



UNIVERSIDADE DO ALGARVE
Faculdade de Ciências e Tecnologias

**Transformação direta de lamas
primárias papeleras em bioprodutos:
um desafio à bioengenharia.**

Diana Filipa Nunes Reis

Dissertação
Mestrado Integrado em Engenharia Biológica

Trabalho efetuado sob a orientação:
Prof. Dr. Raúl Barros
Prof. Dr. Jorge Rocha

2014



UNIVERSIDADE DO ALGARVE
Faculdade de Ciências e Tecnologias

**Transformação direta de lamas
primárias papeleras em bioprodutos:
um desafio à bioengenharia.**

Diana Filipa Nunes Reis

Dissertação
Mestrado Integrado em Engenharia Biológica

Trabalho efetuado sob a orientação:
Prof. Dr. Raúl Barros
Prof. Dr. Jorge Rocha

2014

Declaração de autoria de trabalho

Transformação direta de lamas primárias papeleiras em bioprodutos: um desafio à bioengenharia.

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Diana Filipa Nunes Reis

Agradecimentos

Primeiro de tudo quero agradecer à minha família por todo o apoio e ajuda que me deram, às minhas irmãs Telma e Verónica, aos meus cunhados Luís e Rui, à minha tia Ana e, principalmente à minha mãe que fez tudo o que esteve ao seu alcance e todo o esforço que teve de fazer para me poder dar tudo o que precisava e ao meu pai que apesar de não estar entre nós sei que estará muito orgulhoso de mim.

Quero agradecer ao Professor Jorge Rocha e à Professora Maria Graça Carvalho por me receberem no Departamento de Engenharia Química da Universidade de Coimbra para realizar a investigação para a minha dissertação de mestrado. Também quero agradecer-lhes por me terem orientado e por me receberem tão bem nesta etapa da minha vida. Quero agradecer à Engenheira Cátia Mendes, por me ter ajudado e apoiado sempre, por me ensinar tudo o que sei e por todos os bons momentos que passamos juntas no laboratório B27.

Também quero agradecer ao meu namorado, Marco, pelo apoio que me deu nestes anos de Universidade, por estado sempre lá para mim e, pela paciência que teve comigo. Às minhas amigas da Universidade do Algarve que durante estes anos me acompanharam nesta etapa e pelos momentos que proporcionaram. Às amigas da Residência Albacor, que são como uma família, Maria, Cristina, Sara, Filipa e Joana Ferreira pelos momentos divertidos e pela amizade que ficou entre nós.

Um muito obrigado a todos os professores da Universidade do Algarve e ao meu orientador Professor Raúl Barros, que me acompanharam ao longo deste percurso, ensinando tudo o que sei.

Resumo

Devido à elevada expansão do setor automóvel durante o século XX, levou a um aumento exponencial na produção de CO₂, alterando o ecossistema. Para isso, é necessário procurar alternativas para diminuir os gases de efeito estufa, como recorrer aos combustíveis alternativos, como o bioetanol. Podem ser usados resíduos biológicos da indústria papelreira como biomassa para produção de bioetanol. A estratégia mais usada é a sacarificação e fermentação simultânea (SSF). Apesar de ser mais vantajosa, apresenta um problema, o facto do extrato enzimático e os microrganismos não atuarem à mesma temperatura ótima. Para contornar este problema usou-se um microrganismo termotolerante, a levedura *Kluyveromyces marxianus*, a estirpe mais usada neste tipo de processo. O principal objetivo deste trabalho é valorizar os resíduos da indústria papelreira, chamados de lamas primárias e transformá-los em bioprodutos, como o bioetanol. Realizaram-se ensaios em regime semi-descontínuo e em descontínuo. Como fonte de carbono foi usada a fração de hidratos de carbono (HC) da biomassa com concentração final de 200 g/L. Nos ensaios em semi-descontínuo, com a *Saccharomyces cerevisiae* a concentração máxima de etanol foi de 45,1 g/L ao fim de 72h, com a *K. marxianus* NCYC 1426 foi de 48,6 g/L às 150h a 38°C e, 25,4 g/L às 24h a 42°C. A *S. cerevisiae* ATCC 26602 atingiu uma produção de 43,9 g/L ao fim de 55h. Optou-se por utilizar a *S. cerevisiae* ATCC 26602 nos restantes ensaios a 38°C. Realizaram-se ensaios em descontínuo em erlenmeyer e em biorreator para um aumento de escala. Para os ensaios em erlenmeyer a concentração máxima de etanol foi 13 g/L e 20 g/L e em biorreator foi 10 g/L e 11 g/L para as lamas da Fábrica 2 e 3, em ambos os ensaios. Verifica-se que o aumento de escala em sistemas biológicos deste género torna-se difícil.

Palavras-chave: Biomassa lenho-celulósica; bioetanol; SSF; *S. cerevisiae*; biorreator.

Abstract

The expansion of the automobile industry during the 20th century has led to a high expansion of CO₂ production, making the ecosystem susceptible of suffer severe alterations. For that reason it's became necessary to pursue alternatives to the usage of fossil fuels in order to diminish the levels of GHG emissions, like alternative fuels, bioethanol. We can use biological wastes of paper industry as biomass for production of bioethanol. The most used method for the conversion of biomass in bioethanol is simultaneous saccharification and fermentation (SSF). Despite being the most advantageous strategy, the fact that the microorganisms and the enzymatic extract don't act at the same optimal temperature presents a problem. To go around this problem, a thermotolerant microorganism, *Kluyveromyces marxianus* yeast, was used. The main objective of this work was to value the paper industry waste called primary sludge and turned them into bio products like bioethanol. Testes were realized in fed-batch and batch system. The fraction of carbohydrate (HC) from the biomass was used as carbon source at the concentration of 200 g/L. In the fed-batch tests, with the *S. cerevisiae* the maximum concentration of ethanol was 45,1 g/L at the end of 72h, with *K. marxianus* NCYC 1426 it was 48,6 g/L at 150h and 38°C and, 25,4 g/L at 24h and 42°C. The *S. cerevisiae* ATCC 26602 accomplished a production of 43,9 g/L at the end of 55h. In the rest of the tests, it was chosen to use the *S. cerevisiae* ATCC 26602 at a temperature of 38°C. Assays were performed in batch at erlenmeyer and bioreactor for scale-up. For the results of assays in erlenmeyer, the maximum ethanol concentration was 13 g/L and 20 g/L, and in the bioreactor was 10 g/L and 11 g/L for sludge Factory 2 and 3, in both assays. It is noted that the scaling in biological systems of this kind becomes difficult to do.

Keywords: Lignocellulosic biomass; bioethanol; SSF; *S. cerevisiae*, bioreactor.

Índice

Agradecimentos	iv
Resumo	v
Abstract	vi
Índice de figuras	x
Índice de tabelas	xiv
Abreviaturas.....	xvii
1. Introdução.....	1
1.1. Impacto ambiental.....	1
1.2. Aspetos ambientais	2
1.3. Biomassa	2
1.3.1. Biomassa lenho-celulósica.....	6
1.4. Produção de pasta e papel	8
1.4.1. Processo de produção de pasta (Processo <i>Kraft</i>)	8
1.4.2. Resíduos da indústria do papel.....	10
1.5. Bioetanol	12
1.6. Produção de bioetanol.....	12
1.6.1. Hidrólise.....	13
1.6.1.1. Hidrólise ácida.....	13
1.6.1.2. Hidrólise enzimática	14
1.6.2. Fermentação alcoólica.....	15

1.7.	Microrganismos	19
1.8.	Estratégias de produção de bioetanol	20
1.8.1.	Hidrólise e Fermentação em Separado (SHF – Separated Hydrolysis and Fermentation)	21
1.8.2.	Sacarificação e Fermentação em Simultâneo (SSF – <i>Simultaneous Saccharification and Fermentation</i>)	22
1.8.3.	Sacarificação e Co-fermentação Simultânea (SSCF – <i>Simultaneous Saccharification and Cofermentation</i>)	24
1.8.4.	Bioprocesso Consolidado (CBP).....	24
1.9.	Objetivos de trabalho	25
2.	Materiais e métodos.....	26
2.1.	Biomassa.....	26
2.2.	Leveduras usadas em SSF	27
2.2.1.	Avaliação da cinética de crescimento das leveduras a diferentes temperaturas	28
2.3.	Extrato enzimático.....	29
2.4.	Procedimento SSF.....	30
2.4.1.	Escala erlenmeyer.....	31
2.4.2.	Escala biorreator de bancada.....	33
2.5.	Método de determinação dos açúcares redutores	34
2.6.	Método de Bradford.....	34
2.7.	Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).....	35
2.8.	Parâmetros SSF	35
3.	Resultados e discussão	38

3.1.	Avaliação do crescimento das leveduras	38
3.2.	Ensaio SSF (erlenmeyer) em regime semi-descontínuo (fed-batch)	41
3.2.1.	Ensaio com a levedura <i>S. cerevisiae</i>	42
3.2.2.	Ensaio com a levedura <i>K. marxianus</i> NCYC 1426	47
3.2.3.	Ensaio com a levedura <i>S. cerevisiae</i> ATCC 26602	52
3.2.4.	Estudo com nova enzima – NS 22192.....	57
3.2.5.	Otimização da carga enzimática	64
3.2.5.1.	Pasta Crua (DEQ)	64
3.2.5.2.	Lamas primárias (Fábrica 3).....	66
3.2.6.	Ensaio com carga enzimática otimizada.....	69
3.3.	Ensaio SSF (erlenmeyer) em regime descontínuo (batch)	73
3.3.1.	Ensaio com a levedura <i>S. cerevisiae</i> ATCC 26602	73
3.4.	Ensaio SSF (Reator de bancada) em regime descontínuo.....	80
3.5.	Estudo da produção de subprodutos	85
4.	Conclusão	89
5.	Bibliografia.....	91
6.	Anexos.....	i
	Anexo I. Caracterização das amostras de biomassa lenho-celulósica	i
	Anexo II. Atividade enzimática dos extratos enzimáticos	vii
	Anexo III. Determinação quantitativa dos açúcares redutores e a preparação da solução de tampão citrato a 0,05 M	ix
	Anexo IV. Quantificação de compostos por HPLC e os seus tempos de retenção	xiii
	Anexo V. Ensaio SSF com lamas primárias diferentes.....	xvii

Índice de figuras

Figura 1.1: Conversão de algumas matérias-primas em biocombustíveis líquidos.	4
Figura 1.2: Representação esquemática de matérias-primas de primeira geração utilizadas para produção de bioetanol.	5
Figura 1.3: A estrutura das ligações químicas da molécula da celulose.	6
Figura 1.4: Exemplo de um troço da estrutura molecular da hemicelulose.	7
Figura 1.5: Unidade de fenil-propano, constituinte da estrutura molecular da lenhina.	8
Figura 1.6: Esquema representativo da ETAR de uma fábrica de pasta papelreira.	11
Figura 1.7: Representação esquemática da ação catalítica do complexo enzimático celulítico sobre a celulose com a produção de glucose.	15
Figura 1.8: Conversão de glucose em etanol na fermentação alcoólica.	16
Figura 1.9: Perfil de um processo de fermentação descontínua ao longo do tempo. .	17
Figura 1.10: Perfis de fermentação contínua, em estado estacionário, ao longo do tempo.	18
Figura 1.11: Produção de etanol pelo processo SHF.	21
Figura 1.12: Produção de etanol pelo processo SSF.	23
Figura 2.1: Diferentes biomassas lenho-celulósicas usadas nos ensaios SSF.	26
Figura 2.2: Esquema representativo de um processo SSF.	31
Figura 3.1: Curva de crescimento da a) <i>S. cerevisiae</i> (comercial), b) <i>S. cerevisiae</i> ATCC 26602 e c) <i>K. marxianus</i> NCYC 1426, para as temperaturas de 30, 38 e 42°C. 40	40
Figura 3.2: Evolução da concentração de a) etanol e b) açúcares redutores, em regime semi-descontínuo usando lama primária e pasta crua com a <i>S. cerevisiae</i> e a celulase Cellic® CTec2.	43
Figura 3.3: Evolução da concentração de a) etanol e b) açúcares redutores, em regime semi-descontínuo usando lama primária e pasta crua com a <i>K. marxianus</i> NCYC 1426 e a celulase Cellic® CTec2, a 38°C.	48

Figura 3.4: Evolução da concentração de a) etanol e b) açúcares redutores, em regime semi-descontínuo usando lama primária e pasta crua com a <i>K. marxianus</i> NCYC 1426 e a celulase Cellic® CTec2, a 42°C.....	48
Figura 3.5: Evolução da concentração de a) etanol e b) açúcares redutores em regime semi-descontínuo usando lama primária e pasta crua com a <i>S. cerevisiae</i> ATCC 26602 e a celulase Cellic® CTec2, a 38°C.....	53
Figura 3.6: Evolução da produção de etanol em regime semi-descontínuo a 38°C, usando a <i>S. cerevisiae</i> ATCC 26602 e a celulase NS 22192, para os ensaios E1 (esterilizado e com glucose), E2 (esterilizado e sem glucose), E3 (não esterilizado e com glucose) e E4 (não esterilizado e sem glucose).....	58
Figura 3.7: Evolução da produção de etanol em regime semi-descontínuo a 38°C, usando a <i>S. cerevisiae</i> ATCC 26602 e a celulase NS 22192, para os ensaios esterilizados e não esterilizados, usando a pasta crua.	60
Figura 3.8: Evolução da concentração de a) etanol e b) açúcares redutores em regime semi-descontínuo usando lama primária da fábrica 2 com a <i>S. cerevisiae</i> ATCC 26602 e a celulase NS 22192, a 38°C.....	62
Figura 3.9: Evolução da produção de etanol em regime semi-descontínuo a 38°C, com pasta crua usando a <i>S. cerevisiae</i> ATCC 26602 e a celulase NS 22192, com otimização da carga enzimática.	65
Figura 3.10: Evolução da produção de etanol em regime semi-descontínuo a 38°C, com lamas priárias usando a <i>S. cerevisiae</i> ATCC 26602 e a celulase NS 22192, com otimização da carga enzimática.	67
Figura 3.11: Evolução da concentração de a) etanol e b) açúcares redutores em regime semi-descontínuo com a <i>S. cerevisiae</i> ATCC 26602 e a celulase NS 22192, a 38°C, para as lamas primárias da Fábrica 2 e 3.....	69
Figura 3.12: Representação dos diferentes ensaios realizados em regime descontínuo, a 38°C, usando a <i>S. cerevisiae</i> ATCC 26602 e a celulase NS 22192.....	74
Figura 3.13: Evolução da concentração de a) etanol e b) açúcares redutores em regime descontínuo com a <i>S. cerevisiae</i> ATCC 26602 e 15 FPU/g _{HC} de celulase NS	

22192, a 38°C, para as lamas primárias da Fábrica 2 e 3, com uma carga de hidratos de carbono de 150 g/L	75
Figura 3.14: Evolução da concentração de a) de etanol e b) açúcares redutores em regime descontínuo com a <i>S. cerevisiae</i> ATCC 26602 e 5 FPU/g _{HC} de celulase NS 22192, a 38°C, para as lamas primárias da Fábrica 2 e 3, com carga de hidratos de carbono de 150 g/L.	77
Figura 3.15: Foto dos ensaios em erlenmeyer no início do processo SSF de lamas primárias com uma carga de 150 g/L de hidratos de carbono.	79
Figura 3.16: Foto dos ensaios em erlenmeyer no final do processo SSF.	79
Figura 3.17: Evolução da concentração de a) etanol e b) açúcares redutores, num processo SSF em erlenmeyer, em regime descontínuo com a <i>S. cerevisiae</i> ATCC 26602 e 15 FPU/g _{HC} da celulase NS 22192, a 38°C, para as lamas primárias da Fábrica 2 e 3, com carga de hidratos de carbono de 50 g/L.	81
Figura 3.18: Evolução da concentração de a) etanol e b) açúcares redutores, num processo SSF no biorreator, em regime descontínuo com a <i>S. cerevisiae</i> ATCC 26602 e 15 FPU/g _{HC} da celulase NS 22192, a 38°C, para as lamas primárias da Fábrica 2 e 3, com carga de hidratos de carbono de 50 g/L.	83
Figura 3.19: Foto do biorreator no início do processo SSF em regime descontínuo a 38°C.	84
Figura 3.20: Representação de um cromatograma obtido num ensaio SSF, com a deteção de um subproduto.	85
Figura 3.21: Evolução do processo de fermentação de a) 50 g/L de glucose, b) 50 g/L xilose e c) 40 g/L glucose + 10 g/L xilose, com a <i>S. cerevisiae</i> ATCC 26602.	87
Figura 6.1: Relaciona a densidade ótica a 540nm com a concentração de glucose (mg/mL).	xii
Figura 6.2: Representação do gráfico de calibração da glucose para as análises das amostras injetadas no HPLC.	xv
Figura 6.3: Representação do gráfico de calibração da xilose para as análises das amostras injetadas no HPLC.	xvi

Figura 6.4: Representação do gráfico de calibração da glucose para as análises das amostras injetadas no HPLC.	xvi
Figura 6.5: Representação da produção de etanol ao longo do tempo para o ensaio SSF com as lamas da fábrica 3, a 38°C.....	xviii
Figura 6.6: Representação das lamas primárias da fábrica 4 após terem sido guardadas numa camara frigorífica.	xviii

Índice de tabelas

Tabela 1.1: Composição química da madeira <i>Eucalyptus globulus</i> , usada como fonte de biomassa lenho-celulósica.	8
Tabela 1.2: Exemplo de leveduras mais usadas em processos de produção de etanol.	20
Tabela 2.1: Composição dos diferentes tipos de lamas primárias e pasta crua.	27
Tabela 2.2: Composição do meio universal para leveduras.	28
Tabela 2.3: Atividade enzimática das enzimas a duas temperaturas.	29
Tabela 2.4: Quantidade de proteína e de açúcares nas duas enzimas usadas.	30
Tabela 2.5: Quantidades necessárias de biomassa lenho-celulósica (em base húmida) e de tampão citrato 0,05 M, a pH 5,0, usadas nos ensaios SSF.	32
Tabela 2.6: Quantidades necessárias de biomassa lenho-celulósica (em base húmida), para os ensaios SSF em maior escala.	33
Tabela 3.1: Utilização de diferentes matérias-primas e microrganismos, em processos SSF.	38
Tabela 3.2: Taxa específica de crescimento para as diferentes estirpes às temperaturas 30, 38 e 42°C.	41
Tabela 3.3: Valores de rendimento (%), produtividade (g/(L.h)) e do pH em regime semi-contínuo, usando lama primária e pasta crua a 38°C, com a <i>S. cerevisiae</i> e a celulase Cellic® CTec2.	46
Tabela 3.4: Valores de rendimento (%), produtividade (g/(L.h)) e do pH em regime semi-contínuo, usando lama primária e pasta crua a 38°C, com a <i>K. marxianus</i> NCYC 1426 e a celulase Cellic® CTec2.	51
Tabela 3.5: Valores de rendimento (%), produtividade (g/(L.h)) e do pH em regime semi-contínuo, usando lama primária e pasta crua a 42°C, com a <i>K. marxianus</i> NCYC 1426 e a celulase Cellic® CTec2.	51
Tabela 3.6: Valores de rendimento (%), produtividade (g/(L.h)) e do pH em regime semi-contínuo, usando lama primária e pasta crua a 38°C, com a <i>S. cerevisiae</i> ATCC 26602 e a celulase Cellic® CTec2.	55

Tabela 3.7: Valores de rendimento (%), produtividade (g/(L.h)) em regime semi-contínuo, usando lama primária a 38°C, com a <i>S. cerevisiae</i> ATCC 26602 e a celulase NS 22192, para os ensaios E1, E2, E3 e E4.....	59
Tabela 3.8: Valores de rendimento (%), produtividade (g/(L.h)) e pH em regime semi-contínuo, usando lama primária a 38°C, com a <i>S. cerevisiae</i> ATCC 26602 e a celulase NS 22192, para os ensaios esterilizado e não esterilizado.....	61
Tabela 3.9: Valores de rendimento (%), produtividade (g/(L.h)) e pH em regime semi-contínuo, usando lama primária (Fábrica 2) a 38°C, com a <i>S. cerevisiae</i> ATCC 26602 e a celulase NS 22192.....	63
Tabela 3.10: Valores de rendimento (%), produtividade (g/(L.h)) e pH em regime semi-contínuo, usando pasta crua a 38°C, com a <i>S. cerevisiae</i> ATCC 26602 e a celulase NS 22192, com otimização da carga enzimática.	66
Tabela 3.11: Valores de rendimento (%), produtividade (g/(L.h)) e pH em regime semi-contínuo, usando lama primária a 38°C, com a <i>S. cerevisiae</i> ATCC 26602 e a celulase NS 22192, com otimização da carga enzimática.	68
Tabela 3.12: Valores de rendimento (%), produtividade (g/(L.h)) e pH em regime semi-contínuo, usando lamas primárias da Fábrica 2 e 3 a 38°C, com a <i>S. cerevisiae</i> ATCC 26602 e a celulase NS 22192.	72
Tabela 3.13: Valores de rendimento (%), produtividade (g/(L.h)) e pH em regime descontínuo, usando lamas primárias da Fábrica 2 e 3 a 38°C, com a <i>S. cerevisiae</i> ATCC 26602 e 15 FPU/g _{HC} da celulase NS 22192.	76
Tabela 3.14: Valores de rendimento (%), produtividade (g/(L.h)) e pH em regime descontínuo, usando lamas primárias da Fábrica 2 e 3 a 38°C, com a <i>S. cerevisiae</i> ATCC 26602 e 5 FPU/g _{HC} da celulase NS 22192.	78
Tabela 3.15: Valores de rendimento (%), produtividade (g/(L.h)) e pH obtidos no SSF em erlenmeyer em regime descontínuo, usando lamas primárias da Fábrica 2 e 3 a 38°C, com a <i>S. cerevisiae</i> ATCC 26602 e 15 FPU/g _{HC} da celulase NS 22192, com uma carga única de 50 g/L de hidratos de carbono.	82

Tabela 3.16: Valores de rendimento (%), produtividade (g/(L.h)) e pH obtidos no SSF no biorreator em regime descontínuo, usando lamas primárias da Fábrica 2 e 3 a 38°C, com a <i>S. cerevisiae</i> ATCC 26602 e 15 FPU/g _{HC} da celulase NS 22192, com uma carga única de 50 g/L de hidratos de carbono.	84
Tabela 6.1: Quantidades necessárias de solução stock de glucose, volume de tampão e a concentração de glucose para se poder realizar a curva de calibração.....	xi
Tabela 6.2: Nome dos compostos com os respetivos tempos de retenção	xv
Tabela 6.3: Valores percentuais da caracterização das diferentes lamas primárias..	xvii

Abreviaturas

°C – Graus Celsius;

μ - Taxa específica de crescimento;

μm - Micrómetros

CBP – Bioprocesso consolidado;

CO₂ – Dióxido de carbono;

CaCO₃ – Carbonato de cálcio;

CELPA – Associação da Indústria Papeleira

D.O. – Densidade ótica;

DNS – Ácido 3,5 – dinitrosalicílico;

ETAR – Estação de Tratamento de Águas Residuais;

FPU – Unidade de papel de filtro;

g – Grama;

GHG – Greenhouse gas

h – Hora;

HC – Hidratos de carbono;

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência

L – Litro;

ln – Logaritmo neperiano

min – Minuto;

mL – Mililitro;

mm – Milímetro;

nm – Nanómetros;

NREL – Laboratório Nacional de Energia Renovável;

Prod. – Produtividade de etanol (g/(L.h));

R_{ETOH} – Rendimento em etanol (%);

rpm – Rotação por minuto;

SSCF – Sacarificação e co-fermentação simultâneo;

SHF – Hidrólise e fermentação em separado;

SSF – Sacarificação e fermentação em simultâneo;

t – Tempo;

UV – Ultravioleta;

Vis – Visível;

YM – Meio líquido universal para leveduras.

1. Introdução

1.1. Impacto ambiental

A indústria papelreira portuguesa produz cerca de 350 000 toneladas de lamas (primárias e biológicas) por ano, de acordo com o Boletim Estatístico da CELPA (Associação da Indústria Papelreira). Estas lamas são geralmente aplicadas na agricultura e na compostagem, sendo que a sua eliminação pode acarretar custos adicionais à papelreira que as produz. Uma vez que as lamas primárias são ricas em fibras celulósicas, estes resíduos sólidos poderiam ser aproveitados para a obtenção de produtos de valor acrescentado. Deste modo, a empresa teria uma solução ambientalmente mais favorável para a eliminação das lamas e aumentaria o seu leque de produtos, contribuindo para o aumento da sua competitividade económica.

A produção de bioetanol a partir de materiais orgânicos ricos em celulose, como é o caso das lamas primárias, é considerada uma tecnologia promissora para atender um dos maiores desafios para a sociedade de hoje: a substituição de combustíveis fósseis por biocombustíveis, no setor de transportes (Linde *et al.* 2007). A tremenda expansão do sector automóvel durante o século passado levou ao aumento exponencial da produção de dióxido de carbono, causando grandes alterações no ecossistema da Terra. Por esta razão, é necessário a colaboração mundial de modo a reduzir o impacto dos gases de efeito estufa sobre o clima (Kádár *et al.* 2004). A substituição dos combustíveis fósseis por biocombustíveis diminui a libertação de dióxido de carbono para a atmosfera quando ocorre combustão. Contribui-se assim para a diminuição da emissão dos gases de efeito estufa e, portanto, para o abrandamento do aquecimento global (Eduardo *et al.* 2009). Um dos principais parâmetros que contribuem para o custo da produção do bioetanol é o preço da matéria-prima. No entanto, podem ser utilizados resíduos industriais, como as lamas primárias, de modo a reduzir os custos (Kádár *et al.* 2004).

1.2. Aspetos ambientais

Os custos da biomassa lenho-celulósica dependem principalmente dos custos da matéria-prima, ou seja, os custos da madeira e dos resíduos de papel, que podem variar dependendo da localidade e dos transportes a serem usados. Estes custos vão representar a despesa principal na produção de bioetanol. No caso da utilização de matérias-primas de primeira geração (milho, cana-de-açúcar) normalmente é de 50-80% dos custos totais, enquanto os custos da matéria-prima de segunda geração (biomassa lenho-celulósica) são apenas $\approx 40\%$ dos custos totais, uma diferença significativa. No futuro, os custos da produção da matéria-prima lenho-celulósica serão menores, devido aos avanços das tecnologias (Walker, 2010).

A obtenção de um produto de valor acrescentado, como o bioetanol, pode proporcionar uma opção economicamente mais atrativa, uma vez que a biomassa lenho-celulósica, neste caso, as lamas primárias, um resíduo das indústrias de fabrico de pasta e papel, pode ter um custo zero, ou até mesmo negativo, uma vez que a empresa tem de encontrar um destino final para as lamas (compostagem, aterro, etc.), cuja ação pode ter custos (Kádár *et al.* 2004).

1.3. Biomassa

A biomassa é a fração biodegradável de produtos, resíduos e detritos de origem biológica provenientes da agricultura (incluindo substâncias de origem vegetal e animal), da exploração florestal e de indústrias afins, incluindo a pesca e a da aquicultura, bem como a fração biodegradável dos resíduos industriais e urbanos (Directiva CE/28/2009, 2009).

A biomassa é maioritariamente produzida por plantas que convertem luz solar através da fotossíntese e inclui toda a vegetação à base de água do solo, assim como

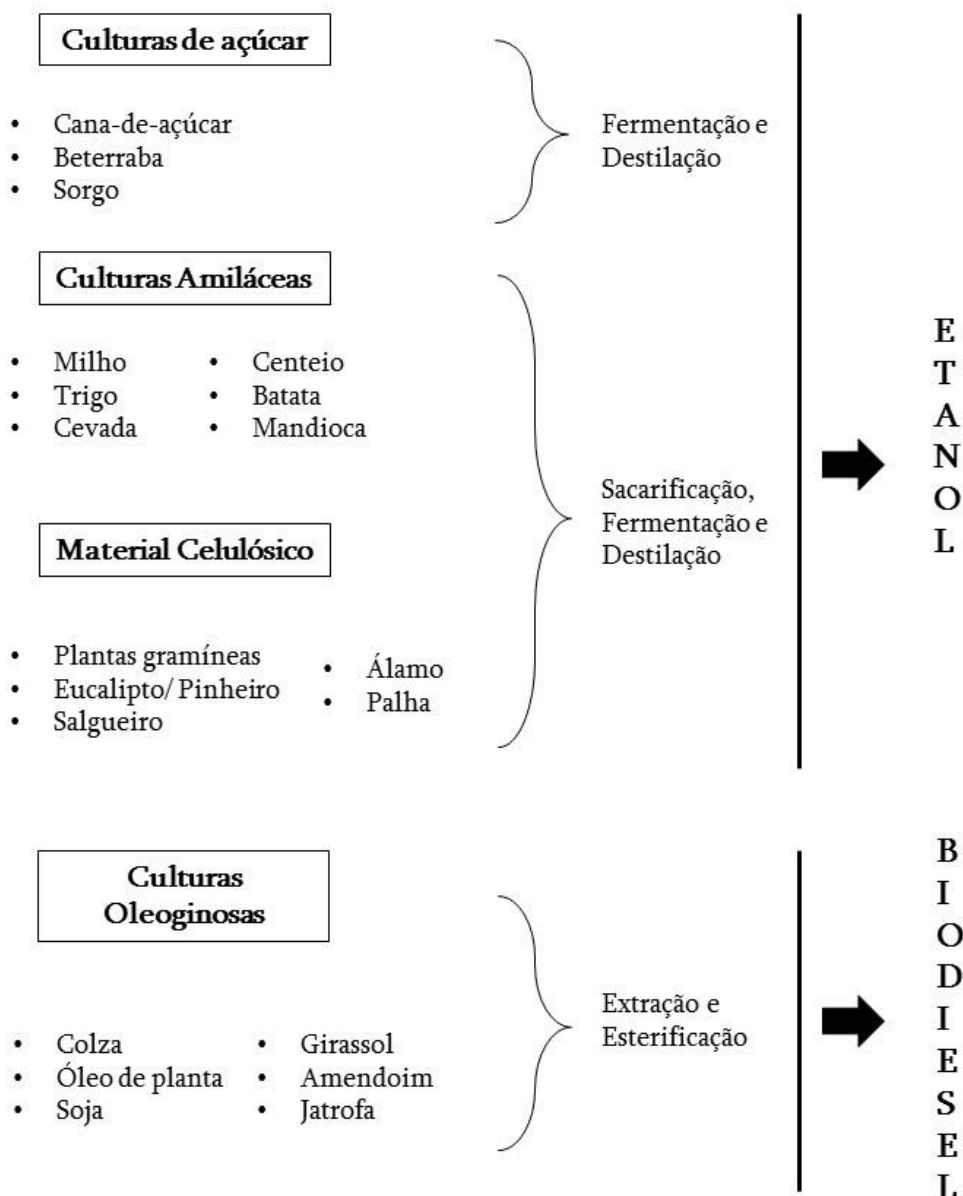
todos os resíduos orgânicos. A biomassa sempre foi uma fonte de energia para a humanidade e atualmente estima-se que contribui na ordem dos 10-14% da oferta global de energia.

A biomassa é o material vegetal derivado da reação entre o CO₂ no ar, a água e a luz solar, através da fotossíntese, para formar os hidratos de carbono que formam os blocos de construção da biomassa. Está disponível numa base renovável, quer por processos naturais, ou pode ser disponibilizada como um subproduto de atividades humanas, isto é, resíduos orgânicos (McKendry, 2002).

A biomassa tradicional, incluindo lenha, carvão e estrume de animal, continua a fornecer importantes fontes de energia em muitas partes do mundo (FAO, 2008).

O uso da biomassa contendo açúcares que podem ser fermentados diretamente para etanol é a maneira mais simples de produzir etanol. Estas fontes de carbono incluem vários tipos de resíduos, tais como resíduos da indústria de alimentos, resíduos pós-colheita deixados nos campos, estrume de animal, restos de madeira da silvicultura e da indústria, resíduos de indústria de alimentos e de papel, resíduos sólidos urbanos, lamas de depuração e de biogás a partir da digestão de resíduos orgânicos agrícolas e outros (FAO, 2008).

A figura 1.1 representa a conversão de algumas matérias-primas em biocombustíveis líquidos.

