

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA GEOGRÁFICA, GEOFÍSICA E ENERGIA



**Produção de Bioetanol a partir de Polpa de Alfarroba:  
destoxificação de polifenóis por fotocatalise**

Bruno Miguel Murta Reis

Mestrado em Engenharia da Energia e do Ambiente

2013

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA GEOGRÁFICA, GEOFÍSICA E ENERGIA



# **Produção de Bioetanol a partir de Polpa de Alfarroba: destoxificação de polifenóis por fotocatalise**

Bruno Miguel Murta Reis

**Dissertação de Mestrado em Engenharia da Energia e do Ambiente**

Trabalho realizado sob a supervisão de

Doutora Maria Helena Whytton da Terra Soares de Albergaria (LNEG)

Doutora Ana Cristina Ramos de Oliveira Justino (FCUL)

**2013**

## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar gostaria de agradecer à Unidade de Bioenergia do Laboratório Nacional de Energia e Geologia pela oportunidade de estágio nas suas instalações.

Gostaria de expressar os meus mais sinceros agradecimentos à Doutora Helena Albergaria pela oportunidade de participar neste trabalho, e por toda a disponibilidade, apoio e amizade manifestada durante a sua elaboração.

Gostaria de agradecer à Doutora Cristina Oliveira e à Doutora Paula Passarinho por todo o apoio e por toda a ajuda prestada no decorrer deste trabalho.

A todos os bolseiros, estagiários e técnicos de laboratório pelo bom ambiente de trabalho proporcionado, em particular ao João por ter sido uma ajuda essencial no início e durante o trabalho laboratorial.

Aos meus pais, ao meu irmão, a todos os meus avós e restante família e como não poderia deixar de ser a todos os meus amigos, um especial agradecimento pelo apoio, incentivo e carinho prestados ao longo da minha vida, tornando tudo isto possível.

## Abstract

The worldwide increasing demand for energy has been leading to the exhaustion of fossil fuels reserves. This situation is pushing the search for alternative renewable energies, such as biofuels that can be directly used in the transportation sector. Carob pulp, which is an endogenous biomass waste that contains high levels of readily fermentable sugars (40-50% w/dw) and also a lignocellulosic fraction (*ca* 20% w/dw) that can be further fermented after being hydrolyzed, arises as a very suitable feedstock for bioethanol production. However, in a recent work carried out at LNEG, results suggested that the low yields obtained in the enzymatic hydrolysis of the lignocellulosic fraction of carob pulp were due to its high polyphenolic content. Thus, the aim of the present work was to apply a photocatalytic method to carob pulp to degrade its polyphenols and to evaluate the impact of this treatment on the yield of the enzymatic hydrolysis process. Carob pulp was first characterized for its composition and then the material was processed into three products: whole carob pulp (WCP), carob syrup and extracted carob pulp (ECP). ECP and carob syrups were obtained by extraction of the WCP soluble sugars by direct contact with water, using a solids: liquid ratio of 1:3 and temperatures of 25 and 50 °C, respectively. Results showed that carob syrups extracted at 25°C and at 50°C contained 236.4 and 488.4 mg GAE/l, respectively, while the ECP at 25°C and 50°C contained 6.30 and 7.37 mg GAE/g (d.w. of ECP), respectively. Detoxification of carob syrups by photocatalysis showed that the soluble polyphenols were successfully removed, while in the ECP at 25°C the polyphenolic content increased from 6.30 to 20.64 mg GAE/g (d.w. of ECP). Nevertheless, both substrates (ECP and carob syrup) lost their intense orange-brown color, which is believed to correspond to colored polyphenols, after photocatalysis. Finally, enzymatic hydrolysis was applied to ECP treated and not-treated by photocatalysis and results showed a significant increase on the yield of the process (from 22% to 38%).

**Keywords:** carob pulp; bioethanol; polyphenols; photocatalysis; enzymatic hydrolysis.

## Resumo

O aumento das necessidades energéticas a nível mundial e o elevado consumo de combustíveis fósseis tem levado à procura de fontes de energia renováveis, surgindo assim os biocombustíveis (*e.g.* bioetanol) como uma possível alternativa aos combustíveis fósseis. Nesta perspetiva, a polpa de alfarroba surge como um resíduo endógeno adequado à produção de bioetanol por conter uma elevada concentração de açúcares solúveis (40-50% peso seco (p.s.)), além de uma fração lenhocelulósica (aproximadamente 20% p.s.) que poderá ainda ser fermentada após hidrólise. No entanto, trabalhos recentemente realizados no LNEG mostraram que os baixos rendimentos obtidos na hidrólise enzimática da polpa de alfarroba podiam resultar do alto conteúdo em polifenóis na polpa. Assim, a finalidade do presente trabalho foi aplicar um método de destoxificação, designado de fotocatalise, à polpa de alfarroba para remover os polifenóis e avaliar o impacto deste processo no posterior rendimento da hidrólise enzimática. A polpa de alfarroba foi primeiramente caracterizada e processada de modo a se obterem três subprodutos diferentes: polpa de alfarroba inteira (PAI), xarope de alfarroba e polpa de alfarroba extratada (PAE). A PAE e os respetivos xaropes foram obtidos após extração dos açúcares solúveis da PAI por contacto direto com água, usando uma razão sólido:líquido de 1:3 e duas temperaturas de extração, 25 e 50°C. Em seguida, aplicou-se o método fotocatalítico a cada um dos subprodutos mencionados. Os resultados mostraram que a fotocatalise removeu totalmente os polifenóis presentes nos xaropes (236,4 e 488,4 mg EAG/l). Contrariamente, na PAE a aplicação da fotocatalise levou a um aumento significativo dos polifenóis solúveis que foi de 6,30 mg EAG/g (p.s. PAE) para 20,64 mg EAG/g (p.s. PAE) na polpa extraída a 25°C. No entanto, quer na PAE quer nos xaropes de alfarroba a cor castanho-alaranjada característica dos polifenóis corados existentes na polpa de alfarroba desapareceu após aplicação da fotocatalise. Por fim, aplicou-se a hidrólise enzimática à PAE tratada e não tratada por fotocatalise, tendo os resultados mostrado um aumento no rendimento da hidrólise de 22% para 38%.

**Palavras-chave:** polpa de alfarroba; bioetanol; polifenóis; fotocatalise; hidrólise enzimática.

## Índice

Abstract .....	ii
Resumo.....	iii
Enquadramento e objetivos do trabalho .....	1
1. Introdução.....	4
1.1 Biocombustíveis: bioetanol .....	4
1.2 Panorama energético na União Europeia .....	5
1.3 Panorama energético em Portugal .....	6
1.4 <i>Competition food vs fuel</i> : matérias-primas sacarinas versus lenhocelulósicos.....	7
1.5 Processos de produção de bioetanol de 2ª geração: SSF e SHF .....	9
1.6 A polpa de alfarroba como matéria-prima para produção de bioetanol .....	11
1.6.1 Alfarroba: Recurso endógeno.....	11
1.6.2 Alfarroba: Composição e suas aplicações .....	12
1.7 Métodos de destoxificação para remoção dos polifenóis .....	15
1.7.1 Fotocatálise.....	15
2. Materiais e métodos.....	18
2.1 Microrganismos e meios de cultura.....	18
2.2 Processamento da matéria-prima.....	18
2.2.1 Polpa de alfarroba inteira (PAI) .....	19
2.2.2 Polpa de alfarroba extratada (PAE) e xarope de alfarroba .....	20
2.3 Caraterização da matéria-prima.....	20
2.3.1 Determinação da Humidade, Proteína e Açúcares solúveis .....	20
2.3.2 Hidrólise ácida quantitativa (HAQ).....	21
2.3.3 Polifenóis totais: extração e quantificação .....	22
2.4 Tratamento fotocatalítico para remoção dos polifenóis .....	22
2.4.1 Fotocatálise: Xarope de alfarroba.....	23
2.4.2 Fotocatálise: PAE e PAI.....	23

2.5	Hidrólise enzimática.....	24
2.6	Produção de bioetanol: SSF da PAI .....	25
3.	Resultados e discussão .....	26
3.1	Processamento e caracterização da polpa de alfarroba .....	26
3.1.1	Xarope de alfarroba .....	26
3.1.2	Polpa de alfarroba extratada (PAE).....	28
3.1.3	Polpa de alfarroba inteira (PAI) .....	30
3.2	Remoção dos polifenóis por fotocátalise.....	31
3.2.1	Xarope de alfarroba .....	32
3.2.2	Polpa de alfarroba extratada .....	34
3.2.3	Polpa de alfarroba inteira.....	38
3.3	Efeito da fotocátalise no rendimento da hidrólise enzimática aplicada à PAE .....	40
3.4	Efeito da fotocátalise no rendimento do processo de produção de bioetanol a partir da polpa de alfarroba.....	42
4.	Conclusões e perspectivas futuras.....	43
5.	Referências bibliográficas .....	45
	Anexo I – Retas de calibração utilizadas na determinação do conteúdo em polifenóis presentes na polpa de alfarroba pelo método de Singleton & Rossi.....	I
	Anexo II – Fórmulas usadas nos cálculos da lenhina, celulose e hemicelulose .....	IV

## Índice de figuras

Figura 1.1: Estimativa do consumo de biocombustíveis na UE no final de 2012. Fonte: EurObserv'ER, 2013. ....	6
Figura 1.2: Taxa de dependência energética em Portugal entre 2000 e 2010. Fonte: DGEG,2010... 6	6
Figura 1.3: Composição química do material lenhocelulósico. Fonte: Oliveira, 2012. ....	9
Figura 1.4: Fotografia de uma alfarrobeira. ....	12
Figura 1.5: Alfarroba e seus constituintes. ....	13
Figura 1.6: Estrutura química do ácido gálico (a) e de uma flavona (b). ....	15
Figura 1.7: Esquema de um coletor CPC. Fonte: Malato <i>et al.</i> , 2002.....	17
Figura 2.1: Representação esquemática das operações de processamento a que a polpa de alfarroba foi sujeita para se obterem as três frações usadas no trabalho: polpa de alfarroba inteira (PAI); polpa de alfarroba extratada (PAE) e xarope de alfarroba. ....	19
Figura 2.2: Aspecto interior do dispositivo usado para a realização da fotocatalise.....	23
Figura 3.1: Conteúdo em polifenóis insolúveis (PAE 25 e PAE 50), solúveis (xarope 25 e xarope 50) e totais (PAI).Os valores apresentados correspondem à média de duplicados e as barras de erro aos respectivos desvios padrão.....	31
Figura 3.2: Variação do conteúdo em polifenóis solúveis presentes nos xarope 25 e xarope 50 durante o processo fotocatalítico. Os valores apresentados no tempo -1 h correspondem às quantificações efetuadas nos xaropes antes da aplicação do processo fotocatalítico (Tabela 3.3) e os valores apresentados no tempo 0 correspondem aos determinados imediatamente após a adição do Fe II (tempo = -0,03 h) e após a 1ª adição de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (tempo = 0 h).....	32
Figura 3.3: Fotografia do xarope de alfarroba (xarope 50) antes aplicação do processo de fotocatalise (à esquerda) e o mesmo xarope após a aplicação do processo de fotocatalise (à direita). ....	33
Figura 3.4: Conteúdo em polifenóis da PAE ao longo do primeiro tratamento fotocatalítico efetuado à PAE 25. Os valores apresentados correspondem à média de duplicados e as barras de erro ao desvio padrão. Os valores apresentados no tempo -1 h correspondem às quantificações efetuadas à PAE 25 antes da aplicação do tratamento fotocatalítico (Tabela 3.6) e os valores apresentados no tempo 0 h correspondem aos determinados após a adição do Fe II e após a 1ª adição de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . ....	34
Figura 3.5: Conteúdo em polifenóis da PAE ao longo do segundo tratamento fotocatalítico efetuado à PAE 25. Os valores apresentados correspondem à média de duplicados e as barras de erro ao respetivo desvio padrão. Os valores apresentados no tempo -1 h correspondem às quantificações efetuadas à PAE 25 antes da aplicação do tratamento fotocatalítico (Tabela 3.6) e os valores apresentados no tempo 0 h correspondem aos determinados após a adição do Fe II e após a 1ª adição de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . ....	36



Figura 3.6: Conteúdo em polifenóis da PAE ao longo do terceiro tratamento fotocatalítico efetuado à PAE 25. Os valores apresentados correspondem à média de duplicados e as barras de erro ao respectivo desvio padrão. Os valores apresentados no tempo -1 h correspondem às quantificações efetuadas à PAE 25 antes da aplicação do tratamento fotocatalítico (Tabela 3.6) e os valores apresentados no tempo 0 h correspondem aos determinados após a adição do Fe II e após a 1ª adição de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	37
Figura 3.7: Fotografia das amostras da fração sólida da PAE 25 após os vários ensaios de fotocatalise efetuados: Fotocatálise 1 - à esquerda, Fotocatálise 2 - à direita e Fotocatálise 3 - ao centro. ....	38
Figura 3.8: Conteúdo em polifenóis da PAI ao longo do tratamento. Os valores apresentados correspondem à média de duplicados e as barras de erro ao desvio padrão. Os valores apresentados no tempo -1 h correspondem às quantificações efetuadas à PAI antes da aplicação do tratamento fotocatalítico (subseção 3.1.3) e os valores apresentados no tempo 0 h correspondem aos determinados após a adição do Fe II e após a 1ª adição de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	39
Figura 3.9: Aumento da concentração de glucose nos hidrolisados ao longo das 72 h de hidrólise enzimática efetuada à PAE 25, sem e com aplicação do pré-tratamento por fotocatalise. ....	40
Figura I.1: Reta de calibração do ácido gálico usada na determinação da concentração de polifenóis nos xaropes de alfarroba 25 e 50. ....	I
Figura I.2: Reta de calibração do ácido gálico usada na determinação da concentração de polifenóis ao longo da fotocatalise dos xaropes 25 e 50. ....	I
Figura I.3: Reta de calibração do ácido gálico usada na determinação da concentração de polifenóis na PAE 25 e 50, e no primeiro ensaio fotocatalítico da PAE 25.....	II
Figura I.4: Reta de calibração do ácido gálico usada na obtenção da concentração de polifenóis no 2º e 3º ensaio fotocatalítico da PAE 25 e no ensaio da PAI. ....	II
Figura I.5: Reta de calibração da albumina.....	III

## Índice de tabelas

Tabela 1.1: Produtividade em etanol para diferentes matérias-primas.....	8
Tabela 1.2: Produtividade e conteúdo em açúcares nas diferentes culturas.....	13
Tabela 3.1: Concentração dos açúcares solúveis nos xaropes de alfarroba. ....	27
Tabela 3.2: Conteúdo e concentração de proteína nos xaropes de alfarroba.....	27
Tabela 3.3: Concentração e conteúdo de polifenóis solúveis nos xaropes e na polpa de alfarroba. 28	
Tabela 3.4: Composição da fração lenhocelulósica da polpa de alfarroba extratada (PAE).....	29
Tabela 3.5: Conteúdo de proteína na PAE 25 e na PAE 50. ....	29
Tabela 3.6: Conteúdo em polifenóis na polpa de alfarroba extratada (PAE).....	30
Tabela 3.7: Rendimento da hidrólise enzimática (HE) efetuada à PAE 25 não-tratada e tratada por fotocatalise, em termos de % de glucano hidrolisado. ....	41

## Lista de abreviaturas

<b>AGRUPA</b>	Agrupamento de Alfarroba e Amêndoa
<b>AOP</b>	<i>Advanced Oxidation Processes</i>
<b>ATCC</b>	<i>American Type Culture Collection</i>
<b>CPC</b>	<i>Compound parabolic concentrator</i>
<b>DGEG</b>	Direção Geral de Energia e Geologia
<b>DRAPALG</b>	Direção Regional de Agricultura e Pescas do Algarve
<b>EAG</b>	Equivalentes de ácido gálico
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamina tetra-acético
<b>EUA</b>	Estados Unidos da América
<b>HPLC</b>	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
<b>LNEG</b>	Laboratório Nacional de Energia e Geologia
<b>PAE</b>	Polpa de alfarroba extratada
<b>PAI</b>	Polpa de alfarroba inteira
<b>SHF</b>	<i>Separated Hydrolysis and Fermentation</i>
<b>SSF</b>	<i>Simultaneous Saccharification and Fermentation</i>
<b>TdB</b>	Títulos de biocombustível
<b>UE</b>	União Europeia
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>YEPD</b>	<i>Yeast Extract Peptone Dextrose</i>

## Enquadramento e objetivos do trabalho:

Tendo em conta que as necessidades energéticas globais estão a aumentar e que estas são supridas maioritariamente pelo consumo de combustíveis fósseis (principalmente petróleo) cujas reservas se encontram cada vez mais perto do esgotamento, tornou-se obrigatória a procura de fontes de energia alternativas como é o caso das energias renováveis em geral (*e.g.* solar, eólica, hídrica, biomassa, biogás, *etc.*) e dos biocombustíveis em particular. Os biocombustíveis, nomeadamente o biodiesel e o bioetanol, ocupam um lugar especial pois são os únicos que atualmente podem ser diretamente utilizados nos meios de transporte. De forma a promover e incentivar o uso de biocombustíveis (especialmente os obtidos a partir de recursos endógenos) têm sido lançadas a nível europeu e nacional várias diretivas e decretos-lei, que entre muitas outras coisas lançam a obrigatoriedade de integração de 10% de biocombustíveis nos combustíveis fósseis até 2020.

Os biocombustíveis podem ser obtidos a partir de matérias-primas que são usadas para outros fins, como seja na alimentação (*e.g.* óleos vegetais, milho, *etc.*), sendo nesse caso designados de 1ª geração, ou então serem produzidos a partir de resíduos orgânicos, sendo então designados de 2ª geração. No caso do bioetanol, este é considerado de 1ª geração se for produzido a partir de matérias-primas ricas em açúcares diretamente fermentáveis (*e.g.* cana-de-açúcar, beterraba, milho, sorgo, *etc.*) e de 2ª geração se for produzido a partir da biomassa lenhocelulósica, resíduos vegetais e subprodutos agroalimentares ou industriais (*e.g.* dreche cervejeira, polpa de alfarroba, pasta de papel, *etc.*)

Para produzir bioetanol a partir de matérias-primas sacarinas apenas é necessário efetuar uma fermentação pois os microrganismos assimilaram diretamente estes açúcares solúveis (sacarose, glucose e frutose). No entanto, se a matéria-prima for lenhocelulósica, antes da fermentação é necessário efetuar uma hidrólise enzimática (ou química) de forma a converter os polissacáridos em monossacáridos. Assim, no processo de produção de bioetanol de 2ª geração existem dois passos principais, a sacarificação e a fermentação. Estes dois passos podem ser realizados sequencialmente e o processo designa-se *Separated Hydrolysis and Fermentation* (SHF), ou simultaneamente, e então o processo é designado *Simultaneous Saccharification and Fermentation* (SSF). Em ambos os processos (SHF e SSF) é usual ter de se aplicar um pré-tratamento (térmico ou químico) à biomassa lenhocelulósica antes da hidrólise enzimática por forma a aumentar a acessibilidade das enzimas à celulose e assim melhorar o rendimento da hidrólise.

A alfarrobeira (*Ceratonia siliqua*) é uma árvore típica dos países Mediterrâneos que produz um fruto cujo principal aproveitamento industrial é uma goma alimentar composta por galactomananos extraída das suas sementes. A polpa de alfarroba (fruto sem sementes) representa cerca de 90% do peso seco do fruto e é extremamente rica em açúcares solúveis: sacarose, glucose e frutose. Dado o valor calórico da polpa de alfarroba, esta tem sido tradicionalmente utilizada na alimentação, quer

humana quer animal. No entanto, o baixo teor em proteína (ca 5,4% peso/peso (p/p)) e a presença de elevadas concentrações de polifenóis altamente condensados (até 20% p/p) limita a sua utilização na alimentação. No entanto, elevado teor em açúcares (até 54% p/p) diretamente extratáveis em água da polpa de alfarroba, torna este material extremamente adequado para a produção de bioetanol. Para além disso, este material vegetal contém, para além dos açúcares solúveis, uma fração celulósica (14% p/p), cuja hidrólise poderá produzir uma quantidade adicional de açúcares fermentescíveis, aumentando assim o rendimento global do processo (1 etanol/ton polpa). Assim, a polpa de alfarroba é um resíduo agroalimentar que, para além de ser um recurso endógeno, é uma matéria-prima com elevado potencial para produção de bioetanol.

