



Otimização de meios de cultura para a produção de xilitol com base em hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de azeitona extratado

Ana Rita Colaço Morais

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Alimentar

Orientador: Doutora Florbela Carvalheiro

Co-orientador: Professora Doutora Luísa Louro

Júri:

Presidente: Doutora Maria Suzana Leitão Ferreira Dias Vicente, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Vogais: Doutora Maria Luísa Lopes de Castro e Brito, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;
Doutora Maria Luísa Louro Martins, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;
Doutora Florbela de Oliveira Carvalheiro Esteves Amaro, Investigadora Auxiliar do Laboratório Nacional de Engenharia e Geologia;
Doutor Pedro Lourenço, Técnico de Investigação e Desenvolvimento – UCASUL, União de Cooperativas UCRL.

Lisboa, 2012

“O conteúdo desta dissertação é da exclusiva responsabilidade da autora”

Agradecimentos

Uma vez que a realização deste trabalho apenas foi possível com o apoio e colaboração de diversas pessoas é com grande apreço que expresso os meus sinceros agradecimentos.

Em primeiro lugar o meu agradecimento vai para o Doutor Francisco Gírio pela oportunidade de realização do meu trabalho de dissertação de mestrado na Unidade de Bioenergia.

À Doutora Florbela Carvalheiro pela sua orientação, compreensão, simpatia e principalmente por tudo que me ensinou. Muito obrigada!

Ao Investigador Luís C. Duarte pela disponibilidade incondicional, boa disposição e profissionalismo.

Ao Doutor Rafal Lukasik, sempre disponível para me receber, vontade em ajudar e pela simpatia.

À professora Luísa Louro pela disponibilidade, apoio e simpatia.

Ao Doutor Pedro Lourenço por sempre se mostrar pronto a oferecer ajuda e pela informação transmitida sobre o projeto RefinOlea.

À Amélia, à Céu e à Margarida pelo apoio prestado a nível experimental.

A todos os meus colegas de laboratório nomeadamente o André, a Karen, a Patrícia, e a Mafalda pelo excelente ambiente de trabalho que proporcionaram e ajuda disponibilizada. À Filipa pela amizade e companheirismo.

À Sofia pela amizade, bom humor e apoio. Obrigada Sofia!

À Ivone que foi uma “professora” que sempre se disponibilizou a transmitir os seus conhecimentos. Foi sem dúvida uma “peça” fundamental na realização deste trabalho. Obrigada Ivone!

Aos meus pais e irmãos, os grandes responsáveis por tudo. Obrigada pelo apoio, dedicação e amor.

A todos vós, um grande MUITO OBRIGADO!

Lista de publicações

Parte dos resultados desta tese estão já publicados como:

- Lourenço, P., Martins, C., Carvalheiro F., Torrado, I., Telhada, J., Duarte, J., Duarte, L.C., Roseiro, L., Viegas, M., Moniz, P., Bernardo, P., Branco, P., C., Bogel-Lukasik, R., Morais, R., Marques, S., Silva-Fernandes, T., Guerra, V., Pinto, F., Lopes, H., Duarte, F., Neves, L., Fernandes, M., Ramos, P., Sengo, S., Brás, T. 2012 Valorization strategy by-products of olive oil extraction industry. Comunicação oral. Workshop internacional “Valorization of Mediterranean biowastes and effluents” IMAAW-The International Association of Mediterranean Agro-Industrial Wastes. Santarém, Portugal

Resumo

O bagaço de azeitona extratado (BAE) é o resíduo proveniente da indústria da extração de óleo de bagaço de azeitona, atualmente utilizado em aplicações energéticas, de baixo valor. Neste trabalho foi estudada a valorização da fração hemicelulósica deste material pela obtenção de hidrolisados ricos em pentoses passíveis de bioconversão em xilitol. Dado o elevado teor em compostos fenólicos, alguns de alto valor, estudou-se a pré-extração aquosa desses compostos. As condições otimizadas correspondem a 100°C, 60 min e uma razão líquido/sólido (RLS) de 5 g·g⁻¹. Para a obtenção de hidrolisados hemicelulósicos, o BAE com e sem PEA foi sujeito a uma hidrólise com ácido diluído (3,5% H₂SO₄), 130°C e 130 min, para diferentes RLS (3,4 e 5).

Foram estudadas várias metodologias para destoxificação dos hidrolisados, nomeadamente, adsorção com carvão ativado com NaOH e com HCl, resinas aniónicas, concentração por evaporação e membranas, e avaliado o seu impacto na produção de xilitol pela levedura *D. hansenii*, eventualmente após a adição de diferentes suplementos. A destoxificação com membranas foi o processo que permitiu a remoção mais significativa de compostos inibidores. A produtividade em xilitol mais elevada 0,30 g·L⁻¹·h⁻¹ (rendimento 0,42 g·g⁻¹) foi obtida para os hidrolisados destoxificados com resinas (pH 5,5) sendo o rendimento em xilitol mais elevado (0,57 g·g⁻¹) obtido nos hidrolisado destoxificado com membranas e suplementado com *corn steep liquor*, um suplemento de baixo custo que constitui uma vantagem em termos económicos.

Palavras-chave: Bagaço de azeitona extratado, compostos fenólicos, *Debaryomyces hansenii*, destoxificação, hidrolisados hemicelulósicos, xilitol

Abstract

The extracted olive pomace (EOP) is the by-product of the olive pomace oil extraction industry, currently used in low value energy applications.

In this work, it was studied the valorisation of hemicellulosic fraction of this material to development of the production of pentose-rich hydrolysates for subsequent bioconversion into xylitol. Given the high content of phenolic compounds, some high value-added, it was studied the aqueous pre-extraction (APE). The optimum conditions for APE were found at 100 °C, 60 min and a liquid to solid ratio (LSR) of 5 g·g⁻¹. To obtain hemicellulosic hydrolysates, it was studied for both APE-treated and untreated EOP using dilute sulphuric acid (3.5%, w/w) at 130°C for 130 min at different LSR (3, 4 and 5).

The hydrolysates obtained were detoxified using different methods which include the adsorption to NaOH and HCl activated charcoal, anionic resins, concentration by evaporation and membranes (nanofiltration). The impact of hydrolysis LSR, detoxification method and supplementation on xylitol production by the yeast *D. hansenii*, was evaluated. Nanofiltration was the method that enabled the highest removal of inhibitors. The highest xylitol volumetric productivity was 0.30 g·L⁻¹·h⁻¹ (yield 0.42 g·g⁻¹) was obtained for resin-detoxified hydrolysates (pH 5.5). The highest yield, 0.57 g·g⁻¹, was obtained for nanofiltration detoxified hydrolysates supplemented with corn steep liquor, a low-cost supplement with economic advantages.

Key-words: Extracted olive pomace, phenolic compounds, *Debaryomyces hansenii*, detoxification, hemicellulosic hydrolysate, xylitol

Extended Abstract

The extracted olive pomace (EOP) is the waste of the olive-pomace oil extraction industry. Currently it is produced in large amounts in Mediterranean countries, such as Portugal and it is mainly used as an energy source through combustion.

In order to assess its valorisation, within the biorefinery concept this work aims to develop an upgrading strategy for the hemicellulose fraction. The target product is xylitol, a compound with potential applications in the food, pharmaceutical and cosmetic industries.

As other ligocellulosic materials EOP contains cellulose, hemicellulose and lignin. The hemicellulosic content account for approximately 40% of all polysaccharides is particularly relevant and its challenging valorisation is studied in this work. EOP also contain an important amount of phenolic compound of which hydroxytyrosol an added value compound with anti-oxidant properties is the most important. This way, in order to avoid the contamination of the hydrolysates with phenolic inhibitors and also to test a simple and environmental friendly method to extract these compounds, an aqueous pre-extraction (APE) was also optimized. The optimum conditions were found for 100°C, 60 min and a liquid to solid ratio (LSR) of 5 g•g⁻¹. The chemical composition of solid residues as well as the extracts composition was assessed. In order to obtain pentose-rich hydrolysates, dilute acid hydrolysis using sulphuric acid was used for the selective hydrolysis of hemicelluloses. For untreated and pre-extracted EOP the effect of LSR on hydrolysate composition was studied. These results enable to establish the operational conditions to obtain a highly concentrated pentose-rich hydrolysate with low levels of inhibitors. The results showed that both hydrolysates obtained at a LSR 3 (with APE) and LSR 3 and 5 (without APE) were the best and were selected to be used in the fermentation studies. The first conditions allowed obtaining a monosaccharide-rich hydrolysate (65 g•L) with a lower content of phenolic compounds, as compared with the others but still containing relatively high concentrations of toxic compounds, particularly acetic acid. Even with an adequate methodology detoxification, it was suspected that the content of these inhibitor compounds would exert an inhibitory effect on the microbial metabolism. In order to avoid this inhibition another hydrolysate (obtained at LSR 5) was also chosen. Despite that the lower content of pentoses the amount of inhibitory compounds is considerably lower lying below the threshold of adaptability of the yeast. Both hydrolysates were detoxified by adsorption to NaOH-activated charcoal and the impact on growth and xylitol production by the yeast *D. hansenii*, was evaluated. Although detoxification enables an important removal of inhibitors, no growth was attained in the hydrolysates obtained at LSR 3. For this reason all other fermentation studies were carried out using hydrolysates obtained at LSR 5. To these hydrolysates other detoxification methods including the adsorption to HCl-activated charcoal, anionic resins, concentration by

evaporation and membrane techniques (nanofiltration) were tested and their impact on xylitol production was evaluated. Nanofiltration was the method that enabled the highest removal of inhibitors: 54% of acetic acid, 100% of furfural, 41% of hydroxymethylfurfural and 67% of phenolic compounds.

Under aerobic conditions, non-detoxified hydrolysates can sustain the growth and xylitol production although at low levels. More specifically, the volumetric productivity and yield of xylitol obtained were $0.14 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ and $0.30 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$. The highest xylitol volumetric productivity, $0.30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ (yield $0.42 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$) was obtained for resins detoxified hydrolysates (pH 5.5) demonstrating this method can remove an important part of inhibitors

With the aim of reducing the cost of culture media, the effect the supplementing the hydrolysate with several supplements was studied (TEVM, yeast extract, CSL and brewery extract). The CSL supplement increased in xylitol yield from $0.39 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ to $0.57 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ comparatively to TEVM. The highest xylitol yield ($0.57 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$) was obtained for nanofiltration detoxified hydrolysates supplemented with *CSL*, a low-cost supplement with economic advantages.

Índice geral

Agradecimentos	I
Lista de publicações	III
Resumo	V
Abstract	VII
Extended Abstract	IX
Índice geral.....	XI
Índice de figuras	XV
Índice de tabelas	XVII
Abreviaturas e siglas	XIX
Enquadramento.....	XXIII
1. Introdução	1
1.1. Biomassa	1
1.2. Conceito de biorrefinaria	2
1.3. Materiais lenhocelulósicos como matéria-prima para obtenção de produtos de valor acrescentado	4
1.3.1. <i>Estrutura e composição dos materiais lenhocelulósicos</i>	5
1.3.1.1. Celulose	6
1.3.1.2. Hemicelulose	7
1.3.1.3. Lenhina	9
1.3.1.4. Compostos de baixa massa molecular.....	10
1.3.1.5. Outros materiais poliméricos	11
1.4. Produção de azeite	11
1.4.1. <i>Sistemas de extração de azeite e subprodutos gerados</i>	12
1.4.1.1. Sistema tradicional de prensa hidráulica	12
1.4.1.2. Sistema de centrifugação contínuo de 3 fases	12
1.4.1.3. Sistema de centrifugação contínuo de 2 fases	13
1.4.1.4. Terminologia	13
1.5. Bagaço de azeitona.....	14
1.5.1. <i>Compostos fenólicos no bagaço de azeitona</i>	15
1.6. Valorização do bagaço de azeitona.....	15
1.7. Métodos de fracionamento dos materiais lenhocelulósicos	17
1.7.1. <i>Métodos ácidos</i>	17
1.7.1.1. Hidrólise com ácidos diluídos	19
1.7.1.2. Hidrólise com ácidos concentrados	20
1.7.2. <i>Métodos hidrotérmicos</i>	21

1.7.2.1. Autohidrólise	21
1.7.3. Métodos alcalinos.....	21
1.7.4. Métodos enzimáticos	21
1.8. Métodos de destoxificação	22
1.9. Xilitol	23
1.9.1. Propriedades e potenciais aplicações.....	24
1.9.2. Métodos de obtenção de xilitol.....	25
1.9.2.1. Síntese química	26
1.9.2.2. Produção biotecnológica	26
1.10. A levedura <i>Debaryomyces hansenii</i>	26
1.10.1. Metabolismo da D-xilose em leveduras	27
1.11. Variáveis que influenciam a produção biotecnológica de xilitol	28
1.11.1. Composição do meio de cultura.....	28
1.11.2. Efeito da limitação em oxigénio	29
1.11.3. Idade do inóculo	30
1.11.4. Concentração do inóculo	30
1.11.5. Temperatura e pH.....	30
2. Metodologia experimental	31
2.1. Matéria-prima	31
2.1.1. Caracterização granulométrica	31
2.2. Pré-extração aquosa	31
2.3. Hidrólise com ácido diluído.....	32
2.4. Produção de hidrolisado para o ensaio de bioconversão.....	32
2.5. Destoxificação dos hidrolisados	33
2.5.1. Acerto do pH.....	33
2.5.2. Tratamento com carvão ativado.....	33
2.5.3. Tratamento com resinas de troca aniónica	34
2.5.4. Tratamento com membranas.....	35
2.5.5. Concentração do hidrolisado	35
2.6. Processo fermentativo.....	35
2.6.1. Microrganismo	35
2.6.2. Preparação do inóculo.....	36
2.6.3. Avaliação do efeito da destoxificação do hidrolisado na produção de xilitol/polióis	36
2.6.4. Avaliação do efeito da suplementação do hidrolisado na produção de xilitol/polióis.....	37
2.6.5. Amostragem.....	38

2.7. Métodos analíticos	38
2.7.1. Caraterização química dos licores resultantes da pré-extração aquosa.....	38
2.7.1.1. Determinação dos extrativos em água	38
2.7.2. Caraterização dos licores resultantes da hidrólise ácida.....	38
2.7.2.1. Determinação da humidade	38
2.7.2.2. Doseamento de extrativos.....	38
2.7.2.3. Determinação do resíduo seco.....	39
2.7.2.4. Doseamento de compostos fenólicos.....	39
2.7.3. Determinação dos polissacáridos (<i>glucano, xilano, arabinano</i>) e grupos acetilo .	40
2.7.3.1. Determinação da lenhina Klason.....	40
2.7.3.2. Determinação da cinza.....	40
2.7.3.3. Determinação da proteína total	41
2.7.4. Determinação da concentração da biomassa celular	41
2.7.5. Doseamento de monossacáridos, compostos inibidores e produtos resultantes do metabolismo microbiano.....	41
3. Resultados e Discussão	43
3.1. Caraterização da matéria-prima	43
3.1.1. Caraterização granulométrica	43
3.1.2. Caraterização química	44
3.2. Pré-extração aquosa da matéria-prima	45
3.2.1. Otimização da pré-extração aquosa	46
3.2.2. Caraterização dos compostos fenólicos provenientes da PEA por eletroforese capilar de zona (CZE)	48
3.3. Hidrólise com ácido diluído do bagaço de azeitona extratado	49
3.4. Avaliação da destoxificação na remoção de compostos inibidores.....	53
3.5. Efeito da destoxificação na composição do hidrolisado- possível impacto na produção de xilitol.....	57
3.5.1. Efeito da destoxificação com carvão ativado com NaOH na produção de xilitol..	58
3.5.2. Efeito da concentração do hidrolisado na produção de xilitol.....	61
3.5.3. Efeito da destoxificação com carvão ativado com HCl na produção de xilitol.....	64
3.5.4. Efeito da destoxificação com resinas aniónicas na produção de xilitol.....	68
3.5.5. Efeito da destoxificação com membranas e suplementação na produção de xilitol	70
3.6. Resultados globais dos diferentes métodos de destoxificação e suplementação do hidrolisado de BAE na produção de xilitol por <i>D. hansenii</i>	73
4. Considerações finais e perspectivas	76
5. Referências bibliográficas	79

Anexos	89
I. Procedimento da destoxificação.....	89
II. Meios de cultura	90
III. Soluções e Reagentes utilizados	90
III.1. Solução de nutrientes.....	90
III.2. Solução de sais	91
III.3. Solução de NP	91
III.4. Solução de Mg	92
III.5. Solução de vitaminas e cálcio	92
III.6. Solução de extrato de levedura	92
III.7. Água de maceração de milho (CSL – Corn Steep Liquor)	93
III.8. Solução de extrato de dreche cervejeira	93
IV. Formulário	93
IV.1. Caracterização química da matéria-prima e resíduos sólidos	93
IV.2. Cálculo de rendimentos	94
IV.3. Parâmetros cinéticos e estequiométricos.....	97
IV.4. Determinação do diâmetro médio das partículas	98
V. Determinação da proteína total	99
VI. Doseamento de extrativos	100
VII. Determinação da concentração de compostos fenólicos	101

Índice de figuras

Figura 1.1 - Ilustração do conceito de biorrefinaria	2
Figura 1.2 - Principais constituintes químicos da biomassa vegetal.....	5
Figura 1.3 - Associação dos componentes na parede celular vegetal	6
Figura 1.4 - Representação da cadeia principal da estrutura da celulose	7
Figura 1.5 - Monómeros constituintes da lenhina	9
Figura 1.6 - Total de azeite produzido pelos principais países produtores da UE - dados da campanha 2011/2012.....	11
Figura 1.7 - Etapas do sistema tradicional de extração de azeite por prensagem	12
Figura 1.8 - Etapas do sistema de extração contínuo de 3 fases.....	13
Figura 1.9 - Etapas do sistema de extração contínuo de 2 fases.....	13
Figura 1.10 - Esquema do sistema de extração de óleo de bagaço de azeitona	16
Figura 1.11 - Mecanismo da reação para a despolimerização do xilano em meio ácido, com formação de uma molécula de xilose	18
Figura 1.12 - Reações de formação de HMF e furfural a partir dos açúcares correspondentes.....	19
Figura 1.13 - Fluxograma da produção de xilitol por via química e biotecnológica.....	25
Figura 1.14 - Representação esquemática do metabolismo da D-xilose em leveduras.	27
Figura 3.1- Caracterização granulométrica do bagaço de azeitona extratado.	43
Figura 3.2 - Perfis dos compostos fenólicos presentes nos licores após pré-extração aquosa	49
Figura 3.3 - Efeito da razão líquido/sólido e PEA no rendimento em sólidos (SY) e composição de glucano (Gn), xilano (Xn) e lenhina Klason (KL) no bagaço de azeitona extratado após hidrólise com ácido diluído.....	50
Figura 3.4 - Perfil de consumo de xilose (■), arabinose (▲), glucose (◆) e ácido acético (x), acumulação de xilitol (□) e de crescimento da levedura <i>D. hansenii</i> (O) em hidrolisado com RLS 5 (g·g ⁻¹) destoxificado com carvão ativado com NaOH	59
Figura 3.5 - Perfil de consumo de xilose (■), arabinose (▲), glucose (◆) e ácido acético (x), acumulação de xilitol (□) e de crescimento da levedura <i>D. hansenii</i> (O) em hidrolisado não-concentrado (A) e hidrolisado concentrado (1,5 vezes em massa) (B).	61
Figura 3.6. - Perfil de consumo de xilose (■), arabinose (▲), glucose (◆) e ácido acético (x), acumulação de xilitol (□) e de crescimento da levedura <i>D. hansenii</i> (O) em hidrolisado concentrado (2 vezes em massa) a pH 6,5 (C) e hidrolisado concentrado (2 vezes em massa) a pH 7,5 (D).	62
Figura 3.7 - Perfil de consumo de xilose (■), arabinose (▲), glucose (◆) e ácido acético (x),acumulação de xilitol (□) e de crescimento da levedura <i>D. hansenii</i> (O) em hidrolisado	

destoxificado e concentrado (2 vezes em massa) a pH 5,5 (A) hidrolisado destoxificado e concentrado (2 vezes em massa) a pH 6,5 com elevada disponibilidade de oxigénio(B) hidrolisado destoxificado e concentrado (2 vezes em massa) a pH 6,5 com baixa disponibilidade de oxigénio (C) e hidrolisado destoxificado e concentrado (2 vezes em massa) a pH 7,5 (D).	65
Figura 3.8 - Perfil de consumo de xilose (■), arabinose (▲), glucose (◆) e ácido acético (x), acumulação de xilitol (□) e de crescimento da levedura <i>D. hansenii</i> (○) em hidrolisado destoxificado com resinas aniónicas e concentrado (2 vezes em massa) a pH 5,5 (A) hidrolisado destoxificado com resinas aniónicas e concentrado (2 vezes em massa) a pH 6,5 (B).	69
Figura 3.9 - Perfil de consumo de xilose (■), arabinose (▲) e glucose (◆) e ácido acético (x), acumulação de xilitol (□), de crescimento da levedura <i>D. hansenii</i> (○) em hidrolisado suplementado com TEVM (A) hidrolisado suplementado com EL (B) hidrolisado suplementado com CSL (C) e hidrolisado suplementado com ED (D).	71
Figura I.1 - Procedimento experimental de nanofiltração (NF270).	89

Índice de tabelas

Tabela 1.1 - Produtos químicos de elevado valor acrescentado produzidos por via bioquímica.....	4
Tabela 1.2 - Exemplos de terminologias dos resíduos de lagares de azeite.....	14
Tabela 1.3 - Métodos de fracionamento de materiais lenhocelulósicos	17
Tabela 1.4 - Condições operacionais utilizadas na hidrólise com ácido diluído de diferentes materiais lenhocelulósicos.....	20
Tabela 2.1 - Dimensões dos peneiros usados na caracterização granulométrica.....	31
Tabela 2.2 - Tipologia e soluções de activação de carvão utilizadas.....	33
Tabela 2.3 - Hidrolisados utilizados como meio fermentativo para avaliar o efeito da destoxificação na produção de xilitol	37
Tabela 2.4 - Suplementos adicionados ao meio fermentativo.....	37
Tabela 2.5 - Condições de análise por eletroforese capilar de zona.....	39
Tabela 2.6 - Equipamento e condições de operação para as análises por HPLC.....	42
Tabela 3.1 - Composição química média do BAE.....	44
Tabela 3.2 - Efeito do tempo de pré-extração aquosa no rendimento em sólidos e na composição química, obtidos do bagaço de azeitona extratado.	46
Tabela 3.3 - Rendimento em açúcares dos licores resultantes da pré-extração aquosa.....	47
Tabela 3.4 - Rendimentos em açúcares, ácido acético, HMF e furfural na fração sólida e líquida, e de lenhina na fração sólida.	51
Tabela 3.5 - Concentrações ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) de monossacáridos, ácido acético, compostos fenólicos e furanos obtidos para a hidrólise ácida do BAE para diferentes razões líquido/sólido.....	52
Tabela 3.6 - Influência dos vários tratamentos de destoxificação na remoção de compostos inibidores e de monossacáridos totais presentes no hidrolisado	55
Tabela 3.7 - Composição dos hidrolisados utilizados como meio fermentativo para produção de xilitol.....	58
Tabela 3.8 - Influência da destoxificação com carvão ativado com NaOH nos parâmetros cinéticos e estequiométricos do crescimento e produção de xilitol pela levedura <i>D. hansenii</i>	60
Tabela 3.9 - Influência do processo de concentração nos parâmetros cinéticos e estequiométricos do crescimento e produção de xilitol pela levedura <i>D. hansenii</i>	63
Tabela 3.10 - Influência do processo de destoxificação com carvão ativado com HCl nos parâmetros cinéticos e estequiométricos do crescimento e produção de xilitol pela levedura <i>D. hansenii</i>	67

Tabela 3.11 - Influência do processo de destoxificação com resinas aniônicas nos parâmetros cinéticos e estequiométricos do crescimento e produção de xilitol pela levedura <i>D. hansenii</i>	69
Tabela 3.12 - Influência suplementação nos parâmetros cinéticos e estequiométricos do crescimento e produção de xilitol pela levedura <i>D. hansenii</i>	72
Tabela 3.13 - Condições de produção de xilitol em hidrolisado de BAE.	75
Tabela I.1 - Características da membrana NF270	89
Tabela II.1 - Constituintes e quantidades aplicadas na preparação de 1000 mL de MQD	90
Tabela III.1 - Composição da solução de sais 40 vezes concentrada.....	91
Tabela III.2 - Composição da solução de NP 20 vezes concentrada	91
Tabela III.3 - Composição da solução de Mg 40 vezes concentrada	92
Tabela III.4 - Composição da solução de vitaminas e cálcio 100 vezes concentradas.....	92
Tabela III.5 - Composição da solução de <i>Corn Steep Liquor</i>	93
Tabela V.1 - Reagentes utilizados na determinação da proteína total	99

