

# **PRÉ-TRATAMENTOS AQUOSOS DO BAGAÇO E CAROÇO DE AZEITONA PARA OBTENÇÃO DE COMPOSTOS DE VALOR ACRESCENTADO**

**Barbara Medeiros Soares**

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em

**Engenharia Alimentar**

Orientadores: Doutora Maria Suzana Leitão Ferreira Dias Vicente

Doutora Isabel Maria Silva Sanches de Miranda

**Júri:**

Presidente: Doutor Vítor Manuel Delgado Alves, Professor Auxiliar do(a) Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Vogais: Doutora Maria Suzana Leitão Ferreira Dias Vicente, Professora Associada com Agregação do(a) Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Doutor Jorge Manuel Barros D Almeida Gominho, Investigador Auxiliar do(a) Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa



**O presente trabalho foi realizado no**

**Centro de Estudos Florestais**

## **Agradecimentos**

Ao apresentar este trabalho, gostaria de prestar os meus agradecimentos a todos os que, direta ou indiretamente, contribuíram para a sua realização, através da sua orientação e/ou apoio e motivação:

- Professoras Doutoras Suzana Ferreira Dias e Isabel Miranda, pela orientação científica, apoio, disponibilidade e esclarecimento de todas as dúvidas
- Joaquina Silva e Rita Simões, pela disponibilidade e auxílio na realização de todas as atividades laboratoriais, tal como, o esclarecimento de todas as dúvidas
- Professor Doutor Jorge Gominho pelo auxílio na fase dos pré-tratamentos aquosos
- Catarina Lopes, Carolina Monteiro, Rita Soares, Miguel Póvoas e Vanessa Sousa pela companhia, ajuda e amizade

**Dedico esta Dissertação à minha família que sempre me apoiou e motivou.**

## Resumo

O bagaço de azeitona extratado (BAE) e o caroço de azeitona (CA) são resíduos abundantes provenientes da indústria do azeite. No entanto, atualmente, estes são unicamente aproveitados como fonte combustível em processos de cogeração para a produção de energia, ou em através da compostagem, obtendo fertilizantes orgânicos. Estes materiais são ricos em moléculas bioativas, tais como açúcares, taninos, polialcoois, pectinas, lípidos e fenóis, cujo potencial ainda não fora explorado, sendo fontes potenciais de compostos de valor acrescentado.

Neste trabalho, o BAE e CA foram avaliados relativamente à sua composição química e propriedades antioxidantes dos extratos polares, tal como submetidos a pré-tratamentos aquosos (hidrólise ácida e auto-hidrólise).

O BAE e CA revelaram teores elevados em lenhinas (32 e 42 %, respetivamente), teores moderados em compostos fenólicos: fenóis totais entre 120,3 e 136,7 e 145,8 e 160,5 mg ácido gálico equivalentes/g extrato, para o BAE e CA, respetivamente; flavonóides entre 44,1 e 102 e 46,4 e 93 mg catequina equivalentes/g extrato, para o BAE e CA, respetivamente. Estes extratos obtiveram baixas atividades antioxidantes, comprovadas por teores elevados de IC<sub>50</sub> de 58,8 e 57,8 µg/mL, para os extratos de BAE e CA, respetivamente.

Relativamente aos pré-tratamentos, o em meio ácido (utilizando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (3,5% (w/w))), foi o que demonstrou maior eficiência, com rendimentos de 50,03 % e 44,67 % para o BAE e CA, respetivamente.

**Palavras-chave:** bagaço de azeitona, caroço de azeitona, composição química, pré-tratamentos aquosos

## Abstract

Extracted olive pomace (EOP) and olive stones (OS) are abundant residues generated by the olive oil industry. However, these materials have been only used as fuel in cogeneration plants to produce energy or as organic fertilizer after a composting process. These raw-materials are rich in bioactive molecules, such as sugars, tannins, polyalcohols, pectins, lipids, and phenols, which have not been used. Thus, they are a low cost and renewable source of high value-added compounds.

In this study, the EOP and OS were analyzed regarding their chemical composition and antioxidant properties of polar extractives, as well as submitted through aqueous pretreatments (dilute acid and autohydrolysis).

EOP and OS showed a high content in lignin (32 and 42 %, respectively), and moderate contents in phenolic compounds: total phenols ranged from 120.3 to 136.7 and 145.8 to 160.5 mg gallic acid equivalents/g extract, for EOP and OS, respectively; flavonoid content ranged from 44.1 to 102 and 46.4 to 93.0 mg catechin equivalents/g extract, for EOP and OS, respectively, and tannins from 13.4 to 27.7 and 19.1 to 28.8 mg catechin equivalents/g extract, for EOP and OS, respectively. These extracts showed low antioxidant properties, which can be proved by an  $IC_{50}$  value of 58.8 and 57.8  $\mu\text{g/mL}$ , for EOP and OS extracts, respectively.

In terms of pre-treatments, the dilute acid (using  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (3,5% (w/w))), was the most efficient, yielding 50.03 % and 44.67 % for EOP and OS, respectively.

**Keywords:** olive pomace, olive stones, chemical composition, aqueous pretreatments

## Lista de Abreviaturas

BAE- Bagaço de azeitona extratado

CA- Caroço de azeitona

DPPH- 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo

EOP- *Extracted olive pomace*

FPU- *Filter paper unit*

FRAP- *Ferric Reduction Antioxidant Power*

GAE- *Gallic Acid Equivalents*

HPLC- *High-performance liquid chromatography*

IC<sub>50</sub>- *Half concentration of inhibition*

OS- *Olive stones*

TAPPI- *Technical Association of the Pulp and Paper Industry*

TEAC- *Trolox-Equivalent Antioxidant Capacity*

UV- Ultravioleta

XOS- Oligossacáridos de xilose (Xilooligossacáridos)

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS</b> .....	<b>1</b>
<b>2. ENQUADRAMENTO TEÓRICO</b> .....	<b>3</b>
2.1. A indústria de extração do azeite .....	3
2.1.1. Processo de extração .....	4
2.1.2. Bagaço de azeitona .....	5
2.2. Composição química .....	7
2.2.1. Celulose.....	7
2.2.2. Hemiceluloses .....	8
2.2.3. Lenhina .....	9
2.2.4. Outros componentes.....	11
2.3. Biorrefinarias .....	14
2.4. Pré-tratamentos.....	15
2.4.1. Hidrólise ácida .....	17
2.4.2. Hidrólise alcalina.....	17
2.4.3. Pré-tratamentos hidrotérmicos (auto-hidrólise) .....	18
2.4.4. A xilose como potencial fonte de valor acrescentado proveniente dos pré-tratamentos aquosos.....	18
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>22</b>
3.1. Matéria prima .....	22
3.2. Métodos utilizados na análise química do BAE e CA.....	22
3.2.1 Preparação da amostra .....	22
3.2.2 Determinação do teor de humidade .....	22
3.2.3. Determinação do teor de cinzas.....	22
3.2.4. Determinação de extrativos pelo método de Soxhlet .....	23
3.2.5. Determinação das lenhinas.....	23
3.2.5.1. Determinação da lenhina de Klason.....	23
3.2.5.2. Determinação da lenhina solúvel .....	24

3.2.5.3. Composição dos açúcares estruturais .....	25
3.2.6. Determinação dos compostos bioactivos .....	25
3.2.6.1. Determinação do teor de fenóis .....	25
3.2.6.2. Determinação do teor de flavonóides totais .....	26
3.2.6.3. Determinação do teor de taninos condensados .....	27
3.2.6.4. Propriedades antioxidantes.....	27
3.2.6.4.1. Determinação da atividade de redução Fe(III) a Fe(II) pelo ensaio FRAP ( <i>Ferric Reduction Antioxidant Power</i> ) .....	27
3.2.6.4.2. Capacidade de sequestro do radical DPPH .....	28
3.3. Pré-tratamentos aquosos .....	29
3.3.1. Pré-tratamentos aquosos - Auto-hidrólise .....	29
3.3.2. Pré-tratamentos aquosos - Hidrólise ácida.....	30
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>32</b>
4.1. Caracterização química do bagaço extractado e caroço de azeitona .....	32
4.2. Caracterização da composição dos extrativos polares .....	35
4.3. Pré-tratamentos aquosos .....	36
<b>5. CONCLUSÕES .....</b>	<b>40</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>41</b>

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Composição química média do bagaço húmido (adaptado de Centre d'Initiatives pour la Production Propre, 2000).....	6
<b>Tabela 2:</b> Composição (em base seca), de alguns materiais lenhocelulósicos agrícolas e de origem industrial.....	10
<b>Tabela 3:</b> Principais vantagens e desvantagens dos pré-tratamentos físicos, químicos e biológicos (Fonte: Kumar, 2018).....	17
<b>Tabela 4:</b> Composição química média (% material inicial) do bagaço e caroço de azeitona.....	32
<b>Tabela 5:</b> Composição média em açúcares dos polissacáridos e ácidos orgânicos (% material inicial) do bagaço e caroço de azeitona.....	33
<b>Tabela 6:</b> Composição dos extractivos polares e propriedades antioxidante do bagaço e caroço de azeitona (teor de fenóis totais, flavonóides, taninos e atividade antioxidante TEAC e FRAP).....	35
<b>Tabela 7:</b> Rendimentos em sólidos obtidos com pré-tratamentos aquosos (hidrólise ácida e auto-hidrólise) do bagaço e caroço de azeitona.....	37
<b>Tabela 8:</b> Composição química dos resíduos sólidos resultantes após os pré-tratamentos (% em relação aos resíduos sólidos).....	37
<b>Tabela 9:</b> Percentagem dos açúcares hidrolisados na fase líquida em relação aos açúcares do material inicial.....	38

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Diagrama representativo da valorização do bagaço de azeitona, inserido no projeto com o CSIR .....	2
<b>Figura 2:</b> Categorias de azeite e óleo de bagaço de azeitona aptos para consumo final ..	4
<b>Figura 3:</b> Diagrama de extração do azeite (Sistemas Contínuos de duas e três fases) (adaptado de (Ferreira-Dias, 2017) .....	5
<b>Figura 4:</b> Estrutura da celulose .....	8
<b>Figura 5:</b> Exemplo da fórmula estrutural de uma hemicelulose.....	9
<b>Figura 6:</b> Estrutura molecular da lenhina de madeira de uma resinosa .....	10
<b>Figura 7:</b> Estrutura química da Quercetina (um flavonóide).....	12
<b>Figura 8:</b> Estrutura dos principais flavonoides. A sua diferença assenta principalmente no grupo –OH e no grau de saturação (ligações duplas) que apresenta o anel C .....	13
<b>Figura 9:</b> Estrutura química de um tanino condensado.....	13
<b>Figura 10:</b> Conceito de biorrefinaria (adaptado de Carvalheiro <i>et al</i> , 2008).....	14
<b>Figura 11:</b> Representação do processo de pré-tratamento do material lenhocelulósico (adaptado de (Afonso, 2012) .....	16
<b>Figura 12:</b> Estrutura molecular da xilose .....	19
<b>Figura 13:</b> Estrutura molecular do xilitol .....	19
<b>Figura 14:</b> Estrutura esquemática da xilose e dos xilooligossacáridos (adaptado de (Brienzo, 2016).....	20

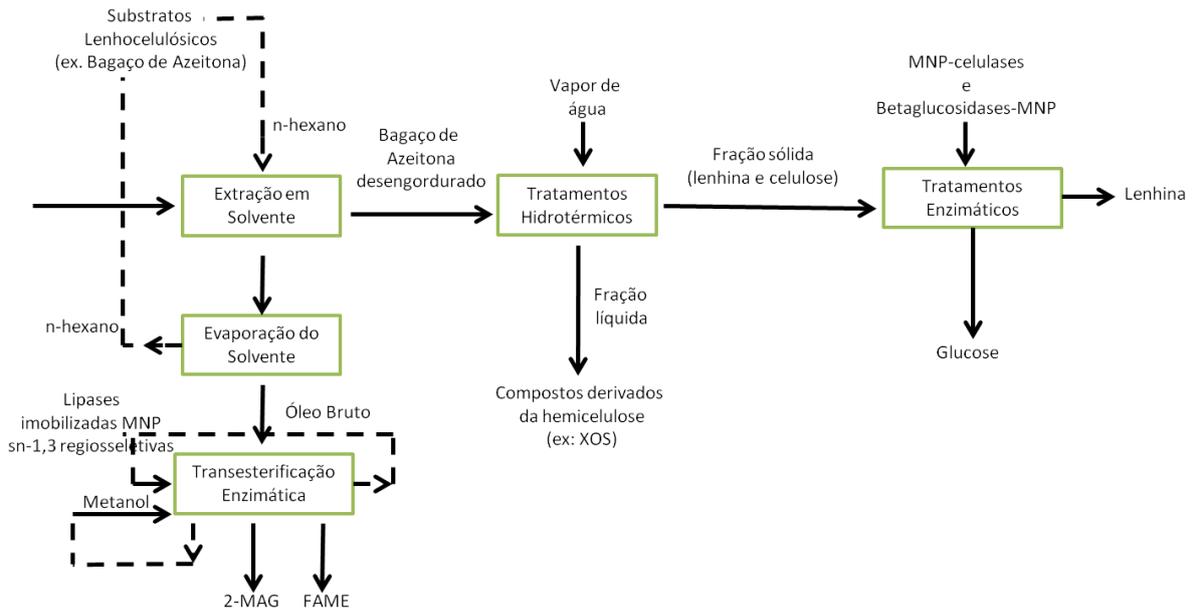


## 1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

O conceito de economia linear tradicional, no qual os recursos seguem o trajeto de produção, disposição final e utilização, sem reaproveitamento, é um modelo insustentável. A economia circular é um modelo alternativo ao tradicional, cíclico, visando a redução dos impactos ambientais, estimulando também novas oportunidades de negócio. Este novo modelo incentiva a reutilização de materiais, componentes e produtos, bem como, o aproveitamento da energia solar, eólica e proveniente da biomassa e resíduos, ao longo da cadeia de valor de um produto (Korhonen *et al*, 2016).

As agroindústrias portuguesas contemplam vários setores, sendo que mais de metade (52,9 %) das instalações (em número) correspondem a lagares. O processamento de matérias primas de origem vegetal tende a originar elevadas quantidades de resíduos, podendo constituir um sério problema, não só ambiental, mas também de sub-aproveitamento e valorização. Cada vez mais tem-se vindo a observar uma tendência crescente para a valorização e transformação dos resíduos em sub-produtos de valor acrescentado (Duarte *et al*, 2007; Baeta, 2014). Os materiais lenhocelulósicos são a maior fonte de biomassa inutilizada, sendo uma considerável parte composta por sub-produtos das atividades agrícola e florestal (Niga, 2010).