Trabalho anteriormente realizado no LNEG, no âmbito de um projeto QREN (AlfaEtílico), mostrou que a utilização integral dos açúcares da polpa de alfarroba (sacarose e celulose) através da integração de tecnologias de 1ª e 2ª geração para produção de bioetanol, permitiu aumentar o rendimento global do processo (1 etanol/ton polpa). No entanto, verificou-se que o passo limitante na otimização do processo é a hidrólise enzimática da polpa cujo rendimento máximo obtido foi de apenas 20%. Sabendo-se que os polifenóis estão presentes na polpa de alfarroba em elevadas concentrações e que estes podem inibir a hidrólise enzimática, colocou-se a hipótese da sua remoção poder melhorar a eficiência do processo enzimático. Apesar de existirem outros métodos para destoxificar os polifenóis da polpa de alfarroba, nomeadamente a utilização de carvão ativado, neste trabalho optou-se por usar o método da fotocatalise uma vez que este não só pode ser diretamente aplicado à polpa de alfarroba como ainda representa um método ambientalmente mais favorável uma vez que pode utilizar a energia solar como catalisador da reação de oxidação.

### **Objetivos do trabalho:**

O objetivo geral do presente trabalho foi a otimização do processo de produção de bioetanol a partir de polpa de alfarroba. Os objetivos específicos foram:

- 1º) Aplicar um método físico-químico **-a fotocatalise-** para degradar os polifenóis existentes na polpa de alfarroba e quantificar o seu efeito;
- 2º) Avaliar o impacto da fotocatalise no rendimento da hidrólise enzimática da polpa de alfarroba;
- 3º) Aplicar a fotocatalise à polpa de alfarroba e efetuar fermentações em SSF com a polpa tratada e não-tratada para comparar o rendimento global do processo de produção de etanol;

### **Abordagem experimental:**

Muito sucintamente, o trabalho experimental desta tese consistiu em:

1. Processar e caracterizar quimicamente a matéria-prima: polpa de alfarroba;
2. Aplicar a fotocatalise à polpa de alfarroba e comparar os rendimentos da hidrólise enzimática aplicada à polpa tratada e não tratada;
3. Efetuar fermentações em SSF com polpa de alfarroba tratada e não tratada e determinar o rendimento global do processo em l etanol/ton polpa.

## 1. Introdução

### 1.1 Biocombustíveis: bioetanol

Atualmente, as necessidades energéticas globais dependem maioritariamente dos combustíveis fósseis (cerca de 80% das necessidades energéticas mundiais). O elevado consumo destes combustíveis levará a um previsível esgotamento das fontes de energia fóssil e está a causar, globalmente, alterações climáticas principalmente devido à emissão de gases poluentes como CO<sub>x</sub>, NO<sub>x</sub>, SO<sub>x</sub>, C<sub>x</sub>H<sub>x</sub>, cinzas, entre outros compostos orgânicos, que são emitidos para a atmosfera como resultado da sua combustão (Das & Veziroglu, 2001).

Devido a estes fatores, nos últimos anos, a procura de fontes de energia sustentáveis e amigas do ambiente para as nossas indústrias e sociedade consumidora tornou-se umas das grandes prioridades à escala global. Consequentemente, existe um enorme interesse na produção e consumo de combustíveis provenientes de fontes renováveis, como plantas ou resíduos orgânicos (Mabee *et al.*, 2005).

Os biocombustíveis produzidos a partir de fontes renováveis poderão ajudar a minimizar a queima de combustíveis fósseis e consequentemente a produção de CO<sub>2</sub>. Estes biocombustíveis têm o potencial de reduzir a emissão de CO<sub>2</sub> pois as plantas a partir das quais eles são produzidos consomem CO<sub>2</sub> durante o seu crescimento. Assim, os biocombustíveis produzidos a partir de biomassa irão mitigar o aquecimento global pois a quantidade de CO<sub>2</sub> produzida durante a sua queima é semelhante à quantidade de CO<sub>2</sub> consumida durante a fotossíntese o que evitará o aumento do CO<sub>2</sub> acumulado na atmosfera (Naik *et al.*, 2010). No entanto, segundo alguns autores, esta quantificação em muitos casos não é feita de forma correta pois não é tido em conta no balanço de carbono o impacto relativo às alterações no uso dos solos. De facto, normalmente ignora-se que, para além dos gases de efeito de estufa libertados durante o processo de produção dos biocombustíveis, também se deve ter em conta a alteração no balanço de carbono resultante da conversão dos terrenos para produzir a respetiva matéria-prima. Esta contabilização é de importância vital se o terreno não tiver sido usado anteriormente ou se tiver sido sujeito a outros usos como a silvicultura ou a pastagem. Esta lacuna na quantificação dos balanços de carbono normalmente leva a uma sobrestimação do potencial de mitigação de carbono pelo uso de biocombustíveis, principalmente tendo em conta que hoje em dia a desflorestação ou a degradação florestal causam cerca de 20% das emissões totais de carbono (Lange, 2011).

Existem vários tipos de biocombustíveis como é o caso do bioetanol, do biodiesel ou do biogás. O bioetanol começou a ser produzido em larga escala em países como o Brasil e os Estados Unidos da América (EUA), com o investimento nesta área a ser feito a partir da crise do petróleo dos anos 70, e é expectável que seja um dos biocombustíveis dominantes no setor dos transportes durante os próximos 20 anos (Timilsina & Shrestha, 2011). No Brasil a produção é feita a partir dos açúcares

provenientes das vastas plantações de cana-de-açúcar existentes no país, enquanto que nos EUA a produção é feita a partir do amido proveniente das plantações de milho. O etanol ( $C_2H_6O$ ) pode ser misturado com combustíveis fósseis ou usado como álcool puro em motores dedicados. O etanol apresenta algumas vantagens face à gasolina quando usado num motor de combustão interna, uma vez que possui um número de octanas e calor de vaporização mais elevados (Hahn-Hägerdal *et al.*, 2006), o que permite uma taxa de compressão mais elevada e um período de queima menor (Balat *et al.*, 2008).

## 1.2 Panorama energético na União Europeia

Na União Europeia (UE), para além dos problemas ambientais, o petróleo também traz problemas a nível económico devido ao aumento do seu preço e à crescente taxa de dependência energética suscetível de impedir a recuperação da economia. Assim, se nada for feito, dentro de 20 a 30 anos cerca de 70% das necessidades energéticas da UE serão cobertas por produtos importados contra os atuais 50% o que poderá trazer grandes impactos a nível económico (Livro Verde, 2001).

De forma a evitar o crescente aumento da dependência energética da UE, foi lançada em 2003 a Diretiva 2003/30/CE “relativa à promoção e utilização de biocombustíveis ou outros combustíveis renováveis nos transportes” (UE, 2003). Mais tarde, em 2009, foi lançada a Diretiva 2009/28/CE “relativa à promoção da utilização de energia proveniente de fontes renováveis” e que revoga e altera a Diretiva 2003/30/CE. Esta diretiva definiu uma quota de 10% para a utilização de energia proveniente de fontes renováveis no sector dos transportes até 2020, os limites de incorporação obrigatória de biocombustíveis para os anos entre 2011 e 2020, e ainda que a produção de biocombustíveis só será contabilizada se estes forem produzidos de forma sustentável (UE, 2009).

O mercado europeu é marcado por uma elevada presença de automóveis a gasóleo, os quais podem usar biodiesel, o que leva a uma maior procura de biodiesel em detrimento do bioetanol. Assim, a nível europeu o consumo de biodiesel é de 79,1%, enquanto que o consumo de bioetanol corresponde apenas a 19,9% (Figura 1.1).



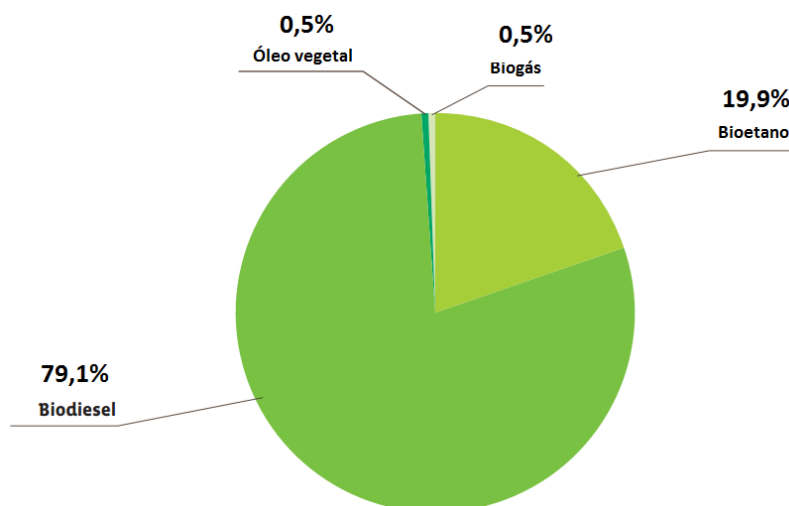


Figura 1.1: Estimativa do consumo de biocombustíveis na UE no final de 2012. Fonte: EurObserv'ER, 2013.

### 1.3 Panorama energético em Portugal

Portugal é um país com escassos recursos energéticos endógenos, principalmente aqueles que asseguram a generalidade das necessidades energéticas da maioria dos países desenvolvidos, como o petróleo, o carvão e o gás natural. Esta escassez de recursos fósseis conduz a uma elevada dependência energética do exterior (Figura 1.2), nomeadamente das importações de fontes energéticas primárias de origem fóssil. Assim, será importante aumentar a contribuição das energias renováveis para que esta dependência energética decresça (DGEG, 2010).

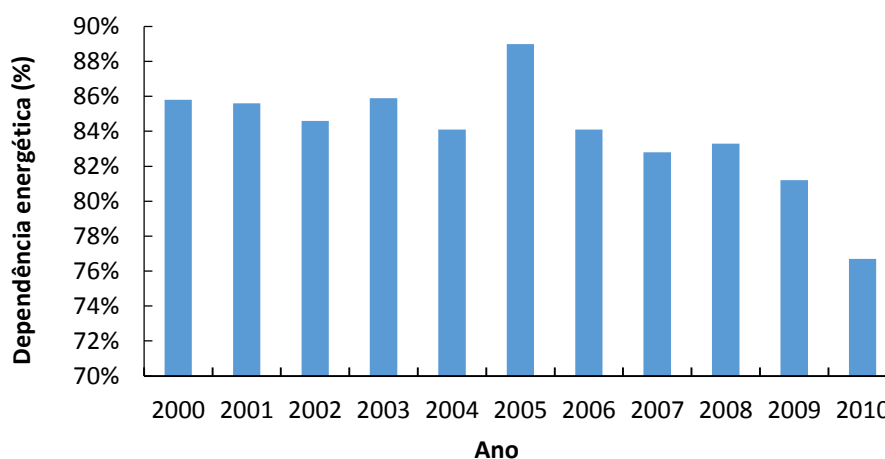


Figura 1.2: Taxa de dependência energética em Portugal entre 2000 e 2010. Fonte: DGEG, 2010.

Como estado membro da União Europeia, Portugal publicou em 2006 o Decreto-Lei nº62/2006 que transpôs a Diretiva 2003/30/CE para a ordem jurídica nacional. Com o surgimento da Diretiva

2009/28/CE foi elaborada a Estratégia Nacional para a Energia 2020 que prevê a definição dos critérios de sustentabilidade para os biocombustíveis e a promoção da utilização de recursos endógenos para a sua produção (Presidência do Conselho de Ministros, 2010), mais tarde refletida no Decreto-Lei nº117/2010. Este decreto-lei definiu os limites mínimos de incorporação obrigatória de biocombustíveis para os anos de 2011 a 2020 e criou, para a verificação das metas de incorporação, um sistema de emissão de Títulos de Biocombustíveis (TdB). Este sistema atribui uma valorização adicional aos biocombustíveis produzidos a partir de resíduos e detritos ou de matérias-primas de origem lenhocelulósica, bem como a partir de matéria orgânica endógena, em particular a não alimentar, de forma a privilegiar o valor acrescentado nacional.

Pelas razões anteriormente referidas, atualmente, em Portugal a produção de biocombustíveis restringe-se exclusivamente ao biodiesel. Efetivamente, o consumo de bioetanol corresponde apenas a 1 % do total dos biocombustíveis consumidos, sendo que a produção industrial ainda não foi implementada quer por falta de meios que permitam uma economia de escala quer porque os incentivos à sua produção não são tão aliciantes como no caso do biodiesel.

#### **1.4 *Competition food vs fuel: matérias-primas sacarinas versus lenhocelulósicos***

Os biocombustíveis podem ser produzidos a partir de óleos vegetais, cereais, beterraba, resíduos orgânicos e biomassa processada. Matérias-primas biológicas com uma quantidade considerável de açúcares diretamente fermentáveis (sacarose, glucose e frutose) ou que possuam materiais que possam ser convertidos nestes açúcares, como a celulose e o amido, podem ser fermentados para produzir bioetanol e serem usados nos motores a gasolina (Malça & Freire, 2006). As matérias-primas utilizadas na produção de bioetanol podem ser classificadas em três tipos diferentes: (i) matérias-primas ricas em sacarose (*e.g.* cana-de-açúcar, beterraba, sorgo, polpa de alfarroba), (ii) materiais ricos em amido (*e.g.* milho, trigo e cevada), (iii) biomassa lenhocelulósica (*e.g.* madeira, palha e ervas) (Balat *et al.*, 2008).

Quando os biocombustíveis são produzidos a partir de matérias-primas já usadas noutros fins, como seja na alimentação (*e.g.* óleos vegetais, milho, cana-de-açúcar, *etc.*), são designados de 1ª geração. Quando são produzidos a partir de resíduos orgânicos não alimentares são chamados de 2ª geração. No caso do bioetanol, este é considerado de 1ª geração se for produzido a partir de matérias-primas ricas em fontes de carbono facilmente fermentáveis (*e.g.* cana-de-açúcar, beterraba, milho, sorgo, *etc.*), ou de 2ª geração quando produzido a partir de biomassa lenhocelulósica ou de resíduos vegetais e subprodutos agroalimentares ou industriais (*e.g.* dreche cervejeira, polpa de alfarroba, pasta de papel, *etc.*).

Na Tabela 1.1 apresenta-se a produtividade potencial (i.e. teórica) de diferentes matérias-primas que podem ser utilizadas na produção de bioetanol.

Tabela 1.1: Produtividade em etanol para diferentes matérias-primas.

Matéria-prima	Produtividade em bioetanol (l/ton matéria-prima necessária)
Milho	409
Trigo	360
Polpa de alfarroba	320
Beterraba	200
Sorgo sacarino	140
Cana-de-açúcar	85

Fonte: Sánchez *et al.*, 2010.

A sobre-exploração das matérias-primas atualmente utilizadas na produção de biocombustíveis de 1ª geração (*e.g.* milho, trigo, cana-de-açúcar, entre outros) tem criado algum ceticismo no seio da comunidade científica devido aos possíveis impactos ambientais. Mas a maior controvérsia associada aos biocombustíveis de 1º geração centra-se na temática *food versus fuel*. Na verdade, o aumento da produção de biocombustíveis tem incentivado a procura de certas matérias-primas (*e.g.* cana-de-açúcar, milho, trigo, *etc.*) que são também utilizadas na alimentação, o que tem levado ao aumento do preço desses alimentos (Balat *et al.*, 2008). Além disso, como foi verificado por Hill *et al.* (2006) será impossível os biocombustíveis substituírem o petróleo sem que isso afete o abastecimento alimentar. Tomando como exemplo os EUA, se toda a produção de milho e de soja fosse dedicada à produção de biocombustíveis isso apenas iria corresponder a cerca de 12% das necessidades de gasolina e 6% das necessidades de gásóleo. Globalmente, se se dedicassem as seguintes culturas, trigo, arroz, milho, sorgo, cana-de-açúcar, mandioca e beterraba, que atualmente ocupam cerca de 42% das terras cultiváveis do planeta, à produção de bioetanol, isso apenas seria suficiente para suprir cerca de metade da gasolina consumida mundialmente (Srinivasan, 2009). Assim, existe atualmente uma grande pressão para encontrar matérias-primas alternativas que possam ser utilizadas na produção de biocombustíveis, mas que não criem problemas ambientais nem de abastecimento alimentar. Nesta perspetiva, matérias-primas provenientes de resíduos agroalimentares, industriais e florestais, têm o potencial para fornecer uma nova geração de biocombustíveis, os chamados biocombustíveis de segunda geração. Estes biocombustíveis de segunda geração, produzidos a partir de biomassa de plantas, correspondem na sua maioria a material lenhocelulósico, não-alimentar, barato e abundante. No entanto, a utilização de material lenhocelulósico para produção de bioetanol não é, atualmente, economicamente viável devido ao elevado número de barreiras técnicas que precisam de ser ultrapassadas (Naik *et al.*, 2010).

Sendo a biomassa das plantas um dos mais abundantes e inutilizados recursos biológicos no planeta, esta é vista como uma fonte promissora para produção de biocombustíveis. Apesar disso, a produção de biocombustíveis a partir de subprodutos agrícolas apenas pode satisfazer uma pequena parcela das crescentes necessidades em combustíveis líquidos (Gomez *et al.*, 2008).

Presentemente ainda não existem biorefinarias especializadas na produção comercial de biocombustíveis de segunda geração, embora já se encontrem a ser desenvolvidas instalações piloto e de demonstração. Para já, o que é garantido é que os biocombustíveis de segunda geração podem reduzir significativamente as emissões de CO<sub>2</sub>, não competem com as culturas alimentares e alguns tipos podem até melhorar a *performance* do motor. Mas, a partir do momento em que possam ser comercializados a preços competitivos têm o potencial de ser equiparáveis à gasolina e ao gasóleo, sendo ainda uma melhor escolha para o sector dos transportes rodoviários pois a sua “pegada de carbono” é menor (Naik *et al.*, 2010).

### 1.5 Processos de produção de bioetanol de 2ª geração: SSF e SHF

Como já foi referido, os materiais lenhocelulósicos são os mais abundantes complexos orgânicos de carbono existentes no planeta e são basicamente constituídos por três componentes: celulose, hemicelulose e lenhina (Santos *et al.*, 2010). A biomassa lenhocelulósica é composta por três frações diferentes (Figura 1.3) e apresenta tipicamente cerca de 40-60% de celulose, 20-40% de hemicelulose e 10-25% de lenhina (Hamelinck *et al.*, 2005). A celulose é um homopolímero de glucose de cadeia longa, cuja fórmula empírica é a seguinte: (C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>)<sub>n</sub>, em que n tem um valor mínimo de 200. Apresenta uma estrutura linear, onde se estabelecem múltiplas ligações entre os grupos –OH de cadeias justapostas de glucose. As cadeias de glucose formam uma camada impermeável à água, sendo portanto insolúveis na mesma. Por sua vez, a hemicelulose difere da celulose por ser amorfa, com estruturas ramificadas e compostas pela combinação de vários açúcares (xilose, arabinose, glucose, manose, galactose) e ácidos urónico. A hemicelulose é mais solúvel em água e mais fácil de ser degradada do que a celulose. A lenhina é um heteropolímero tridimensional, reticular, com uma base fenólica composta de três tipos de unidades de fenilpropano interligados por ligações do tipo C-C ou C-O-C (Oliveira, 2012). É extremamente resistente à hidrólise ácida e confere normalmente uma estrutura rígida aos materiais lenhocelulósicos.

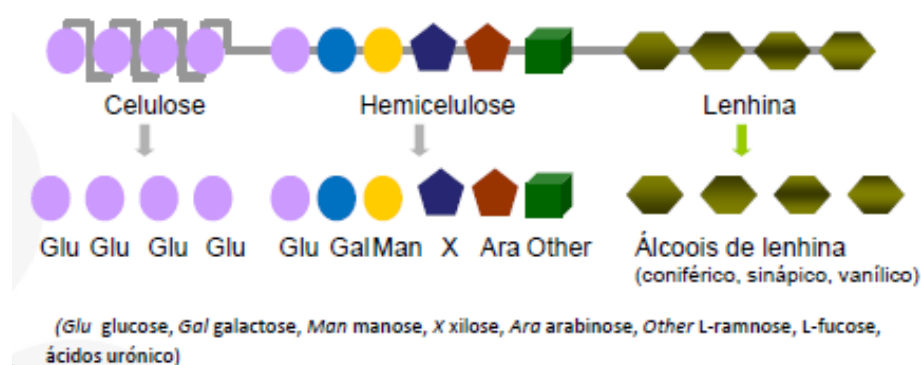


Figura 1.3: Composição química do material lenhocelulósico. Fonte: Oliveira, 2012.