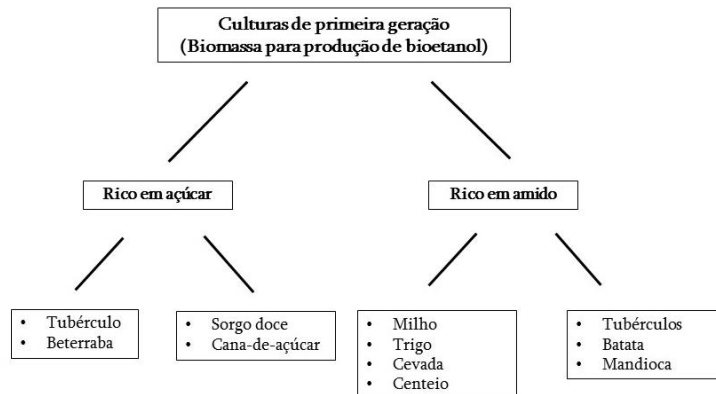


Fonte: adaptado de FAO, 2008

Figura 1.1: Conversão de algumas matérias-primas em biocombustíveis líquidos.

Em geral, o etanol pode ser obtido de qualquer tipo de material de hidratos de carbono que têm a fórmula típica de $(CH_2O)_n$ e podem ser divididos em dois grupos: biomassa de primeira geração e a de segunda geração.

Matérias-primas de primeira geração referem-se principalmente a fontes de biomassa vegetal, que também são fontes de nutrição humana e animal (Tomás-Pejó *et al.* 2008), como estão representadas na figura 1.2.



Fonte: adaptado de FAO, 2008

Figura 1.2: Representação esquemática de matérias-primas de primeira geração utilizadas para produção de bioetanol.

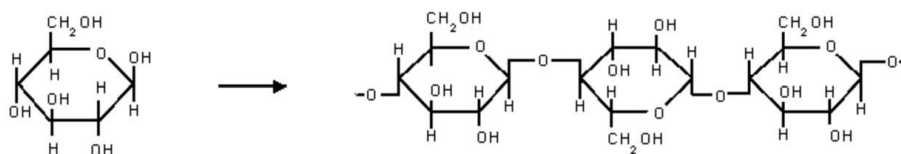
Os biocombustíveis são originados, em geral, de plantas que exigem áreas de cultivo extensas. Mesmo que no momento não haja conflito no uso de terra para biocombustíveis e alimentos, isso poderá verificar-se a longo prazo, se o volume de petróleo a substituir for significativo (Pacheco, 2011). Para evitar atingir o limite de oferta ou que haja competição pelo uso da terra para a geração de energia e produção de alimentos torna-se necessário investir no desenvolvimento de tecnologias de segunda geração para produzir etanol. O etanol de segunda geração é produzido a partir de biomassa lenho-celulósica, presente em resíduos de origem vegetal (Pacheco, 2011), ou seja, é uma fonte de biomassa não alimentar e representa a forma mais abundante de carbono na terra (FAO, 2008). Essa segunda geração representa uma alternativa para o uso energético de biomassa, apresentando vantagens ambientais e económicas. Um fator ambiental relativo à utilização de biomassa de segunda geração é que existe uma maior redução na emissão de gases com efeito de estufa (Olofsson *et al.* 2008).

1.3.1. Biomassa lenho-celulósica

A biomassa lenho-celulósica é a fonte renovável mais abundante na Terra, compreende cerca de 50% da biomassa mundial.

A composição deste tipo de biomassa depende da espécie de planta e consiste principalmente em celulose (30-50% da massa total), hemicelulose e lenhina (Fernandes *et al.* 2010).

A celulose (figura 1.3) é o componente principal da madeira e a sua fórmula geral é $(C_6H_{10}O_5)_n$, onde 'n' é o grau de polimerização médio e é classificado como polissacarídeo ou hidrato de carbono. É descrita como um β -polissacarídeo composto por unidades repetidas de celobiose (dissacarídeo) unidas por ligações glicosídicas do tipo β -(1,4). Nas paredes das células vegetais, as cadeias de celulose agregam-se em fibrilas que se vão associar para construir a parede da fibra. Quando ocorre hidrólise, a celulose resulta em vários monómeros de açúcar, a glucose (Fernandes *et al.* 2010).



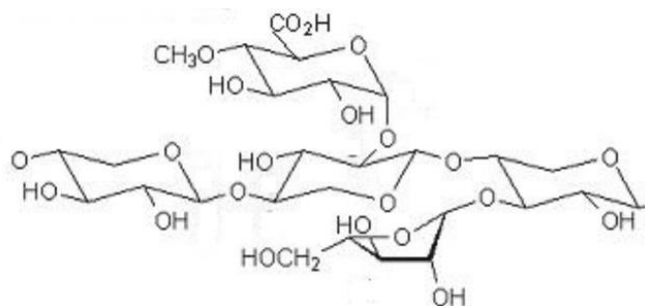
Fonte: Eduardo *et al.* 2009

Figura 1.3: A estrutura das ligações químicas da molécula da celulose.

Outro constituinte da madeira são as hemiceluloses, que contribuem cerca de 10-40% para o material da planta. São polissacarídeos constituídos por pentoses, principalmente xilose e arabinose, e por hexoses, principalmente manose, galactose e glucose (Walker, 2010).

As hemiceluloses (figura 1.4) referem-se a uma mistura de polímeros de hexoses, pentoses e ácidos urónicos que podem ser lineares ou ramificados, são amorfos e possuem peso molecular relativamente baixo. São uma classe de diversos

polissacarídeos, que, em parte, estão ligados por pontes de hidrogénio à celulose. São divididas em pentosanas e hexosanas. As pentosanas quando sujeitas a hidrólise resultam em pentoses (xilose e arabinose), que são monossacarídeos que apresentam na sua estrutura cinco átomos de carbono (Palmqvist & Hahn-Hägerdal, 2000).



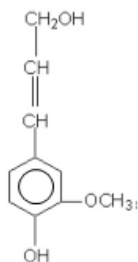
Fonte: (Eduardo *et al.* 2009)

Figura 1.4: Exemplo de um troço da estrutura molecular da hemicelulose.

A lenhina (figura 1.5), outro constituinte da madeira, é uma substância química que confere rigidez à parede celular e mantém as células ligadas entre si (Walker, 2010). É das macromoléculas mais abundante da Terra, constituída por unidades de fenil-propano não fermentáveis e, está diretamente envolvida nas ligações entre moléculas de xilanas e outros polissacarídeos. Apesar de ser um composto macromolecular aromático, a lenhina difere dos outros componentes presentes na biomassa vegetal, na medida em que a sua estrutura tridimensional não possui ligações repetitivas entre os resíduos monoméricos constituintes da macromolécula (Ferreira, 2010).

Devido à sua complexidade estrutural, a lenhina apresenta-se como uma barreira à ação das celulasas e hemicelulasas (Ferreira, 2010). A sua presença é um problema importante para o processo de conversão de biomassa, porque a estrutura física da lenho-celulose é intrinsecamente resistente à enzima de ataque, principalmente da celulose, que está protegida pela matriz envolvente da lenhina, hemicelulose e pectina (Vásquez *et al.* 2007).

Para os processos de produção de bioetanol, a lenhina apresenta alguns efeitos negativos como a inibição da celulase e, conseqüentemente a inibição da fermentação, pelo que em alguns casos a biomassa é submetida a pré-tratamentos para se conseguir retirar parte da lenhina existente (Walker, 2010).



Fonte: Walker, 2010

Figura 1.5: Unidade de fenil-propano, constituinte da estrutura molecular da lenhina.

A indústria papeleira portuguesa usa principalmente a madeira de *Eucalyptus globulus* como matéria-prima. A maior parte das unidades de açúcar provenientes da hidrólise dos correspondentes hemiceluloses é composta por xilose (Duff & Murray, 1996). Na tabela 1.1, encontra-se representada a composição química da madeira de *Eucalyptus globulus*.

Tabela 1.1: Composição química da madeira *Eucalyptus globulus*, usada como fonte de biomassa lenho-celulósica.

	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lenhina (%)
<i>Eucalyptus globulus</i>	50	13	28

Fonte: Walker, 2010

1.4. Produção de pasta e papel

1.4.1. Processo de produção de pasta (Processo *Kraft*)

A matéria-prima a ser selecionada depende do tipo de pasta ou de papel que se pretende produzir, sendo que a mais utilizada é a madeira, embora também se

possam usar outros materiais, como fibras de algodão cru e até mesmo papéis já utilizados (processo de reciclagem). Em Portugal, a espécie mais usada para a produção de pasta e papel é a espécie *Eucalyptus globulus*, porque o seu período de maturação é curto em relação a outras espécies (aproximadamente 12 anos), permitindo um melhor controlo do ciclo de crescimento das árvores, otimizando a produção.

Depois de atingir o ponto de maturação as árvores utilizadas no processo são derrubadas e cortadas em fragmentos, chamados toros, para serem transportados para a fábrica. Na fábrica são retiradas as cascas aos toros, porque são ricas em lenhina e possuem um teor muito baixo de fibras, de modo a não prejudicarem a qualidade da pasta produzida. As cascas vão ser adicionadas à caldeira de biomassa para produzir energia e os toros sem casca são encaminhados ao destroçador a fim de transformá-los em aparas com dimensões adequadas, que são depois crivadas para permitir um cozimento mais homogéneo. O cozimento (o cozimento *Kraft* é o mais utilizado na indústria papelreira portuguesa) dá-se num equipamento denominado digestor. Adicionam-se as aparas e o licor de reagentes (licor branco), constituído por hidróxido de sódio (NaOH) e sulfureto de sódio (Na₂S), como agentes químicos. Durante o cozimento dá-se a dissolução da lenhina (cerca de 90%) e a separação das fibras. As aparas juntamente com o licor branco sofrem um aquecimento, sob pressão, cuja operação pode ser contínua ou descontínua (Gonçalves *et al.* 2007; Carvalho, 1999).

O resultado do cozimento contém as aparas cozidas (pasta) e o licor negro impregnado com lenhina, hemiceluloses e outros compostos solubilizados durante a etapa de cozimento. A etapa seguinte, a lavagem, tem como objetivo, separar o licor negro (material não celulósico dissolvido) da pasta, para que a pasta possa ser encaminhada para a etapa seguinte, o branqueamento, enquanto o licor negro é enviado para o ciclo de recuperação (Piotto, 2003).

No início da etapa de branqueamento a pasta obtida após a lavagem apresenta uma cor acastanhada devido aos grupos cromóforos provenientes da lenhina ainda

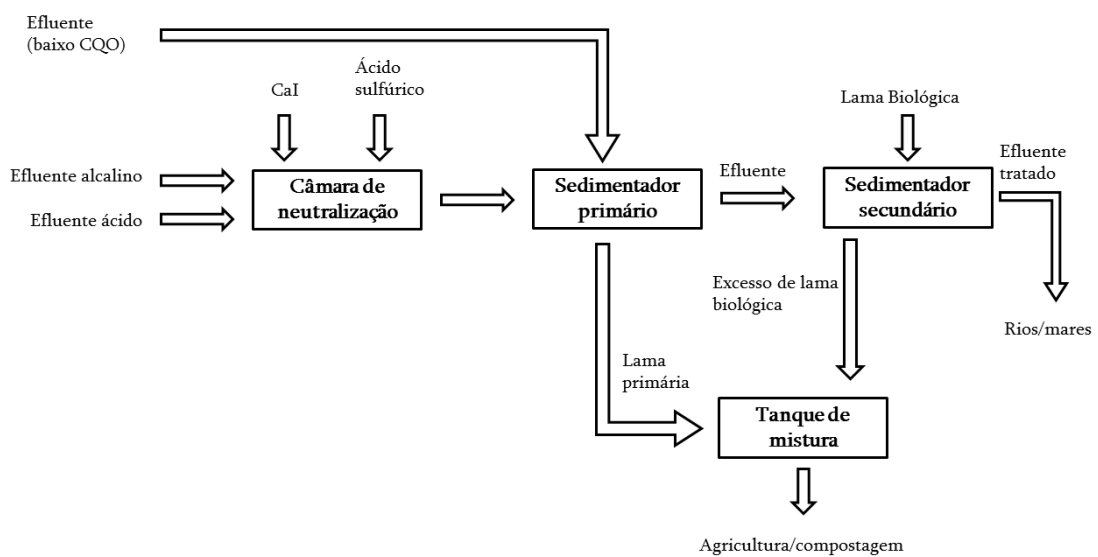
presentes. Esta fase é importante quando o objetivo é produzir papéis brancos. Aqui, vão ser utilizados diferentes produtos químicos para retirar a lenhina restante da pasta, que vão promover a destruição dos grupos cromóforos existentes na lenhina, sem afetar a estrutura fibrilar da pasta. Atualmente, o branqueamento é alcançado através de processos sequenciais contínuos utilizando diferentes condições e produtos químicos em cada estágio, intercalados com lavagem (Gonçalves *et al.* 2007; Carvalho, 1999).

Segue-se, por fim, a etapa de secagem, que consiste em retirar a água residual da pasta branqueada até atingir 95% de pasta seca. Depois de secar, a pasta é cortada e embalada em fardos para ser transportada para as fábricas de papel (Carvalho, 1999; Piotto, 2003).

1.4.2. Resíduos da indústria do papel

Define-se como resíduo das indústrias de base florestal as sobras que ocorrem no processamento mecânico, físico ou químico, e que não são incorporadas no produto final. Os resíduos gerados nas indústrias de pasta e papel incluem cinzas provenientes da caldeira, resíduos florestais, resíduos celulósicos, lamas biológicas (lamas secundárias) e químicos residuais. Os efluentes gerados ao longo do processo de produção de pasta e papel são encaminhados para a Estação de Tratamento de Águas Residuais (ETAR) (Kádár *et al.* 2004) e são submetidos a tratamentos. Os efluentes ácidos e alcalinos são misturados numa câmara de neutralização, caso seja necessário ajustar o pH para neutro, com ácido ou base. Do tratamento primário obtêm-se, a partir do sedimentador primário, as lamas primárias que resultaram do processo de sedimentação, onde a água é bombeada para tanques para se remover os sólidos depositados. Estas lamas têm na sua composição, em base seca, cerca de 45-60% (m/m) de hidratos de carbono (celulose e hemicelulose), 5-20% (m/m) de lenhina e 35-50% (m/m) de matéria inorgânica (cinzas, principalmente CaCO_3). Na etapa

seguinte, a água resultante do processo anterior é direcionada para um biorreator, que por ação biológica promove a assimilação dos sólidos orgânicos dissolvidos no efluente. No fim do tratamento biológico do efluente tratado passa pelo sedimentador secundário e é adequado para descarga em rios ou mares, sendo as lamas secundárias misturadas com as lamas secundárias num tanque de mistura, onde vão ser encaminhadas para agricultura e compostagem, como mostra a figura 1.6 (Scott & Smith, 1995).



Fonte: adaptado de Menezes, 2013

Figura 1.6: Esquema representativo da ETAR de uma fábrica de pasta papelreira.

Como matéria-prima para a obtenção de bioetanol, as lamas primárias da indústria papelreira têm um custo, que é essencialmente zero e pode até ser um custo negativo (Kang *et al.* 2010). A utilização das lamas primárias em processos fermentativos confere assim um valor acrescentado, através da qual deixam de ser um resíduo e passam a ser consideradas uma matéria-prima, que se pode usar na obtenção de bioetanol.

1.5. Bioetanol

O bioetanol é o álcool obtido através da fermentação, ou seja, refere-se ao álcool etílico produzido por processos de fermentação microbiana. Pode ser usado como um combustível líquido, bebidas alcoólicas, em células de combustível de sistemas de cogeração e combustível para energia elétrica (Walker, 2010).

A principal vantagem do bioetanol é ser um combustível renovável e não um contribuinte líquido para as emissões de gases de efeito estufa (ao contrário dos combustíveis fósseis), devido à baixa toxicidade para o ambiente. As desvantagens incluem um maior consumo de combustível, a insustentabilidade de algumas fontes de biomassa e a competição com o setor alimentar (Walker, 2010), no caso de utilização de biomassa de primeira geração. No caso da utilização de biomassa de segunda geração, já não existe a competição com o setor alimentar.

Existe um potencial para a produção de bioetanol principalmente devido a fatores como:

- Variação significativa dos preços mundiais do petróleo bruto;
- Preocupações de segurança internacionais em regiões que contém recursos de petróleo bruto;
- Potencial para melhorar a balança comercial;
- Preocupações ambientais e o potencial de amenizar as alterações climáticas através da redução de emissões de gases de efeito estufa (Walker, 2010).

1.6. Produção de bioetanol

Pode dizer-se de uma maneira simples que a obtenção de bioetanol a partir de biomassa envolve duas etapas. A primeira consiste na hidrólise dos polissacarídeos,

originando mono e dissacarídeos. A segunda etapa envolve a fermentação dos monos e dissacarídeos. Para se obter o bioetanol puro é necessário passar por uma fase denominada por destilação. A destilação é utilizada para separar misturas, isto significa isolar os componentes que podem ser sólidos e líquidos ou apenas só líquidos. O bioetanol é obtido através da destilação fracionada do mosto fermentado onde o álcool vai ser separado dos restantes componentes. Como o álcool evapora mais rápido do que os restantes componentes, fazendo com que seja condensado para outro recipiente, obtendo assim cerca de 96% de bioetanol e 4%.

1.6.1. Hidrólise

Vários métodos foram propostos para a hidrólise de material lenho-celulósico. Existem duas maneiras mais frequentes para realizar a hidrólise. A primeira é o uso de hidrólise ácida e a segunda é a hidrólise enzimática do material lenho-celulósico, que pode ser ou não pré-tratado. Em ambos os casos há vários modos de operação e a sua escolha deve ser baseada de acordo com a origem do material, o microrganismo a ser usado para a fermentação dos açúcares libertados e o produto, para além da própria economia (Ogeda & Petri, 2010).

As hemiceluloses e celulose podem ser hidrolisadas em açúcares e fermentadas em vários produtos como o etanol, ou serem convertidas quimicamente noutros produtos.

1.6.1.1. Hidrólise ácida

O uso de ácidos para hidrolisar a biomassa é relativamente antigo, considerando que a sua utilização data do fim do século XIX. Em virtude dos

elevados custos operacionais - devido, principalmente, à baixa concentração de etanol – e de investimentos, esta modalidade revelou-se pouco económica (Eduardo *et al.* 2009).

A hidrólise com ácido concentrado resulta em rendimentos razoáveis de hexoses e pentoses, causando apenas uma reduzida quantidade dos produtos de degradação de açúcares (furfural, hidroximetilfurfural). A produção de compostos inibidores da fermentação torna-se mais um inconveniente para o uso desta técnica (Eduardo *et al.* 2009).

1.6.1.2. Hidrólise enzimática

As enzimas são utilizadas há várias décadas como catalisadores biológicos para a produção de etanol de segunda geração (Eduardo *et al.* 2009). As enzimas usadas, chamadas de celulasas, são responsáveis pela degradação da celulose, o principal composto presente nas células vegetais. São moléculas orgânicas complexas, sendo que as usadas em processos industriais são produzidas por microrganismos, tais como bactérias e fungos da espécie *Trichoderma reesei*, devido aos seus elevados níveis de celulase secretada. A maioria das celulasas comerciais é obtida a partir da espécie *Trichoderma reesei* (Ogeda & Petri 2010).

A hidrólise enzimática é catalisada por um complexo enzimático celulítico (figura 1.7) composto por três grandes grupos de celulasas:

- a) endoglucanases, quebram as ligações glicosídicas do tipo β -(1,4) das cadeias de celulose criando novos grupos terminais atuando aleatoriamente nas regiões amorfas da celulose e dos seus derivados;
- b) exoglucanases, são responsáveis pela ação nos terminais redutores das cadeias de celulose libertando a celobiose;

- c) β -glicosidades, vão catalisar a libertação de unidades monoméricas de glicose a partir da celobiose (Ogeda & Petri 2010).



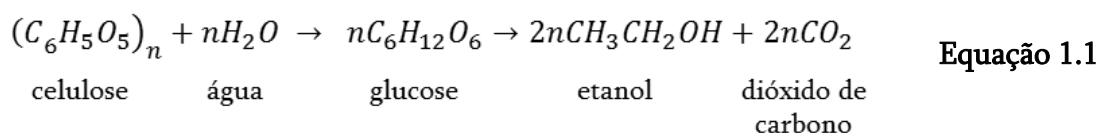
Fonte: adaptado de Menezes, 2013

Figura 1.7: Representação esquemática da ação catalítica do complexo enzimático celulítico sobre a celulose com a produção de glicose.

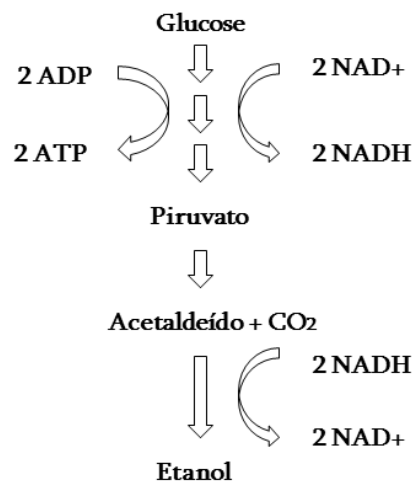
A primeira etapa da pesquisa relacionada com a hidrólise da biomassa consiste em selecionar os microrganismos capazes de produzir as enzimas adequadas para o processo de produção de bioetanol (Eduardo *et al.* 2009). É preciso considerar que as enzimas devem ser avaliadas do ponto de vista de todo o processo, e não apenas em relação a algumas operações isoladamente. Como por exemplo, determinada enzima pode permitir elevados rendimentos na hidrólise, mas inibir a fermentação (Eduardo *et al.* 2009), assim sendo, deve ter-se em conta alguns aspetos na escolha de celulase, como a composição do substrato, a atividade enzimática da celulase e as condições do meio reacional, tais como a temperatura e o pH (Mosier *et al.* 2005; Lynd *et al.* 2002).

1.6.2. Fermentação alcoólica

A fermentação de açúcares em etanol (equação 1.1) por leveduras tem um importante papel em vários processos industriais (Ferreira, 2010). As diversas matérias-primas utilizadas na produção de etanol são classificadas em três tipos: açúcares, amido (biomassa de primeira geração) e celulose (biomassa de segunda geração) (Lin & Tanaka, 2006).



A conversão de glucose em etanol envolve enzimas e leveduras fermentativas. Do ponto de vista bioquímico as leveduras são capazes de utilizar açúcares na ausência de oxigênio, como doador de elétrons, e a fonte de carbono como aceitador de elétrons. Ao fazer isso, ocorrem reações terminais da oxidação da co-enzima NADH a NAD^+ reduzindo o piruvato, havendo formação de etanol (figura 1.8) (Walker, 2010).



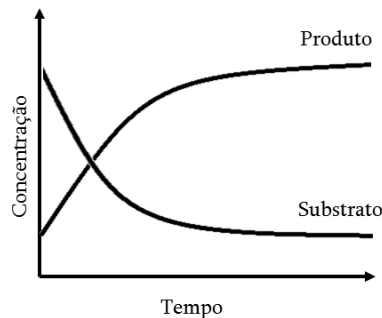
Fonte: adaptado de Walker, 2010

Figura 1.8: Conversão de glucose em etanol na fermentação alcoólica.

A levedura de maior interesse industrial é a espécie *Saccharomyces cerevisiae*, conhecida pela produção de bebidas fermentadas, mas também os gêneros *Kluyveromyces* e *Pichia*. Estas leveduras são capazes de fermentar açúcares e tolerar elevadas concentrações de etanol, dado que o etanol inibe o crescimento e a fermentação (Ferreira, 2010). Em geral, estas leveduras conseguem crescer e fermentar a pH entre 3,5 e 6,0 e na gama de temperaturas de 28 a 35°C, exceto a espécie *Kluyveromyces* que consegue crescer a temperaturas superiores (Sánchez & Cardona, 2008).

Para os processos de fermentação de biomassa para produzir bioetanol, podem ser adotados vários sistemas, como descontínuo (batch), semi-descontínuo (fed-batch) e contínuo (Walker, 2010).

A fermentação descontínua é caracterizada pela adição ao meio de cultura de todos os nutrientes no arranque do processo (Raposo & Costa, 2009) ocorrendo a reação em estado não estacionário, ou seja, com variação da composição de substrato e enzima no reator ao longo do tempo. A concentração do substrato diminui ao longo do tempo, enquanto a concentração do produto aumenta, como mostra a figura 1.9. É um tipo de reator simples, uma vez que permite uma boa mistura e um fácil controle de pH (Cabral *et al.* 2003).



Fonte: adaptado de Cabral *et al.* 2003

Figura 1.9: Perfil de um processo de fermentação descontínua ao longo do tempo.

Este tipo de reator é o processo mais seguro quando é necessário manter as condições de assepsia, uma vez que a adição de todos os nutrientes se dá no início da fermentação. Apresenta ainda mais algumas vantagens, entre as quais:

- Fácil operação;
- Menor risco de contaminação;
- Construção e instrumentação mais simples;
- Processo adequado para curtos períodos de tempo;
- Versatilidade de usos.

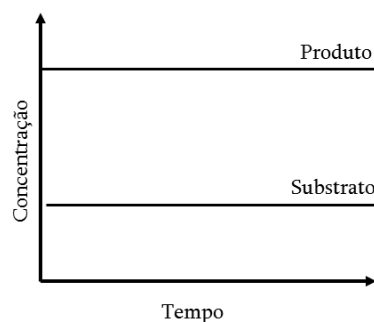
Como todos os processos também tem desvantagens. Quando são adicionados todos os nutrientes no início da fermentação vai ocorrer um esgotamento do meio de

cultura ao longo do tempo de fermentação e pode ocorrer acumulação de compostos tóxicos ou a degradação do produto final.

Outro sistema de operação é o sistema de fermentação semi-descontínuo ou sistema *fed-batch*. Neste tipo de fermentação, um nutriente é alimentado continuamente ou periodicamente até atingir o volume máximo do reator ou o volume máximo estipulado para cada processo, pois havendo saída do efluente, como acontece no sistema descontínuo é preciso evitar o risco de *wash-out* (Raposo & Costa, 2009).

A cultura semi-descontínuo é sempre iniciada por um crescimento em descontínuo, sem adição de nutriente, por isso, permite duas formas operatórias, começa em descontínuo, passando por semi-descontínuo, com adição de meio nutriente, e volta a passar por descontínuo, uma vez que o efluente só é retirado no final do processo (Raposo & Costa, 2009). A adição de alimentação ao meio fermentativo pode ser planeada de forma a maximizar a formação do produto pretendido.

Os reatores que operam de forma contínua todos os nutrientes são alimentados continuamente ao reator e o meio de cultura é retirado ao mesmo caudal de alimentação dos nutrientes, de modo a que o volume de líquido no reator biológico se mantenha constante, como mostra a figura 1.10 (Raposo & Costa, 2009).



Fonte: adaptado de Cabral *et al.* 2003

Figura 1.10: Perfis de fermentação contínua, em estado estacionário, ao longo do tempo.

1.7. Microrganismos

Nas fermentações podem usar-se dois tipos principais de microrganismos, as bactérias e as leveduras. Neste estudo, as bactérias foram colocadas de lado, visto que apresentam algumas desvantagens relativamente às leveduras. As bactérias fermentativas por não tolerarem concentrações elevadas de etanol, teriam de ser geneticamente modificadas para serem usadas em fermentações alcoólicas e também existe uma grande probabilidade de ocorrer contaminações por outras bactérias, uma vez que iriam ser cultivadas num intervalo de pH entre 6-8. Por estas razões, neste trabalho foram usadas as leveduras, como microrganismo fermentativo (Walker, 2010; Olsson *et al.* 2006).

A estirpe de *Saccharomyces cerevisiae* é um dos microrganismos predominantes na fermentação alcoólica, sendo um microfungo unicelular que desempenha um papel importante na indústria, meio ambiente e na ciência médica. O problema desta estirpe é que não cresce a temperaturas elevadas, podendo dificultar no processo de produção de etanol. Por isso, foi necessário encontrar uma estirpe que fosse termotolerante, ou seja, que tolerasse temperaturas maiores, e que conseguisse suportar as elevadas concentrações de etanol.

Os microrganismos termotolerantes, principalmente pertencente à espécie *Kluyveromyces marxianus*, são capazes de crescer e fermentar a temperaturas acima de 40°C e têm sido bastante utilizadas nos processos de Sacarificação e fermentação simultâneo (Simultaneous Saccharification and Fermentation – SSF). A vantagem de utilizar leveduras termotolerantes permite reduzir a duração do processo SSF, assim como a quantidade de enzimas utilizadas (Souza, 2011).

A *K. marxianus* é diferente da *S. cerevisiae* porque é uma levedura com metabolismo respiro-fermentativo. Possui genes adequados à produção de etanol por fermentação e sob condições de stress, como por exemplo na presença de concentrações elevadas de glucose (Souza, 2011).

Na escolha do microrganismo fermentativo, deve ter-se em conta:

- A tolerância da estirpe ao etanol;
- A termotolerância para conseguir suportar temperaturas altas;
- Evitar contaminações, de acordo com o crescimento e as condições operatórias do microrganismo;
- Fermentação rápida;
- Tolerância a meios ácidos.

Apesar da *S. cerevisiae* e de *K. marxianus* serem as estirpes mais usadas, também podem ser usadas outros tipos de leveduras, como se pode ver na tabela 1.2.

Tabela 1.2: Exemplo de leveduras mais usadas em processos de produção de etanol.

Tipos de leveduras	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
<i>Pichia stipitis</i>	<i>Candida shehatae</i>
<i>Dekkera bruxellensis</i>	<i>Candida krusei</i>

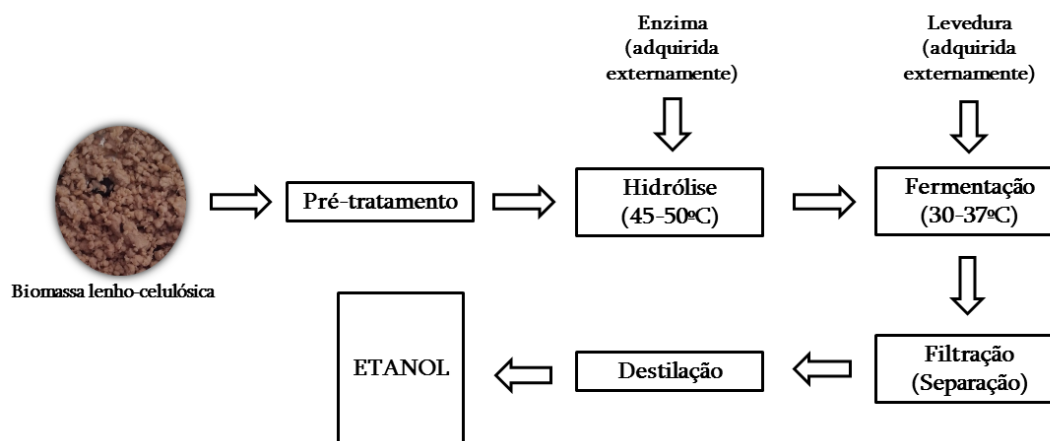
Fonte: Walker, 2010

1.8. Estratégias de produção de bioetanol

A transformação dos materiais lenho-celulósicos tem sido estudada sob diferentes estratégias. Neste sentido, quatro estratégias têm sido apresentadas, estando em diferentes fases de desenvolvimento: i) hidrólise e fermentação em separado, ii) sacarificação e fermentação em simultâneo, iii) sacarificação e co-fermentação simultânea e iv) bioprocesso consolidado.

1.8.1. Hidrólise e Fermentação em Separado (SHF – Separated Hydrolysis and Fermentation)

É a concepção mais antiga, onde a hidrólise da celulose e hemiceluloses ocorre num reator separado da fermentação. A hidrólise pode ser realizada com agentes químicos ou enzimáticos (Schlittler & Pereira Jr. 2008). Ao ser utilizado um agente químico como catalisador são formados compostos inibidores da fermentação. A hidrólise enzimática é geralmente conduzida nas condições ótimas de pH e temperatura das celulasas. A dificuldade deste processo reside na acumulação de glucose e oligossacarídeos provenientes da hidrólise, que atuam como inibidores de algumas das enzimas envolvidas, decorrendo a hidrólise incompleta da celulose. Uma vez terminada a hidrólise o resíduo sólido é separado e o sobrenadante é utilizado para a fermentação por microrganismos figura 1.11 (Wingren *et al.* 2003).



Fonte: adaptado de Walker, 2010

Figura 1.11: Produção de etanol pelo processo SHF.