Esta Dissertação insere-se num projeto bilateral com o CSIR- *National Institute for Interdisciplinary Science and Technology* (NIIST), Trivandrum, Índia- intitulado “Desenvolvimento de catalisadores enzimáticos imobilizados em nanopartículas magnéticas para aplicações em biocombustíveis”. A valorização do bagaço de azeitona está inserida no âmbito deste projeto, numa perspetiva de biorrefinaria de acordo com a figura 1. O bagaço de azeitona será extratado com solvente orgânico (hexano) para obtenção de óleo de bagaço de azeitona bruto. Este será posteriormente convertido em biodiesel (FAME) e 2-MAG (emulsionantes alimentares), através da transesterificação catalisada por lipases sn-1,3 regio-seletivas. O bagaço desengordurado será submetido a tratamento aquoso de modo a obter uma fração de compostos derivados da hemicelulose (açúcares, nomeadamente pentoses, com atividade prebiótica), e uma fração sólida rica em lenhina e celulose, após tratamentos enzimáticos com celulases e betaglucosidasas, obtendo-se glucose e lenhina. A glucose será matéria-prima para produção de bioetanol.



**Figura 1:** Diagrama representativo da valorização do bagaço de azeitona, inserido no projeto com o CSIR

## 2. ENQUADRAMENTO TEÓRICO

### 2.1. A indústria de extração do azeite

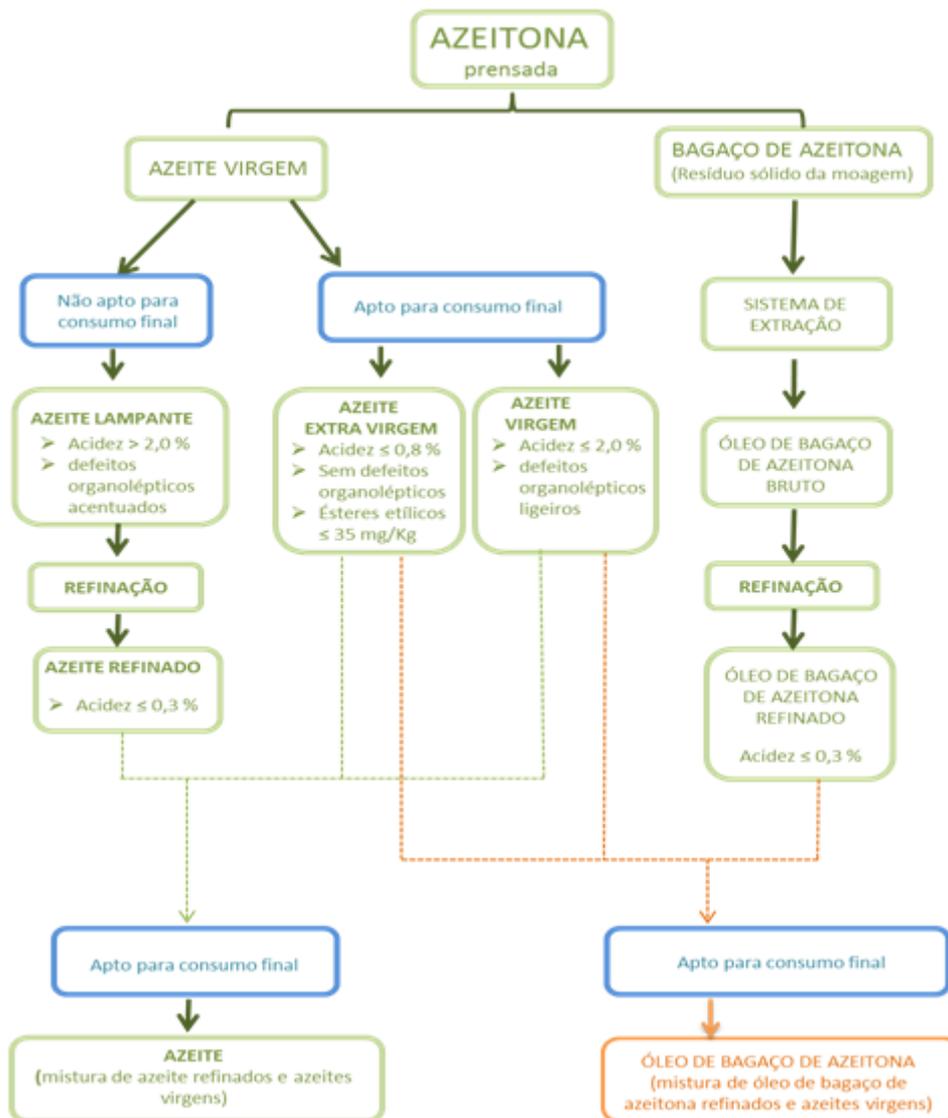
No ano agrícola de 2016/2017, a produção de azeite ultrapassou os 1,47 milhões de hectolitros com 462 lagares em laboração, correspondendo à campanha mais produtiva desde 1915 (ano a partir do qual existem registos), correspondente uma área de olival de 349703 ha. A região do Alentejo apresentou a maior produção, cerca de 74 % da de Portugal Continental. Foi também registado um domínio da produção de azeite com acidez máxima de 0,8 ° (limite para o azeite virgem extra), correspondendo a cerca de 96% da produção de Portugal Continental (INE, 2018).

De acordo com o Regulamento (CE) nº 1308/2013, definem-se como azeites virgens, “azeites obtidos a partir do fruto da oliveira unicamente por processos mecânicos ou outros processos físicos, em condições que não alterem o azeite, e que não tenham sofrido outros tratamentos além da lavagem, decantação, centrifugação e filtração, com exclusão dos azeites obtidos com solventes, com adjuvantes de acção química ou bioquímica ou por processos de reesterificação, bem como de qualquer mistura com óleos de outra natureza”.

Os azeites virgens podem ser classificados como virgem extra, virgem, e azeite lampante, sendo que:

- Azeite virgem extra- “azeite virgem com uma acidez livre, expressa em ácido oleico, não superior a 0,8 g por 100 g, estando as outras características conformes com as previstas para esta categoria”.
- Azeite virgem- “azeite virgem com uma acidez livre, expressa em ácido oleico, não superior a 2 g por 100 g, estando as outras características conformes com as previstas para esta categoria”.
- Azeite lampante- “azeite virgem com uma acidez livre, expressa em ácido oleico, superior a 2 g por 100 g e/ou estando as outras características conformes com as previstas para esta categoria”.

O azeite lampante só poderá ser comercializado após submetido a operações de refinação, que tem como objetivo eliminar as características indesejadas (elevada acidez, cheiros e sabores anómalos). Este azeite refinado, pode, então ser lotado com azeites virgem ou virgem extra, resultando o comercialmente designado, *Azeite*. A figura 2 representa esquematicamente as várias categorias de azeite e óleo de bagaço de azeitona aptos ao consumo final (DL 76/2010).



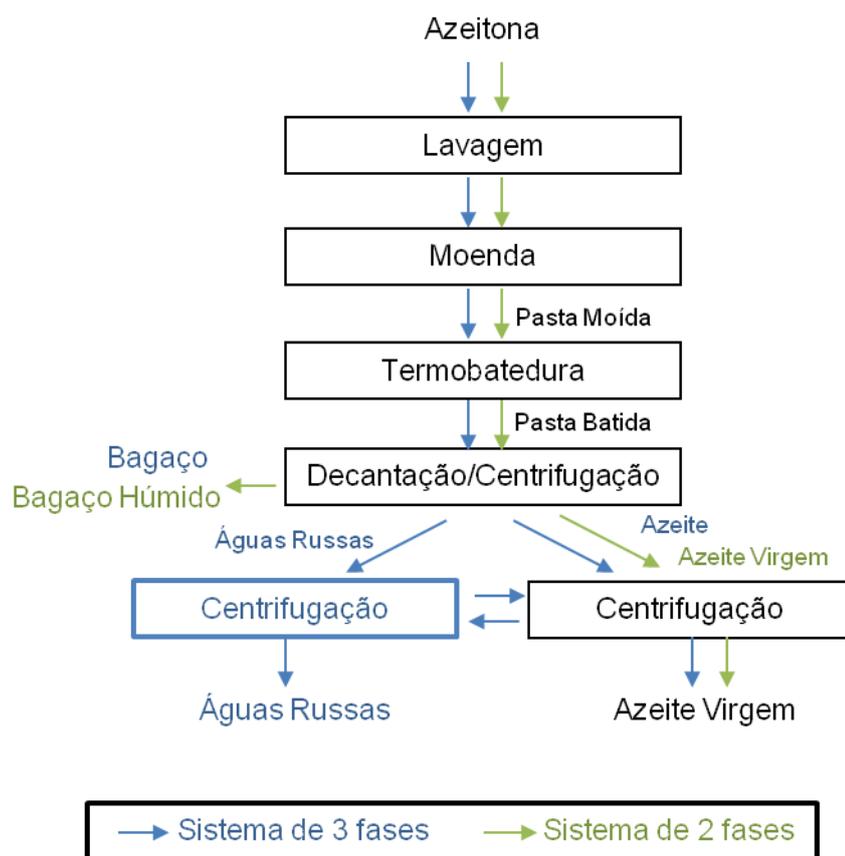
**Figura 2:** Categorias de azeite e óleo de bagaço de azeitona aptos para consumo final (ASAE, 2017)

### 2.1.1. Processo de extração

A extração do azeite pode ser efetuada através do sistema clássico ou contínuo. Tem-se observado, nos últimos anos, investimentos nos lagares para a substituição dos sistemas clássicos em contínuos, primariamente, em três fases seguindo-se, mais recentemente, em duas fases. A figura 3 representa um diagrama de produção de azeite em sistema contínuo.

A transição dos sistemas de extração através da substituição das tradicionais prensas por sistemas contínuos de extração por centrifugação, com maior capacidade do que os sistemas clássicos, conduz à diminuição do tempo de espera da azeitona até laboração e do

tempo de extração, o que contribui para o aumento da qualidade do azeite obtido. Também se observa uma redução substancial do impacto ambiental provocada pelos efluentes dos lagares, uma vez que os sistemas contínuos de duas fases não produzem águas russas, e o único efluente produzido é resultado das lavagens da azeitona e dos equipamentos (GPP, 2007). Como se pode, também, observar pela figura 3, o bagaço de azeitona é o sub-produto obtido no processo de extração do azeite.



**Figura 3:** Diagrama de extração do azeite (Sistemas Contínuos de duas e três fases) (adaptado de (Ferreira-Dias, 2017))

### 2.1.2. Bagaço de azeitona

O bagaço de azeitona é um sub-produto da indústria produtora de azeite, constituído por água, óleo, polpa, películas e caroços das azeitonas. Este é originado nos processos de prensagem, no sistema clássico ou de decantação/centrifugação nos sistemas contínuos.

Com a evolução tecnológica, e respetiva substituição dos sistemas clássicos e contínuos de 3 fases, por sistemas contínuos de duas fases em que o bagaço e as águas russas

constituem uma única fase, tem-se observado a crescente produção de bagaços húmidos (GPP, 2007). A composição química média deste bagaço está representada na tabela 1.

**Tabela 1:** Composição química média do bagaço húmido (adaptado de Centre d'Initiatives pour la Production Propre, 2000).

<b>Composição Química</b>	
Humidade (%)	65
Gordura (%)	3-4
Proteína (%)	56
Açúcares (%)	13-14
Fibra Bruta (%)	14-15
Cinzas (%)	2-3
Ácidos Orgânicos (%)	0,5-1,0
Polialcoois (%)	0,5-1,0
Glucósidos e Polifenóis (%)	0,5
Densidade Aparente (kg/m <sup>3</sup> )	1035

Nos lagares com sistemas de extração clássicos ou contínuos de três fases o bagaço representa uma fonte de rendimento extra, sendo adquirido por fábricas de extração de óleo de bagaço, enquanto que o bagaço húmido dos sistemas de duas fases possui menor valor comercial, uma vez que o seu teor acrescido em humidade e viscosidade dificultam o transporte, armazenagem e secagem. Na região do Alentejo, em 2001, entrou em funcionamento uma grande unidade de secagem (UCASUL –União de Cooperativas do Sul, CRL), que processa os bagaços húmidos produzidos nesta região, uma das maiores em sistemas contínuos de duas fases em Portugal. Após reduzida a sua humidade, são canalizados para extracção de óleo de bagaço através de solvente, onde são obtidos os óleos de bagaço bruto e o bagaço extratado. Este último é valorizado como fonte de energia (queima em caldeiras). O óleo de bagaço bruto após refinação é comercializado como óleo alimentar de bagaço de azeitona (GPP, 2007).

Em Portugal observa-se uma produção de cerca de 370000 t/ano de bagaço de azeitona, que é relativamente rico em material lenhocelulósico (celulose, hemiceluloses e lenhina), constituindo cerca de 40 % da sua massa (Ferreira-Dias *et al*, 2017).

O material lenhocelulósico contém um número elevado de moléculas com interesse económico. A utilização desta biomassa em biorrefinarias é economicamente vantajoso, uma vez que é possível extrair compostos, tais como, derivados da hemicelulose (XOS- oligossacáridos de xilose- que possuem atividade prebiótica), através de tratamentos térmicos, ou glucose através da hidrólise da celulose pelas vias química ou enzimática, utilizado posteriormente para, por exemplo, a produção de bioetanol (Manrich, 2012; Ogata, 2013).

## **2.2. Composição química**

O bagaço de azeitona e o caroço de azeitona são constituídos quimicamente por dois tipos de componentes: estruturais e não estruturais. Os componentes estruturais são macromoléculas de natureza polimérica, insolúveis; fazem parte da parede das células, conferindo-lhes forma e grande parte das suas propriedades físicas e químicas. Os elementos estruturais do bagaço de azeitona e o caroço de azeitona são os polissacáridos (celulose e hemiceluloses) e a lenhina (Limayem & Ricke, 2012).

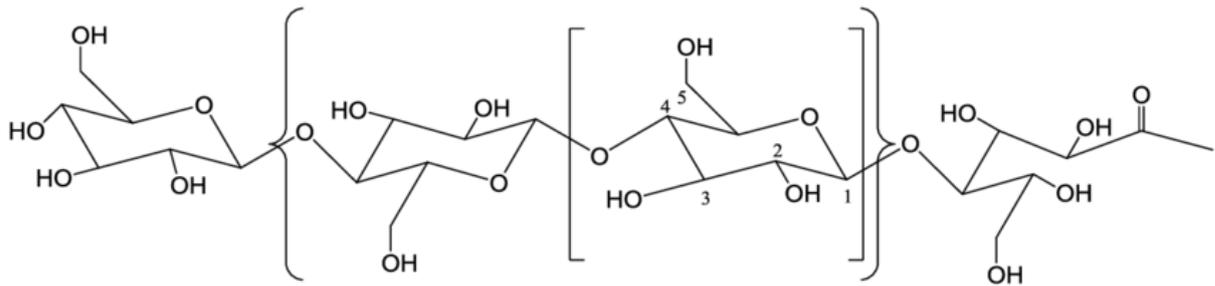
Os componentes não estruturais são geralmente compostos de baixa massa molecular, podendo ser removidos por processos de solubilização através de extração com solventes e que se designam extractivos. São compostos orgânicos que incluem uma grande variedade de famílias e compostos químicos, por exemplo: n-alcanos, n-alcanóis, ceras, triterpenos, ácidos gordos, glicéridos, esterós, fenóis e polifenóis. Existem também compostos inorgânicos, que são determinados como o resíduo da combustão e, portanto, designados cinzas (Limayem & Ricke, 2012).