Abreviaturas e siglas

A	Massa de amostra seca (g)
Abs	Absorvância num determinado momento
Abs₀	Absorvância inicial
Ara	Arabinose
Ara_R	Percentagem de arabinano solubilizada a arabinose (g por 100 g Arn _{MP})
Ara_T	Rendimento em arabinose (g por 100 g matéria-prima)
Arn	Percentagem de arabinano (g por 100 g sólido)
Arn_{MP}	Percentagem de arabinano na matéria-prima (g por 100 g matéria-prima)
Arn_R	Percentagem de arabinano não solubilizado (g por 100 g Arn _{MP})
Arn_T	Percentagem de arabinano (g por 100 g matéria-prima)
BA	Bagaço de Azeitona
BAE	Bagaço de Azeitona Extratado
BAH	Bagaço de azeitona húmido
CCMI	Coleção de Culturas de Microrganismos Industriais do LNEG
CSL	<i>Corn Steep Liquor</i>
CZE	“Capillary zone electrophoresis” (Eletroforese Capilar de Zona)
DMSO	Dimetil Sulfóxido
ED	Extrato de Dreche cervejeira
EL	Extrato de levedura
Furf_R	Percentagem de xilano convertido a furfural (g por 100 g Xn _{MP})
Furf_T	Rendimento em furfural (g por 100 g matéria-prima)
GAc	Percentagem de grupos acetilo (g por 100 g sólido)
GAc_{MP}	Percentagem de grupos acetilo na matéria-prima (g por 100 g matéria-prima)
GAc_R	Percentagem de grupos acetilo não solubilizados (g por 100 g GAc _{MP})
GAc_T	Rendimento em grupos acetilo (g por 100 g matéria-prima)
Glc	Glucose (g·L ⁻¹)
Glc_R	Percentagem de glucano solubilizado a glucose (g por 100 g Gn _{MP})
Glc_T	Rendimento em glucose (g por 100 g matéria-prima)
Gn	Percentagem de glucano (g por 100 g de sólido)
Gn_{MP}	Percentagem de glucano na matéria-prima (g por 100 g matéria-prima)
Gn_R	Percentagem de glucano não solubilizado (g por 100 g Gn _{MP})
Gn_T	Percentagem de glucano (g por 100 g matéria-prima)
GP	Grau de polimerização
HAc	Ácido acético
HAc_R	Percentagem de ácido acético recuperado na hidrólise (g por 100 g GAc _{MP})

HAc_T	Percentagem de ácido acético na matéria-prima (g por 100 g matéria-prima)
HAQ	Hidrolise ácida quantitativa
HFor	Ácido fórmico
HLev	Ácido levulínico
HMF	Hidroximetilfurfural (g·L ⁻¹)
HMF_R	Percentagem de glucano convertido a HMF (g por 100 g G _{nMP})
HMF_T	Rendimento em HMF (g por 100 g matéria-prima)
HPLC	Cromatografia líquida de alta pressão (“High Pressure Liquid Chromatography”)
LK	Lenhina Klason (g por 100 g sólido)
LKM_P	Lenhina Klason na matéria-prima (g por 100 g matéria-prima)
LK_R	Percentagem de lenhina Klason não solubilizada (g por 100 g LK _{MP})
LK_T	Rendimento em lenhina Klason (g por 100 g matéria-prima)
LNEG	Laboratório Nacional de Energia e Geologia
MADRP	Ministério de Agricultura Desenvolvimento Rural e das Pescas
Mg	Fonte de Magnésio
ML	Materiais Lenhocelulósicos
MQD	Meio quimicamente definido
NP	Fonte de Azoto e Fósforo
PEA	Pré-extração aquosa
P_f	Concentração final de produto (g·L ⁻¹)
PH	Peso de hidrolisado (g)
P_{sol}	Peso da solução (g)
Q_{Polióis}	Produtividade em polióis (g·L ⁻¹ ·h ⁻¹)
Q_S	Taxa volumétrica de consumo de substrato (g·L ⁻¹ ·h ⁻¹)
Q_X	Produtividade celular (g·L ⁻¹ ·h ⁻¹)
RLS	Razão Líquido/Sólido
S_f	Concentração final de substratos (g·L ⁻¹)
S_i	Concentração inicial de substratos (g·L ⁻¹)
t	Tempo (min)
T	Temperatura (°C)
t_f	Valor final do intervalo de tempo considerado (h)
t_i	Valor inicial do intervalo de tempo considerado (h)
UB	Unidade de Bioenergia
UCASUL	União de Cooperativas Agrícolas do Sul, Ucri
UV	Ultra Violeta
XDH	Xilitol-desidrogenase
X_f	Concentração final de biomassa (g·L ⁻¹)

X_i	Concentração inicial de biomassa (g·L ⁻¹)
Xilitol_f	Concentração final de xilitol (g·L ⁻¹)
Xilitol_i	Concentração inicial de xilitol (g·L ⁻¹)
X_n	Percentagem de xilano (g por 100 g sólido)
X_{nMP}	Percentagem de xilano na matéria-prima (g por 100 g matéria-prima)
X_{nR}	Percentagem de xilano não solubilizado (g por 100 g X _{nMP})
X_{nT}	Percentagem de xilano (g por 100 g matéria-prima)
XR	Xilose-redutase
Xyl	Xilose
Xyl_R	Percentagem de xilose recuperada na hidrólise (g por 100 g X _{nMP})
Xyl_T	Rendimento em xilose (g por 100 g matéria-prima)
Y_{polióis}	Rendimento em polióis (g·g ⁻¹)
Y_S	Rendimento em sólidos (g sólido recuperado por 100 g matéria-prima)
Y_{X/S}	Rendimento celular (g·g ⁻¹)
ρ_H	Massa volúmica do hidrolisado (g·L ⁻¹)

Enquadramento

Este trabalho foi realizado na Unidade de Bioenergia (UB) do Laboratório Nacional de Energia e Geologia (LNEG), no âmbito do projeto “RefinOlea – Valorização Integrada de Resíduos da Extração de Azeite”, QREN 5450 (2009-2012), projeto em co-promoção com a UCASUL – União de Cooperativas Agrícolas, Ucl., Alvito, financiado no âmbito do Sistema de Incentivos à Investigação e Desenvolvimento Tecnológico – Projetos em Co-promoção.

O projeto RefinOlea pretende avaliar possibilidades de valorização da biomassa disponível na empresa Mariano Lopes e Filhos/UCASUL resultante da extração de óleo de bagaço de azeitona e estudar formas de as implementar de um modo técnico e economicamente viável, nomeadamente:

- Processos de pré-tratamentos da biomassa (hidrotérmicos e ácido diluído);
- Destoxificação e concentração de hidrolisados recorrendo a técnicas de membrana;
- Estudos de sacarificação enzimática do Bagaço de Azeitona Extratado (BAE).

Deste modo, no âmbito deste projeto, o presente trabalho tem como principais objetivos:

- Caracterização físico-química do Bagaço de Azeitona Extratado (BAE);
- Otimização da pré-extração aquosa (PEA) de compostos fenólicos da matéria-prima;
- Estudo do efeito da razão líquido/sólido e do tratamento de PEA na hidrólise ácida seletiva da hemicelulose do BAE para obtenção de um hidrolisado rico em pentoses;
- Caracterização química dos hidrolisados e resíduos sólidos obtidos;
- Estudo de métodos de destoxificação para a remoção dos inibidores do hidrolisado.
- Avaliação da viabilidade desse hidrolisado para a produção de xilitol, pela levedura *Debaryomyces hansenii* CCMI 941;
- Estudo do efeito da suplementação na produção de xilitol.

1. Introdução

Nos últimos anos tem-se assistido a um aumento do consumo dos recursos naturais resultante do desenvolvimento da atividade industrial, das flutuações nos mercados de aprovisionamento de combustíveis fósseis bem como das exigências em termos ambientais criadas por força das alterações climáticas a nível global. Esta conjuntura tem aumentado a preocupação pelo esgotamento dos combustíveis fósseis, conduzido a uma tendência para a escassez em determinados bens e a uma tentativa para um maior e melhor aproveitamento dos recursos naturais, nomeadamente para fins energéticos e para a obtenção de bens transacionáveis.

1.1. Biomassa

Desde a década de 70 que as questões críticas relativas ao esgotamento de recursos fósseis bem como às emissões de gases de efeito estufa estimularam um grande interesse na exploração de fontes alternativas de energia renovável tais como a biomassa vegetal. A biomassa constitui uma fonte renovável de produção energética para a obtenção de eletricidade, calor ou combustível, sendo muito variado o leque de produtos utilizáveis como matérias-primas para este fim, oriundos em larga medida da atividade agrícola, silvícola, pesca e respetivas fileiras industriais. Esta caracteriza-se pelo seu baixo custo associado, por ser renovável e abundante ao contrário de outras fontes energéticas (Binod *et al.*, 2010; Duff *et al.*, 1996).

A biomassa constitui um recurso importante para o futuro aprovisionamento energético da Europa pois pode satisfazer uma parte relevante de energia na União Europeia (EU) (Angelini *et al.*, 2009). Estima-se que a produção anual de biomassa vegetal em todo o mundo seja cerca de 220 biliões de toneladas de matéria orgânica seca, dos quais apenas 1,25% são aproveitados, tanto para fins alimentares, como para outros fins industriais ou energéticos (Himmel *et al.*, 2007).

Quanto a Portugal, existem poucos dados relativamente à produção de biomassa vegetal mas estima-se que em 2004 a produção de resíduos agroindustriais tenha sido de 4×10^5 t (Duarte *et al.*, 2007). Uma vez que uma quantidade considerável de resíduos industriais e agroindustriais, bem como os diversos subprodutos de origem lenhocelulósica, não são aproveitados adequadamente, podem constituir um problema ambiental, para qual não existe uma solução adequada. O aproveitamento destes materiais deve garantir a produção de produtos de valor acrescentado bem como a sustentabilidade ambiental (Carvalho *et al.*, 2008).

1.2. Conceito de biorrefinaria

O aumento do consumo de combustíveis fósseis, a par com a quantidade de resíduos lenhocelulósicos suscetíveis de valorização conduziu ao desenvolvimento de unidades industriais designadas de biorrefinarias (Carvalho *et al.*, 2008; Gírio *et al.*, 2010; SIADEB, 2011).

Na literatura é possível encontrar várias definições para biorrefinaria. De acordo com a Agência Internacional de Energia (IEA) uma biorrefinaria consiste numa “instalação capaz de processar a biomassa de forma a integrar os seus processos de conversão e equipamentos para a produção de combustíveis, energia e produtos químicos. O conceito de biorrefinaria foi desenvolvido por analogia com as refinarias de petróleo que produzem múltiplos combustíveis e produtos derivados do petróleo. As biorrefinarias industriais foram identificadas como a via mais promissora para a criação de novas indústrias nacionais de base biológica. Através da produção de vários produtos, as biorrefinarias podem retirar vantagem dos diferentes componentes que constituem a biomassa e dos produtos intermédios e assim, maximizar o valor obtido a partir da matéria-prima”; ou segundo a Sociedade Ibero-Americanas para o Desenvolvimento das Biorrefinarias (SIADEB) uma biorrefinaria é uma “instalação industrial que procura a utilização integral da biomassa, de forma sustentável, para a produção concomitante de biocombustíveis, energia, materiais, e produtos químicos, preferencialmente de valor acrescentado (Figura 1.1)

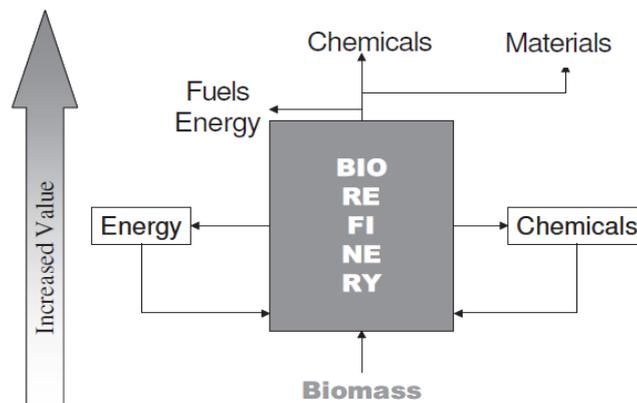


Figura 1.1 - Ilustração do conceito de biorrefinaria (Carvalho *et al.*, 2008)

Em diversos países mediterrâneos, incluindo Portugal a indústria extratora de óleo de bagaço de azeitona, a indústria de pasta de papel, fábricas de farinha de milho e as adegas ao produzir um leque de produtos alimentícios, ração animal e energia constituem exemplos de “proto-biorrefinarias” (Duarte, comunicação pessoal).

Dependendo da matéria-prima, dos processos tecnológicos e dos produtos obtidos, podem ser consideradas várias plataformas numa biorrefinaria, nomeadamente a plataforma dos açúcares (bioquímica), a termoquímica e do biogás.

A plataforma bioquímica e a termoquímica são consideradas das plataformas mais promissoras (Carvalho *et al.*, 2008). A plataforma dos açúcares baseia-se em processos de conversão bioquímica e o foco é dado à fermentação de açúcares extraídos da biomassa. Por sua vez, a plataforma termoquímica baseia-se na gaseificação da biomassa e dos subprodutos do processo de conversão ainda que outros métodos de conversão de biomassa tenham também sido descritos (Carvalho *et al.*, 2008).

As biorrefinarias encontram-se em franca expansão mundial, no qual a biomassa lenhocelulósica possui um lugar de destaque. Espera-se que venha a tornar-se um dos principais tipos de matéria-prima no futuro, uma vez que se encontra extensamente disponível e a custos moderados. Contudo, estas unidades industriais necessitam ainda de desenvolvimentos a nível científico e tecnológico de modo a superar as limitações com que atualmente se deparam, para que possam responder em pleno ao desafio que se lhes coloca: serem o principal motor do desenvolvimento da bioeconomia, tornando-se unidades industriais geradoras de emprego e riqueza (SIADEB, 2011), (<http://www.enterpriseeuropenetwork.pt>).

Exemplos de produtos que podem ser obtidos nas biorrefinarias, são os diversos biocombustíveis (etanol, biodiesel), glicerol, lípidos, óleos, ácidos orgânicos, furfural, isopropanol, vitaminas, polímeros de açúcares e de proteínas e combustíveis intermédios como o carvão e briquetes. Outros produtos que podem ter grande importância para as biorrefinarias são os plásticos e os agentes tensioactivos biodegradáveis, polímeros específicos, fibras novas e enzimas (Gravito *et al.*, 1999).

Um estudo recente demonstrou que só a partir dos açúcares dos materiais lenhocelulósicos, existem cerca de 300 produtos potencialmente passíveis de ser obtidos numa biorrefinaria. Entre estes, 12 foram considerados os mais vantajosos para serem obtidos por via bioquímica (Tabela 1.1). Trata-se de compostos que se caracterizam por apresentar múltiplos grupos funcionais, passíveis de transformação em novas famílias de moléculas úteis e que podem ser obtidos a partir de conversões químicas e/ou biológicas.

Tabela 1.1 - Produtos químicos de elevado valor acrescentado produzidos por via bioquímica

Produtos Químicos	
Ácido succínico, fumárico e málico	Ácido itacónico
Ácido dicarboxílico	Ácido levulínico
Ácido 3-hidroxiopropiónico	3-hidroxi-butírolactona
Ácido aspártico	Glicerina
Ácido gluctárico	Sorbitol
Ácido glutâmico	Xilitol / Arabitol

1.3. Materiais lenhocelulósicos como matéria-prima para obtenção de produtos de valor acrescentado

Designam-se por materiais lenhocelulósicos (ML) os diferentes tipos de biomassa de origem vegetal que têm como característica comum serem principalmente constituídos por polissacáridos (celulose e hemicelulose) e lenhina. Os ML representam cerca de 50% da biomassa vegetal global e tem uma produção anual estimada de 10-50 mil milhões de toneladas (Salanti *et al.*, 2010).

De acordo com a composição química e com as características físicas e mecânicas, estes materiais podem ser classificados em dois tipos principais: materiais lenhosos de origem resinosa ou folhosa e em materiais não-lenhosos (materiais herbáceos como os materiais agrícolas).

Os materiais lenhocelulósicos são usualmente considerados abundantes, facilmente biodegradáveis, de baixo custo e potencialmente valorizáveis. No entanto, devido às grandes quantidades processadas, podem constituir um problema ambiental, impondo assim um encargo significativo. De acordo com a sua origem, os subprodutos e os resíduos lenhocelulósicos podem ser também classificados em: florestais (gerados nas florestas e os provenientes das indústrias da pasta para papel e de transformação de madeiras, incluindo aparas, serradura), agrícolas (palhas, cascas, caules e espigas de cereais, podas de árvores de fruto e videiras), agroindustriais (bagaço de azeitona extratado, dreche cervejeira, polpa, casca e sementes de frutos e vegetais) e urbanos (papéis, cartões e lixo doméstico constituídos principalmente por celulose) (Duarte *et al.*, 2007;Carvalho *et al.*, 2004b).

Nos últimos anos tem havido um interesse crescente pelos resíduos agroindustriais devido à elevada quantidade produzida anualmente, possibilidade de valorização, disponibilidade de matéria-prima de baixo custo e elevado potencial de bioconversão (Carvalho *et al.*, 2008). No entanto, estes materiais, como todos os ML em geral, possuem uma estrutura complexa

requerendo pré-tratamentos/ processos de fracionamento. Apesar das suas grandes potencialidades e dos avanços recentes nas tecnologias de valorização, nomeadamente biotecnológicas, estes materiais são pouco valorizados.

Anualmente são produzidas em todo o mundo cerca de 100×10^9 t de biomassa vegetal das quais apenas 7%, em média, são utilizados (www.westbioenergy.org), constituindo a maior parte, resíduos ou subprodutos de que fazem parte os resíduos florestais, agrícolas e agroindustriais. Em Portugal, os principais subprodutos agroindustriais são: a dreche cervejeira, o bagaço de uva sem álcool, a polpa de alfarroba, a casca de arroz, o repiso de tomate, o bagaço de azeitona extratado, a casca de frutos rijos, o engaço, a borra de vinho sem álcool e a grainha de uva. Os dados disponíveis indicam que em 2004 a produção destes foi de cerca de 4×10^5 t (Carvalho *et al.*, 2004b; Duarte *et al.*, 2007).

1.3.1. Estrutura e composição dos materiais lenhocelulósicos

A biomassa lenhocelulósica é constituída principalmente por polímeros de alto peso molecular como a celulose, hemicelulose e lenhina, e por outras substâncias de baixo peso molecular que estão presentes em pequenas quantidades nas quais se incluem os extrativos (compostos orgânicos) e a cinza (material inorgânico) (Figura 1.2) (Buzetki *et al.*, 2011; Sluiter *et al.*, 2010). A remoção dos primeiros requer a utilização de tratamentos químicos ou mecânicos visando a sua despolimerização ou solubilização total.

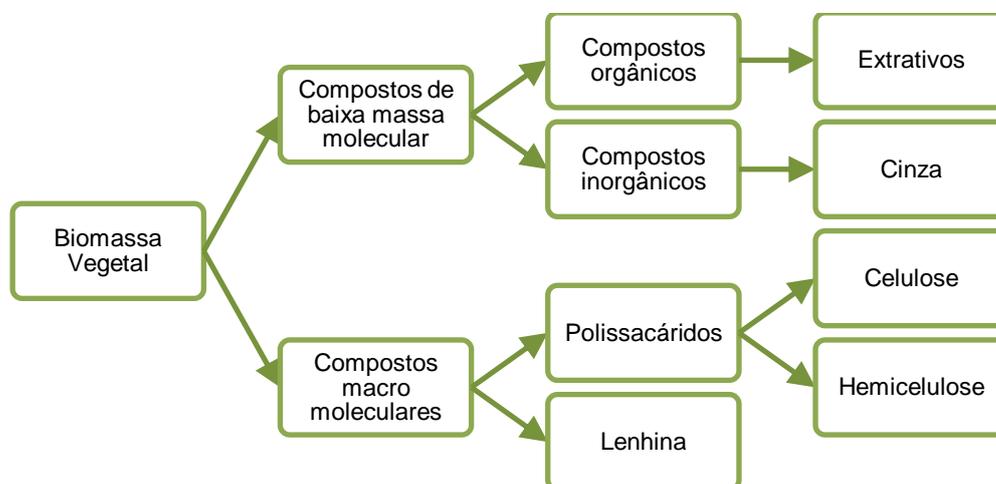


Figura 1.2 - Principais constituintes químicos da biomassa vegetal (Fengel *et al.*, 1984).

O teor dos diferentes componentes varia de acordo com o tipo de biomassa, fatores genéticos, condições de crescimento e origem geográfica das espécies vegetais (Saha, 2003). Mais especificamente, os materiais agrícolas são aqueles que em geral apresentam maior percentagem de hemiceluloses, as madeiras folhosas são as mais ricas em celulose enquanto que as madeiras resinosas apresentam maior teor em lenhina (Gírio *et al.*, 2010).

Em termos da organização dos polímeros, cada célula vegetal possui a sua própria parede celular que está fixa à parede da célula vizinha pela lamela média (Salmén *et al.*, 1985). A arquitetura da parede primária da parede vegetal é determinada, principalmente pela celulose que forma um sistema de fibrilhas entrelaçadas e por hemiceluloses. A hemicelulose envolve as microfibrilhas conferindo a elasticidade necessária ao crescimento celular (Gómez *et al.*, 2008).

A parede secundária é constituída por consecutivas camadas, formadas por uma matriz (lenhina) em torno das fibras de celulose. A hemicelulose permite a ligação entre a celulose e a lenhina (Figura 1.3).

Adicionalmente, as ligações de hidrogénio inter e intramoleculares são responsáveis pela manutenção das regiões cristalinas conferindo resistência à celulose.

O conjunto dos fatores anteriormente referidos permite a formação de um material recalcitrante dotado de uma elevada resistência aos diversos métodos de fracionamento e, por conseguinte, aos processos de bioconversão (Sannigrahi *et al.*, 2010).

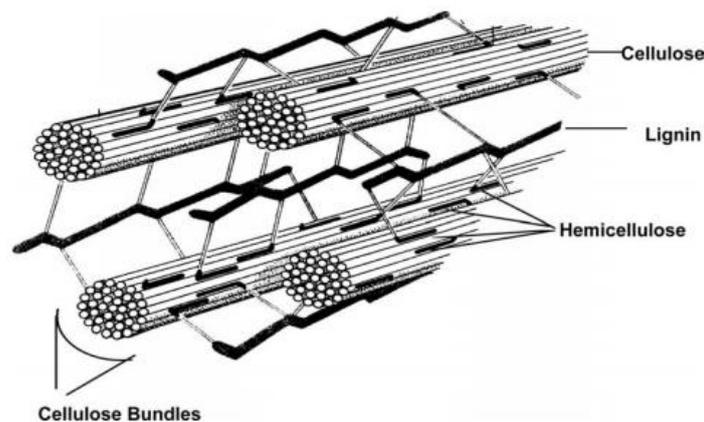


Figura 1.3 - Associação dos componentes na parede celular vegetal (Scott S., 2002)

1.3.1.1. Celulose

A celulose é um homopoliósido constituído por monómeros de β -D-glucopiranosose (forma cíclica da glucose) unidas por ligações glicosídicas β -1,4, formando uma cadeia com estrutura linear. Cada molécula de glucose apresenta uma rotação de 180° em relação às moléculas vizinhas pelo que a unidade básica de repetição da celulose é na realidade uma molécula de celobiose (Nag, 2008) (Figura 1.4). A extensão da cadeia de celulose é determinada pelo ser grau de polimerização que representa o número de unidades de

glucose que forma a cadeia polimérica. Esta pode variar entre 500-15000 Da de acordo com a origem, grau de maturação da parede celular, entre outros fatores (Buzetzi *et al.*, 2011).

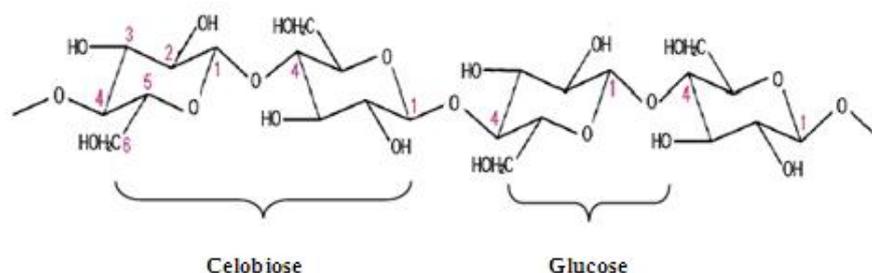


Figura 1.4 - Representação da cadeia principal da estrutura da celulose

Devido à linearidade da cadeia de celulose, as cadeias adjacentes formam um conjunto de agregados denominados de fibrilhas elementares. Por sua vez, a agregação das fibrilhas origina as microfibrilhas de celulose. As referidas microfibrilhas são na sua maioria independentes mas a sua ultra-estrutura é em grande parte devido à presença de ligações covalentes, ligações de hidrogénio e forças de *Van der Waals*. As ligações de hidrogénio no interior das microfibrilhas de celulose determinam a linearidade da cadeia, contudo as pontes de hidrogénio pode introduzir ordem (cristalina) ou desordem (amorfo) na estrutura da cadeia polimérica (Agbor *et al.*, 2011). A forma amorfa é facilmente degradada, sendo que a forma cristalina é mais resistente ao ataque químico e à degradação microbiana. Estima-se que 70% desta se encontre na forma cristalina e ordenada. Este fato significa que a celulose é insolúvel em água e na grande maioria dos solventes, porém é solúvel em ácidos, nomeadamente ácido sulfúrico e/ ou em outras soluções iónicas (Carvalho *et al.*, 2004b).