A grande vantagem deste processo é que as etapas de hidrólise e fermentação são realizadas nas suas condições de pH e temperatura ótimas: o extrato enzimático das

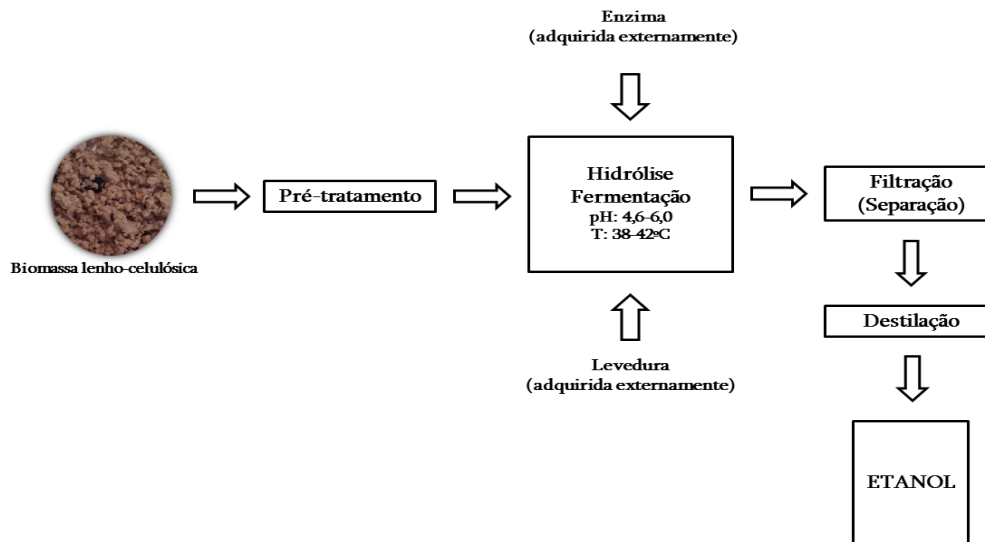
celulases tem uma atividade máxima no intervalo de temperaturas de 45-50°C a pH 4,8, enquanto a maioria das leveduras produtoras de etanol cresce entre 30 e 37°C no intervalo de pH de 5,0-6,0 (Olsson et al. 2006).

No processo SHF pode também ocorrer contaminação, porque os dois processos são realizados em reatores diferentes e há a necessidade de arrefecimento entre os processos, levando a um aumento de custo do processo global (Ask *et al.* 2012; Brethauer & Wyman, 2010; Eklund & Zacchi, 1995; Shen *et al.* 2011).

1.8.2. Sacarificação e Fermentação em Simultâneo (SSF – *Simultaneous Saccharification and Fermentation*)

Com o próprio nome diz a sacarificação e a fermentação da fração celulósica ocorrem numa mesma etapa, ou seja, no mesmo reator (Schlittler & Pereira Jr. 2008). É um dos processos mais promissores para converter celulose em etanol (Ballesteros *et al.* 2002).

Neste processo há necessidade de utilizar um complexo enzimático hidrolisante da celulose (celulase) que é combinado com um microrganismo de produção de etanol para se efetuar a hidrólise da celulose em glucose em simultâneo com a conversão da glucose em etanol no mesmo reator (Ballesteros *et al.* 2002), representada na figura 1.12.



Fonte: adaptado de Walker, 2010

Figura 1.12: Produção de etanol pelo processo SSF.

O processo SSF aumenta o rendimento de etanol diminuindo a inibição do produto, bem como elimina a necessidade de ter reatores separados (Krishna *et al.* 2001).

Este processo apresenta outras vantagens:

- Problemas de inibição pelo produto da primeira reação (glucose no processo de hidrólise) são evitados, devido à minimização da acumulação de açúcares no reator;
- Maior conversão de glucose, pois os equilíbrios das reações enzimáticas são deslocados no sentido de formação de mais produto (glucose no processo de hidrólise), uma vez que a glucose é imediatamente consumida;
- Tempo de fermentação global mais curto;
- Risco de contaminação minimizado, devido às temperaturas elevadas do processo e da presença de etanol no meio, que faz com que a mistura seja menos vulnerável à invasão por microrganismos indesejáveis;
- Custos reduzidos, quando comparada à estratégia SHF, pois ocorre num único reator e não há necessidade de equipamento de arrefecimento entre

as etapas de hidrólise e fermentação (Ballesteros *et al.* 2002; Ballesteros *et al.* 2004; Wyman, 1994).

No entanto, o processo SSF requer condições compatíveis na hidrólise e na fermentação. Um problema associado ao SSF é a diferença de temperaturas ótimas do extrato enzimático e do microrganismo utilizado. A temperatura ótima para a hidrólise enzimática dos hidratos de carbono da matéria-prima lenho-celulósica é entre 45 e 50°C. Em contrapartida, a maioria dos microrganismos etanólicos cresce no intervalo de temperaturas de 30-37°C (Ballesteros *et al.* 2004). Uma alternativa a este problema é utilizar microrganismos termotolerantes, isto é, que sejam capazes de produzir etanol e de crescer a temperaturas acima de 38°C.

1.8.3. Sacarificação e Co-fermentação Simultânea (SSCF – *Simultaneous Saccharification and Cofermentation*)

A hidrólise da celulose e a fermentação, tanto das pentoses como das hexoses acontecem simultaneamente, num mesmo equipamento. Este processo assemelha-se ao processo SSF, residindo a diferença no microrganismo utilizado neste processo que possui a capacidade de fermentar tanto hexoses, provenientes da celulose, como também pentoses, provenientes das hemiceluloses (Schlittler & Pereira Jr. 2008; Ferreira, 2010).

1.8.4. Bioprocesso Consolidado (CBP)

Nas estratégias descritas anteriormente era necessário uma unidade separada para produção de celulasas, ou então adquiridas a um produtor externo. Neste processo, todas as operações de carácter biológico, inclusive a produção de enzimas

são realizados simultaneamente (Hamelinck *et al.* 2005). Para este processo será necessário recorrer às técnicas de engenharia genética, com o intuito de se obter um microrganismo que consiga produzir diversas enzimas que permitam a clivagem dos complexos hemicelulósico e celulósico, bem como uma elevada capacidade fermentativa, tanto de pentoses como de hexoses (Ferreira, 2010).

Entre as quatro estratégias apresentadas, o processo SSF é o mais promissor para a aplicação em maior escala, com maior potencial de valorização económica dos resíduos lenho-celulósicos por isso selecionado no presente trabalho.

1.9. Objetivos de trabalho

O principal objetivo do presente trabalho foi avaliar a possível valorização dos resíduos biológicos da indústria papeleira, como as lamas primárias para serem usadas como matérias-primas lenho-celulósicas e serem transformadas em bioprodutos, como o bioetanol. Para além do objetivo principal, este trabalho teve mais objetivos, como:

- ✓ Aumento da escala, passar de erlenmeyer para biorreator de bancada, com o intuito de aumentar a produção de etanol;
- ✓ Comparar e verificar qual a melhor biomassa lenho-celulósica, proveniente de várias Fábricas papeleiras, de modo a otimizar a produção de etanol;
- ✓ Otimização do processo SSF, para reduzir os custos globais do processo.

2. Materiais e métodos

2.1. Biomassa

Como fonte de biomassa foram utilizadas matérias-primas lenho-celulósicas, como a pasta crua e lamas primárias. A pasta crua foi produzida em laboratório e as lamas primárias provenientes de várias indústrias papeleiras.

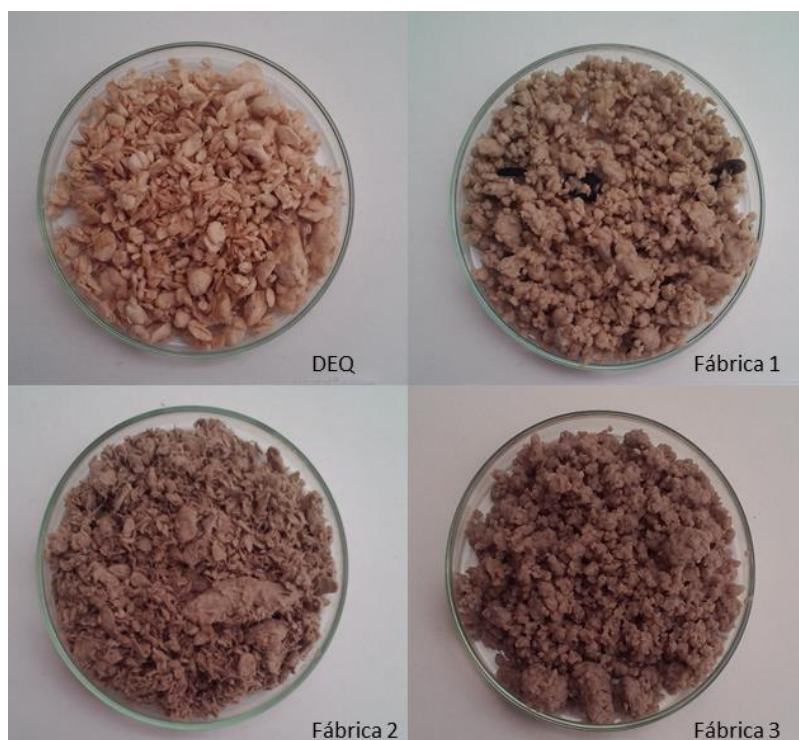


Figura 2.1: Diferentes biomassas lenho-celulósicas usadas nos ensaios SSF.

A caracterização das diferentes matérias-primas lenho-celulósicas foi realizada tendo em conta os seguintes parâmetros: determinação da humidade (quantidade percentual de água na biomassa), o teor de hidratos de carbono (celulose e hemiceluloses), a lenhina total (solúvel e insolúvel em ácido) e o teor de cinzas (carbonato de cálcio, CaCO_3) (Anexo I). A quantidade de humidade, de lenhina total e o teor de cinzas foi realizado de acordo com os protocolos LAP-001: “*Standard Method for Determination of Total Solids in Biomass*”, LAP-003: “*Determination of Acid-Insoluble Lignin in Biomass*”, LAP-004: “*Determination of Acid-Soluble Lignin in Biomass*”, e LAP-005: “*Standard Method for Ash in Biomass*”, efetuados pelo

Laboratório Nacional de Energia Renovável (National Renewable Energy Laboratory – NREL) (NREL-LAP 001, 1994; NREL-LAP 003, 1995; NREL-LAP 004, 1996; NREL-LAP 005, 1994). Os hidratos de carbono (HC) foram determinados pela diferença entre a matéria orgânica e a lenhina total. A matéria orgânica corresponde à diferença entre os sólidos totais e as cinzas. Na tabela 2.1 encontra-se representada a composição determinada dos diferentes tipos de biomassa lenho-celulósica.

Tabela 2.1: Composição dos diferentes tipos de lamas primárias e pasta crua.

Constituintes Matérias-primas Lenho-celulósicas	Humidade (%)	HC (% em base seca)	Lenhina Total (% em base seca)	Cinzas (% em base seca)	CaCO₃ (% em base seca)
Pasta Crua	70,1	97,2	2,1	0,7	1,2
Lamas primárias (Fábrica 1)	77,9	58,5	3,0	38,5	34,6
Lamas primárias (Fábrica 2)	58,5	69,1	3,1	27,8	19,6
Lamas primárias (Fábrica 3)	81,0	81,2	2,1	16,7	10,4

2.2. Leveduras usadas em SSF

Neste trabalho foram testadas três estirpes de leveduras, a *Saccharomyces cerevisiae* (comercial), *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602 (American Type Culture Collection) e *Kluyveromyces marxianus* NCYC 1426 (National Collection of Yeast Cultures).

O inóculo foi preparado de acordo com o meio universal para leveduras. Foi preparado meio sólido para que as leveduras se multiplicassem e pudessem ser conservada no frigorífico e em congelador. Posteriormente, foi preparado um meio líquido (YM) sem agar para que a levedura crescesse à temperatura desejada numa

incubadora orbital e pudesse ser transferido como inóculo para os balões de erlenmeyer para se dar o início da fermentação SSF. Na tabela 2.2, estão representadas as concentrações para a preparação dos dois meios.

Tabela 2.2: Composição do meio universal para leveduras.

Meio universal para leveduras (YM)	
Composto	Quantidade (g/L)
Extrato de levedura	3
Extrato de malte	3
Peptona	5
Glucose	10
Agar*	15
Água destilada	Até perfazer o volume desejado

*Apenas utilizado em meios sólidos

2.2.1. Avaliação da cinética de crescimento das leveduras a diferentes temperaturas

Antes de começar os ensaios SSF foi necessário avaliar o crescimento das diferentes leveduras, a *Saccharomyces cerevisiae* (comercial), *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602 e da *Kluyveromyces marxianus* NCYC 1426, às temperaturas de 30, 38 e 42°C, para avaliar se as estirpes da *Saccharomyces cerevisiae* suportariam temperaturas mais altas, uma vez que a sua temperatura ótima é de 30°C.

Para avaliar a cinética do crescimento foram realizados ensaios de crescimento de multiplicação celular e traçados os perfis de fermentação (absorvância a 540 nm *versus* tempo) às três temperaturas. Inicialmente, inoculou-se em meio líquido YM (50 mL) as leveduras provenientes do meio sólido. Esta cultura que serviu de inóculo, foi colocada na incubadora orbital a 150 rpm à temperatura desejada. Após 24 h de crescimento, foi medida a densidade ótica deste inóculo para saber que quantidade

dele se deve adicionar no novo meio para garantir uma densidade ótica de 0,3 do volume total da nova cultura no início do crescimento. Adicionou-se o inóculo num balão de 250 mL contendo 100 mL de meio líquido YM com 20 g/L de glucose e, colocou-se novamente na incubadora orbital (150 rpm) a 30, 38 e 42°C. Foram retiradas amostras em duplicado de 1 mL, com intervalos de 30 minutos até às 8h de crescimento e após as 24 h. Uma de cada par das amostras foi centrifugada durante 5 minutos a 3500 rpm, aproveitando-se o sobrenadante. A densidade ótica das amostras foi analisada a 540 nm no espectrofotómetro UV-Vis contra um branco que foi o sobrenadante resultante da centrifugação. Sempre que a leitura da densidade ótica excedia os 0,6 fazia-se a diluição da amostra e do branco.

2.3. Extrato enzimático

Foram utilizadas dois tipos de enzimas: Cellic® CTec 2 e NS22192, fornecidas pela Novozymes. São constituídas por celulasas, hemicelulasas e β -glucosidasas e têm um intervalo de temperatura ótimo entre 45 e 50°C a um pH 5,0 a 5,5. Para determinar a atividade enzimática de cada enzima, seguiu-se o protocolo LAP-006 “*Measurement of Cellulase Activities*”, efetuado pelo NREL (NREL – LAP 006, 1996) (Anexo II). A atividade enzimática foi determinada para a gama de temperaturas utilizada no processo SSF (38 e 42°C). A tabela 2.3 apresenta os valores da atividade enzimática das duas enzimas para as duas temperaturas.

Tabela 2.3: Atividade enzimática das enzimas a duas temperaturas.

Atividade enzimática		
Temperatura	38°C	42°C
Enzima	(FPU/mL de enzima)	(FPU/mL de enzima)
Cellic® CTec 2	45,2	58,6
*Cellic® CTec 2	14,8	41,6
NS 22192	46,8	102,8

* Mesmo frasco, depois de aberto (\approx 2anos)

A unidade FPU (*filter paper unity*) corresponde à quantidade de enzima que vai solubilizar 2,0 mg de glucose a partir da hidrólise de 50,0 mg de papel de filtro durante a reação de 1 h (Nordmark & Bakalinsky, 2007).

Para determinar a quantidade de proteína e de açúcares redutores presentes nos extratos enzimáticos comerciais usados, foi necessário recorrer ao método de Bradford e ao método de DNS modificado, respetivamente. A tabela 2.4 contém os valores obtidos para a quantidade de proteína e de açúcares redutores, expressos em equivalentes de BSA (albumina do soro bovino) e em equivalentes de glucose, respetivamente.

Tabela 2.4: Quantidade de proteína e de açúcares nas duas enzimas usadas.

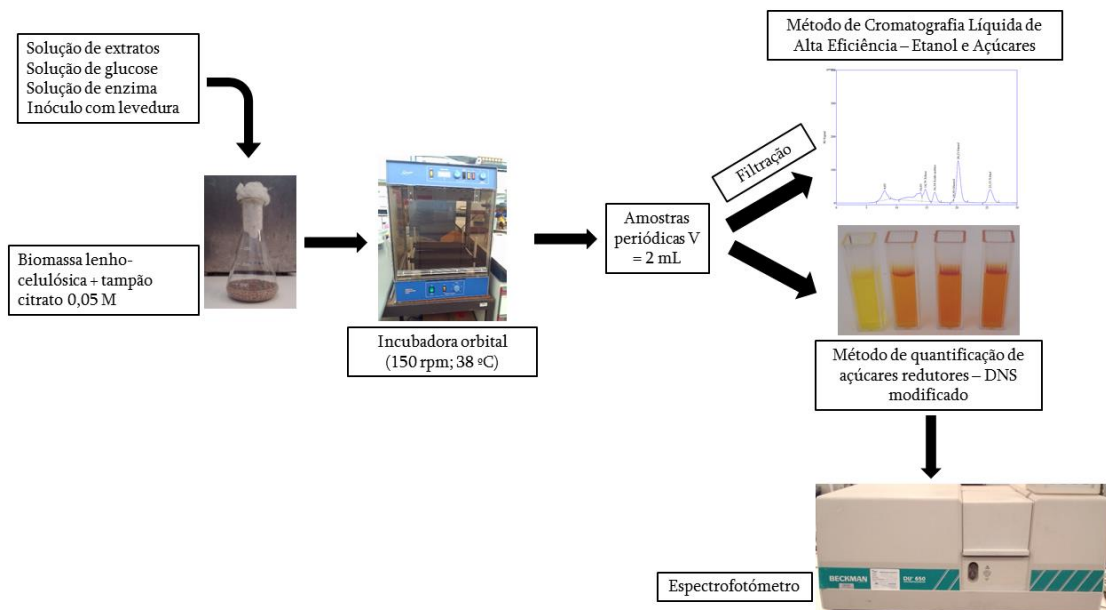
Enzimas	[Eq. BSA] (g/L)	[Eq. Glucose] (g/L)
Cellic® CTec 2	43	311
*Cellic® CTec 2	67	336
NS 22192	69	86

* Mesmo frasco, depois de aberto (\approx 2anos)

A carga enzimática utilizada inicialmente no processo SSF foi 35 FPU/g HC, dose recomendada pela folha informativa das enzimas. Em ensaios posteriores efetuou-se o estudo da minimização da carga enzimática.

2.4. Procedimento SSF

O procedimento SSF seguiu os parâmetros do protocolo LAP-008 “*SSF Experimental Protocols: Lignocellulosic Biomass Hydrolysis and Fermentation*”, efetuado pelo NREL (NREL – LAP 008, 1995). A figura 2.2 representa o esquema explicativo do processo.



Fonte: este trabalho

Figura 2.2: Esquema representativo de um processo SSF.

2.4.1. Escala erlenmeyer

Para fermentações em pequena escala foram utilizados balões de erlenmeyer de 250 mL. Estabeleceu-se um volume de trabalho de 100 mL, contendo uma concentração inicial de 50 g/L de hidratos de carbono. Tratou-se de colocar primeiro a biomassa lenho-celulósica juntamente com tampão citrato a 0,05 M (pH 5). Na tabela 2.5 são apresentadas as quantidades de biomassa lenho-celulósica, em base húmida, que se adicionaram para cada tipo de lama primária e a quantidade de tampão citrato necessário. Estes ensaios foram realizados com uma fração de hidratos de carbono de 5 g.

Tabela 2.5: Quantidades necessárias de biomassa lenho-celulósica (em base húmida) e de tampão citrato 0,05 M, a pH 5,0, usadas nos ensaios SSF.

Biomassa lenho-celulósica	Pasta Crua (DEQ)	Lamas Primárias (Fábrica 1)	Lamas Primárias (Fábrica 2)	Lamas Primárias (Fábrica 3)
Massa (g)	17,2	38,3	17,4	32,5
Tampão citrato 0,05 M, pH 5 (mL)	47,8	24,2	47,6	27,5

À biomassa e ao tampão juntaram-se uma solução de extrato de malte, extrato de levedura e peptona (para fornecimento de nutrientes) e uma solução de glucose (para impulsionar o crescimento inicial da levedura). Os balões de erlenmeyer com a biomassa lenho-celulósica e a solução tampão, juntamente com os frascos que continham as soluções de extratos e de glucose foram autoclavados a 121°C durante 20 minutos. Após o seu arrefecimento, as soluções foram transferidas para o balão de erlenmeyer, pela seguinte ordem:

- Solução de glucose (5 g/L)
- Solução de extratos (extrato de malte (3 g/L), extrato de levedura (3 g/L) e peptona (5 g/L))
- Solução de enzima
- Inóculo da levedura

Depois de ser tudo adicionado os balões foram agitados de modo a que o meio ficasse bem homogéneo, tapou-se com algodão e papel de alumínio. Após este processo os balões foram colocados em incubadoras orbitais à temperatura desejada e com rotação de 150 rpm. Amostras com um volume de 2 mL foram retiradas periodicamente para ser realizada a quantificação dos açúcares redutores, análise no HPLC (verificar a produção de etanol) e medição do pH.

Os ensaios SSF foram realizados em fed-batch, para verificar a quantidade máxima da produção de etanol com adições de alimentação periódicas.

Todo o material usado sofreu esterilização na autoclave a 121°C. Na preparação do inóculo e do meio fermentativo, foi usado um bico de Bunsen para realizar transferências assépticas.

2.4.2. Escala biorreator de bancada

Para um aumento de escala utilizou-se um biorreator de bancada com um volume total de 5 L. Estabeleceu-se um volume de trabalho de 2,5 L, contendo uma concentração de 50 g/L de hidratos de carbono.

Inicialmente foi colocada a biomassa lenho-celulósica com o tampão citrato a 0,05M a pH 5. Nestes ensaios foram utilizadas apenas as lamas das Fábricas 2 e 3. Na tabela seguinte estão representadas as quantidades necessárias para se obter uma concentração de 50 g/L de hidratos de carbono.

Tabela 2.6: Quantidades necessárias de biomassa lenho-celulósica (em base húmida), para os ensaios SSF em maior escala.

Biomassa lenho-celulósica	Fábrica 2	Fábrica 3
Massa (g)	356	780

Após a adição da biomassa e do tampão, juntaram-se uma solução contendo extrato de malte (3 g/L), extrato de levedura (3 g/L) e peptona (5 g/L), a solução de enzima e o inóculo com a levedura (250 mL de inóculo). Nestes ensaios apenas foram controladas a agitação da mistura (200 rpm) e a temperatura (38°C). O pH foi apenas monitorizado e não houve fornecimento de ar à cultura.

Foram retiradas amostras periódicas para se realizar a determinação dos açúcares redutores e análise no HPLC para verificar a produção de etanol.

Os ensaios SSF em biorreator de bancada foram realizados em modo descontínuo porque se tornava difícil a alimentação de meio sólido ao biorreator.

2.5. Método de determinação dos açúcares redutores

Para determinar a quantidade de açúcares redutores foi usado o método de DNS modificado (Anexo III).

Adicionou-se 1 mL de solução tampão citrato 0,05 M em tubos de ensaio e 0,5 mL de amostra, previamente diluída em tampão sempre que for necessário, e 3 mL de reagente de DNS modificado. Agitou-se a amostra de modo a homogeneizar a mistura. Os tubos de ensaio foram colocados num banho de água a ferver durante 5 minutos e, de seguida, colocou-se num banho de gelo para se dar o arrefecimento durante 5 minutos. Pipetaram-se 0,2 mL da mistura para uma cuvete de plástico e adicionaram-se 2,5 mL de água destilada. As amostras foram lidas num espectrofotómetro Vis-Uv com um comprimento de onda a 540 nm contra um branco com tampão citrato 0,05 M que sofreu o mesmo tratamento das amostras.

A quantidade dos açúcares redutores foi determinada através da equação da curva de calibração do DNS modificado, que relaciona a absorvância com a concentração de glucose para soluções padrão conhecidas (NREL-LAP 006, 1996).

2.6. Método de Bradford

Para se poder determinar o teor proteico em enzimas recorreu-se ao método de Bradford. Este método consistiu em adicionar 0,025 mL de amostra enzimática (diluída, quando for necessária) com 1 mL de Reagente de Bradford num tubo de ensaio. Agitou-se a mistura durante alguns segundos e deixou-se em repouso durante 20 minutos. Colocou-se a mistura numa cuvete e efetuou-se a leitura da absorvância a 595 nm num espectrofotómetro Vis-Uv, contra um branco de água que sofreu o mesmo tratamento das amostras. Calculou-se a concentração de BSA (albumina de

soro bovino) da amostra através de uma curva de calibração anteriormente preparada com soluções de BSA de concentrações conhecidas (Bradford, 1976).

2.7. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Foi utilizado o método de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para quantificar a produção de etanol no processo SSF. Para isso, recorreu-se ao equipamento Knauer modelo K-301 constituído por uma coluna PL Hi-Plex Ca 8 µm e 300 mm (Varian) mantida a 85°C e acoplada ao detetor de índice de refração (Knauer). O eluente (fase móvel) usado foi água ultrapura desgaseificada bombeada a 0,6 mL/min. A identificação e a avaliação da produção de etanol foi feita através do tempo de retenção na coluna, sendo a sua concentração de etanol determinada através da curva de calibração que foi previamente construída (Anexo IV).

2.8. Parâmetros SSF

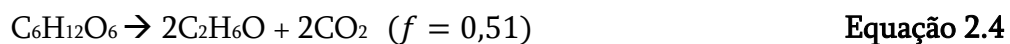
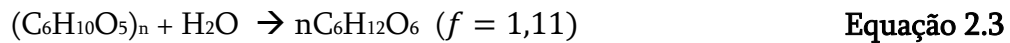
O rendimento de conversão da biomassa em etanol foi calculado de acordo com o protocolo LAP-008 (NREL-LAP 008, 1995), em % do rendimento teórico, representado pela equação 2.2.

$$\text{Rendimento em etanol (\%)} = \frac{[EtOH]_f - [EtOH]_i}{0,568 f [Biomassa]} \times 100\% \quad \text{Equação 2.2}$$

Onde:

- $[EtOH]_f$ – Concentração de etanol no final da fermentação (g/L)
- $[EtOH]_i$ – Concentração de etanol no início da fermentação (g/L) ≈ 0
- $[Biomassa]$ – Concentração de biomassa lenho-celulósica seca no início da fermentação (g/L)
- f – Fração de celulose da biomassa seca (g/g)
- 0,568 – Fator de conversão da celulose em etanol (em massa)

O fator de conversão mássico resulta da multiplicação dos fatores de conversão da reação de hidrólise da celulose (equação 2.3) com a reação da fermentação da glucose (equação 2.4).



No entanto, a equação 2.2 foi modificada de modo a considerar a concentração de etanol produzido a partir de fontes de carbono externas à biomassa lenho-celulósica adicionada (a solução enzimática, a solução de extratos e a solução de glucose). Foram realizadas fermentações-controlo, contento estas soluções, e o etanol produzido foi descontado na quantidade de etanol produzido no processo SSF. A equação 2.5 representa ao valor efetivo do rendimento de conversão da biomassa em etanol.

$$\text{Rendimento em etanol corrigido (\%)} = \frac{[EtOH]_f - [EtOH]_i - [EtOH]_{controlo}}{0,568 f [Biomassa]} \times 100\%$$

Equação 2.5

Onde:

- $[EtOH]_{controlo}$ – Concentração de etanol produzida nas fermentações controlo

A produtividade (g/L.h) foi calculada pela equação 2.6, e viva relacionar a concentração de etanol num determinado tempo de reação.

$$\text{Produtividade (g/L.h)} = \frac{[EtOH]_t}{t} \quad \text{Equação 2.6}$$

Como no caso do rendimento em etanol, a produtividade também foi corrigida, para se ter um valor mais preciso, da concentração de etanol produzida. A equação 2.7 representa a produtividade corrigida (g/L.h).

$$\text{Produtividade corrigida (g/L.h)} = \frac{[EtOH]_t - [EtOH]_{\text{controlo } t}}{t} \quad \text{Equação 2.7}$$

Onde:

- $[EtOH]_t$ – Concentração de etanol no tempo t da reação (g/L)
- t – Tempo da reação (h)
- $[EtOH]_{\text{controlo } t}$ – Concentração de etanol no tempo t na reação de controlo (g/L)

Nas operações em regime semi-descontínuo (fed-batch), a concentração de biomassa lenho-celulósica que entra na equação corresponde ao total adicionado (início + adições de biomassa). A produção máxima corresponde a um menor tempo em que é atingido a máxima concentração de etanol.

3. Resultados e discussão

3.1. Avaliação do crescimento das leveduras

Antes de se iniciar os ensaios SSF foi necessário fazer uma pesquisa para saber quais as leveduras mais usadas na produção de bioetanol a partir da biomassa lenho-celulósica proveniente da indústria papelreira, e saber os seus rendimentos e a produtividade. A tabela 3.1 apresenta de forma resumida as leveduras mais referidas na literatura.

Tabela 3.1: Matérias-primas e microrganismos mais usados em processos SSF.

Biomassa	Microrganismo	Fonte
Lamas primárias derivadas do processo Kraft	<i>S. cerevisiae</i> ATCC 200062	(Kang et al. 2010)
Biomassa de <i>Eucalyptus globulus</i>	<i>K. marxianus</i> CECT 10875	(Ballesteros et al. 2004)
Lamas de papel	<i>K. marxianus</i> Y01070	(Kádár et al. 2004)
Lamas de papel reciclado	<i>K. marxianus</i> ATCC 36907	(Lark et al. 1997)
Madeira	<i>S. cerevisiae</i>	(Palmqvist & Hahn-Hägerdal, 2000)
Lamas de papel reciclado	<i>Pichia stipitis</i> CBS 5773	(Marques et al. 2008)

Como se pode verificar através da tabela 3.1, as estirpes mais usadas na produção de bioetanol a partir de biomassa lenho-celulósica são a *Saccharomyces cerevisiae* e a *Kluyveromyces marxianus*. Foi escolhida a estirpe *S. cerevisiae* (comercial, usada como fermento de padeiro ou como inóculo na indústria vinícola), uma vez que é a levedura mais usada na fermentação alcoólica; selecionou-se também a estirpe *S. cerevisiae* ATCC 26602. A espécie *K. marxianus* NCYC 1426 foi também selecionada, como uma levedura termotolerante, ou seja, tolera temperaturas elevadas e favorece

a fermentação alcoólica. Não foi necessário adquirir nenhuma das leveduras, uma vez que no laboratório onde foi realizado este trabalho, já existiam estas estirpes, previamente selecionadas de acordo com os mesmos critérios.

Segundo o catálogo da *National Collection of Yeast Cultures* (NCYC), a estirpe *K. marxianus* NCYC 1426 produz etanol e consegue degradar a glucose e pentoses, conseguindo tolerar uma temperatura máxima de 42°C, sendo chamada de levedura termotolerante. A *S. cerevisiae* ATCC 26602 tem como características a produção de etanol podendo tolerar temperaturas mais elevadas, embora a temperatura ótima de crescimento seja 30°C.

Depois de se ter escolhido as leveduras a serem usadas nestes ensaios, realizou-se a avaliação do crescimento celular de cada uma, às temperaturas de 30, 38 e 42°C. Assim, conseguiu avaliar-se a que temperaturas o crescimento era mais favorável e determinar a que temperaturas os ensaios SSF poderiam ser realizados. Para isso, as estirpes foram inoculadas em 100 mL de meio YM esterilizado (20 g/L de glucose) e foram realizadas em duplicado. Os erlenmeyers tapados com rolha de algodão foram incubados, com uma agitação orbital de 150 rpm. Foram retiradas amostras de 30 em 30 minutos até às 8 h de crescimento e após 24 h de incubação. Acompanhou-se o crescimento das leveduras através da análise das amostras num espectrofotómetro UV-Vis com o comprimento de onda 540 nm. Na figura 3.1 encontram-se representadas as curvas de crescimento (densidade ótica a 540 nm *versus* tempo (h)) da estirpe *S. cerevisiae* (comercial), *S. cerevisiae* ATCC 26602 e da *K. marxianus* NCYC 1426 a 30, 38 e 42°C.