### **Componentes estruturais**

#### **2.2.1. Celulose**

A celulose é um homopolímero de cadeia linear longa, constituído por monómeros de  $\beta$ -D-glucose ligados entre si por ligações glicosídicas do tipo  $\beta(1-4)$  (Figura 4). A linearidade do polímero permite o estabelecimento de ligações intra e inter-moleculares num mesmo plano (ligações de hidrogénio) e entre planos diferentes (forças de Van der Waals) com uma organização de forma ordenada, num arranjo cristalino, o que torna a celulose muito resistente mecanicamente e difícil de atacar quimicamente (Fan *et al*, 2016, Kirk e Farrell, 1987).

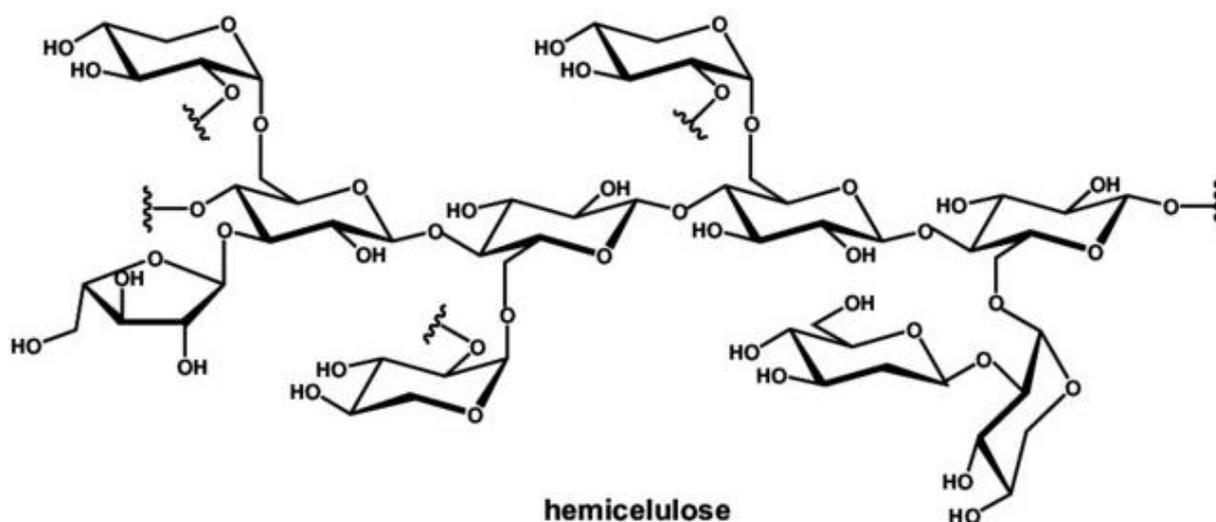
Devido à sua abundância, a celulose possui grande potencial como alternativa à utilização de recursos fósseis para produção de produtos químicos e combustíveis, tal como a obtenção de bioetanol (Onda *et al*, 2009).



**Figura 4:** Estrutura da celulose

### 2.2.2. Hemiceluloses

As hemiceluloses são heteropolímeros constituídos a partir de várias hexoses (manose, glucose e galactose), pentoses (xilose e arabinose) incluindo também ácidos urônicos e apresentando substituições com grupos acetilo. Em termos de estrutura molecular, as hemiceluloses apresentam uma cadeia central linear mas são sempre mais ou menos ramificadas com açúcares ligados lateralmente à cadeia principal. As hemiceluloses possuem um grande número de grupos hidroxilo e acetilo na sua periferia, através dos quais podem estabelecer ligações inter-moleculares com os polímeros vizinhos (Figura 5) (Huang *et al*; 2010 Fan *et al*, 2016).



**Figura 5:** Exemplo da fórmula estrutural de uma hemicelulose

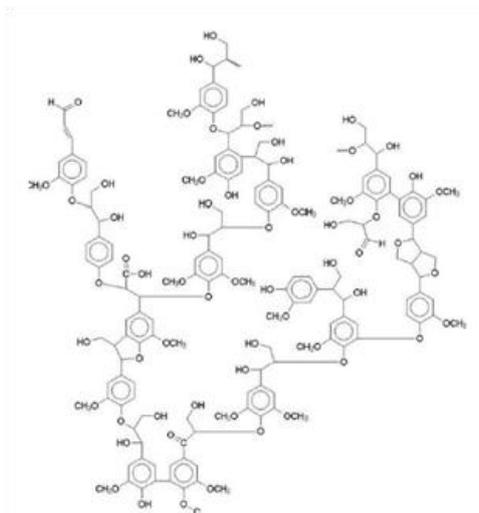
As hemiceluloses podem ser classificadas em vários grupos, tais como: xiloglucanas, heteroxilanas, galactomananas, glucomananas e arabinogalactanas, diferenciando-se pela constituição da sua estrutura de base, por exemplo, nas xiloglucanas predominam a xilose e glucose, na sua cadeia principal. Para a maioria dos materiais lenhocelulósicos, as formas dominantes são as xiloglucanas e as heteroxilanas (Qing *et al*, 2013).

As hemiceluloses são solúveis em ácidos e em soluções alcalinas sendo hidrolizadas nos seus açúcares constituintes sendo possível obter soluções com hexoses (glucose, galactose e manose), pentoses (xilose e arabinose) e quantidades reduzidas de outros açúcares como ácidos urónicos e ácido acético (Pereira *et al*, 2003).

### 2.2.3. Lenhina

A lenhina é uma macromolécula formada pela polimerização de monómeros de tipo fenilpropano: os álcoois coniferílico, sinapílico e *p*-cumarílico, que diferem entre si apenas no grau de substituição dos carbonos 3 e 5 por grupos metoxilo. Os monómeros da lenhina são mencionados muitas vezes apenas pela parte fenólica que os distingue: hidroxifenilo (H) (sem metoxilos), guaiacilo (G) (um substituinte metoxilo) e siringilo (S) (dois grupos metoxilo). Os monómeros encontram-se ligados entre si por dois tipos de ligações: ligações éter através do oxigénio do grupo hidroxilo do anel fenólico e ligações carbono-carbono (C-

C) ditas de condensação. A maior parte as ligações encontradas nas lenhinas são do tipo éter, nomeadamente a  $\beta$ -O-4 e a  $\alpha$ -O-4, que normalmente representam 50-65% de todas as ligações (Pereira *et al.* 2003). As proporções dos monómeros participantes na construção das moléculas de lenhina dependem do material vegetal: por exemplo as lenhinas das folhosas são constituídas por monómeros do tipo G e S, em proporções variáveis, enquanto as lenhinas nas resinosas são constituídas maioritariamente por monómeros do tipo G (Fengel & Wegener, 1983; Huang *et al.*, 2010). A Figura 6 representa a estrutura química de uma lenhina.



**Figura 6:** Estrutura molecular da lenhina de madeira de uma resinosa

A Tabela 2 apresenta a composição química de alguns materiais lenhocelulósicos de origem agrícola e industrial.

**Tabela 2:** Composição (em base seca), de alguns materiais lenhocelulósicos agrícolas e de origem industrial

Material	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lenhina (%)	Fonte
Palha de sorgo	43,3	23,8	21,7	(Kim e Day, 2011)
Palha de milho	42,1	29,2	17,5	(Moniz <i>et al.</i> , 2013)
Bagaço de cana-de-açúcar	35-42,8	26,2-35,8	16,1-25,2	(Geddes <i>et al.</i> , 2011; Imman <i>et al.</i> , 2013)
Cana de bambu	38,8	24,9	23,9	(González <i>et al.</i> , 2011)
Casca de arroz	36,7-37,7	16,7-17,3	21,3-22,1	(Vila <i>et al.</i> , 2002; Mancilha e Karim, 2003)
<b>Bagaço de azeitona</b>	<b>36,4</b>	<b>26,8</b>	<b>26</b>	<b>(Brás <i>et al.</i>, 2014)</b>
Palha de trigo	31,5	25,2	15,9	(Nabarlatz <i>et al.</i> , 2007)
Dreche cervejeira	9-18	19-31	16-25	(Beldman <i>et al.</i> , 1987; Prentice e D'Appolonia, 1977)

#### **2.2.4. Outros componentes**

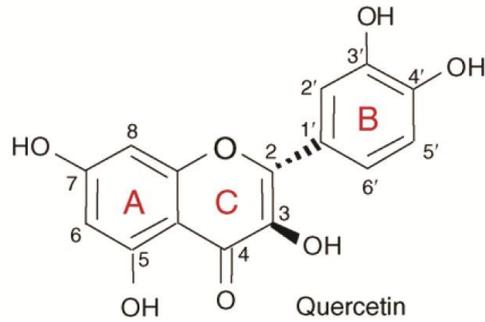
As plantas têm a importante capacidade de sintetizar uma grande diversidade de compostos de baixo peso molecular, denominados metabolitos secundários, os quais podem ou não, desempenhar um papel determinante no metabolismo vegetal. Os metabolitos secundários são compostos produzidos por algumas espécies e a sua concentração difere de planta para planta, ao contrário dos metabolitos primários como os glúcidos, as proteínas, clorofilas são encontrados em todas as plantas e desempenham funções metabólicas essenciais. Os metabolitos secundários podem ser divididos em três grupos distintos: terpenóides, fenóis e alcalóides. Estudos demonstram que, muitos destes compostos possuem atividades biológicas interessantes, tais como, atividade antioxidante, anti-inflamatória, anticancerígena, antibacterianas e antivirais (Gracelin *et al.* 2013)

#### **Compostos Fenólicos**

Os compostos fenólicos são substâncias que contêm pelo menos um grupo hidroxilo ligado a um anel benzênico (fenol).

Este grupo de compostos é caracterizado estruturalmente pela presença de dois anéis aromáticos (A, B) ligados a um anel heterocíclico (C) (Figura 7) e que podem conter outros substituintes na sua estrutura tais como açúcares ou ácidos orgânicos .

Os compostos fenólicos nas plantas podem ser divididos em diversas classes de acordo com a sua estrutura química. Entre estas classes podem-se encontrar compostos simples com apenas um anel benzênico polihidroxilado tais como os ácidos benzóicos e compostos com estruturas mais complexas tais como os flavonóides e compostos altamente polimerizados (por exemplo os taninos) (Silva *et al.*, 2007). As propriedades antioxidantes destes compostos consistem em retardar a oxidação de vários compostos "importantes para a vida", inibindo a iniciação ou a propagação de reações em cadeia (Amarowicz *et al.*, 2004). A sua presença contribui, ainda, para as características sensoriais dos alimentos, como a cor, o sabor e o aroma.



**Figura 7:** Estrutura química da Quercetina (um flavonóide)

Deste grande grupo de compostos, os flavonoides e os taninos foram estudados em particular.

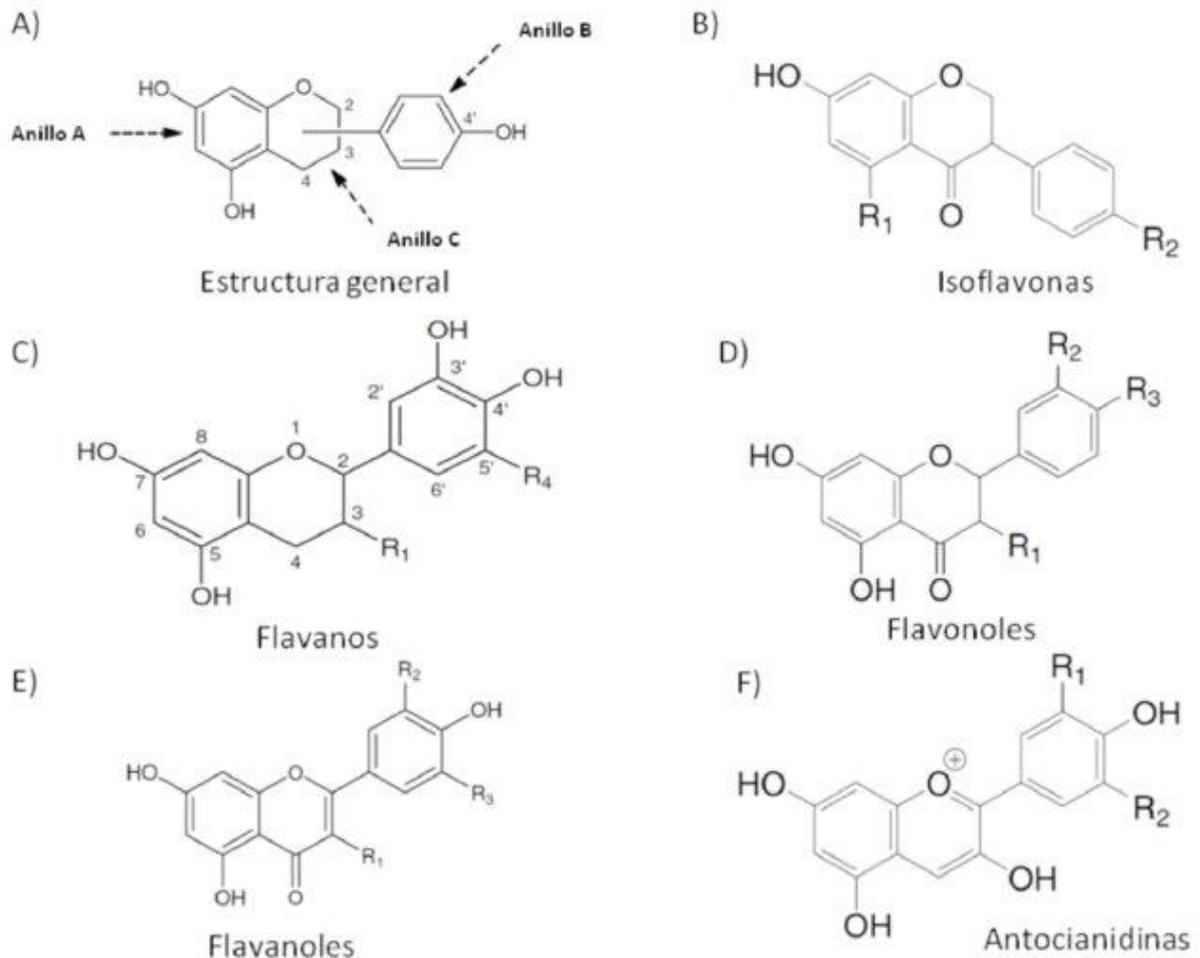
### **Flavonóides**

São os responsáveis pelas cores de plantas e frutos, Os flavonoides são constituídos por um número alargado de famílias de compostos como os flavonóis, flavonas, flavanóis, flavanonas, antocianidinas e isoflavonoides (Figura 8) (Ratnam *et al.*, 2006).