Para produzir bioetanol a partir de matérias-primas sacarinas é apenas necessário efetuar uma fermentação, visto que a sacarose é um açúcar diretamente assimilável pelos microrganismos. No entanto, para utilizar materiais lenhocelulósicos, é necessário antes da fermentação efetuar uma hidrólise, que pode ser enzimática ou química, à fração lenhocelulósica de forma a converter os polissacáridos que a compõem em monossacáridos. Assim, no processo de produção de bioetanol de 2ª geração existem dois passos principais, a sacarificação e a fermentação. Estes dois passos podem ser realizados sequencialmente e o processo designa-se então por *Separated Hydrolysis and Fermentation* (SHF), ou simultaneamente, e então o processo é designado por *Simultaneous Saccharification and Fermentation* (SSF). Em ambos os processos (SHF e SSF), é usual ter de aplicar-se um pré-tratamento (térmico ou químico) à biomassa lenhocelulósica antes da hidrólise enzimática, de modo a aumentar a acessibilidade das enzimas à celulose e melhorar o rendimento da hidrólise.

A hidrólise ácida é efetuada com ácidos fortes, como seja ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) ou ácido clorídrico (HCl), concentrados. As hidrólises ácidas são em geral rápidas e eficazes na “desconstrução” da biomassa lenhocelulósica mas apresentam diversos inconvenientes: elevada toxicidade, são corrosivos e perigosos e necessitam de reatores resistentes à corrosão devido às condições extremas de uso (temperatura 100 – 120°C e pH 1 – 2) (Taherzadeh & Karimi, 2007), o que apresenta um elevado custo inicial e de manutenção ao longo do seu uso. Para além disto, para que este tratamento seja economicamente viável é necessário efetuar a recuperação do ácido utilizado após a hidrólise (Sun & Cheng, 2002), o que torna a hidrólise ácida um processo complexo e com elevados custos. Mas, a principal desvantagem da utilização da hidrólise ácida na sacarificação de materiais lenhocelulósicos consiste no facto de se produzirem durante o processo compostos como o ácido acético, furfural e hidroximetil-furfural, que são extremamente tóxicos para os microrganismos que em seguida irão fermentar os respetivos hidrolisados. Assim, após a hidrólise ácida é necessário destoxificar os hidrolisados lenhocelulósicos, o que é caro e moroso.

Ao contrário da hidrólise ácida, a principal característica da hidrólise enzimática é a especificidade das enzimas para o substrato, o que evita a formação de produtos secundários tóxicos. Por esta razão, a utilização de enzimas celulolíticas e xilanolíticas na hidrólise de materiais lenhocelulósicos é atualmente o processo mais usado na produção de bioetanol de 2ª geração. Além disso, na hidrólise enzimática os custos de operação são mais baixos em comparação com a hidrólise ácida devido às condições moderadas de operação (temperatura 30 – 50°C e pH 6 – 7) e à ausência de problemas de corrosão (Xiao *et al.*, 2004). No entanto, a hidrólise enzimática também apresenta algumas desvantagens e limitações, como sejam: o custo elevado das enzimas, mas que tem diminuído nos últimos anos, e a lentidão do processo de hidrólise quando a glucose se acumula no meio reacional devido à velocidade da reação ser limitada pelo produto. A velocidade da reação enzimática apresenta usualmente duas fases: uma fase inicial rápida com uma curva logarítmica, seguida duma fase lenta

com uma curva assintótica (Ramos *et al.*, 1993). Tipicamente, como acontece no caso do eucalipto, a hidrólise enzimática de materiais lenhocelulósicos ocorre de forma rápida na fase inicial do processo, onde é libertada aproximadamente metade da celulose existente em menos de 24 horas como acontece no caso do eucalipto, sendo que a restante costuma demorar mais dois dias a ser totalmente hidrolisada (Gregg & Saddler, 1996). Este fenómeno verifica-se devido à ação do produto final, pois este é o grande responsável pela inibição que impede a conversão contínua e rápida da celulose em glucose (Xiao *et al.*, 2004). Esta é a principal razão pela qual foi desenvolvido o processo SSF para fermentar hidrolisados lenhocelulósicos usando hidrólise enzimática. Como no processo SSF ocorre simultaneamente a libertação e consumo da glucose, a velocidade da hidrólise enzimática não é limitada pelo produto (glucose) pois toda a glucose libertada no meio é imediatamente consumida pelo microrganismo.

## **1.6 A polpa de alfarroba como matéria-prima para produção de bioetanol**

A polpa de alfarroba, que corresponde ao fruto da alfarrobeira ao qual foram retiradas as sementes, é um resíduo agrícola com baixo valor económico e para o qual é dado atualmente pouco uso. Estas características em conjunto com o seu elevado conteúdo em açúcares solúveis torna esta matéria-prima muito apetecível para ser usada na produção de bioetanol (Sánchez *et al.*, 2010).

### **1.6.1 Alfarroba: Recurso endógeno**

A alfarrobeira (*Ceratonia siliqua*) (Figura 1.4) é uma árvore perene que é cultivada nas regiões do mediterrâneo e que apresenta grande longevidade (Lima-Costa *et al.*, 2012). Pode crescer até aproximadamente 10 a 20 metros de altura, apresenta uma coroa semiesférica suportada por um tronco espesso de ramos fortes e pouco flexíveis e dá-se bem em solos pobres que não estão preparados para outros cultivos, não precisando de ser regada para níveis de precipitação na ordem dos 250 mm/ano, sendo assim uma excelente solução para solos pobres e calcários (Dasenekis & Zografakis, 2002). A alfarrobeira demora bastante tempo até entrar em período de produção, variando o tempo médio de espera até que ocorra a primeira produção entre 3 e 5 anos, enquanto que a produção madura só ocorre passados 5 a 7 anos (dados fornecidos pela AGRUPA).



Figura 1.4: Fotografia de uma alfarrobeira.

A fileira da alfarrobeira é particularmente importante nas regiões do mediterrâneo, assumindo maior relevo em países como Espanha, Portugal, Grécia, Itália, Marrocos, Tunísia e Turquia, onde se concentra 76% da produção anual mundial de alfarroba. Em Portugal, é produzida maioritariamente na região do Algarve, que apresenta condições edafo-climáticas extremamente favoráveis ao seu desenvolvimento (DRAPALG, 2007), isto é: um clima com elevado grau de aridez, caracterizado por um verão quente e seco e uma precipitação anual na ordem dos 400-500 mm (Correia & Martins-Loução, 2005).

De acordo com dados recentes, a produção mundial de alfarroba estima-se em cerca de 400 mil toneladas por ano, sendo que no Algarve a produção é de cerca de 50 mil toneladas por ano e o seu preço é de cerca de 200 € por tonelada, preço este que varia de ano para ano (Lima-Costa *et al.*, 2012). Nos últimos anos tem existido um aumento de plantações de alfarroba, sendo que entre 2000 e 2012 foram plantadas à volta de 2 milhões e 800 mil novas árvores, o que corresponde a um aumento anual de 1800 toneladas de alfarroba produzida. Nos próximos 5 anos está previsto que ocorra um aumento de produção de cerca de 80 mil toneladas por ano devido ao facto das novas plantações atingirem a idade adulta (dados fornecidos pela AGRUPA).

### **1.6.2 Alfarroba: Composição e suas aplicações**

O fruto da alfarrobeira (alfarroba) (Figura 1.5) é constituído pela polpa e pelas sementes, que representam respetivamente cerca de 90% e 10% do seu peso seco (Biner *et al.*, 2007). Atualmente, a maior parte do valor económico da alfarroba reside nas suas sementes, donde se extrai uma goma

alimentar constituída principalmente por galactomananos (Kumazawa *et al.*, 2002) e que é usada na indústria alimentar como aditivo natural (E410), mas também na indústria farmacêutica, cosmética, têxtil e da pasta de papel, devido às suas propriedades estabilizantes, emulsificantes e espessantes (Bernardo-Gil *et al.*, 2011).



Figura 1.5: Alfarroba e seus constituintes.

A composição química da polpa de alfarroba varia com o clima, a variedade cultivada e as técnicas de crescimento, mas apresenta sempre um elevado conteúdo em açúcares solúveis (40-50% p/p) e polifenóis (até 20% p/p), entre eles taninos e ácido gálico, e um baixo conteúdo em proteínas (3-4%) e lípidos (0,4-0,8%) (Dasenakis & Zografakis, 2002; Kumazawa *et al.*, 2002). Nos açúcares solúveis podemos encontrar maioritariamente sacarose (65-75% do total de açúcares), glucose e frutose (15-25% do total de açúcares) e um baixo conteúdo de outros açúcares como manose, galactose e maltose, entre outros (Petit & Pinilla, 1995). Esta elevada presença de açúcares na polpa poderá fazer com que a importância económica da alfarroba aumente e que esta seja usada como matéria-prima na produção vários produtos biológicos como seja, dextrina, frutose, ácido cítrico e etanol (Lima-Costa *et al.*, 2012). Comparando o conteúdo de açúcares e a produtividade da alfarroba com os apresentados por outras matérias-primas utilizadas para o mesmo fim, conclui-se que a alfarroba apresenta-se como uma boa alternativa para a produção de bioetanol (Tabela 1.2).

Tabela 1.2: Produtividade e conteúdo em açúcares nas diferentes culturas

Cultura	Conteúdo de açúcares (%)	Produtividade (ton/ha)
Beterraba	16	40-50
Cana-de-açúcar	13	50-100
Milho	60	4-8
Trigo	62	2-9
Sorgo sacarino	70	4-15
Alfarroba *	40-50	8-10

Fonte: Vourdoubas *et al.*, 2002. \* Kumazawa *et al.*, 2002.



A elevada presença de açúcares solúveis na polpa de alfarroba e a simplicidade do processo de extração (por contato direto com água) em conjunto com o baixo valor económico e a pouca utilização dada à polpa de alfarroba, tornam esta matéria-prima bastante apetecível para a realização de fermentações em condições de elevadas concentrações de açúcares como seja a fermentação alcoólica. Depois da extração dos açúcares solúveis, a polpa de alfarroba restante consiste numa fração lenhocelulósica que contém uma elevada presença de celulose (até 14% do peso seco (p.s.)). Esta celulose pode assim ser ainda aproveitada para produzir bioetanol de 2ª geração, após hidrólise e fermentação. Trabalhos realizados anteriormente no LNEG verificaram que a maneira de se obter maiores produtividades e rendimentos na conversão da polpa de alfarroba para etanol é através da realização da hidrólise enzimática e fermentação em conjunto (SSF) (dados não publicados).

A grande vantagem da alfarroba para produção de bioetanol em Portugal em comparação com outras matérias-primas, é o facto de esta ser um recurso endógeno, o que evita o seu transporte a grandes distâncias e significa que a sua utilização não terá grandes impactos a nível ambiental. A grande limitação neste momento é o baixo volume de produção, o impede a viabilização económica da produção de bioetanol, pois este é um processo de economia de escala (baixo preço/grande volume).

Para além da elevada presença de açúcares, a polpa de alfarroba contém também uma elevada concentração de polifenóis, sendo que estes ainda não foram bem caracterizados (Kumazawa *et al.*, 2002). Além disso, alguns dos trabalhos efetuados até ao momento (Papagiannopoulos *et al.* 2004; Owen *et al.*, 2003) apresentam diferenças significativas na composição dos compostos fenólicos encontrados na fibra de alfarroba (fração lenhocelulósica). Enquanto que no estudo de Papagiannopoulos *et al.* (2004) se concluiu que a fibra de alfarroba apresenta 41 compostos fenólicos diferentes numa concentração total de 4,14 mg/(g p.s. fibra alfarroba), no estudo realizado por Owen *et al.* (2003) foram identificados 24 compostos fenólicos numa concentração total de 3,94 mg/(g p.s. fibra de alfarroba). Mas, em ambos os estudos foi referida a presença de ácidos fenólicos (mais concretamente o ácido gálico), taninos hidrolisáveis (que são polímeros de açúcares e fenóis), flavonóides, e taninos condensados (que são polímeros de flavonóides) como sendo os polifenóis mais abundantes na fibra de alfarroba. O ácido gálico (ácido 3,4,5-trihidroxibenzóico) apresenta uma estrutura molecular mais simples do que os taninos condensados e os flavonóides, como pode ser visto na Figura 1.6.

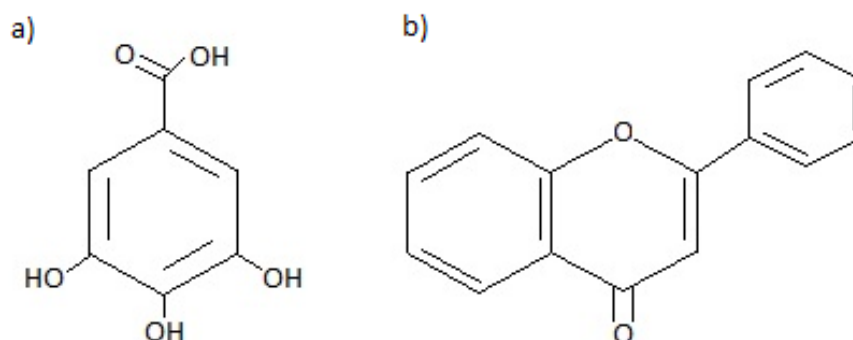


Figura 1.6: Estrutura química do ácido gálico (a) e de uma flavona (b).

## 1.7 Métodos de destoxificação para remoção dos polifenóis

Os polifenóis são compostos antimicrobianos que podem inibir o crescimento de diferentes microrganismos, mas que também podem ser inibidores da hidrólise enzimática (Griffiths, 1986). Existem vários métodos para destoxificar hidrolisados contendo polifenóis, como por exemplo: adsorção por carvão ativado, por sais de alumínio ou por resinas. Estes métodos já foram aplicados no xarope de alfarroba e mostraram resultados positivos na redução dos taninos (Petit & Pinilla, 1995) mas apresentam o problema de serem tratamentos relativamente caros.

Para além dos métodos acima mencionados, existem outros métodos para tratar poluentes orgânicos (*e.g.* águas ruças) provenientes da indústria, baseados em processos mecânicos, biológicos e físico-químicos, sendo que o processo biológico é o ideal. Mas nem todos os poluentes orgânicos são biodegradáveis. Por essa razão surgiram os denominados processos avançados de oxidação, ou na sua designação em inglês *Advanced Oxidation Processes* (AOPs), que podem usar diferentes sistemas reativos com uma característica em comum, a geração de radicais  $\cdot\text{OH}$  com poder fortemente oxidante que permitem a degradação completa (mineralização) do poluente (Malato *et al.*, 2002).

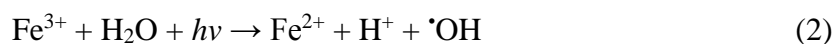
Existem vários AOPs que permitem degradar compostos orgânicos recalcitrantes (*e.g.* polifenóis), entre eles destacam-se a fotocatalise e a ozonização (Agustina *et al.*, 2005). Destes dois métodos a fotocatalise destaca-se por apresentar uma maior percentagem de degradação de compostos orgânicos do que a ozonização (Brillas *et al.*, 1998).

### 1.7.1 Fotocatálise

O tratamento fotocatalítico tem provado ser uma tecnologia promissora na degradação de vários compostos orgânicos, existindo atualmente vários trabalhos publicados sobre este método (Agustina *et al.*, 2005; Huston & Pignatello, 1999; Kabra *et al.*, 2004 e muitos outros). As maiores vantagens deste método são: (i) Ao contrário de outros tratamentos que transferem os poluentes de um meio

para outro, a fotocatalise forma produtos inofensivos; (ii) poder ser usado para destruir uma grande variedade de compostos perigosos; (iv) poder ser aplicado em meios gasosos e líquidos, como também, até certo ponto, em meios sólidos; (v) as condições de reação serem moderadas e requerer uma adição reduzida de agentes químicos; (vi) a geração de resíduos secundários ser mínima (Kabra *et al.*, 2004).

Existem dois sistemas fotocatalíticos que podem usar a energia solar: a fotocatalise heterogénea com dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>) e a fotocatalise homogénea através do processo de foto-Feton. O processo heterogéneo de destoxificação fotocatalítica consiste na utilização de radiação ultravioleta (UV) de comprimentos de onda inferiores a 380 nm para excitar um semicondutor (catalisador). Na presença de oxigénio são gerados radicais hidroxilo que atacam os contaminantes oxidáveis, gerando uma quebra progressiva das moléculas até CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O e ácidos inorgânicos. No caso do processo de foto-Feton, este é baseado na produção de radicais hidroxilo pelo reagente de Fenton (Malato *et al.*, 2002), que consiste numa solução aquosa de peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) com iões ferro (Fe<sup>2+</sup>) sendo uma importante fonte de radicais hidroxilo (equação 1) em condições ácidas (pH 2 – 4). Este reagente é um forte oxidante de compostos orgânicos mas quando em conjunto com a radiação UV a taxa de degradação aumenta significativamente levando à formação de mais radicais hidroxilo porque leva à redução do fotocatalisador oxidado (equação 2) e à fotólise do peróxido de hidrogénio (equação 3) (Huston & Pignatello, 1999).



O uso da luz do Sol em vez de luz artificial para aplicação na fotocatalise permite reduzir drasticamente os custos do processo, o que torna a aplicação industrial possível.

Para as aplicações solares industriais, os coletores do tipo CPC (*Compound parabolic concentrator*) são a melhor escolha, de entre os coletores atualmente existentes para aplicações solares fotoquímicas (Romero *et al.*, 1999), pois conseguem capturar tanta a radiação direta como a difusa. Os CPCs (Figura 1.6) são coletores estáticos com uma superfície refletora à volta de um tubo cilíndrico (reator) e fornecem a melhor ótica para sistemas de baixa concentração (Malato *et al.*, 2002).

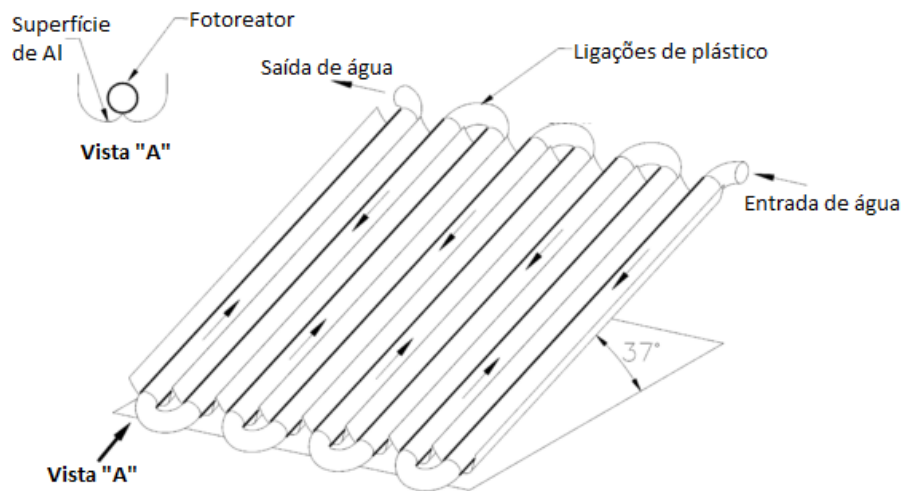


Figura 1.7: Esquema de um coletor CPC. Fonte: Malato *et al.*, 2002.

## 2. Materiais e métodos

### 2.1 Microrganismos e meios de cultura

Na realização deste trabalho experimental foi utilizada a levedura *Saccharomyces carlsbergensis*, estirpe ATCC 6265 (*American Type Culture Collection*) para produção de bioetanol. A levedura foi mantida em rampas de meio YEPD-agar (20 g/l de glucose, 10 g/l de peptona, 5 g/l de extrato de levedura, 3 g/l de extrato de malte e 20 g/l de agar), sendo armazenada a 4°C.

O inóculo foi preparado transferindo a biomassa crescida numa rampa de YEPD-agar (previamente incubada a 30°C durante 48 h) para um meio líquido de YEPD (sem agar) que foi incubado num agitador orbital (G25 Incubator Shaker, New Jersey, EUA) a 30°C e 150 rpm de agitação, durante 16 h. Passadas as 16 h, os inóculos foram centrifugados numa centrífuga (Sartorius AG, Göttingen, Alemanha) a 9000 rpm e 5°C, durante 10 min e a biomassa recuperada e ressuspensa no respetivo meio fermentativo.