1.3.1.2. Hemicelulose

A hemicelulose é o segundo polímero mais abundante da biomassa lenhocelulósica (20-50%). É um polímero constituído a partir de vários açúcares, compreendendo dois grandes grupos: pentoses (β -D-xilose, α -L-arabinose) e hexoses (β -D-manose, β -D-glucose, α -D-galactose). Também apresenta pequenas quantidades de L-ramnose, L-fucose e de ácidos urónicos (ácidos α -D-glucorónico, α -D-4-O-metilglucurónico, α -D-galacturónico). Os grupos hidroxilo dos açúcares podem ser parcialmente substituídos por grupos acetilo (McCarthy *et al.*, 2000).

Entre os componentes estruturais da parede celular, a hemicelulose é a mais suscetível aos tratamentos químicos e termoquímicos. Esta característica é usualmente atribuída ao seu caráter amorfo e ao baixo grau de polimerização, permitindo que seja facilmente hidrolisável

em meios ácidos e solúvel em meios alcalinos, à temperatura ambiente. A sua solubilização total ocorre a partir dos 180 °C, embora a partir dos 150 °C ocorra a solubilização parcial.

De acordo a sua origem biológica (madeiras folhosas, resinosas ou materiais agrícolas), as hemiceluloses apresentam diferenças quanto à sua estrutura e composição. Os xilanos (*O*-acetil-4-*O*-metilglucuronoxilano) e os glucomananos (em menor quantidade) são as hemiceluloses predominantes nas madeiras folhosas. Nas resinosas, as principais hemiceluloses são os galactoglucomananos (*O*-acetil-galactoglucomano), contendo também alguns xilanos (arabino-4-*O*-metilglucuronoxilano). Estes últimos também se encontram maioritariamente nos materiais não-lenhosos, embora apresentem semelhanças com os xilanos das madeiras folhosas. Na maioria das madeiras folhosas e resíduos agrícolas cerca de 80% dos açúcares hemicelulósicos correspondem a xilose, pelo que é frequente associar o conteúdo em hemicelulose ao conteúdo em xilano (Touwaide, 2010; Moure *et al.*, 2006).

Xilanos

- *O*-acetil-4-*O*-metilglucuronoxilanos ou *glucuronoxilanos*. São os xilanos mais comuns e representam 15-30% da massa das madeiras folhosas. Consistem numa cadeia linear de unidades β -D-xilopiranosilo unidas por ligações glicosídicas β -(1,4). Algumas xiloses são acetiladas sendo que 8 a 17% do total de xilano encontra-se ligado a grupos acetilo e 10 % das moléculas de xilose possuem um ácido urónico (4- *O*-metilglucurónico). Este último é a unidade estrutural mais resistente à ação de ácidos. Para além destes componentes, o xilano pode conter, ainda, pequenas quantidades de L-ramnose, ácido ferúlico, *p*-cumárico e ácido galacturónico. Este último confere resistência às bases (Moure *et al.*, 2006; Sedlmeyer, 2011).
- *Arabino-4-O-metilglucuronoxilanos* ou *arabinoglucuronoxilanos*. Representam 5-10% da massa seca das madeiras resinosas, sendo constituídas por uma cadeia linear de unidades β -D-xilopiranosilo unidas por ligações glicosídicas β -(1,4). Podem conter pequenas quantidades de ácido galacturónico e ramnose mas não possuem grupos acetilo. Estas hemiceluloses estão também presentes nos materiais não-lenhosos mas possuem maiores quantidades de L-arabinose, sendo frequentemente designados por arabinoxilanos (Carvalho *et al.*, 2004b).

Glucomananos

- *O*-acetil-galactoglucomananos ou *galactoglucomananos*. Representam 20-25% da massa seca das madeiras resinosas. Consistem numa cadeia linear de unidades β -D-glucopiranosilo e β -D-manopiranosilo, unidas por ligações glicosídicas β -(1,4) (Alén 2000). Alguns glucomananos presentes são solúveis em água, tornando por

vezes difícil a distinção entre hemiceluloses solúveis em água e extrativos (Carvalho *et al.*, 2004b).

1.3.1.3. Lenhina

A lenhina consiste num heteropolímero complexo, aromático, amorfo, hidrofóbico e de difícil degradação, constituindo 10 a 25% da biomassa lenhocelulósica. É o principal constituinte da lamela média, unindo os elementos celulares entre si. Nos ML tem um papel fundamental de suporte mecânico, condução de solutos e de proteção a agentes exteriores nas plantas superiores (Fengel *et al.*, 1984).

Esta macromolécula é constituída por três monómeros diferentes compostos por um anel fenólico ligado a uma cadeia de três carbonos que possui um grupo hidroxilo (álcool) no carbono terminal (Figura 1.5).



Figura 1.5 - Monómeros constituintes da lenhina

O que distingue os três monómeros constituintes da lenhina é a ausência do substituinte metoxilo (álcool cumarílico), a presença de um metoxilo (álcool coniferílico) e a existência de dois grupos metoxilo (álcool sinapílico) (Fengel *et al.*, 1984).

A lenhina é constituída por fenilpropanos que preenchem os espaços na parede celular entre a celulose, as pectinas e as hemiceluloses e encontra-se covalentemente ligada à celulose (Ebringerová *et al.*, 2005).

Este polímero funciona como uma barreira física para proteger os hidratos de carbono e evitar a degradação da celulose e da hemicelulose, promovendo assim o fortalecimento da parede celular (Buzetzki *et al.*, 2011). Durante a polimerização, os monómeros podem associar-se a partir de ligações éter (na maioria através do oxigénio do grupo hidroxilo do anel fenólico) e ligações diretas carbono-carbono, conduzindo à formação de um polímero tridimensional e amorfo (Lara *et al.*, 2003). A degradação da lenhina, em meio aquoso ocorre a temperaturas superiores a 180°C ainda que essa degradação dependa da composição e da distribuição dos monómeros que a constituem (Hendriks *et al.*, 2009).

Devido à sua natureza química, a lenhina é um dos polímeros naturais mais resistentes a reações de hidrólise alcalina, ácida e enzimática, sendo mais suscetível do que os polissacáridos a reações de oxidação.

A lenhina é muito utilizada para combustão por apresentar um valor calórico elevado (7,1 kcal·g⁻¹). As propriedades físicas e químicas deste polímero permitem que seja utilizada em diferentes sistemas quer diretamente ou quer após modificações químicas (Weng *et al.*, 2008).

Desta forma, os produtos provenientes da lenhina podem competir com produtos similares produzidos, por exemplo, a partir do petróleo (Weng *et al.*, 2008).

1.3.1.4. Compostos de baixa massa molecular

Todas as espécies vegetais contêm pequenas quantidades de outras substâncias químicas nas suas paredes celulares além das macromoléculas que são designadas por extrativos. A sua presença depende de uma série de fatores entre os quais os de natureza genética e climática. Estes extrativos representam uma pequena percentagem da composição dos materiais lenhocelulósicos (normalmente inferior a 10%), mas têm uma influência significativa nas suas propriedades (Fengel *et al.*, 1984).

Os extrativos encontram-se na parede celular e dividem-se em duas classes: os extrativos solúveis em água e os extrativos solúveis em solventes orgânicos neutros (éter, acetona, etanol, metanol, hexano, entre outros). Estas substâncias podem ser lipofílicas e hidrofílicas e são consideradas como constituintes não-estruturais. Os extrativos podem ser divididos em terpenóides, compostos fenólicos, ésteres de ácidos gordos e alcaloides (Thomas, 1976). Dos extrativos fenólicos fazem parte compostos como os flavonóides e taninos. Os extrativos removíveis com solventes polares podem também estar presente nos hidratos de carbono na forma de monómeros (Fengel *et al.*, 1984).

Os materiais que não são comumente extratáveis com os agentes mencionados, são designados por compostos inorgânicos (cinza) (Fengel *et al.*, 1984). A cinza é obtida a partir da combustão na matéria orgânica. Esta é constituída principalmente por cálcio, potássio e magnésio, entre outros elementos e o total de todos os componentes da cinza constituem em geral menos de 10% dos resíduos sólidos secos. A quantidade e a composição da cinza dependem de uma série de fatores tal como a origem da matéria-prima, localização e as condições ambientais (fertilizantes e clima) (Fengel *et al.*, 1984; Thomas, 1976).

1.3.1.5. Outros materiais poliméricos

Os materiais lenhocelulósicos são também constituídos por outros polímeros, geralmente presentes em menores quantidades e muito mais variáveis tais como as pectinas, proteínas e amido.

As pectinas são compostas por cadeias lineares de ácido e em conjunto com as hemiceluloses e com a lenhina, interagem com as fibrilhas de celulose criando uma estrutura rígida que reforça a parede celular (de Vries *et al.*, 2001).

A parede celular contém uma gama de proteínas, a maioria das quais glicosiladas, que podem estar ligadas covalentemente, através de ligações cruzadas com a lenhina e com os polissacáridos desempenhando funções estruturais.

O amido localiza-se no endosperma, podendo ainda aparecer numa quantidade apreciável nos resíduos, nomeadamente nas cascas.

1.4. Produção de azeite

O azeite é um produto agrícola típico dos países mediterrâneos, sendo que, cerca de 95% da superfície oleícola mundial está concentrada na Bacia Mediterrânica. Os países produtores da União Europeia (UE) (Espanha, Itália, Grécia e Portugal) são responsáveis por 71% da produção mundial (Figura 1.6). Espanha é atualmente o maior produtor mundial e o responsável por 60% do total de azeite produzido na UE (COI, 2012). Em Portugal, a produção de azeite tem vindo a crescer, no qual se produziu cerca de 70 000 t de azeite na campanha de 2010/2011, o dobro do que se produzia em 2006. Prevê-se que na campanha de 2012/2013 sejam produzidos 75 000 a 80 000 t de azeite (www.faostat.org).

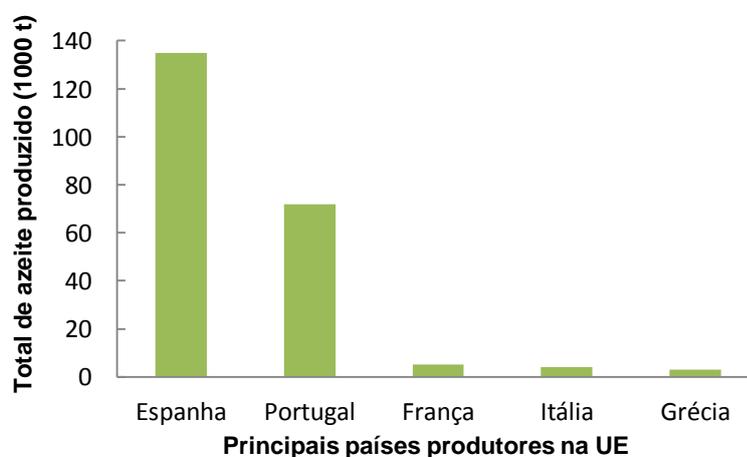


Figura 1.6 - Total de azeite produzido pelos principais países produtores da UE - dados da campanha 2011/2012 (COI,2012)

1.4.1. Sistemas de extração de azeite e subprodutos gerados

A extração de azeite pode ser feita por sistemas tradicionais de prensas ou por sistemas de centrifugação contínuos.

Independentemente do sistema utilizado, existe uma fase inicial comum aos três sistemas que compreende uma série de etapas que consistem na lavagem e limpeza da azeitona. Independentemente do sistema utilizado, os frutos são dilacerados e reduzidos a pasta por meio de uma moenda e batadura. A operação de moenda tem a finalidade de romper o fruto, permitindo a libertação das gotas de azeite que se encontram na polpa da azeitona. Segue-se depois a operação de termobatedura cujo objetivo é o aumento da percentagem de azeite livre, rompendo a emulsão azeite/água, facilitando, assim a separação de fases (Amirante *et al.*, 1993; Di Giovacchino, 1991; García, 2004).

1.4.1.1. **Sistema tradicional de prensa hidráulica**

Este sistema é o mais antigo e ainda muito usado nos lagares. A pasta de azeitona é colocada entre os capachos, que em condições apropriadas e sob ação de pressão, liberta o mosto oleoso (fase líquida constituída por azeite e água) que por decantação permite obter o azeite através da diferença de densidade. Na Figura 1.7 está representado, de forma sucinta, o sistema de extração por prensagem.

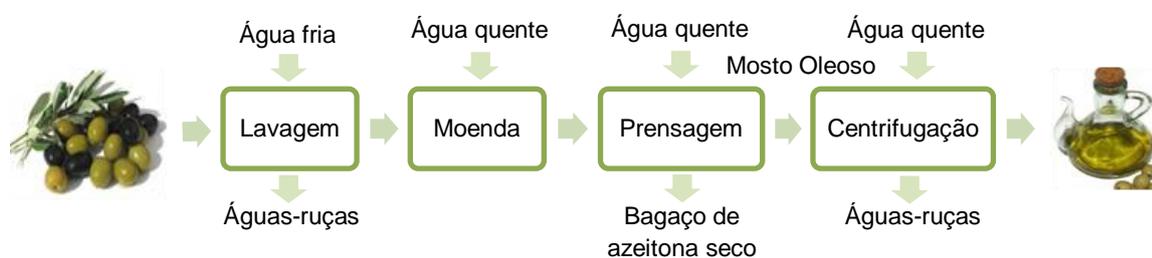


Figura 1.7 - Etapas do sistema tradicional de extração de azeite por prensagem

1.4.1.2. **Sistema de centrifugação contínuo de 3 fases**

Neste caso a pasta de azeitona moída e batida é sujeita à ação de uma centrífuga horizontal. Neste processo ocorre a adição de água quente de forma a facilitar a separação de fases dando origem ao azeite, bagaço de azeitona seco (valores médios de 50% de humidade e 3% de gordura) e águas ruças, daí a designação da centrifugação contínua de 3 fases (Albuquerque *et al.*, 2004). Na Figura 1.8 está representado o esquema do sistema de extração contínuo de 3 fases.



Figura 1.8 - Etapas do sistema de extração contínuo de 3 fases

1.4.1.3. Sistema de centrifugação contínuo de 2 fases

Este sistema apresenta uma grande vantagem relativamente ao sistema de 3 fases pois elimina a produção de águas-ruças. Para tal, são utilizadas centrífugas que permitem separar o azeite do resíduo que engloba os subprodutos (caroço, polpa, película e água ruça). Contudo, este bagaço apresenta um teor de humidade de cerca 70% superior ao bagaço seco, sendo designado por bagaço húmido. Na Figura 1.9 está representado, o esquema do sistema de extração de 2 fases.

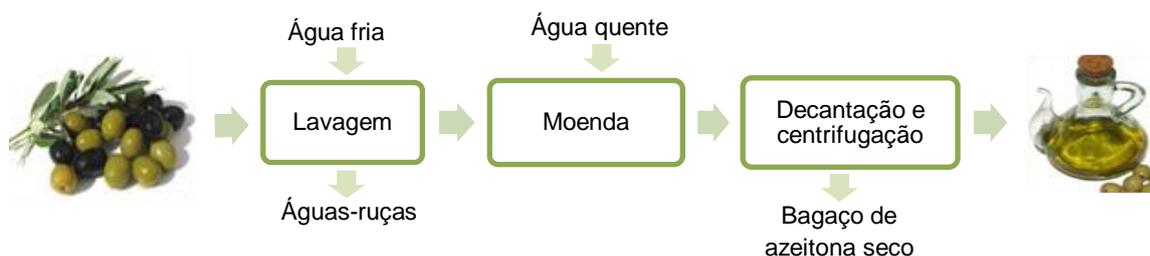


Figura 1.9 - Etapas do sistema de extração contínuo de 2 fases

Em Portugal, o sistema tradicional ainda é o mais utilizado. Embora as instalações que possuem o sistema de 2 fases, existam em número reduzido são responsáveis por 46% da produção nacional de azeite, estimando-se que a produção anual de bagaço húmido seja atualmente de 54 000 toneladas (Cegarra Rosique *et al.*, 2004;Albuquerque *et al.*, 2004).

Em Espanha, mais de 90% dos lagares operam com o sistema de 2 fases, o que significa uma produção anual de bagaço húmido de 2,5 a 6 x 10⁶ t (Albuquerque *et al.*, 2004). Contudo, a produção de bagaço de azeitona por este sistema quer em Itália quer na Grécia é insignificante (< 5%).

1.4.1.4. Terminologia

Na bibliografia existem muitas designações para os resíduos gerados nos lagares. Mesmo na literatura publicada na língua inglesa, a designação depende do país de origem, pelo que pode dificultar a perceção da proveniência do resíduo e das suas características. Estas diferenças justificam-se fundamentalmente pela coexistência de diversas tecnologias de

extração de azeite bem como da posterior extração da gordura residual do bagaço de azeitona, originando subprodutos com diferentes características.

Na Tabela 1.2. apresentam-se algumas das terminologias dos resíduos de lagares de azeite na bibliografia. Um exemplo claro desta problemática, é em Espanha onde o bagaço de azeitona húmido é designado por *alperujo*. Este termo resulta da combinação de *alpechin* (água-ruça) e *orujo* (bagaço). Esta terminologia demonstra de uma forma invulgar a proveniência do resíduo, que acaba por ser simplesmente a combinação dos dois resíduos dos sistemas anteriores.

Tabela 1.2 - Exemplos de terminologias dos resíduos de lagares de azeite.

Terminologia	Descrição	Designação atribuída	Referências
Olive Husk/Olive Pit/ Olive Stone (En)	Caroço; corresponde ao bagaço seco do sistema de extração contínua de três fases e prensa,	Bagaço azeitona seco	(Fernández-Bolaños <i>et al.</i> , 2004; Tyree, 1996)
Orujo (Sp) Pirina (Gr/Tr), Pomace (It), Grignons (Fr), Husks (It) Bagaço de três fases (Pt), OMW (olive mill waste),	Resíduo sólido resultante do sistema de extração contínua de três fases e prensa,	Bagaço azeitona seco	(Hepbasli <i>et al.</i> , 2003; Rodriguez-Rodriguez <i>et al.</i> , 2007).
Orujillo (Sp)	Bagaço dos sistemas de prensa e três fases sujeito a uma extração da gordura residual,	Bagaço de azeitona seco extratado	Fernández-Bolaños <i>et al.</i> , 2002)
Alperujo / Alpeorujo (Sp) TPOMW (two phase olive mill waste) (En), Bagaço de duas fases(Pt)	Bagaço procedente do sistema de extração de duas fases,	Bagaço de azeitona húmido	(Roig <i>et al.</i> , 2006)
DTPOMW (oiled olive mill waste) (En)	Bagaço húmido após extração do azeite residual	Bagaço de azeitona extratado	(Roig <i>et al.</i> , 2006)

En – Reino Unido; Gr/Tr – Grécia/Turquia; It – Itália; Sp – Espanha; Fr – França,

1.5. Bagaço de azeitona

O bagaço de azeitona (BA) é um subproduto semissólido proveniente do sistema de extração de azeite contínuo de duas fases. No final do processo, o bagaço encontra-se com um teor de humidade relativamente elevado, entre 25 a 55%, pelo que é designado por bagaço de azeitona húmido (BAH). Este resíduo tem uma consistência que se assemelha com lama espessa e contém 80% do tegumento de azeitona, incluindo película, polpa (30-35%) e caroço (30-35%), que podem ser separados e usados por exemplo como combustível sólido (Roig *et al.*, 2006; Vlyssides *et al.*, 2004). As referidas proporções dependem da variedade de azeitona, condições edafo-climáticas, sistema de extração adotado, entre outros. O bagaço de azeitona húmido pode ser um poluente relevante devido

à presença de uma grande quantidade de substâncias orgânicas (óleo, polifenóis, proteínas e polissacáridos) (Fernández-Bolaños *et al.*, 2006)

Este material é constituído maioritariamente por lenhina (13-15%) hemicelulose (15,3-38,7%), celulose (17,3-33,7%) e minerais (2,5%). Os principais componentes orgânicos de baixo peso molecular são os açúcares (3%), péptidos (1,5%), ácidos gordos voláteis (C2-C7) (1%), poliálcoois (0,2%), pigmentos (0,5%) e polifenóis (0,2%) (Rauter *et al.*, 2010). Porém, como referido anteriormente, as diversas características dos resíduos de lagares de azeite dependem de um enorme conjunto de fatores, podendo gerar uma grande variabilidade entre amostras.

1.5.1. Compostos fenólicos no bagaço de azeitona

Os compostos fenólicos têm sido alvo de estudos científicos devido à correlação da potencial atividade antioxidante e possíveis efeitos contras doenças degenerativas (Artajo *et al.*, 2007).

A ocorrência destes compostos no bagaço de azeitona depende de diversos fatores, entre os quais, o grau de maturação da azeitona, a cultivar, condições edafo-climáticas, tempo de armazenamento e método de extração de azeite (Obied *et al.*, 2005). Entre os vários compostos fenólicos, faz-se apenas referência ao hidroxitirosol por ser o composto maioritário da azeitona.

O hidroxitirosol ou *3,4-dihidroxifeniletanol* encontra-se na forma livre nas azeitonas em estado de maturação avançado devido a hidrólise da oleuropeína. Este composto tem despertado interesse na comunidade científica no âmbito da biodisponibilidade e metabolismo humano para estabelecer efeitos benéficos para a saúde (Miro-Casas *et al.*, 2003; Artajo *et al.*, 2007; De Leonardis *et al.*, 2008).

Para a extração destes compostos, os processos de natureza física surgem como alternativa, aos processos convencionais de extração que exigem a utilização de solventes a elevadas temperaturas que pode conduzir à termodegradação dos compostos de interesse. Assim têm sido desenvolvidos processos emergentes de extração tais como altas pressões hidrostáticas, ultrassons, pulsos de campo elétrico e extração com fluidos supercríticos.

1.6. Valorização do bagaço de azeitona

O bagaço de azeitona (BA) pode constituir uma fonte de lucro uma vez que há a possibilidade dos lagares venderem este subproduto a unidades industriais de extração de óleo de bagaço de azeitona. Contudo, este resíduo tem um valor comercial quase nulo (entre 0 e 25 €/t), dado que o seu armazenamento e transporte requer equipamento específico sendo necessário proceder-se a uma pré-secagem antes do processo de

extração de óleo de BA (Civantos López-Villalta *et al.*, 1992). A Figura 1.10 representa o esquema simplificado do processo de extração de óleo de bagaço e obtenção do bagaço extratado.

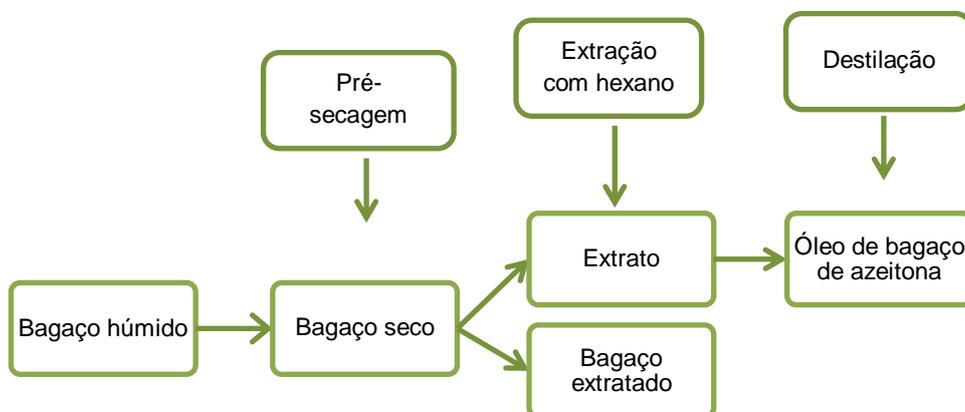


Figura 1.10 - Esquema do sistema de extração de óleo de bagaço de azeitona

Após a extração do azeite, o bagaço contém um teor de azeite residual (5 a 8%) que varia de acordo com o método de extração. Este azeite pode ser recuperado, após uma pré-secagem (400-800°C) em secadores horizontais até se atingir uma humidade de cerca de 8%, seguindo-se uma extração com solventes orgânicos, habitualmente com hexano (por ser seletivo e ter um baixo ponto de ebulição (60°C)), que permite obter o óleo de bagaço de azeitona bruto e um resíduo sólido designado de bagaço de azeitona extratado (BAE) (Albuquerque *et al.*, 2004; Cegarra Rosique *et al.*, 2004).

A incidência da problemática dos bagaços húmidos faz-se sentir maioritariamente no Alentejo e Trás-os-Montes, dada a relevância do azeite obtido pelo referido sistema de 2 fases. Esta situação foi ultrapassada no Alentejo com a entrada em funcionamento em 2001 de uma unidade de industrial de secagem (UCASUL – União de Cooperativas do Sul), que processa grandes quantidades de bagaço húmido produzidos na referida região. Também, na região Norte existem duas unidades de secagem que, praticamente escoam a totalidade dos bagaços húmidos (MADRP, 2007).