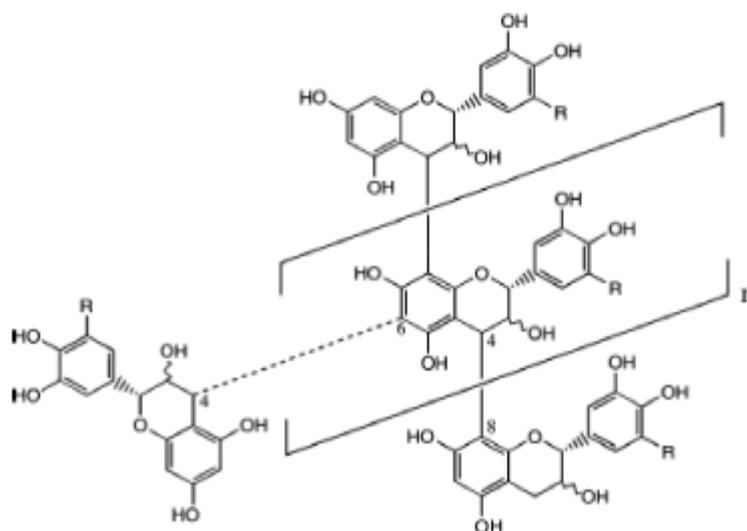
### **Taninos**

os taninos são os compostos fenólicos com maior massa molecular De acordo com a sua estrutura química, distinguem-se dois grandes grupos de taninos: os hidrolisáveis e os condensados (Okuda, 2005).

Os taninos condensados são polímeros formados pela condensação de duas ou mais unidades de flavanóis (Figura 9).



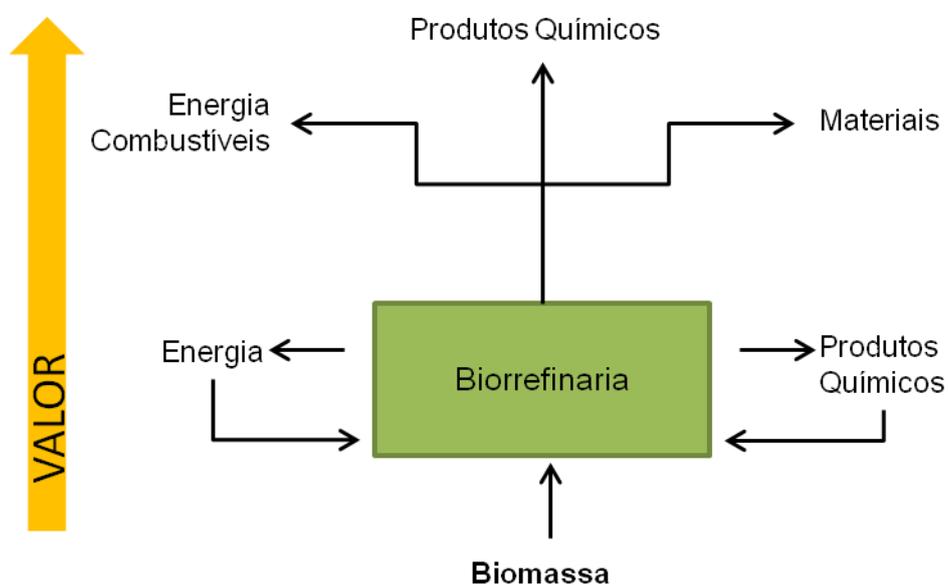
**Figura 8:** Estrutura dos principais flavonoides. A sua diferença assenta principalmente no grupo –OH e no grau de saturação (ligações duplas) que apresenta o anel C



**Figura 9:** Estrutura química de um tanino condensado

### 2.3. Biorrefinarias

A biorrefinaria corresponde a uma unidade de processamento integrada e diversificada, onde as biomassas são convertidas em produtos preferencialmente com valor acrescentado, possuindo um conceito muito semelhante a uma refinaria de petróleo (Carvalho *et al*, 2008). Nos países mediterrâneos, tal como Portugal, as unidades de extração de óleo de bagaço são exemplos de proto-biorrefinarias, uma vez que transformam o óleo residual do bagaço em óleo alimentar, e os resíduos sólidos restantes são utilizados como fonte de alimentação animal e fonte energética para combustão (Carvalho *et al*, 2008).



**Figura 10:** Conceito de biorrefinaria (adaptado de Carvalho *et al*, 2008)

As biorrefinarias podem ser distinguidas de acordo com os materiais processados, processos tecnológicos e produtos finais, podendo estar envolvidas diversas metodologias tecnológicas (separação, conversões termoquímicas, químicas ou bioquímicas, por exemplo), com o objetivo de tirar o maior partido da biomassa a processar (Kamm *et al*, 2006; Carvalho *et al*, 2008).

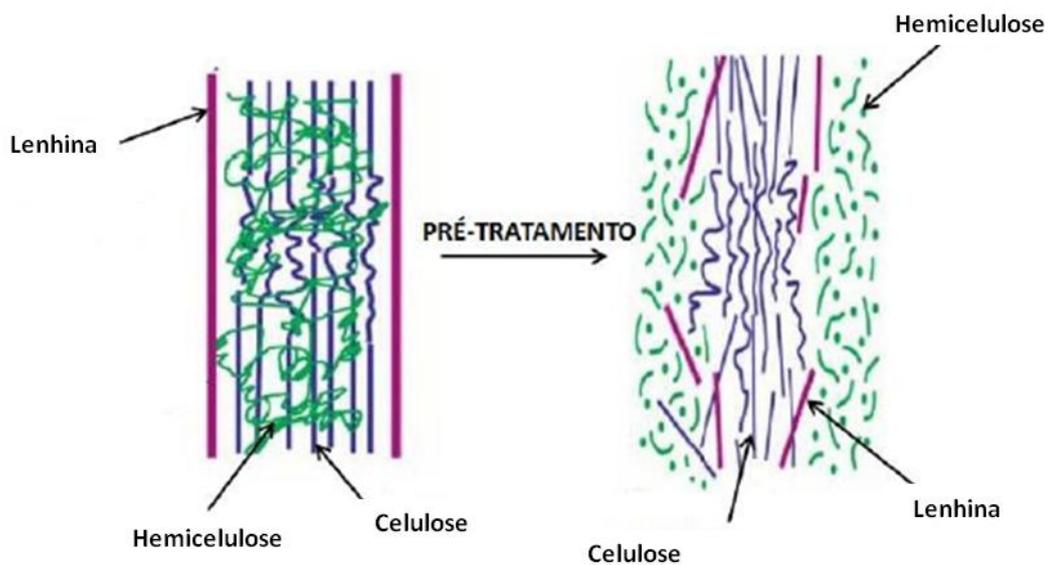
As tecnologias de aproveitamento da biomassa atualmente estão divididas em duas categorias: as termoquímicas, tais como a gaseificação e pirólise (plataforma termoquímica), e as bioquímicas como a hidrólise nas quais a quebra da estrutura do material é feita química ou enzimaticamente (plataforma bioquímica) (Carvalho *et al*, 2008).

## 2.4. Pré-tratamentos

Na valorização e aproveitamento dos materiais lenhocelulósicos é fundamental efetuar o seu fracionamento, através de processos habitualmente conhecidos como métodos de pré-tratamento. O fracionamento é considerado como um pré-requisito para a conversão dessa mesma biomassa em produtos de valor acrescentado e tem como objetivo a separação dos diferentes componentes (desconstrução da biomassa) de modo a que cada um possa ser directamente utilizado ou convertido.

O fracionamento da biomassa lenhocelulósica pode ser definido como um conjunto de processos físicos, químicos e biológicos, efetuados de modo a obter uma separação seletiva dos diferentes componentes que a constituem, ou seja, conseguir uma separação eficiente das hemiceluloses, da celulose e da lenhina, evitando a formação de subprodutos indesejáveis (como ácidos alifáticos e furanos (resultantes da degradação de açúcares) e de compostos fenólicos), minimizando os gastos energéticos e o recurso a produtos químicos (Kumar, 2018).

O objectivo do fracionamento (denominado pré-tratamento) consiste na hidrólise seletiva das hemiceluloses. Ocorre a desconstrução da matriz lenho-celulósica através da ruptura e remoção das hemiceluloses, o que leva a um aumento da área efetiva superficial, da porosidade da biomassa pré-tratada e diminuição do grau de cristalinidade da celulose (Carvalho *et al*, 2008), permite assim uma maior exposição aos reagentes para o fracionamento dos restantes componentes, principalmente da celulose e lenhina. A Figura 11 pretende demonstrar graficamente a rutura do complexo lenhocelulósico.



**Figura 11:** Representação do processo de pré-tratamento do material lenhocelulósico (adaptado de (Afonso, 2012))

Os pré-tratamentos podem ser classificados como físicos, químicos ou biológicos. São exemplos de pré-tratamentos físicos, a moagem ou a homogeneização a elevadas pressões. Estes caracterizam-se por tempos curtos de reação e não são muito eficientes como pré-tratamento único. Os pré-tratamentos alcalinos ou ácidos são exemplos de tratamentos químicos. Estes possuem eficiências elevadas, porém, poderão originar compostos inibidores dos processos de sacarificação enzimática, e no caso da utilização de ácidos ou bases fortes (por exemplo,  $H_2SO_4$ , ou  $NaOH$ , respetivamente), originam-se efluentes com risco ambiental. Os pré-tratamentos de origem biológica requerem elevados tempos de reação, com flutuações nas eficiências das hidrólises. Os pré-tratamentos com menor risco ambiental são, a moagem de disco húmido, liquefação hidrotérmica e os pré-tratamentos hidrotérmicos (Fan *et al*, 2016). A Tabela 3 representa as vantagens e desvantagens para cada pré-tratamento (físico, químico e biológico), de uma forma sintética.

**Tabela 3:** Principais vantagens e desvantagens dos pré-tratamentos físicos, químicos e biológicos (Fonte: Kumar, 2018)

Pré-tratamento	Vantagens	Desvantagens
Físico	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aumento da área superficial e diminuição do grau de cristalização da celulose</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Destruição parcial (incompleta) da matriz lenhina-glúcido</li> <li>• Gastos energéticos elevados</li> </ul>
Químico	<ul style="list-style-type: none"> <li>• O tratamento alcalino reduz o teor de lenhina e hemiceluloses a um baixo custo</li> <li>• O tratamento ácido reduz o teor de hemiceluloses a um baixo custo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Poluição</li> <li>• Formação de compostos inibidores</li> <li>• Problemas na recuperação dos reagentes químicos e custo associado</li> </ul>
Biológico	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Baixo <i>input</i> energético</li> <li>• Condições da reação moderadas</li> <li>• Sem adição de reagentes químicos</li> <li>• Não gera compostos tóxicos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Velocidades das hidrólises baixas</li> <li>• Necessidade de um meio esterilizado</li> </ul>

#### 2.4.1. Hidrólise ácida

A hidrólise ácida pode ser caracterizada através de duas abordagens: utilização de ácidos concentrados a temperaturas baixas, ou, utilização de ácidos diluídos a temperaturas elevadas (Carvalho *et al*, 2008), destacando-se a segunda.

A diluição de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,5-1,5%) é a mais utilizada industrialmente, uma vez que é possível obter rendimentos relativamente elevados em açúcares provenientes da hidrólise e solubilização das hemiceluloses. Ao contrário das hidrólises utilizando ácidos concentrados, a sua diluição origina menos compostos de degradação e não é tão corrosiva. A sua eficácia depende da concentração em ácido e temperatura da reação. Quanto maior for a temperatura e/ou concentração em ácido, maior será a formação de produtos de degradação, tais como o furfural (maioritário, derivado da hidrólise das pentoses), 5-hidroximetilfurfural (derivado da hidrólise das hexoses), que levam à libertação do ácido fórmico, para além destes, também são formados ácidos fenólicos, ácidos alifáticos (tal como o levulínico- derivado da lenhina), e aldeídos, com propriedades inibitórias da atividade enzimática e fermentação (Carvalho *et al*, 2008).

#### 2.4.2. Hidrólise alcalina

O pré-tratamento alcalino é o segundo mais utilizado industrialmente. Nestes, os reagentes mais utilizados são os hidróxidos de sódio, cálcio e amónio. Este pré-tratamento irá remover os compostos amorfos (lenhina e hemiceluloses) do material lenhocelulósico, expondo a celulose e o conseqüente aumento da eficiência da sua hidrólise. A eficiência

desta hidrólise está dependente das suas condições, tais como a temperatura (até 150-200 °C) e duração (entre 30 min a semanas).

### **2.4.3. Pré-tratamentos hidrotérmicos (auto-hidrólise)**

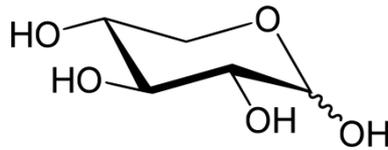
Os pré-tratamentos hidrotérmicos, também denominados como auto-hidrólises, são uma alternativa com baixo risco ambiental, uma vez que o meio de pré-tratamento consiste somente em água, ou vapor de água (Carvalho *et al*, 2008).

O processo hidrotérmico (autohidrólise ou água líquida quente), é considerado um dos métodos mais promissores de pré-tratamento dos materiais lenhocelulósicos no conceito de biorrefinarias. Trata-se de um processo amigo do ambiente, que consiste na utilização de água a alta temperatura, provocando o aumento da sua força iónica. Este método leva a uma despolimerização da hemicelulose, que é catalisada pelos iões hidrogénio gerados *in situ* pela autoionização da água e pelo ácido acético formado na reacção da mesma hemicelulose. Deste processo resulta uma fase líquida, contendo principalmente hemicelulose, e uma fase sólida contendo celulose e lenhina (Carvalho *et al*, 2008, Qing *et al*, 2013).

Os processos de auto-hidrólise e hidrólise ácida possuem mecanismos semelhantes de reacção, uma vez que ambos se tratam de hidrólises catalisadas por iões de hidrogénio ( $H_3O^+$ ). A escolha entre os dois métodos de pré-tratamento pode-se basear na constituição do material lenhocelulósico no conteúdo dos grupos acetilo (Carvalho *et al*, 2008).