### 2.2 Processamento da matéria-prima

A polpa de alfarroba (sem sementes) foi gentilmente fornecida pela AGRUPA (Agrupamento de Alfarroba e Amêndoa, Loulé, Portugal) sem sementes e na forma de *kibbles* (com um tamanho médio de 7 mm e 17 % (p/p) de humidade), tendo sido primeiramente triturada numa trituradora caseira (Maeva NGS-Home) e depois processada de acordo com o esquema apresentado na Figura 2.1, de modo a se obterem três frações diferentes: polpa de alfarroba inteira (PAI), polpa de alfarroba extratada (PAE) e xarope de alfarroba.

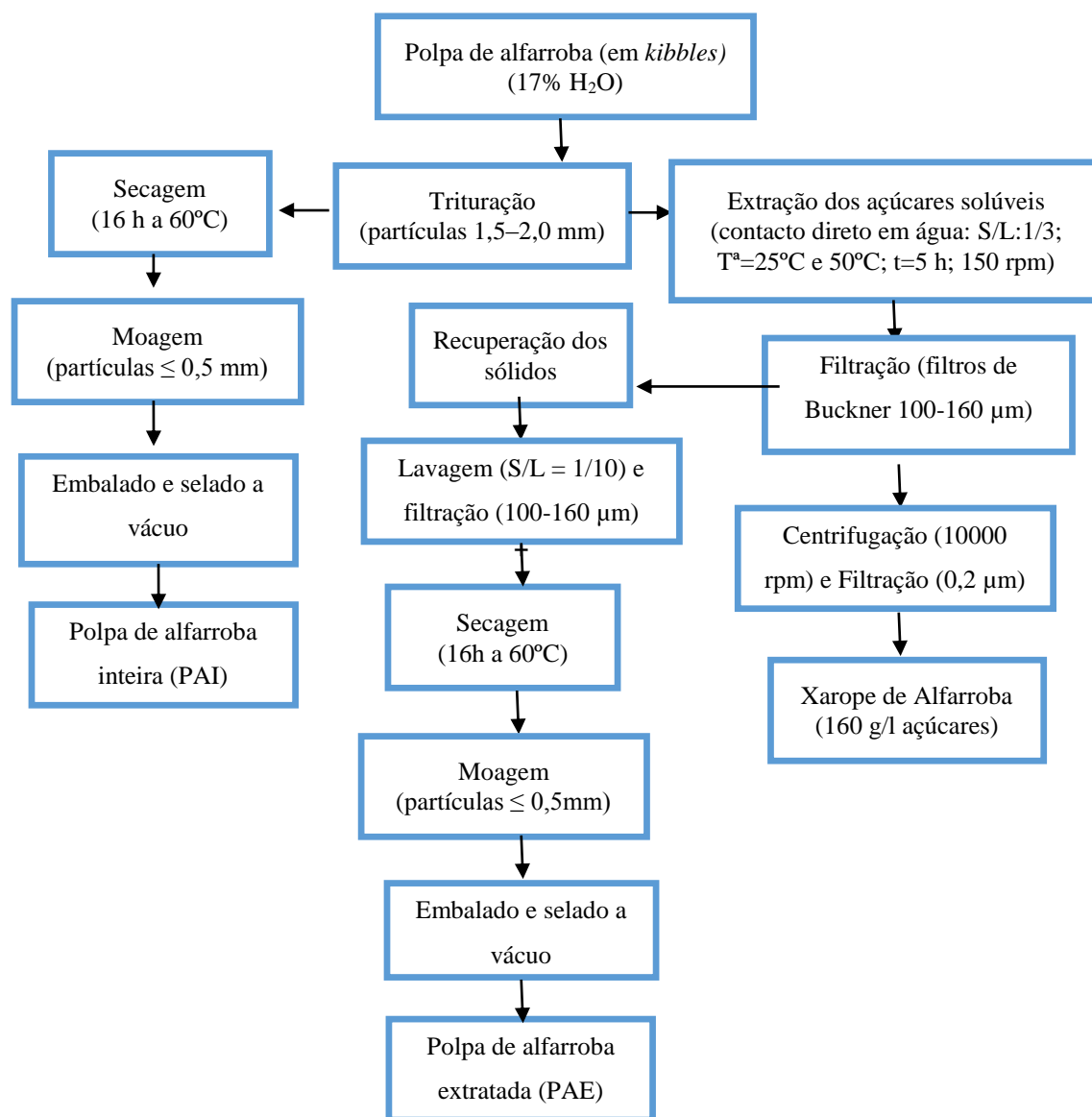


Figura 2.1: Representação esquemática das operações de processamento a que a polpa de alfarroba foi sujeita para se obterem as três frações usadas no trabalho: polpa de alfarroba inteira (PAI); polpa de alfarroba extratada (PAE) e xarope de alfarroba.

### 2.2.1 Polpa de alfarroba inteira (PAI)

Uma fração da polpa de alfarroba triturada foi imediatamente seca a 60°C numa estufa com circulação de ar (Memmert, Schwabach, Alemanha) durante 16 h até uma humidade final de aproximadamente 6% (p/p), sendo em seguida moída e peneirada num moinho de facas (Fritsch Industriert, Idar-Oberstein, Alemanha), ficando com partículas de uma dimensão menor ou igual a 0,5 mm. A PAI seca foi então embalada a vácuo de forma a reduzir os riscos de contaminação.

## **2.2.2 Polpa de alfarroba extratada (PAE) e xarope de alfarroba**

A polpa de alfarroba triturada foi também utilizada para extrair os açúcares solúveis por contacto direto com água, numa razão sólido/líquido (S/L) de 1:3. A polpa de alfarroba moída manteve-se em contacto com água durante 5 h, a 150 rpm, numa incubadora orbital (Infors Unitron HT, Suíça). Utilizaram-se duas temperaturas diferentes de extração dos açúcares: 25°C e 50°C. Este procedimento teve por objetivo a posterior avaliação do efeito da temperatura de extração no conteúdo em polifenóis solúveis nos xaropes e insolúveis na PAE. Obtiveram-se, assim, duas PAE diferentes que se designaram por PAE 25 e PAE 50 de acordo com as temperaturas de extração utilizadas.

A fração líquida (xarope de alfarroba) foi recuperada por filtração num filtro de placa porosa de 100-160 µm (Duran Group, Alemanha) e centrifugada numa centrífuga Beckman (Coulter Inc., Brea, EUA) a 10000 rpm e 10°C, durante 20 min para remoção das partículas sólidas em suspensão no líquido. O xarope foi em seguida esterilizado por filtração, usando membranas de 0,2 µm de poro (Millipore, Massachusetts, EUA) e guardado no frio (10°C) ao abrigo da luz até utilização.

Os sólidos extratados (PAE) foram lavados com água numa razão S:L de 1:10 e agitados num agitador orbital (New Brunswick Scientific, Edison, New Jersey, EUA) a 150 rpm durante 2 h à temperatura ambiente. Após lavagem, os sólidos (PAE) foram recuperados por filtração através de um filtro de placa porosa de 100-160 µm (Duran Group, Alemanha) e procedeu-se à sua secagem a 60°C numa estufa com circulação forçada de ar (Memmert, Schwabach, Alemanha) durante 16 h. No fim da secagem a PAE 25 apresentava aproximadamente 10% (p/p) de humidade e a PAE 50 aproximadamente 8% (p/p) de humidade. Tanto a PAE 25 como a PAE 50 foram em seguida moídas e peneiradas tal como para a PAI (subsecção 2.2.1) e depois embaladas a vácuo e armazenadas no frio (10°C).

## **2.3 Caraterização da matéria-prima**

### **2.3.1 Determinação da Humidade, Proteína e Açúcares solúveis**

A humidade da polpa de alfarroba foi determinada gravimetricamente, usando triplicados de cada amostra (PAI e PAE), correspondendo a humidade à diferença de peso entre a amostra de polpa de alfarroba não seca (aproximadamente 0,6 g de polpa) e a mesma amostra após secagem em estufa a 105°C durante 16 h (Memmert, Schwabach, Alemanha).

O conteúdo em proteína foi estimado através do método de Kjeldahl (Kjeldahl, 1883) e aplicado a amostras de PAE (0,5 g) e xarope de alfarroba (9 ml). Estas amostras foram colocadas em tubos de digestão e a proteína digerida com uma mistura catalisadora (93% sulfato de potássio, 3% de sulfato de cobre, 3% de óxido de titânio e 1% de ácido esteárico) e ácido sulfúrico (1,84 g/l), numa unidade de digestão (Tecator, Alemanha). Após digestão da proteína, deixou-se arrefecer o conteúdo dos

tubos à temperatura ambiente e adicionou-se água destilada, ácido bórico a 4% (m/v) e um indicador de pH (2 g de vermelho de metilo, 1 g de azul de metileno em 100 ml de álcool etílico a 95% (v/v)). Em seguida, colocaram-se os tubos numa unidade de destilação (Tecator, Alemanha) tendo-se adicionado hidróxido de sódio a 50% (p/v) à mistura reacional. Doseou-se então o amoníaco destilado, por titulação com ácido clorídrico 0,1 N. O valor usado na conversão de nitrogénio em proteína foi 6,25. As determinações foram efetuadas em duplicado para cada uma das amostras.

Os açúcares solúveis presentes no xarope de alfarroba foram determinados por cromatografia líquida de alta pressão (*High Performance Liquid Chromatography* -HPLC) utilizando um sistema HPLC (L-7200, Merck-Hitachi, EUA) equipado com um forno (L-7350, Merck, EUA) e um detetor de índice de refração (L-7490, Merck, EUA). As amostras foram eluídas numa coluna Sugar-Pack (Waters Hitachi, Milford, EUA) operada a 90°C, usando como eluente uma solução aquosa de CaEDTA 50 mM a um caudal de 0,5 ml/min. As amostras foram analisadas em duplicado para cada amostra.

### 2.3.2 Hidrólise ácida quantitativa (HAQ)

A composição lenhocelulósica (lenhina, hemicelulose e celulose) da polpa de alfarroba foi determinada quer na PAE 25 quer na PAE 50 pelo método da hidrólise ácida quantitativa (HAQ), descrito por Browning (1967). Sucintamente, o método consistiu numa hidrólise ácida completa do material lenhocelulósico através da adição de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) em duas etapas: num primeiro passo, adicionou-se ácido sulfúrico a 72% (p/p) à amostra a analisar (aproximadamente 0,6 g de polpa de alfarroba) e colocou-se a mistura reacional num banho-maria a 30°C durante 1 h; num segundo passo, adicionou-se água à mistura reacional até o ácido ficar numa concentração final de 4% (p/p) e colocou-se a amostra em autoclave (Uniclave 88, AJC, Portugal) a 121°C durante 1 h. No final, as amostras hidrolisadas foram filtradas por filtros de placa porosa (40-100 µm) e a fração líquida recolhida para ser analisada por HPLC para determinação dos açúcares livres (monossacáridos) presentes no hidrolisado. A fração líquida antes de ser analisada por HPLC foi centrifugada numa centrífuga de bancada (Hettich, Alemanha) a 5000 rpm e 4°C, durante 10 minutos, para remoção de partículas em suspensão. A concentração de açúcares (glucose, xilose e arabinose) presente nos hidrolisados foi depois utilizada para determinar o conteúdo em celulose (glucose) e hemicelulose (xilose e arabinose) da polpa de alfarroba (fórmulas no Anexo II). A fração sólida dos hidrolisados foi também recuperada e usada para determinar o conteúdo em lenhina insolúvel em ácido (lenhina de Klason) através de pesagem da fração sólida dos hidrolisados após secagem em estufa (105°C durante 16 h) (Mommert, Schwabach, Alemanha). Por fim, determinaram-se as cinzas por incineração da fração sólida seca do hidrolisado numa mufla (47900, Sybron-Thermolyne, EUA) a 550°C durante 5 h.



A concentração de açúcares (glucose, xilose e arabinose) presentes nos hidrolisados de PAE após HAQ foi determinada por HPLC, usando o sistema de HPLC referido anteriormente (subsecção 2.3.1) e uma coluna cromatográfica Aminex HPX-87H (Bio-Rad, EUA), operada a 50°C e como eluente uma solução aquosa de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mM a um caudal de 0,4 ml/min. As amostras foram analisadas em duplicado para cada amostra.

### **2.3.3 Polifenóis totais: extração e quantificação**

Os polifenóis foram extraídos da PAE e da PAI utilizando acetona a 70% (v/v). A acetona foi adicionada a 1 g de polpa de alfarroba numa razão S:L de 1:20 e a mistura colocada num agitador orbital (New Brunswick Scientific, Edison, New Jersey, EUA) a 300 rpm, durante 10 min, à temperatura ambiente. Após esse tempo, levou-se a mistura a centrifugar numa centrífuga de bancada (Sartorius AG, Göttingen, Alemanha) a 9000 rpm, durante 10 min, a 4°C, sendo o sobrenadante recolhido e armazenado. Este processo de extração foi repetido quatro vezes sucessivas na mesma amostra, sendo que na quarta e última extração o tempo de agitação foi de 16 h. Em seguida juntaram-se os sobrenadantes recolhidos em cada uma das quatro extrações e procedeu-se novamente a uma centrifugação. Por fim, este sobrenadante foi levado à secura num rotavapor (Buchi, Rotavapor® R-210, Suíça) com um banho-maria (Buchi, Heating Bath B-491, Suíça) a 50°C. O sólido final foi depois ressuspensionado em metanol e o conteúdo em polifenóis totais quantificado pelo método de Singleton & Rossi (1965).

Os polifenóis totais extraídos da PAE e PAI e os polifenóis solúveis presentes no xarope de alfarroba foram determinados pelo método de Singleton & Rossi. Este método consistiu na adição do reagente de Folin-Ciocalteu (Panreac, UE) diluído 1:10 em água e de carbonato de sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) a 7,5% (p/v) à amostra em estudo. Após 1,5 h procedeu-se à leitura da absorvância a 765 nm num espectrofotómetro de microplacas (ThermoScientific™, Vantaa, Finlândia). A concentração de polifenóis foi expressa em equivalentes de ácido gálico (EAG) (mg EAG/g de polpa de alfarroba). As amostras foram analisadas em duplicado para cada amostra.

## **2.4 Tratamento fotocatalítico para remoção dos polifenóis**

O método fotocatalítico foi aplicado tanto ao xarope de alfarroba como à PAE 25, e PAE 50 e PAI. O equipamento de fotocatalise (Figura 2.2), que foi construído e concebido no LNEG, consiste numa caixa de madeira com o interior formado por duas secções de um espelho côncavo, sendo que num dos focos se encontra, disposta verticalmente, uma fonte luminosa (4 lâmpadas Eversun L40/79K da Osram com uma potência unitária de 40 W e uma irradiância global de 53 W.m<sup>-2</sup> em UV) com 59

cm de comprimento e 3,8 cm de diâmetro e no outro foco o reator contendo o substrato a estudar. Este sistema laboratorial mimetiza uma montagem com um coletor do tipo CPC sob iluminação solar.



Figura 2.2: Aspecto interior do dispositivo usado para a realização da fotocatalise.

#### 2.4.1 Fotocatálise: Xarope de alfarroba

O tratamento fotocatalítico do xarope de alfarroba foi realizado colocando 300 ml de xarope num frasco *Schott* (Duran, EUA), tendo-se procedido previamente ao acerto do pH do xarope a 2,9 com ácido sulfúrico a 98% (p/p). Adicionou-se então 30 mg de sulfato de ferro ( $\text{FeSO}_4$ ) ao xarope, ficando este numa concentração de 20 mg/l de ferro II, e agitou-se durante 2 min à temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se 5 ml de peróxido de hidrogénio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (21,4 g/l, para uma concentração final no reator de 100 mM) e agitou-se à temperatura ambiente durante 2 min. Colocou-se o frasco no dispositivo (Figura 2.2), ligou-se a luz e deixou-se a agitar continuamente durante 6 h. Realizaram-se adições de 5 ml de  $\text{H}_2\text{O}_2$  de 1 em 1 h, perfazendo no final um volume de  $\text{H}_2\text{O}_2$  adicionada de 30 ml (100 ml por l de xarope). Retiraram-se amostras antes e depois da primeira adição de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e em seguida, de hora a hora, imediatamente antes de cada nova adição de  $\text{H}_2\text{O}_2$  até ao final do processo fotocatalítico.

#### 2.4.2 Fotocatálise: PAE e PAI

O tratamento fotocatalítico da PAE e da PAI foi efetuado sobre uma suspensão aquosa de PAE ou de PAI a 100 g (p.s.)/l num frasco *Schott* (Duran, EUA), tendo-se acertado inicialmente o pH a 2,9 com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a 98% (v/v). Adicionou-se depois 30 mg  $\text{FeSO}_4$  (1 mg/g p.s. de polpa) e deixou-se a agitar à temperatura ambiente durante 2 min. Em seguida, adicionou-se 33 ml de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (21,4 g/l) e procedeu-se da mesma forma que o descrito para o xarope de alfarroba (subsecção 2.4.1). Colocou-se então o frasco *Schott* no dispositivo de fotocatalise (Figura 2.2) e aplicou-se o processo durante

12 h, sob agitação contínua e irradiação. A adição do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> também foi faseada, tal como no xarope, mas neste caso foi feita a adição de 2 em 2 h e o volume final de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> adicionado foi de 200 ml (4 ml/g p.s. de polpa). As amostragens foram realizadas antes e depois da primeira adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e de 2 em 2 h até ao final da fotocatalise imediatamente antes de cada adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Colocou-se depois o frasco *Schott* no dispositivo da fotocatalise (Figura 2.2), com agitação contínua, durante 12 h. As amostragens foram realizadas antes e depois da primeira adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e depois disso de 2 em 2 h até ao final do processo de fotocatalise, tendo-se retirado amostras sempre imediatamente antes de cada adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

No processo fotocatalítico aplicado à PAE e PAI para posterior realização da hidrólise enzimática, preparou-se inicialmente uma suspensão de 200 g/l de PAE (ou PAI) em citrato de sódio 0,1 M num frasco *Schott* (Duran, EUA) e aplicou-se o mesmo procedimento que o descrito no parágrafo anterior, com a exceção de que neste caso não se retiraram amostras

## 2.5 Hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática foi aplicada à PAE com e sem pré-tratamento por fotocatalise, utilizando uma mistura enzimática comercial (celulolítica e xilanolítica) (Novozymes, Dinamarca) composta por: Celluclast® 1,5 l numa dosagem de 1,2 ml/(g de glucano), e Novozym® 188, numa dosagem de 0,5 ml/(g de glucano). A PAE foi suspensa numa solução tampão de citrato de sódio (Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>) 0,1 M (pH 5,5) numa concentração final de 100 g/l de sólidos, tendo-se adicionado depois a mistura enzimática na concentração acima referida e uma solução de azida de sódio (NaN<sub>3</sub>) a 2% (p/v). A hidrólise decorreu numa incubadora orbital (Infors Unitron HT, Suíça) a 30°C e 150 rpm, tendo-se retirado amostras de 2 em 2 h durante as 8 h iniciais e as restantes amostras a intervalos de tempo variáveis.

No caso da hidrólise enzimática efetuada à PAE após fotocatalise, procedeu-se primeiro ao acerto do pH para 5,5 usando hidróxido de sódio (NaOH) 10 N. A PAE tratada foi então diluída em igual volume de tampão citrato de sódio 1 M (pH 5,5) numa concentração final de sólidos de 100 g/l, tendo-se adicionado em seguida a mistura enzimática na concentração referida anteriormente e uma solução de azida de sódio a 2% (p/v) (2 ml/5 g p.s. PAE).

Após tratamento das amostras como descrito na subsecção 2.3.2, os açúcares libertados (glucose, xilose e arabinose) durante a hidrólise enzimática foram quantificados por HPLC usando uma coluna Aminex HPX-87P (Bio-Rad, EUA), operada à temperatura de 85°C, usando como eluente água Milli-Q a um caudal de 0,6 ml/min. As amostras foram analisadas em duplicado para cada amostra.

## 2.6 Produção de bioetanol: SSF da PAI

A produção de bioetanol foi realizada aplicando um processo SSF à PAI após pré-tratamento por fotocatalise. Após a realização da fotocatalise (descrita na subsecção 2.4.2) deixou-se a PAI a agitar a 400 rpm num agitador orbital (New Brunswick Scientific, Edison, New Jersey, EUA) à temperatura de 4°C durante 16 h, para libertar o peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Em seguida, acertou-se o pH da suspensão a 5,5, usando uma solução aquosa de NaOH 10 N, e adicionou-se uma solução de tampão de citrato de sódio 1 M (pH 5,5) até se atingir uma concentração de sólidos (PAI) de 100 g/l. O processo SSF foi iniciado com a adição simultânea do inóculo da levedura *Saccharomyces carlsbergensis* a 20% (v/v) e da mistura enzimática, nas mesmas condições que as indicadas na subsecção 2.5. O SSF foi realizado em frascos agitados com um volume total de meio de cultura de 100 ml, numa incubadora orbital (Infors Unitron HT, Suíça) a 30°C, com uma agitação de 150 rpm, durante 72 h. Retiraram-se amostras de 2 em 2 h durante as primeiras 8 h, e em seguida a tempos variáveis.