Atualmente, uma parte significativa deste material (50-60%) é utilizada diretamente nas indústrias para fins energéticos. O excedente é vendido para aplicações energéticas a um valor próximo dos 30 €/t (10-12% humidade) (Duarte *et al.*, 2007). O BA tem sido alvo de diversos estudos de valorização, nomeadamente: aplicação em solos agrícolas, tratamento termoquímico, biodegradação aeróbia e anaeróbia e de fracionamento tendo como objetivo a obtenção de produção de valor acrescentado e biocombustíveis (Fernández-Bolaños *et al.*, 2004; Niaounakis *et al.*, 2006; Roig *et al.*, 2006).

1.7. Métodos de fracionamento dos materiais lenhocelulósicos

Como referido anteriormente, o processamento dos ML, no âmbito de uma biorrefinaria, consiste na separação dos componentes poliméricos com base nas suas propriedades físicas e químicas, a fim de encontrar um aproveitamento individualizado tornando o processo mais rentável economicamente.

Inicialmente, os métodos de fracionamento designados por métodos de pré-tratamento tinham apenas como objetivo o aproveitamento da celulose. Hoje em dia, com o imperativo económico e ambiental para o aproveitamento de todas as frações, o pré-tratamento tem como objetivo tornar a biomassa sólida mais acessível aos tratamentos posteriores, quer sejam químicos, físicos ou biológicos (métodos de fracionamento). Mais especificamente, estes métodos visam a desconstrução da biomassa e, em geral, a libertação de açúcares diretamente ou subsequentemente a partir da celulose e/ou da hemicelulose. A hidrólise completa da celulose resulta em monómeros de glucose enquanto que a hidrólise da hemicelulose origina pentoses e hexoses (Taherzadeh *et al.*, 2007).

A hemicelulose constitui a fração polimérica mais facilmente hidrolisável que em conjunto com a celulose podem ser hidrolisadas em meio ácido, dando origem a uma mistura de açúcares. A lenhina, por sua vez, apenas é degradada por agentes alcalinos e por métodos oxidativos sendo que no caso de utilização de agentes oxidantes, os polissacáridos mantêm-se praticamente intactos.

De acordo com a fração que se pretende degradar, pode distinguir-se diversos métodos de fracionamento que visam a remoção e despolimerização parcial da hemicelulose, diminuição da cristalinidade da celulose (hidrólise) e a remoção da lenhina (deslenhificação) (Tabela 1.3). De acordo com o agente promotor da hidrólise estes métodos podem ser alcalinos, hidrotérmicos, ácidos (diluídos e concentrados) e enzimáticos.

Tabela 1.3 - Métodos de fracionamento de materiais lenhocelulósicos

Físicos	Químicos	Físico-químicos	Biológicos
Moagem	Ácido	Auto-hidrólise	Fungos
Irradiação	Alcalino	Explosão de vapor	Actinomicetes
Extrusão	Sais inorgânicos	Fluídos supercríticos	
	Organosolv		
	Líquidos iónicos		

1.7.1. Métodos ácidos

A hidrólise ácida pode ser dividida em dois grupos: hidrólise com ácido concentrado e hidrólise com ácido diluído. Esta última, por exemplo, utiliza concentrações de ácido baixas (0,5-1,5 %) e utiliza temperaturas elevadas (120-160 °C) e é a mais adequada para a

hidrólise da hemicelulose. Por outro lado, temperaturas moderadas e concentrações de ácido elevadas favorecem a hidrólise da celulose. Em ambos os casos pode ocorrer a formação de produtos de degradação dos açúcares e da lenhina. Como se verá mais adiante a sua formação depende da temperatura e da concentração de ácido utilizado (Sun *et al.*, 2002).

O ácido sulfúrico (H_2SO_4) é o catalisador mais utilizado, por ser barato e eficaz e apresenta diversas vantagens tecnológicas, nomeadamente não apresenta grandes problemas de segurança laboratorial quando comparado com outros ácidos. No entanto, o H_2SO_4 é tóxico e perigoso de manusear. Adicionalmente, a hidrólise ácida pode ainda ser levada a cabo com outros ácidos inorgânicos como ácido clorídrico (HCl), fosfórico (H_2PO_4) e trifluoroacético (TFA) (Fengel and Wegener, 1984). Também, os ácidos orgânicos fracos podem ser empregues na hidrólise com ácidos diluídos, ainda que os resultados fiquem aquém dos obtidos com ácidos inorgânicos (Carvalho *et al.*, 2008; Gírio *et al.*, 2010).

Mecanismo Reacional

A hidrólise ácida dos polissacáridos baseia-se no ataque de um protão à ligação glicosídica que une os monómeros dos polissacáridos. A Figura 1.11 mostra o mecanismo da reação da despolimerização do xilano em meio ácido, que consiste nas seguintes etapas: (i) protonação do oxigénio da ligação glicosídica; (ii) rutura da ligação referida com formação de uma carbocatião e de um polímero, oligómero ou monómero, dependendo da posição da ligação na cadeia polimérica (etapa determinante da velocidade de reação); (iii) solvatação do carbocatião com uma molécula de água; (iv) regeneração do protão e formação de uma molécula de xilose estável (Hendriks *et al.*, 2009).

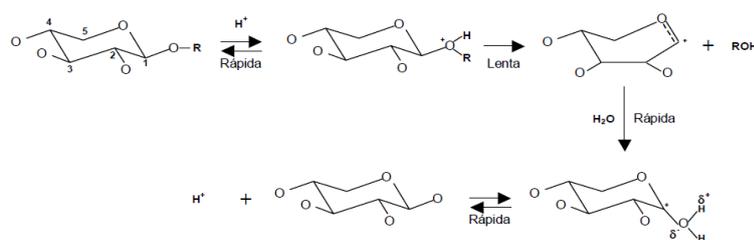


Figura 1.11 - Mecanismo da reação para a despolimerização do xilano em meio ácido, com formação de uma molécula de xilose (Hendriks *et al.*, 2009)

Formação de subprodutos do processo de hidrólise

As reações de desidratação de açúcares que dão origem à formação de furanos seguidas da formação de ácidos carboxílicos e remoção parcial da lenhina, são reações que ocorrem em meio ácido. O furfural e o 5-hidroximetil-2-furfural (HMF) são os furanos mais relevantes e são produzidos desidratação das pentoses e hexoses, respetivamente. A partir do HMF pode formar-se ácido levulínico e fórmico (Figura 1.12).

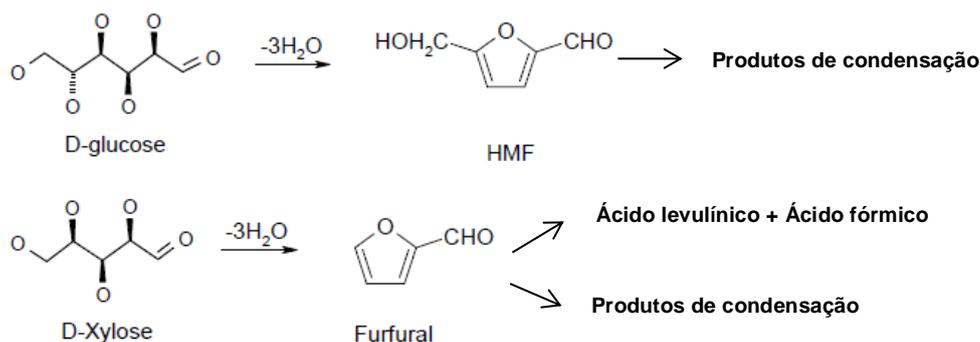


Figura 1.12 - Reações de formação de HMF e furfural a partir dos açúcares correspondentes

O ácido fórmico pode ainda ser formado a partir dos grupos metoxilo da hemicelulose e estes podem ser hidrolisados a metanol. O ácido acético é formado a partir da hidrólise dos grupos acetilo da hemicelulose, como consequência da desacetilação das pentoses.

A formação de compostos aromáticos resulta da degradação da lenhina, embora possa ser proveniente dos extrativos. Muitos destes subprodutos do processo de hidrólise são considerados compostos tóxicos/inibidores do crescimento microbiano (Taherzadeh *et al.*, 2007).

1.7.1.1. Hidrólise com ácidos diluídos

A hidrólise com ácido diluído é provavelmente o método mais difundido, entre os diversos métodos químicos. Este pode ser usado como método de pré-tratamento dos materiais lenhocelulósicos para posterior hidrólise enzimática da celulose. Não sendo eficiente na dissolução da lenhina pode afetar a sua estrutura e aumentar a suscetibilidade da celulose à hidrólise enzimática. Este método é igualmente eficaz na hidrólise seletiva da fração hemicelulósica para obtenção de monossacáridos e apresenta como vantagens o fato da formação de produtos indesejáveis e a corrosão dos equipamentos não ser significativa.

Porém, o rendimento em açúcares obtido depende do tipo de matéria-prima utilizada, bem como das condições operacionais (Akpınar *et al.*, 2011). Adicionalmente, para que a fermentação dos hidrolisados seja possível, é necessário proceder à neutralização ou remoção do ácido empregue no processo.

Na literatura é possível observar-se uma grande variedade de condições de hidrólise com ácido diluído para uma grande diversidade de materiais lenhocelulósicos. As diferenças encontram-se fundamentalmente no tipo de ácido utilizado, bem como na sua concentração, temperatura e duração da reação de hidrólise, como se pode observar na Tabela 1.4.

Tabela 1.4 - Condições operacionais utilizadas na hidrólise com ácido diluído de diferentes materiais lenhocelulósicos

Material	Ácido	Concentração de ácido (%)	Temperatura (°C)	Duração (min)	Referências
Resíduos agroindustriais					
Bagaço de azeitona	H ₂ SO ₄	3,5	130	130	(Guerra, 2011)
Carolo de milho	HCl	2	100	120	
Dreche cervejeira	H ₂ SO ₄	3	130	15	(Carvalho <i>et al.</i> , 2004a)
Palha de arroz	H ₂ SO ₄	3	140-145	20	(Roberto <i>et al.</i> , 1996)
Palha de trigo	H ₂ SO ₄				(Silva-Fernandes <i>et al.</i> , 2008)
Sorgo	H ₂ SO ₄	1,4	130	75	(Torrado <i>et al.</i> , 2010)
Sorgo	H ₃ PO ₄	6	134	300	(Vazquez <i>et al.</i> , 2007)
Madeiras Folhosas					
Eucalipto	H ₂ SO ₄	3	100-130	60	(Parajó <i>et al.</i> , 1997c)
Madeiras Resinosas					
Abeto	H ₂ SO ₄	2,4	200	30	(Palmqvist <i>et al.</i> , 1998)

A hidrólise da celulose pelo método com ácidos diluídos têm sido pouco explorada, uma vez que as temperaturas elevadas exigidas para que ocorra hidrólise da celulose requerem elevados custos energéticos e de construção dos equipamentos além de conduzirem a uma elevada formação de produtos indesejáveis.

1.7.1.2. Hidrólise com ácidos concentrados

A hidrólise da celulose e da hemicelulose pode ser alcançada pela ação de ácidos concentrados a temperaturas moderadas (20-50°C), produzindo um resíduo sólido constituído maioritariamente por lenhina. Este método é conhecido por poder permitir uma recuperação de açúcares elevada (Taherzadeh *et al.*, 2007) ainda que pequenas alterações na temperatura possam conduzir à formação de elevadas concentrações de produtos de degradação. Contudo, a concentração de ácido utilizada é bastante alta (30 a 70 %) e o aquecimento do ácido durante o processo, torna-o extremamente corrosivo. A solubilização completa dos polissacáridos é possível com diferentes concentrações, consoante o ácido utilizado, nomeadamente: 72% de H₂SO₄, 41% de HCl ou 100% no caso do TFA. Os últimos têm a vantagem de serem facilmente recuperáveis (Carvalho *et al.*, 2008).

A recuperação do ácido é fundamental por razões económicas. O elevado investimento e os custos de manutenção tem ainda reduzido o interesse comercial deste processo (Carvalho *et al.*, 2008).

1.7.2. Métodos hidrotérmicos

Os métodos hidrotérmicos englobam dois métodos (auto-hidrólise e a explosão de vapor) baseados na utilização de água, vapor, ou ambos, e calor. Permite uma solubilização substancial da fração hemicelulósica sem adição de catalisadores ácidos pelo que não é necessário o passo de neutralização tornando-se uma alternativa económica e ambientalmente atraente (Gírio *et al.*, 2010).

1.7.2.1. Autohidrólise

Neste processo os reagentes utilizados são apenas água e biomassa. As condições operacionais caracterizam-se por temperaturas elevadas (150-230°C) podendo o tempo de reação variar em função da temperatura utilizada (Garrote *et al.*, 1999). Deste processo pode resultar uma solubilização e recuperação da fração hemicelulósica entre 55-84%, sendo que a celulose e a lenhina se mantêm praticamente inalteradas no resíduo sólido (Parajó *et al.*, 1998a). Na fração líquida encontram-se, em geral, baixas concentrações de produtos indesejáveis e os açúcares estão fundamentalmente na forma oligomérica (Carvalho *et al.*, 2008).

1.7.3. Métodos alcalinos

Os métodos alcalinos podem ser divididos em dois grupos, dependendo do tipo de catalisador utilizado: tratamentos com soluções de hidróxidos (sódio, cálcio ou potássio) e tratamentos com amónia: AFEX (*ammonia fibre explosion*), ARP (*ammonia recycle percolation*) e SAA (*soaking in aqueous ammonia*). Estes processos promovem em geral uma maior dissolução da lenhina do que da fração hemicelulósica. Ocorre redução da cristalinidade da celulose, aumentando assim a superfície de contacto e a sua porosidade (Chen *et al.*, 1985). Neste tipo de sistema a recuperação das bases é fundamental para garantir a viabilidade económica do processo (Carvalho *et al.*, 2005b).

1.7.4. Métodos enzimáticos

A hidrólise enzimática é um processo biológico utilizado para hidrolisar a fração hemicelulósica e/ou celulósica. Este processo é economicamente vantajoso pois constitui uma tecnologia pouco dispendiosa a nível de equipamentos e de gastos energéticos. Além disso, é altamente seletivo e não ocorre formação de produtos inibidores. Atualmente, este processo tem grande interesse pois está associado ao processo de produção de etanol utilizando celulasas surgindo como um complemento aos métodos de pré-tratamento anteriormente descritos (Carvalho *et al.*, 2008). Contudo, em alguns materiais, o método enzimático não é o mais adequado para a hidrólise da fração hemicelulósica. Por um lado, a

ação das enzimas por si só, sem que ocorra qualquer tipo de pré-tratamento do material, não é eficaz. Por outro lado, a hidrólise das hemiceluloses e em particular, no caso do BAE, requer uma grande multiplicidade de enzimas acessórias para a hidrólise das ligações laterais sem a qual não é possível hidrolisar eficazmente a cadeia de xilano principal.

Independentemente do material, o recurso a enzimas enfrenta ainda alguns obstáculos como o seu custo e a sua recuperação no final do processo, bem como a morosidade deste (Carvalho *et al.*, 2008).

1.8. Métodos de destoxificação

A presença de compostos inibidores nos hidrolisados lenhocelulósicos pode colocar em causa a eficiência do processo de bioconversão. Ainda que seja possível utilizar diversas abordagens para minimizar os seus efeitos, nomeadamente, a utilização de condições de hidrólise moderadas, adaptação dos microrganismos aos hidrolisados, entre outras, a destoxificação é na maioria dos casos necessária. Por isso, a seleção de um método de destoxificação eficaz é de extrema importância pois acarreta custos relativamente elevados e pode afetar a viabilidade económica do processo.

Os métodos de destoxificação podem dividir-se em 3 classes: físicos (evaporação, separação por membranas), químicos (ajuste de pH, *overliming*, tratamento com carvão ativado e com resinas de troca iónica) e biológicos (uso de enzimas) (Mussatto *et al.*, 2004; Parajó *et al.*, 1997b).

O **ajuste de pH** consiste no acerto do pH do hidrolisado para um valor próximo da neutralidade e adequado ao crescimento microbiano. Como consequência pode ocorrer a precipitação de compostos fenólicos, metais pesados, furfural, acetato e terpenos sendo o precipitado posteriormente removido, por filtração. Este método é frequentemente utilizado em combinação com outros métodos pois, na maior parte dos casos, por si só não é suficientemente eficiente para a obtenção de um hidrolisado adequado para o processo de bioconversão (van Zyl *et al.*, 1988).

O método de “**overliming**” consiste na adição de uma base, normalmente hidróxido de cálcio, com o intuito de fazer subir o pH para valores de 9-12, seguida de uma acidificação posterior para valores de pH adequados para o processo de fermentação (Carvalho *et al.*, 2005a). Nestas condições, é favorecida a dissociação de ácidos fracos, como o ácido acético e a grande maioria dos compostos fenólicos, permitindo a sua remoção parcial (Larsson *et al.*, 1999; Palmqvist *et al.*, 2000).

O processo de destoxificação com **carvão ativado** consiste em colocar o hidrolisado em contacto com o carvão, em geral num processo descontínuo (Carvalho, 2005) ainda que o

hidrolisado possa ser tratado pela passagem numa coluna empacotada com carvão. Este processo é caracterizado por ser eficiente e de baixo custo mas a sua eficácia depende do método de ativação (na literatura encontram-se referenciados métodos de ativação com ácido), tempo de contacto, granulometria do carvão, concentração do carvão ativado, temperatura e pH do hidrolisado (Parajó *et al.*, 1996a). A interação entre os fatores acima descritos, influência de modo direto a adsorção dos compostos inibidores, sendo essencial a otimização das condições de operação (Mussatto *et al.*, 2004). Este tratamento é relativamente eficaz na remoção de compostos fenólicos, de derivados do furano (HMF e furfural), pigmentos e ácidos gordos livres (Mussatto *et al.*, 2004).

A **concentração** do hidrolisado, por exemplo utilizando evaporação sob vácuo é outro dos métodos para destoxificação do hidrolisado por permitir em geral, a remoção de compostos voláteis como o ácido acético, furfural e alguns compostos fenólicos (Larsson *et al.*, 1999). Permite ainda aumentar a concentração de açúcares no hidrolisado. Contudo, tem o inconveniente de conduzir ao aumento de compostos tóxicos não voláteis (extrativos e derivados da lenhina) e à redução do volume de hidrolisado (Carvalho *et al.*, 2005a; Parajó *et al.*, 1996b)

O tratamento com **resinas de troca iónica** é altamente eficaz na remoção dos ácidos alifáticos, em geral, mas destaca-se pela eficácia na remoção de compostos fenólicos, podendo dar origem a um hidrolisado cuja fermentação é similar a um meio livre de compostos inibidores. Em geral, as resinas de troca aniónica em comparação com outro tipo de resinas (catiónicas com diferente força iónica, resinas mistas, resinas sem grupos ionizáveis) são as mais eficientes na remoção dos diversos grupos de compostos inibidores (Carvalho *et al.*, 2005a).

O tratamento de destoxificação com **membranas** (nanofiltração) é uma tecnologia de destoxificação promissora e economicamente bastante competitiva. Este método permite separar moléculas de elevado peso molecular, nomeadamente entre 150 a 250 g·mol⁻¹, tendo diversas aplicações tais como separação de açúcares, aumento da concentração de monossacáridos e remoção de compostos tóxicos. Ainda que existam poucos trabalhos na literatura que estudem especificamente a destoxificação de hidrolisados utilizando estes métodos, está descrito a sua eficácia na remoção dos ácidos alifáticos, bem como de compostos derivados do furano (Mondal *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2011).

1.9. Xilitol

A produção de xilitol a partir de hidrolisados hemicelulósicos provenientes dos resíduos agroindustriais apresenta um elevado interesse económico. Este processo permite agregar

valor acrescentado a estes resíduos e promover o seu aproveitamento para obtenção de xilitol como de outros polióis, como o arabitol. No entanto, destes, o xilitol é o que apresenta maior interesse e valor comercial (Carvalho *et al.*, 2005a).

1.9.1. Propriedades e potenciais aplicações

O xilitol é um poliálcool (xilo-pentano-1,2,3,4,5-pentol, $C_5H_{12}O_5$) com poder adoçante similar ao da sacarose e superior ao de outros polióis como o sorbitol ou manitol. É encontrado na natureza em frutas e legumes e constitui um intermediário no metabolismo dos hidratos de carbono dos mamíferos de tal forma que os humanos adultos produzem em média, de cinco a quinze gramas de xilitol por dia (Carvalho *et al.*, 2005a; Pepper *et al.*, 1988).

Este poliól é também indicado para diabéticos uma vez que a sua metabolização é independente da insulina. Em termos energéticos, o xilitol caracteriza-se por ser também uma fonte de baixas de calorías (4,06 kcal) (Emodi, 1978).

A característica mais importante do xilitol reside no fato deste ser um adoçante anticariogénico, uma vez que não é metabolizado pelos microrganismos presentes na cavidade bucal, além de inibir a desmineralização dos dentes e impede o desenvolvimento de cáries existentes (cariostático), que o torna um agente importante em termos de saúde oral (Nigam *et al.*, 1995b).

A entalpia negativa em solução (-36,6 cal/g) constitui uma característica tecnológica importante pois confere um sabor com sensação de frescura similar ao do mentol, na cavidade bucal e nasal. Tal característica é desejável em inúmeros alimentos, tais como, gelados, refrigerantes, pastilhas elásticas, entre outros (Emodi, 1978). A entalpia negativa confere, também, elevada estabilidade térmica, elevada solubilidade em água (168 g por 100 mL, a 20 °C), viscosidade mais baixa que a sacarose em solução e a não participação nas reações de Maillard. O principal interesse do xilitol resulta das suas propriedades físicas, químicas e tecnológicas que tem vindo a incitar o interesse da indústria alimentar, principalmente, na produção de produtos de panificação, chocolates, iogurtes, gelados, compotas, pastilhas elásticas, entre outros. Este composto foi classificado pela *Food and Drug Administration* (FDA) como um aditivo do tipo GRAS (*Generally Regarded as Safe*), pelo que sua incorporação em alimentos é legalmente permitida (Carvalho *et al.*, 2005a). Outras aplicações tecnológicas importantes são na indústria farmacêutica e cosmética. Na primeira, o xilitol é utilizado como edulcorante, na formulação de suplementos dietéticos e principalmente em produtos de higiene oral como pastas dentífricas. Na indústria cosmética, a aplicação de xilitol em preparações cosméticas têm sido alvo de estudo, no sentido em que os polióis selecionados ajudam a melhorar a microbiota da pele impedindo o desenvolvimento de microrganismos patogénicos (Nigam *et al.*, 1995b).

Desde da década de 90, a produção anual mundial de xilitol situa-se nas 5000 toneladas (<http://www.scribd.com/doc/7314491/Xylitol-Technology>). Diversos países, nomeadamente, os Estados Unidos, Suíça, Finlândia, Alemanha, entre outros têm interesse na produção de xilitol em grande escala. A União Europeia é responsável por 50% da produção mundial de xilitol, sendo que a Ásia e os Estados Unidos são responsáveis por 30 e 20%, respetivamente.

O mercado do xilitol encontra-se em franco crescimento, sendo este estimado em 810 milhões euros/ano e o preço deste poliól encontra-se na faixa dos 7-10 €/kg, de acordo com o seu grau de pureza (Carvalho, comunicação pessoal).

Como o preço de mercado do xilitol é relativamente elevado (custo de produção cerca de 10 vezes superior ao da sacarose ou do sorbitol) (Parajó *et al.*, 1998b) este é normalmente utilizado em combinação com outros polióis.

1.9.2. Métodos de obtenção de xilitol

O custo elevado do xilitol bem como a baixa disponibilidade presente nas fontes naturais tornam o processo de extração direto economicamente inviável. Deste modo, têm sido desenvolvidos vários processos de produção, tais como a síntese química e a conversão biotecnológica da xilose. As etapas iniciais são comuns em ambos os processos, consistindo no fracionamento da biomassa lenhocelulósica para promover a hidrólise da hemicelulose, conduzindo à libertação da xilose (Figura 1.13).

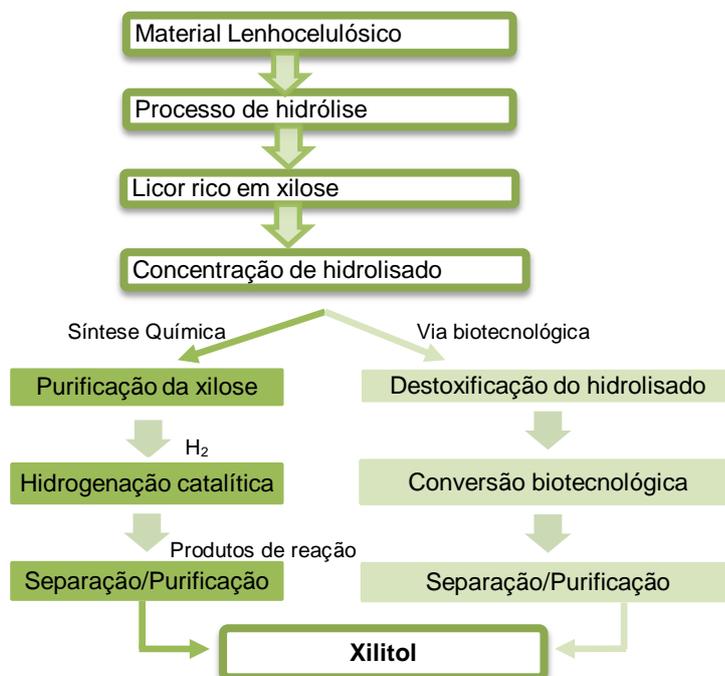


Figura 1.13 - Fluxograma da produção de xilitol por via química e biotecnológica (Parajó *et al.*, 1998a).