### **2.4.4. A xilose como potencial fonte de valor acrescentado proveniente dos pré-tratamentos aquosos**

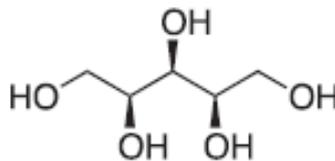
A xilose é um grande constituinte das xilanas (grupo de hemiceluloses), sendo, portanto um dos açúcares mais abundantes no planeta. A sua denominação (derivada do grego *ξύλον*, “madeira”), deve-se ao isolamento deste açúcar a partir da madeira, por Koch em 1886. Trata-se de uma pentose que poderá dar origem ao xilitol através dos processos de hidrogenação da xilose ou por fermentação da xilose (Beerens *et al*, 2012) (Figura 12).



**Figura 12:** Estrutura molecular da xilose

### O xilitol

O xilitol é um poliálcool com 5 átomos de carbono, descoberto pelo químico alemão Emil Fischer (Figura 13). O xilitol é sensorialmente mais doce que a xilose sendo utilizado como adoçante, uma vez que é comparável à percepção de “doce” da sacarose, possuindo menor teor calórico (2,4 kcal/g vs 4,0 kcal/g, para o xilitol e sacarose, respetivamente), e está naturalmente presente em produtos hortofrutícolas, no entanto, em quantidades muito pequenas (Pal *et al*, 2016).



**Figura 13:** Estrutura molecular do xilitol

Devido às suas propriedades únicas tais como não cariogenicidade, fortalecimento dos dentes, prevenção de inflamações nos ouvidos e algumas infeções respiratórias, o xilitol é utilizado em produtos farmacêuticos e dietéticos alimentares e o seu metabolismo é independente da insulina, tornando-o um promissor substituto do açúcar para diabéticos. Uma outra vantagem do xilitol é o facto de não participar nas reações de maillard que ocorrem durante o processamento térmico dos alimentos, não alterando o valor nutricional das proteínas presentes. Todas estas propriedades referidas anteriormente contribuem para o aumento da sua procura e incorporação nos géneros alimentícios, produtos farmacêuticos e de higiene oral, tais como elixires e em pastilhas elásticas (Pal *et al*, 2016).

Atualmente, a produção industrial de xilose é através da via química baseando-se na hidrogenação da xilose, utilizando um catalisador de níquel a temperaturas e pressões elevadas. O xilitol é relativamente caro, uma vez que a obtenção de xilose pura, tais como

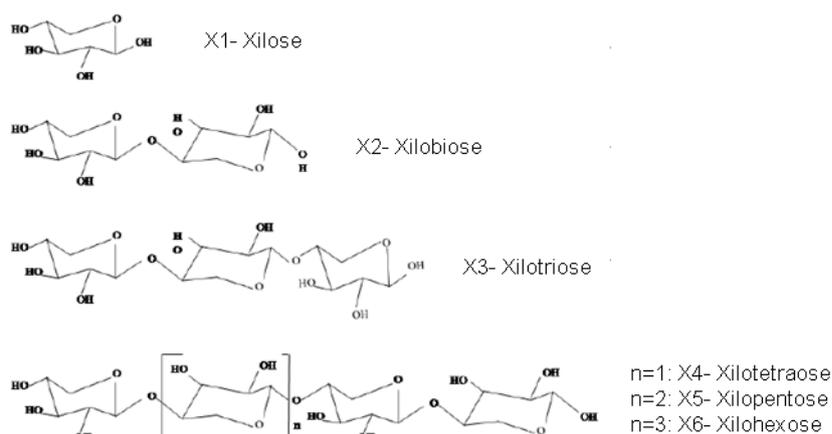
os processos da produção industrial, e todo o processo de refinagem deste polioliol possuem custos elevados. Devido a estas condições, procura-se alternativas para a obtenção de xilitol, tal como a via microbiana, através da utilização de bactérias, leveduras ou bolores, e a utilização de resíduos lenhocelulósicos provenientes da indústria agroalimentar (Franceschin *et al*, 2011).

### Os oligossacáridos de xilose

Nos processos de hidrólise aquosa, obtém-se uma fração líquida composta por derivados das hemiceluloses. Para a maioria dos materiais lenhocelulósicos, as suas formas dominantes são as xiloglucanas e as heteroxilanas (Qing *et al*, 2013).

Os oligossacáridos são monossacáridos polymerizados de cadeia curta através de ligações glicosídicas  $\alpha$  e/ou  $\beta$ . A extensão do seu grau de polymerização ainda não se encontra bem definida, podendo ser considerados entre 2 a 40 monossacáridos por cada polímero (Qing *et al*, 2013; Brienzo, 2016).

Os oligossacáridos de xilose (XOS) são constituídos por unidades de xilose, através de ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 e são produzidos na fração xilano das plantas. Normalmente são constituídos por duas a 12 unidades de xilose, como se pode observar pela Figura 14. Também são considerados XOS, moléculas constituídas por até 20 unidades deste monómero (Qing *et al*, 2013; Brienzo, 2016).



**Figura 14:** Estrutura esquemática da xilose e dos xilooligossacáridos (adaptado de (Brienzo, 2016))

Os XOS não são digeridos no estômago humano e possuem propriedades prebióticas, uma vez que estimulam a flora microbiana benéfica intestinal. Como são moléculas não cariogénicas, podem ser utilizados como edulcorantes hipocalóricos, e encontram-se presentes nos ingredientes de alimentos funcionais, devido aos seus benefícios para a saúde, nomeadamente intestinal, uma vez que podem melhorar a modelação da microbiota presente no cólon (destacando-se as *Bifidobacteria* e *Lactobacillus*) (Brienzo, 2016).

Apesar de todos os benefícios associados aos XOS, estes são pouco produzidos industrialmente e consumidos pelo ser humano. Recentemente, a sua estrutura e benefícios têm sido estudados, em especial, associados à melhoria da absorção dos nutrientes e fatores relacionados com a inibição de micróbios patogénicos e as consequências relacionadas com o bom desenvolvimento intestinal. As propriedades dos XOS dependem da sua estrutura, que se encontra dependente dos açúcares presentes e do seu grau de polimerização (Brienzo, 2016).

Os oligossacáridos encontram-se presentes naturalmente nos tecidos das plantas, em baixas quantidades quando comparados com polissacáridos estruturais da parede celular, tais como a celulose ou a hemicelulose. Durante o processo de pré-tratamento de um material lenhocelulósico, grande parte da hemicelulose é removida da superfície das microfibrilas de celulose e hidrolisada em vários oligossacáridos solúveis, que irão variar com a estrutura e composição da própria hemicelulose. Para a maioria dos materiais lenhocelulósicos, os XOS são os oligossacáridos predominantes libertados durante o pré-tratamento, tratando-se de materiais interessantes para a produção destes oligossacáridos (Qing *et al*, 2013; Brienzo, 2016).

No processo de pré-tratamento, o xilano é libertado sob a forma de XOS solúvel, que por sua vez, será hidrolisado em xilose. Se as condições das hidrólises forem mais agressivas, isto é, temperaturas muito elevadas, tempos prolongados e níveis de pH baixos, esta poder-se-á degradar em furfural, e conseqüentemente convertida em outros produtos de degradação e condensação (Qing *et al*, 2013; Brienzo, 2016).

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Matéria prima**

As amostras de bagaço extratado e caroço de azeitona foram fornecidas pela empresa UCASUL- União de Cooperativas UCRL (Alvito, Beja, Portugal).

#### **3.2. Métodos utilizados na análise química do BAE e CA**

##### **3.2.1 Preparação da amostra**

As amostras de caroço e bagaço de azeitona destinadas à análise da composição química foram moídas num moinho “Wiley” com um crivo de 2 mm, e posteriormente separadas por classes granulométricas num crivo vibratório “Retsch”, nas fracções: < 40 mesh, 40-60 mesh e > 80 mesh. A fracção 40-60 mesh (0,420-0,250 mm) foi utilizada na determinação do teor de extrativos, lenhinas, açúcares estruturais e cinzas, segundo as normas TAPPI.

##### **3.2.2 Determinação do teor de humidade**

O teor de humidade das amostras foi determinado gravimetricamente. O método utilizado consistiu na determinação da perda de massa de 2 g de amostra, que foi colocada numa estufa, a 100 °C durante 24h. O teor de humidade em base húmida foi determinado pela Equação 1

$$\text{Humidade (\%)} = \frac{m_{\text{amostra}} - m_{\text{amostra seca}}}{m_{\text{amostra}}} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

Para cada amostra o ensaio foi realizado em duplicado.

##### **3.2.3. Determinação do teor de cinzas**

O teor de cinzas foi obtido gravimetricamente após incineração das amostras (TAPPI T 211 om-02). A incineração foi feita numa mufla (Heraeus MR 170 E) a 525 °C em 2 g de amostra seca, durante cerca de 24 horas até completa oxidação dos materiais orgânicos presentes.

O teor de cinzas foi determinado pela Equação 2

$$\text{Teor de cinzas (\%)} = \frac{m_{\text{cinzas da amostra}}}{m_{\text{amostra seca}}} \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

Para cada amostra o ensaio foi realizado em duplicado.

### **3.2.4. Determinação de extrativos pelo método de Soxhlet**

A determinação dos extrativos teve por base a norma TAPPI 204 cm-97 (adaptação). Foram pesadas cerca de 2,2 g de amostra seca da fração 40-60 mesh e colocados em cartuchos de extração e submetidos a extracções sucessivas, em Soxhlet, com solventes de crescente polaridade: diclorometano, etanol e água destilada. Utilizaram-se cerca de 170 mL de cada solvente, tendo-se feito a extração durante 6 horas com diclorometano 16 horas com etanol e 16 horas com água.

O teor de substâncias solúveis em cada solvente foi obtido através da determinação gravimétrica da perda de massa da amostra após cada extração.

O teor de substâncias solúveis em cada solvente foi determinado pela Equação 3

$$\text{Extrativos (\%)} = \frac{m_{\text{extrato}}}{m_{\text{amostra seca}}} \times 100 \quad (\text{Equação 3})$$

Para cada amostra o ensaio foi realizado sempre em duplicado.

O teor de extrativos totais foi obtido a partir da soma dos teores de extractivos em diclorometano, etanol e água.

### **3.2.5. Determinação das lenhinas**

#### **3.2.5.1. Determinação da lenhina de Klason**

A determinação da lenhina Klason foi seguida de acordo com a norma TAPPI 222 om-02 que quantifica a lenhina Klason como o resíduo insolúvel resultante do ataque químico com ácido forte ao material.

Foram pesados 0.35 g de amostra previamente extratada e seca, para um copo de precipitação. Foram adicionados 3 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 72 % (m/m), e a mistura colocada num

banho-maria termostatzado a 30 °C, durante 1 hora, com agitação ocasional, utilizando uma vareta de vidro. De seguida, a mistura foi transferida para um frasco de vidro com tampa hermética e adicionados 84 mL de água destilada de modo a diluir o ácido até uma concentração de 4 % (v/v). De seguida os frascos de vidro com as amostras foram colocados numa autoclave (Certoclav-EL 12/18L) durante 1 hora a 120 °C. Quando atingido o tempo de reacção, após a descompressão da autoclave, os frascos foram retirados da autoclave e arrefecidos em gelo.

Após o arrefecimento, procedeu-se   filtração da mistura recorrendo a cadinhos de placa porosa (G 4), previamente secos e tarados. O resíduo insolúvel em ácido retido no cadinho filtrante (lenhina Klason) foi lavado com água destilada. O filtrado foi guardado para a determinação do teor de lenhina solúvel e dos a c ares estruturais.

Os cadinhos com o resíduo foram secos inicialmente numa estufa a 60 °C, durante 24 horas e de seguida numa estufa a 100 °C, durante 2 horas.

O teor de lenhina Klason foi determinado após secagem do resíduo e corrigido em rela o ao teor de extractivos e de cinzas, de acordo com as Equa es 4 e 5.

$$A \text{ (Lenhina KLASON sem corre o (\%))} = \frac{m_{\text{resíduo amostra}}}{m_{\text{amostra seca}}} \times 100 \quad \text{(Equa o 4)}$$

$$\text{Lenhina KLASON corrigida} = \left( \frac{100 - \text{Extractivos (\%)} - \text{Cinzas (\%)}}{100} \right) \times A \quad \text{(Equa o 5)}$$

Para cada amostra, o ensaio foi realizado sempre em duplicado.

### 3.2.5.2. Determina o da lenhina solúvel

A determina o da lenhina solúvel em ácido foi efetuada de acordo com a norma TAPPI UM 250 (1993).

A lenhina solúvel em ácido foi determinada através da absorção no ultravioleta (205 nm) do filtrado (250 mL) resultante da determina o da lenhina Klason.

Foram pipetados 2 mL ou 1 mL do filtrado, de caroço e de bagaço de azeitona, respetivamente, para um tubo de ensaio e perpez-se o volume até aos 20 mL, com água destilada. A leitura da absorvância a 250 nm foi realizada num espectrof tmetro (UV-160A Recording Spectrophotometer, Shimadzu) contra água destilada.

Para a determinação da lenhina solúvel foi utilizada a Equação 6.

$$\text{Lenhina solúvel} = \frac{A_{205} \times V \times f}{\varepsilon \times m_{\text{amostra seca}}} \times 100 \quad (\text{Equação 6})$$

Sendo:  $A_{205}$  – Absorvância a 205 nm,  $\varepsilon$  –  $110 \text{ cm}^{-1}\text{g}^{-1}\text{L}$  (absortividade molar),  $V$  – volume inicial (0,250 L),  $f$  – factor de diluição,  $m$  – massa seca (g)

Para cada amostra, o ensaio foi realizado sempre em duplicado.

### **3.2.5.3. Composição dos açúcares estruturais**

A composição dos açúcares estruturais, correspondentes à celulose e às hemiceluloses, foi avaliada, através da quantificação, dos açúcares correspondentes após a sua total hidrólise (no hidrolisado obtido na determinação da lenhina Klason) por HPLC (Cromatografia líquida de troca aniónica de alta eficiência)

A análise por HPLC foi realizada no Laboratório de Análises REQUIMTE - Rede de Química e Tecnologia, Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia de Universidade NOVA de Lisboa. Foi utilizado um equipamento DIONEX ICS3000 equipado com uma coluna CarboPac PA10 250x40 mm + Aminotrap e um detetor PAD. Os cromatogramas das amostras foram comparados com os dos padrões dos açúcares e ácidos orgânicos a serem analisados, sendo a quantificação feita por curvas de calibração de cada composto.

### **3.2.6. Determinação dos compostos bioactivos**

Os extratos em etanol e em água, obtidos da extração em Soxhlet, foram caracterizados, com a determinação de teor de fenóis totais, flavonóides totais, taninos condensados e taninos hidrolisáveis e determinada a actividade antioxidante.

#### **3.2.6.1. Determinação do teor de fenóis**

O teor de compostos fenólicos totais presentes nos extratos em etanol e em água foram determinados pelo método de Folin-Ciocalteu (Singleton e Rossi, 1965). O método de Folin Ciocalteu é um método colorimétrico que se baseia numa reacção de oxidação-redução entre o reagente de Folin e os compostos fenólicos, formando um complexo de molibdénio e tungsténio de cor azul com absorção a 765 nm. O ácido gálico foi utilizado como composto padrão de referência.