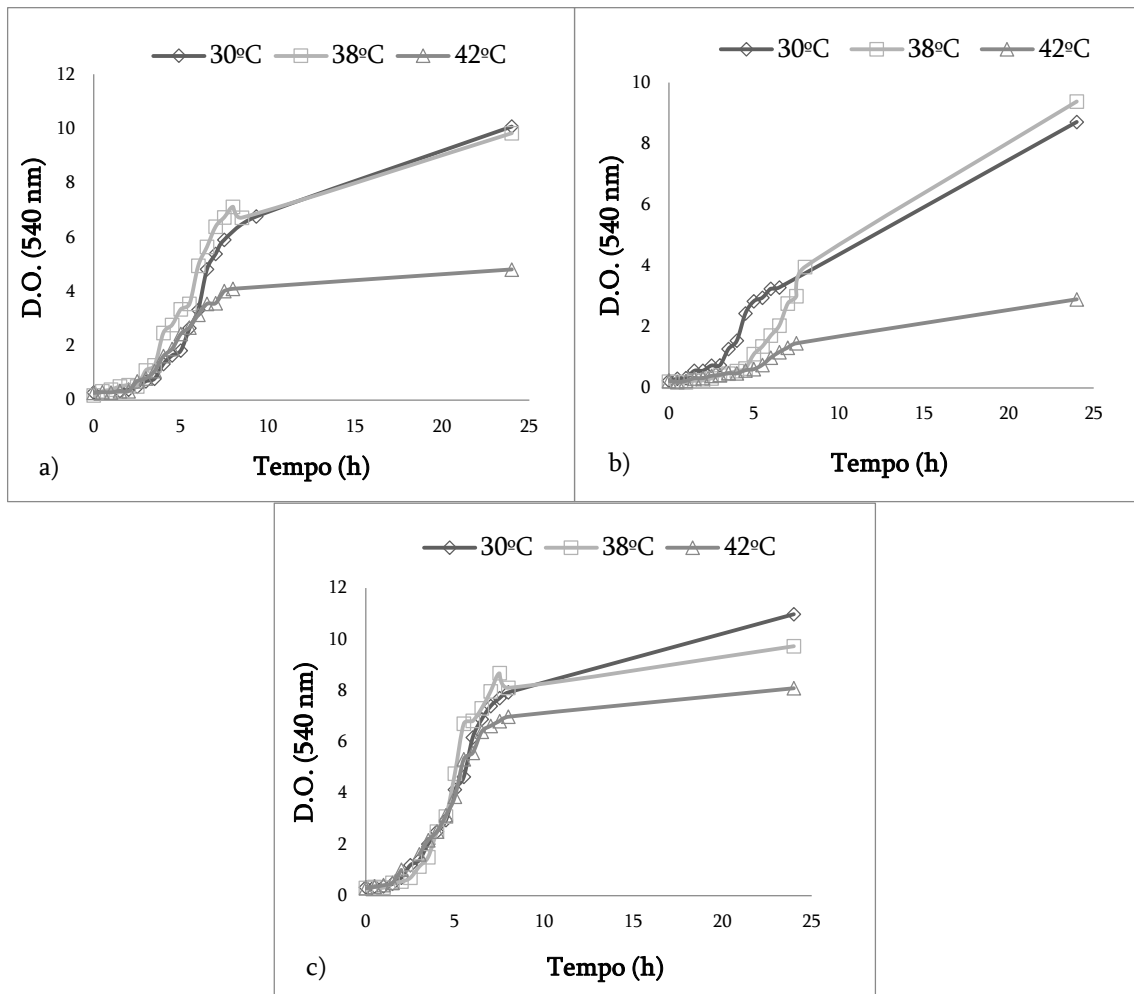


Figura 3.1: Curva de crescimento da a) *S. cerevisiae* (comercial), b) *S. cerevisiae* ATCC 26602 e c) *K. marxianus* NCYC 1426, para as temperaturas de 30, 38 e 42°C.

O crescimento das leveduras passa por duas fases bem distintas: a fase de adaptação (das 0 às 2 h) e a fase de crescimento exponencial (das 2 às 7 h), que é semelhante para as três estirpes. A fase estacionária poderá dizer-se que inicia entre as 7 e as 24 h, sendo que o declive entre estes dois pontos é menos pronunciado do que o da fase exponencial de crescimento. Para comparar a velocidade de crescimento das leveduras às diferentes temperaturas foi avaliada a taxa específica de crescimento (μ). Foi efetuada uma regressão linear do logaritmo neperiano da densidade ótica ($\ln(D.O.)$) em função do tempo de cultura, entre as 2 e as 7 h de crescimento, ou seja, na fase de crescimento. A taxa específica de crescimento corresponde ao valor do declive da reta resultante dessa regressão. Os valores da taxa

de crescimento para cada estirpe incubada a diferentes temperaturas encontram-se representados na tabela 3.2.

Tabela 3.2: Taxa específica de crescimento para as diferentes estirpes às temperaturas 30, 38 e 42°C.

	<i>S. cerevisiae</i> (comercial)	<i>S. cerevisiae</i> ATCC 26602	<i>K. marxianus</i> NCYC 1426
T (°C)	μ (h ⁻¹)	μ (h ⁻¹)	μ (h ⁻¹)
30	0,53	0,45	0,51
38	0,56	0,49	0,68
42	0,42	0,27	0,46

Relativamente às taxas específicas de crescimento obtidas, observa-se que as três estirpes de leveduras apresentaram um melhor crescimento à temperatura de 38°C. Tanto a *S. cerevisiae* (comercial) como a *S. cerevisiae* ATCC 26602 apresentaram um desempenho de crescimento mais baixo quando submetidas à temperatura de 42°C, enquanto a *K. marxianus* NCYC 1426, obteve uma taxa específica de crescimento superior às estirpes da *Saccharomyces* às temperaturas de 38 e 42°C, comprovando assim, que é uma estirpe termotolerante.

Conforme os resultados obtidos, optou-se por utilizar nos ensaios SSF a *S. cerevisiae* (comercial) e a *S. cerevisiae* ATCC 26602 à temperatura de 38°C e a levedura *K. marxianus* NCYC 1426 às temperaturas de 38 e 42°C.

3.2. Ensaios SSF (erlenmeyer) em regime semi-descontínuo (fed-batch)

Realizaram-se diversos ensaios de hidrólise enzimática e fermentação em simultâneo, em regime semi-descontínuo com o objetivo de maximizar a concentração de etanol. Quando se utilizam substratos sólidos, como foi o caso no presente trabalho, o regime semi-descontínuo pode tornar-se vantajoso no aumento de hidratos de carbono disponíveis no meio de cultura para a produção de etanol,

atenuando a dificuldade da agitação inicial da mistura heterogênea composta pelas lamas primárias, enzimas e leveduras. O processo SSF aliado a uma estratégia de regime em semi-descontínuo promove a interação entre a enzima e os hidratos de carbono, evitando a inibição do extrato enzimático pelo excesso de açúcar. Usaram-se as estirpes *S. cerevisiae* (comercial), *S. cerevisiae* ATCC 26602 e a *K. marxianus* NCYC 1426. Utilizou-se a fração de hidratos de carbono, proveniente da pasta crua ou das lamas primárias, como fonte de carbono com uma concentração inicial de 50 g/L. Ao longo do processo, foram feitas adições, para além da carga inicial, todas correspondentes a 50 g/L de hidratos de carbono, consoante a necessidade de enriquecer o caldo com nutriente/substrato. Quando adequado, foram feitas após 24, 48 e 72 h. Os ensaios foram todos realizados em balões de erlenmeyer de 250 mL, com um volume total de cultura de 100 mL, e usaram-se dois extratos enzimáticos, Cellic® CTec2 (já existente no DEQ) e NS22192 (adquirida no presente trabalho) com uma carga inicial e total de 35 FPU/g_{HC}.

3.2.1. Ensaio com a levedura *S. cerevisiae*

Este ensaio foi realizado à temperatura de 38°C, utilizando a levedura mais usada em fermentações alcoólicas, a *S. cerevisiae* (comercial). O meio de cultura utilizado, de 100 mL, foi preparado com as lamas primárias, provenientes da Fábrica 1, ou pasta crua, produzida no DEQ. Usou-se a Cellic® CTec2, como celulase, com uma carga enzimática inicial e total de 35 FPU/g_{HC}. Foram adicionados 10 mL de inóculo de levedura e ainda uma concentração de 5 g/L de glucose para impulsionar o processo inicial de multiplicação da levedura e de fermentação. Nestes ensaios adicionou-se 50 g/L de hidratos de carbono, perfazendo uma carga final de 200 g/L com mais três adições ao longo da fermentação. Os valores de açúcares redutores determinados durante o processo apresentam então três origens: i) os açúcares

presentes na solução de Cellic® CTec2; ii) a glucose adicionada inicialmente e iii) os açúcares produzidos durante a hidrólise enzimática dos hidratos de carbono presentes nas lamas primárias ou na pasta crua. Todas estas fontes de carbono contribuem para a produção de etanol, e foram tidas em conta na determinação do rendimento em etanol. Os valores da concentração de etanol foram obtidos através da análise dos cromatogramas obtidos pelas amostras injetadas no HPLC. A figura 3.2 mostra a evolução da fermentação, ou seja, a evolução da produção de etanol e dos açúcares presentes no caldo de cultura, expressos como equivalentes de glucose.

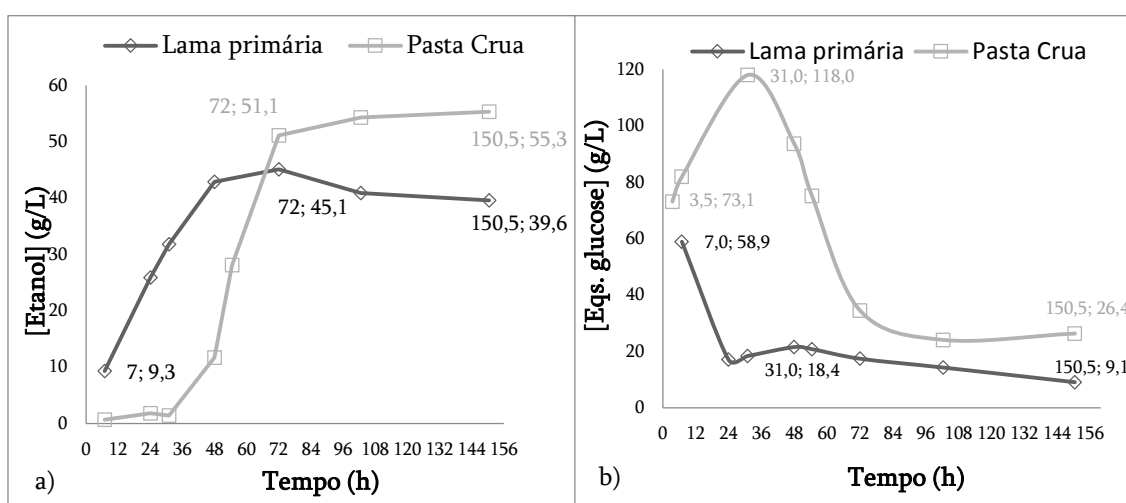


Figura 3.2: Evolução da concentração de a) etanol e b) açúcares redutores, em regime semi-descontínuo usando lama primária e pasta crua com a *S. cerevisiae* e a celulase Cellic® CTec2.

A figura 3.2 a) representa a evolução da concentração de etanol nos ensaios que utilizaram lama primária ou pasta crua como matéria-prima. Em qualquer um dos ensaios, só foi possível retirar a primeira amostra após as 7 h de reação, após as quais a mistura sólida inicial já estava mais liquefeita. Como se verifica pela figura 3.2 a), uma concentração de etanol de 9 g/L foi quantificada às 7 h a partir das lamas primárias. Relativamente ao perfil de açúcares redutores presentes no caldo de cultura na primeira amostragem, às 7 h, determinou-se uma concentração de 58,9 g/L, como se verifica na figura 3.2 b). Tendo em conta que inicialmente não existiriam açúcares individuais, pode observar-se que entre as 0 e as 7 h a velocidade de hidrólise enzimática foi mais elevada que a velocidade de fermentação. Entre as 7 h e as 24 h não se pode prever o comportamento exato do perfil da concentração de

açúcares, uma vez que o processo de produção de açúcares é simultâneo ao processo de consumo de açúcares. No entanto, durante o período referido a velocidade de fermentação ultrapassou a velocidade de hidrólise das lamas primárias, já que às 24 h a concentração de açúcares era inferior do que a quantificada às 7 h. Atingiu-se o pico máximo de produção de etanol às 72 h de fermentação, com uma concentração de 45,1 g/L. O perfil aparente da concentração de açúcares redutores mantém-se constante entre as 24 h e as 72 h, o que pode indicar que, durante este período, as velocidades de produção de açúcares pela enzima e de consumo de açúcares pela levedura coincidiram. A partir desse tempo de fermentação nota-se um decréscimo da concentração de etanol, quando atinge as 150,5 h de fermentação, com 9,1 g/L de equivalentes de glucose, o que significa, provavelmente, que o etanol começou a ser consumido pela levedura. A assimilação de etanol pela levedura é um indicador de que o caldo de cultura não estaria suficientemente rico em açúcares simples, fermentáveis pela *S. cerevisiae*. Observando novamente a figura 3.2 b), durante esse intervalo de tempo (72 – 150,5 h) foram determinadas concentrações baixas (e constantes) de açúcares, não sendo vantajoso prolongar por muito mais tempo a fermentação. Os açúcares libertados durante a hidrólise enzimática não são apenas constituídos por glucose. Vão sendo também produzidos monómeros de xilose, para além de dissacarídeos ou oligossacarídeos de unidades de glucose e xilose. Estes, não sendo metabolizados pela *S. cerevisiae* para a formação de etanol, podem contribuir para a quantificação dos açúcares redutores, juntamente com outros compostos redutores que não são açúcares e podem estar presentes no caldo de fermentação. Daí o facto de se contabilizar ainda entre 9,1 e 17,4 g/L de açúcares redutores por utilizar desde as 72 até às 150,5 h. A inexistência de concentrações elevadas de açúcares monoméricos pode também ser indicador de que a reação de hidrólise enzimática não foi completa, por saturação ou perda da atividade enzimática.

No caso da pasta crua atingiu-se o pico máximo de produção de etanol às 150,5 h de fermentação, de 55,3 g/L. No entanto, às 72 h a produção de etanol é também bastante elevada (51,5 g/L) podendo indicar que pode não ser muito

vantajoso prolongar o tempo de fermentação muito para além das 72 h. O valor máximo determinado de açúcares redutores no processo SSF da pasta crua foi de 118 g/L, às 31 h, muito superior ao observado no processo SSF das lamas primárias. Também para o etanol a concentração obtida foi maior. A menor eficiência do processo SSF das lamas primárias, quando comparado com o processo SSF da pasta crua, deve-se sobretudo à presença de uma elevada quantidade de carbonato de cálcio (CaCO_3) nas lamas primárias. Este composto limita o ataque enzimático às fibras celulósicas. Para além disso, podem existir interações entre o complexo enzimático e o CaCO_3 , uma vez que este pode adsorver moléculas enzimáticas, diminuindo a eficiência da hidrólise da celulose e hemiceluloses (Chen *et al.* 2012).

No caso dos ensaios com a lama primária, na figura 3.2 b), só foi possível retirar a primeira amostra às 7 h devido ao meio reagente com lama ser mais consistente. Como a lama primária da Fábrica 1 possui mais humidade e é constituída por uma fração de hidratos de carbono mais baixa, é necessário adicionar uma maior quantidade de lama primária, em base seca, quando comparada com a pasta crua (para se ter a mesma quantidade de hidratos de carbono nos ensaios). Esta maior consistência do meio constituído por lamas primárias dificulta a agitação da mistura reacional e portanto, a interação entre a enzima e as fibras celulósicas. A eficiência do processo de SSF é avaliada principalmente através de três parâmetros, a concentração de etanol, apresentada na figura 3.2 a), o rendimento e a produtividade, estes últimos apresentados na tabela 3.3. Os valores de rendimento em etanol tiveram como base a concentração de etanol produzida pela quantidade de hidratos de carbono adicionados até ao momento em que se verificou essa concentração.

Tabela 3.3: Valores de rendimento (%), produtividade (g/(L.h)) e do pH em regime semi-descontínuo, usando lama primária e pasta crua a 38°C, com a *S. cerevisiae* e a celulase Cellic® CTec2.

Tempo (h)	Lama primária (Fábrica 1)			Pasta Crua		
	R _{EtOH} (%)	Prod. g/(L.h)	pH	R _{EtOH} (%)	Prod. g/(L.h)	pH
7	17,5	1,33	6,252	0,8	0,10	4,982
24	48,8	1,08	-	1,3	0,08	-
31	39,2	1,03	6,097	2,6	0,05	4,918
48	52,9	0,89	-	22,1	0,26	-
72	41,3	0,63	-	63,0	0,73	-
102,5	29,8	0,40	5,874	49,8	0,52	4,480
150,5	28,9	0,26	5,751	50,7	0,35	4,422

“-“ Significa que nesse determinado tempo, não foi medido o pH.

Através da tabela 3.3, observa-se que o rendimento máximo para a lama primária foi aproximadamente 52,9% ao fim de 48 h, que corresponde a uma concentração de etanol de 42,9 g/L, produzida a uma velocidade de 0,89 g/(L.h). Para a pasta crua, o rendimento máximo obtido foi 63% correspondendo a uma concentração de etanol de 51,1 g/L. A velocidade de produção de etanol foi de 0,73 g/(L.h).

Nota-se, também, que os valores de rendimento e de produtividade, após atingirem os picos máximos, começam a decrescer, passando de 52,9% para 29% na lama primária e, de 63% para 50,7% na pasta crua. Esta diminuição deve-se: i) à alimentação adicional de hidratos de carbono, que mesmo não tendo sido hidrolisados pela enzima e posteriormente consumidos pela levedura, contribuem para o cálculo do rendimento; ii) à diminuição da concentração de etanol no meio, devido à escassez de açúcares fermentáveis pela *S. cerevisiae*.

A medição de pH foi efetuada em apenas uma amostra por dia (eram retiradas duas amostras por dia). De acordo com os valores de pH medidos (tabela 3.3), observou-se uma variação decrescente entre 6,3 e 5,8, no processo SSF das lamas primárias. Nos ensaios com pasta crua o pH variou entre 5-4,4. O pH na presença de

lamas é mais alto do que na presença de pasta crua, pois a fração de carbonato de cálcio existente nas lamias primárias influencia o pH da biomassa lenho-celulósica. No entanto, o pH encontra-se dentro dos parâmetros normais de fermentações SSF. A queda do pH ao longo do tempo foi devido à formação de ácidos orgânicos e dióxido de carbono. O dióxido de carbono é produzido pelas leveduras ao longo do tempo e é importante para o seu metabolismo, dissolvendo-se no meio reacional, contribuindo para a diminuição do pH. Nestes processos, o metabolismo das leveduras pode levar também à formação de glicerol e ácido acético. Através das análises no HPLC foi possível observar a formação de ácido acético e glicerol, através da realização das curvas de calibração de modo a conseguir determinar as concentrações dos dois compostos. A concentração máxima de ácido acético e glicerol para as lamias primárias foi de 6,1 e 2,6 g/L, respetivamente, enquanto para a pasta crua foi determinado 5,6 g/L de ácido acético e 2,3 g/L de glicerol.

3.2.2. Ensaio com a levedura *K. marxianus* NCYC 1426

Os ensaios com a estirpe *K. marxianus* NCYC 1426 foram realizados a duas temperaturas, 38 e a 42°C, uma vez que esta levedura consegue crescer a temperaturas mais elevadas, de acordo com as taxas específicas de crescimento obtidas. As condições de meio foram iguais para ambas as temperaturas. Usou-se como biomassa lenho-celulósica, as lamias primárias da Fábrica 1 e a pasta crua, produzidas no DEQ. O meio foi ainda enriquecido com 5 g/L de glucose e o extrato enzimático usado foi a Cellic® CTec2 com carga enzimática de 35 FPU/g_{HC}. No início adicionou-se uma carga inicial de 50 g/L de HC, mas ao longo do tempo reacional foram adicionadas mais três cargas iguais de hidratos de carbono, até perfazer um total de 200 g/L. As amostras foram retiradas periodicamente, analisando-se a concentração de etanol e de açúcares e o valor de pH. A figura 3.3 representa a evolução da produção de etanol a 38°C, assim como a evolução dos açúcares

presentes no caldo de cultura. Os perfis equivalentes obtidos no processo SSF a 42°C estão apresentados na 3.4.

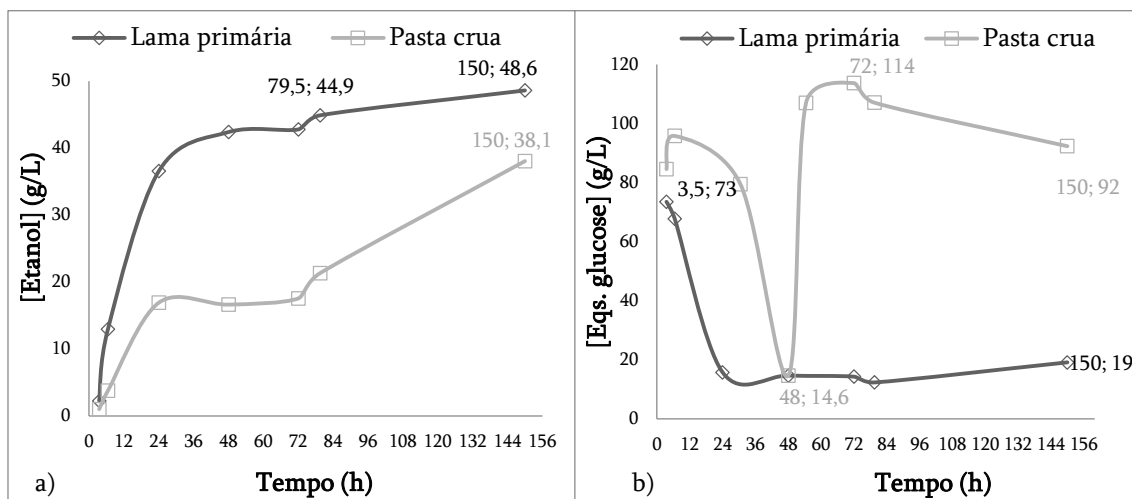


Figura 3.3: Evolução da concentração de a) etanol e b) açúcares redutores, em regime semi-descontínuo usando lama primária e pasta crua com a *K. marxianus* NCYC 1426 e a celulase Cellic® CTec2, a 38°C.

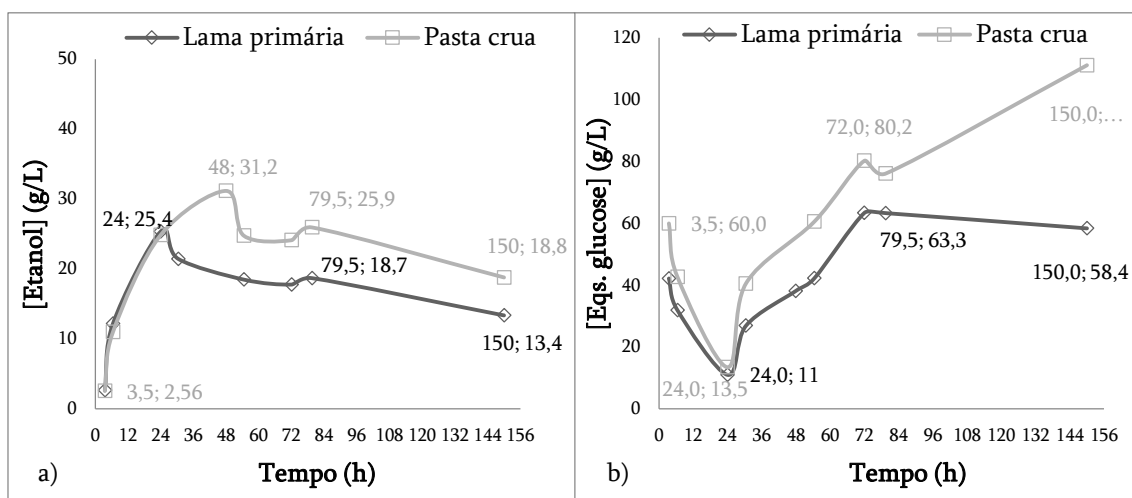


Figura 3.4: Evolução da concentração de a) etanol e b) açúcares redutores, em regime semi-descontínuo usando lama primária e pasta crua com a *K. marxianus* NCYC 1426 e a celulase Cellic® CTec2, a 42°C.

Para o caso da produção de etanol, figura 3.3 a), usando lamas primárias como biomassa lenho-celulósica a 38°C, nota-se que há uma produção crescente de etanol ao longo do tempo. Às 79,5 h atinge um valor que corresponde a uma concentração de 45 g/L, tendo nessa altura já sido adicionados 150 g/L de HC, ou seja, foi feita a adição de hidratos de carbono no começo da processo e mais duas antes das 79,5 h.

Foi efetuada uma última adição após as 79,5h. O valor máximo para as lamas foi às 150 h com uma produção de aproximadamente 48 g/L de etanol. Após a última adição, registou-se um acréscimo de apenas 3 g/L na produção de etanol, que permite questionar a necessidade da última adição de biomassa lenho-celulósica. O perfil de produção de etanol para a pasta crua foi diferente, verificando-se uma produção de etanol menos acentuada. O valor máximo de etanol foi apenas às 150 h com uma concentração cerca de 38 g/L. A figura 3.3 b) representa a quantidade de açúcares redutores ao longo do tempo, que mostra para as lamas primárias, uma concentração de 73 g/L às 3,5h. Portanto, ainda decorria a reação de hidrólise, nestas primeiras horas do processo SSF. Ao longo do tempo há um decréscimo grande da concentração de açúcares (início da fermentação, com velocidade superior à hidrólise enzimática) e às 48h existem cerca de 14,6 g/L de açúcares no meio, o que significa que a levedura metabolizou a glucose existente, produzindo cerca de 42 g/L de etanol. Após as 48 h foram adicionadas mais duas alimentações de hidratos de carbono, no entanto, no perfil aparente dos açúcares redutores, a sua concentração manteve-se praticamente constante, indicador possível de que a hidrólise e a fermentação ocorriam em velocidades similares. O facto de não se ter registado um decréscimo na concentração de etanol, indica também que existiam açúcares fermentáveis em quantidade suficiente para evitar o consumo de etanol pela levedura. No caso da pasta crua, foi determinada uma grande quantidade de açúcares que foi diminuindo até atingir as 48 h, com uma concentração de quase 15 g/L. Após as 48 h e a adição de hidratos de carbono, verifica-se uma velocidade elevada de produção de açúcares, que atingem uma concentração de 114 g/L às 72 h, decrescendo depois um pouco a concentração (92 g/L às 150 h). O facto de a velocidade de consumo de açúcares ser baixa, no período entre as 72 e as 92 h, durante o qual a concentração se manteve elevada entre 114 e 92 g/L, pode indicar que esta quantidade elevada de açúcares que se acumulou no meio possa ter começado a inibir as atividades metabólicas da levedura. Daí que a concentração de

etanol produzido tivesse sido inferior ao observado no processo SSF das lamas primárias.

A figura 3.4 a) representa a produção de etanol usando a estirpe *K. marxianus* NCYC 1426 à temperatura de 42°C. Tanto os processos com a lama primária como com a pasta crua tiveram um comportamento idêntico. O pico máximo de produção de etanol a partir das lamas primárias foi atingido antes do pico máximo de produção de etanol a partir da pasta crua. A partir das lamas primárias produziu-se um máximo de 25 g/L de etanol às 24 h, enquanto a partir de pasta crua se atingiu uma concentração de 31 g/L de etanol às 48 h. Após atingirem a concentração máxima, a produção de etanol começa a decrescer, independentemente de a concentração de açúcares disponíveis para a levedura aumentar no caldo de cultura. A tendência decrescente da concentração de etanol no meio pode dever-se sobretudo a efeitos inibidores da atividade metabólica da *K. marxianus* NCYC 1426 a 42°C, nomeadamente à concentração de substrato (glucose e xilose), à concentração do produto (etanol) ou até à existência de outras substâncias. No presente trabalho, fez-se um estudo comparativo das leveduras no processo SSF com as lamas primárias e a pasta crua. Sugere-se que, em trabalho futuro, se efetue um estudo mais detalhado sobre a tolerância destas leveduras ao substrato (glucose e xilose) e ao etanol.

Na evolução do consumo de açúcares a 42°C (figura 3.4 b)), verifica-se consumo de açúcar partir das 3,5 h e entre as 24h e as 79,5 h observa-se uma taxa elevada de produção de açúcares, resultado das duas adições de biomassa lenhocelulósica, tanto no processo com as lamas primárias, como com a pasta crua. Após as 79,5 h efetuou-se a última adição de substrato. No caso da pasta crua, continuou a haver produção de açúcares no processo de hidrólise enzimática, atingindo-se uma concentração de 11 g/L de açúcares redutores. Contrariamente, a última adição de lamas primárias não teve o mesmo efeito, sendo que neste caso a concentração de açúcares no meio se manteve constante. As tabelas 3.4 e 3.5 apresentam os rendimentos (com base na totalidade de açúcares adicionados ao meio fermentativo,

tanto na forma polimérica como monomérica) e as produtividades, juntamente com o pH, a 38 e a 42°C, respetivamente.

Tabela 3.4: Valores de rendimento (%), produtividade (g/(L.h)) e do pH em regime semi-descontínuo, usando lama primária e pasta crua a 38°C, com a *K. marxianus* NCYC 1426 e a celulase Cellic® CTec2.

	38°C					
	Lama primária (Fábrica 1)			Pasta Crua		
Tempo (h)	R _{EtOH} (%)	Prod. g/(L.h)	pH	R _{EtOH} (%)	Prod. g/(L.h)	pH
3,5	4,2	0,64	-	1,9	0,29	-
6,5	24,4	1,99	5,71	7,1	0,58	4,76
24	68,9	1,52	-	20,8	0,70	-
30,5	43,4	1,16	5,45	18,7	0,50	4,68
48	52,3	0,88	-	20,5	0,35	-
54,5	33,6	0,67	5,34	13,0	0,26	4,63
72	39,2	0,59	-	16,1	0,24	-
79,5	41,1	0,56	5,25	19,5	0,27	4,59
150	35,4	0,32	5,12	27,7	0,25	4,40

“-“ Significa que nesse determinado tempo, não foi medido o pH.

Tabela 3.5: Valores de rendimento (%), produtividade (g/(L.h)) e do pH em regime semi-descontínuo, usando lama primária e pasta crua a 42°C, com a *K. marxianus* NCYC 1426 e a celulase Cellic® CTec2.

	42°C					
	Lama primária (Fábrica 1)			Pasta Crua		
Tempo (h)	R _{EtOH} (%)	Prod. g/(L.h)	pH	R _{EtOH} (%)	Prod. g/(L.h)	pH
3,5	5,0	0,76	-	5,1	0,73	-
6,5	23,0	1,88	5,87	21,8	1,70	4,79
24	47,8	1,06	-	49,3	1,04	-
30,5	26,4	0,70	5,87	30,6	0,79	4,68
48	30,3	0,51	-	39,7	0,65	-
54,5	16,9	0,34	6,16	23,2	0,45	4,63
72	16,3	0,25	-	22,6	0,34	-
79,5	17,1	0,24	5,87	24,4	0,33	4,63
150	9,7	0,09	6,12	14,0	0,13	4,60

“-“ Significa que nesse determinado tempo, não foi medido o pH.

Relativamente aos rendimentos dos ensaios a 38°C, representados na tabela 3.4 verifica-se que o rendimento mais alto para a lama primária foi de 68,9% às 24 h de reação. Para a pasta crua, o rendimento mais alto foi de aproximadamente 28% às 150 h, correspondendo à concentração máxima de etanol obtida.

Na tabela 3.5 encontram-se os valores de rendimento e produtividade do ensaio a 42°C para a lama primária e para a pasta crua. Tanto no processo com lamas primárias como com pasta crua, o rendimento máximo foi atingido às 24 h de reação, quando atinge os 47,8% para a conversão dos hidratos de carbono da lama primária e 49,3% para a pasta crua. Como se pode observar, os rendimentos são muito similares.

Nos ensaios a 38 e 42°C, observa-se que o pH dos ensaios com as lamas primárias varia entre 5 e 6, enquanto na pasta crua o pH é ligeiramente mais baixo, como já verificado em ensaios anteriores. Como já referido a diferença de pH entre os meios com biomassas lenho-celulósicas diferentes, reside na diversidade da composição química das biomassas (existência do CaCO₃). A queda de pH deve-se à formação de ácido acético e dióxido de carbono no processo fermentativo. Para o ensaio a 38°C a concentração máxima de ácido acético foi de 5,6 g/L para as lamas e pasta. No caso do ensaio a 42°C, atingiu-se uma concentração máxima de 6,1 g/L de no ensaio com lama e 6,9 g/L no ensaio com pasta. Relativamente à produção de glicerol, este subproduto não foi detetado no SFF da pasta crua, tanto a 38 como a 42°C. No processo SSF das lamas primárias, foi registada uma produção máxima de 2,6 e 2,5 g/L de glicerol, nos ensaios decorridos a 38 e a 42°C, respetivamente.