1.9.2.1. Síntese química

Até muito recentemente, o xilitol produzido à escala industrial era obtido a partir da redução química da xilose proveniente de hidrolisados hemicelulósicos principalmente a partir de madeiras folhosas (Hyvonen *et al.*, 1982;Carvalho *et al.*, 2004). Para além das etapas anteriormente descritas, o processo químico exige (Figura 1.13) a purificação da solução de xilose e uma purificação adicional para remoção de resíduos do catalisador e outros produtos, cuja formação ocorre durante o processo de hidrogenação (Parajó *et al.*, 1998c). Apesar deste processo ser o mais utilizado na indústria, a conjugação de todos estes fatores torna-o pouco competitivo.

1.9.2.2. Produção biotecnológica

Como alternativa ao processo químico, têm sido realizados estudos no sentido de desenvolver uma técnica menos dispendiosa e que seja possível de utilizar à escala industrial (Parajó *et al.*, 1998a). A produção biotecnológica de xilitol consiste em converter a xilose em xilitol mediante a utilização de microrganismos. Existem bactérias, fungos e leveduras que apresentam essa capacidade. As leveduras das espécies *Candida guilliermondi*, *Candida tropicalis* e *Debaryomyces hansenii* são referidas na literatura como as melhores produtoras de xilitol (Domínguez *et al.*, 1999).

Este processo constitui, por diversas razões, uma boa alternativa ao método químico tradicional pois reduz o impacto ambiental, minimiza o consumo de energia, dispensa a purificação inicial da xilose e podem ser utilizados microrganismos específicos para a conversão da xilose a xilitol. Este fato induz a um aumento do rendimento do produto o que facilita a sua separação (Parajó *et al.*, 1998a). Contudo, a via biotecnológica apresenta ainda desvantagens, nomeadamente, a morosidade do processo.

1.10. A levedura *Debaryomyces hansenii*

A levedura *Debaryomyces hansenii* (forma anamórfica: *Candida famata*) é uma espécie haploide e que se reproduz assexuadamente por gemulação multilateral. Este género é também caracterizado pela possibilidade de conjugação heterogâmica, isto é, conjugação de duas células de diferentes formas ou dimensões. O pseudomicélio está ausente, primitivo ou ocasionalmente bem desenvolvido (Breuer *et al.*, 2006). A espécie *D. hansenii* é constituída por duas variedades, var, *hansenii* e var, *fabryii*, distinguíveis em diversas propriedades, nomeadamente, na temperatura máxima de crescimento, (35 e 39 °C, respetivamente) e na mobilidade eletroforética da enzima glucose-6-fosfato-desidrogenase (Breuer *et al.*, 2006; Nakase *et al.*, 1985).

O principal habitat a que esta levedura aparece associada é o ecossistema marinho, embora possa ser encontrada também no solo, plantas e em diversos alimentos processados.

Devido à sua capacidade de metabolizar ácidos orgânicos e aminoácidos esta levedura tem diversas aplicações biotecnológicas importantes, nomeadamente em produtos de salsicharia e em diversos tipos de queijos (“picante da Beira Baixa”, “*Cheddar*” e nos queijos com fungos, em geral) (Encinas *et al.*, 2000; Freitas *et al.*, 1996). Adicionalmente, é a levedura mais comumente associada a produtos congelados (Guerzoni *et al.*, 1993).

A principal característica biotecnológica da referida levedura prende-se com a sua capacidade de metabolizar diversos monossacáridos presentes nos hidrolisados hemicelulósicos e utilizar de forma eficaz a xilose como fonte de carbono e energia (Breuer *et al.*, 2006). Este fato, torna esta levedura a mais importante para o processo de bioconversão de xilose em xilitol, como produto principal.

1.10.1. Metabolismo da D-xilose em leveduras

A D-xilose é o principal açúcar constituinte da fração hemicelulósica da biomassa vegetal (Spencer *et al.* 1988). A conversão dos açúcares depende da forma como se efetua o transporte através da membrana plasmática, dependendo de uma grande variedade de condições ambientais, entre as quais, a taxa de oxigénio disponível, valor de pH, temperatura, mistura de açúcares e concentração de etanol e ácido acético (Sonderegger *et al.*, 2004). O metabolismo da D-xilose em leveduras divide-se em dois passos fundamentais para a produção de xilitol: redução da D-xilose a xilitol pela enzima xilose-reductase (XR) dependente do NADPH e oxidação do xilitol em D-xilulose através da xilitol-desidrogenase (XDH) dependente do NADH (Figura 1.14). A presença de xilose induz a formação das referidas enzimas. O oxigénio é o fator que regula a indução destas enzimas, sendo o seu papel a regeneração dos cofatores fortemente depende da disponibilidade daquele gás.

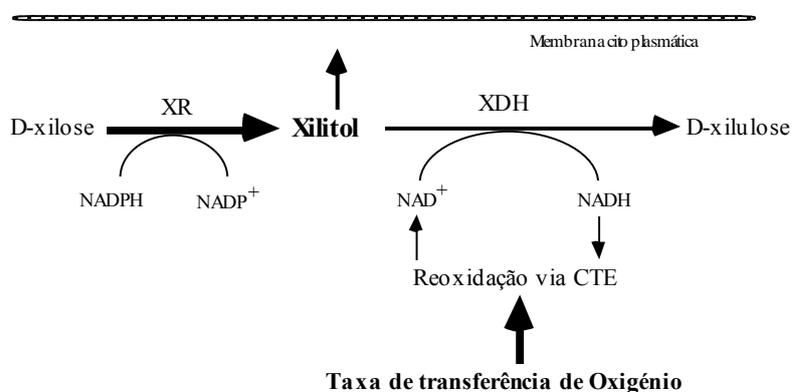


Figura 1.14 - Representação esquemática do metabolismo da D-xilose em leveduras.

As leveduras podem ser classificadas em dois grupos distintos de acordo com a especificidade da enzima XR para os cofatores e para as concentrações de produtos formados em diferentes condições de arejamento. Nas leveduras que possuem a enzima XR especificamente dependente do NADPH (*Candida tropicalis*, *C. guilliermondii*) (Amaral-Collaço *et al.* 1989), observa-se a acumulação do poliól em condições de limitação de oxigénio, pois nestas condições a capacidade da cadeia respiratória na recuperação do cofator NAD^+ é reduzida, diminuindo assim a atividade da enzima XDH e da taxa de conversão de xilitol em xilulose (Prior *et al.*, 1989). As leveduras em que a XR utiliza como cofatores o NADPH ou NADH, tais como *C. shehatae*, *P. tennophilus*, *P. stipilis* (Gírio e Roseiro 1993), o principal produto formado é o etanol. Uma vez que a XR da *D. hansenii* é dependente do NADPH, não ocorre fermentação da D-xilose em anaerobiose.

1.11. Variáveis que influenciam a produção biotecnológica de xilitol

A produção biotecnológica de xilitol constitui uma alternativa ao método químico. Contudo são-lhe reconhecidas diversas limitações que afetam o processo de bioconversão da xilose em xilitol. A produção de xilitol é afetada por fatores tais como a composição do meio de cultura, temperatura, pH do meio, disponibilidade de oxigénio, estirpe utilizada, idade do inóculo e respetiva concentração celular. Adicionalmente, fatores como a suplementação, a destoxificação e a concentração de açúcares, também influenciam o bioprocessamento (Parajó *et al.*, 1998a; Parajó *et al.*, 1998b; Parajó *et al.*, 1998c).

1.11.1. Composição do meio de cultura

O meio fermentativo deve ser constituído por nutrientes que satisfaçam as necessidades básicas dos microrganismos, nomeadamente, carbono, oxigénio, fosforo, entre outros. Elevadas concentrações de D-xilose favorecem o rendimento e a produtividade em xilitol, contudo, quando a concentração inicial deste açúcar é muito elevada esta pode ter um efeito inibidor (Winkelhausen *et al.*, 1998). Por outro lado, baixas concentrações de xilose no meio favorecem a produção de biomassa e conseqüentemente reduzem a formação de xilitol (Nigam *et al.*, 1995b). Os valores ótimos de concentração de xilose variam com as condições de cultivo e com a espécie de microrganismo utilizado. Para a obtenção de bons resultados na produção biotecnológica de xilitol é fundamental que a composição do hidrolisado hemicelulósico seja adequada para servir de meio de cultura. O grau de concentração dos hidrolisados afeta a concentração tanto do substrato como dos inibidores e os seus efeitos combinados podem conduzir a um ótimo de produção de xilitol ou a um decréscimo da produção como resultado da concentração de inibidores.

A presença de hexoses, nomeadamente a glucose ou manose, no meio de fermentação podem inibir o processo de bioconversão por repressão da atividade da XR, conduzindo num baixo rendimento em produto (Prior *et al.*, 1989). Em meios constituídos por glucose e xilose, a glucose é consumida preferencialmente e quando em concentrações elevadas pode conduzir à diminuição considerável da assimilação da xilose (Tavares *et al.*, 2000)

A concentração de xilitol no hidrolisado também pode ter influência nos resultados da bioconversão de xilose em xilitol, quando a concentração de xilitol no meio ultrapassa os 50 g·L⁻¹, sendo a causa sugerida para a inibição a falta e transporte do xilitol através da membrana (Nigam *et al.*, 1995a). Além do xilitol, pode também ocorrer a formação de produtos secundários em pequenas quantidades, tais como arabitol, ribitol, glicerol e etanol, que podem ser usados como fonte de carbono (Nolleau *et al.*, 1993).

A bioconversão da xilose em xilitol é afetada pela adição de suplementos ao meio. Porém, é de salientar que o tipo de suplemento adicionado deve ser alvo de estudos prévios para determinar as concentrações mínimas necessárias e o tipo de suplementação mais adequado, de forma a garantir a minimização dos custos de suplementação e consequentemente, o custo final do processo sem comprometer a produção de xilitol. A adição de fontes de azoto e fósforo tem demonstrado potenciar o processo de bioconversão independentemente da espécie de levedura utilizada, sendo que o extrato de levedura é um nutriente importante para a produção de xilitol (Tavares *et al.*, 1999). Podem ser utilizados outros suplementos tais como extrato de malte, peptona, casaminoácidos, e *corn steep liquor* (CSL) (Carvalho *et al.*, 2006; Tavares *et al.*, 1999). Para a otimização do meio para produção de xilitol a suplementação com vitaminas e oligoelementos pode também ser necessária (Preziosi-Belloy *et al.*, 2000)

1.11.2. Efeito da limitação em oxigénio

A taxa de arejamento conjugado com a concentração de substrato são parâmetros com elevada importância. Estes são fatores determinantes para a otimização da produção de xilitol, para qualquer espécie de levedura ou tipo de meio fermentativo. Diversos estudos demonstraram que as condições de arejamento para a maximização de xilitol devem corresponder a condições de semi-aerobiose, ou seja, condições de limitação de oxigénio (Nobre *et al.*, 2002; Winkelhausen *et al.*, 1998). É de realçar que o fornecimento do oxigénio constitui um parâmetro chave que determina se a xilose é respirada ou fermentada, pelo que é importante a determinação das condições de arejamento o que promoverá uma utilização balanceada do carbono quer para o crescimento como para a fermentação (Winkelhausen *et al.*, 1998).

1.11.3. Idade do inóculo

Este fator parece influenciar a atividade metabólica e a viabilidade das células, afetando as taxas de produtividade e os rendimentos da conversão (du Preez, 1994).

1.11.4. Concentração do inóculo

A concentração inicial do inóculo exerce uma forte influência no rendimento e produtividade da bioconversão da xilose em xilitol e depende de diversos fatores como o tipo de microrganismo, composição do meio e condições de fermentação (Parajó *et al.*, 1997a).

Elevada densidade celular nos meios conduz à limitação da disponibilidade de oxigênio traduzindo-se na diminuição da produtividade e do rendimento do processo, mas também à minimização do efeito inibitório de alguns componentes existentes nos substratos. Associado à composição inicial do inóculo, também a idade das células está relacionada com a atividade metabólica. Quando se varia a idade do inóculo observaram-se resultados diferentes, fato verificado em estudos com várias leveduras diferentes (Felipe *et al.*, 1996). Este fato pode ser explicado pelo decréscimo da atividade das enzimas XR e XDH sintetizadas pela referida levedura.

1.11.5. Temperatura e pH

Tanto o valor de pH e de temperatura tem uma forte influência no processo metabólico tal como na formação do produto. A temperatura de incubação a que as leveduras estão sujeitas influencia o seu crescimento, metabolismo, viabilidade e a capacidade de produzir xilitol (Felipe *et al.*, 1996). A gama de temperaturas mais adequada ao crescimento das leveduras situa-se entre 20 e 30 °C, embora tenha sido demonstrado em vários estudos que as leveduras têm uma capacidade produtiva na gama dos 24-45 °C, sendo a temperatura ótima próxima de 30 °C.

Geralmente, as leveduras são cultivadas em meios cujo pH se encontra entre 4 e 6, sendo o pH ótimo de crescimento da levedura *Debaryomyces hansenii* de 5,5 (Domínguez *et al.*, 1999). A influência do pH inicial nos hidrolisados hemicelulósicos para a conversão da xilose tem sido relacionada com a presença dos ácidos alifáticos, nomeadamente ácido acético. Este fato é crucial para a exequibilidade da bioconversão, no sentido em que a forma não-ionizada do ácido acético em meios de pH ácido pode atuar como inibidor do metabolismo da levedura (Gravitis *et al.*, 1999).

2. Metodologia experimental

2.1. Matéria-prima

A matéria-prima utilizada foi o bagaço de azeitona extratado (BAE). Durante a campanha de 2011/2012 foram recolhidas diversas amostras, que após processamento constituíram o lote estudado, disponibilizado pela União de Cooperativas Agrícolas, Ucl (UCASul), Alvito, Beja. Este permaneceu armazenado em sacos de 25 kg e à temperatura ambiente tendo sido posteriormente caracterizado de acordo com a sua composição granulométrica e química.

2.1.1. Caraterização granulométrica

Para a caraterização granulométrica da matéria-prima, utilizaram-se 100 g de BAE que foram separados durante 20 min, com recurso a um agitador de peneiros (Endecotts, ECVS1, Inglaterra) e a sete peneiros com 20,3 cm de diâmetro e (Retsch, ASTM E11, Alemanha) e colocados em série de acordo com o diâmetro do poro (Tabela 2.1). Os ensaios foram realizados em triplicado.

Tabela 2.1 - Dimensões dos peneiros usados na caraterização granulométrica

Peneiros	Diâmetro do poro (mm)	Diâmetro do poro (mesh)
1	0,250	63
2	0,500	35
3	0,710	25
4	1,00	18
5	1,60	12
6	2,36	8
7	3,55	6

Após separação, procedeu-se à pesagem da amostra retida em cada peneiro e posteriormente foi calculado a percentagem de BAE de cada fração.

De modo a produzir um lote de amostra uniforme para ser utilizado nos estudos de hidrólise e produção dos hidrolisados hemicelulósicos, procedeu-se de novo a várias separações por forma a obter a fração compreendida entre 1 e 3,55 mm. As frações maiores e menores foram descartadas. No total foram fracionados 20 kg de BAE de modo a trabalhar a fração escolhida ao longo do trabalho experimental.

2.2. Pré-extração aquosa

O BAE foi sujeito a uma pré-extração aquosa (PEA) para a remoção dos extrativos solúveis em água, fundamentalmente compostos fenólicos. Esta extração foi realizada em autoclave

(Uniclave, Portugal) utilizando uma RLS de 5 (g·g⁻¹), 100 °C e a diferentes tempo de pré-tratamento (30, 45 e 60 min). Após o tratamento, as frações sólida e líquida foram recuperadas por filtração rápida (Filter-Lab 1235) e quantificadas de forma a avaliar as perdas durante o processo. O licor (fração líquida) obtido foi submetido a uma segunda filtração, com filtros de 0,22 µm (Millipore, USA) e analisado por HPLC conforme descrito em 2.7.5. Foram doseados os compostos fenólicos de acordo com o método de *Folin-Ciocalteu* (2.7.2.4) e determinados os extrativos em água (2.7.1.1). O restante licor foi armazenado a 4 °C. Os resíduos sólidos (fração sólida) foram lavados com um volume fixo de água desmineralizada, secos a 5 ± 5 ° C, durante 48 h (estufa J.,P. – Selecta, S.A., Espanha) e pesados após ter permanecido à temperatura ambiente durante 24 h. Foi usado uma pequena quantidade da amostra das diferentes condições experimentais para a determinação da humidade (2.7.2.1). A restante amostra foi moída num moinho de facas (IKA, Alemanha) a partículas inferiores a 0,5 mm e caracterizada quimicamente, conforme descrito em 0. Todos os ensaios foram realizados, pelo menos, em duplicado.

2.3. Hidrólise com ácido diluído

O material foi hidrolisado em autoclave em frascos Schott (Alemanha) de 500 mL de capacidade, fechados com tampas Schott GL45 vermelhas (temperatura máxima admissível 200 °C). Foram testadas as razões líquido/sólido (RLS) 3, 4 e 5 (g_{BAE}·g_{sol.ácido}⁻¹). Antes de colocar na autoclave pesou-se o conjunto numa balança analítica (Sotel, Portugal). O tempo e temperatura de reação foram 130 min e 130 °C, respetivamente. De modo a minimizar as diferenças entre os diversos ensaios, os frascos foram colocados no interior da autoclave após esta atingir os 50 °C, registando-se o perfil tempo-temperatura entre os 100 e os 130 °C. Atingido o tempo de hidrólise pretendido desligou-se o aquecimento e registou-se o tempo de decréscimo da temperatura entre os 130 e os 100 °C e entre os 100 e os 90 °C. Após o arrefecimento dos frascos, a ocorrência de eventuais perdas foi registada através da sua pesagem. A mistura contida nos frascos foi prensada e a fração líquida (licor) foi caracterizada quanto à composição química (2.7.5) e valor de pH. Os resíduos sólidos foram lavados com um volume fixo de água desmineralizada, secos a 50 °C numa estufa durante 48 h e pesados após terem permanecido 24 h à temperatura ambiente. De cada ensaio foi usada uma amostra representativa para a determinação da respetiva humidade. A quantidade de amostra restante foi moída num moinho de facas (IKA, Alemanha) a partículas inferiores a 0,5 mm e caracterizadas quimicamente, como descrito em 0.

2.4. Produção de hidrolisado para o ensaio de bioconversão

A produção de hidrolisado para os ensaios de bioconversão foi realizada nas condições de tempo, temperatura e concentração de ácido previamente otimizadas (130 min, 130 °C e

3,5% de H_2SO_4 (p-p^{-1}) (Guerra, 2011) para a RLS 3 (com e sem pré-extração aquosa do BAE) e para a RLS 5 $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Foram realizados diversos ensaios de modo a obter o volume de hidrolisado necessário. No final de cada tratamento o conteúdo do frasco de hidrólise foi prensado (Sotel, Portugal) e filtrado (Filter-Lab 1235). Os hidrolisados obtidos nas mesmas condições de operação foram misturados de modo a obter um lote uniforme e armazenados a 4 °C até posterior utilização.

2.5. Destoxificação dos hidrolisados

2.5.1. Acerto do pH

O pH dos licores resultantes da hidrólise ácida (pH inicial de 0,8) foi acertado a 5,5 por adição de NaOH sólido, com agitação magnética. A adição progressiva de NaOH ao hidrolisado foi acompanhado por leituras constantes de pH até se atingir o valor pretendido (medidor de pH (Crison micropH 2002, Espanha)). Após o acerto de pH, os possíveis precipitados foram removidos por filtração com papel de filtro Filter-Lab 1235 (filtração rápida) e Filter-Lab 1242 (filtração lenta).

2.5.2. Tratamento com carvão ativado

O tratamento com carvão ativado envolve as etapas lavagem, ativação, destoxificação e recuperação do carvão. Neste trabalho foram utilizados dois tipos de carvões com diferente granulometria e ativados com diferentes soluções de ativação (Tabela 2.2).

Tabela 2.2 - Tipologia e soluções de activação de carvão utilizadas

Tipo	Descrição	Solução de activação
Pó	100 a 400 mesh (Merck, Alemanha)	NaOH 5M
Granulado	2,5 mm Merck, Alemanha	HCl 0,4M

Na primeira etapa, os dois tipos de carvão foram lavados com água desmineralizada, filtrados sob vácuo (filtros Filter-Lab 1235) e secos à temperatura ambiente durante aproximadamente 48 h.

A ativação do carvão com NaOH foi realizada na proporção de 1:5 (p/v) com agitação numa incubadora orbital (Infors HT, Bottmingen, Suíça) durante 1 h a 30 °C e a 150 rpm. Depois de equilibrado, este foi filtrado sob vácuo (filtros Filter-Lab 1235) e seco numa estufa a 80 °C durante 12 h, aproximadamente.

Para ativação do carvão com ácido, adicionou-se a quantidade suficiente da solução de HCl 0,4 M para cobrir todo o carvão, o que foi mantida com agitação magnética durante 1 h.

Posteriormente, o carvão foi filtrado sob vácuo (filtros Filter-Lab 1235), lavado com água e seco à temperatura ambiente durante aproximadamente 48 h.

Após ativação do carvão procedeu-se ao processo de destoxificação propriamente dito. O carvão ativado com solução básica foi adicionado ao hidrolisado (pH 0,8) que se encontrava previamente com agitação magnética, na quantidade necessária, até se atingir o valor de pH 5,5. Foi mantido sob agitação numa incubadora orbital (Infors HT, Bottmingen, Suíça) durante 1 h a 30 °C e a 150 rpm. No final, o hidrolisado foi recolhido e filtrado sob vácuo com filtros Filter-Lab 1235 (filtração rápida) e posteriormente com filtros 0,45 mm (Pall Corporation).

O carvão ativado com solução ácida foi adicionado ao hidrolisado numa proporção 1:10 (p/v). Antes da adição do carvão o pH do hidrolisado havia sido previamente acertado para 2,5 pela adição de NaOH sólido. Após a adição do carvão ao hidrolisado, a mistura manteve-se com agitação magnética durante 1 h à temperatura ambiente. Decorrido o tratamento, a mistura foi sujeita a filtração sob vácuo (Filter-Lab 1235) e o seu pH acertado a 5,5 pela adição de NaOH sólido e filtrado novamente por filtração sob vácuo com recurso a filtros Filter-Lab 1235 e a filtros 0,45 µm (Pall Corporation). Em qualquer dos casos, após filtração foi possível recuperar o carvão utilizado para posterior regeneração.

2.5.3. Tratamento com resinas de troca aniónica

As resinas utilizadas foram resinas fracamente aniónicas (Marathon) (Sigma-Aldrich). Antes de se proceder à destoxificação as resinas foram previamente lavadas e ativadas.

A lavagem foi realizada através da adição de água desmineralizada sendo o volume de água adicionado aquele que permite obter, aproximadamente, uma altura do líquido de 5 cm acima do leito. As resinas foram mantidas sob agitação magnética durante 15 min e a água foi decantada e adicionada novamente igual volume de água, agitando-se mais 10 min e novamente decantada.

Após secagem à temperatura ambiente, as resinas foram ativadas através do contato com uma solução NaOH 0,1 M durante 1 h, à temperatura ambiente com agitação magnética. Posteriormente, procedeu-se à remoção do excesso de contra – iões que não se ligaram à matriz polimérica, através de várias lavagens com água desmineralizada. Para assegurar a eficiência da lavagem realizaram-se medições de pH com papel indicador (Macherey-Nagel, Alemanha), até se atingir um valor próximo da neutralidade. No final, as resinas foram separadas sob vácuo com papel de filtro Filter-Lab 1235 e secas à temperatura ambiente durante aproximadamente 48 h.

O tratamento de destoxificação com resinas propriamente dito, iniciou-se quando as resinas foram adicionadas ao hidrolisado hemicelulósico. Este encontrava-se sob agitação magnética e com recurso a leituras constantes de pH foram adicionadas pequenas quantidades de resinas até se atingir um pH de 5,5 permanecendo em agitação durante 1 h à temperatura ambiente. Decorrido esse tempo, o hidrolisado foi filtrado com recurso a uma bomba de vácuo com filtros Filter-Lab 1235 e posteriormente com filtros 0,45 mm (Pall Corporation).

2.5.4. Tratamento com membranas

Os hidrolisados de BAE foram também destoxificados utilizando processos de separação por membranas, nomeadamente a nanofiltração. Este trabalho, resultante de uma colaboração no âmbito de um projeto em curso, foi realizado no CEBAL (Centro de Biotecnologia Agrícola e Agro-Alimentar do Baixo Alentejo e Litoral, Beja). O procedimento experimental e o cálculo efetuado encontram-se descritos no Anexo I.

2.5.5. Concentração do hidrolisado

De modo a aumentar a concentração de xilose no hidrolisado, bem como a remoção de alguns compostos inibidores voláteis, tal como o furfural, o hidrolisado foi sujeito a um processo de concentração por evaporação (1,5 e 2 vezes em massa) com recurso a um evaporador rotativo (R-210 Büchi, Suíça), a 150 mbar, a uma temperatura de 70 °C e agitação de 5 rpm. Este processo foi aplicado aos hidrolisados destoxificados e não-destoxificados.