Os extractos em etanol foram inicialmente diluídos de 1:100. A 100 µL de cada extracto foram adicionados 4 mL de solução Folin-Ciocalteu 1:10 (v/v) e ao fim de 8 minutos a solução foi neutralizada com 4 mL de carbonato de sódio (7,5 % (m/v)). Após 15 minutos a 45 °C num banho termostaticado, para permitir a estabilização da cor, a absorvância foi medida num espectrofotómetro (UV-160A Recording Spectrophotometer, Shimadzu), a 765 nm contra um branco contendo apenas água destilada

Realizou-se o mesmo procedimento para a construção da curva de calibração, utilizando soluções com concentrações diferentes de ácido gálico (0 a 0,6 mg/mL).

A concentração em fenóis totais foi determinada por interpolação da curva de calibração de ácido gálico. Os resultados obtidos foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico por grama de extrato.

Todas as amostras foram analisadas em duplicado.

#### **3.2.6.2. Determinação do teor de flavonóides totais**

Os flavonoides totais foram determinados por um método espectrofotométrico seguindo uma metodologia previamente descrita por Zhishen *et al.* (1999). A técnica envolve a medida da absorvância, a 510 nm, do complexo  $AlCl_3$ -flavonoide, utilizando a curva de calibração de catequina.

A partir de uma solução de catequina em metanol (1000 ppm), foram preparadas as soluções padrão a diferentes concentrações (entre 0 e 1,0 mg/mL) para obtenção da curva de calibração.

A 1,0 mL de cada extracto (e das soluções de catequina) foram adicionados 4 mL de água destilada e 0,3 mL de solução de nitrito de sódio 5% (m/v). Após 5 minutos foram adicionados 0,3 mL de solução de cloreto de alumínio (10%). Ao fim de 6 minutos, foram adicionados 2 mL de hidróxido de sódio (4%), e 2,4 mL de água destilada. A absorvância foi medida num espectrofotómetro (UV-160A Recording Spectrophotometer, Shimadzu) a 510 nm contra um branco contendo apenas metanol.

A concentração em flavonóides totais foi determinada por interpolação da curva de calibração de catequina. Os resultados foram expressos como mg de equivalentes de catequina por g de extrato.

Todas as amostras foram analisadas em duplicado.

### **3.2.6.3. Determinação do teor de taninos condensados**

O teor de taninos condensados nos extratos em etanol e em água foi quantificado por reação com vanilina (Abdalla *et al*, 2014).

A partir de uma solução de catequina em metanol 1000 ppm foram preparadas as soluções padrão a diferentes concentrações (entre 0 e 1,0 mg/mL) para obtenção da curva de calibração.

A 1,0 mL de extrato (e das soluções de catequina) foram adicionados 2,5 mL de solução de vanilina (concentração de 10 g/L em metanol) e 2,5 mL de uma solução 25 % (v/v) de ácido sulfúrico em metanol e 4 mL de metanol seguida de homogeneização da solução. A leitura da absorvância foi efectuada directamente a 500 nm a temperatura ambiente no espectrofotómetro.

A concentração dos taninos condensados foi determinada por interpolação da curva de calibração de catequina. Os resultados foram expressos como mg de equivalentes de catequina por g de extrato

Todas as amostras foram analisadas em duplicado.

### **3.2.6.4. Propriedades antioxidantes**

Para a avaliação da atividade antioxidante dos extratos utilizaram-se os métodos espectrofotométricos DPPH, e FRAP.

DPPH para avaliar a capacidade de sequestrar radicais livres (antirradicalar).

FRAP para avaliar o poder antioxidante por redução do ião férrico.

#### **3.2.6.4.1. Determinação da atividade de redução Fe(III) a Fe(II) pelo ensaio FRAP (*Ferric Reduction Antioxidant Power*)**

O ensaio FRAP baseia-se na determinação da capacidade da amostra para reduzir o Fe(III) a Fe(II), medindo assim a sua capacidade redutora. Quando o Fe(III) do complexo de Fe(III)- tripiriditriazina ( $Fe^{3+}$ -TPTZ) é reduzido a Fe(II) forma-se, em meio ácido, uma intensa coloração azul suscetível de ser quantificada espectrofotometricamente a 593 nm e que é proporcional à quantidade de espécies redutoras presentes na amostra.

Para a realização do ensaio FRAP seguiu-se o método descrito por Benzie e Strain (1996).

O reagente FRAP foi preparado no momento da utilização, do seguinte modo: 10 volumes de tampão acetato 0,25 M (pH 3,6), 1 volume de solução 10 mM de TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina) em 40 mM de HCl e 1 volume de solução de FeCl<sub>3</sub> 20 mM. O ensaio iniciou-se com a adição, num tubo de ensaio, de 2,7 mL do reagente FRAP, preparado de fresco e pré-aquecido a 37 °C, com 270 µL de água e 90 µL de cada um dos extratos. As misturas foram incubadas no escuro durante 30 minutos a 37 °C. A leitura foi efetuada no espectrofotómetro a 595 nm, contra o reagente FRAP.

Realizou-se o mesmo procedimento para a construção da curva de calibração, substituindo a amostra por concentrações diferentes de Trolox em metanol (entre 0.05 e 1,0 mM/L).

A atividade antioxidante foi determinada por interpolação de uma curva de calibração. Os resultados foram expressos em µM equivalentes de Trolox por grama de extrato.

Todas as amostras foram analisadas em duplicado.

#### **3.2.6.4.2. Capacidade de sequestro do radical DPPH**

A avaliação da capacidade antirradicalar dos extratos foi efetuada utilizando um radical livre e estável, o DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo). Este método baseia-se na captura do radical DPPH por antioxidantes, produzindo um decréscimo da absorvância a 515 nm (Sharma e Bhat, 2009). A actividade antioxidante foi expressa em mg equivalentes de Trolox / g de extracto e em IC<sub>50</sub>, ou seja, a concentração do extrato que proporciona uma inibição de 50 % da capacidade da sequestração dos radicais livres.

Inicialmente foram preparadas três diluições de cada extrato.

Para a construção de uma curva de calibração, prepararam-se várias diluições de Trolox em metanol (0,5; 1,25; 2,5; 5 µg/ml).

A 0,1 ml de cada diluição do extrato (e das soluções de Trolox) foram adicionados 3,9 mL do reagente DPPH (0,06 mM). A mistura foi agitada no vortex. Ao fim 30 minutos, a absorvância foi lida num espectrofotómetro a 517 nm.

No branco (controlo) foram utilizados 3,9 mL de DPPH (0,2 mM) em metanol e 0,1 mL de metanol.

Os resultados foram expressos em percentagem de inibição (I%) de redução de DPPH relativamente ao controlo e calculado através da seguinte equação.

$$\% \text{ de inibição} = [(A_{\text{DPPH}} - A_{\text{S}}) / A_{\text{DPPH}}] \times 100 \quad (\text{Equação 7})$$

sendo,  $A_s$  a absorvância da solução com a amostra e  $A_{DPPH}$ , a absorvância da solução de DPPH (controlo).

A execução dos ensaios com diversas concentrações para cada amostra permitiu determinar graficamente a concentração de extracto que causa 50 % de inibição ( $IC_{50}$ ).

O valor do  $IC_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) foi obtido por interpolação gráfica da % de inibição em função da concentração do extracto em estudo.

Todas as amostras foram analisadas em duplicado.

### **3.3. Pré-tratamentos aquosos**

Foram realizados dois pré-tratamentos aquosos às amostras de bagaço e caroço de azeitona: pré-tratamento hidrotérmico ou auto hidrólise e pré-tratamento em meio ácido (solução de ácido sulfúrico a 3,5 % (m/m)).

Nos pré-tratamentos aquosos foram utilizadas as amostras de caroço e bagaço brutas, sem qualquer trituração. Foram efetuados 5 ensaios por amostra de bagaço e de caroço de azeitona por tratamento hidrotérmico.

#### **3.3.1. Pré-tratamentos aquosos - Auto-hidrólise**

As amostras de bagaço e de caroço de azeitona foram hidrolisadas em autoclave (ajc Uniclave 88), em frascos Shott de 50 mL de capacidade com tampa hermética, com as seguintes condições operatórias (Fernandes *et al*, 2016):

Solvente: água destilada

Temperatura: 130 °C

Tempo de reacção: 130 min

Razão sólido líquido: 1:3 (m/v)

15 mL de água destilada e 5 g de cada amostra foram colocados nos frascos shot com tampa hermética e introduzidos numa autoclave a 130 °C. Quando atingido o tempo de

reação pretendido (130 min), após a decompressão da autoclave, os fracos foram retirados e arrefecidos em gelo.

A separação sólido líquido foi realizada por filtração recorrendo a cadinhos de placa porosa (G0), previamente secos e tarados. O resíduo retido no cadinho filtrante foi lavado com água destilada. A mistura filtrada foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL que foi completado com a água de lavagem do material retido no filtro. Os hidrolisados foram analisados por HPLC nas condições referidas previamente.

Os cadinhos com o resíduo sólido foram secos até massa constante, inicialmente numa estufa a 60 °C, durante 24 horas e de seguida numa estufa a 100 °C, durante 24 horas. Por fim foram pesados e determinada a percentagem de sólidos insolúveis e a percentagem sólidos solúveis presentes no hidrolisado resultante.

O material insolúvel (resíduo sólido) proveniente da etapa de hidrólise foi quimicamente analisado, com a determinação do teor de lenhina Klason e lenhina solúvel e composição e quantificação dos açúcares estruturais.

### **3.3.2. Pré-tratamentos aquosos - Hidrólise ácida**

As amostras de bagaço e de caroço de azeitona foram hidrolisadas em autoclave (ajc Uniclave 88), em frascos Shott de 50 mL de capacidade com tampa hermética, com as seguintes condições operatórias (Fernandes *et al*, 2016):

Solvente: ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) com a concentração de 3,5% (m/m)

Temperatura: 130 °C

Tempo: 130 minutos

Razão sólido líquido: 1:3 (m/v)

15 mL de solução de ácido sulfúrico a 3,5 % e 5 g de cada amostra foram colocados nos frascos shott e introduzidos na autoclave a 130 °C. Quando atingido o tempo de reação pretendido (130 min), após a decompressão da autoclave, os fracos foram retirados da autoclave e arrefecidos em gelo.

A separação sólido líquido foi realizada por filtração recorrendo a cadinhos de placa porosa (G0), previamente secos e tarados. O resíduo retido no cadinho filtrante foi lavado com água destilada. A mistura filtrada foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL que foi completado com a água de lavagem do material retido no filtro. Os hidrolisados foram analisados por HPLC nas condições referidas previamente.

Os cadinhos com o resíduo sólido foram secos até peso constante, inicialmente numa estufa a 60 °C, durante 24 horas e de seguida numa estufa a 100 °C, durante 24 horas. Por fim foram pesados e determinada a percentagem de sólidos insolúveis e a percentagem sólidos solúveis presentes no hidrolisado resultante.

O material insolúvel proveniente da etapa de hidrólise ácida foi quimicamente analisado, com a determinação do teor de lenhina Klason e lenhina solúvel e composição e quantificação dos açúcares estruturais.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Caracterização química do bagaço extractado e caroço de azeitona

Realizou-se o estudo da determinação da composição química do bagaço de azeitona extractado e do caroço de azeitona pela análise química somativa na qual se determinou a percentagem relativa de cada um dos principais grupos de componentes químicos. Ao realizar a análise química, esteve presente que para quantificar um determinado constituinte químico exige a sua separação dos restantes componentes.

Na Tabela 4 são apresentados os valores médios (em % do material inicial) da composição química somativa das amostras de bagaço e do caroço de azeitona.

**Tabela 4:** Composição química média (% , material inicial) do bagaço e caroço de azeitona

	<b>BAE</b>	<b>CA</b>
	Média	Média
<b>Cinzas (%)</b>	<b>13,36</b>	<b>0,57</b>
<b>Extrativos totais (%)</b>	<b>34,42</b>	<b>13,72</b>
- Diclorometano (%)	7,98	7,81
- Etanol (%)	12,42	3,12
- Água (%)	14,02	2,79
<b>Lenhinas totais (%)</b>	<b>31,92</b>	<b>42,06</b>
- Lenhina Klason (%)	27,69	39,81
- Lenhina solúvel (%)	4,23	2,25

O teor de cinzas foi, em média, 13,4 % para o bagaço extractado e 0,57 % para o caroço de azeitona. O teor médio de cinzas obtido para o bagaço extractado foi superior quando comparado com os valores referenciados. Sansoucy (1985) refere que o bagaço de azeitona extratado possui teores de cinzas entre 7 a 10 %. Valores entre 3,4 % (Leite *et al.* 2016) e 4,4 % (Fernandes *et al.* 2016) foram obtidos em bagaço de azeitona. Este valor elevado de teor de cinzas poderá ser explicado pelo facto da amostra de bagaço ser um resíduo industrial, podendo a amostra ter sido contaminada com material inorgânico. O teor médio de cinzas obtido para o caroço de azeitona foi muito inferior (0,57 %) comparativamente com o valor de 2,3 % referido por Ghelen *et al* (2016) para o caroço de azeitona

O teor, em extrativos totais, obtido para o bagaço extractado e caroço de azeitona foi de 34,4 % e 13,72 %, respectivamente. Considerando a distribuição dos extractivos totais por solvente, verificou-se que os extractivos mais polares, removidos por etanol e água,

constituem a maior parte dos extractivos correspondendo em média a 77% e 43 % dos extractivos totais, respectivamente no bagaço extractado e caroço de azeitona. O teor de extractivos não polares solúveis em diclorometano representaram, respectivamente, 23% e 57 % dos extrativos totais do bagaço extractado e caroço de azeitona (correspondendo a 7,98 % do bagaço e 7,81 % do caroço de azeitona).

O teor de lenhina do bagaço e do caroço de azeitona foram, respectivamente, 32 % e 42 %. Estes valores médios de teor de lenhina são semelhantes aos descritos para o bagaço de azeitona extractado. Rodríguez *et al* (2007) referem para o bagaço de azeitona teores de lenhina total de 29,3 %. Fernandes *et al.* (2016) obtiveram valores de lenhina Klason de 33,9 % e Leite *et al.* (2016) 41.62 % lenhina.

A Tabela 5 apresenta os resultados da análise da composição em açúcares dos polissacáridos e ácidos orgânicos do bagaço e caroço de azeitona.