### 3. Resultados e discussão

#### 3.1 Processamento e caracterização da polpa de alfarroba

A polpa de alfarroba, maioritariamente das variedades Mulata e Galhosa (as mais representativas em Portugal), foi processada de forma a se obterem três subprodutos diferentes: polpa de alfarroba inteira (PAI), polpa de alfarroba extratada (PAE) e xarope de alfarroba (Figura 2.1). Para tal, começou por se triturar grosseiramente (partículas com 1,5-2,0 mm de diâmetro) a polpa de alfarroba fornecida pela AGRUPA, tendo-se em seguida separado essa polpa triturada em 2 lotes. Um dos lotes foi seco e armazenado no frio (4°C), após embalagem a vácuo, para ser usado posteriormente como PAI. O outro lote foi usado para extrair os açúcares solúveis, por contato direto com água numa razão sólido:líquido de 1:3. Após separação da fração sólida e líquida, obtiveram-se, respetivamente, os xaropes de alfarroba e a PAE que foi em seguida lavada, seca e armazenada a vácuo. Usaram-se duas temperaturas (25°C e 50°C) de extração dos açúcares tendo-se assim obtido dois xaropes, designados de xarope 25 e xarope 50. Este procedimento foi efetuado pois trabalhos anteriores mostraram que quanto maior a temperatura de extração dos açúcares solúveis, maior a extração de polifenóis solúveis (Bernardo-Gil *et al.*, 2011). Assim, o objetivo deste procedimento foi avaliar o efeito da fotocatalise sobre diferentes concentrações de polifenóis nos xaropes de alfarroba (polifenóis solúveis), pois este nunca tinha sido antes aplicado nesta matéria-prima.

Os xaropes de alfarroba extraídos a 25°C (xarope 25) e 50°C (xarope 50) foram caracterizados relativamente à concentração de açúcares solúveis, proteína e polifenóis solúveis. A PAE extratada a 25°C (PAE 25) e a PAE extratada a 50°C (PAE 50) foram caracterizadas quanto à sua composição lenhocelulósica (celulose, hemicelulose e lenhina), proteína, humidade, cinzas e polifenóis. Determinou-se ainda na PAI a humidade e a concentração total de polifenóis (solúveis e insolúveis).

##### 3.1.1 Xarope de alfarroba

Embora a temperatura de extração do xarope 25 e do xarope 50 tenha sido diferente verificou-se que a concentração de açúcares solúveis num e no outro xarope foi semelhante (Tabela 3.1). Assim, os nossos resultados provaram que a utilização de uma temperatura de 25°C é suficiente para extrair a totalidade dos açúcares solúveis da polpa de alfarroba.

Tabela 3.1: Concentração dos açúcares solúveis nos xaropes de alfarroba.

	Concentração açúcares solúveis (g/l)			
	Sacarose	Glucose	Frutose	Total de açúcares
Xarope 50	95,1	19,9	19,0	134,0
Xarope 25	101,0	17,4	15,9	134,3

No xarope 50 a concentração total de açúcares solúveis foi de 134,0 g/l e no xarope 25 foi de 134,3 g/l (Tabela 3.1). Quanto à proporção de sacarose, glucose e frutose no xarope 50, esta foi de 71% para a sacarose, 15% para a glucose e 14% para a frutose, enquanto que no xarope 25 foi de 75% para a sacarose, 13% para a glucose e 12% para a frutose. Segundo os resultados deste trabalho os açúcares solúveis na polpa de alfarroba representam 40% em peso do total da polpa de alfarroba (em peso seco), o que está dentro dos valores referidos na literatura, 40-50% (p/p) dos açúcares solúveis na polpa de alfarroba. (Petit & Pinilla, 1995; Sánchez *et al.*, 2010).

A PAE 25 e a PAE 50 obtidas após separação do líquido (xarope) por filtração ainda continham uma concentração elevada de açúcares solúveis, pelo que foram extensivamente lavadas com água (10 l de água/1 kg polpa) para remover a totalidade dos açúcares solúveis.

Quanto à proteína presente nos xaropes, verificou-se que o xarope 25 apresentava uma concentração ligeiramente superior à do xarope 50 (Tabela 3.2).

Tabela 3.2: Conteúdo e concentração de proteína nos xaropes de alfarroba.

	Xarope 50	Xarope 25
Conteúdo de proteína (g/100 g p.s. xarope)	0,246 ( $\pm$ 0,001)	0,277 ( $\pm$ 0,004)
Concentração de proteína (g/l)	2,52 ( $\pm$ 0,01)	2,83 ( $\pm$ 0,04)

Valores médios calculados para amostras em duplicado e respetivo desvio padrão entre parênteses.

Para determinar a concentração de polifenóis presentes no xarope 50 e 25 utilizou-se o método de Singleton & Rossi (subsecção 2.3.3), usando como padrão ácido gálico. No presente trabalho usou-se a reta de calibração do ácido gálico (concentrações entre 5 e 100 mg/l) apresentada no Anexo I-a. No entanto, ao utilizar este método para determinação dos polifenóis nos xaropes de alfarroba, verificou-se que a proteína aí existente interferia na quantificação dos polifenóis. Deste modo, e com o objetivo de remover esta interferência, aplicou-se o método de Singleton & Rossi para obter uma reta de calibração para a proteína, usando albumina como padrão, numa gama de concentrações que variou entre 0,1 e 10,0 g/l. Utilizando a reta de calibração obtida para a albumina (Anexo I-b) descontou-se aos valores de absorvância obtidos pela aplicação do método aos xaropes de alfarroba,

o valor correspondente à absorvância referente à concentração de proteína existente nos xaropes (2,83 g/l para o xarope 25 e 2,52 g/l para o xarope 50).

O xarope 50 apresentou uma concentração de polifenóis cerca de 52% superior à do xarope 25, devido à sua extração ter sido feita a uma temperatura superior o que permitiu uma maior extração de polifenóis solúveis (Tabela 3.3).

Tabela 3.3: Concentração e conteúdo de polifenóis solúveis nos xaropes e na polpa de alfarroba.

	Xarope 50	Xarope 25
<sup>a)</sup> Concentração polifenóis (mg EAG/l)	488,4	236,4
<sup>b)</sup> Conteúdo em polifenóis (mg EAG/ g p.s. polpa alfarroba)	1,46	0,71

<sup>a)</sup> Concentração de polifenóis obtida através da reta de calibração do ácido gálico (Figura I.1), após correção para o valor de proteína presente nos respetivos xaropes. <sup>b)</sup> Conteúdo em polifenóis calculado relativamente à massa de polpa de alfarroba usada para produzir o xarope (1 kg/3 l de água).

Os resultados mostraram que o conteúdo em polifenóis solúveis na polpa de alfarroba extraída a 50°C e a 25°C foi, respetivamente, 1,46 mg EAG/(g p.s.) e 0,71 mg EAG/(g p.s.). À maior concentração de polifenóis no xarope 50 verificou-se igualmente uma cor castanho-alaranjada mais intensa do que no xarope 25, o que significa que estes correspondem a polifenóis corados.

### 3.1.2 Polpa de alfarroba extratada (PAE)

As cinzas totais e a humidade presentes quer na PAE 25 quer na PAE 50 foram determinadas como descrito na subsecção 2.3.1. A PAE 25 apresentou 0,8 mg de cinzas em 100 g polpa (p.s.) e uma humidade de aproximadamente 10%, enquanto que a PAE 50 apresentou uma humidade de aproximadamente 8% não tendo sido possível quantificar as cinzas, provavelmente devido à perda de massa durante o processo de incineração.

A quantificação da celulose, da hemicelulose e da lenhina presentes na polpa de alfarroba foi determinada pela aplicação do método da HAQ (subsecção 2.3.2) à PAE, usando as fórmulas apresentadas no Anexo II. Dado não ter sido possível determinar as cinzas totais na PAE 50 usou-se, por aproximação, o valor obtido para a PAE 25. Na Tabela 3.4 são apresentados os resultados obtidos para as duas frações lenhocelulósicas em g/(100 g p.s. PAE).

Tabela 3.4: Composição da fração lenhocelulósica da polpa de alfarroba extratada (PAE).

Composição (g/100 g (p.s.) PAE)		PAE 50	PAE 25
Lenhina de Klason		54,81 ( $\pm$ 0,51)	56,08 ( $\pm$ 0,88)
Celulose	Glucano	13,37 ( $\pm$ 0,48)	13,26 ( $\pm$ 0,32)
Hemicelulose	Arabinano	2,04 ( $\pm$ 0,10)	1,72 ( $\pm$ 0,22)
	Xilano	5,80 ( $\pm$ 0,21)	5,26 ( $\pm$ 0,26)
Celulose + Hemicelulose		21,21 ( $\pm$ 0,79)	20,24 ( $\pm$ 0,80)

A composição lenhocelulósica da PAE 25 é semelhante à da PAE 50 (Tabela 3.4), tendo a PAE 25 13,37 g/(100 g p.s.) de celulose (glucano) e 6,98 g/(100 g p.s.) de hemicelulose (arabinano e xilano). Também se pode verificar que a concentração de lenhina na PAE é bastante elevada, correspondendo a mais de 50% do peso seco da PAE, enquanto a hemicelulose mais a celulose representam cerca de 20% do peso seco da PAE.

Comparando a composição lenhocelulósica na PAE 25 com a da PAE 50 verifica-se que para o caso da hemicelulose e celulose são aproximadamente iguais, podendo-se considerar que as diferenças obtidas se devem ao erro associado ao método de quantificação. Com estes dados para a celulose, hemicelulose e lenhina podemos calcular a composição da fração lenhocelulósica relativamente à polpa de alfarroba inteira (g/100 g p.s. polpa alfarroba), pois sabemos que a PAE representa 60% (p/p) da PAI.

O conteúdo em proteína obtido na PAE 50 foi ligeiramente superior ao obtido na PAE 25 (Tabela 3.5).

Tabela 3.5: Conteúdo de proteína na PAE 25 e na PAE 50.

	PAE 50	PAE 25
Conteúdo de proteína (g/100 g p.s. PAE)	5,92 ( $\pm$ 0,04)	5,69 ( $\pm$ 0,33)

Através da Tabela 3.5 verifica-se que a temperatura de extração não tem um efeito significativo no conteúdo de proteína presente nas PAE e que o menor conteúdo de proteína na PAE 25 está relacionado com o maior desvio padrão obtido na sua determinação.

A quantificação dos polifenóis presentes na PAE 50 e na PAE 25 foi obtida por extração dos polifenóis com acetona a 70% (v/v), pois segundo a literatura (Avallone *et al.*, 1997;



Papagiannopoulos *et al.*, 2004) este é o método que apresenta uma maior eficiência na extração dos polifenóis totais da alfarroba.

Tabela 3.6: Conteúdo em polifenóis na polpa de alfarroba extratada (PAE).

	PAE 50	PAE 25
Conteúdo em polifenóis (mg EAG/g p.s. PAE)	7,37	6,30

Os polifenóis “totais” (solúveis e insolúveis) quantificados na PAE 25 (6,30 g EAG/g p.s. PAE) foram ligeiramente inferiores aos quantificados na PAE 50 (7,37 mg EAG/g p.s. PAE). Uma possível explicação para este facto pode resultar da quantidade de polifenóis solúveis extraídos no xarope 50, bem como muito possivelmente a de outros compostos solúveis, ter sido maior e assim a quantidade de polifenóis insolúveis existente na PAE 50 representar uma proporção maior face à massa total de PAE.

### 3.1.3 Polpa de alfarroba inteira (PAI)

Utilizando os mesmos métodos aplicados à PAE, determinou-se que a PAI tinha aproximadamente 6% de humidade e um conteúdo em polifenóis totais de 7,65 mg EAG/(g p.s. de polpa de alfarroba). Sabendo-se que a PAI contém cerca de 40% (p/p) de açúcares solúveis, pode-se comparar os conteúdos de polifenóis (ou de qualquer outro componente) obtido para a PAI com o obtido para a PAE, multiplicando esse valor por 0,6. Fazendo esses cálculos, obteve-se para a PAE 25 e PAE 50, respetivamente, os valores de 3,78 e 4,42 mg EAG/(g p.s. PAI). Comparando estes valores com os obtidos para a PAI, 7,65 mg EAG/(g p.s. PAI), podemos verificar que eles são significativamente menores. No entanto, para podermos comparar corretamente os polifenóis totais (solúveis e insolúveis) determinados para a PAI com os obtidos na PAE temos de considerar também os polifenóis solúveis existentes nos respetivos xaropes (50 e 25). Essa comparação foi efetuada somando o conteúdo total em polifenóis solúveis determinado no xarope 25 e xarope 50 com o conteúdo em polifenóis insolúveis obtidos na correspondente PAE 25 e PAE 50, de forma a garantir-se que todos os polifenóis foram quantificados nos diferentes subprodutos da polpa de alfarroba (Figura 3.1).

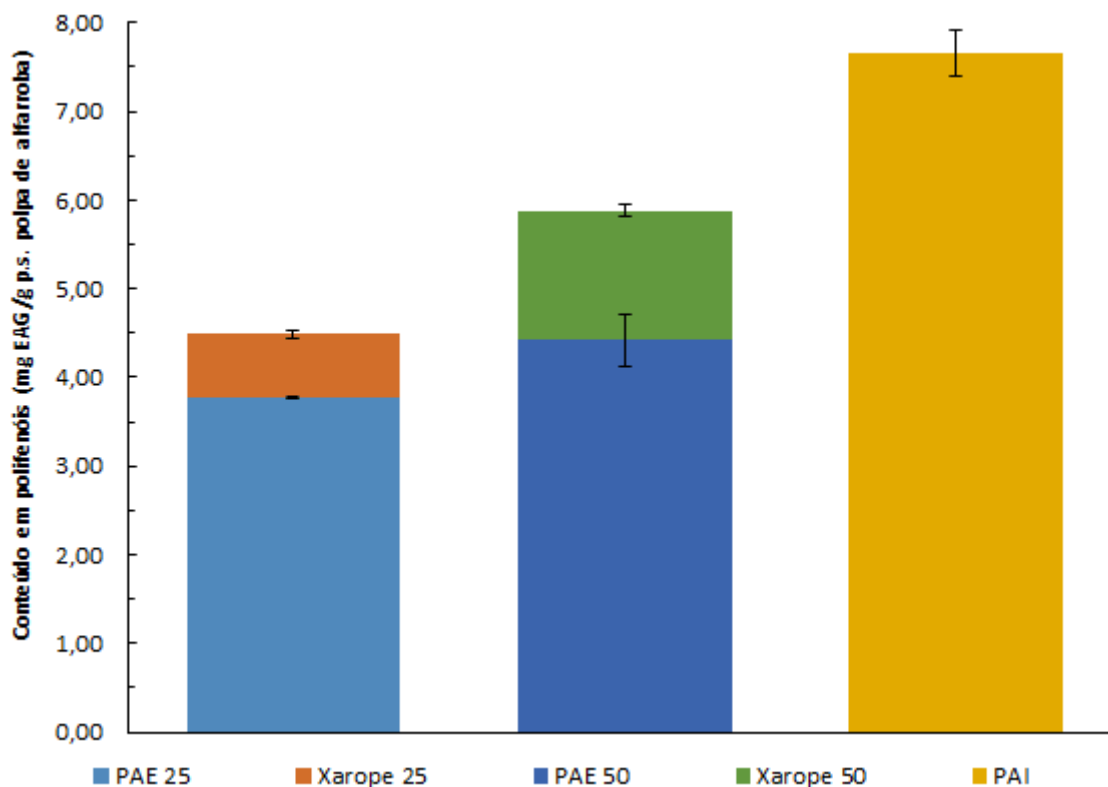


Figura 3.1: Conteúdo em polifenóis insolúveis (PAE 25 e PAE 50), solúveis (xarope 25 e xarope 50) e totais (PAI). Os valores apresentados correspondem à média de duplicados e as barras de erro aos respectivos desvios padrão.

Os resultados obtidos (Figura 3.1) mostram que o conteúdo em polifenóis totais quantificado na PAI foi sempre maior que a soma dos polifenóis determinados quer na PAE 25 e respetivo xarope 25, quer na PAE 50 e respetivo xarope 50, quando seria de esperar que fossem relativamente semelhantes. De qualquer modo, pode-se constatar que o conteúdo em polifenóis insolúveis presentes na polpa de alfarroba é sempre bastante superior ao conteúdo em polifenóis solúveis.

### 3.2 Remoção dos polifenóis por fotocatalise

Um dos objetivos deste trabalho foi avaliar se a fotocatalise degradava os polifenóis da polpa de alfarroba permitindo assim melhorar o rendimento da hidrólise enzimática. Uma vez que não existiam quaisquer estudos relativos à aplicação da fotocatalise nesta matéria-prima (polpa de alfarroba) fomos aplicar este método quer à PAI, quer à PAE, assim como aos diferentes xaropes obtidos (xarope 25 e xarope 50).

### 3.2.1 Xarope de alfarroba

Em primeiro lugar aplicou-se o método da fotocatalise ao xarope de alfarroba de forma a verificar se o método aplicado neste subproduto da polpa de alfarroba teria o mesmo efeito que noutros resíduos orgânicos nos quais os resultados são bastante positivos (Huston & Pignatello, 1999). Na quantificação (em duplicado) nas amostras retiradas durante o tratamento verificou-se que efetivamente ocorreu uma degradação significativa dos polifenóis solúveis, quer no xarope 50 quer no xarope 25 (Figura 3.2).

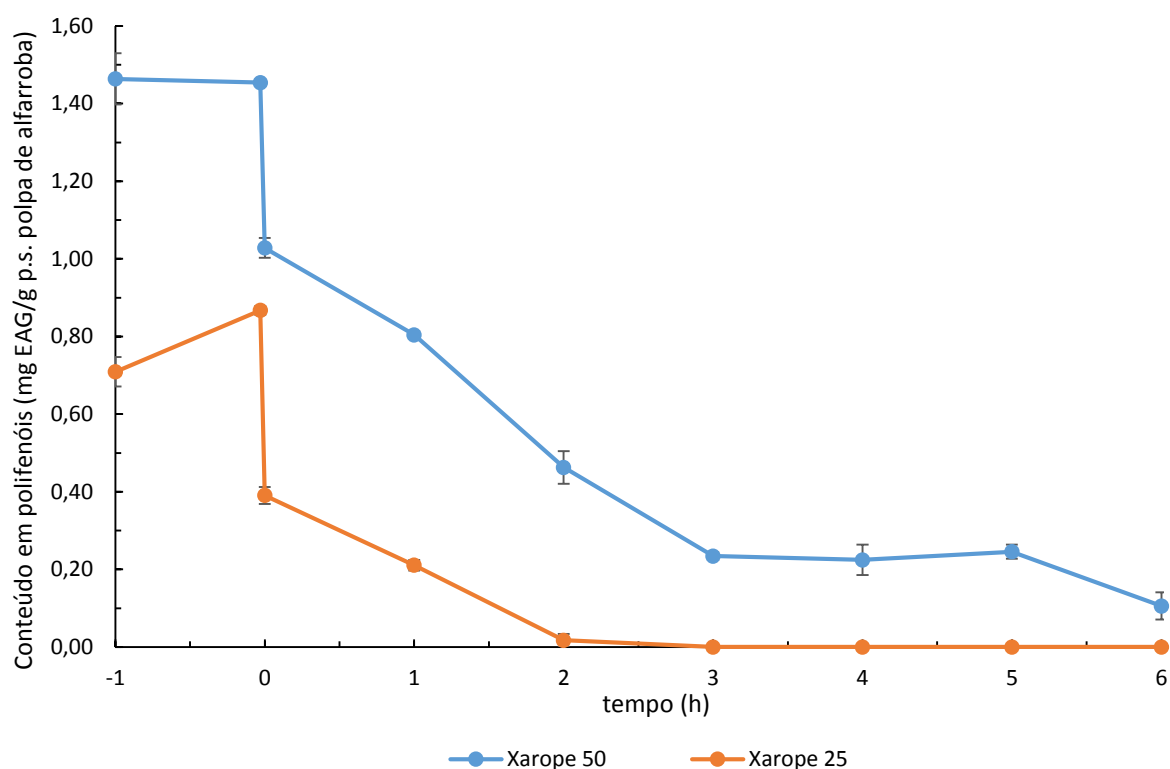


Figura 3.2: Variação do conteúdo em polifenóis solúveis presentes nos xarope 25 e xarope 50 durante o processo fotocatalítico. Os valores apresentados no tempo -1 h correspondem às quantificações efetuadas nos xaropes antes da aplicação do processo fotocatalítico (Tabela 3.3) e os valores apresentados no tempo 0 correspondem aos determinados imediatamente após a adição do Fe II (tempo = -0,03 h) e após a 1ª adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (tempo = 0 h).