Os hidrolisados destoxificados e/ou concentrados pelos vários métodos testados foram analisados por HPLC relativamente ao seu conteúdo em açúcares, ácido acético, ácido fórmico, ácido levulínico, HMF e furfural, conforme o descrito em 2.7.5 e à concentração de compostos fenólicos totais (2.7.2.4). As várias amostras concentradas foram congeladas até posterior utilização.

2.6. Processo fermentativo

2.6.1. Microrganismo

O microrganismo utilizado neste estudo foi a levedura *Debaryomyces hansenii* (var. *fabryi*), depositada na Coleção de Culturas de Microrganismos Industriais do LNEG (CCMI) com o número 941.

2.6.2. Preparação do inóculo

Para preparação do inóculo foram utilizadas culturas *stock* do microrganismo armazenadas a -70 °C, após descongelação no frigorífico. Adicionaram-se 2,5 mL da cultura *stock* a balões Erlenmeyer de 1000 mL com anteparas contendo 100 mL de meio quimicamente definido (MQD) (Anexo II). Os balões foram incubados a 30 °C com agitação orbital de 150 rpm (Infors Unitron HT, Suíça), durante 20 h. Foram utilizados dois procedimentos para a inoculação do hidrolisado. Num primeiro caso (ensaio de avaliação do efeito da destoxificação do carvão ativado com NaOH) foram retirados 8 mL de inóculo para cada um dos balões de Erlenmeyer de 1000 mL sem anteparas, contendo 80 mL de MQD. Para os restantes ensaios, após as 20 h de crescimento, foram recolhidos 40 mL de inóculo para tubos *falcon* estéreis que foram centrifugados durante 10 min a 8035×g (Sigma 2k15, EUA), à temperatura de 4 °C. A biomassa foi ressuspensa nos diferentes hidrolisados de modo com que cada balão tivesse uma concentração inicial de biomassa próxima de 4 g·L⁻¹.

2.6.3. Avaliação do efeito da destoxificação do hidrolisado na produção de xilitol/polióis

Na preparação dos meios de cultura, o pH dos hidrolisados foi acertado para os valores pretendidos com NaOH sólido (excetua-se o caso do hidrolisado destoxificado com carvão alcalino). Os hidrolisados destoxificados e concentrados foram esterilizados por filtração com membranas 0,22 µm (Gelman Sciences, EUA), excetuando aqueles que foram destoxificados com carvão ácido e resinas. Estes hidrolisados foram filtrados por filtros Filter-Lab 1235 e esterilizados em autoclave (121 °C, 15 min), devido ao fato de formação de precipitados ter impossibilitado a esterilização por filtração.

Após a esterilização, adicionou-se a 72,8 mL de hidrolisado, em condições assépticas, 2 mL de uma solução de sais, 0,8 mL de solução de vitaminas, 4 mL de solução de azoto e fósforo e 2 mL de solução de magnésio (Anexo II), sendo esta mistura de suplementos designada, a partir daqui por TEVM (*trace elements, vitamins and minerals*).

Todos os ensaios foram realizados em duplicado, em balões Erlenmeyer de 1000 mL contendo 80 mL de meio de cultura e incubados nas mesmas condições dos inóculos. Por forma a testar o efeito do arejamento na produção de xilitol foram utilizados balões com e sem anteparas.

Na Tabela 2.3 está apresentado um resumo dos ensaios realizados para avaliar o efeito da destoxificação na produção de xilitol.

Tabela 2.3 - Hidrolisados utilizados como meio fermentativo para avaliar o efeito da destoxificação na produção de xilitol

Tipo de hidrolisado ^a	Método de destoxificação	Concentração do hidrolisado ^b	pH final	Balões (anteparas)
3 3 com PEA	Carvão alcalino	-	5,5	Não
5	Nenhum	1,5 vezes	5,5	Sim
5	Nenhum	2 vezes	5,5 6,5 7,5	Sim
5	Acerto de pH	-	5,5	Sim
5	Carvão ácido	2 vezes	5,5 6,5 7,5	Sim
5	Carvão ácido	2 vezes	6,5	Não
5	Resinas	2 vezes	5,5 6,5	Sim
5	Membranas	2 vezes	5,5	Sim

^a Razão líquido sólido utilizada para a obtenção do hidrolisado; ^b em massa

2.6.4. Avaliação do efeito da suplementação do hidrolisado na produção de xilitol/polióis

No hidrolisado destoxificado por filtração com membranas e concentrado (2 vezes em massa) foi estudado o efeito da adição de várias fontes de nutrientes descritas como capazes de potenciar a acumulação de xilitol, tais como o extrato de levedura (EL), “*corn steep liquor*” (CSL) e extrato de dreche cervejeira (ED) (Tabela 2.4).

Tabela 2.4 - Suplementos adicionados ao meio fermentativo

Tipo de suplemento	Concentração final no hidrolisado (g·L ⁻¹)	Hidrolisado (mL)	Volume de suplementação (mL)	Água (mL)
Extrato de levedura	3	72,8	6	1,2
<i>Corn steep liquor</i>	5	72,8	6	1,2
Extracto de dreche	10,3	72,8	6	1,2

Todos os ensaios foram realizados em duplicado, exceto o ensaio suplementado com solução de extrato de dreche cervejeira (ED). Foi utilizado um extrato de levedura comercial (Sigma, EUA), o CSL foi gentilmente cedido pela empresa (Copam, S. João da Talha) e o extracto de dreche foi preparado no laboratório a partir de dreche cervejeira cedida pela Central de Cervejas, SA (Vialonga). Como controlo utilizou-se um hidrolisado suplementado com TEVM.

2.6.5. Amostragem

No decorrer dos processos fermentativos foram retiradas periodicamente amostras para avaliação do crescimento celular, quantificação de substratos e produtos na suspensão celular. De modo a minimizar as alterações de cultivo, o volume de amostra foi o mais reduzido possível (2,5 mL) com exceção no caso das amostras utilizadas para determinação de concentração de biomassa (5 mL).

2.7. Métodos analíticos

2.7.1. Caracterização química dos licores resultantes da pré-extração aquosa

2.7.1.1. Determinação dos extrativos em água

Para determinação da percentagem de extrativos obtida com a pré-extração aquosa (PEA) do BAE, colocou-se em balões de vidro de 250 mL de capacidade, previamente tarados a 105 ± 5 °C numa estufa durante 12 h, 100 g de hidrolisado. A amostra foi concentrada com auxílio de um rotavapor (R-210 Büchi, Suíça), a 70 mbar, a uma temperatura de 40 °C e com uma agitação a 150 rpm. Após evaporação quase total do licor os balões foram colocados novamente na estufa a 10 ± 5 °C durante 12 h. Decorrido o tempo pretendido, estes foram arrefecidos à temperatura ambiente em exsiccador e registou-se o seu peso seco.

2.7.2. Caracterização dos licores resultantes da hidrólise ácida

2.7.2.1. Determinação da humidade

A humidade da matéria-prima e dos resíduos sólidos foi determinada pesando-se aproximadamente 1 g de amostra em caixas de níquel, previamente secas a 105 ± 5 °C durante 16 h e taradas numa balança analítica (Mettler HK160, Suíça), colocando-se a amostra a secar nas mesmas condições na estufa. Após secagem, as caixas contendo as amostras foram arrefecidas em exsiccador, durante aproximadamente 1 h. Este procedimento foi repetido sempre que necessário, sendo realizado, pelo menos, em duplicado.

2.7.2.2. Doseamento de extrativos

Os extrativos presentes na matéria-prima foram doseados de acordo com o protocolo experimental do NREL (Sluiter et al. 2008) utilizando um Soxhlet com 85 mL de capacidade. O procedimento experimental e os cálculos efetuados encontram-se descritos no Anexo VI.

2.7.2.3. Determinação do resíduo seco

A percentagem de sólidos (resíduo seco) nos hidrolisados foi determinada utilizando o mesmo método de determinação de humidade das amostras, sendo neste caso, a massa das amostras de 5 g.

2.7.2.4. Doseamento de compostos fenólicos

Método espectrofotométrico

Os compostos fenólicos totais presentes nos hidrolisado sujeitos a PEA e a hidrólise ácida foram determinados pelo método *Folin-Ciocalteu* (Singleton 1965). Este método baseia-se numa reação que ocorre entre os polifenóis e o reagente *Folin-Ciocalteu*, sob condições alcalinas, ocorrendo a alteração a cor de amarelo para azul, cuja densidade óptica a 750 nm é proporcional ao teor de polifenóis. O procedimento encontra-se descrito no Anexo V.

Eletroforese Capilar

O perfil dos compostos fenólicos presentes nos hidrolisados sujeitos a pré-extração aquosa foi determinado por eletroforese capilar de zona (CZE) de acordo com (Roseiro *et al.*, 2003).

Foi utilizado um equipamento Agilent CE modelo G1600AX e um capilar de bolha, para uma maior sensibilidade, com revestimento de sílica fundida (Agilent G1600-60232) com 50 µm de diâmetro interno e 56 cm de comprimento. Foi utilizada uma solução tampão de EDTA 20 mM em metanol a 20%, ajustado com HCl para um pH de 9,3. As condições de operação estão resumidas na Tabela 2.5.

Tabela 2.5 - Condições de análise por eletroforese capilar de zona

Parâmetro	Configuração
Temperatura	25°C
Offset	8 mm do fundo do vial
Injecção	50 mbar x 15 seg, no ânodo (+)
Corrente	120 µA
Tempo de migração	30 min
Voltagem	25 kV com 0,5 min de rampa de subida
Comprimentos de onda	200, 280, 375 nm
Espectro	"All in peak", 190-600 nm
Pré-acondicionamento	3 min de lavagem com 0,1 M de NaOH seguido de 3 min de tampão de corrida

Todas as amostras foram previamente filtradas através de filtros Millipore® com um diâmetro de poro de 0,45 µm. As identificações dos compostos foram feitas a partir dos tempos de migração e espectros UV-Vis de padrões comerciais analisados nas mesmas condições. Os padrões analisados incluem oleuropeína, tirosol, hidroxitirosol, ácidos 3-

hidroxibenzóico, cafeico, elágico, ferúlico, siríngico, trans-cinâmico, e vanílico, catequina, epicatequina, naringina, naringenina, hidroquinona, siringaldeído e vanilina.

2.7.3. Determinação dos polissacáridos (glucano, xilano, arabinano) e grupos acetilo

Para a determinação dos polissacáridos, lenhina e grupos acetilo, as amostras foram sujeitas a uma hidrólise ácida quantitativa, de acordo com o método descrito em (Browning 1967). A 0,5 g de amostra foram adicionados 5 mL de H₂SO₄ 72 % (p-p⁻¹) e a mistura incubada a 30 ± 1 °C num banho termostaticado (Mettler, Alemanha), durante 1 h, com agitação de 10 em 10 min com uma vareta de vidro. Em seguida, todo o conteúdo do tubo de ensaio foi transferido para frascos Schott de 250 mL de tampa vermelha através do arrastamento com água desmineralizada, numa quantidade suficiente para se obter uma concentração de H₂SO₄ de 4% (p-p⁻¹). Esta mistura foi autoclavada a 121 °C durante 60 min. Após o tratamento, a autoclave foi rapidamente despressurizada e quando a temperatura chegou aos 90 °C, esta foi aberta e retiraram-se os frascos. Com os frascos devidamente arrefecidos confirmou-se a ocorrência de possíveis perdas durante o tratamento através de pesagens do conjunto. A mistura foi filtrada por filtros de placa porosa (Schott) de porosidade 3 previamente tarados a 550 ± 5 °C numa mufla (Heraeus D-6450, Alemanha) durante 5 h.

Os componentes da fração líquida foram analisados por HPLC. As concentrações de glucose, xilose, arabinose e ácido acético permitiram calcular as percentagens dos respetivos polímeros e grupos acetilo (Anexo IV).

2.7.3.1. Determinação da lenhina Klason

O resíduo insolúvel obtido após as duas fases da hidrólise ácida quantitativa e após correção do valor da cinza, constitui a lenhina Klason. Este resíduo contido nos cadinhos de placa porosa foi lavado com água desmineralizada (50 mL), filtrado e seco durante 16 h a 105 ± 5 °C. Decorrido o tempo, os cadinhos foram arrefecidos em exsiccador, à temperatura ambiente e pesados. De seguida, os cadinhos que continham o resíduo insolúvel foram colocados na mufla (Heraeus D-6450, Alemanha) a 550 ± 5 °C durante 5 h e pesados após arrefecimento em exsiccador. O valor da cinza no resíduo insolúvel em ácido permite fazer a correção para o cálculo da lenhina Klason (Anexo IV).

2.7.3.2. Determinação da cinza

Para a determinação de cinza da matéria-prima, pesou-se em cadinhos de porcelana, aproximadamente 1 g de amostra. Estes foram primeiramente secos a 100 ± 1 °C durante 16 h, arrefecidos e pesados. Em seguida, os cadinhos de porcelana com amostra seca

foram colocados numa placa de aquecimento e queimados, sendo posteriormente colocados na mufla (Heraeus D-6450, Alemanha) a 550 ± 5 °C durante 5 h, arrefecidos e pesados. A diferença entre o peso da amostra, que se encontrava no cadinho, antes e depois de queimada, dá o valor da cinza. Este procedimento foi repetido sempre que necessário, sendo realizado, pelo menos, em duplicado.

2.7.3.3. Determinação da proteína total

A proteína total da matéria-prima foi determinada de acordo com o método de *Kjedahl* utilizando um analisador de proteína semi-automático *Kjeltec*, Tecator (Suécia). O fator de conversão utilizado foi $N \times 6,25$. O procedimento experimental e os cálculos efetuados encontram-se descritos no Anexo V.

2.7.4. Determinação da concentração da biomassa celular

A concentração celular foi estimada, por medição das leituras de densidade ótica da cultura, a 600 nm, contra um branco de água destilada, num espectrofotómetro (Jasco V-530, Japão). Para valores de absorvância superiores a 0,8 foram realizadas diluições, de modo a obter valores de absorvância dentro da gama de linearidade 0,2 a 0,8. Todas as diluições foram realizadas no mínimo em duplicado.

A determinação do peso seco permitiu quantificar a concentração de biomassa seca das culturas das amostras a analisar. Foram filtrados (filtros de 0,45 µm Pall Corporation previamente secos e tarados), sob vácuo, 10 mL da suspensão celular. A biomassa foi lavada com 20 mL de água desmineralizada e os filtros foram secos a 100 ± 1 °C cerca de 18h. Seguidamente foram arrefecidos a temperatura ambiente num exsiccador durante 30 min e pesados numa balança analítica (Mettler HK 160, Suíça). Este procedimento foi realizado em duplicado.

2.7.5. Doseamento de monossacáridos, compostos inibidores e produtos resultantes do metabolismo microbiano

A determinação de monossacáridos, compostos inibidores (exceto compostos fenólicos) e os diversos produtos derivados do metabolismo microbiano foi realizado com recurso à técnica de HPLC. As amostras foram previamente filtradas através de filtros 0,45 µm e analisadas sempre em duplicado. A D-glucose, D-xilose, L-arabinose, ácido acético, glicerol, etanol, polióis, HMF e furfural foram analisados por uma coluna Aminex HPX-87H (Bio-Rad, EUA). Para o HMF e furfural foi utilizado um detetor de UV/VIS regulado para 280 nm, e para os restantes compostos um detetor de IR.

Nas amostras resultantes da pré-extração aquosa do BAE o doseamento da sacarose, glucose e frutose foi analisado numa coluna Sugar-Pak I (Waters Chromatography, EUA), especifica para a análise de monossacáridos e álcoois de baixo peso molecular. Nas amostras dos crescimentos, devido à sobreposição parcial dos picos de L-arabinose, arabitol e xilitol estas foram também analisados numa coluna Sugar-Pak I.

As concentrações dos compostos analisados foram calculadas a partir de curvas de calibração traçadas a partir de soluções padrão. Estes padrões foram diariamente analisados.

As condições de operação dos sistemas associados a cada coluna estão resumidas na Tabela 2.6.

Tabela 2.6 - Equipamento e condições de operação para as análises por HPLC

Designação/Coluna	HPX-87H	Sugar-Pak I
Fase móvel	H ₂ SO ₄ 5,0 mM	Ca-EDTA 50 mg/L
Caudal	0,4 mL/min (caraterização da matéria-prima e resíduos sólidos) 0,6 mL/min (restantes casos)	0,5 mL/min
Temperatura da coluna	50°C	90°C
Temperatura do detetor de IR	45°C	35°C
Comprimento de onda UV	280 nm	-
Volume de amostra	20 µL (0,4 mL/min) ou 5 µL (0,6 mL/min)	20 µL

3. Resultados e Discussão

3.1. Caracterização da matéria-prima

3.1.1. Caraterização granulométrica

A granulometria do material é um fator importante para o armazenamento, transporte e processamento da matéria-prima. Por esta razão, o lote de BAE utilizado neste trabalho foi caracterizado quanto à sua granulometria.

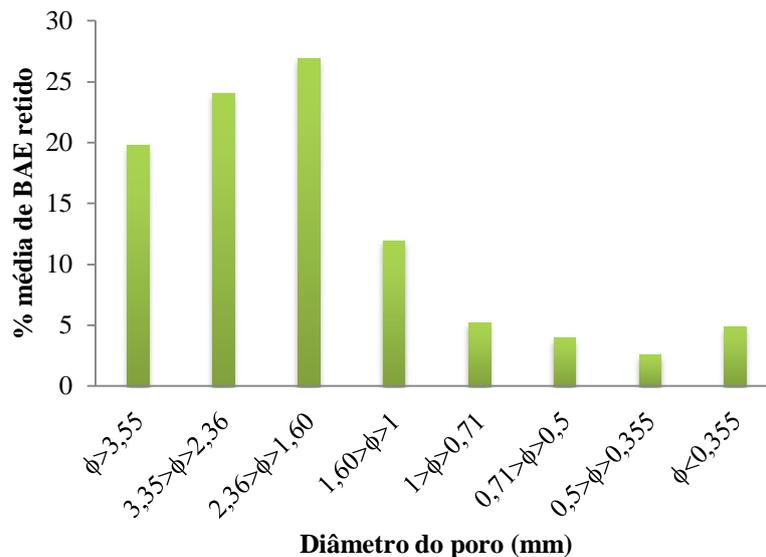


Figura 3.1- Caraterização granulométrica do bagaço de azeitona extratado.

Pela análise da Figura 3.1. pode observar-se que uma quantidade considerável da matéria-prima (63%) tem um diâmetro compreendido entre 3,55 e 1 mm, 17% inferior a 1 mm e 20% superior a 3,55 mm.

Para efeitos do presente trabalho, foram descartadas as partículas com diâmetro superior a 3,55 mm e inferior a 1 mm. As primeiras, por não serem indicadas para os tratamentos de hidrólise ácida e pela possibilidade de ocorrer limitações difusionais à transferência de massa e calor. A última, porque se torna difícil o seu manuseamento e são mais suscetíveis de degradação durante o tratamento, podendo por exemplo, ser indicadas para tratamentos termoquímicos (Duarte *et al.*, 2012).

Para a gama de granulometrias considerada (frações 3,35-2,36, 2,36-1,6, 1,6-1 mm) foi determinado diâmetro médio das partículas conforme descrito no Anexo IV (Eq. IV.37). O valor obtido foi:

$$D_p = 3,1107 \text{ mm}$$

O diâmetro das partículas obtido para o lote utilizado encontra-se dentro da gama de valores já referidos noutros estudos realizados com o mesmo material (Bernardo-Gil *et al.*, 2011; Guerra, 2011).

3.1.2. Caraterização química

A caraterização química dos materiais lenhocelulósicos é fundamental para se proceder a uma adequada valorização. A sua composição, tal como referido anteriormente, varia de acordo com a sua origem geográfica e condições de crescimento. No caso do BAE, depende ainda dos métodos de extração do azeite, do óleo de bagaço de azeitona e da secagem. As diferenças da composição química dos materiais residem essencialmente na proporção relativa da celulose, hemicelulose e lenhina, e em particular na composição da fração hemicelulósica.

Deste modo, uma caraterização química da matéria-prima é fundamental para a obtenção de um hidrolisado hemicelulósico com vista ao seu aproveitamento para o processo de bioconversão de D-xilose em xilitol. Na Tabela 3.1 é apresentada a composição química do BAE utilizado neste trabalho.

Tabela 3.1 - Composição química média do BAE¹

Componentes	%
Glucano	16,8
Hemicelulose	23,7
Xilano	17,7
Arabinano	1,16
Grupos acetilo	4,79
Lenhina Klason	37,9
Cinza	4,20
Proteína	5,52
Extrativos (água)	12,1
Extrativos (etanol)	2,81

¹ Base seca

Os resultados obtidos para a caraterização química deste material estão de acordo com os descritos na literatura, em que o BAE é referido como uma matéria-prima com elevado teor em polissacáridos (cerca de 40% (p.p⁻¹)) dos quais mais de metade corresponde à hemicelulose (Alburquerque *et al.*, 2004; Roig *et al.*, 2006).

Os teores de xilano, arabinano e grupos acetilo estão de acordo com os descritos na literatura para o bagaço e caroço de azeitona (Derriche *et al.*, 2007; Niaounakis *et al.*, 2006). Contudo, o valor encontrado para o teor em xilano (17,69%) pode não se dever exclusivamente à xilose. Sabe-se que as hemiceluloses deste tipo de materiais podem, conter em pequenas quantidades, outros açúcares, tais como manose e galactose, dos

quais a galactose especificamente pode interferir com a quantificação da xilose (Niaounakis *et al.*, 2006). Por limitações analíticas, a galactose não foi quantificada. No entanto, espera-se que este aspeto não tenha grande influência na quantificação do xilano pois a galactose está descrita por existir em pequenas quantidades. Para além destes açúcares hemicelulósicos, alguns autores descrevem a presença de açúcares solúveis (frutose, sacarose) em resíduos provenientes do processamento da azeitona (Fernández-Bolaños *et al.*, 2002). Neste material, especificamente, como se verá mais adiante a presença destes açúcares não tem grande significado.

Em relação à lenhina Klason, o valor obtido pode considerar-se relativamente elevado, quando comparado com outras matérias-primas (Albuquerque *et al.*, 2004; Niaounakis *et al.*, 2006) mas semelhante ao já descrito para este material (Guerra, 2011; Bernardo-Gil *et al.*, 2011). O teor de lenhina deste material pode também constituir uma vantagem quando se pretende fazer um aproveitamento da lenhina para outras valorizações.

O BAE é habitualmente descrito como um material rico em extrativos, sendo até considerado uma mais-valia, dado o seu valor económico. O mais abundante, e também com maior valor é o hidroxitirosol, tendo já sido desenvolvidas estratégias para a valorização do bagaço de azeitona mediante uma recuperação e purificação deste composto (Fernández-Bolaños *et al.*, 2004; Fernández-Bolaños *et al.*, 2006). Neste trabalho o teor de extrativos obtido foi de 14,9% muito semelhante ao encontrado noutros trabalhos com a mesma matéria-prima (Carvalho *et al.*, 2012; Duarte *et al.*, 2012).

Também o teor de proteína é ligeiramente superior ao encontrado noutros materiais, como palhas, o que pode ser um aspeto vantajoso para a bioconversão tendo em conta que parte desta proteína irá ser hidrolisada no processo de preparação do hidrolisado (Carvalho *et al.*, 2004a; Torrado *et al.*, 2010) podendo levar a menores necessidades de suplementação.

Em suma, a composição química determinada para o BAE é concordante com a composição química anteriormente descrita para este material e possui uma composição favorável para a obtenção de hidrolisados ricos em pentoses (para a bioconversão de D-xilose em xilitol).

3.2. Pré-extração aquosa da matéria-prima

Sendo o BAE rico em compostos fenólicos solúveis, alguns deles só por si com elevado valor acrescentado, e uma vez que a presença destes compostos poderá representar um aumento de toxicidade para os meios de cultura, o BAE foi sujeito a uma pré-extração aquosa (PEA). O objetivo desta operação foi remover os compostos fenólicos provenientes dos extrativos da matéria-prima por um lado e, por outro, poder também retirar potenciais compostos de valor acrescentado. Assim, a remoção destes compostos permitirá, em

princípio, a redução da quantidade de compostos inibidores formados durante o pré-tratamento, i.e., a hidrólise com ácido diluído conducente à obtenção dos hidrolisados hemicelulósicos.

3.2.1. Otimização da pré-extração aquosa

Para a otimização da PEA as amostras foram sujeitas a um tratamento aquoso a 100 °C durante diferentes tempos (30, 45 e 60 min). A escolha destas condições teve por base um estudo prévio para remoção dos extrativos da palha de sorgo (Torrado *et al.*, 2012), em que se demonstrou que a temperatura de 100 °C permite uma redução substancial dos extrativos da matéria-prima praticamente sem afetar a composição macromolecular do sólido.

No final de cada tratamento, as frações sólida e líquida foram caracterizadas quimicamente quanto aos teores em polissacáridos, grupos acetilo, lenhina Klason, açúcares solúveis, extrativos em água e compostos fenólicos (Tabela 3.2 e Tabela 3.3).