3.2.3. Ensaio com a levedura *S. cerevisiae* ATCC 26602

O ensaio com a levedura *S. cerevisiae* ATCC 26602 foi realizado à temperatura de 38°C, uma vez que a sua taxa específica de crescimento foi mais elevada a esta temperatura, 0,49 h⁻¹. O meio usado foi o meio universal para leveduras, YM, juntamente com as lamas primárias da Fábrica 1 ou com a pasta crua

produzida em laboratório. Foram adicionadas também a celulase Cellic® CTec 2, com carga enzimática de 35 FPU/g_{HC} e uma concentração de glucose de 5 g/L. Inicialmente adicionou-se 50 g/L de HC e foram feitas mais três adições de hidratos de carbono, periodicamente, até perfazer uma carga final de 200 g/L. As concentrações de açúcares são provenientes da solução de glucose, do extrato enzimático, do inóculo da levedura e da produção de açúcares durante a hidrólise enzimática da celulose e das hemiceluloses do material lenho-celulósico. Os valores da concentração de etanol foram obtidos através da análise das amostras retiradas e injetadas no HPLC. A figura 3.5 mostra a evolução da produção de etanol e a concentração de açúcares redutores, expressos como equivalentes de glucose, ao longo do tempo de reação SSF.

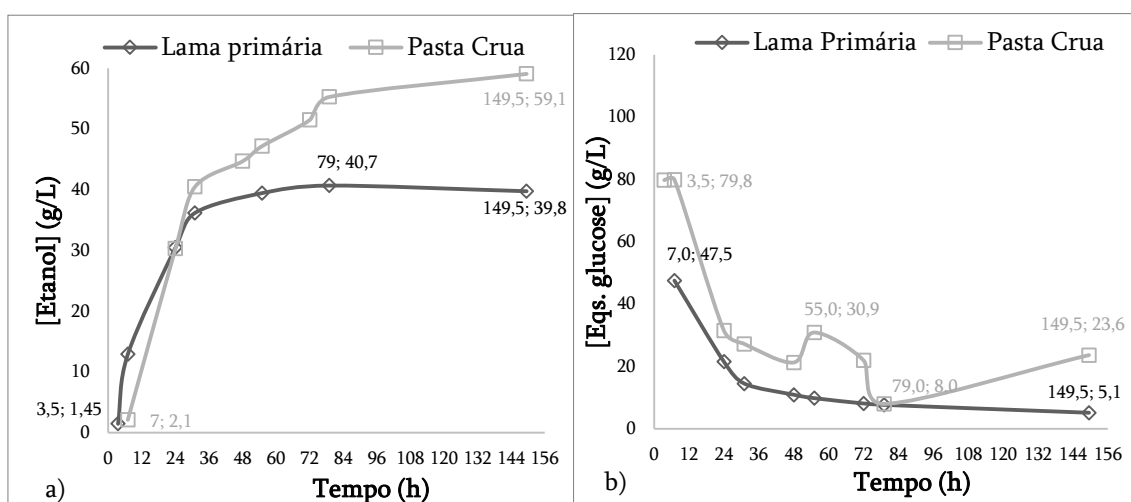


Figura 3.5: Evolução da concentração de a) etanol e b) açúcares redutores em regime semi-descontínuo usando lama primária e pasta crua com a *S. cerevisiae* ATCC 26602 e a celulase Cellic® CTec2, a 38°C.

A figura 3.5 a) representa a evolução da produção de etanol referente ao ensaio com a *S. cerevisiae* ATCC 26602 a 38°C, usando lamas primárias ou pasta crua como substrato. Para o caso das lamas primárias, verifica-se que, a partir das 3,5 h, já existe alguma produção de etanol. O valor máximo de produção de etanol é atingido ao fim de 79 h de reação com 40,7 g/L. Até ao final da fermentação (149,5 h) a concentração de etanol mantém-se praticamente constante. No ensaio com a pasta crua, o valor máximo de etanol foi superior ao verificado no processo com as lamas,

produzindo-se 59 g/L ao fim de 149,5 h. Até às 31 h, os perfis de produção de etanol obtidos através das lamas primárias e da pasta crua são semelhantes. A partir das 31 h, no processo com lamas primárias, a concentração de etanol permanece constante, enquanto com a pasta crua continua a aumentar, indicando a existência de um mecanismo de inibição à produção de etanol no processo efetuado com as lamas.

A evolução da concentração de açúcares encontra-se representada na figura 3.5 b) e, conforme se pode observar, a concentração de açúcares no caldo de cultura, usando as lamas como substrato, foi diminuindo ao longo do tempo, sem haver picos significativos, até atingir uma concentração de 5 g/L às 149,5 h de fermentação. No entanto, no caso da pasta crua, não se observou o mesmo comportamento, uma vez que se verifica um ligeiro aumento da quantidade de açúcares das 48 h às 72 h. Voltou a registar-se novo aumento a partir das 79 h (após a última adição de hidratos de carbono), até ao final da fermentação. No caso das lamas primárias, a partir das 24 h, ou seja a partir do momento em que foi feita a primeira alimentação adicional de hidratos de carbono, as velocidades de produção e consumo de açúcares poderão ter sido coincidentes, daí a concentração de açúcares se ter mantido constante. O facto de não se ter observado qualquer alteração da concentração de açúcares, aliado à estabilidade na concentração de etanol, pode indicar também um mecanismo de inibição à produção de açúcares. A existência de carbonato de cálcio nas lamas primárias pode interferir até certo ponto com a atividade enzimática da Cellic® CTec2, assim como com a atividade metabólica da *S. cerevisiae* ATCC 26602. Daí se ter verificado esta diferença nos perfis de etanol e de açúcares a partir das 31 h para o caso das lamas, uma vez que o carbonato de cálcio é praticamente inexistente na pasta crua.

Na tabela 3.6, encontram-se os rendimentos do processo SSF (com base na totalidade das fontes de carbono existentes no meio fermentativo) e as produtividades, juntamente com o pH para as lamas primárias e a pasta crua a 38°C.

Tabela 3.6: Valores de rendimento (%), produtividade (g/(L.h)) e do pH em regime semi-descontínuo, usando lama primária e pasta crua a 38°C, com a *S. cerevisiae* ATCC 26602 e a celulase Cellic® CTec2.

	38°C					
	Lama primária (Fábrica 1)			Pasta Crua		
Tempo (h)	R _{EtOH} (%)	Prod. g/(L.h)	pH	R _{EtOH} (%)	Prod. g/(L.h)	pH
3,5	2,7	0,41	-	0,6	0,09	-
7	24,4	1,84	5,71	4,0	0,30	4,94
24	57,6	1,27	-	57,1	1,26	-
31	44,8	1,17	5,79	50,0	1,31	4,63
48	44,0	0,74	-	55,1	0,93	-
55	36,3	0,72	5,65	43,3	0,86	4,54
72	36,0	0,54	-	47,2	0,72	-
79	37,4	0,52	5,73	50,7	0,70	4,64
149,5	29,1	0,27	5,71	43,1	0,40	4,53

“-“ Significa que nesse determinado tempo, não foi medido o pH.

De acordo com os valores obtidos e calculados, os maiores rendimentos foram obtidos às 24 h de fermentação para a lama primária e pasta crua, 57,6% e 57,1%, respetivamente. Relativamente ao pH, no caso da lama primária da Fábrica 1, está dentro do intervalo ótimo do processo SSF, como descrito anteriormente, não sendo necessário acrescentar uma base ou ácido para manter o pH dentro do intervalo pretendido. O pH no ensaio com a pasta crua é relativamente mais baixo, devido às características serem diferentes das da lama, nomeadamente a quantidade ínfima de carbonato de cálcio. O pH vai diminuindo, principalmente na pasta crua, devido à produção de ácido acético e dióxido de carbono no processo. As concentrações máximas de ácido acético foram de 4,9 g/L para as lamas primárias e 6,9 g/L para a pasta. O glicerol, não foi detetado no processo de SSF com pasta crua, enquanto uma concentração máxima de 2,9 g/L foi determinada no processo com lamas primárias.

Comparando todos os ensaios realizados com a *S. cerevisiae* (comercial), *K. marxianus* NCYC 1426 e *S. cerevisiae* ATCC 26602, juntamente com a celulase Cellic® CTec2, verifica-se que para o caso da *S. cerevisiae* o rendimento máximo foi

de 49% ao fim de 24 h para a lama primária e de 63% ao fim de 72 h para a pasta. No entanto, a concentração máxima de etanol obtida a partir da pasta crua, 55 g/L foi ao fim de 150 h. No entanto, às 72 h já se tinha uma concentração de 51 g/L de etanol. No caso das lamas, a concentração máxima de etanol foi de 45 g/L ao fim de 72 h, com queda tendencial após este instante. Quando se usou a *K. marxianus* NCYC 1426, a 38°C, a taxa máxima de conversão de açúcares em etanol foi de 69% ao fim de 24 h, para as lamas primárias, e 28% ao fim de 150h, para a pasta crua. As concentrações máximas de etanol foram obtidas às 150 h: 49 g/L para as lamas primárias e 38 g/L para a pasta crua. Nos ensaios com a *K. marxianus* NCYC 1426, a 42°C, obtiveram-se rendimentos máximos às 24 h, sendo que para as lamas a taxa de conversão foi de 48% e para a pasta crua foi de 49%. No entanto, a quantidade máxima de etanol produzida foi de 25 g/L (às 24 h), através das lamas primárias, e 31 g/L (48h), a partir da pasta crua. Denotou-se uma certa inconstância no desempenho da *K. marxianus* NCYC 1426 face a estes materiais lenho-celulósicos. Para além disso, a realização do processo a 42°C não mostrou ter efeitos positivos na produção de etanol. A estirpe *S. cerevisiae* ATCC 26602 produziu uma concentração máxima de etanol de 59 g/L às 150 h a partir da pasta crua e de 40 g/L através de lamas primárias. No entanto ao fim das 31 h, já se tinha quantificado uma concentração de 40 g/L no meio com pasta crua e de 36 g/L no meio com lamas primárias. O rendimento máximo em etanol ocorreu às 24 h, quer no caso das lamas como da pasta, determinando-se um rendimento de 57,6% para a lama primária e 57,1% para a pasta crua. De acordo, com os resultados obtidos tanto nos processos SSF com pasta crua como com as lamas primárias, decidiu-se escolher a estirpe *S. cerevisiae* ATCC 26602 para continuar os ensaios SSF e estudar efeito de outras variáveis.

3.2.4. Estudo com nova enzima – NS 22192

Este estudo teve como objetivo avaliar a capacidade da nova celulase, a NS 22192, gentilmente cedida pela Novozymes, no processo de produção de bioetanol com utilização de biomassa lenho-celulósica, usando a estirpe *S. cerevisiae* ATCC 26602, para isso as condições foram semelhantes aos ensaios onde se usou a celulase Cellic® CTec2, com a mesma carga enzimática de 35 FPU/g_{HC}. Nestes ensaios, também se decidiu estudar a influência da adição de glucose no meio fermentativo (como agente impulsionador da fermentação) bem como a necessidade de o material ser esterilizado. Nestes ensaios apenas foram utilizadas as lamas primárias provenientes da Fábrica 1, com carga inicial de 50 g/L de hidratos de carbono até atingir um total de 150 g/L no final, sendo feitas duas adições ao longo do tempo de reação, para além da inicial. Apenas se fizeram mais duas adições, devido aos resultados obtidos anteriormente, onde se verificou que não era rentável adicionar mais hidratos de carbono para conseguir atingir a concentração máxima de etanol.

Foram realizados quatro ensaios diferentes para se poder estudar todos os aspetos referidos acima. Os ensaios E1 e E2 foram realizados com todos os materiais esterilizados. No ensaio E1, foi adicionada glucose ao meio fermentativo, enquanto no ensaio E2 não se adicionou glucose ao meio. Realizaram-se mais dois ensaios onde não ocorreu esterilização alguma, designados por E3 e E4. No ensaio E3, adicionou-se glucose como agente impulsionador, enquanto no E4 não se adicionou solução de glucose ao meio fermentativo. Foi avaliada a produção de subprodutos diferentes dos obtidos anteriormente (eventual indicação de contaminação do meio), através da análise dos cromatogramas obtidos. Os cromatogramas obtidos ao longo do tempo foram bastante similares em todos os ensaios. Os valores da concentração de etanol determinados encontram-se representados na figura 3.6.

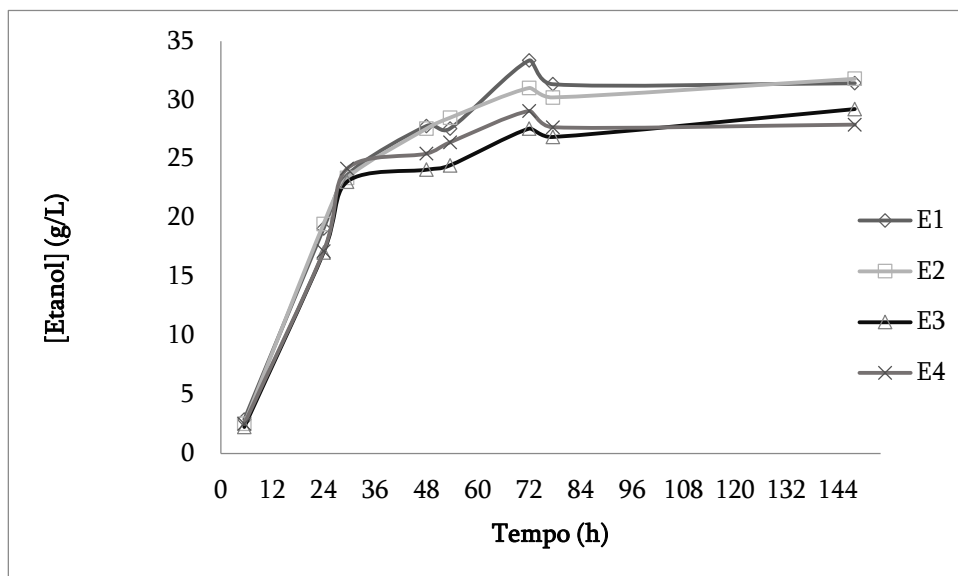


Figura 3.6: Evolução da produção de etanol em regime semi-descontínuo a 38°C, usando a *S. cerevisiae* ATCC 26602 e a celulase NS 22192, para os ensaios E1 (esterilizado e com glucose), E2 (esterilizado e sem glucose), E3 (não esterilizado e com glucose) e E4 (não esterilizado e sem glucose).

Como se pode verificar pelo gráfico, representado na figura 3.6, o comportamento de todos os ensaios é semelhante, o que se pode dizer que a adição de glucose no meio de reação não interfere no processo SSF, portanto torna-se desnecessária a sua adição como meio impulsionador do crescimento da levedura e da fermentação. Verifica-se, também, que a esterilização do material não traz diferenças significativas no processo de produção de bioetanol. Este estudo serviu para conseguir otimizar o processo em termos económicos, uma vez que ao ser possível evitar a etapa da esterilização, os custos energéticos e de equipamento do processo diminuem, assim como o tempo global do processo diminui também. Na tabela 3.7 estão representados os valores do rendimento (com base na totalidade de hidratos de carbono adicionados ao meio fermentativo) e a produtividade do processo.

Tabela 3.7: Valores de rendimento (%) e produtividade (g/(L.h)) em regime semi-descontínuo, usando lama primária a 38°C, com a *S. cerevisiae* ATCC 26602 e a celulase NS 22192, para os ensaios E1, E2, E3 e E4.

Tempo (h)	E1 (esterilizado com glucose)		E2 (esterilizado sem glucose)		E3 (não esterilizado com glucose)		E4 (não esterilizado sem glucose)	
	R _{EtOH} (%)	Prod. g/(L.h)	R _{EtOH} (%)	Prod. g/(L.h)	R _{EtOH} (%)	Prod. g/(L.h)	R _{EtOH} (%)	Prod. g/(L.h)
5,5	10,3	0,53	9,0	0,46	8,0	0,41	9,0	0,46
24	68,0	0,80	69,3	0,81	60,7	0,71	61,1	0,72
29,5	42,0	0,80	41,6	0,79	41,0	0,78	43,0	0,82
48	49,4	0,58	49,0	0,57	42,8	0,50	45,3	0,53
53,5	49,1	0,52	50,7	0,53	43,5	0,462	47,0	0,49
72	39,6	0,46	36,8	0,43	32,7	0,38	34,5	0,40
77,5	37,2	0,40	35,8	0,39	31,9	0,35	32,8	0,36
148	37,3	0,21	37,7	0,22	34,7	0,20	33,1	0,19

Através da análise da tabela 3.7, verifica-se que os valores dos rendimentos dos ensaios com o material não esterilizado (61%) não são muito díspares dos valores dos rendimentos obtidos nos ensaios onde o material sofreu esterilização, (68-69%). Os ensaios podem ser realizados sem a esterilização do material, uma vez que não foram detetadas contaminações do meio ao longo do processo, nem foi detetado nenhum subproduto para além dos usualmente identificados. Consegue-se assim uma otimização do tempo e do custo do processo, ao eliminar a etapa da esterilização. Quando se comparam os valores dos ensaios onde se adicionou solução de glucose ao meio fermentativo com os valores dos ensaios onde não foi adicionada glucose, verifica-se que os rendimentos estão muito próximos, o que significa que a presença de glucose não traz qualquer benefício ao processo SSF, economizando-se assim um reagente.

Uma vez que o presente trabalho usa a pasta crua como material de referência, pois contém uma elevada fração de hidratos de carbono e uma quantidade insignificante de cinzas, o estudo da possível eliminação da esterilização foi também efetuado com este material lenho-celulósico. Os ensaios com pasta crua foram

efetuados nas mesmas condições dos ensaios realizados com as lamas: 50 g/L de hidratos de carbono iniciais, seguidos por mais duas adições de 50 g/L também e 35 FPU/g_{HC} da celulase NS 22192. Nestes ensaios com pasta crua, não se adicionou glucose.

A figura 3.7 representa a evolução da produção de etanol ao longo do tempo (h), para os ensaios com pasta crua, com material esterilizado e material não esterilizado, para observar se ocorrem diferenças significativas no processo.

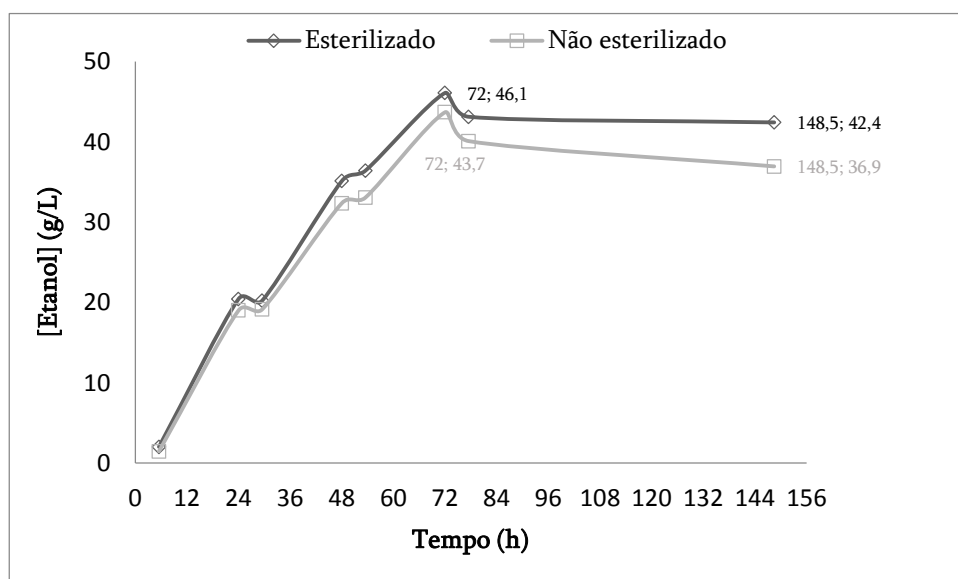


Figura 3.7: Evolução da produção de etanol em regime semi-descontínuo a 38°C, usando a *S. cerevisiae* ATCC 26602 e a celulase NS 22192, para os ensaios esterilizados e não esterilizados, usando a pasta crua.

Como se verifica através dos resultados apresentados na figura 3.7, até às 72 h o comportamento dos ensaios é muito semelhante, atingindo nesse instante o pico máximo de produção de etanol: 46,1 g/L e 43,7 g/L para o ensaio com e sem esterilização, respetivamente. Como se pode verificar as concentrações não diferem muito. No entanto, às 148,5 h a concentração de etanol é ligeiramente mais baixa para o ensaio não esterilizado, 37 g/L, enquanto no ensaio esterilizado a concentração foi de 42 g/L. Esta pequena diferença observada às 148,5 h não é tida como fator determinante para não se eliminar a etapa da esterilização, para além de que também não será economicamente favorável estender a fermentação durante tanto tempo.

Daí que o facto de o material não ser esterilizado não traz diferenças significativas, conseguindo rentabilizar o processo. Na tabela 3.8, estão representados os valores dos rendimentos (com base na totalidade de hidratos de carbono adicionados ao meio fermentativo) e produtividade, para se comparar estes ensaios.

Tabela 3.8: Valores de rendimento (%), produtividade (g/(L.h)) e pH em regime semi-descontínuo, usando pasta crua a 38°C, com a *S. cerevisiae* ATCC 26602 e a celulase NS 22192, para os ensaios esterilizado e não esterilizado.

Tempo (h)	Esterilizado			Não esterilizado		
	R _{EtOH} (%)	Prod. g/(L.h)	pH	R _{EtOH} (%)	Prod. g/(L.h)	pH
5,5	7,2	0,37	5,22	5,2	0,27	4,95
24	72,0	0,85	-	67,0	0,79	-
29,5	35,6	0,69	5,14	33,7	0,65	4,70
48	61,9	0,73	-	57,0	0,67	-
53,5	64,1	0,68	5,00	58,2	0,62	4,81
72	54,1	0,64	-	51,3	0,61	-
77,5	50,6	0,56	4,62	47,1	0,52	4,66
148,5	49,8	0,29	4,77	43,4	0,25	4,82

“-“ Significa que nesse determinado tempo, não foi medido o pH

Como se pode verificar através da consulta dos resultados apresentados na tabela 3.8, as pequenas diferenças entre os rendimentos (cerca de 5%) justificam que a etapa da esterilização possa ser eliminada do processo global. O mesmo acontece com o pH, que varia entre 4,6 e 5,2, encontrando-se dentro da gama de pH ótimo do processo SSF, que é entre 4,6 e 6.

Conclui-se também, a partir dos resultados obtidos, que a adição de solução de glucose ao meio fermentativo não traz qualquer benefício ao processo SSF. A etapa de esterilização pode ser eliminada do processo, diminuindo os custos de equipamento e energia associados a esta etapa. Posto isto, todos os ensaios apresentados doravante foram realizados sem esterilização do material e sem adição de glucose ao meio de cultura inicial.

Foram então efetuados ensaios com lamas de uma outra fábrica papeleira, provenientes da Fábrica 2, que foram caracterizadas previamente para saber qual o teor de hidratos de carbono. Conhecendo a fração de hidratos de carbono, calcula-se a massa necessária para se ter uma carga de 50 g/L de hidratos de carbono, adicionada no início do processo. Foram feitas mais duas adições de hidratos de carbono ao longo do tempo para fazer uma carga final de 150 g/L. Estes ensaios foram realizados à temperatura de 38°C usando a levedura *S. cerevisiae* ATCC 26602 e a celulase NS 22192. Os resultados destes ensaios encontram-se representados na figura 3.8.

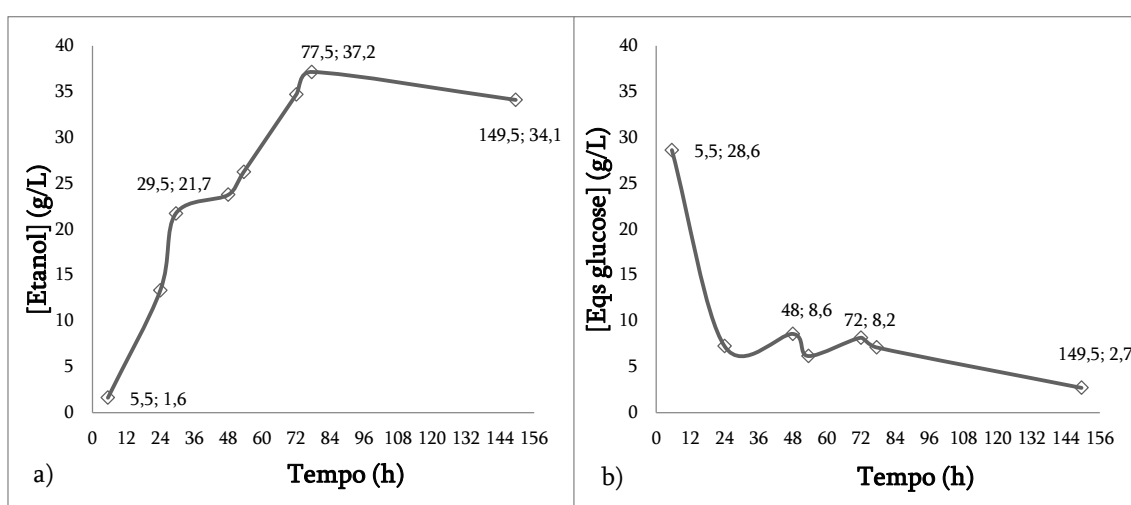


Figura 3.8: Evolução da concentração de a) etanol e b) açúcares redutores em regime semi-descontínuo usando lama primária da fábrica 2 com a *S. cerevisiae* ATCC 26602 e a celulase NS 22192, a 38°C.

Na figura 3.8 a) está representada a evolução da produção de etanol. Às 5,5 h de reação já se evidencia alguma produção de etanol. A partir desse instante também se verifica um consumo acentuado nos açúcares redutores. Portanto, até a esse tempo ocorreu a hidrólise enzimática dos hidratos de carbono das lamas em açúcares redutores, após o que foram utilizados na levedura para o seu crescimento e para a produção de etanol. O pico máximo da produção de etanol foi atingido às 77,5 h, com uma concentração de 37,2 g/L. Após as 77,5 h e até as 149,5 h ocorreu um decréscimo da produção de etanol, que pode ser justificado pelos motivos já descritos anteriormente (falta de glucose que despoleta o consumo de etanol; inibição dos

processos de hidrólise e/ou fermentação devido à existência de carbonato de cálcio ou de outros subprodutos da fermentação).

Quanto à figura 3.8 b), a concentração de açúcares é bastante elevada no início da fermentação, portanto a velocidade de hidrólise dos hidratos de carbono foi elevada nas primeiras 5 h do processo. Após as 5,5h os açúcares começaram a ser consumidos pela levedura para produzir etanol. Entre as 29,5 e as 72 h encontram-se dois picos devido às duas adições de hidratos de carbono que foram feitas nesse intervalo. Após esse tempo, a concentração decresce até atingir os 3 g/L às 149,5 h. Sendo esta concentração de açúcares tão baixa, a levedura usou o etanol como fonte de carbono e energia. Os rendimentos, calculados com base nos hidratos de carbono adicionados ao meio, as produtividades ao longo do tempo e o pH do processo estão apresentados na tabela 3.9.

Tabela 3.9: Valores de rendimento (%), produtividade (g/(L.h)) e pH em regime semi-descontínuo, usando lama primária (Fábrica 2) a 38°C, com a *S. cerevisiae* ATCC 26602 e a celulase NS 22192.

Tempo (h)	Lamas primárias (Fábrica 2)		
	R _{EtOH} (%)	Prod. g/(L.h)	pH
5,5	5,7	0,29	6,08
24	47,0	0,56	-
29,5	38,3	0,74	6,09
48	41,9	0,50	-
53,5	30,9	0,49	6,40
72	40,8	0,48	-
77,5	43,7	0,48	6,25
149,5	40,1	0,23	6,20

“-“ Significa que nesse determinado tempo, não foi medido o pH

Através da análise dos resultados obtidos descritos na tabela 3.9, verifica-se que às 24 h se atinge o rendimento máximo do processo, cerca de 47%. A partir desse tempo, tal como nos ensaios já descritos anteriormente, os rendimentos começam a diminuir, devido ao consumo do etanol. Relativamente ao pH, mantém-se perto dos

6, o que significa que não é necessário adicionar nenhuma base ou ácido para equilibrar o pH, uma vez que o pH ótimo no processo SSF é entre 4 e 6.

3.2.5. Otimização da carga enzimática

O objetivo deste estudo foi tentar minimizar a carga enzimática, usando a NS 22192, de modo a otimizar e reduzir os custos do processo. Para isso, foi usada como biomassa lenho-celulósica, a pasta crua e lamas primárias. As lamas primárias usadas nestes ensaios são provenientes da Fábrica 3, foram previamente estudadas para saber a quantidade de hidratos de carbono, carbonato de cálcio, matéria orgânica e lenhina total, para saber a massa a ser usada para termos a quantidade de 50 g/L de hidratos de carbono iniciais. Após a adição inicial de hidratos de carbono foram feitas mais duas adições tendo uma concentração final de 150 g/L de hidratos de carbono. Nestes ensaios não foi adicionada solução de glucose pura ao meio e não ocorreu esterilização do material. Os ensaios foram realizados todos à temperatura de 38°C, usando a *S. cerevisiae* ATCC 26602.

3.2.5.1. Pasta Crua (DEQ)

Neste estudo foram estudadas as cargas enzimáticas de 25 e 15 FPU/g_{HC} para podermos avaliar o comportamento em cada uma das situações e poder comparar com os resultados obtidos no ensaio nas mesmas condições usando a carga enzimática de 35 FPU/g_{HC}. A figura 3.9 mostra a evolução da produção de etanol ao longo do tempo utilizando as diferentes cargas enzimáticas.

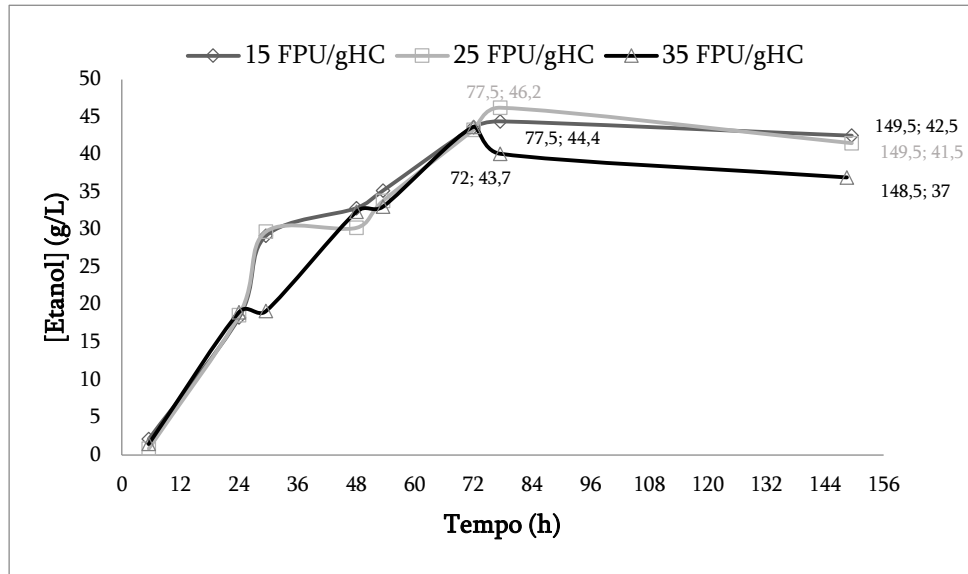


Figura 3.9: Evolução da produção de etanol em regime semi-descontínuo a 38°C, com pasta crua usando a *S. cerevisiae* ATCC 26602 e a celulase NS 22192, com otimização da carga enzimática.

Observando a figura 3.9, verifica-se que a utilização de uma carga enzimática inferior não altera significativamente a eficiência do processo SSF. De acordo com a figura 3.9, a concentração máxima de etanol foi de 46 g/L utilizando a carga enzimática de 25 FPU/g_{HC} e de 44 g/L usando uma carga de 15 FPU/g_{HC}, ambas obtidas às 77,5 h. Quando se utilizaram 35 FPU/g_{HC} atingiu-se uma concentração de 44 g/L de etanol às 72h. Portanto, a melhor concentração foi obtida quando se usou a carga de 25 FPU/g_{HC}, no entanto não difere muito da concentração obtida quando se usou 15 FPU/g_{HC}. Sendo que uma grande fração dos custos de um processo SSF corresponde aos custos da enzima, é vantajoso utilizar a menor carga de enzima possível. Na tabela 3.10 encontram-se os valores dos rendimentos do processo, com base nos hidratos de carbono adicionados ao longo do tempo e a sua produtividade em etanol, para as três cargas enzimáticas.