Observando os resultados apresentados na Figura 3.2, podemos constatar que após a adição do ferro (II) ao xarope 25 verificou-se um aumento significativo do conteúdo em polifenóis solúveis, o que poderá ser explicado pela interferência do ferro (II) no método de Singleton & Rossi (Box, 1983). Além disso, verificou-se em ambos os xaropes que imediatamente após a adição do agente oxidante (peróxido de hidrogénio) e agitação do substrato ocorreu um decréscimo muito significativo do conteúdo em polifenóis, mesmo sem a ação catalisadora da luz sobre o substrato, resultante da reação de Feton (equação 1). Este decréscimo resultante da reação de Feton foi de 0,48 mg EAG/(g p.s. de

polpa de alfarroba) no caso do xarope 25 e de 0,42 mg EAG/(g p.s. de polpa de alfarroba) no caso do xarope 50, o que corresponde a uma redução de 55% e 29%, respetivamente, do conteúdo total em polifenóis. Verifica-se assim que o efeito do peróxido de hidrogénio foi imediato e elevado.

Comparando os perfis de degradação dos polifenóis solúveis existentes nos dois xaropes (xarope 25 e xarope 50) durante o tratamento fotocatalítico (Figura 3.2), pode constatar-se que enquanto no xarope 25 a degradação dos polifenóis foi total ao fim de 2 h, no xarope 50 essa degradação não só foi mais lenta como ainda não foi total. No xarope 50 verificou-se após o início da fotocatalise (ponto 3 da Figura 3.2) e até às 3 h de fotocatalise um decréscimo constante da quantidade de polifenóis até um valor de 0,23 mg EAG/(g p.s. de polpa de alfarroba). A partir das 3 h e até às 5 h esse valor manteve-se relativamente constante, só baixando das 5 h para as 6 h onde atingiu um valor mínimo de 0,11 mg EAG/(g (p.s.) de polpa de alfarroba). Uma explicação possível para a diferença observada na degradação dos polifenóis solúveis da polpa de alfarroba entre os xaropes 50 e 25, será a presença de polifenóis mais complexos no xarope 50 que não sejam tão facilmente oxidáveis. Assim, podemos especular que a remoção destes polifenóis mais complexos é mais lenta, e que nestas condições de fotocatalise não se conseguem degradar totalmente.

No entanto, a Figura 3.3 mostra claramente que a fotocatalise provocou um efeito significativo no xarope 50 pois ocorreu uma enorme diferença na cor do xarope 50 não tratado e após aplicação do método de destoxificação. O xarope 50 não tratado apresenta uma cor castanho-alaranjado (caramelo) enquanto que o xarope 50 após aplicação da fotocatalise apresenta um tom amarelo claro quase totalmente transparente. Dado que se sabe que os polifenóis são geralmente corados (Cheynier, 2005) o desaparecimento da cor no xarope após aplicação da fotocatalise permite concluir que houve oxidação dos polifenóis aí presentes. Uma alteração semelhante de cor ocorreu igualmente no xarope 25 após aplicação da fotocatalise (dados não apresentados).



Figura 3.3: Fotografia do xarope de alfarroba (xarope 50) antes aplicação do processo de fotocatalise (à esquerda) e o mesmo xarope após a aplicação do processo de fotocatalise (à direita).

### 3.2.2 Polpa de alfarroba extratada

Como no processo de fotocatalise aplicada quer ao xarope 50 quer ao xarope 25 se verificou que 6 h foi um tempo suficiente para reduzir quase totalmente os polifenóis solúveis presentes nesses xaropes, resolveu-se aplicar o mesmo pré-tratamento de fotocatalise à PAE, mantendo todas as variáveis inalteradas. No entanto, e porque a oxidação se dá mais facilmente na presença de água, o processo de fotocatalise teve de ser aplicado a uma suspensão de PAE em água (100 g/l). Assim, e para quantificar o efeito da fotocatalise na remoção dos polifenóis totais da PAE (quer dos polifenóis insolúveis quer dos que se dissolveram na água), foi necessário retirar amostras da fração líquida e da fração sólida para se ter uma ideia de como a fotocatalise agia sobre os polifenóis solúveis (fração líquida) e insolúveis (fração sólida). Nas amostragens retiradas ao longo do processo tentou-se retirar quantidades equivalentes de sólido e de líquido de tal forma que a concentração em ambas as frações (líquida e sólida) equivalesse às existentes na PAE que se encontrava numa concentração S:L de 100 g/l. Por isso, quantificaram-se os polifenóis insolúveis (extraídos com acetona a 70% (v/v)) nas frações sólidas recolhidas e os existentes na fração líquida. Os resultados obtidos para a PAE 25 encontram-se representados na Figura 3.4 e mostram a evolução ao longo do tempo dos polifenóis em cada uma das frações recolhidas (líquida e sólida).

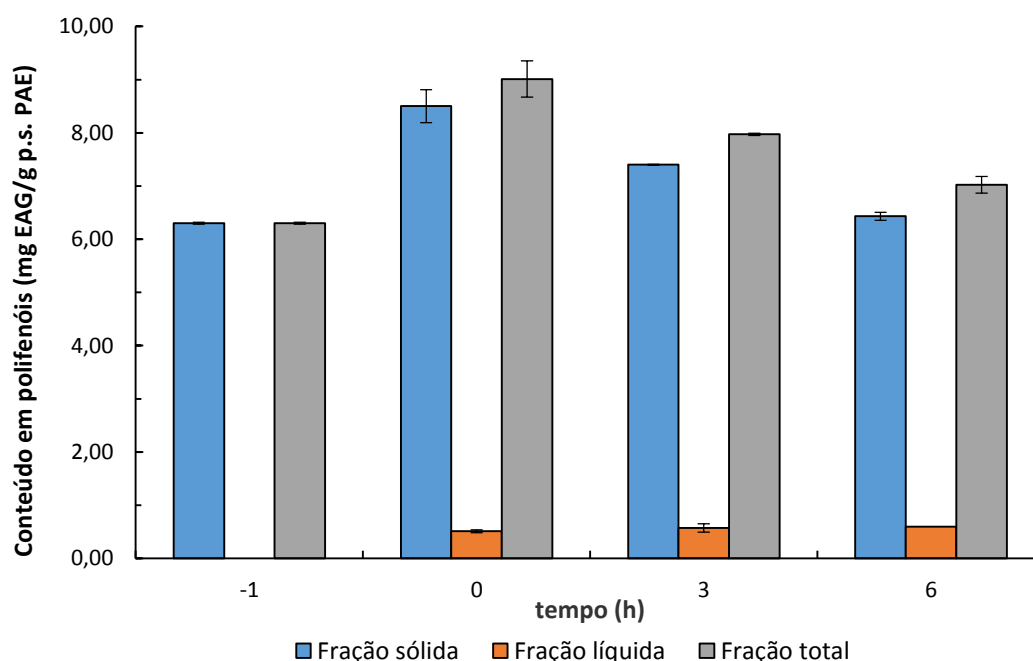


Figura 3.4: Conteúdo em polifenóis da PAE ao longo do primeiro tratamento fotocatalítico efetuado à PAE 25. Os valores apresentados correspondem à média de duplicados e as barras de erro ao desvio padrão. Os valores apresentados no tempo -1 h correspondem às quantificações efetuadas à PAE 25 antes da aplicação do tratamento fotocatalítico (Tabela 3.6) e os valores apresentados no tempo 0 h correspondem aos determinados após a adição do Fe II e após a 1ª adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

A Figura 3.4 mostra que o conteúdo em polifenóis insolúveis determinado na PAE 25 no início do processo fotocatalítico imediatamente após a 1ª adição do Fe II e do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0 h) foi consideravelmente maior (8,50 mg EAG/g p.s. PAE) que o quantificado na PAE 25 antes da aplicação do tratamento fotocatalítico (tempo -1 h) (6,30 mg EAG/ g p.s. PAE). Uma explicação possível para este aumento do conteúdo de polifenóis na PAE logo no início do pré-tratamento por fotocatalise poderá ser que a reação de Fenton que ocorre com a adição do ferro (II) e do peróxido de hidrogénio à PAE induza uma degradação imediata de alguns polifenóis insolúveis e altamente complexos (polifenóis condensados ou flavonóides) na PAE, tornando-os mais facilmente detetáveis pelo método de Singleton & Rossi. A degradação dos polifenóis é um processo químico conhecido principalmente por ocorrer nos vinhos (Pérez-Magariño & González-San José, 2006) e nas águas ruças (Agustina *et al.*, 2005). Além disso, pode acontecer que alguns fenóis tenham mais afinidade para a água do que para a acetona e sejam assim preferencialmente extraídos quando a PAE se encontra em suspensão aquosa.

No entanto, verificou-se que os polifenóis presentes na fração sólida (polifenóis insolúveis) foram diminuindo ao longo das primeiras 6 h de fotocatalise passando de 8,50 mg EAG/(g p.s. PAE) para 6,43 mg EAG/(g p.s. PAE). Este resultado confirma que houve um decréscimo dos polifenóis existentes na PAE durante o processo fotocatalítico, mas no entanto os valores totais de polifenóis quantificados foram sempre mais elevados do que os obtidos na PAE 25 não tratada (6,30 mg EAG/g p.s. PAE) (Tabela 3.6). Na fração líquida verificou-se um ligeiro aumento do conteúdo em polifenóis entre as 0 h e as 6 h finais, o que indica que ocorreu dissolução de polifenóis solúveis da fração sólida para a líquida.

Tendo-se verificado que a aplicação do tratamento fotocatalítico durante 6 h não foi suficiente para degradar totalmente os polifenóis presentes na PAE 25, decidiu-se aumentar a duração do processo para 12 h. Assim, no segundo ensaio de fotocatalise (Figura 3.5) a única alteração efetuada comparativamente ao primeiro ensaio foi o aumento da sua duração.

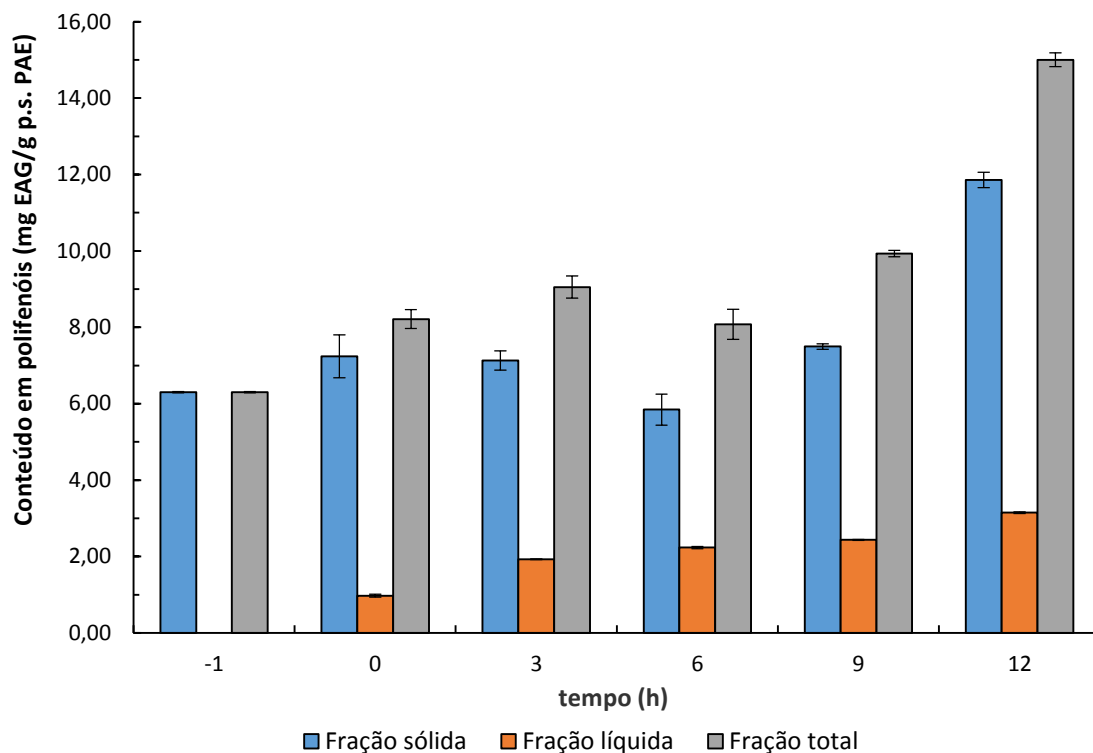


Figura 3.5: Conteúdo em polifenóis da PAE ao longo do segundo tratamento fotocatalítico efetuado à PAE 25. Os valores apresentados correspondem à média de duplicados e as barras de erro ao respetivo desvio padrão. Os valores apresentados no tempo -1 h correspondem às quantificações efetuadas à PAE 25 antes da aplicação do tratamento fotocatalítico (Tabela 3.6) e os valores apresentados no tempo 0 h correspondem aos determinados após a adição do Fe II e após a 1ª adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Devido ao facto da única alteração feita neste segundo ensaio de fotocatalíse ter sido o prolongamento do tempo do processo de 6 para 12 h, seria de esperar que os resultados durante as primeiras 6 h fossem semelhantes aos obtidos no primeiro ensaio de fotocatalíse (Figura 3.4). Na realidade, os resultados neste ensaio durante as primeiras 6 h não foram muito diferentes do primeiro, tendo-se verificado que ocorreu uma ligeira diminuição no conteúdo em polifenóis insolúveis enquanto que na fração líquida houve um ligeiro aumento dos polifenóis solúveis (Figura 3.5). Entre as 6 e as 12 h de fotocatalíse aconteceu precisamente o inverso do pretendido, isto é, ocorreu um aumento do conteúdo em polifenóis de 6,92 mg EAG/(g p.s. PAE), sendo o conteúdo total final de 15,00 mg EAG/(g p.s. PAE). Mais uma vez, a explicação poderá ser a de que tenha ocorrido uma oxidação dos polifenóis insolúveis mais complexos transformando-os em polifenóis mais simples que por sua vez são suscetíveis de serem quantificados pelo método de Singleton & Rossi, enquanto que os muito complexos não o são.

Tendo-se verificado que o prolongamento do tempo de fotocatalíse levou ao aumento do conteúdo em polifenóis totais na PAE 25 tratada, resolveu-se realizar uma terceira fotocatalíse na qual se

duplicou a quantidade de peróxido de hidrogénio adicionada em cada 2 h durante o tratamento. Neste terceiro ensaio de fotocatalise, verificou-se que no tempo 0 h o conteúdo em polifenóis, quer na fração sólida (1,12 mg EAG/g p.s. PAE) quer na fração líquida (0,16 mg EAG/g p.s. PAE), foi menor do que nos ensaios anteriores (Figura 3.6).

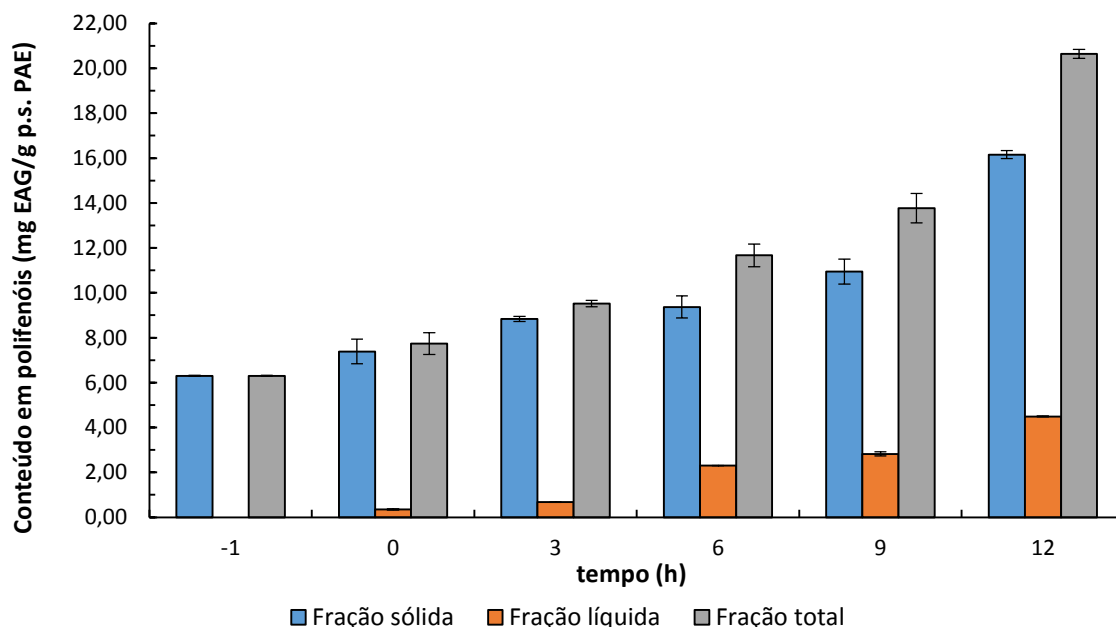


Figura 3.6: Conteúdo em polifenóis da PAE ao longo do terceiro tratamento fotocatalítico efetuado à PAE 25. Os valores apresentados correspondem à média de duplicados e as barras de erro ao respetivo desvio padrão. Os valores apresentados no tempo -1 h correspondem às quantificações efetuadas à PAE 25 antes da aplicação do tratamento fotocatalítico (Tabela 3.6) e os valores apresentados no tempo 0 h correspondem aos determinados após a adição do Fe II e após a 1ª adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Comparando estes dados com os obtidos no segundo ensaio pode-se constatar que o conteúdo inicial de polifenóis na fração sólida foi neste caso superior em (0,15 mg EAG/g p.s. PAE), enquanto que na fração líquida foi inferior (0,62 mg EAG/g p.s. PAE). Outro aspeto importante a realçar é o facto de nas 9 h iniciais do processo de fotocatalise se ter verificado um aumento muito considerável do conteúdo total em polifenóis, contrariamente ao que aconteceu no segundo ensaio de fotocatalise. Além disso, verificou-se também um aumento significativo dos polifenóis totais entre as 9 e 12 h de fotocatalise, de 6,87 mg EAG/g (p.s. PAE), valor superior ao aumento verificado no segundo ensaio de fotocatalise (5,07 mg EAG/g p.s. PAE) onde a concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi menor. Além disso, neste último ensaio de fotocatalise, o conteúdo final de polifenóis totais (20,64 mg EAG/g p.s. PAE) foi superior ao verificado no segundo ensaio de fotocatalise (15,00 mg EAG/g p.s. PAE).



Em relação ao aspeto da PAE, mais uma vez se observou que tal como nos xaropes de alfarroba, ocorreu uma diminuição significativa da cor da PAE 25 após aplicação do processo fotocatalítico (Figura 3.7).



Figura 3.7: Fotografia das amostras da fração sólida da PAE 25 após os vários ensaios de fotocatalise efetuados: Fotocatálise 1 - à esquerda, Fotocatálise 2 - à direita e Fotocatálise 3 - ao centro.

Além disso, a fotografia apresentada na Figura 3.7 mostra claramente que houve uma maior diminuição na cor (castanha-amarelada) da PAE 25 quanto maior foi o tempo e a quantidade de peróxido de hidrogénio utilizados no processo fotocatalítico (fotocatálises 3, 2 e 1). Estes resultados indicam que, embora o conteúdo em polifenóis determinados pelo método de Singleton & Rossi tenha sido maior na fotocatalise 3, houve simultaneamente uma maior remoção dos polifenóis responsáveis pela cor (proantocianinas, flavonas, entre outros) da PAE. Também se verifica que a PAE 25 no final da fotocatalise 2 apresenta uma cor ligeiramente mais clara que no final da fotocatalise 1 significando que o aumento do tempo de duração do processo levou a uma maior oxidação dos polifenóis.

### 3.2.3 Polpa de alfarroba inteira

Após a realização do processo fotocatalítico à PAE 25 fomos aplicá-lo à PAI para verificar se também neste material se verificava degradação dos polifenóis. Neste processo, aplicaram-se as mesmas condições que as utilizadas no terceiro ensaio à PAE 25.