**Tabela 5:** Composição média em açúcares dos polissacáridos e ácidos orgânicos (% material inicial) do bagaço e caroço de azeitona

	Bagaço	Caroço
Galactose	0,21	0,39
Ramnose	0,15	0,28
Arabinose	0,62	0,80
Glucose	13,77	15,26
Manose	0,54	n.d.
Xilose	18,94	20,28
Ácido galacturónico	0,26	0,73
Ácido glucorónico	n.d.	0,05
Ácido acético	1,97	7,91
<b>Total</b>	<b>36,46</b>	<b>45,70</b>

n.d.- não detetado

A celulose do bagaço extractado de azeitona (estimada a partir do teor de glucanas, ou seja toda a glucose da celulose mais a glucose das hemiceluloses) mostra valores relativamente baixos, na ordem dos 14 % (comparativamente com os teores de celulose observados na madeira de varias espécies cerca 50 % do material inicial). O teor de hemiceluloses (a partir dos valores de xilose ramnose arabinose manose e ácidos orgânicos e grupos acetilo) foi de 22,5 %, sendo constituídas principalmente por xilose, com valores

próximos dos 19 %, o que significa que as hemiceluloses são predominantemente xilanas. O teor de grupos acetilo foi de 1,97 %.

Os valores obtidos para o teor de celulose e hemiceluloses foram similares aos observados por Fernandes *et al.* (2016) para o bagaço de azeitona: 22,8 % glucanas, hemiceluloses 23,3%, sendo as xilanas (teor de xilose) de 15,6% e grupos acetilo 6,6 %. Leite *et al.* (2016) para bagaço de azeitona extractado referem valores de celulose de 11 % e hemiceluloses 24,1 %.

O teor de celulose obtido no caroço de azeitona foi de 15,3 %, valor inferior ao observado no bagaço de azeitona. O teor de hemiceluloses foi de 30,4 % do material inicial, sendo a xilose o principal açúcar, cerca de 20,3 % do material inicial. (67 % dos monossacáridos presentes nas hemiceluloses). O teor de grupos acetilo, 7,9 % foi superior quando comparado com o teor observado no bagaço de azeitona.

#### **Em síntese:**

- O bagaço de azeitona apresentou teores de extractivos totais e cinzas mais elevados relativamente ao caroço de azeitona.
- Considerando a distribuição dos extractivos totais por solvente, verificou-se que os extractivos mais polares (etanol e água) constituem a maior parte dos extractivos totais no bagaço e caroço de azeitona.
- O caroço de azeitona apresentou teores de lenhina total superiores relativamente ao bagaço de azeitona.
- O bagaço de azeitona e o caroço de azeitona apresentaram baixos teores de celulose.
- As hemiceluloses do bagaço de azeitona e do caroço apresentaram teores elevados de xilose.

## 4.2. Caracterização da composição dos extractivos polares

A Tabela 6 apresenta a composição e propriedades antioxidantes dos extractos polares do bagaço e caroço de azeitona.

**Tabela 6:** Composição dos extractivos polares e propriedades antioxidante do bagaço e caroço de azeitona (teor de fenóis totais, flavonóides, taninos e atividade antioxidante TEAC e FRAP)

	BAE		CA	
	Etanol	H <sub>2</sub> O	Etanol	H <sub>2</sub> O
	Média	Média	Média	Média
Fenóis Totais (mg GAE/g extrato)	120,28	136,70	145,87	160,48
Flavonóides (mg catequina/g extrato)	102,13	44,17	92,97	46,40
Taninos Condensados (mg catequina/g extrato)	12,37	27,72	28,79	19,01
Atividade Antioxidante- TEAC (mg Trolox/g extrato)	84,86	58,53	149,54	58,95
IC <sub>50</sub> (µg extrato/mL)	47,82	69,75	30,01	83,50
Atividade Antioxidante- FRAP (mM Fe <sup>2+</sup> /g extrato)	0,65	0,45	1,87	0,75

O teor médio de compostos fenólicos totais no extracto em etanol e em água do bagaço de azeitona, expresso em equivalentes de ácido gálico, foi respectivamente, de 120,3 e 136,6 mg equivalentes de ácido gálico /g de extracto (total 256,9 mg de equivalentes de ácido gálico /g de extracto). Os extractos em etanol e em água do caroço de azeitona apresentaram um teor médio de compostos fenólicos totais mais elevado, respectivamente, 145,9 e 160,1 mg equivalentes de ácido gálico /g de extracto (total 306,0 mg equivalentes de ácido gálico /g de extracto).

O teor de flavonóides totais presente no extracto polar do bagaço de azeitona foi de 146,3 equivalentes de catequina / g de extrato (102,1 mg equivalentes de catequina /g de extracto em etanol, e 44,2 mg equivalentes de catequina /g de extracto em água). O teor de flavonóides totais no extracto polar do caroço de azeitona foi de 139,4 equivalentes de catequina (93,0 mg equivalentes de catequina /g de extracto em etanol, e 46,4 mg equivalentes de catequina /g de extracto em água).

Em ambos os extratos de bagaço e caroço de azeitona foram detetados a presença taninos condensados. O extrato do caroço em etanol obteve a maior concentração (28,79 mg catequina/g extrato).

A atividade antioxidante dos extractos foi avaliada com base na captura do radical livre de DPPH (método DPPH, actividade antioxidante expressa em termos da quantidade de extrato requerida para reduzir de 50% a concentração de DPPH ( $IC_{50}$ )) e na capacidade de redução do ferro (método FRAP). Todos os extractos polares obtidos por extracção com etanol e com água do bagaço e caroço apresentaram muito fraca actividade antioxidante:

O bagaço e caroço em ambos os extratos possuem atividades antioxidantes baixas, tal como se pode observar pelos resultados obtidos no  $IC_{50}$ . Quando comparados com o padrão Trolox, cujo  $IC_{50}$  foi de 4,02  $\mu$ g Trolox/mL, obtiveram valores bastante superiores, indicativos de reduzidas atividades antioxidantes.

#### **Em síntese:**

- Os extractos polares do bagaço e caroço de azeitona apresentaram teores elevados de fenóis totais, respectivamente 256,9 e 306,0 mg equivalentes de ácido gálico /g de extracto.
- Os extractos polares do bagaço e caroço de azeitona apresentaram actividade antioxidante muito baixa.

#### **4.3. Pré-tratamentos aquosos**

O bagaço e o caroço de azeitona foram submetidos a tratamentos hidrotérmicos de autohidrólise e hidrotérmico catalisado com ácido sulfúrico (3,5 %), ambos os processos à temperatura de 130 °C e durante 130 minutos. A etapa de pré-tratamento tem como principal objectivo facilitar o acesso das enzimas celulósicas à celulose presente na fracção sólida, aumentando, desta forma, o rendimento na etapa posterior de hidrólise enzimática da celulose em glucose. Após a realização dos pré-tratamentos os resíduos sólidos obtidos foram analisados quimicamente a fim de quantificar os açúcares solúveis obtidos. Na Tabela 7 são apresentados os rendimentos médios da fracção sólida insolúvel obtida com os pré-tratamentos de auto-hidrólise e hidrotérmico catalisado com ácido (ácido sulfúrico 3,5%). Na Tabela 8 são apresentados os valores da composição química dos materiais pré-tratados obtidos.

**Tabela 7:** Rendimentos em sólidos obtidos com pré-tratamentos aquosos (hidrólise ácida e auto-hidrólise) do bagaço e caroço de azeitona

Amostra	Meio Reacional	Rendimento médio (%)	Desvio Padrão
Bagaço	H <sub>2</sub> O	74,51	0,975
	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (3,5 % (w/w))	50,48	1,551
Caroço	H <sub>2</sub> O	86,66	1,530
	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (3,5 % (w/w))	55,72	0,940

**Tabela 8:** Composição química dos resíduos sólidos resultantes após os pré-tratamentos (% em relação aos resíduos sólidos)

	BAE (H <sub>2</sub> O)	CA (H <sub>2</sub> O)	BAE (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (3.5%))	CA (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (3.5%))
Lenhina total	54,85	55,91	66,08	77,18
Lenhina Klason	53,84	54,28	65,17	76,70
Lenhina Solúvel	1,01	1,63	0,91	0,48
<b>Polissacáridos</b>	<b>BAE (H<sub>2</sub>O)</b>	<b>CA (H<sub>2</sub>O)</b>	<b>BAE (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (3.5%))</b>	<b>CA (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (3.5%))</b>
Galactose	0,45	0,44	0,11	0,23
Rhamnose	0,23	0,28	0,12	0,47
Arabinose	0,69	0,25	0,62	4,88
Glucose	9,22	7,59	0,39	0,35
Xilose	11,88	16,04	0,19	0,43
Manose	0,00	0,00	0,00	0,00
Ácido galacturónico	0,21	0,37	2,96	0,38
Ácido glucorónico	0,00	0,01	0,03	0,16
Ácido acético	0,00	0,00	0,00	0,00
Total	22,69	24,99	4,41	6,90

O rendimento em sólidos residuais após a etapa de pré-tratamento foi: respectivamente, no bagaço e caroço de azeitona, 74,5 % e 86,7 %, após o pré-tratamento de autohidrólise e 50,5 % e 55,7 %, após o pré-tratamento hidrotérmico catalisado com ácido. O pré-tratamento hidrotérmico catalisado com ácido foi mais severo apresentando uma perda de massa 1,5 vezes superior ao verificado com o tratamento de autohidrólise. Valores de

percentagem de recuperação de sólidos com o tratamento de autohidrólise obtidos foram semelhantes aos valores obtidos por Fernandes *et al* (2016), com bagaço de azeitona (rendimento de sólidos de 63,6 %) com tratamento hidrotérmico ácido até à temperatura final de 130 °C (em condições não isotérmicas).

Os resultados da composição química do bagaço e caroço de azeitona após os pré-tratamentos, como esperado, indicam a remoção de grande parte dos polissacáridos (hemiceluloses e celulose). As hemiceluloses e a celulose presentes na fase sólida decresceram comparativamente ao material inicial indicando uma solubilização das mesmas, sendo mais acentuada para o pré-tratamento catalisado com ácido), no entanto, verificou-se que estes tipo de tratamento hidrotérmicos não tiveram um efeito significativo na lenhina Klason (fraco ataque da lenhina) com um acréscimo da sua percentagem. O teor de lenhina nos resíduos de bagaço de azeitona foi de 54,85 % e 66,08 % e nos resíduos de caroço 55,9 % e 77,18 %, respectivamente, após pré-tratamento auto-hidrólise e hidrotérmico catalisado com ácido.

As percentagens de açúcares solubilizados na fração líquida foram calculadas através de um balanço de massas a partir das concentrações dos monossacáridos presentes no material inicial e dos monossacáridos presentes nas fracções sólidas após os pré-tratamentos, os resultados obtidos encontram-se representados na Tabela 9.

**Tabela 9:** Percentagem dos açúcares hidrolisados na fase líquida em relação aos açúcares do material inicial

%	Bagaço (H <sub>2</sub> O)	Caroço (H <sub>2</sub> O)	Bagaço (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (3,5%))	Caroço (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (3,5%))
Açúcares totais	37,79	45,34	90,33	94,51
Galactose	0	2,23	73,56	67,14
Rhamnose	0	13,34	59,62	6,47
Arabinose	17,08	72,92	49,52	66,01
Glucose	50,11	56,90	98,57	98,72
Xilose	53,26	31,46	99,49	92,21
Manose	100,00	0,00	100,00	0
Ácido galacturónico	39,82	56,08	0	6,61
Ácido glucorónico	0	82,67	0	0
Ácido acético	≈100,00	≈100,00	≈100,00	≈100,00

Através do pré-tratamento de autohidrólise cerca de 38 % e 45 % dos açúcares constituintes da celulose e hemiceluloses foram solubilizados. No caso do bagaço de

azeitona 50 % das glucanas e 53,3 % das xilanas iniciais foram solubilizadas na fracção líquida, e no caroço 56,9 % das glucanas e cerca de 31,5 % das xilanas foram solubilizadas.

Em geral, os tratamentos hidrotérmicos, caracterizam-se ou poderão ser otimizados para uma hidrólise seletiva das hemiceluloses com as glucanas praticamente não serem afetadas. Para as condições operacionais utilizadas no pré-tratamento de autohidrólise cerca de 50 % das glucanas foram solubilizadas, um trabalho de optimização das condições operatórias (temperatura e tempo, razão solido liquido) ainda deverá ser feito.

No pré-tratamento catalisado com ácido sulfúrico utilizado no caroço e bagaço de azeitona mais de 90 % das glucanas e das xilanas foram solubilizadas.

No entanto os hidrolisados obtidos a partir dos pré-tratamentos de autohidrólise e hidrotérmico ácido, do caroço e do bagaço de azeitona, apresentam teores elevados de pentoses (xiloses) e hexoses (glucose) que podem ser valorizados em produtos de valor acrescentado, como por exemplo, obtenção de bioetanol através da fermentação da glucose para ou a produção de xilitol com a utilização de microorganismos.

#### **Em síntese**

- O rendimento em sólidos residuais foi: respectivamente, no bagaço e caroço de azeitona, 74,5 e 86,7%, após o pré-tratamento de autohidrólise e 50,5 % e 55,7 %, após o pré-tratamento hidrotérmico catalisado com ácido.
- Através do pré-tratamento de autohidrólise cerca de 38 % e 45 % dos açúcares constituintes da celulose e hemiceluloses foram solubilizados
- Através do pré-tratamento catalisado com ácido sulfúrico mais de 90 % das glucanas e das xilanas do caroço e bagaço foram solubilizadas.
- Os tratamento hidrotérmicos não tiveram um efeito significativo na lenhina Klason
- Os hidrólizados obtidos podem ser valorizados em produtos de valor acrescenta como seja a produção de bioetanol e xilitol.

## 5. CONCLUSÕES

O estudo efetuado mostrou que o bagaço e caroço de azeitona são ricos em lenhinas (32 e 42 %), e o bagaço possui um teor em extrativos elevado (34 %), especialmente na componente solúvel em etanol e água. Relativamente à composição média em açúcares, o caroço apresentou a xilose como açúcar maioritário, e o bagaço, a glucose.

Relativamente aos compostos bioativos, apesar do teor moderado em fenóis totais e flavonóides, as amostras de bagaço e caroço de azeitona apresentaram atividades antioxidantes baixas, que se refletem na atividade antioxidante TEAC e IC<sub>50</sub> elevados, tal como pela atividade antioxidante (método FRAP), não sendo bons agentes sequestrantes de radicais livres.

O bagaço extratado de azeitona obteve melhores rendimentos em ambos os pré-tratamentos (auto-hidrólise e hidrólise em meio ácido), e os pré-tratamentos aquosos em meio ácido foram os que obtiveram melhores rendimentos em extracto (50 % e 45 %, para o bagaço e caroço, respetivamente).