Tabela 3.10: Valores de rendimento (%), produtividade (g/(L.h)) e pH em regime semi-descontínuo, usando pasta crua a 38°C, com a *S. cerevisiae* ATCC 26602 e a celulase NS 22192, com otimização da carga enzimática.

Tempo (h)	15 FPU/g _{HC}		25 FPU/g _{HC}		35 FPU/g _{HC}	
	R _{EtOH} (%)	Prod. g/(L.h)	R _{EtOH} (%)	Prod. g/(L.h)	R _{EtOH} (%)	Prod. g/(L.h)
5,5	7,4	0,38	3,0	0,15	5,2	0,27
24	64,5	0,76	65,6	0,78	67,0	0,79
29,5	51,4	0,99	52,4	1,01	33,7	0,65
48	57,9	0,68	53,2	0,63	57,0	0,67
53,5	62,0	0,66	59,6	0,63	58,2	0,62
72	51,2	0,61	50,8	0,60	51,3	0,61
77,5	52,1	0,57	54,3	0,60	47,1	0,52
148,5	49,9	0,28	48,7	0,28	43,4	0,25

Como se pode observar, com exceção dos valores obtidos às 5,5 h, os rendimentos aproximam-se bastante, o que significa usar uma carga enzimática menor não vai prejudicar a etapa de hidrólise enzimática, neste processo conjunto de hidrólise e fermentação. Usando a pasta crua como substrato, as diferentes cargas enzimáticas comportam-se praticamente da mesma maneira, o que pode ser um progresso para este processo, diminuindo assim, os custos relacionados com a utilização da enzima. Nos ensaios seguintes, foi avaliado o comportamento do processo quando diminuimos a carga enzimática utilizando lamas primárias.

3.2.5.2. Lamas primárias (Fábrica 3)

Para otimizar a carga enzimática para as lamas primárias, foram usadas as lamas provenientes da Fábrica 3. As condições do processo SSF foram as mesmas usadas com a pasta crua, portanto foram feitos três ensaios, usando as três cargas

enzimáticas, 35, 25 e 15 FPU/g_{HC}. A figura 3.10 representa a evolução da produção de etanol para as três cargas enzimáticas.

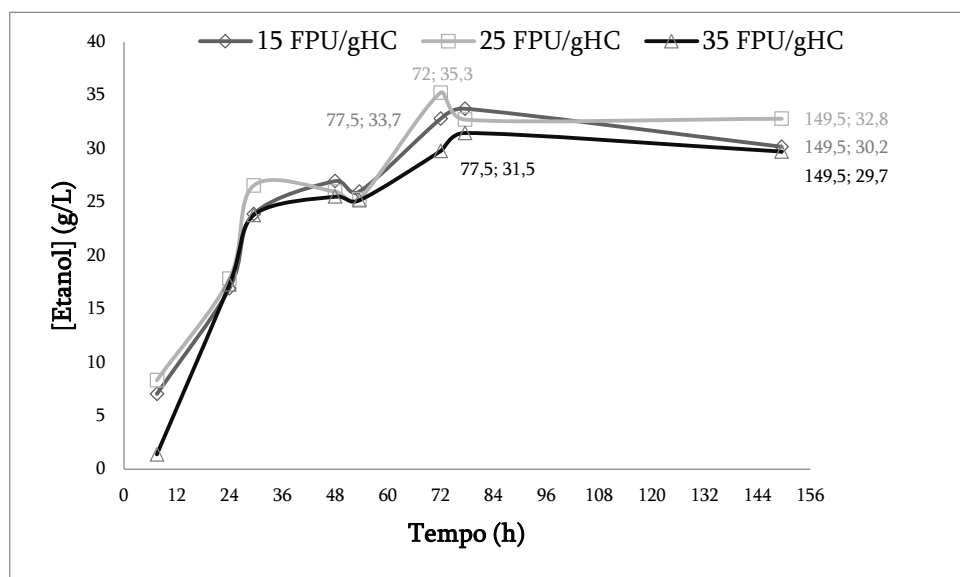


Figura 3.10: Evolução da produção de etanol em regime semi-descontínuo a 38°C, com lamas primárias usando a *S. cerevisiae* ATCC 26602 e a celulase NS 22192, com otimização da carga enzimática.

Observando a figura 3.9 e a figura 3.10, que representam a evolução da produção de etanol com a otimização da carga enzimática para a pasta crua e para a lama primária, respectivamente, verifica-se que o comportamento dos perfis é idêntico. Utilizando uma carga enzimática de 25 FPU/g_{HC} obtém-se a concentração mais alta de 35 g/L de etanol às 72h, enquanto para a carga de 35 FPU/g_{HC} tem-se uma concentração máxima de 32 g/L às 77,5 h. No ensaio em que se utilizou uma carga enzimática de 15 FPU/g_{HC}, foi produzida uma concentração máxima de 34 g/L às 77,5 h, quase a mesma concentração obtida quando se usa 25 FPU/g_{HC}. Na tabela 3.11 são apresentados os rendimentos, com base nos hidratos de carbono adicionados, e a produtividade do processo para cada carga enzimática.

Tabela 3.11: Valores de rendimento (%), produtividade (g/(L.h)) e pH em regime semi-descontínuo, usando lama primária a 38°C, com a *S. cerevisiae* ATCC 26602 e a celulase NS 22192, com otimização da carga enzimática.

Tempo (h)	15 FPU/g _{HC}		25 FPU/g _{HC}		35 FPU/g _{HC}	
	R _{EtOH} (%)	Prod. g/(L.h)	R _{EtOH} (%)	Prod. g/(L.h)	R _{EtOH} (%)	Prod. g/(L.h)
7,5	24,8	0,94	29,3	1,11	4,9	0,19
24	59,6	0,71	62,8	0,74	61,0	0,72
29,5	42,0	0,81	46,8	0,90	41,9	0,81
48	47,5	0,56	45,8	0,54	45,0	0,54
53,5	45,8	0,49	44,5	0,47	44,3	0,47
72	38,5	0,46	41,4	0,49	35,0	0,41
77,5	39,6	0,44	38,4	0,42	37,0	0,41
149,5	35,4	0,20	38,5	0,22	34,9	0,20

Como se verifica, através dos resultados obtidos, os rendimentos obtidos aproximam-se nos ensaios todos. O rendimento máximo da conversão de hidratos de carbono em etanol obtido para a carga enzimática de 15 FPU/g_{HC} foi de 60%, 63% para a carga de 25 FPU/g_{HC} e 61% para a carga de 35 FPU/g_{HC} às 24 h de fermentação. Embora os rendimentos tenham sido próximos, quando se fala em concentração máxima de etanol produzido, a carga de 25 e 15 FPU/g_{HC} são superiores à de 35 FPU/g_{HC}.

Quando se comparam os ensaios de otimização enzimática para a pasta crua e lamas primárias verifica-se que o comportamento é idêntico nos dois ensaios. Estes resultados mostraram que se pode usar cargas enzimáticas mais baixas, conseguindo assim, obter uma boa produção de etanol. A diminuição da carga enzimática traz vantagens económicas, uma vez que não é necessária uma quantidade tão grande de enzima.

3.2.6. Ensaio com carga enzimática otimizada

Nestes ensaios foram usados dois tipos de lamas primárias, as lamas das Fábricas 2 e 3, de modo a comparar os comportamentos do processo SSF das duas lamas a 38°C, usando a levedura *S. cerevisiae* ATCC 26602. Foi usado o meio YM sem adição de glucose e com uma carga enzimática de 15 FPU/g_{HC}, uma vez que se comprovou que havia uma boa produção de etanol usando, uma carga enzimática mais baixa, com a enzima NS 22192. Na figura 3.11 encontra-se representada a evolução da produção de etanol para os dois tipos de biomassa lenho-celulósica e a evolução da concentração dos açúcares redutores.

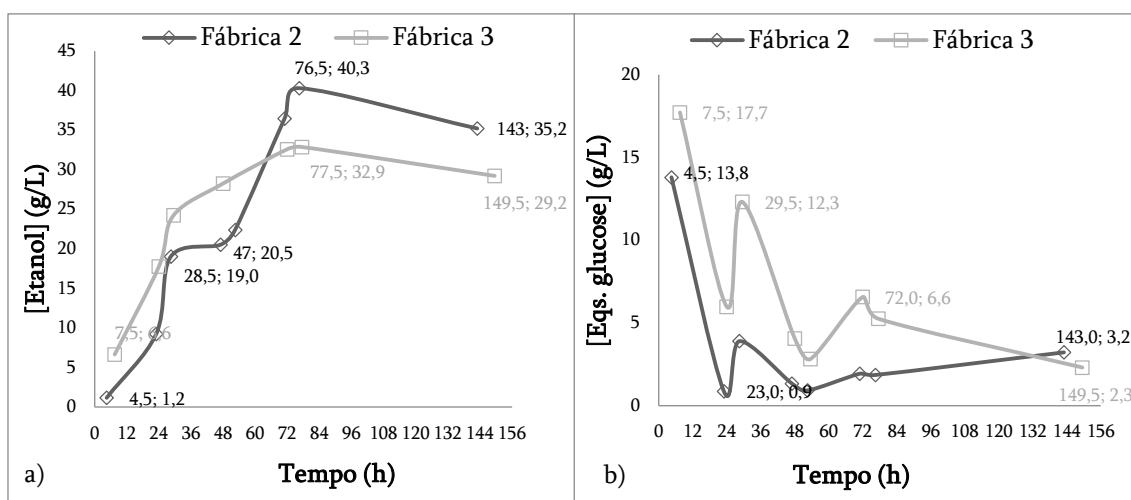


Figura 3.11: Evolução da concentração de a) etanol e b) açúcares redutores em regime semi-descontínuo com a *S. cerevisiae* ATCC 26602 e a celulase NS 22192, a 38°C, para as lamas primárias da Fábrica 2 e 3.

Comparando os ensaios com os dois tipos de lamas, observou-se que a mistura reacional com a lama da Fábrica 2, começou a liquefazer mais cedo, permitindo que a primeira recolha de amostra ocorresse às 4,5 h de processo. No caso do ensaio com a lama da Fábrica 3, a primeira amostra foi retirada após 7,5 h. Este facto deve-se à diferença da percentagem de humidade entre estas lamas. Como a lama da Fábrica 3 possui um teor de água mais elevada, é necessária uma maior quantidade de lamas

húmidas para se ter a concentração inicial de 50 g/L de hidratos de carbono (embora o seu teor de hidratos de carbono seja superior), comparativamente às lamas da Fábrica 2. De acordo, com a figura 3.11 a), para as lamas da Fábrica 2, a produção de etanol começa às 4,5 h e a sua concentração no meio vai aumentando até atingir o pico máximo de 40,3 g/L às 76,5 h. Depois de ter atingido o máximo da produção ocorreu um decréscimo da concentração de etanol até ao final da fermentação, às 143 h. No caso, das lamas primárias da Fábrica 3, às 7,5h já se deteta produção de etanol, aumentando gradualmente até atingir o pico máximo às 77,5 h com uma concentração de 32,9 g/L. Até ao final da fermentação, acontece a mesma situação que as lamas da Fábrica 2, a concentração decresce até às 149,5 h. Nos dois casos, a diminuição da concentração de etanol ocorre porque, o etanol está a ser consumido devido à pouca concentração de glucose no meio. A concentração de açúcares redutores existente no meio encontra-se sob a forma de xilose (que pode corresponder até cerca de 20% dos açúcares fermentáveis) ou sob a forma de outros di-, tri-, ou oligossacarídeos que não sofreram hidrólise completa e não são metabolizados pela levedura). O ensaio com as lamas da Fábrica 2 foi o que atingiu uma concentração maior de produção de etanol, devido às diferenças nas características das duas lamas, nomeadamente a percentagem de humidade das lamas. As lamas da Fábrica 3 contém uma percentagem de humidade muito superior às das lamas da Fábrica 2, uma diferença cerca de 21,8%, logo vai fazer com que seja necessário uma maior massa a adicionar para conseguir ter uma carga de 50 g/L de hidratos de carbono. Portanto, como a massa total nos ensaios com as lamas da Fábrica 3 é mais elevada do que nos ensaios com as lamas da Fábrica 2, a dificuldade de agitação (orbital) vai ser maior, diminuindo a eficiência da hidrólise enzimática dos hidratos de carbono em açúcares fermentáveis e da fermentação destes açúcares em etanol. Portanto, no caso de lamas primárias utilizadas num processo SSF em semi-descontínuo, a percentagem de humidade poderá ter um efeito mais relevante do que a percentagem de cinzas (CaCO_3).

Na figura 3.11 b) encontra-se representada a evolução da concentração dos açúcares redutores ao longo do tempo de reação. Para o caso das lamas da Fábrica 2, conseguiu retirar-se uma amostra às 4,5 h e no caso das lamas da Fábrica 3 só foi possível tirar às 7,5 h, devido à maior quantidade de lamas que foi adicionada neste caso para conseguir ter uma carga de 50 g/L de hidratos de carbono (já explicado anteriormente). No início da fermentação, as concentrações em ambas as situações são altas, decorrentes da hidrólise dos hidratos de carbono das lamas em açúcares fermentáveis. Para as lamas da Fábrica 2, ao fim de 23 h, a concentração de açúcares é de 0,9 g/L. Após esse instante, foi adicionada uma carga de hidratos de carbono, originando um aumento da concentração de açúcares devido à hidrólise enzimática. A concentração dos açúcares volta a decrescer devido ao seu consumo pela levedura e depois aumenta ligeiramente devido à adição da terceira alimentação de hidratos de carbono. No caso das lamas da Fábrica 3, o perfil é similar em termos de oscilações nas concentrações de açúcares, mas os valores destas mantêm-se mais baixos do que no caso das lamas da Fábrica 2, mostrando a dificuldade de agitação do meio que compromete a eficiência da hidrólise enzimática. Ao fim das 143 h, a concentração de açúcares é muito baixa tanto para as lamas da Fábrica 2 como da Fábrica 3. Na tabela 3.12 estão representados os valores dos rendimentos percentuais, com base na adição de hidratos de carbono ao meio fermentativo, as produtividades e o pH do processo.

Tabela 3.12: Valores de rendimento (%), produtividade (g/(L.h)) e pH em regime semi-descontínuo, usando lamas primárias da Fábrica 2 e 3 a 38°C, com a *S. cerevisiae* ATCC 26602 e a celulase NS 22192.

Lamas primárias (Fábrica 2)				Lamas primárias (Fábrica 3)			
Tempo (h)	R _{EtOH} (%)	Prod. g/(L.h)	pH	Tempo (h)	R _{EtOH} (%)	Prod. g/(L.h)	pH
4,5	4,1	0,26	6,18	7,5	23,6	0,89	5,97
23	32,4	0,40	-	24	62,5	0,74	-
28,5	33,4	0,67	5,72	29,5	42,7	0,82	5,67
47	36,0	0,44	-	48	49,8	0,59	-
52,5	39,3	0,43	6,03	53,5	46,0	0,49	5,97
71	42,7	0,51	-	72	38,3	0,45	-
76,5	47,2	0,53	5,86	77,5	38,6	0,42	6,14
143	41,2	0,25	5,64	149,5	34,3	0,20	6,14

“-“ Significa que nesse determinado tempo, não foi medido o pH

Através da análise dos resultados obtidos, verifica-se que o rendimento máximo é atingido às 76,5 h com 47%, correspondente à concentração máxima de etanol obtida, para a utilização das lamas primárias provenientes da Fábrica 2. No caso das lamas primárias da Fábrica 3, o rendimento máximo é atingido logo ao fim de 24 h de fermentação, com um rendimento de 62%. Para a concentração máxima de etanol (33 g/L às 77,5 h), o rendimento obtido foi de 38,6% com base nos hidratos de carbono adicionados até esse instante. Verifica-se, também, que para as lamas da Fábrica 2 o rendimento vai aumentando até atingir o rendimento máximo e, no caso das lamas da Fábrica 3 os rendimentos a partir das 24 h vão diminuindo gradualmente, devendo-se ao comportamento dinâmico diferente nos dois casos (a maior dificuldade de agitação no caso das lamas da Fábrica 3 interfere com a velocidade de transformação das lamas em etanol nas primeiras horas do processo) e posteriormente também ao consumo de etanol. Para ambas as lamas, o valor de pH mantém-se dentro do intervalo ótimo para o processo SSF. Não foi necessário a adição de qualquer agente químico para manter o pH dentro do intervalo ótimo. Relativamente a subprodutos, a concentração máxima de ácido acético foi de 6,1 g/L

e a de glicerol foi cerca de 6 g/L no SSF das lamas da Fábrica 2. No SSF das lamas da Fábrica 3 houve produção de ácido acético com uma concentração de 5,6 g/L e de glicerol com uma concentração de 2,4 g/L.

Comparando, os dois tipos de lamas primárias, verifica-se que a lama primária da Fábrica 2 atinge uma concentração de etanol mais elevada relativamente à utilização da lama primária da Fábrica 3, o que é favorável, uma vez que é necessário menos quantidade mássica de lamas adicionadas ao processo para corresponder a 50 g/L de hidratos de carbono. Em relação aos rendimentos, quando se usa as lamas da Fábrica 2, o rendimento máximo é atingido muito mais tarde do que quando se usou as lamas da Fábrica 3. Estas diferenças acontecem devido ao facto de possuírem características diferentes, nomeadamente a percentagem de humidade.

3.3. Ensaio SSF (erlenmeyer) em regime descontínuo (batch)

3.3.1. Ensaio com a levedura *S. cerevisiae* ATCC 26602

Foram realizados alguns ensaios em regime descontínuo para verificarmos o comportamento das lamas das Fábricas 2 e 3, a 38°C e fazer a sua comparação com o regime semi-descontínuo. O esquema da figura 3.12 representa os ensaios que foram realizados e as condições a que foram submetidos. Em todos os ensaios foram utilizadas as lamas das diferentes fábricas, bem como a enzima NS 22192. Além do extrato enzimático, foram adicionados o inóculo de levedura e a solução de extrato de malte, extrato de levedura e peptona. A única diferença nestes ensaios é o facto de não haver adição de hidratos de carbono ao longo do tempo reacional. A quantidade de hidratos de carbono estudada em cada ensaio foi adicionada desde o início do processo.

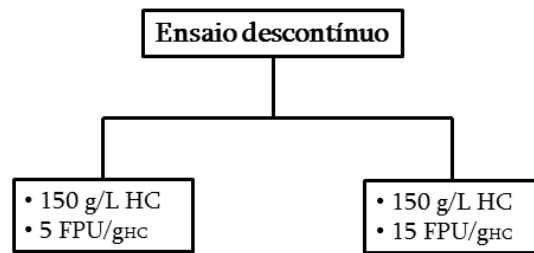


Figura 3.12: Representação dos diferentes ensaios realizados em regime descontínuo, a 38°C, usando a *S. cerevisiae* ATCC 26602 e a celulase NS 22192.

Nos ensaios SSF em regime descontínuo realizados foi adicionada uma carga de 150 g/L de hidratos de carbono logo no início do processo, de modo a igualar a totalidade de hidratos de carbono usados no regime semi-descontínuo. Nos ensaios em regime semi-descontínuo eram adicionados 50 g/L hidratos de carbono no início do processo SSF e até ao seu final, adicionaram-se mais duas cargas equivalentes de 50 g/L, perfazendo um total de 150 g/L de hidratos de carbono. Ao adicionar uma carga tão elevada de hidratos de carbono no início do processo, vai existir no meio uma grande quantidade mássica de lamas, principalmente de lamas da Fábrica 3 (com maior teor de água). Portanto, no caso das lamas da Fábrica 3, adicionaram-se 97,3 g de lamas húmidas e no caso das lamas da Fábrica 2 foi cerca de 42,8 g. Sendo este um sistema heterogéneo, quanto maior a carga de sólidos (lamas húmidas) presente no meio, mais complicado se torna o arranque do processo de hidrólise enzimática e de fermentação etanólica. Num primeiro ensaio, foi adicionada uma carga enzimática de 15 FPU/g_{HC}, tendo em conta os 150 g/L de hidratos de carbono iniciais. A figura 3.13 representa a evolução da produção de etanol e da concentração de açúcares redutores ao longo do tempo, para as diferentes lamas primárias.

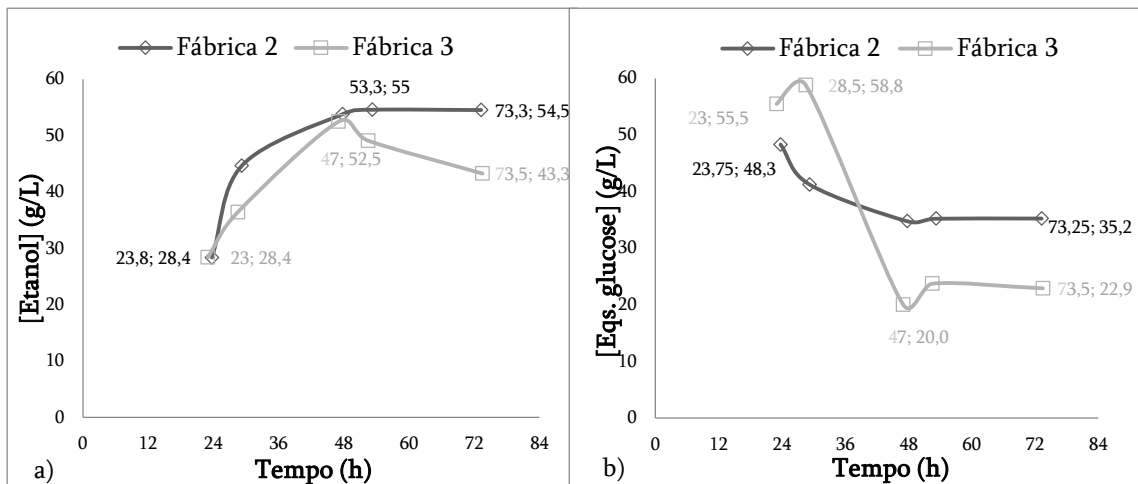


Figura 3.13: Evolução da concentração de a) etanol e b) açúcares redutores em regime descontínuo com a *S. cerevisiae* ATCC 26602 e 15 FPU/g_{HC} de celulase NS 22192, a 38°C, para as lamas primárias da Fábrica 2 e 3, com uma carga de hidratos de carbono de 150 g/L

Observou-se que só foi possível retirar a primeira amostra ao fim de quase 24 h, para os ensaios com os dois tipos de lamas. Só ao final deste tempo, é que a mistura inicialmente heterogénea se começou a liquefazer sendo possível a recolha da amostra. Através da figura 3.13 a), verifica-se que as lamas primárias da Fábrica 2 conseguem ser transformadas numa concentração máxima de 55 g/L de etanol às 53,3 h, mantendo a concentração de etanol constante até ao final da fermentação, ou seja, até às 73,3 h. Para as lamas da Fábrica 3, a concentração máxima de etanol atingida foi de 53 g/L às 47 h. Após esse tempo a concentração de etanol vai diminuindo, até ao final da fermentação. Relativamente à figura 3.13 b), a concentração de açúcares mantém-se muito elevada no processo (cerca de 35 g/L no caso das lamas da Fábrica 2 e 23 g/L no caso das lamas da Fábrica 3).

Na tabela 3.13 estão representados os rendimentos do processo, com base na quantidade inicial de hidratos de carbono adicionada ao processo, as produtividades e o pH do processo ao longo do tempo de reação.

Tabela 3.13: Valores de rendimento (%), produtividade (g/(L.h)) e pH em regime descontínuo, usando lamas primárias da Fábrica 2 e 3 a 38°C, com a *S. cerevisiae* ATCC 26602 e 15 FPU/g_{HC} da celulase NS 22192.

Lamas primárias (Fábrica 2)				Lamas primárias (Fábrica 3)			
Tempo (h)	R _{EtOH} (%)	Prod. g/(L.h)	pH	Tempo (h)	R _{EtOH} (%)	Prod. g/(L.h)	pH
23,75	33,3	1,19	-	23	33,4	1,23	5,49
29,25	52,4	1,53	5,42	28,5	42,9	1,28	5,58
47,75	63,1	1,13	-	47	61,8	1,12	5,56
53,25	64,0	1,03	5,41	52,5	57,8	0,93	5,56
73,25	64,0	0,74	5,45	73,5	50,9	0,59	5,58

“-“ Significa que nesse determinado tempo, não foi medido o pH

Analisando a tabela 3.13 verifica-se que o rendimento máximo é atingido às 53,3 h com 64% para as lamas da Fábrica 2 e às 47 h com 62% para as lamas da Fábrica 3. Os rendimentos ao longo do tempo de reação mantêm-se elevados, podendo ser devido à quantidade de hidratos de carbono adicionados logo no início do processo. Quanto maior a quantidade inicial de hidratos de carbono, maior é a quantidade de açúcares redutores produzidos e disponíveis para a fermentação em etanol. Relativamente ao pH, mantêm-se entre 4 e 6 como se verifica, que é o pH ótimo para o processo de sacarificação e fermentação simultânea. Apesar de não haver queda de pH nestes ensaios, verificou-se também a produção de ácido acético durante o processo. Para o caso das lamas primárias da Fábrica 2, a concentração máxima foi 9,9 g/L e no caso das lamas da Fábrica 3 foi 8,6 g/L.

Num outro conjunto de ensaios em regime descontínuo aos quais se adicionaram 150 g/L de hidratos de carbono no início do processo a carga enzimática foi alterada. Nestes ensaios, foi adicionado apenas 5 FPU/g_{HC} de celulase NS 22192. Quando se efetuou o estudo da otimização da carga enzimática, verificou-se possível adicionar 15 FPU/g_{HC}. Esta carga enzimática tem por base os hidratos de carbono adicionados inicialmente. Portanto, nos ensaios efetuados em regime semi-descontínuo, foram adicionados 15 FPU/g_{HC} tendo em conta os 50 g/L de hidratos de carbono adicionados no início do processo. Ao longo do processo, como se

adicionaram mais duas alimentações, perfazendo os 150 g/L de hidratos de carbono, sem adicionar nenhuma carga extra de enzima, passou a ter-se efetivamente uma carga de 5 FPU/g_{HC} no processo total de SSF. A figura 3.14 representa a evolução da produção de etanol e da concentração de açúcares redutores ao longo do tempo do processo SSF.

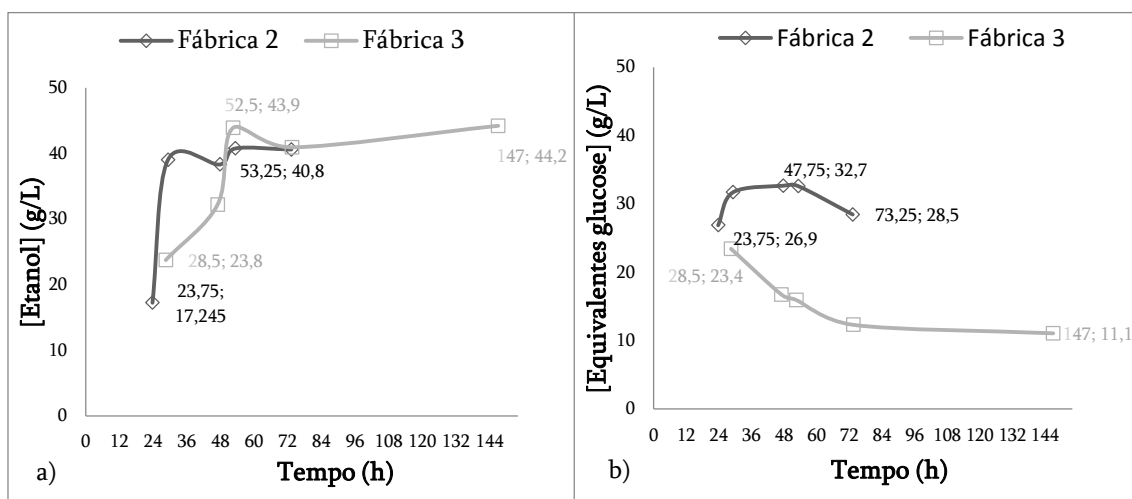


Figura 3.14: Evolução da concentração de a) de etanol e b) açúcares redutores em regime descontínuo com a *S. cerevisiae* ATCC 26602 e 5 FPU/g_{HC} de celulase NS 22192, a 38°C, para as lamas primárias da Fábrica 2 e 3, com carga de hidratos de carbono de 150 g/L.

Para as lamas da Fábrica 2, a concentração máxima de produção de etanol foi de 41 g/L às 53,3 h, como se verifica na figura 3.14 a). Após esse tempo a concentração mantém-se constante até ao final da fermentação. No caso das lamas da Fábrica 3, o tempo de fermentação foi maior, mas o pico máximo de produção de etanol foi atingido às 52,5h com uma concentração de 44 g/L. A figura 3.14 b) apresenta a evolução do balanço entre a produção açúcares pela celulase e do consumo de açúcares pela levedura para produzir etanol. Como se observa, para as lamas da Fábrica 2, a concentração de açúcares aumenta até às 47,8 h, portanto ainda estava a ocorrer a hidrólise de alguns hidratos de carbono, uma vez que foi adicionada uma grande quantidade de hidratos de carbono no início do processo. Neste caso as velocidades de hidrólise e de fermentação são semelhantes, ou seja, alguns açúcares hidrolisados dão origem ao etanol, enquanto outros ainda estão a ser produzidos através da hidrólise dos hidratos de carbono. Ao fim desse tempo, ocorre

o consumo dos açúcares presentes no meio fermentativo até ao final da fermentação. Os açúcares vão sendo consumidos, até atingirem uma concentração de 11 g/L no caso das lamas da Fábrica 3, e de 28,5 g/L no caso das lamas da Fábrica 2 no final da fermentação. Na tabela 3.14 estão representados os valores dos rendimentos, com base nos hidratos de carbono adicionados ao processo, da produtividade e do pH de todo o processo ao longo do tempo.

Tabela 3.14: Valores de rendimento (%), produtividade (g/(L.h)) e pH em regime descontínuo, usando lamas primárias da Fábrica 2 e 3 a 38°C, com a *S. cerevisiae* ATCC 26602 e 5 FPU/g_{HC} da celulase NS 22192.

Lamas primárias (Fábrica 2)				Lamas primárias (Fábrica 3)			
Tempo (h)	R _{EtOH} (%)	Prod. g/(L.h)	pH	Tempo (h)	R _{EtOH} (%)	Prod. g/(L.h)	pH
23,75	20,2	0,73	-	28,5	27,9	0,83	5,57
29,25	45,7	1,33	5,69	47	37,8	0,69	-
47,75	44,9	0,80	-	52,5	51,6	0,84	5,64
53,25	47,8	0,77	5,67	73,5	48,1	0,56	5,58
73,25	47,6	0,55	5,59	147	51,9	0,30	5,71

“-“ Significa que nesse determinado tempo, não foi medido o pH

Como se verifica, analisando os valores da tabela 3.14, o rendimento máximo para as lamas primárias da Fábrica 2 é atingido às 53,3 h, cerca de 48%, enquanto para as lamas da Fábrica 3 o rendimento máximo só é atingido no final da fermentação, às 147 h, com um rendimento de 52%. Estes rendimentos têm como base a conversão dos hidratos de carbono, que são adicionados ao processo, em etanol. Relativamente ao pH, verifica-se que se mantém entre os limites ótimos do processo, o que significa que não foi necessário adição de qualquer agente químico (ácido ou base) para manter o pH no intervalo ótimo do processo SSF. A concentração máxima de ácido acético foi 12,2 g/L para as lamas primárias da Fábrica 2 e 5,9 g/L para as lamas da Fábrica 3.

Nestes ensaios, como foi referido a carga elevada de hidratos de carbono fez com que o processo demorasse mais a arrancar devido à elevada massa total de lamas primárias, como se pode observar na figura 3.15.



Fonte: este trabalho

Figura 3.15: Foto dos ensaios em erlenmeyer no início do processo SSF de lamas primárias com uma carga de 150 g/L de hidratos de carbono.

Em todos os ensaios realizados em erlenmeyer em regime semi-descontínuo e descontínuo, observou-se a acumulação de sólidos no fundo do erlenmeyer para os ensaios com a lama primária, como se verifica na figura 3.16. As cargas elevadas de cinzas, especialmente carbonato de cálcio, podem causar sérios problemas, como a redução da eficiência no processo.



Fonte: este trabalho

Figura 3.16: Foto dos ensaios em erlenmeyer no final do processo SSF.