Os resultados mostraram que a grande diferença observada na fotocatalise à PAI relativamente às anteriormente realizadas à PAE 25 foi a elevada presença de polifenóis na fração líquida (Figura 3.8). Este resultado é facilmente explicável pelo facto de na PAI não se terem removido os polifenóis solúveis antes da aplicação do processo, tal como aconteceu na PAE aquando da extração dos açúcares solúveis (xarope). No entanto, e mesmo tendo em conta que na PAI existe um maior conteúdo de polifenóis solúveis na fração líquida inicial, esta é ainda assim mais elevada do que seria de esperar, 4,45 mg EAG/g (p.s. polpa de alfarroba) enquanto que nos xaropes era de apenas 2 mg EAG/g (p.s. polpa de alfarroba).

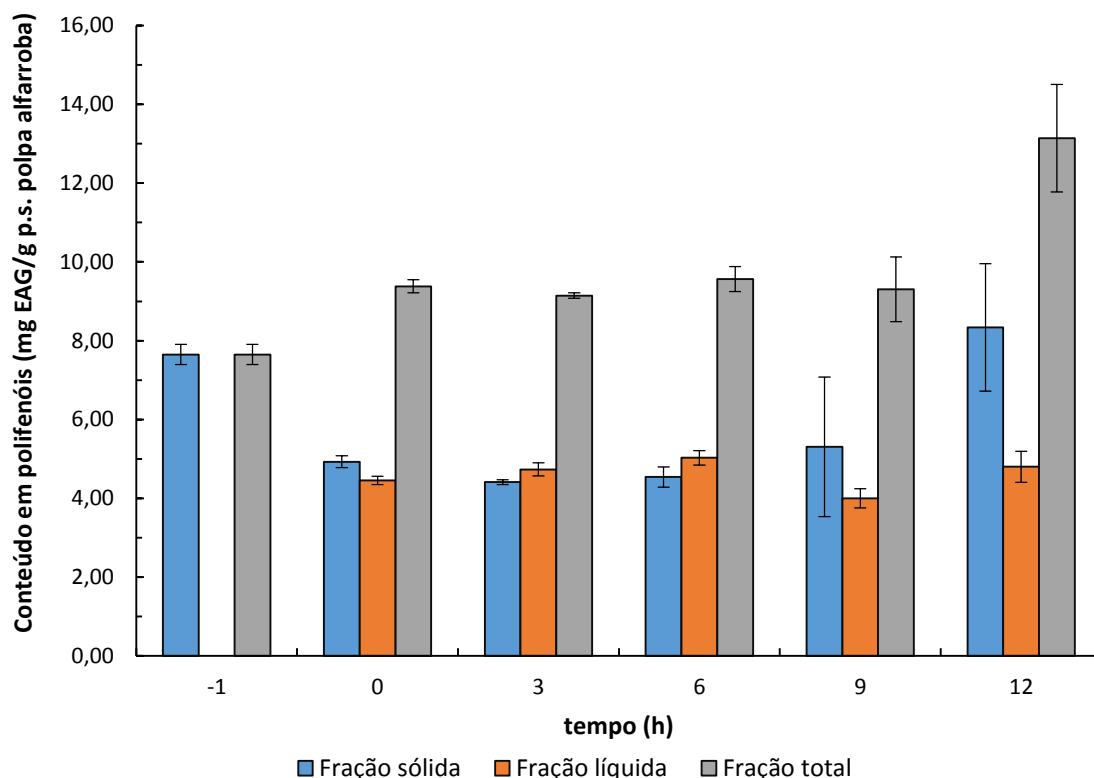


Figura 3.8: Conteúdo em polifenóis da PAI ao longo do tratamento. Os valores apresentados correspondem à média de duplicados e as barras de erro ao desvio padrão. Os valores apresentados no tempo -1 h correspondem às quantificações efetuadas à PAI antes da aplicação do tratamento fotocatalítico (subseção 3.1.3) e os valores apresentados no tempo 0 h correspondem aos determinados após a adição do Fe II e após a 1ª adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Esta fotocatalise foi realizada numa suspensão de PAI em água numa concentração inicial de 100 g/l. Tendo em conta que cerca de 40-50% do peso seco da PAI corresponde a açúcares solúveis, após dissolução destes na água, a razão S:L nesta suspensão reduziu-se a cerca de metade da inicial pois os açúcares bem como todas as matérias orgânicas solúveis acabam por se dissolver na água durante o processo. Assim a razão S:L poderá passar para metade da inicial o que poderá facilitar a ação do agente oxidante levando a que uma maior quantidade de polifenóis passe para a fração líquida e que seja assim mais facilmente atacada pelo agente oxidante, tal como aconteceu nos xaropes.

Relativamente ao conteúdo total em polifenóis (solúveis e insolúveis em água) verificou-se que no início do pré-tratamento este era de 9,38 mg EAG/g (p.s. polpa de alfarroba), valor bastante superior ao determinado na PAE 25 que foi de 4,64 mg EAG/g (p.s. polpa de alfarroba). Comparando o processo fotocatalítico aplicado à PAE 25 com o aplicado à PAI, verifica-se que no primeiro caso (terceiro ensaio de fotocatalise) ocorreu um aumento gradual dos polifenóis totais durante as primeiras 9 h, enquanto que no processo aplicado à PAI o conteúdo total de polifenóis manteve-se constante. No entanto, em ambos os processos verificou-se que o grande aumento de polifenóis totais

ocorreu maioritariamente entre as 9 e as 12 h, em resultado sobretudo do grande aumento dos polifenóis insolúveis na fração sólida.

### 3.3 Efeito da fotocatalise no rendimento da hidrólise enzimática aplicada à PAE

Efetuuou-se uma hidrólise enzimática à PAE 25 não tratada e tratada por fotocatalise, de modo a se comparar as possíveis melhorias no rendimento da hidrólise enzimática. O processo fotocatalítico foi realizado nas mesmas condições do ensaio com 20 mg/l de Fe II e 200 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (subsecção 3.2.2) efetuada à PAE 25. A concentração de sólidos (PAE) durante a hidrólise enzimática foi de 100 g/l e o processo decorreu numa incubadora orbital, à temperatura de 30°C, a 150 rpm de agitação, durante 72 h. Foram retiradas amostras à suspensão de PAE durante o processo enzimático e a fração sólida foi separada da fração líquida por centrifugação. Os sobrenadantes das amostras foram analisados por HPLC para quantificação dos açúcares libertados durante o processo enzimático. O aumento da concentração de glucose ao longo da hidrólise enzimática, quer na PAE 25 não tratada quer na tratada por fotocatalise, encontra-se representado na Figura 3.9 e permitiu determinar o rendimento do processo enzimático (i.e. hidrólise da celulose com libertação de glucose para o meio).

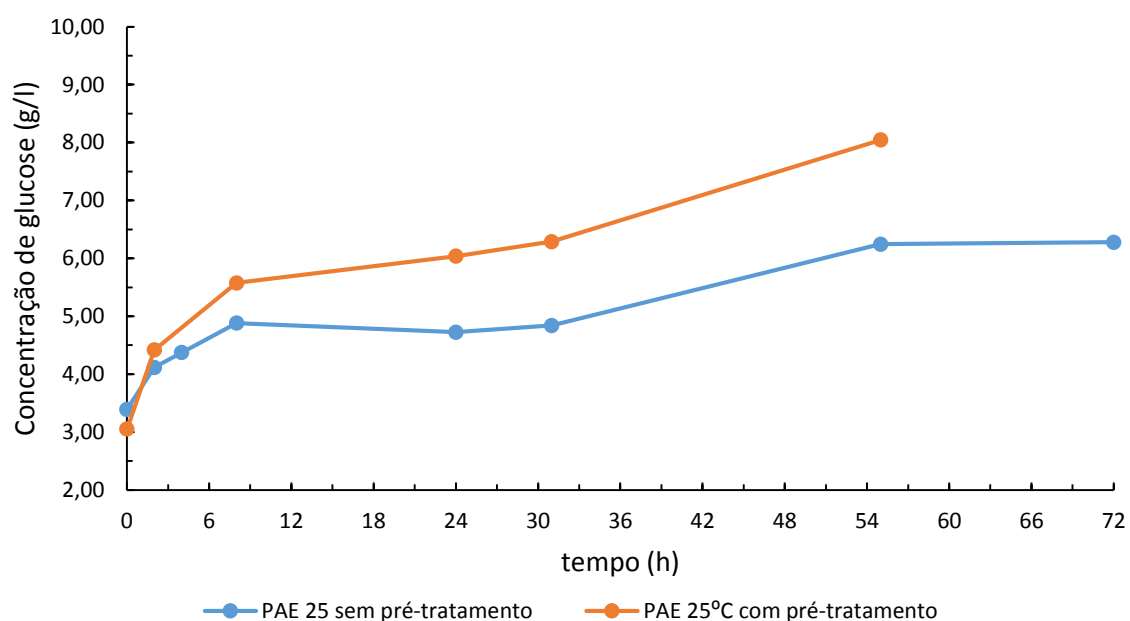


Figura 3.9: Aumento da concentração de glucose nos hidrolisados ao longo das 72 h de hidrólise enzimática efetuada à PAE 25, sem e com aplicação do pré-tratamento por fotocatalise.

Pelos resultados apresentados na Figura 3.9, pode constatar-se que em ambas as polpas (PAE 25 tratada e não tratada) a concentração de glucose no início da hidrólise enzimática era de aproximadamente 3 g/l. A presença de glucose inicialmente na PAE 25 significa que as lavagens

efetuadas durante o processo de produção da PAE não foi suficiente para remover a totalidade dos açúcares solúveis. Deste modo, a quantificação da glucose libertada durante a hidrólise enzimática da fração celulósica da PAE foi calculada descontando este valor inicial de glucose. Assim o rendimento da hidrólise enzimática corresponde apenas à concentração de glucose libertada acima deste valor inicial. Em ambos os casos verificou-se que nas primeiras 8 h de hidrólise ocorreu um aumento significativo da concentração de glucose, sendo que na PAE 25 com pré-tratamento esse aumento foi mais significativo, aumentando 2,52 g/l, enquanto que na PAE 25 sem pré-tratamento esse aumento foi de 1,49 g/l. Ao longo das 64 h seguintes não houve um aumento significativo da concentração de glucose durante a hidrólise enzimática realizada com a PAE 25 sem pré-tratamento, (aumentou apenas 1,39 g/l até uma concentração final de 6,28 g/l), enquanto que na PAE 25 tratada esse aumento foi de 2,47 g/l (concentração final de 8,05 g/l). Mesmo só tendo obtido dados para a concentração de glucose até às 55 h da hidrólise enzimática, os resultados mostram claramente que o tratamento fotocatalítico efetuado à PAE 25 melhoraram significativamente o rendimento da hidrólise enzimática nesta polpa por comparação com a PAE 25 não tratada. A concentração de glucose no hidrolisado enzimático obtido com a PAE 25 tratada por fotocatalíse atingiu um valor máximo de 8,05 g/l, valor bastante superior às 6,28 g/l de glucose obtidas no hidrolisado da PAE 25 não tratada. Os resultados obtidos permitem assim concluir que a destoxificação dos polifenóis da polpa de alfarroba através da aplicação do método fotocatalítico, melhoraram de facto o rendimento da hidrólise enzimática efetuada para sacarificar a fração celulósica desta matéria-prima (Tabela 3.7).

Tabela 3.7: Rendimento da hidrólise enzimática (HE) efetuada à PAE 25 não-tratada e tratada por fotocatalíse, em termos de % de glucano hidrolisado.

	PAE 25 não tratada	PAE 25 tratada por fotocatalíse
Rendimento (%)	21,8	37,7

Podemos assim concluir que a fotocatalíse apresenta-se como um método de destoxificação eficaz para remover polifenóis da polpa de alfarroba permitindo além disso melhorar o rendimento de hidrólise da celulose deste material por via enzimática (Tabela 3.7). Embora os polifenóis da polpa de alfarroba tenham aumentado durante o processo fotocatalítico, segundo método de Singleton & Rossi, os resultados da hidrólise enzimática mostraram que parece ter havido uma real oxidação dos polifenóis da PAE e que estes inibem o processo de hidrólise enzimática da polpa de alfarroba. Para além disso, estes resultados mostram ainda que provavelmente terá sido a remoção dos polifenóis corados o que levou à melhoria do rendimento da hidrólise enzimática, porque como se viu na Figura 3.7 houve uma elevada perda de cor na PAE 25 após aplicação da fotocatalíse.

### **3.4 Efeito da fotocatalise no rendimento do processo de produção de bioetanol a partir da polpa de alfarroba**

Para verificar se a polpa de alfarroba tratada previamente por fotocatalise permitiria um aumento do rendimento de produção de etanol, utilizou-se PAI tratada por fotocatalise para efetuar uma fermentação em SSF. A fermentação foi realizada em frascos agitados, num volume final de meio de 100 ml contendo a PAI (tratada por fotocatalise) diluída em tampão fosfato 1 M (pH 5,5) até uma concentração final de 100 g/l e a mistura enzimática nas condições descritas na subsecção 2.5. O meio foi inoculado com a levedura *S. carlsbergiensis* (20 % v/v) e a fermentação deveria ter ocorrido num agitador orbital, à temperatura de 30°C e 150 rpm de agitação. No entanto, ao se inocular o meio com a levedura ocorreu uma libertação intensa e súbita de calor que pensamos terá sido provocada pelo peróxido de hidrogénio residual (100 mg/l) presente na PAI após aplicação do processo fotocatalítico. Assim, fez-se um plaqueamento do meio para se verificar se havia crescimento, não tendo tal acontecido não foi possível prosseguir com este estudo e não se puderam retirar dados desta experiência.

Na verdade, após a fotocatalise da PAI verificou-se a existência de peróxido de hidrogénio residual (aproximadamente 200 mg/l), o qual se tentou remover deixando o substrato a agitar durante 16 h. No entanto, os resultados experimentais confirmaram que tal não foi possível e que a concentração após as 16 h de agitação ainda era de aproximadamente 100 mg/l. Assim, e em termos futuros terão que se usar outras formas para remover totalmente o peróxido de hidrogénio do meio reacional onde ocorre a fotocatalise.

Existem algumas técnicas possíveis para eliminar o peróxido de hidrogénio presente no substrato no qual se pretendia aplicar o SSF que são: a agitação do substrato durante um tempo maior do que o utilizado neste caso; utilização de enzimas (catalases) que decompõem totalmente o peróxido de hidrogénio em água e oxigénio.

#### 4. Conclusões e perspectivas futuras

As diferentes temperaturas de extração (25 e 50°C) dos açúcares solúveis da polpa de alfarroba mostraram influenciar a quantidade de polifenóis extraídos da polpa de alfarroba, tendo-se removido uma maior quantidade de polifenóis solúveis a 50°C, sendo a quantidade de açúcares removida semelhante em ambos os casos (25°C e 50°C). A PAE obtida por extração dos açúcares solúveis a 25 e a 50°C respetivamente, apresentaram uma composição lenhocelulósica muito semelhante.

O tratamento fotocatalítico mostrou-se muito eficaz na remoção dos polifenóis solúveis presentes no xarope de alfarroba, embora no xarope 50 no final do pré-tratamento ainda permanecesse uma concentração residual de polifenóis solúveis. Dos resultados obtidos pode concluir-se que quer a duração, quer a quantidade de agente oxidante ( $H_2O_2$ ) e catalisador (Fe II) utilizados na fotocatalise foram suficientes para uma rápida destoxificação dos polifenóis solúveis presentes nos xaropes de alfarroba. Os polifenóis removidos dos xaropes terão sido os polifenóis corados pois a cor castanho-alaranjada desapareceu do xarope tratado por fotocatalise (Figura 3.3).

A fotocatalise quando aplicada à fração sólida da alfarroba (PAE e PAI) levou a um aumento dos polifenóis totais em vez da esperada diminuição. Verificou-se que a quantidade de peróxido de hidrogénio aplicado influencia a velocidade a que os polifenóis são removidos, tendo o aumento da quantidade de peróxido de hidrogénio de 2 para 4 ml/(g p.s. de polpa) aumentado a quantidade de polifenóis corados oxidados (Figura 3.7). Outro fator determinante é a duração da fotocatalise, tendo-se verificado inicialmente que as 6 h aplicadas na PAE não foram suficientes para degradar os polifenóis e por fim que as 12 h também não foram suficientes. Embora a aplicação do processo fotocatalítico durante 12 h não tenha sido suficiente para degradar a totalidade dos polifenóis presentes na polpa de alfarroba, verificou-se que o aumento da duração do processo levou a um aumento da degradação dos polifenóis corados.

A hidrólise enzimática efetuada à PAE 25 tratada por fotocatalise, permite concluir que o tratamento fotocatalítico melhorou o rendimento do processo de conversão de glucano em glucose, tendo aumentado o rendimento de hidrólise em cerca de 16% (de 22% para 38%).

A realização do processo SSF na PAI tratada por fotocatalise revelou-se infrutífera devido à presença de peróxido de hidrogénio na polpa tratada, o que acabou por eliminar os microrganismos impedindo que esta se realizasse nas condições adequadas. No entanto, os resultados obtidos no presente trabalho permitem concluir que a aplicação, com algumas modificações (*e.g.* remoção total do peróxido de hidrogénio após fotocatalise), da fotocatalise à polpa de alfarroba permitirá melhorar o rendimento global do processo de produção de etanol a partir de polpa de alfarroba.

Tendo em conta os resultados obtidos no presente estudo, sugerem-se os seguintes trabalhos futuros:

- Estudar mais detalhadamente o processo fotocatalítico de forma a perceber quais as causas que levam ao aumento da concentração de polifenóis que se observou ao longo do processo (segundo o método de Singleton & Rossi).
- Aumentar o tempo de duração do processo fotocatalítico para verificar se a concentração de polifenóis poderia aumentar ou se a partir de certo ponto diminuiria, e verificar o que é que esse aumento resultaria num aumento do rendimento de hidrólise enzimática.
- Aplicar um processo SSF à PAI tratada por fotocatalise após remoção completa do peróxido de hidrogénio para verificar se existiria uma melhoria efetiva no rendimento global do processo de produção de etanol a partir de polpa de alfarroba. Na remoção do peróxido de hidrogénio sugere-se a agitação da polpa de alfarroba após o processo fotocatalítico durante pelo menos 24 h num ambiente refrigerado (temperatura de aproximadamente 4°C) ou em alternativa o uso de enzimas (peroxidases) capazes de decompor completamente o peróxido de hidrogénio.
- Estudar a viabilidade técnica e económica da aplicação de um processo fotocatalítico à polpa de alfarroba usando coletores solares do tipo CPC na produção industrial de bioetanol a partir de polpa de alfarroba.

## 5. Referências bibliográficas

- Agustina, T.E., H.M. Ang and V.K. Vareek, 2005. A review of synergistic effect of photocatalysis and ozonation on wastewater treatment. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 6(4), pp.264–273.
- Avallone, R., M. Plessi, M. Baraldi and A. Monzani, 1997. Determination of Chemical Composition of Carob ( *Ceratonia siliqua*): Protein, Fat, Carbohydrates, and Tannins. *Journal of food composition and analysis*, 172, pp.166–172.
- Balat, M., H. Balat and C. Öz, 2008. Progress in bioethanol processing. *Progress in Energy and Combustion Science*, 34(5), pp.551–573.
- Bernardo-Gil, M.G, R. Roque, L.B. Roseiro, L.C. Duarte, F. Gírio and P. Esteves, 2011. Supercritical extraction of carob kibbles (*Ceratonia siliqua* L.). *The Journal of Supercritical Fluids*, 59, pp.36–42.
- Biner, B., H. Gubbuk, M. Karhan, M. Aksu and M. Pekmezci, 2007. Sugar profiles of the pods of cultivated and wild types of carob bean (*Ceratonia siliqua* L.) in Turkey. *Food Chemistry*, 100(4), pp.1453–1455.
- Box, J., 1983. Investigation of the Folin-Ciocalteu phenol reagent for the determination of polyphenolic substances in natural waters. *Water Research*, (ii), p.400.
- Brillas, E., E. Mur, R. Sauleda, L. Sánchez, J. Peral, X. Domènech and J. Casado, 1998. Aniline degradation by combined photocatalysis and ozonation. *Applied Catalysis B: Environmental*, 19, pp.59–65.
- Browning, B., 1967. Methods of wood chemistry. Volumes I & II. *Methods of wood chemistry. Volumes I & II.*, 102(11).
- Cheynier, V., 2005. Polyphenols in foods are more complex than often thought. *The American journal of clinical nutrition*, 81(1 Suppl), p.223S–229S.
- Comunidades Europeias, 2001. Livro Verde: Para uma Estratégia Europeia de Segurança do Aproveitamento Energético. *Comissão Europeia*.
- Correia, P.J. and M.A. Martins-Loução, 2005. The use of macronutrients and water in marginal Mediterranean areas: the case of carob-tree. *Field Crops Research*, 91(1), pp.1–6.
- Das, D. and T.N. Veziroğlu, 2001. Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. *International Journal of Hydrogen Energy*, 26, pp.13–28.
- Dasenakis, D. and N. Zografakis, 2002. Studies on the exploitation of carob for bioethanol production. *Biomass in Mediterranean*.
- DGEG, 2010. Direcção Geral de Energia e Geologia.
- DRAPALG, 2007. "Programa desenvolvimento rural 2007-2013: Fileira da alfarroba e amêndoa". *Direcção Regional de Agricultura e Pescas do Algarve*.