De modo a confirmar que a PEA não influenciou significativamente a composição macromolecular dos resíduos sólidos, foram feitos os balanços mássicos a cada um dos componentes e calculadas as respetivas percentagens de solubilização.

Os resultados apresentados na Tabela 3.2. mostram que independentemente do tempo de pré-extração, a solubilização dos sólidos foi muito baixa (cerca de 10%), sendo também os valores das percentagens de polissacáridos (exceto o arabinano) e da lenhina bastante próximos dos da matéria-prima (Tabela 3.1).

Tabela 3.2 - Efeito do tempo de pré-extração aquosa no rendimento em sólidos e na composição química, obtidos do bagaço de azeitona extratado.

Valores médios (g por 100g)			
	Tempo (min)		
	30	45	60
Rendimento em sólido ^a	90,8 (9,2)	90,0 (10,0)	89,5 (10,5)
Glucano ^b	16,2 (12,1)	16,5 (12,3)	16,4 (12,3)
Xilano ^b	17,0 (15,5)	16,7 (16,5)	16,5 (16,5)
Arabinano ^b	0,96 (47,2)	0,68 (47,8)	0,61 (52,9)
Grupos acetilo ^b	5,34 (2,5)	5,31 (3,1)	5,00 (6,7)
Lenhina Klason ^b	44,0 (0)	43,7 (0)	42,6 (0)
Cinza ^b	2,03	1,79	1,69
Proteína ^b	6,05	4,95	4,92
Outros (por diferença)	8,05	10,3	12,3

* Os valores entre parênteses correspondem à percentagem de solubilização;^a g/ 100 g de matéria-prima; ^b g/ 100 g de BAE após PEA

Em relação à fração hemicelulósica, o arabinano foi o mais afetado podendo ser solubilizado até 53% para o tempo de PEA mais elevado. No entanto, a percentagem de arabinano neste material é muito baixa pelo que a solubilização obtida representa apenas uma pequena

perda em termos de pentoses. O xilano não foi significativamente afetado (solubilização entre 15,5-16,5%) o que constitui uma vantagem ter termos dos objetivos da PEA. A percentagem de grupos acetilo solubilizada aumentou ligeiramente com o tempo de PEA. No entanto, essa remoção foi bastante baixa (máximo de 6,7% aos 60 min). Por sua vez, a solubilização do glucano foi cerca de 12%. Sabe-se que as hemiceluloses do bagaço de azeitona se caracterizam por ser do tipo xiloglucanos (Fernández-Bolaños *et al.*, 2004). Este aspeto poderá ter algumas implicações práticas em termos da quantificação da celulose, uma vez que nem todo o glucano quantificado corresponderá a celulose, podendo uma pequena parte corresponder à hemicelulose. Ainda assim, o glucano deverá representar maioritariamente celulose pelo que se poderá afirmar que a celulose não foi significativamente afetada por este tratamento.

A lenhina não sofreu solubilização, sendo a percentagem de recuperação sempre próxima de 100%. Este resultado seria de esperar, uma vez que as condições utilizadas neste tratamento não são suficientemente drásticas (quer em termos de tempo e quer de temperatura) para ocorrer a sua solubilização.

Foi também determinado o teor total de extrativos removidos com a PEA, sua composição em açúcares, ácido acético e compostos fenólicos na fase líquida (Tabela 3.3).

Tabela 3.3 - Rendimento extrativos em água dos licores resultantes da pré-extração aquosa

	Composição (g por 100g BAE)		
	Tempo de PEA (min)		
	30	45	60
Extrativos em água	7,29	7,70	7,89
Compostos fenólicos	0,74 (1,44)	0,90(1,75)	1,12 (1,93)
Açúcares totais	0,50 (0,96)	0,54 (1,05)	0,61 (1,06)
Sacarose	0,08 (0,15)	0,09 (0,16)	0,09 (0,16)
Frutose	0,31 (0,58)	0,33 (0,62)	0
Arabinose	0,12 (0,24)	0,14 (0,27)	0,16 (0,27)

* Os valores entre parênteses correspondem a composição em g·L⁻¹.

O teor de extrativos obtido nas diferentes condições é semelhante embora se possa observar um ligeiro aumento com o aumento do tempo de extração. Dos componentes dos extrativos que foi possível quantificar, os compostos fenólicos são os maioritários. Pode observar-se um aumento dos compostos fenólicos extraídos com o tempo de extração. Ainda assim, o valor máximo obtido (1,12 g por 100 g BAE) é bastante inferior ao total de extrativos determinado.

Os extrativos deste material também apresentam uma baixa concentração de açúcares. Os açúcares identificados e quantificados foram a sacarose, frutose e a arabinose que se encontram numa concentração total máxima de 1,06 g·L⁻¹, sendo a arabinose o açúcar maioritário. Estes valores são consistentes com a elevada solubilização de arabinano

encontrada nos sólidos. A glucose e a xilose também aparecem no licor mas em concentrações vestigiais, não sendo possível a sua quantificação por HPLC. O ácido acético não se encontra nos licores em concentrações apreciáveis pressupondo que as condições utilizadas não são suficientemente severas para remover os grupos acetilo das hemiceluloses.

A comparação dos resultados dos três tempos de extração conduziu à escolha do tempo de 60 min como o mais adequado para a extração pretendida, uma vez que este tempo permitiu uma remoção mais eficiente de compostos fenólicos. Adicionalmente, nas condições testadas, não se verificaram alterações significativas quer nos resíduos sólidos quer nos licores, sugerindo que o tempo de tratamento não afeta a composição macromolecular da matéria-prima.

Em suma, independentemente do tempo testado, a PEA aquosa não conduz a perdas consideráveis de polissacáridos nos resíduos sólidos e ainda permite a extração de compostos fenólicos que poderão ser valorizados para além de potencialmente permitir obter hidrolisados com uma menor concentração de compostos fenólicos, o que poderá favorecer a bioconversão.

3.2.2. Caracterização dos compostos fenólicos provenientes da PEA por eletroforese capilar de zona (CZE)

Nos últimos tempos, os compostos fenólicos têm sido alvo de interesse por parte da comunidade científica das mais diversas áreas devido à potencial atividade antioxidante e possíveis efeitos contra as doenças degenerativas (Artajo *et al.*, 2007). Após o processo de extração do azeite, cerca de 2% da fração fenólica fica retida no azeite, enquanto que 98% dos fenóis totais permanecem nos subprodutos (Artajo *et al.*, 2007). Isto faz com que o BAE seja uma potencial fonte de uma grande variedade de compostos fenólicos com diferentes níveis de atividade biológica. Deste modo, procedeu-se à caracterização do perfil dos compostos fenólicos presentes nos licores da PEA (condição de 60 min) por eletroforese capilar de zona (CZE) (Figura 3.2).

Pela análise da figura acima apresentada, constata-se que o licor contém uma grande variedade de compostos fenólicos dos quais se destaca o hidroxitirosol (3,4-dihidroxifeniletanol), logo seguido do tirosol, pirocatecol, sendo também identificados em menores quantidades o ácido vanílico e o metilcatecol. O hidroxitirosol para além de ser o composto maioritário neste extrato é caracterizado por ter um valor económico elevado, devido às suas propriedades antioxidantes, atividade antimicrobiana *in vitro*, prevenção de doenças cardiovasculares, entre outros benefícios. Têm sido propostos vários métodos para a obtenção deste composto que são geralmente morosos e envolvem custos elevados,

resultando num número limitado de produtos comercialmente disponíveis. Neste âmbito, a pré-extração aquosa poderá ser um processo alternativo à obtenção de hidroxitirosol de uma forma simples e a baixo custo.

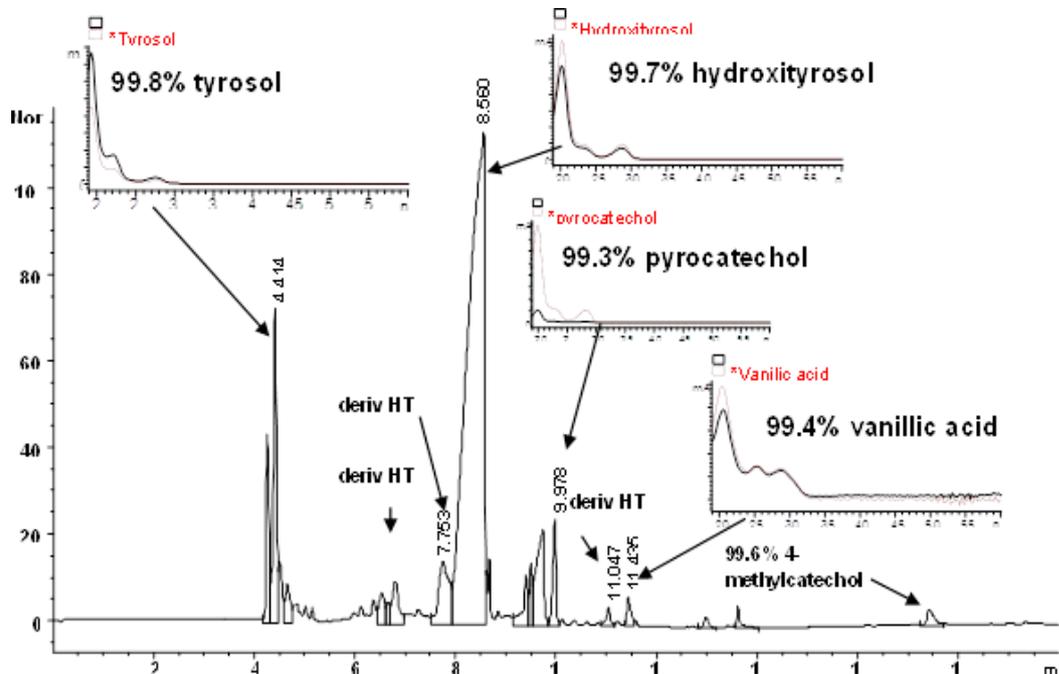


Figura 3.2 - Perfis dos compostos fenólicos presentes nos licores após pré-extração aquosa

3.3. Hidrólise com ácido diluído do bagaço de azeitona extratado

A maioria das condições operacionais adotadas para a hidrólise com ácido diluído do BAE, nomeadamente o tipo e concentração de ácido, temperatura e tempo de reação, foram já otimizadas em trabalhos anteriores (Carvalho *et al.*, 2012) e correspondem ao rendimento máximo obtido para este processo e para esta matéria-prima. Deste modo, a hidrólise ácida foi realizada à temperatura de 130 °C, um tempo de operação de 130 min e uma concentração de H₂SO₄ de 3,5% (p.p⁻¹). Assim, para finalizar a otimização do processo de hidrólise, foram testadas diferentes razões líquido/sólido (3, 4 e 5 g·g⁻¹) por forma a avaliar qual destas condições permitirá concentrações mais elevadas de monossacáridos e baixas concentrações de compostos inibidores do metabolismo microbiano, tendo sempre em vista elevados rendimentos e ausência de problemas ao nível de limitações difusionais e à transferência de massa e de calor. No caso da RLS 3 foi estudado o efeito da hidrólise no material com e sem PEA. Todos os outros ensaios foram realizados com material sem PEA.

Na Figura 3.3 está apresentada a composição em polissacáridos (glucano e xilano) e lenhina Klason dos resíduos sólidos obtidos após a hidrólise com ácido diluído.

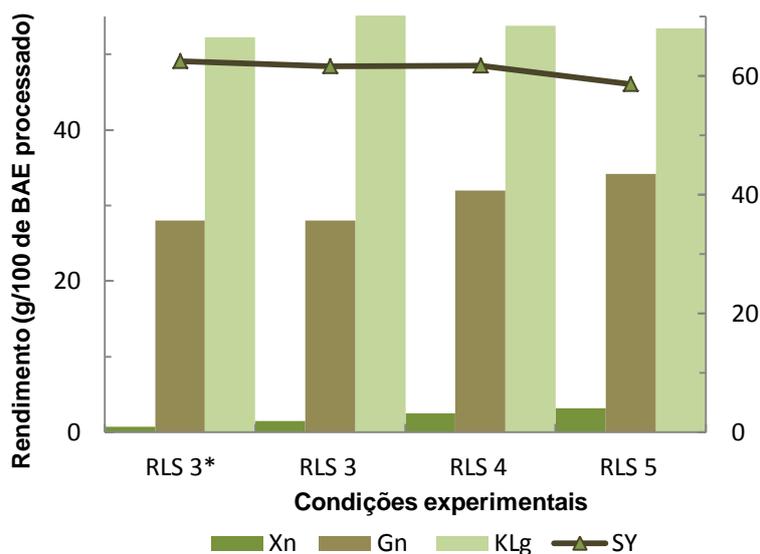


Figura 3.3 - Efeito da razão líquido/sólido e PEA no rendimento em sólidos (SY) e composição de glucano (Gn), xilano (Xn) e lenhina Klason (KL) no bagaço de azeitona extratado após hidrólise com ácido diluído; ^a g por 100 g matéria-prima; ^b g por 100 g de sólidos processados; * RLS com PEA

A partir da figura acima apresentada verifica-se que o rendimento em sólidos diminuiu ligeiramente para as condições RLS estudadas, atingindo o valor mínimo de 58,6% para a condição RLS 5. Esta diminuição pode estar relacionada com a solubilização dos componentes que constituem a fração hemicelulósica (xilano, arabinano e grupos acetilo). O arabinano e os grupos acetilo são os componentes hemicelulósicos presentes em menor quantidade e ambos foram totalmente hidrolisados na condição RLS 3. A quantidade de xilano residual que permaneceu no resíduo sólido diminuiu com a diminuição da RLS. O valor mais baixo, correspondente a uma percentagem de xilano de 0,7%, foi obtido para a RLS 3 com PEA. Nestas condições foi solubilizado 97% do xilano (Tabela 3.4).

O glucano não foi afetado pelo tratamento hidrolítico, sugerindo que a celulose não foi afetada pelo tratamento efetuado. Os resultados obtidos nas outras condições diferem dos obtidos para a hidrólise ácida diluída com o BAE (RLS 3, H₂SO₄ 3,5% (p.p⁻¹) a 130 °C durante 130 min), em trabalhos anteriores, sendo naqueles casos a percentagem de solubilização máxima do glucano de 11,5% (Guerra, 2011). Também para outros materiais, tal como para a dreche cervejeira (Carvalho *et al.*, 2004a; Carvalho *et al.*, 2004b; Duarte *et al.*, 2004) e para a palha de sorgo (Torrado *et al.*, 2012) os valores descritos para a hidrólise do glucano são também relativamente baixos.

Relativamente à lenhina, verifica-se que o teor no material após hidrólise variou entre 10-23%. A solubilização máxima (23%) foi obtida na condição RLS 3 com PEA sendo cerca de 17% para as condições RLS 4 e 5 e de 10% para a restante condição.

Os resultados obtidos para a primeira condição referida, reforça o que foi referido anteriormente, no qual os sólidos sujeitos previamente a PEA aquosa tornam-se mais suscetíveis ao tratamento ácido.

Na Tabela 3.4 são apresentados os rendimentos em monossacáridos (glucose, xilose e arabinose) e ácido acético nos hidrolisados, assim como os rendimentos em polímeros e grupos acetilo nos sólidos.

Tabela 3.4 - Rendimentos em açúcares, ácido acético, HMF e furfural na fração sólida e líquida, e de lenhina na fração sólida.

RLS (g·g ⁻¹)	3*	3	4	5
Rendimento em xilose (g por 100g Xn _{MP})	99,9	91,6	89,5	85,7
Rendimento em furfural (g por 100 g Xn _{MP})	0,25	0,83	0,28	0,28
Solubilização de xilano (g por 100 g Xn _{MP})	97,3	96,7	91,7	89,7
Rendimento em xilose (g por 100 g MP)	16,5	16,2	15,8	15,2
Rendimento de arabinose (g por 100 g Arn _{MP})	97,9	98,0	93,5	88,5
Solubilização de arabinano (g por 100 g Arn _{MP})	100,0	100,0	83,3	72,0
Rendimento em arabinose (g por 100 g MP)	1,02	1,14	1,09	1,03
Rendimento de grupos acetilo (g por 100 g GAc _{MP})	0	0	0	0,53
Solubilização de grupos acetilo (g por 100 g GAc _{MP})	100,0	100,0	100,0	99,5
Rendimento em glucose (g por 100 g Gn _{MP})	7,77	5,88	6,41	6,89
Rendimento em HMF (g por 100 g Gn _{MP})	0,04	0,04	0,05	0,05
Solubilização de glucano (g por 100 g Gn _{MP})	0	0	0	0
Rendimento em glucose (g por 100 g MP)	1,28	0,99	1,08	1,16
Rendimento em lenhina (g por 100 g LK _{MP})	76,6	89,9	83,2	82,6
Solubilização de lenhina (g por 100 g LK _{MP})	23,4	10,1	16,8	17,4

*BAE com PEA.

O rendimento máximo de pentoses obtido foi de 16,5 g por 100 g para a xilose e 1,02 g por 100 g para a arabinose na condição RLS 3 com PEA. Nesta condição, 99,9% do xilano presente na matéria-prima foi recuperado sob a forma de xilose e 97,9% do arabinano sob a forma de arabinose. Os rendimentos obtidos são significativamente superiores aos descritos para a hidrólise ácida da BAE realizada em trabalhos anteriores (Guerra, 2011). Estes resultados são diferentes dos obtidos para o mesmo tipo de material pois no presente trabalho foi utilizado um lote de BAE com diferente composição química e procedeu-se previamente a um tratamento de PEA que permitiu aumentar a suscetibilidade dos resíduos sólidos ao processo hidrolítico.

Uma vez que o hidrolisado obtido será utilizado como meio de cultura, foi prestada especial atenção aos compostos tóxicos obtidos, nomeadamente, ácido acético e compostos fenólicos gerados a partir da hidrólise dos componentes lenhocelulósicos, furfural e HMF gerados a partir das reações de degradação.

De um modo geral, verifica-se que a recuperação de xilano diminuiu com o aumento da RLS, variando o xilano recuperado nas fases sólidas e líquidas (sob a forma de xilose) entre 85,7% e 99,9%. Os valores obtidos justificam-se devido a reações de degradação que ocorrem durante o processo hidrolítico, ausência da quantificação de oligossacáridos solúveis e pequenas quantidades de açúcares solubilizados que precipitam com os sólidos. Na condição RLS 5, as reações de degradação são as principais responsáveis pela menor

recuperação de xilose no hidrolisado. Relativamente à glucose, o rendimento mais elevado (1,28 g·100 g BAE) foi obtido na condição RLS 3 com PEA, o que corresponde a uma solubilização de 68%. A recuperação do seu produto de degradação (HMF) foi relativamente baixa, variando entre 0,04 e 0,05 g/ 100 g de glucano nas condições estudadas. É de notar que na condição de menor recuperação de pentoses (RLS 5), as concentrações de furanos obtidas foram as mais baixas, apresentando rendimentos de 0,28 g/ 100 g xilano para o furfural e 0,05 g/ 100 g glucano para o HMF. Os resultados correspondentes ao furfural e HMF encontram-se ligeiramente abaixo dos descritos para estes materiais (Guerra, 2011; Torrado *et al.*, 2012).

Em todas as condições verificou-se a solubilização total dos grupos acetilo, exceto na condição RLS 5 (99,5%). Guerra, 2011 obteve uma solubilização máxima de 83% dos grupos acetilo para RLS 3 sem PEA. A solubilização da lenhina obtida neste trabalho conduziu também à obtenção de concentrações de compostos fenólicos, relativamente elevadas, entre 5,00 e 6,53 g·L⁻¹ (Tabela 3.5). Estes resultados mostram, que se por um lado a PEA torna o material mais suscetível, e permite obter maiores recuperações de xilose, por outro lado, a hidrólise da lenhina que ocorre leva à produção de compostos fenólicos que em termos de concentração acabam por se aproximar dos valores obtidos nas amostras não sujeitas a PEA. As concentrações obtidas encontram-se em concordância para este tipo de material (Guerra, 2011) mas significativamente superiores às concentrações obtidas noutros hidrolisados, por exemplo, em palha de sorgo e em palha de *Arundo* (1,38 e 1,70 g·L⁻¹, respetivamente) (Ferreira *et al.*, 2012; Torrado *et al.*, 2012).

Na Tabela 3.5 está apresentada a composição química dos hidrolisados de BAE após hidrólise ácida nas condições estudadas.

Tabela 3.5 - Composição (g·L⁻¹) dos hidrolisados obtidos para a hidrólise ácida do BAE para diferentes razões líquido/sólido

Componentes	RLS (g·g ⁻¹)			
	3*	3	4	5
Xilose	56,7	55,6	41,0	32,6
Arabinose	3,45	3,81	2,73	1,98
Glucose	4,30	3,20	2,70	2,30
Monossacáridos Totais	64,5	62,6	46,4	36,9
Ácido acético	15,9	14,8	11,2	9,1
HMF	0,09	0,09	0,08	0,07
Furfural	3,42	2,76	2,74	2,66
Compostos Fenólicos	5,00	6,53	5,45	5,02

*Com PEA a 100 °C durante 60 min.

Pela análise global dos resultados, pode-se concluir que a condição RLS 3 com PEA permitiu a obtenção de um hidrolisado muito rico em pentoses com cerca de $60,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. O teor de pentoses obtido é bastante favorável quando comparado com a maioria dos hidrolisados de resíduos agrícolas (Canilha *et al.*, 2004; Vazquez *et al.*, 2007).

Contudo, este hidrolisado tem o inconveniente de apresentar uns teores de ácido acético, furfural e compostos fenólicos relativamente elevado comparativamente a outros hidrolisados hemicelulósicos (Canilha *et al.*, 2004; Carvalheiro *et al.*, 2004a; Duarte *et al.*, 2004; Ferreira *et al.*, 2012; Vazquez *et al.*, 2007). Ao contrário da condição RLS 3 sem PEA, a condição RLS 5 permitiu obter um teor de pentoses 43% inferior à condição anterior mas, por outro lado, também uma menor concentração de compostos inibidores (22% para o HMF e furfural e 43% para o ácido acético). O teor de compostos inibidores obtidos nesta condição é inferior ao obtido para o mesmo hidrolisado hemicelulósico (RLS 3, H_2SO_4 3,5% (p-p⁻¹) a 130 °C durante 130 min) (Guerra, 2011). Ainda assim, o teor de compostos inibidores é superior ao de outros hidrolisados obtidos a partir de palha de sorgo e *Arundo*, *dreche* cervejeira e eucalipto, (Canilha *et al.*, 2004; Carvalheiro *et al.*, 2004a; Duarte *et al.*, 2004; Ferreira *et al.*, 2012; Vazquez *et al.*, 2007).

Deste modo, as condições RLS 3 com PEA, RLS 3 sem PEA e RLS 5 foram as condições selecionadas para avaliação do hidrolisado como meio de crescimento da levedura *Debaryomyces hansenii* CCMI 941. A primeira porque permitiu obter um hidrolisado rico em açúcares com cerca de $64,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de monossacáridos, dos quais $56,70 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ são xilose. A condição RLS 3 sem PEA permitiu obter um hidrolisado também rico em monossacáridos totais mas com menor teor de compostos inibidores, principalmente de ácido acético e furfural. Mesmo com uma metodologia de destoxificação adequada, suspeitou-se que o teor de compostos inibidores presentes iria exercer um efeito inibitório sobre o metabolismo microbiano. Para evitar tal resultado, escolheu-se a também a condição RLS 5 que apesar do menor teor em pentoses, o teor de compostos inibidores é consideravelmente mais baixo relativamente às outras condições encontrando-se abaixo do limite de adaptabilidade da levedura.

3.4. Avaliação da destoxificação na remoção de compostos inibidores

Os hidrolisados resultantes da hidrólise com ácido diluído do BAE contêm, além de pentoses e hexoses, compostos passíveis de inibir o metabolismo microbiano. Para minimizar o efeito tóxico desses inibidores, existem várias metodologias que podem ser aplicadas. Em geral, a destoxificação utilizando processos químicos e físico-químicos, é a operação mais utilizada.

Neste trabalho, foram testados diferentes procedimentos de destoxificação do hidrolisado

hemicelulósico com vista a avaliar o seu impacto na conversão dos açúcares a xilitol pela levedura *D. hansenii*.

Os hidrolisados obtidos na condição RLS 5, 130 min, 3,5% H₂SO₄ e 130 °C foram submetidos a diferentes tratamentos de destoxificação, nomeadamente a correção de pH a 5,5 (pH de cultivo), adsorção em carvão ativado com HCl e ativado com NaOH, resinas aniónicas e à destoxificação com membranas (por nanofiltração). Os hidrolisados obtidos na condição RLS 3 (com e sem PEA) 130 min, 3,5% H₂SO₄, 130 °C, foram apenas sujeitos à destoxificação por carvão ativado com NaOH. Para além destes tratamentos de destoxificação, alguns dos hidrolisados, nomeadamente os sujeitos à correção de pH, destoxificação com carvão ativado com HCl, com resinas aniónicas e com membranas foram ainda sujeitos a um tratamento adicional de concentração. Sendo cada método de destoxificação específico para determinados inibidores, podem ser obtidos melhores resultados através da combinação de dois ou mais métodos (Carvalho *et al.*, 2005a) e por isso, neste caso após destoxificação os hidrolisados foram submetidos a uma etapa de concentração por evaporação que para além de permitir aumentar a concentração de monossacáridos, pode também ser utilizado como método de destoxificação tendo em conta a volatilidade de alguns inibidores presentes.