3.4. Ensaio SSF (Reator de bancada) em regime descontínuo

Iniciaram-se alguns estudos do processo SSF num biorreator de bancada com o objetivo de avaliar o processo SSF com o aumento de escala. Usou-se um biorreator com capacidade de 5 L, mas estabeleceu-se um volume de 2,5 L para os ensaios realizados. Nestes ensaios apenas se utilizou lamas primárias como biomassa lenhocelulósica e, foram usadas as lamas provenientes das Fábricas 2 e 3. A levedura usada foi a *S. cerevisiae* ATCC 26602, juntamente com a celulase NS 22192 com uma carga enzimática de 15 FPU/g_{HC}. Tendo em conta a dificuldade na agitação da mistura heterogénea verificada nos balões de erlenmeyer, os ensaios preliminares efetuados no biorreator decorreram em regime descontínuo, com uma carga inicial e única de 50 g/L de hidratos de carbono a uma agitação de 150 rpm. Foram também realizados ensaios similares em erlenmeyer para se verificar se o comportamento se manteria igual nas duas escalas. Todos estes ensaios foram realizados à temperatura de 38°C. Sendo um biorreator, consegue-se obter uma melhor monitorização de pH e controlo de temperatura, assim, não foi necessário a medição do pH das amostras retiradas periodicamente. Como nos ensaios anteriores, nestes também não houve qualquer esterilização e não foi adicionada solução de glucose ao meio fermentativo.

A figura 3.17 representa a evolução da produção de etanol e a evolução da concentração dos açúcares redutores presentes no meio, nos ensaios SSF efetuados em erlenmeyer (volume de cultura de 100 mL) em regime descontínuo, com uma carga única de 50 g/L de hidratos de carbono e uma carga enzimática de 15 FPU/g_{HC}.

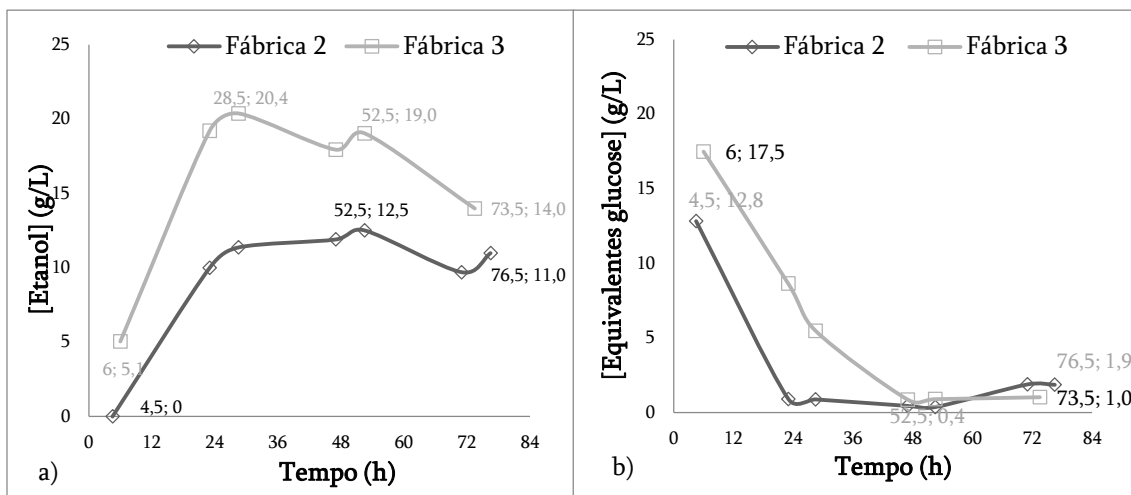


Figura 3.17: Evolução da concentração de a) etanol e b) açúcares redutores, num processo SSF em erlenmeyer, em regime descontínuo com a *S. cerevisiae* ATCC 26602 e 15 FPU/g_{HC} da celulase NS 22192, a 38°C, para as lamas primárias da Fábrica 2 e 3, com carga de hidratos de carbono de 50 g/L.

Relativamente aos resultados obtidos com as lamas primárias da Fábrica 2 (figura 3.17 a)) só foi possível tirar a primeira amostra às 4,5 h, embora a concentração de etanol seja nula. Significa que ainda estava a decorrer a hidrólise dos açúcares adicionados no início do processo SSF. O pico máximo da produção de etanol ocorre às 54,5 h com uma concentração de 13 g/L, mantendo-se praticamente constante até ao final da fermentação, às 76,5 h. A produção de etanol nas lamas primárias da Fábrica 3 foi maior, conseguindo atingir uma concentração de 20 g/L às 28,5 h de fermentação. Após esse tempo a concentração de etanol vai diminuindo gradualmente até ao final da fermentação até atingir os 14 g/L.

Observando o gráfico da figura 3.17 b) para as lamas primárias da Fábrica 2, observa-se que da análise efetuada à primeira amostra retirada, se tem uma concentração de 13 g/L de açúcares redutores presentes no meio. Ao longo do tempo os açúcares começam a ser consumidos até atingir uma concentração de 2 g/L no final da fermentação. Utilizando as lamas primárias da Fábrica 3 como biomassa lenho-celulósica, observa-se que às 6 h de processo o meio era constituído por uma concentração de equivalentes de glucose de 18 g/L e, que ao longo do tempo os açúcares começaram a ser consumidos até ao final da fermentação, atingindo cerca de 1 g/L. No caso das lamas da Fábrica 3 só foi possível tirar amostra às 6 h devido à

mistura não se encontrar homogénea até esse tempo, uma vez que teve que se adicionar mais biomassa do que as lamas da Fábrica 2 para se conseguir ter uma carga igual de hidratos de carbono.

A tabela 3.15 apresenta os valores dos rendimentos, com base nos hidratos de carbono adicionados ao processo, a produtividade e o pH do processo ao longo do tempo.

Tabela 3.15: Valores de rendimento (%), produtividade (g/(L.h)) e pH obtidos no SSF em erlenmeyer em regime descontínuo, usando lamas primárias da Fábrica 2 e 3 a 38°C, com a *S. cerevisiae* ATCC 26602 e 15 FPU/g_{HC} da celulase NS 22192, com uma carga única de 50 g/L de hidratos de carbono.

Lamas primárias (Fábrica 2)				Lamas primárias (Fábrica 3)			
Tempo (h)	R _{EtOH} (%)	Prod. g/(L.h)	pH	Tempo (h)	R _{EtOH} (%)	Prod. g/(L.h)	pH
4,5	0	0	6,23	7,5	17,7	0,84	6,22
23	35,1	0,43	-	23,5	67,6	0,84	-
28,5	39,9	0,40	6,31	29	35,9	0,72	6,08
47	41,8	0,25	-	47,5	31,6	0,38	-
52,5	43,9	0,24	6,78	53	33,5	0,36	6,27
71	34,1	0,14	-	71,5	16,4	0,19	5,61
76,5	38,6	0,14	6,44	7,5	17,7	0,84	6,22

“-“ Significa que nesse determinado tempo, não foi medido o pH

Observando a tabela 3.15 verifica-se que para as lamas primárias da Fábrica 2 o rendimento máximo é atingido apenas às 52,5 h com cerca de 44%, enquanto para as lamas da Fábrica 3 o rendimento máximo é atingido logo às 23,5 h com quase 68%. Após esse tempo os rendimentos começaram a diminuir, uma vez que não foram adicionados mais hidratos de carbono e o etanol começou a ser consumido, levando a decréscimo do rendimento. Relativamente ao pH do processo manteve-se na gama dos 6, se passasse o pH 7 teria que se adicionar um agente ácido para diminuir o pH. O pH nas reações onde se utilizam lamas primárias é mais elevado, devido à presença de carbonato de cálcio na sua constituição. No caso das lamas da Fábrica 2 o pH é ligeiramente mais elevado, porque estas lamas possuem uma percentagem superior

de carbonato de cálcio (19,6%) relativamente às lamas da Fábrica 3 (10,4%). Nestes ensaios, ocorreu a produção de ácido acético, embora não tenha afetado o pH destes ensaios. A concentração máxima para as lamas da Fábrica 2 foi de 3,6 g/L e, para as lamas da Fábrica 3 foi apenas 2,2 g/L.

A figura 3.18 representa a evolução da produção de etanol e a evolução da concentração dos açúcares redutores presentes no meio, nos ensaios SSF efetuados no biorreator de 5 L (volume de cultura de 2,5 L) em regime descontínuo, com uma carga única de 50 g/L de hidratos de carbono e uma carga enzimática de 15 FPU/g_{HC}.

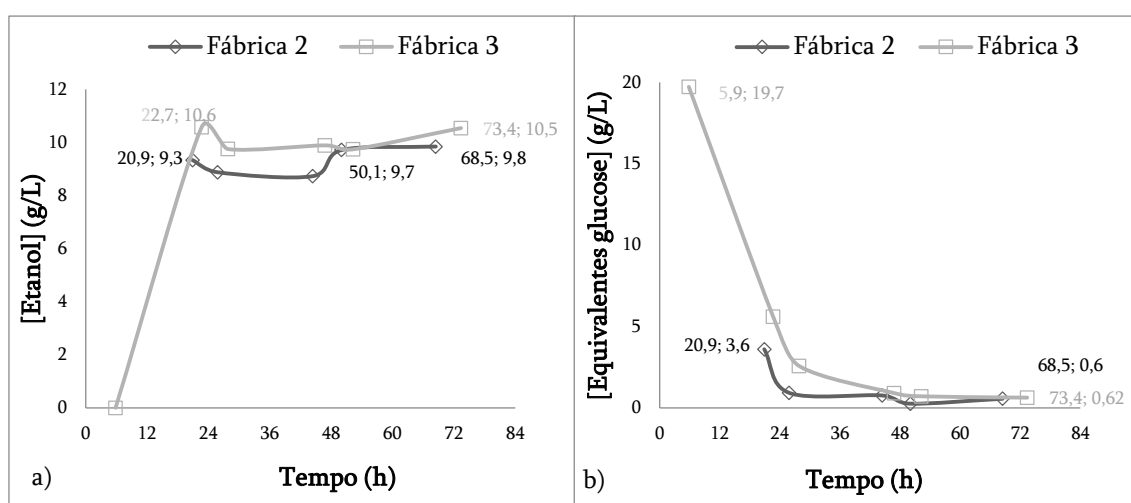


Figura 3.18: Evolução da concentração de a) etanol e b) açúcares redutores, num processo SSF no biorreator, em regime descontínuo com a *S. cerevisiae* ATCC 26602 e 15 FPU/g_{HC} da celulase NS 22192, a 38°C, para as lamas primárias da Fábrica 2 e 3, com carga de hidratos de carbono de 50 g/L.

Como se verifica, através da análise da figura 3.18 a), a concentração máxima de etanol foi de aproximadamente 11 g/L para as lamas da Fábrica 3 às 22,7 h, mantendo-se constante até ao final da fermentação. No processo de bioconversão das lamas da Fábrica 2, apenas se atingiu uma concentração máxima de cerca de 10 g/L no final da fermentação. Quanto à evolução do consumo de açúcares, representada na figura 3.18 b), verifica-se que os açúcares são praticamente todos consumidos ao longo do tempo, atingindo-se uma concentração de 0,6 g/L para os dois tipos de lamas, fazendo com que já não exista mais glucose para ser convertida em etanol, não sendo possível uma produção mais elevada de etanol. Na tabela 3.16 estão

representados os valores obtidos e calculados dos rendimentos e produtividades ao longo do tempo de reação.

Tabela 3.16: Valores de rendimento (%), produtividade (g/(L.h)) e pH obtidos no SSF no biorreator em regime descontínuo, usando lamas primárias da Fábrica 2 e 3 a 38°C, com a *S. cerevisiae* ATCC 26602 e 15 FPU/g_{HC} da celulase NS 22192, com uma carga única de 50 g/L de hidratos de carbono.

	Lamas primárias (Fábrica 2)		Lamas primárias (Fábrica 3)		
Tempo (h)	R _{E:OH} (%)	Prod. g/(L.h)	Tempo (h)	R _{E:OH} (%)	Prod. g/(L.h)
20,9	32,9	0,45	22,67	38,8	0,47
25,8	31,3	0,34	27,82	35,8	0,35
44,4	30,8	0,20	46,80	36,3	0,21
50,1	34,2	0,19	52,25	35,8	0,19
68,5	34,7	0,14	73,37	38,7	0,14

Como se verifica, os rendimentos do processo não são muito elevados e, no caso das lamas primárias da Fábrica 2 só se atinge o rendimento máximo de 35% às 68,5 h, ou seja, no final da fermentação. No caso das lamas primárias da Fábrica 3, o rendimento máximo é de 38,9% e é atingido às 23 h de fermentação, embora os rendimentos se mantenham quase iguais. Na figura 3.19 encontra-se representada a imagem do biorreator no início do processo SSF.



Fonte: este trabalho

Figura 3.19: Foto do biorreator no início do processo SSF em regime descontínuo a 38°C.

Comparando os ensaios em erlenmeyer e em biorreator verifica-se que os rendimentos em erlenmeyer são maiores do que os realizados em escala maior. Para os ensaios em erlenmeyer usando as lamas primárias da Fábrica 2, a concentração máxima de etanol foi de 13 g/L e para as lamas da Fábrica 3 foi de 20 g/L, enquanto nos ensaios em biorreator as concentrações foram ligeiramente inferiores: 10 g/L para as lamas da Fábrica 2 e 11 g/L para as da Fábrica 3. Portanto, feita uma primeira análise, o aumento de escala em sistemas biológicos deste género torna-se mais difícil, sobretudo devido à existência de gradientes de velocidade de hidrólise e de fermentação, que resultam da dificuldade de realizar uma mistura perfeita, observando-se uma diminuição dos rendimentos e da produtividade. Os ensaios em biorreator necessitam de um estudo mais alargado para se poder atingir concentrações superiores ou iguais às obtidas em erlenmeyer.

3.5. Estudo da produção de subprodutos

Ao longo dos ensaios realizados foi detetado um subproduto resultante do processo, como se pode observar através do cromatograma representado na figura 3.20.

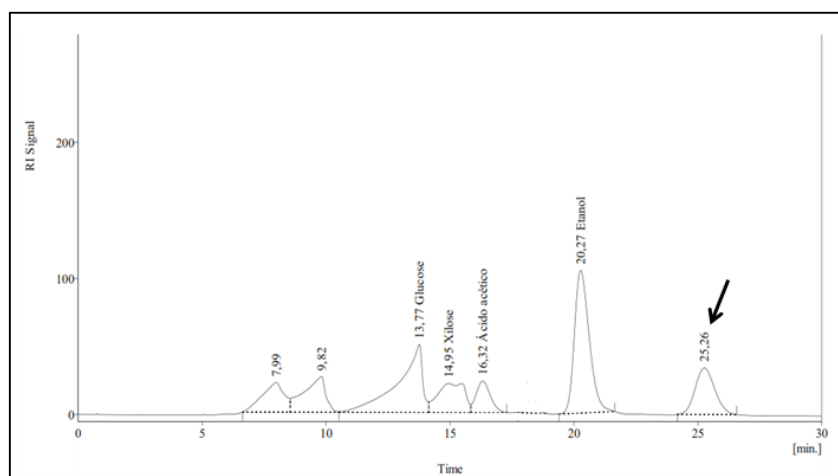


Figura 3.20: Representação de um cromatograma obtido num ensaio SSF, com a deteção de um subproduto.

Como se pode verificar através do cromatograma obtido, por volta dos 25 minutos de análise no HPLC de uma amostra, aparece um subproduto desconhecido. Para saber qual o composto que corresponde ao tempo de retenção de 25 minutos, realizaram-se alguns ensaios.

Tendo em conta alguma literatura consultada (Lebeau *et al.* 1997; Latif & Rajoka 2001), pode haver produção de xilitol, quando há presença de glucose e xilose no meio. Numa primeira análise, preparou-se uma solução-padrão de xilitol e injetou-se uma amostra desta solução no HPLC, de modo a saber o tempo de retenção deste composto. Efetuou-se igualmente uma curva de calibração correspondente ao xilitol. Numa segunda análise, foram realizados três ensaios diferentes, na presença de:

- 1) 50 g/L de glucose
- 2) 50 g/L de xilose
- 3) 40 g/L de glucose + 10 g/L de xilose

Os ensaios foram realizados em erlenmeyer com um volume de reação de 100 mL e em regime descontínuo. Ao meio fermentativo foi adicionado extrato de levedura, extrato de malte, peptona, o inóculo com a levedura *S. cerevisiae* ATCC 26602 e, glucose ou xilose, ou os dois, dependendo do ensaio. A figura 3.21 representa a evolução do processo de fermentação na presença dos diferentes açúcares.

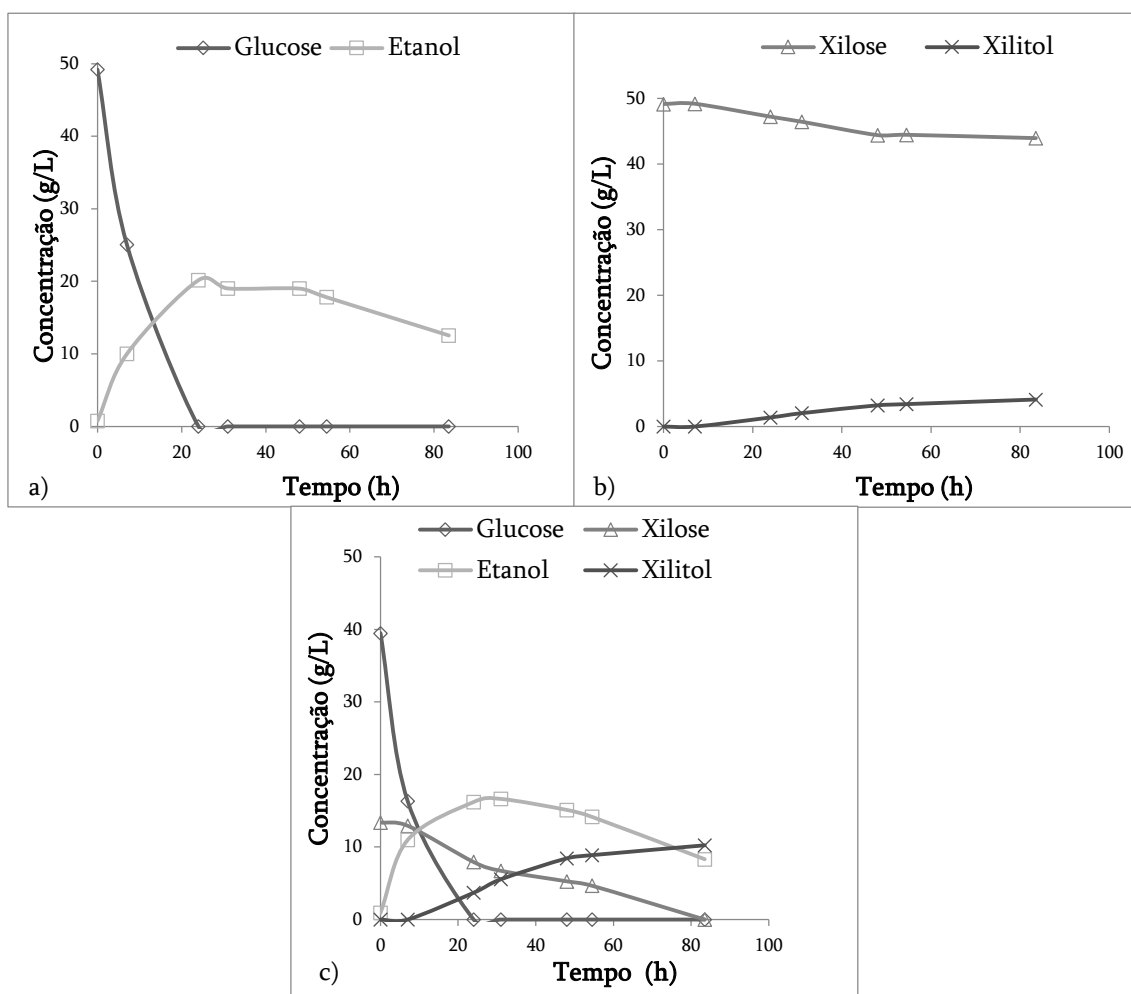


Figura 3.21: Evolução do processo de fermentação de a) 50 g/L de glucose, b) 50 g/L xilose e c) 40 g/L glucose + 10 g/L xilose, com a *S. cerevisiae* ATCC 26602.

Como se verifica na figura 3.21 a), quando se tem apenas glucose no meio, a levedura vai metabolizá-la para a multiplicação celular e para a produção de etanol. Confirma-se igualmente através deste ensaio, que sendo a glucose totalmente consumida, a levedura assimila o etanol que produziu. Neste ensaio, não existe qualquer indício de produção de subprodutos desconhecidos no meio. Quando se tem apenas xilose no meio (figura 3.21 b)), não se verifica produção de etanol. A *S. cerevisiae* é conhecida por não ter a capacidade de metabolizar xilose. No entanto, verificou-se a produção de um subproduto, que foi identificado como sendo xilitol, quando se procedeu à comparação dos cromatogramas do ensaio com os cromatogramas da solução de xilitol injetada. Houve uma pequena percentagem de

xilose que foi transformada em xilitol, produzindo-se uma pequena quantidade deste composto (4 g/L). Na presença de glucose e xilose (figura 3.21 c)) verifica-se que o consumo de glucose aumenta, até a concentração ser nula. Uma vez a glucose consumida, novamente a concentração de etanol produzido a partir da glucose metabolizada, começa a diminuir. A concentração de xilose vai diminuindo ao longo do tempo, sendo transformada em xilitol. A levedura consegue reduzir xilose a xilitol na presença de co-substratos, como a glucose ou o etanol (Lebeau *et al.* 1997; Latif & Rajoka 2001). Neste ensaio, foi determinada uma concentração final de quase 10 g/L de xilitol. Sugere-se que em trabalho futuro se efetuem estudos para avaliar o efeito da produção de xilitol no processo de obtenção de etanol, uma vez que essa produção de xilitol poderá decrescer a quantidade de etanol.

4. Conclusão

Este trabalho teve como objetivo principal avaliar a possível valorização dos resíduos lenho-celulósicos, como as lamas primárias, provenientes de indústrias papeleras, como fonte de biomassa e transformá-los em bioprodutos, como o etanol, através da estratégia de SSF. Para atingir este objetivo foi necessário realizar alguns estudos:

- Avaliação das características dos microrganismos a serem usados, bem como a avaliação do seu crescimento celular. Das leveduras disponíveis em laboratório, utilizou-se a *Saccharomyces cerevisiae* (comercial) a 38°C, *Kluyveromyces marxianus* NCYC 1426 a 38 e 42°C e a *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602 a 38°C;
- Avaliação do potencial das lamas primárias provenientes de Fábricas diferentes para se poder comparar qual a melhor a ser usada nos processos SSF e verificou-se que têm comportamentos semelhantes, as lamas da Fábrica 1 e 2 conseguiram atingir rendimentos ligeiramente superiores às das lamas da Fábrica 3. Como matéria-prima de referência usou-se a pasta crua;
- Comparação da performance das diferentes estirpes. Verificou-se que a estirpe *S. cerevisiae* ATCC 26602 obteve um melhor desempenho no processo SSF a 38°C. A *K. marxianus* NCYC 1426 teve uma certa inconstância com a biomassa lenho-celulósica usada e o processo a 42°C não mostrou ter efeitos positivos na produção de etanol;
- Avaliação da utilização de diferentes celulasas nos processos SSF, não se verificando diferenças significativas na utilização das duas, e otimização da carga enzimática de 35 FPU/g_{HC} para 15 FPU/g_{HC}, de maneira a rentabilizar o processo;

- Avaliação de dois tipos de regime (semi-descontínuo e descontínuo) de adição de biomassa lenho-celulósica. O regime semi-descontínuo apresenta a vantagem de ter melhor consistência inicial do meio reacional e maior economia do extrato enzimático. Quanto ao regime descontínuo, em alguns casos, os rendimentos foram superiores devido à maior quantidade de HC adicionados logo no início da fermentação;
- Avaliação do comportamento das lamas primárias em escala de erlenmeyer e em biorreator de bancada em regime descontínuo, e verificou-se que os rendimentos em erlenmeyer são maiores do que os realizados em escala maior.

O principal objetivo deste trabalho foi alcançado, uma vez que se utilizaram as lamas primárias, conseguindo atingir boas concentrações de bioetanol, conseguindo assim também valorizar os resíduos lenho-celulósicos provenientes das indústrias papeleiras. No entanto, era necessária a realização de mais investigação neste tema. Sugere-se que em trabalhos futuros seja feito:

- Um estudo mais detalhado sobre a tolerância das leveduras usadas ao substrato (glucose e xilose) e ao etanol;
- Um estudo mais alargado na escala de biorreator de bancada para se atingir concentrações superiores às obtidas em erlenmeyer, como seria de esperar;
- Estudos de modo a avaliar o efeito da produção de xilitol no processo de obtenção de etanol.

5. Bibliografia

- Ask, M. et al., 2012. Challenges in enzymatic hydrolysis and fermentation of pretreated *Arundo donax* revealed by a comparison between SHF and SSF. *Process Biochemistry*, 47(10), pp.1452–1459
- Ballesteros, M. et al., 2004. Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SFS) with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. *Process Biochemistry*, 39(12), pp.1843–1848.
- Ballesteros, M. et al., 2002. Ethanol production from paper material using a simultaneous saccharification and fermentation system in a fed-batch basis. *World journal of microbiology & biotechnology*, (1985), pp.559–561.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, pp.248–54.
- Brethauer, S. & Wyman, C.E., 2010. Review: Continuous hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production. *Bioresource technology*, 101(13), pp.4862–74.
- Cabral, J.M.S., Aires-Barros, M.R., Gama, M. *Engenharia Enzimática*. Edições Lidel, Lisboa, 2003.
- Carvalho, M. da G.V.S., 1999. *Efeito das variáveis de cozimento nas características químicas de pasta Kraft de Eucalyptus globulus*. Universidade de Coimbra.
- Celpa, "Associação da indústria papelreira: boletim estatístico" (2011) Disponível em <<http://www.celpa.pt/FileGet.aspx?Filed=4413>>.
- Chen, H. et al., 2012. Enzymatic hydrolysis of recovered office printing paper with low enzyme dosages to produce fermentable sugars. *Applied biochemistry and biotechnology*, 166(5), p.1121.
- CSB - Centraalbureau voor Schimmelcultures, culture collection database. Disponível: <<http://www.cbs.knaw.nl/databases/>>.
- Directiva 2009/28/CE do parlamento europeu e do conselho, 23 de Abril de 2009. Promoção da utilização de energia proveniente de fontes renováveis. (2008), pp.16–62.
- Duff, S.J.B. & Murray, W.D., 1996. Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: a review. *Bioresource Technology*, 55, pp.1–33.

- Eduardo, S., Luiz, J. & Garcia, F., 2009. O etanol de segunda geração: limites e oportunidades. *BNDES*, pp.117–155.
- Eklund, R. & Zacchi, G., 1995. Simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated willow. *Enzyme and Microbial Technology*, 17(3), pp.255–259.
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. The state of food and agriculture, 2008.
- Fernandes, D.L.A. et al., 2010. *Second Generation Bioethanol from Lignocellulosics: Processing of Hardwood Sulphite Spent Liquor*, Aveiro.
- Ferreira, V., 2010. *Produção de B-glucosidase em Saccharomyces cerevisiae recombinante e avaliação de seu emprego no processo de hidrólise enzimática simultânea à fermentação para a produção de etanol de segunda geração*. Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- Gonçalves, H., Carapina, P., Silva, R., & Freitas, S. (2007) *Estudo preliminar de uma unidade de produção de pasta branca para papel - Processo Kraft*. Anteprojeto, Universidade de Aveiro.
- Hamelinck, C.N., Hooijdonk, G. Van & Faaij, A.P., 2005. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. *Biomass and Bioenergy*, 28(4), pp.384–410.
- Kádár, Z., Szengyel, Z. & Réczey, K., 2004. Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of industrial wastes for the production of ethanol. *Industrial Crops and Products*, 20(1), pp.103–110.
- Kang, L., Wang, W. & Lee, Y.Y., 2010. Bioconversion of kraft paper mill sludges to ethanol by SSF and SSCF. *Applied biochemistry and biotechnology*, 161(1-8), pp.53–66.
- Krishna, S.H., Reddy, T.J. & Chowdary, G. V, 2001. Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic wastes to ethanol using a thermotolerant yeast. *Bioresource technology*, 77, pp.193–196.
- Lark, N. et al., 1997. Production of ethanol from recycled paper sludge using cellulase and yeast, *Kluyveromyces Marxianus*. *Biomass and Bioenergy*, 12(2), pp.135–143.
- Latif, F. & Rajoka, M.I., 2001. Production of ethanol and xylitol from corn cobs by yeasts. *Bioresource technology*, 77(1), pp.57–63.

- Lebeau, T., Jouenne, T. & Junter, G., 1997. Fermentation of D -xylose by free and immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters*, 19(7), pp.615–618.
- Lin, Y. & Tanaka, S., 2006. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Applied microbiology and biotechnology*, 69(6), pp.627–42.
- Linde, M., Galbe, M. & Zacchi, G., 2007. Simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated barley straw at low enzyme loadings and low yeast concentration. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(5), pp.1100–1107.
- Lynd, L.R. et al., 2002. Microbial Cellulose Utilization : Fundamentals and Biotechnology Microbial Cellulose Utilization : Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology*, 66(3), pp.1–74.
- Marques, S. et al., 2008. Conversion of recycled paper sludge to ethanol by SHF and SSF using *Pichia stipitis*. *Biomass and Bioenergy*, 32(5), pp.400–406.
- McKendry, P., 2002. Energy production from biomass (Part 1): Overview of biomass. *Bioresource technology*, 83(1), pp.37–46.
- Menezes, F.F. de, 2013. *Sacarificação e fermentação simultâneas de resíduos lignocelulósicos da indústria da pasta e papel para a produção de bioetanol*. Universidade de Coimbra.
- Mosier, N. et al., 2005. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource technology*, 96(6), pp.673–86.
- National Collection of Yeast Cultures (NCYC). Disponível em: <<http://www.ncyc.co.uk/>>.
- Nordmark, T.O.R.S. & Bakalinsky, A., 2007. Measuring Cellulase Activity. *Applied biochemistry and biotechnology*, 136, pp.131–139.
- NREL-LAP 001. Standard Method for Determination of Total Solids in Biomass. Laboratory Analytical Procedure 001. National Renewable Energy Laboratory. (1994) Disponível em: <http://www.nrel.gov/biomass/analytical_procedures.html>.
- NREL-LAP 003. Determination of Acid-Insoluble Lignin in Biomass. Laboratory Analytical Procedure 003. National Renewable Energy Laboratory. (1995) Disponível em: <http://www.nrel.gov/biomass/analytical_procedures.html>.

- NREL-LAP 004. Determination of Acid-Soluble Lignin in Biomass. Laboratory Analytical Procedure 004. National Renewable Energy Laboratory. (1996) Disponível em: <http://www.nrel.gov/biomass/analytical_procedures.html>.
- NREL-LAP 005. Standard Method for Ash in Biomass. Laboratory Analytical Procedure 005. National Renewable Energy Laboratory. (1994) Disponível em: <http://www.nrel.gov/biomass/analytical_procedures.html>.
- NREL-LAP 006. Measurement of Cellulase Activities. Laboratory Analytical Procedure 006. National Renewable Energy Laboratory. (1996) Disponível em: <http://www.nrel.gov/biomass/analytical_procedures.html>.
- NREL-LAP 008. SSF Experimental Protocols: Lignocellulosic Biomass Hydrolysis and Fermentation. Laboratory Analytical Procedure 008. National Renewable Energy Laboratory. (1994) Disponível em: <http://www.nrel.gov/biomass/analytical_procedures.html>.
- Ogeda, T.L. & Petri, D.F.S., 2010. Hidrólise Enzimática de Biomassa. *Química Nova*, 33(7), pp.1549–1558.
- Olofsson, K., Bertilsson, M. & Lidén, G., 2008. A short review on SSF - an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. *Biotechnology for biofuels*, 1(1), p.7.
- Olsson, L. et al., 2006. Separate and simultaneous enzymatic hydrolysis and fermentation of wheat hemicellulose with recombinant xylose utilizing *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 129-132, pp.117–29.
- Pacheco, T.F., 2011. Produção de Etanol: Primeira ou Segunda Geração? , pp.1–6.
- Palmqvist, E. & Hahn-Hägerdal, B., 2000. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology*, 74(1), pp.25–33.
- Piotto, Z.C., 2003. *Eco-eficiência na Indústria de Celulose e Papel - Estudo de Caso*. Universidade de São Paulo.
- Raposo, S., Costa, M.E., Slides de Engenharia de Reatores Biológicos, FCT, Universidade do Algarve, 2009/2010.
- Sánchez, O.J. & Cardona, C. a, 2008. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource technology*, 99(13), pp.5270–95.