- Gomez, L.D., C.G. Steele-King and S.J. McQueen-Mason, 2008. Sustainable liquid biofuels from biomass: the writing's on the walls. *The New phytologist*, 178(3), pp.473–85.
- Griffiths, D.W., 1986. The inhibition of digestive enzymes by polyphenolic compounds. *Nutritional and Toxicological Significance of Enzyme Inhibitors in Foods*, 199, pp.509-516.
- Gregg, D.J. and J.N. Saddler, 1996. Factors affecting cellulose hydrolysis and the potential of enzyme recycle to enhance the efficiency of an integrated wood to ethanol process. *Biotechnology and bioengineering*, 51(4), pp.375–83.
- Hahn-Hägerdal, B., M. Galbe, M.F. Gorwa-Grauslund, G. Lidén and G. Zacchi, 2006. Bio-ethanol- the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends in biotechnology*, 24(12), pp.549–56.
- Hamelinck, C.N., G.v. Hooijdonk and A.P.C. Faaij, 2005. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. *Biomass and Bioenergy*, 28(4), pp.384–410.
- Hill, J., E. Nelson, D. Tilman, S. Polasky, D. Tiffany, 2006. Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(30), pp.11206–10.
- Huston, P.L. and J.J. Pignatello, 1999. Degradation of selected pesticide active ingredients and commercial formulations in water by the photo-assisted Fenton reaction. *Water Research*, 33(5), pp.1238–1246.
- Kabra, K., R. Chaudhary and R.L. Sawhney, 2004. Treatment of Hazardous Organic and Inorganic Compounds through Aqueous-Phase Photocatalysis: A Review. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 43(24), pp.7683–7696.
- Kjeldahl, J., 1883. A new method for the determination of nitrogen in organic matter. *Z. Anal. Chem.*, (22), p.366.
- Kumazawa, S., M. Tanighuchi, Y. Suzuki, M. Shimura, MS. Kwon and T. Nakayama, 2002. Antioxidant activity of polyphenols in carob pods. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(2), pp.373–7.
- Lange, M., 2011. The GHG balance of biofuels taking into account land use change. *Energy Policy*, 39(5), pp.2373–2385.
- Lima-Costa, M.E., C. Tavares, S. Raposo, B. Rodrigues and J. M. Peinado, 2012. Kinetics of sugars consumption and ethanol inhibition in carob pulp fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* in batch and fed-batch cultures. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 39(5), pp.789–97.
- Mabee, W., Gregg, D. and J. Saddler, 2005. Assessing the emerging biorefinery sector in Canada. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 123(1-3), pp.765–778.
- Malato, S., J. Blanco, A. Vidal and C. Richter, 2002. Photocatalysis with solar energy at a pilot-plant scale: an overview. *Applied Catalysis B: Environmental*, 37(1), pp.1–15.
- Malça, J. and F. Freire, 2006. Renewability and life-cycle energy efficiency of bioethanol and bioethyl tertiary butyl ether (bioETBE): Assessing the implications of allocation. *Energy*, 31(15), pp.3362–3380.

- Ministério da Economia e da Inovação. (21 de Março de 2006). Decreto-Lei nº62/2006. *Diário da República*.
- Ministério da Economia e da Inovação. (25 de Outubro de 2010). Decreto-Lei nº117/2010. *Diário da República*.
- Naik, S.N., V. V. Goud, P. K. Rout and A. K. Dalai, 2010. Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(2), pp.578–597.
- Oliveira, A.C., 2012. Slides aulas da disciplina Energia da Biomassa. *Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (FCUL)*.
- Olofsson, K., M. Bertilsson and G. Lidén, 2008. A short review on SSF – an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. *Biotechnology for biofuels*, 1(1), p.7.
- Owen, R.W., R. Haubner, W.E. Hull, G. Erben, B. Spiegelhalder, H. Bartsch and B. Haber, 2003. Isolation and structure elucidation of the major individual polyphenols in carob fibre. *Food and Chemical Toxicology*, 41(12), pp.1727–1738.
- Papagiannopoulos, M., H. R. Wollseifen, A. Mellenthin, B. Haber and R. Galensa, 2004. Identification and quantification of polyphenols in carob fruits (*Ceratonia siliqua* L.) and derived products by HPLC-UV-ESI/MSn. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(12), pp.3784–91.
- Pérez-Magariño, S. and M. L. González-San José, 2006. Polyphenols and colour variability of red wines made from grapes harvested at different ripeness grade. *Food Chemistry*, 96(2), pp.197–208.
- Petit, M. and Pinilla, J., 1995. Production and purification of a sugar syrup from carob pods. *LWT-Food Science and Technology*, 152, pp.145–152.
- Presidência do Conselho de Ministros, 18 de Março de 2010. Resolução do Conselho de Ministros n.º29/2010. *Diário da República*.
- Ramos, L., C. Breuil and J. Saddler, 1993. The use of enzyme recycling and the influence of sugar accumulation on cellulose hydrolysis by *Trichoderma* cellulases. *Enzyme and microbial technology*, 15(1).
- Romero, M., J. Blanco, B. Sánchez, A. Vidal, S. Malato, A. I. Cardona and E. Garcia, 1999. Solar Photocatalytic degradation of water and air pollutants: challenges and perspectives. *Solar Energy*, 66(2), pp.169–182.
- Sánchez, S., L.J. Lozano, C. Godínez, D. Juan, A. Pérez, F.J. Hernández, 2010. Carob pod as a feedstock for the production of bioethanol in Mediterranean areas. *Applied Energy*, 87(11), pp.3417–3424.
- Santos, J.R.A., A. M. Souto-Maior and E. R. Gouveia, 2010. Comparison of SHF and SSF processes from sugar cane bagasse for ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Química Nova*, 33(4), pp.904–908.

- Singleton, V. and J. Rossi, 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*. p.1980.
- Srinivasan, S., 2009. The food v. fuel debate: A nuanced view of incentive structures. *Renewable Energy*, 34(4), pp.950–954.
- Sun, Y. and J. Cheng, 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource technology*, 83(1), pp.1–11.
- UE, 2003. Directiva 2003/30/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 8 de Maio de 2003, relativa à promoção da utilização de biocombustíveis ou de outros combustíveis renováveis nos transportes. *Comissão Europeia*.
- UE, 2009. Directiva 2009/28/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 23 de Abril de 2009, relativa à promoção da utilização de energia proveniente de fontes renováveis que altera e subsequentemente revoga as Directivas 2001/77/CE e 2003/30/CE. *Comissão Europeia*.
- Taherzadeh, M. and K. Karimi, 2007. Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. *BioResources*, 2, pp.707–738.
- Timilsina, G.R. and A. Shrestha, 2011. How much hope should we have for biofuels? *Energy*, 36(4), pp.2055–2069.
- Vourdoubas, J., 2002. Efforts for the production of liquid biofuels in Crete: Bioethanol and biodiesel. *Comprehensive Economic and spatial bio-energy modelling*, pp.151–157.
- Xiao, Z., X. Zhang, D. J. Gregg and J. N. Saddler, 2004. Effects of sugar inhibition on cellulases and  $\beta$ -glucosidase during enzymatic hydrolysis of softwood substrates. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 113-116, pp.1115–1126.

## Anexo I – Retas de calibração utilizadas na determinação do conteúdo em polifenóis presentes na polpa de alfarroba pelo método de Singleton & Rossi.

### a) Reta de calibração para o ácido gálico

Prepararam-se padrões de ácido gálico nas concentrações de 5, 30, 50, 80 e 100 mg/l, aplicou-se o método descrito na subsecção 2.3.3 e leram-se os valores de absorvância a 765 nm.

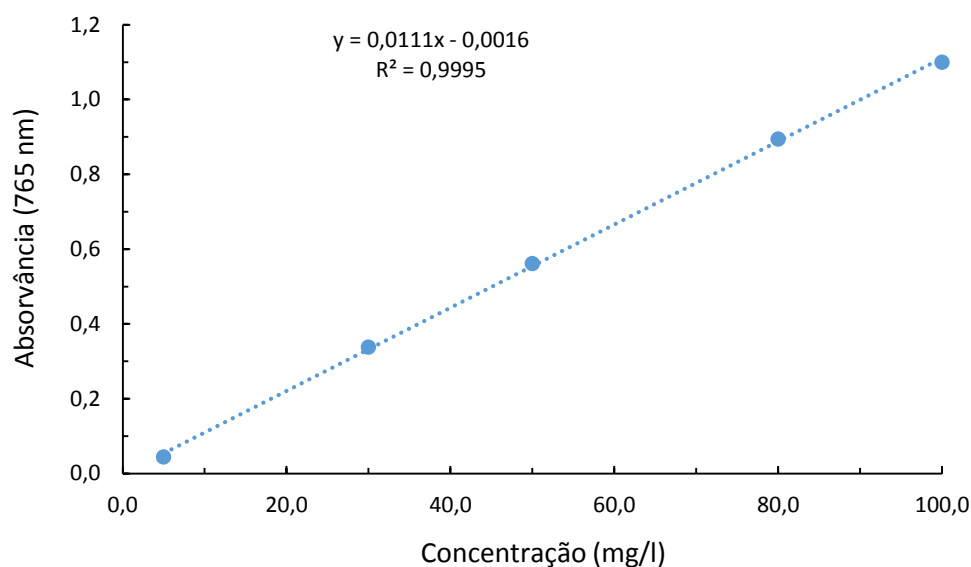


Figura I.1: Reta de calibração do ácido gálico usada na determinação da concentração de polifenóis nos xaropes de alfarroba 25 e 50.

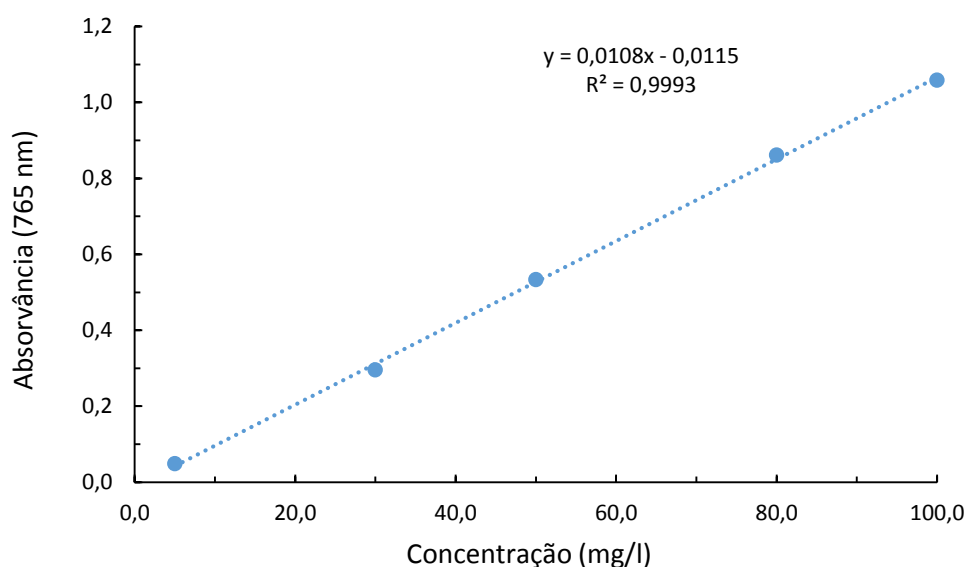


Figura I.2: Reta de calibração do ácido gálico usada na determinação da concentração de polifenóis ao longo da fotocatalise dos xaropes 25 e 50.

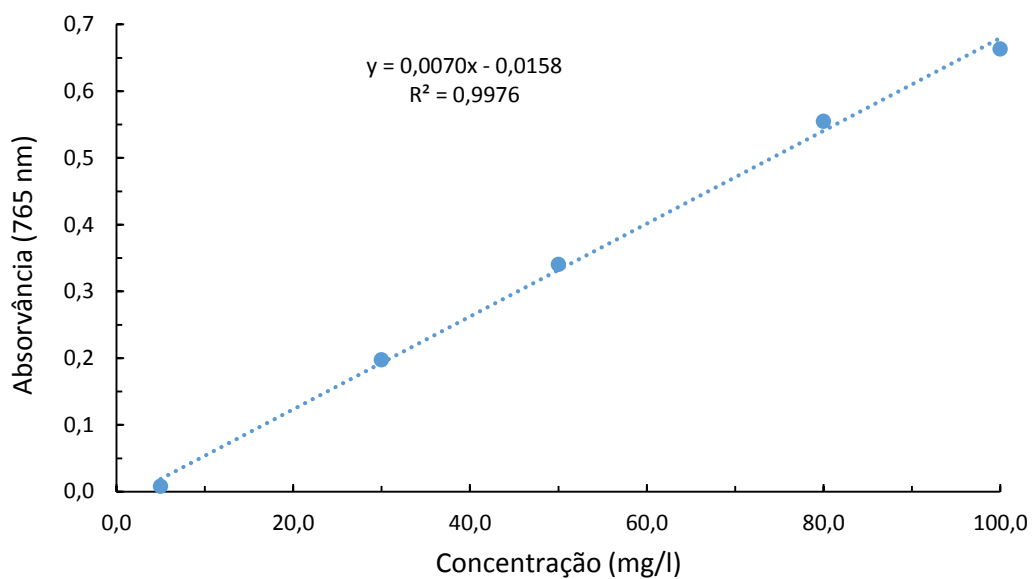


Figura I.3: Reta de calibração do ácido gálico usada na determinação da concentração de polifenóis na PAE 25 e 50, e no primeiro ensaio fotocatalítico da PAE 25.

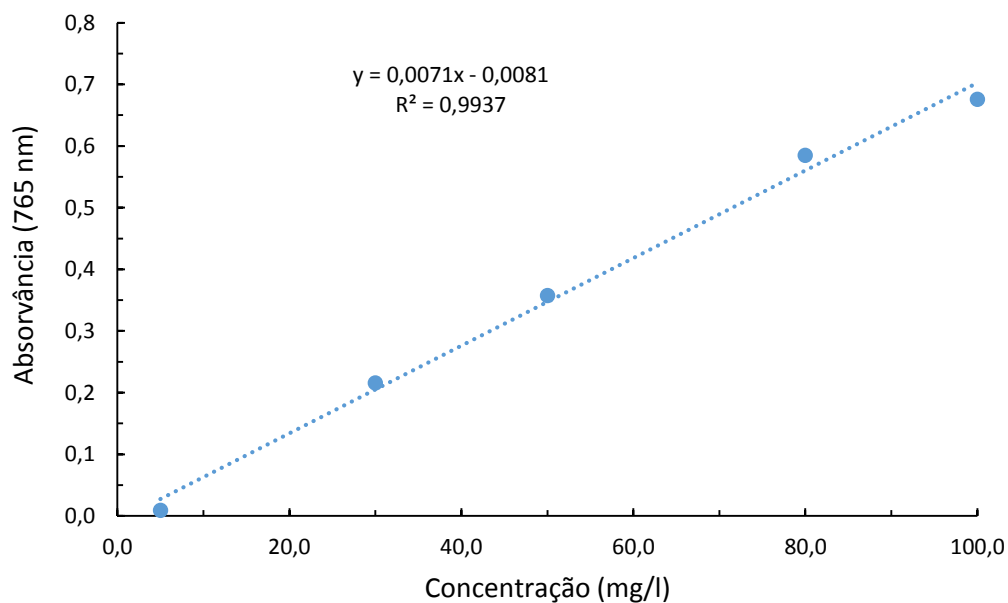


Figura I.4: Reta de calibração do ácido gálico usada na obtenção da concentração de polifenóis no 2º e 3º ensaio fotocatalítico da PAE 25 e no ensaio da PAI.

### b) Reta de calibração para a albumina

Prepararam-se padrões de albumina nas concentrações de 0,1-0,5 mg/l e 1,0, 1,5, 2,0 e 5,0 mg/l, aplicou-se o método como descrito na subsecção 2.3.3 e leram-se os valores de absorvância a 765 nm.

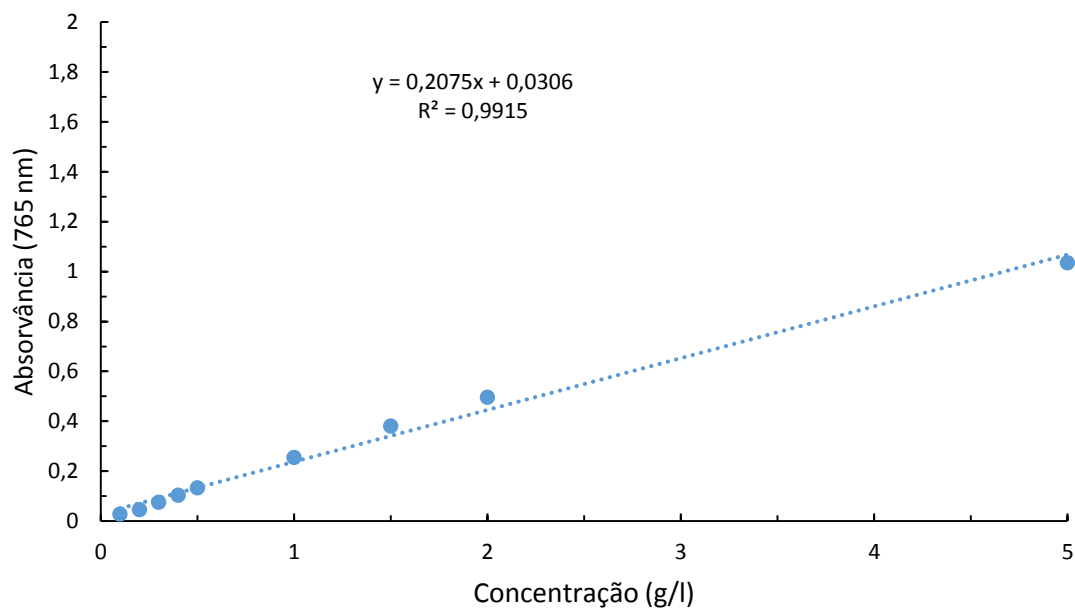


Figura I.5: Reta de calibração da albumina.

## Anexo II – Fórmulas usadas nos cálculos da lenhina, celulose e hemicelulose

### a) Determinação da lenhina total

#### a.1) Determinação da lenhina de Klason (LK)

$$LK = \frac{RIA - C}{A} \times 100 \quad (\text{g}/100 \text{ g})$$

RIA – peso seco do resíduo insolúvel em ácido (g).

C – cinzas (g).

A – peso da amostra seca (g).

### b) Concentração de glucano (Gn)

$$[\text{Gn}] = F_1 \times \frac{162}{180} \times 10^{-1} \times \frac{C_{\text{glucose}} \times V_{\text{final}}}{A} \quad (\text{g}/100 \text{ g})$$

F<sub>1</sub> – fator de correção (1,0400).

C<sub>glucose</sub> – concentração de glucose no filtrado hidrolisado (g/l).

### c) Concentração de xilano (Xn)

$$[\text{Xn}] = F_2 \times \frac{132}{150} \times 10^{-1} \times \frac{C_{\text{xil.}} \times V_{\text{final}}}{A} \quad (\text{g}/100 \text{ g})$$

F<sub>2</sub> – fator de correção (1,0965).

C<sub>xil.</sub> – concentração de xilose no filtrado hidrolisado (g/l).

### d) Concentração de arabinano (An)

$$[\text{An}] = F_3 \times \frac{132}{150} \times 10^{-1} \times \frac{C_{\text{arab.}} \times V_{\text{final}}}{A} \quad (\text{g}/100 \text{ g})$$

F<sub>3</sub> – fator de correção (1,0490).

C<sub>arab.</sub> – concentração de arabinose no filtrado hidrolisado (g/l).