Em termos de perspetivas futuras, seria interessante testar condições de pré-tratamentos em meio alcalino, que hidrolisa a fração das lenhinas, uma grande barreira de resistência, tal como analisar vários binómios tempo/temperatura para os processos de auto-hidrólise e hidrólise ácida, com o objetivo de otimizar os pré-tratamentos, tentando maximizar a hidrólise das hemiceluloses, minimizando a da celulose.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdalla, S., Pizzi, A., Ayed, N., Bouthory, FC., Charrier, B., Bahabri, F., et al. (2014). *MALDI-TOF analysis of Aleppo pine (Pinus halepensis) bark tannin*. *Bioresources*, 9: 3396-3406.

Afonso, L. *Enzymatic saccharification and fermentation of cellulosic date palm wastes to glucose and lactic acid*. (2012). *Produção de celulases por cultivo em estado sólido e aplicação na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar*. Dissertação para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química. Escola Politécnica da Universidade São Paulo. São Paulo-Brasil. 119 p.

Alrumman, S.A. (2016). *Enzymatic saccharification and fermentation of cellulosic date palm wastes to glucose and lactic acid*. *Brazilian journal of microbiology* 47, 110–119A.K.

Amarowicz, R., Pegg, R., Rahimi-Moghaddam, P., Barl, B. e Weil, J. (2004). *Freeradical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies*. *Food Chemistry*. 84: 551-562.

Chandel, Chandrasekhar, G., Silva, M., Silva S. (2012). *The realm of cellulases in biorefinery development*. *Critical Reviews in Biotechnology*, 32: 187-202.

Baeta, M. (2014) *Subprodutos da indústria de hortofrutícolas minimamente processados: caracterização e valorização do potencial bioativo e energético*. Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Alimentar– Processamento dos Alimentos. Universidade de Lisboa - Instituto Superior de Agronomia. Lisboa. 84p.

Beerens, K., Desmet, T. and Soetaert, W. (2012). *Enzymes for the biocatalytic production of rare sugars*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 39 823-834.

Beldman, G., Hennekam, J., Voragen, A. G. J. (1987). *Enzymatic hydrolysis of beer brewers' spent grain and the influence of pretreatments*. *Biotechnology and Bioengineering*, 30, 668–671.

Benítez , V., Mollá, E., Martín-Cabrejas, M., Aguilera, Y., López-Andréu, F., Cools, K., Terry, L., Esteban, R. (2011). *Characterization of Industrial Onion Wastes (Allium Cepa L.): Dietary Fibre and Bioactive Compounds*. *Plant Foods Hum Nutr.*66:48-57.

Benzie, I. F., Strain, J. J. 1996. *The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay*. *Analytical biochemistry*, 239(1), 70-76.

Berhanu H, Kiflie Z, Miranda I, Lourenço A, Ferreira J, Feleke S, *et al.* (2018) *Characterization of crop residues from false banana /Ensete ventricosum/ in Ethiopia in view of a full-resource valorization.* PLoS ONE 13(7): e0199422. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199422>.

Brás, T., Guerra, V., Torrado, I., Lourenço, P., Carvalheiro, F., Duarte, L. C., & Neves, L. A. (2014). *Detoxification of hemicellulosic hydrolysates from extracted olive pomace by diananofiltration.* *Process Biochemistry*, 49, 173–180.

Brienzo, M., Carvalho, A., Figueiredo, F., Neto, P. (2016). *Sugarcane Bagasse Hemicellulose Properties, Extraction Technologies and Xylooligosaccharides Production.* *Food Waste: Chapter 8.*

Carvalheiro, F., Duarte, L., Gírio, F. (2008). *Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments.* *Journal of Scientific & Industrial Research.* Vol. 67: 849-864.

Centre d` Initiative pour la Production Propre (2000). *Prévention de la pollution dans la production d`huile d`olive.* *Ministère de l`Environnement, Gouvernement Autonome de la Catalogne.* Barcelona. Disponível em: [www.cema-sa.org/files/mcsd/fr/oli\\_fr.pdf](http://www.cema-sa.org/files/mcsd/fr/oli_fr.pdf) .

Decreto-Lei nº 76/2010 de 24 de Junho, que estabelece as condições a observar na obtenção, tratamento e comercialização do azeite e do óleo de bagaço de azeitona, criando as regras de execução do Regulamento (CE) n.º 1019/2002, da Comissão, de 13 de Junho, na redação dada pelo Regulamento (CE) n.º 182/2009, da Comissão, de 6 de Março.

Duarte, C. L., Esteves, M.P., Carvalheiro, F., Vicente, P. E Gírio, F. (2007). *Os subprodutos agro-industriais de natureza lenhocelulósica: caracterização da situação portuguesa:* *Revista de Engenharia Química*, 5:56-62.

Fan, S., Zhang, P.; Li, F.; Jin, S.; Wang S., Zhou S. (2016). *A Review of Lignocellulose Change During Hydrothermal Pretreatment for Bioenergy Production.* *Current Organic Chemistry*, 20: 1-11.

Fengel, D. and Wegener, G. (1983). *Wood: Chemistry, ultrastructura, reactions* (pp.1-613). Berlin, Germany, Walter de Gruyter & Co

Fernandes, M., Torrado, I., Carvalheiro, F., Dores, V., Guerra V., Lourenço, P., Duarte L. (2016). *Bioethanol production from extracted olive pomace: dilute acid hydrolysis.* *Bioethanol*, 2: 103-111.

Ferreira-Dias, S., Sukumaran, R. (2017). *Developing magnetic nanoparticle immobilized enzyme catalysts for biofuel applications*. 13 diapositivos. Encontro Ciência 2017, 4 de Julho, Lisboa, Portugal.

Franceschin, G., Sudiro, M., Ingram, T., Smirnova I., Brunner, G., Bertucco A. (2011). *Conversion of rye straw into fuel and xylitol: a technical and economical assessment based on experimental data*. *Chem. Eng. Res. Design*. 89 631-640.

Galbe, M., Zacchi, G. (2012). *Pretreatment: the key to efficient utilization of lignocellulosic materials*. *Biomass and Bioenergy*, 46, 70-78.

Geddes, C. C., Mullinnix, M. T., Nieves, I. U., Peterson, J. J., Hoffman, R. W., York, S. W., Ingram, L. O. (2011). *Simplified process for ethanol production from sugarcane bagasse using hydrolysate-resistant Escherichia coli strain MM160*. *Bioresource Technology*, 102, 2702–2711.

Gehlen, G., Robinson, C., Pinz, C., Lima, A., Silva, J. (2016). *Caracterização de Casca de Aveia, Carço de Azeitona e Carço de Pêssego para fins Energéticos*. Anais do 7º Forum Internacional de Resíduos Sólidos. Disponível em: <http://www.institutoventuri.org.br/ojs/index.php/firs/article/view/64/5>. Acesso a: 10/09/2018.

González, D., Santos, V., Parajó, J. C. (2011). *Manufacture of fibrous reinforcements for biocomposites and hemicellulosic oligomers from bamboo*. *Chemical Engineering Journal*, 167, 278–287.

GPP (2007). *Olivicultura Diagnóstico Sectorial*.

Gracelin D. H. S., John de Brito A., Kumar P. J. R. (2013) *Qualitative and Quantitative Analysis of Phytochemicals in Five Pteris Species*. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5: 105-107.

Imman, S., Arnthong, J., Burapatana, V., Laosiripojana, N., Champreda, V. (2013). *Autohydrolysis of Tropical Agricultural Residues by Compressed Liquid Hot Water Pretreatment*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 170, 1982–1995.

INE, IP (2018). *Estatísticas Agrícolas 2017*. Lisboa-Portugal.

Kamm, B., Gruber, P.R., Kamm M. (2006). *Biorefineries- Industrial Processes and Products*. Germany, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. (pp.1-497)

Kandhola, G., Dijoleu, A., Carrier, D.J., Kim, J.W. (2017). *Pretreatments for Enhanced Enzymatic Hydrolysis of Pinewood: a Review*. *BioEnergy Research*, 10(4), 1138-1154.

Kim, M., & Day, D. F. (2011). *Composition of sugar cane, energy cane, and sweet sorghum suitable for ethanol production at Louisiana sugar mills. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 38, 803–807.

Kirk, T., Farrell, R. (1987). *Enzymatic “combustion”: the microbial degradation of lignin. Annual Review of Microbiology*, 41, 465-505.

Korhonen, J., Honkasalo, A., Seppälä, J. (2016). *Circular Economy: The Concept and its Limitations. Ecological Economics*. 143: 37–46.

Kumar, S. (2018). *Sustainable Development of Green And Eco-Friendly Process for Biobutanol Production Utilizing Non-Edible Lignocellulosics*. Tese para o grau de Doutor em Filosofia. *Advanced Technology Development Centre Indian Institute Of Technology*, Kharagpur, India. 200 p.

Kumar, R., Wyman, C.E. (2009). *Effect of additives on the digestibility of corn stover solids following pretreatment by leading technologies. Biotechnology and Bioengineering*, 102(6). 1544-1557.

Limayem, A., & Ricke, S.C. (2012). *Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. Progress in Energy and Combustion Science*, 38, 449-467.

Mancilha, I. M., Karim, M. N. (2003). *Evaluation of ion exchange resins for removal of inhibitory compounds from corn stover hydrolyzate for xylitol fermentation. Biotechnology Progress*, 19, 1837–1841.

Manrich, A. (2012) *Produção de Xilo-Oligossacarídeos a Partir de Lignocelulósicos Pré-Tratados com Xilanases Imobilizadas e Estabilizadas*. Tese para obtenção do grau de mestre em Engenharia Química. Universidade Federal de São Carlos. São Paulo. 103 p.

Martins, P. (2015). *Otimização de processos hidrotérmicos para o fracionamento seletivo da palha de cana-de-açúcar*. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Alimentar. Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa. Lisboa, Portugal. 82 p.

Miranda, I., & Pereira, H. (2002). *The variation of chemical composition and pulping yield with age and growth factors in young Eucalyptus globulus. Wood and Fiber Science*, 34, 140-145.

Moniz, P., Pereira, H., Quilhó, T., & Carvalheiro, F. (2013). *Characterization and hydrothermal processing optimization of corn straw towards the selective fractionation of hemicelluloses*. *Industrial Crops and Products*, 50, 145–153.

Nabarlatz, D., Ebringerová, A., & Montané, D. (2007). *Autohydrolysis of agricultural by-products for the production of xylo-oligosaccharides*. *Carbohydrate Polymers*, 69, 20–28.

Niga, E. (2010). *Bioethanol from Lignocellulosic Biomass: A review*. p. 1-9.

Ogata, B. (2013) *Caracterização das frações celulose, hemicelulose e lignina de diferentes genótipos de cana-de-açúcar e potencial uso em biorrefinarias*. Dissertação para obtenção do grau de mestre em Ciências área de concentração: Ciência e Tecnologia dos Alimentos. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. São Paulo. 108 p.

Okuda, T. (2005). Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. *Phytochemistry*. 66: 2012-2031.

Pereira, H., Graça, J., Rodrigues, J.C. (2003). *Wood chemistry in relation to quality: Wood quality and its biological basis*. In: Jeronimidis, J.R.B. a. G. (ed) Barnett J.R. & Jeronimidis G. (Oxford: Blackwell Publishing., Ed.).

Prentice, N., D'Appolonia, B. L. (1977). *High-fiber bread containing brewers spent grain*. *Cereal Chemistry*, 54, 1084–1095.

Onda, A., Ochi, T., Yanagisawa, K. (2009) *Hydrolysis of Cellulose Selectively into Glucose Over Sulfonated Activated-Carbon Catalyst Under Hydrothermal Conditions*. *Topics in Catalysis*, 52, 801-807.

Pal, S., Mondal, A. K., Sahoo, D. K. (2016). *Molecular strategies for enhancing microbial production of xylitol*. *Process Biochemistry*. 51 809-819.

Pinto, P.C.R., Silva, E.A.B., Rodrigues, A.E. (2010). *Comparative Study of Solid-Phase Extraction and Liquid-Liquid Extraction for the Reliable Quantification of High Value Added Compounds from Oxidation Processes of Wood-Derived Lignin*. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 49, 12311-12318.

Qing, Q., Li, H., Kumar, R., Wyman, C. (2013). *Xylooligosaccharides Production, Quantification, and Characterization in Context of Lignocellulosic Biomass Pretreatment*. *Aqueous Pretreatment of Plant Biomass for Biological and Chemical Conversion to Fuels and Chemicals*. Primeira Edição.

Rabelo S, Filho R, Costa A. (2008). *Lime Pretreatment of Sugarcane Bagasse for Bioethanol Production. Appl Biochem Biotechnol*, 153, 139–150.

Ramos, S., Moulay L., Granado-Serrano A.B., Vilanova O., Muguerza B., Goya L., *et al* (2008). *Hypolipidemic effect in cholesterol-fed rats of a soluble fiber-rich product obtained from cocoa husks. Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, pp. 6985-6993

Ratnam, D., Ankola, D., Bhardwaj, V., Sahana, D. e Kumar M. (2006). Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: a pharmaceutical perspective. *Journal of Controlled Release*. 113: 189-207.

Regulamento (UE) nº 1308/2013, do Parlamento Europeu e do Conselho de 17 de dezembro de 2013 que estabelece uma organização comum dos mercados dos produtos agrícolas e que revoga os Regulamentos (CEE) n. o 922/72, (CEE) n. o 234/79, (CE) n. o 103797/2001, (CE) n. o 1234/2007 do Conselho.

Rodríguez, G., Rodríguez, R., Jiménez, A., Guillén, R., Fernandez-Bolaños, J. (2007). *Effect of steam treatment of alperujo on the composition, enzymatic saccharification, and in vitro digestibility of alperujo. J Agric Food Chem*. 2007, 55:136-42.

Sansoucy, R. (1985). *Olive by-products for animal feed. FAO Anim. Production Health*, 43, FAO, Rome.

Sharma, OP., Bhat, TK. (2009). DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chem.*, 113: 1202-1205.

Silva, E., Souza, J., Rogez, H., Rees, J. e Larondelle, Y. (2007). Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. *Food Chemistry*. 101: 1012-1018.

Singleton, VL., Rossi JA Jr. (1965). *Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. Am. J. Enol. Vitic*, 16: 144-158.

TAPPI 204 cm-97 (1997) *Solvent extractives of wood and pulp*. TAPPI Press, Atlanta, GA.

TAPPI 211 om-02 (2002). *Ash in wood, pulp, paper and paperboard: Combustion eat 525 °C*. TAPPI Press, Atlanta, GA.

TAPPI 222 om-02 (2002). *Acid-insoluble lignin in wood and pulp*. TAPPI Press, Atlanta, GA.

TAPPI UM 250 (1993). *Acid-soluble lignin in wood and pulp*. TAPPI Press, Atlanta, GA.

Weng, J.-K., Li, X., Bonawitz, N.D., Chapple, C. (2008). *Emerging strategies of lignin engineering and degradation for cellulosic biofuel production*. *Current opinion in Biotechnology*, 19, 166-172.

Zhishen, J., Mengcheng, T., Jinming, W. (1999). *The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxyde radicals*. *Food Chem.*, 64: 555-559.