- Schlittler, L.A.F.S. & Pereira Jr., N., 2008. Produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósicos: pré-tratamento e estratégias de processamento. *Diálogos & Ciência - Revista da Rede de Ensino FTC*.
- Scott, G.M. & Smith, A., 1995. Sludge characteristics and disposal alternatives for the pulp and paper industry. *International Environmental Conference Proceedings*, pp.269–279.
- Shen, F. et al., 2011. Evaluation of hemicellulose removal by xylanase and delignification on SHF and SSF for bioethanol production with steam-pretreated substrates. *Bioresource technology*, 102(19), pp.8945–51.
- Souza, C.J.A., 2011. *Produção de Etanol por Sacarificação e Fermentação Simultâneas do Bagaço de Cana-de-Açúcar Utilizando Leveduras Termotolerantes*.
- Tomás-Pejó, E. et al., 2008. Comparison of SHF and SSF processes from steam-exploded wheat straw for ethanol production by xylose-fermenting and robust glucose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Biotechnology and bioengineering*, 100(6), pp.1122–31.
- Vásquez, M.P. et al., 2007. Enzymatic Hydrolysis Optimization to Ethanol Production by Simultaneous Saccharification and Fermentation. , 136, pp.141–153.
- Walker, G.M., 2010. *Bioethanol : Science and technology of fuel alcohol*,
- Wingren, A., Galbe, M. & Zacchi, G., 2003. Techno-economic evaluation of producing ethanol from softwood: comparison of SSF and SHF and identification of bottlenecks. *Biotechnology progress*, 19(4), pp.1109–17.
- Wyman, C.E., 1994. Ethanol from lignocellulosic biomass: Technology, economics, and opportunities. *Bioresource Technology*, 50(1), pp.3–15.

6. Anexos

Anexo I. Caracterização das amostras de biomassa lenho-celulósica

Para caracterizar as amostras de biomassa lenho-celulósica foi necessário determinar alguns parâmetros, como: determinação de humidade, o teor de hidratos de carbono, a lenhina total e o teor de cinzas.

➤ Determinação da humidade

A determinação da humidade da biomassa lenho-celulósica é realizada de acordo com o protocolo LAP-001: “*Standart Method for Determination of Total Solids in Biomass*”, efetuado pelo Laboratório Nacional de Energia Renovável (National Renewable Energy Laboratory – NREL) (NREL-LAP 001, 1994).

Para realizar esta análise é necessário seguir o seguinte protocolo:

- Este método envolve secar a amostra a $105^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ numa estufa. Cada amostra deve ser executada em duplicado, no mínimo;
- Pesar um pesa-filtro e registar o peso;
- Pegar na amostra e, pesar 1-5 gramas no pesa-filtro e registar o seu peso;
- Colocar a amostra numa estufa a $105^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ e secar até peso constante;
- Retirar a amostra da estufa e colocar num exsicador e deixar arrefecer até à temperatura ambiente;
- Pesar o peso-filtro que contém a amostra seca e registar esse peso.

Para se poder calcular a humidade das amostras, é necessário primeiro calcular o peso da amostra seca a 105°C , em gramas, e a percentagem dos sólidos totais, como está representado nas equações 6.1, 6.2 e 6.3.

Amostra seca 105°C (g)

$$= (\text{Peso do pesa} - \text{filtros (g)} + \text{Amostra seca 105°C (g)}) - \text{Peso do pesa} - \text{filtros (g)}$$

Equação 6.1

$$\text{Sólidos totais (\%)} = \frac{\text{Amostra seca 105°C (g)}}{\text{Amostra Húmida (g)}} \times 100$$

Equação 6.2

$$\text{Humidade (\%)} = 100 - \text{Sólidos Totais (\%)}$$

Equação 6.3

A equação 6.3 representa o cálculo da determinação da humidade da amostra da biomassa lenho-celulósica.

➤ **Determinação da lenhina total (lenhina solúvel e insolúvel)**

Para determinar a lenhina solúvel e insolúvel presente na biomassa lenho-celulósica recorre-se aos protocolos LAP-004: “*Determination of Acid-Soluble Lignin in Biomass*” e LAP-003: “*Determination of Acid-Insoluble Lignin in Biomass*”, respetivamente. Foram realizados pelo laboratório NREL (NREL-LAP 003, 1995; NREL-LAP 004, 1996).

Segue-se os seguintes passos para se calcular a lenhina insolúvel:

- Deve-se identificar os cadinhos necessários para a análise e colocá-los na mufla a 575°C para atingir um peso constante de 0,3 mg. Após a saída da mufla, guarda-se os cadinhos num exsiccador até que seja necessário;
- Pesar $0,3 \pm 0,01$ g da amostra a analisar e coloca-se num tubo de ensaio. Identifica-se o peso inicial da amostra. Cada amostra deve ser analisada em duplicado, no mínimo;

- Adicionar $4,3 \pm 0,01$ mL ($4,92 \pm 0,01$ g) de 72% de H_2SO_4 e utilizar uma vareta de vidro para misturar durante 1 minuto, ou até que a amostra esteja completamente molhada;
- Coloca-se o tubo de ensaio num banho de água controlado à temperatura de $30^\circ C$, onde vai ocorrer a hidrólise durante 2 horas;
- Agita-se a amostra a cada 15 minutos, de modo, a assegurar a mistura completa;
- Após as 2 h, transfere-se o hidrolisado para um frasco de vidro com tampa e diluir até obter uma concentração de 4% de ácido pela adição de $84 \pm 0,04$ mL de água. Deve-se ter o cuidado e transferir todos os resíduos sólidos, juntamente com o hidrolisado;
- Coloca-se os frascos de vidro na autoclave durante 1 hora a $121^\circ C$;
- Após o término do tempo na autoclavagem, coloca-se os frascos a arrefecer durante cerca de 20 minutos à temperatura ambiente;
- Filtra-se a amostra a vácuo coloca-se os filtros nos cadinhos previamente pesados;
- Decanta-se 15-25 mL do filtrado para um recipiente hermeticamente fechado para se utilizar mais tarde na determinação da lenhina solúvel (LAP-004);
- Usa-se água quente deionizada para lavar as partículas que se aderem ao frasco de vidro;
- Seca-se o cadinho e o filtro a $105^\circ C$ durante 2 horas;
- Arrefece-se num exsiccador e regista-se o peso, o peso do cadinho, a lenhina insolúvel em ácido;
- Coloca-se o cadinho e o filtro na mufla à temperatura de $575^\circ C$, pelo menos, durante 3h;
- Arrefece-se num exsiccador e registar o peso, o peso do cadinho e as cinzas.

Para se poder a quantidade percentual de lenhina insolúvel, tem que ser recorrer à equação 6.4, 6.5 e 6.6:

$$W1 = (\text{Peso do cadinho (g)} + \text{Peso do filtro (g)} + \text{lenhina insolúvel (g)} 105^{\circ}\text{C})$$

Equação 6.4

$$\text{Lenhina insolúvel } 105^{\circ}\text{C (g)} = W1 - \text{Peso do filtro (g)} - \text{Peso do cadinho (g)}$$

Equação 6.5

$$\text{Lenhina insolúvel (\%)} = \frac{\text{Lenhina insolúvel } 105^{\circ}\text{C (g)}}{\text{Amostra Seca } 45^{\circ}\text{C (g)}} \times 100$$

Equação 6.6

Para se poder determinar a lenhina solúvel em ácido, basta seguir os passos descritos no protocolo LAP-004:

- Para realizar esta análise, deve-se configurar e calibrar um espectrofotómetro seguindo os protocolos recomendados no manual do instrumento;
- Mede-se a absorvância do hidrolisado obtido no protocolo LAP-003 a 205 nm. Uma solução de 4% de H₂SO₄ deve ser usada como branco;
- Se a leitura da absorvância for superior a 0,7, a amostra tem de ser diluída. Dilui-se a amostra de modo que a leitura da absorvância resultante esteja entre 0,2 e 0,7. O branco também deverá ser diluído na mesma proporção que a amostra e usado como branco de referência para a análise de repetição;
- Cada amostra deve ser analisada em duplicado.

Apartir das equações seguintes pode-se calcular a percentagem de lenhina solúvel presente na amostra analisada.

$$\text{Lenhina solúvel (g/L)} = \frac{A}{b \times a} \times df$$

Equação 6.7

Onde:

A – Absorvância a 205 nm;

b – Comprimento do percurso celular, 1 cm;

a – Absorvidade, 110 L/g-cm, para determinado material de biomassa;

df – Fator de diluição.

$$\text{Lenhina solúvel (g)} = \frac{\text{Lenhina Solúvel (g/L)} \times V}{\frac{1000\text{mL}}{L}} \quad \text{Equação 6.8}$$

Onde:

V – Volume do filtrado, que deve ser 87 mL, se a amostra é hidrolisada a partir da análise do protocolo LAP-003.

$$\text{Lenhina solúvel (\%)} = \frac{\text{Lenhina solúvel (g)}}{\text{Amostra seca a } 45^{\circ}\text{C}} \times 100 \quad \text{Equação 6.9}$$

➤ Determinação do teor de cinzas

O teor de cinzas é determinado seguindo o protocolo LAP-005: “*Standart Method for Ash in Biomass*”, efetuado pelo NREL (NREL-LAP 005, 1994). Para isso, é necessário seguir os seguintes passos:

- Identifica-se um cadinho de porcelana e coloca-se num forno de mufla a 575°C, até atingir peso constante (\approx 4h). Retira-se da mufla e deixa-se arrefecer à temperatura ambiente num exsicador, pesar e registar o peso. Deve-se manter o cadinho dentro do exsicador até ser usado;
- Pesa-se cerca de 0,5 a 1 g da amostra de biomassa para o cadinho, com a balança tarada. Registar a massa da amostra;
- Coloca-se o recipiente e o conteúdo na mufla a incinerar a 575°C, por um mínimo de 3h, ou até o carbono ser todo eliminado;
- Retira-se o cadinho para um exsicador, até arrefecer à temperatura ambiente, pesa-se e regista-se o valor.

Para se poder calcular o teor de cinzas percental presentes na amostra a analisar, deve-se recorrer às equações 6.10 e 6.11.

$$\text{Cinzas } 575^{\circ}\text{C (g)} = (\text{Peso cadinho} + \text{Peso amostra incinerada } 575^{\circ}\text{C})(g) - \text{Peso cadinho}(g)$$

Equação 6.10

$$\text{Cinzas } 575^{\circ}\text{C (\%)} = \frac{\text{Cinzas } 575^{\circ}\text{C (g)}}{\text{Amostra seca } 105^{\circ}\text{C (g)}} \times 100$$

Equação 6.11

➤ **Determinação dos hidratos de carbono**

Para determinar os hidratos de carbono na amostra, só é necessário realizar alguns cálculos. Mas para isso, tem de estar calculado a quantidade de lenhina total, que é o somatório da lenhina solúvel e lenhina insolúvel e, a quantidade de cinzas a 575°C.

$$\text{Hidratos de carbono (\%)} = \text{Matéria orgânica (\%)} - \text{Lenhina total (\%)}$$

Equação 6.12

$$\text{Lenhina total (\%)} = \text{Lenhina insolúvel (\%)} + \text{Lenhina solúvel (\%)}$$

Equação 6.13

$$\text{Matéria orgânica (\%)} = 100 - \text{Matéria inorgânica (\%)}$$

Equação 6.14

$$\text{Matéria inorgânica} = \text{Cinzas } 575^{\circ}\text{C}$$

Equação 6.15

Anexo II. Atividade enzimática dos extratos enzimáticos

Para determinar a atividade enzimática dos extratos enzimáticos é necessário seguir o protocolo LAP-006: “*Measurement of Cellulase Activities*” (NREL-LAP 006,1996):

- Recorta-se tiras de papel de filtro com largura 1,0 cm e um comprimento de 6,0 cm (\approx 50 mg);
- Coloca-se as tiras de papel em tubos de ensaio, exceto no “branco” e nos controlos de enzima;
- Adiciona-se 1,0 mL de tampão citrato a 0,05 M (pH 4,8) em cada tubo; as tiras de papel de filtro devem ficar saturadas com o tampão. Coloca-se na incubadora a 38°C por alguns minutos;
- Após uns minutos na incubadora, adiciona-se 0,5 mL de solução de enzima diluída. É feito pelo menos duas diluições de modo a que, pelo menos, uma das diluições liberte mais de 2,0 mg de glucose e, outra liberte menos de 2,0 mg de glucose;
- Incuba-se a 38°C durante 60 minutos;
- No fim de período de incubação para parar a reação da enzima adiciona-se 3,0 mL de reagente DNS modificado, aplicando o Método de DNS modificado.

Este procedimento também é realizado para o branco do solvente, com 1,5 mL de tampão citrato, para o controlo para cada diluição de enzima, com 1,0 mL de tampão citrato + 0,5 mL de solução de enzima, e para o controlo de substrato, com 1,5 mL de tampão citrato e tira de papel de filtro.

- Faz-se a leitura no espectrofotómetro a 540 nm de todas as amostras contra o branco do solvente. Subtrai-se a absorvância do controlo ao valor da absorvância da amostra reacional;
- Aplica-se a equação da curva de calibração da glucose, para se poder determinar a concentração de glucose libertada na hidrólise da tira do papel. Multiplica-se por 0,5 mL para calcular a massa de glucose libertada nos 0,5 mL da solução de enzima;
- Para encontrar as duas diluições para obter aproximadamente 2 mg de glucose é necessário fazer o seguinte cálculo:

$$[\textit{enzima}]/(\textit{mL de enzima}) = \frac{1}{\textit{fator de diluição}} \quad \textbf{Equação 6.16}$$

- Aplica-se uma interpolação linear simples entre os dois pontos para determinar a concentração de solução de enzima diluída que libertou 2 mg de glucose. O valor da concentração de enzima é depois necessário para calcular a atividade enzimática (FPU/mL de enzima), através da equação 17.

$$FPU = \frac{0,37}{[\textit{enzima}]} \quad \textbf{Equação 6.17}$$

Anexo III. Determinação quantitativa dos açúcares redutores e a preparação da solução de tampão citrato a 0,05 M

➤ Preparação do tampão citrato a 0,05 M

Para preparar tampão citrato 1 M a pH 4,5 foi necessário pesar 210 g de ácido cítrico monohidratado que foi dissolvido em 750 mL de água destilada. Adicionou-se hidróxido de sódio até atingir o pH 4,3 (\approx 50-60 g) e água até perfazer o volume de 1000 mL, mediu-se o pH 4,5. Se o pH não estiver a 4,5, deve-se adicionar hidróxido de sódio até atingir o pH necessário. Por fim, para prepara a solução tampão citrato a 0,05 M bastou diluir a solução tampão (NREL-LAP 006, 1996)

➤ Preparação do reagente de DNS

Para preparar o reagente de DNS mistura-se 10,6 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico e 19,8 g de hidróxido de sódio em 1416 mL de água destilada. Após a sua dissolução, adiciona-se 306 g de tartarato duplo de potássio e sódio com 8,3 g de metabissulfito de sódio e 7,6 mL de fenol (fundido a 50°C).

➤ Método do DNS modificado

Neste método ocorre uma reação de oxidação-redução, em meio alcalino, entre o açúcar e o ácido 3,5-dinitrosalicílico (agente oxidante de cor amarelada). O ácido 3,5-dinitrosalicílico é reduzido pelo açúcar, formando o ácido 3-amino-5-nitrosalicílico e

oxidando o açúcar. A concentração de açúcares é determinada através da medição da luz absorvida num comprimento de onda de 540 nm pelo ácido 3-amino-5-nitrosalicílico.

Para determinar a quantidade de açúcares adicionou-se 1 mL de solução tampão citrato 0,05 M em tubos de ensaio, com 0,5 mL de amostra, diluída em tampão sempre que for necessário, e 3 mL de reagente de DNS modificado. Agitou-se a amostra de modo a ficar a mistura homogénea. Os tubos de ensaio foram colocados num banho de água a ferver durante 5 minutos e, de seguida, colocou-se num banho de gelo para se dar o arrefecimento durante 5 minutos. Em cuvetes de plástico é colocado 0,2 mL da mistura com 2,5 mL de água destilada. As amostras são lidas num espectrofotómetro Vis-Uv com um comprimento de onda a 540 nm contra um branco com tampão citrato 0,05 M que sofreu o mesmo tratamento das amostras.

- **Construção da curva de calibração**

Para efetuar a curva de calibração para a glucose, foi necessário preparar 50 mL de uma solução com uma concentração de 1 mg/mL de glucose em tampão citrato 0,05 M. Após a preparação da solução foi necessário enumerar tubos de ensaio e, em cada tubo, foi preparado soluções-padrão de glucose com diferentes concentrações conhecidas, como mostra a tabela 6.1. Diluiu-se as diferentes alíquotas de solução-padrão stock de glucose 1 mg/mL com tampão citrato 0,05 M. Todos os tubos devem conter um volume total de 1 mL. O tubo 0 apenas contém tampão, consiste no branco.

Tabela 6.1: Quantidades necessárias de solução stock de glucose, volume de tampão e a concentração de glucose para se poder realizar a curva de calibração.

Tubo	Volume solução stock de glucose (mL)	Volume tampão citrato (mL)	[Glucose] (mg/mL)
0	0,5	4,5	0,503
1	1	4	1,005
2	1,5	3,5	1,507
3	2	3	2,010
4	2,5	2,5	2,512
5	3	2	3,014
6	3,5	1,5	3,517
7	4	1	4,019
8	4,5	0,5	4,522
9	5	0	5,024
10	0,5	4,5	0,502

A concentração de glucose foi calculada a partir da equação 18.

$$[Glucose](mg/mL) = \frac{[Glucose]_{stock} \times V_{sol. stock de glucose}}{(V_{sol. stock de glucose} + V_{tampão})} \quad \text{Equação 6.18}$$

Onde:

$[Glucose]_{stock}$ – corresponde à concentração de glucose, para uma determinada massa e um determinado volume.

Após as diluições, foi necessário aplicar o método de DNS modificado, descrito anteriormente. O gráfico 6.1 representa a curva de calibração que relaciona a densidade ótica a 540 nm com a concentração de glucose, como, por exemplo, a curva de calibração, preparada no dia 28/03/2014.

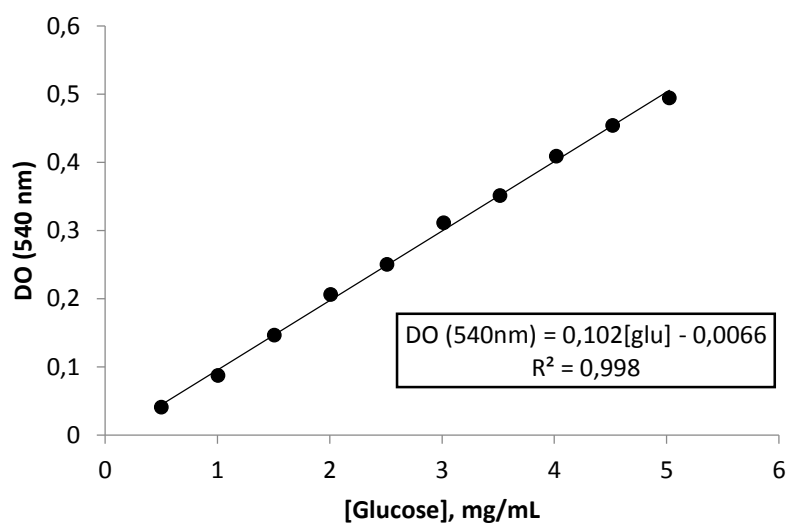


Figura 6.1: Relaciona a densidade ótica a 540nm com a concentração de glicose (mg/mL).

Para determinar a quantidade de açúcares redutores em cada uma das amostras, aplica-se a equação 19.

$$[Glucose](g/L) = \frac{DO - b}{a} \times fd \quad \text{Equação 6.19}$$

Onde:

- fd – Fator de diluição

$$fd = \frac{V_{total \ de \ amostra \ diluída}}{V_{amostra \ original}} \quad \text{Equação 6.20}$$

Anexo IV. Quantificação de compostos por HPLC e os seus tempos de retenção

As colunas para o HPLC são constituídas por co polímeros de estireno com divinil benzeno, na forma de partículas com 8 µm de diâmetro. Nos núcleos de benzeno encontram-se inseridos grupos funcionais de sulfonato associado ao catião Ca^{2+} . Esta associação interage com os grupos funcionais do hidróxido (OH^-) presentes no álcool e nos monossacarídeos. Os diferentes constituintes da amostra serão identificados através de um detetor de índice de refração, baseando na mudança do índice de refração do eluente causada pelas moléculas constituintes da amostra.

- **Preparação de eluente**

Para preparar o eluente é necessário filtrar um litro de água ultrapura, utilizando um filtro de membrana com 0,22 µm de porosidade. Desgaseifica-se a água durante 15 minutos num banho de ultra-sons. Após este tempo, coloca-se a água desgaseificada no reservatório do eluente.

- **Preparação da amostra**

- Filtra-se a amostra a ser injetada com ajuda de filtros de seringa com membrana de 0,22 µm de porosidade para um tubo eppendorf;
- Injeta-se a amostra no aparelho de HPLC;
- Identifica-se a amostra que vai ser analisada;
- Após decorrer o tempo necessário para analisar a amostra, é obtido um cromatograma, onde se vai observar os diferentes picos que correspondem a cada constituinte da amostra;

- As concentrações dos constituintes da amostra são calculados, comparando a altura dos picos dos diversos constituintes com uma curva de calibração previamente preparada para cada um.

- **Construção da curva de calibração**

- Prepara-se diversas soluções padrão com diferentes concentrações em tampão citrato;
- Injeta-se cada uma das soluções padrão;
- Após o tempo necessário para analisar a amostra, obtém-se o cromatograma, seleciona-se o pico e adiciona-se o composto e a concentração conhecida da solução padrão injetada.
- Obtém-se a relação entre a resposta obtida com a concentração da solução padrão preparada.

A tabela seguinte mostra os respectivos compostos injetados no HPLC com os respectivos tempos de retenção em minutos.

Tabela 6.2: Nome dos compostos com os respectivos tempos de retenção

Nome do composto	Tempo de retenção (min)
Ácido acético	17,007
Arabinose	16,727
Celobiose	11,027
Etanol	20,070
Galactose	14,880
Glicerol	19,453
Glucose	13,327
Manose	15,193
Xilitol	25,633
Xilose	14,500

Os gráficos seguintes (figura 6.2, 6.3 e 6.4) representam as curvas de calibração da glucose, xilose e etanol.

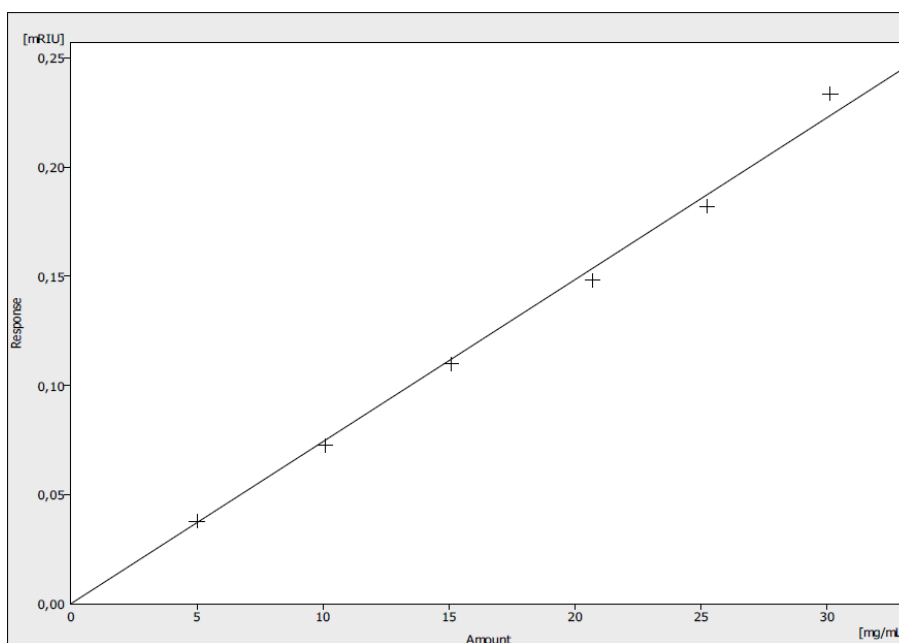


Figura 6.2: Representação do gráfico de calibração da glucose para as análises das amostras injetadas no HPLC.

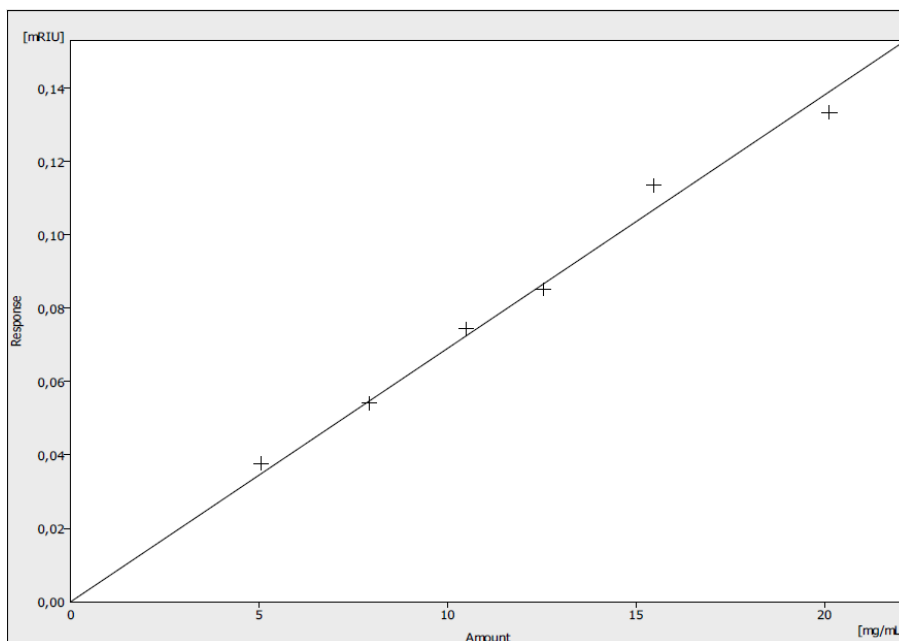


Figura 6.3: Representação do gráfico de calibração da xilose para as análises das amostras injetadas no HPLC.

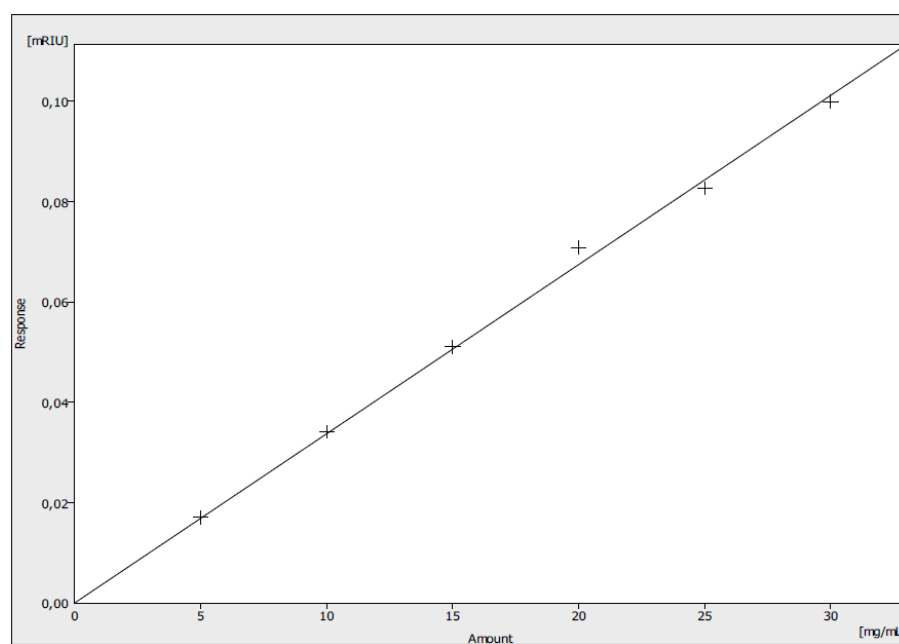


Figura 6.4: Representação do gráfico de calibração da glucose para as análises das amostras injetadas no HPLC.

Anexo V. Ensaio SSF com lamas primárias diferentes

Foram adquiridas umas lamas primárias provenientes de uma fábrica diferente tendo sido caracterizadas para se poder realizar um ensaio em regime semi-contínuo. O aspeto destas lamas era diferente das outras lamas primárias adquiridas das diferentes fábricas. A caracterização foi realizada conforme descrito no anexo II e, os valores encontram-se representados na tabela 6.3:

Tabela 6.3: Valores percentuais da caracterização das diferentes lamas primárias.

Lamas primárias	Matéria Orgânica (%)	Matéria Inorgânica (%)	Hidratos de carbono (%)	Lenhina total (%)	Humidade (%)
Fábrica 1	61,5	38,5	58,8	2,6	77,8
Fábrica 2	72,2	27,8	69,1	3,1	57,8
Fábrica 3	83,3	16,7	81,2	2,1	80,3
Fábrica 4	67,6	32,4	49,3	18,3	78,7

Como se pode verificar, o teor de lenhina total é muito elevado quando comparadas com as lamas primárias das Fábricas 1, 2 e 3, como se encontra representada na tabela x, onde o teor de lenhina encontra-se entre 2-3%, sendo normal nas lamas primárias. Nestas lamas o que pode ter acontecido foi a Fábrica 4 ter misturado as lamas primárias com as lamas secundárias, elevando assim o teor de lenhina total. Realizou-se um ensaio SSF com estas lamas para verificar o comportamento quando o teor de lenhina total é tão elevado. Estes ensaios foram realizados à temperatura de 38°C, usando a levedura *S. cerevisiae* ATCC 26602. Como extrato enzimático utilizou-se a NS 22192, com uma carga enzimática de 35 FPU/g_{HC} e, sem adição de solução de glucose pura. A figura 6.5 representa a evolução da produção de etanol.

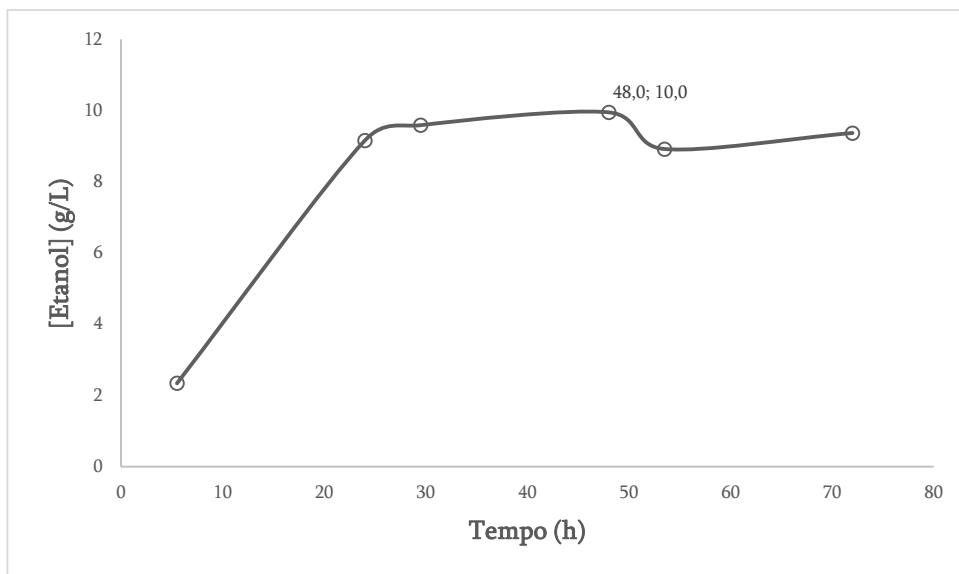


Figura 6.5: Representação da produção de etanol ao longo do tempo para o ensaio SSF com as lamas da fábrica 3, a 38°C.

Como se pode observar a concentração máxima foi de apenas 10 g/L ao fim das 48 h, o que significa que a utilização destas lamas não é nada favorável para este processo, uma vez que produz pouca quantidade de etanol. Após este ensaio, decidiu-se descartar a utilização destas lamas em ensaios SSF. Com o intuito de guardar estas lamas colocaram-se dentro de uma camara frigorífica para serem conservadas. Mas após um determinado tempo, reparou-se que as lamas começaram a ganhar bolor, como se encontra representada na figura 6.6.



Figura 6.6: Representação das lamas primárias da fábrica 4 após terem sido guardadas numa camara frigorífica.