Na Tabela 3.6 são apresentadas as percentagens de monossacáridos totais e de compostos inibidores que permaneceram no hidrolisado após cada tratamento.

A maioria dos métodos de destoxificação aplicados reduziu consideravelmente a concentração dos derivados de furanos sendo que o tratamento com membranas e a concentração do hidrolisado, as metodologias que permitiram remover maiores quantidades destes compostos. O método mais eficaz na remoção do furfural e HMF foi a filtração com membranas (100 e 41%, respetivamente). A concentração também se revelou muito eficiente na remoção do furfural (95-100%), o que se encontra de acordo com o esperado pois sendo o furfural um composto volátil, pode facilmente ser removido por evaporação à temperatura utilizada. Outros autores também verificaram a remoção deste composto usando o método de destoxificação por evaporação (Carvalho *et al.*, 2007; Carvalho *et al.*, 2005a; Ferreira *et al.*, 2012; Parajó *et al.*, 1997b; Guerra, 2011). O HMF, por outro lado, foi pouco removido por evaporação (7-16%) para condições de concentração 1,5 e 2 vezes em massa, respetivamente.

Tabela 3.6 - Influência dos vários tratamentos de destoxificação na remoção de compostos inibidores e de monossacáridos totais presentes no hidrolisado

Método de destoxificação	RLS (g·g ⁻¹)	Composição do hidrolisado ¹				
		Monossacáridos totais	HAc	HMF	Furf	Fenólicos totais
Nenhum	5	100	100	100	100	100
pH 5,5	5	93	95	74	59	94
Concentração (1,5x)	5	87	87	93	5	84
Concentração (2x)	5	88	83	84	0	90
Carvão ativado com NaOH	5	75	81	39	21	46
	3	77	99	57	23	50
	3 ²	76	81	65	41	35
Carvão ativado com HCl	5	99	89	38	13	27
Concentração (2x)	5	99	54	27	44	52
Resinas aniônicas	5	99	99	74	37	41
Concentração (2x)		112	72	47	0	78
Membranas (nanofiltração)	5	90	46	59	0	33
Concentração (2x)		84	41	69	0	83

¹ Os resultados estão apresentados sob a forma de percentagens dos compostos que permaneceram nos hidrolisados após os tratamentos; ² BAE após PEA. Glc-glucose; xyl-xilose; ara-arabinose; HAc-ácido acético; HMF-Hidroximetilfurfural; Furf - furfural

Os ácidos alifáticos em particular o acético foi também removido de forma muito eficiente através da filtração com membranas. Também os tratamentos com carvão ativado com HCl e ativado com NaOH permitiram a remoção máxima de 11 e 19% deste ácido. Estes métodos já tinham sido descritos para a remoção deste tipo de compostos (Carvalho *et al.*, 2005a; Parajó *et al.*, 1996c; Guerra, 2011). O hidrolisado destoxificado com carvão ativado com HCl e concentrado permitiu ainda a remoção adicional de 46% deste ácido. Refira-se que apesar de ser volátil, o ácido acético é um dos compostos tóxicos mais difíceis de remover dos hidrolisados. Em trabalhos anteriores utilizando resinas aniônicas *Dowex Marathon WBA* encontra-se descrita a remoção de 30% de ácido acético (Carvalho *et al.*, 2005a) ainda que neste trabalho não tenha sido possível a sua remoção com as resinas utilizadas. Alguns autores descrevem que o método de concentração por evaporação, reduz, em geral a presença deste composto (Wilson *et al.*, 1989) mas remoções significativas dependem da extensão da evaporação. Neste ensaio foi removido 17% do ácido acético após concentração 2 vezes em massa. Sendo este hidrolisado mais rico em ácido acético e conhecendo-se os seus efeitos para os microrganismos, seria desejável, para além do método de destoxificação com membranas, encontrar um método rápido, barato e eficaz para remover este composto.

O método menos eficaz na remoção de ácido acético e nos restantes compostos inibidores foi o do acerto de pH a 5,5, resultados esses concordantes com a bibliografia (Guerra, 2011; Carvalho *et al.*, 2005a; van Zyl *et al.*, 1988). Em comparação com outros métodos de destoxificação, os valores obtidos apesar de baixos são relativamente superiores às remoções referidas para a correção de pH de outros hidrolisados, nomeadamente, dreche cervejeira. Estes resultados tinham já sido demonstrados em trabalhos anteriores (Guerra,

2011). É de salientar que o principal objetivo deste método é corrigir o pH do meio para valores adequados à atividade microbiana, não proporcionando um método eficaz de remoção de compostos inibidores ainda que possa ocorrer a sua remoção parcial.

Para além dos compostos inibidores já referidos, foi também avaliada a remoção dos compostos fenólicos pelos diferentes métodos. Este grupo de inibidores aparece nos hidrolisados hemicelulósicos, como produtos provenientes dos extrativos e da degradação da lenhina e são considerados mais inibitórios do metabolismo microbiano que os derivados de furanos (Parajó *et al.*, 1998c).

Todos os métodos de destoxificação aplicados, permitiram alguma remoção de compostos fenólicos, sendo que os tratamentos com carvão ativado com HCl e com membranas os que conduziram a maior remoção (73 e 67%, respetivamente). A remoção de compostos fenólicos por estes tratamentos foi possível, mesmo a valores de pH abaixo dos valores de pK_a (7,4 - 9,9) (Larsson *et al.*, 1999) dos diversos compostos fenólicos. Uma vez que os hidrolisados se encontravam a pH 0,8 aquando do tratamento de destoxificação, apenas uma pequena fração dos compostos fenólicos estavam na forma dissociada, sendo que estes compostos foram eficientemente removidos. Os resultados obtidos para a concentração de compostos fenólicos estão de acordo com outros já publicados onde se conseguiram percentagens consideráveis de remoção utilizando o carvão ativado com HCl (Guerra, 2011; Salgado *et al.*, 2012). Entre os métodos testados, o ajuste de pH e o processo de concentração revelaram ser os menos eficientes na remoção dos compostos fenólicos.

Para além da desejada remoção de inibidores, alguns métodos de destoxificação apresentam a desvantagem de poder, também, remover açúcares. O método de destoxificação com carvão ativado com NaOH foi o que conduziu a maior perda de monossacáridos totais (no máximo 25%). A perda de açúcares pelo processo de destoxificação com carvão ativado com NaOH já foi observada noutros hidrolisados (Salgado *et al.*, 2012). Este resultado pode ser atribuído ao fato dos iões hidróxido na superfície do carvão serem capazes de ionizar e capturar monossacáridos neutros. O método do carvão ativado com NaOH apresenta como vantagem a capacidade de destoxificar e acertar o pH para valores adequados para a bioconversão num só passo, constituindo uma vantagem económica comparativamente ao carvão ativado com HCl que exige duas etapas de adição de agentes alcalinos e posterior remoção. Também no processo com membranas se verificou uma perda de 10% dos monossacáridos totais. Resultados semelhantes foram também descritos por outros autores (Maiti *et al.*, 2012). A concentração do hidrolisado 1,5 vezes em massa resultou numa perda de 13% do teor de

monossacáridos totais, o que pode ser explicado pela observação da formação de pequenos precipitados após concentração.

Esta característica inerente aos métodos de destoxificação, de conduzir a perdas significativas de açúcares no hidrolisado constitui uma desvantagem uma vez que possui um efeito negativo na economia global do processo. Deste modo, esta característica deve ser tomada em conta quando se pretende escolher um método de destoxificação para tornar a bioconversão mais eficiente.

No global dos resultados, pode afirmar-se que o tratamento com carvão ativado com HCl e com membranas foram os mais eficientes na remoção dos diversos compostos inibidores.

A eficiência de cada método de destoxificação foi posteriormente avaliado com estudos do processo de bioconversão com *D. hansenii*.

3.5. Efeito da destoxificação na composição do hidrolisado- possível impacto na produção de xilitol

A concentração máxima permitida para cada um dos compostos potencialmente inibidores num hidrolisado não pode ser estabelecida pois depende de muitos fatores, tais como o grau de adaptação dos microrganismos ao meio, processo de bioconversão empregue, presença simultânea de outros inibidores, que podem ter efeitos sinérgicos, suplementação e concentração, e o tipo de fonte de carbono (Duarte *et al.*, 2005; Duarte *et al.*, 2006; Mussatto *et al.*, 2004).

Estes compostos podem não ter um efeito inibitório no metabolismo microbiano mas podem influenciar negativamente o consumo eficaz dos açúcares presentes e, em consequência, influenciar a formação do produto desejado.

A concentração de xilose inicial no meio de fermentação é um fator crítico para a bioconversão da xilose a xilitol. Em geral, as concentrações iniciais de xilose nos hidrolisados hemicelulósicos, não são suficientes para se obter boas produtividades. Como tal, a concentração por evaporação foi uma forma de aumentar a concentração inicial de xilose nos hidrolisados não-destoxificados e destoxificados com carvão ativado com HCl, resinas aniónicas e com membranas. Depois de destoxificados e/ou concentrados o pH destes hidrolisados foi acertado a pH 5,5. Adicionalmente, uma vez que o efeito tóxico do ácido acético depende do pH do meio, nos hidrolisados concentrados e destoxificados com carvão ativado com HCl e com resinas aniónicas, foi também testado o crescimento em hidrolisados com pH mais elevado: 6,5 e 7,5.

Na Tabela 3.7. encontra-se a composição química dos hidrolisados utilizados para a preparação dos meios de cultura. A composição química dos hidrolisados é relativamente

diferente pois a razão líquido/sólido utilizada no processo de hidrólise pode variar e, além disso, é sujeita a diferentes processos de destoxificação que permitiram a remoção de determinados compostos inibidores mas em alguns casos, também de açúcares. Adicionalmente, alguns dos hidrolisados testados, nomeadamente os hidrolisados destoxificado com carvão ativado com HCl e os hidrolisados destoxificado com resinas aniônicas a pH 6,5 necessitaram de ser esterilizados em autoclave, e não por filtração, devido à formação de uma “goma”, conduzindo as perdas adicionais do teor de monossacáridos totais.

Tabela 3.7 - Composição dos hidrolisados utilizados como meio fermentativo para produção de xilitol

Métodos de destoxificação	Composição (g·L ⁻¹)								
	pH	RLS (g·g ⁻¹)	Xyl	Ara	Glc	HAc	Furf	HMF	Fenólicos totais
Ajuste de pH	5,5	5	23,5	2,54	1,60	7,75	1,85	0,05	4,11
Concentração (1,5 x)	5,5	5	32,6	3,52	2,31	9,33	0,15	0,05	3,45
Concentração (2x)	5,5	5	56,9	4,94	4,30	11,9	ND	0,06	3,87
	6,5	5	56,1	4,92	4,28	10,9	ND	0,05	3,90
	7,5	5	55,6	4,91	4,15	10,7	ND	0,05	4,02
Carvão NaOH	5,5	5	22,5	2,13	1,48	7,9	0,86	0,02	3,95
		3	26,5	3,69	1,93	11,4	0,91	0,04	4,51
		3 ¹	48,1	2,94	3,68	15,8	1,98	0,04	3,72
Carvão HCl e Concentração (2 x)	5,5 ²	5	40,9	4,71	4,69	9,80	ND	0,02	1,90
	6,5 ²		39,8	4,62	4,69	9,78	ND	0,02	2,10
	7,5 ²		39,4	4,39	4,48	9,76	ND	0,02	3,00
Resinas Concentração (2 x)	5,5	5	42,6	3,50	2,70	9,33	ND	0,03	4,20
	6,5 ²		31,8	3,24	3,24	10,3	ND	0,02	4,70
Membranas Concentração (2 x)	5,5	5	51,7	5,23	3,97	6,18	ND	0,05	3,50

¹BAE após PEA; ²Hidrolisados esterilizados em autoclave; ND – Não detetado; Xyl-xilose; ara-arabinose; Glc-glucose; HAc- ácido acético; Furf-furfural; HMF-Hidroximetilfurfural;

3.5.1. Efeito da destoxificação com carvão ativado com NaOH na produção de xilitol

Os trabalhos anteriores de produção de xilitol com *D.hansenii* CCMI 941 em meio quimicamente definido, demonstraram que as elevadas concentrações de compostos potencialmente tóxicos inibem o metabolismo microbiano bem como o crescimento celular. Mais especificamente, (Duarte *et al.*, 2006) verificaram que *D. hansenii*, em meio quimicamente definido contendo 9 g·L⁻¹ de ácido acético (pH 5,5), não apresentou qualquer crescimento.

Também, as concentrações de furfural e compostos fenólicos podem conduzir a um decréscimo da taxa específica de crescimento bem como da produtividade celular. Outros trabalhos demonstraram ainda que a presença concomitante de ácidos alifáticos, furfural, HMF e compostos fenólicos (mesmo em baixas concentrações) têm um efeito inibidor em *D. hansenii* (Carvalho *et al.*, 2005a; Duarte *et al.*, 2005). No entanto, a destoxificação de

hidrolisados de BAE com carvão ativado com NaOH permitiu o crescimento da levedura *D. hansenii* e a produção de xilitol em concentrações bastante satisfatórias ($13,8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) quando no meio não destoxificado não havia ocorrido qualquer crescimento (Guerra, 2011). Deste modo, avaliou-se o efeito da destoxificação do carvão ativado com NaOH (hidrolisados obtidos nas condições anteriormente referidas para as diferentes razões líquido/sólido: 3 com PEA, 3 sem PEA e 5 ($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)) no crescimento e produção de xilitol por *D. hansenii*. Todos os hidrolisados em estudo foram suplementados com vitaminas, microelementos e fontes de azoto, fósforo e magnésio (TEVM).

Nos hidrolisados obtidos para RLS 3 ($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) não houve crescimento ao contrário do que acontece no hidrolisado com RLS 5 ($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) (Tabela 3.8).

Nos primeiros a concentração de açúcares permaneceu inalterada, ainda que no caso dos compostos inibidores tenha sido possível verificar um ligeiro consumo (dados não apresentados) ainda que o consumo de inibidores não tenha sido suficiente para quantificar um crescimento celular. No hidrolisado obtido para a RLS 5 ($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) ainda que os rendimentos e produtividades em xilitol não sejam elevados as condições de cultura permitiram um consumo total da glucose, xilose e arabinose (Figura 5.5). Devido à baixa concentração inicial de compostos inibidores no hidrolisado comparativamente com os hidrolisados de RLS 3 ($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), o processo de destoxificação permitiu reduzir as concentrações dos compostos inibidores para limites de adaptabilidade da levedura. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 3.4.

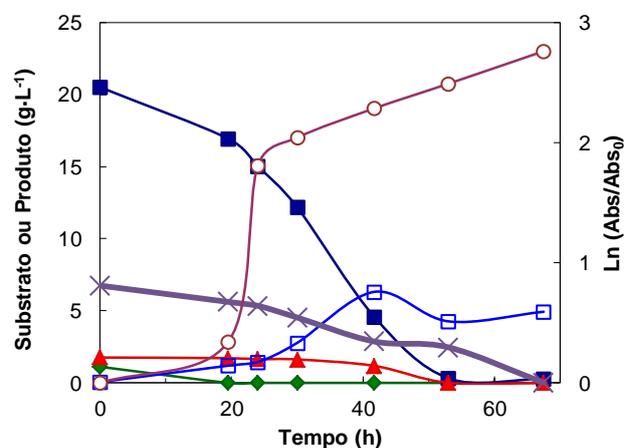


Figura 3.4 - Perfil de consumo de xilose (■), arabinose (▲), glucose (◆) e ácido acético (×), acumulação de xilitol (□) e de crescimento da levedura *D. hansenii* (○) em hidrolisado com RLS 5 ($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) destoxificado com carvão ativado com NaOH

A estirpe CCMI 941 apresenta como substrato preferencial a glucose, sendo que a velocidade de consumo de xilose aumentou quando ocorreu o esgotamento da glucose. A glucose e a xilose foram praticamente consumidas em simultâneo, sendo a glucose consumida nas primeiras 20 h. Este comportamento difere de outras leveduras produtoras de xilitol como *Candida guilliermondii* que apresenta consumo diáuxico da glucose e xilose

(Canilha *et al.* 2005). Para a xilose e arabinose foi observado um padrão de consumo distinto, sendo que o consumo de arabinose ocorre preferencial após o esgotamento da xilose.

Para este hidrolisado observou-se uma fase de latência de 20 h que deverá resultar da adaptação da levedura ao meio o que poderá dever-se à concentração de ácido acético presente ou ao efeito combinado dos vários inibidores. Ainda assim, as concentrações de outros compostos potencialmente inibidores não são elevadas. Refira-se também que pelo fato deste hidrolisado ser caracterizado por apresentar uma toxicidade elevada, optou-se por cultivar os inóculos em meio quimicamente definido, o que pode levar que a levedura possa necessitar de um período de adaptação até utilizar eficazmente a xilose. Ainda assim, o ácido acético apesar de se encontrar presente em concentrações elevadas foi totalmente consumido ao fim de 68 h de cultivo (Figura 3.4) contrariamente ao ácido fórmico que não foi consumido apesar de estar presente em menor concentração (dados não apresentados).

Tabela 3.8 - Influência da destoxificação com carvão ativado com NaOH nos parâmetros cinéticos e estequiométricos do crescimento e produção de xilitol pela levedura *D. hansenii*

Hidrolisado	Tempo ^a (h)	Q_x (g·L ⁻¹ ·h ⁻¹)	Q_{xyI} (g·L ⁻¹ ·h ⁻¹)	(Xilitol) _{máx} (g·L ⁻¹)	$Q_{xilitol}$ (g·L ⁻¹ ·h ⁻¹)	$Y_{xilitol}$ (g·g ⁻¹)
RLS 5 (g·g ⁻¹)	41,8	0,23	0,38	5,99	0,14	0,30

^aTodos os parâmetros foram calculados no máximo de xilitol. Q_x - produtividade celular; Q_{xyI} - taxa volumétrica de consumo de xilose; (Xilitol)_{máx}- concentração máxima de xilitol; $Q_{xilitol}$ - produtividade em xilitol; $Y_{xilitol}$ - rendimento em xilitol.

Neste ensaio, a produção máxima de xilitol foi de 5,99 g·L⁻¹ ao fim de 41,8 h de cultivo, correspondendo a uma produtividade e um rendimento em xilitol de 0,14 g·L⁻¹·h⁻¹, 0,30 g·g⁻¹, respetivamente.

Em comparação com outros hidrolisados destoxificados e suplementados com TEVM, a bioconversão do hidrolisado de BAE apresenta um valor de produtividade em polióis satisfatório. Guerra, 2011 para o mesmo hidrolisado obteve valores de produtividade inferiores (cerca de 30%). Contudo, trabalhos já publicados utilizando leveduras tais como, *C. guilliermondii* e *D. hansenii* NRRL Y-7426 com diferentes tipos de materiais lenhocelulósicos, nomeadamente palha de arroz e eucalipto, demonstraram resultados substancialmente melhores do que os obtidos neste trabalho (Parajó *et al.*, 1997a; Roberto *et al.*, 1996).

Por estas razões, optou-se por continuar a estudar a produção de xilitol no hidrolisado de BAE obtido para a RLS 5 e sujeito a outros processos de destoxificação. Para além disso, e por forma a tentar aumentar a produtividade, optou-se pelo aumento concentração de inóculo nos ensaios seguintes.

3.5.2. Efeito da concentração do hidrolisado na produção de xilitol

De modo a avaliar o grau de inibição do crescimento microbiano causado pelo hidrolisado de BAE obtido na RLS 5, a levedura *D. hansenii* foi cultivada em hidrolisado não-concentrado e não-destoxificado (sujeito apenas a correção do pH a 5,5). Para além desta condição, foi ainda crescida em hidrolisado concentrado (1,5 vezes) a pH 5,5 e em hidrolisados concentrados (2 vezes) a pH 5,5, 6,5 e 7,5. O processo de concentração tem como objetivo aumentar a concentração de açúcares no meio (favorável à produção de xilitol) e paralelamente remover inibidores voláteis. Desses inibidores, o que se encontra em maior concentração é o ácido acético. No entanto, tal como referido anteriormente, apesar deste ácido ser volátil, permanece maioritariamente no hidrolisado pelo que após evaporação a sua concentração aumenta.

Na Figura 3.5 são apresentados os perfis para consumo de xilose, arabinose, glucose e ácido acético, acumulação de xilitol e de crescimento da levedura *D. hansenii* em hidrolisado não-concentrado e hidrolisado concentrado (1,5 vezes) ambos a pH 5,5.

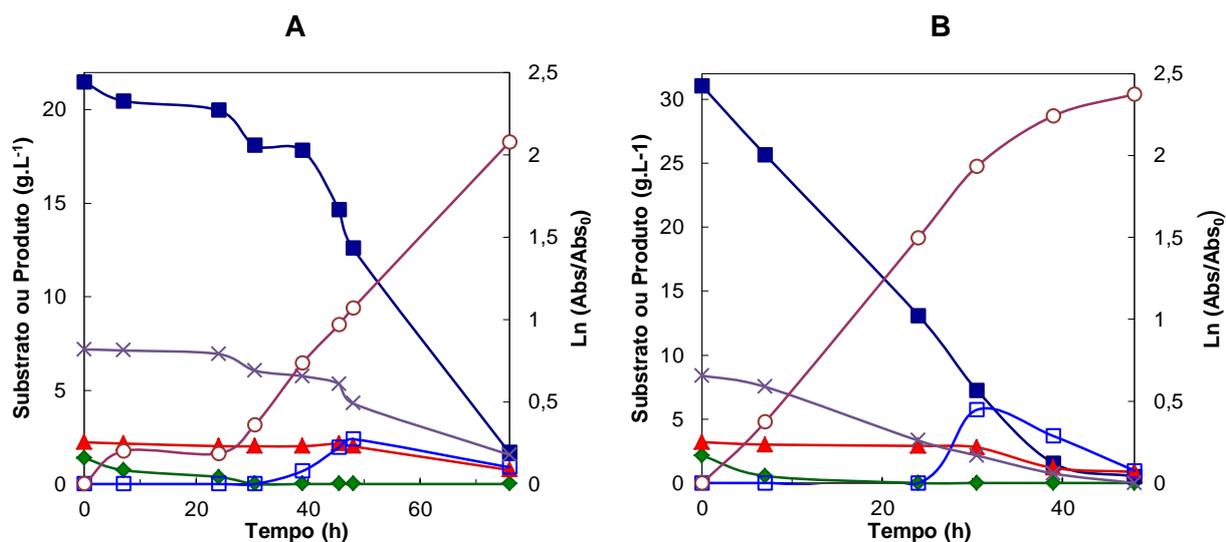


Figura 3.5 - Perfil de consumo de xilose (■), arabinose (▲), glucose (◆) e ácido acético (×), acumulação de xilitol (□) e de crescimento da levedura *D. hansenii* (○) em hidrolisado não-concentrado (A) e hidrolisado concentrado (1,5 vezes em massa) (B).

No hidrolisado não-concentrado, observou-se uma fase de latência relativamente longa (24 h), contrariamente ao que se observou no hidrolisado concentrado (1,5 vezes). Estes resultados sugerem, que no caso do hidrolisado concentrado, a levedura não necessitou de um período de adaptação e, por isso, apresente um crescimento mais eficiente. Nas condições estudadas, os compostos potencialmente inibidores, especificamente, o furfural encontrava-se em menor concentração (0,14 g.L⁻¹) no hidrolisado concentrado

comparativamente ao hidrolisado não-concentrado ($1,06 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). Para ambos os hidrolisados, o furfural e o HMF foram consumidos na totalidade (dados não apresentados).

O hidrolisado concentrado (1,5 x) apresentava um teor de ácido acético 14% superior ao do hidrolisado não-concentrado. Ainda assim, a levedura apresentou um crescimento elevado e uma produção apreciável de xilitol ($5,7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), o que demonstra uma elevada tolerância desta levedura a este tipo de compostos. A concentração de xilitol obtida deve-se, também, ao fato da concentração de xilose ser superior neste ensaio.

Em ambos os hidrolisados, a glucose e a xilose foram praticamente consumidas em simultâneo, sendo que no caso do hidrolisado concentrado a glucose foi consumida nas primeiras 7 h. No caso do hidrolisado não-concentrado, o consumo de xilose só teve um grande incremento ao fim de 40 h de fermentação, ao contrário do que aconteceu no hidrolisado concentrado onde praticamente a totalidade da xilose foi consumida ao fim de 72h. Relativamente à arabinose, o consumo máximo foi de 66 e 73%, nos hidrolisados não-concentrados e concentrados, respetivamente

Com base nestes resultados, foi também avaliado o efeito da concentração (2 vezes em massa) no crescimento e produção de xilitol por *D. hansenii*. Tendo em conta que neste caso a concentração de ácido acético era ainda mais elevada e considerando o efeito do pH na toxicidade de ácidos fracos, efetuaram-se ensaios para diferentes valores de pH 5,5, pH 6,5 e 7,5. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 3.6 e Tabela 3.9.

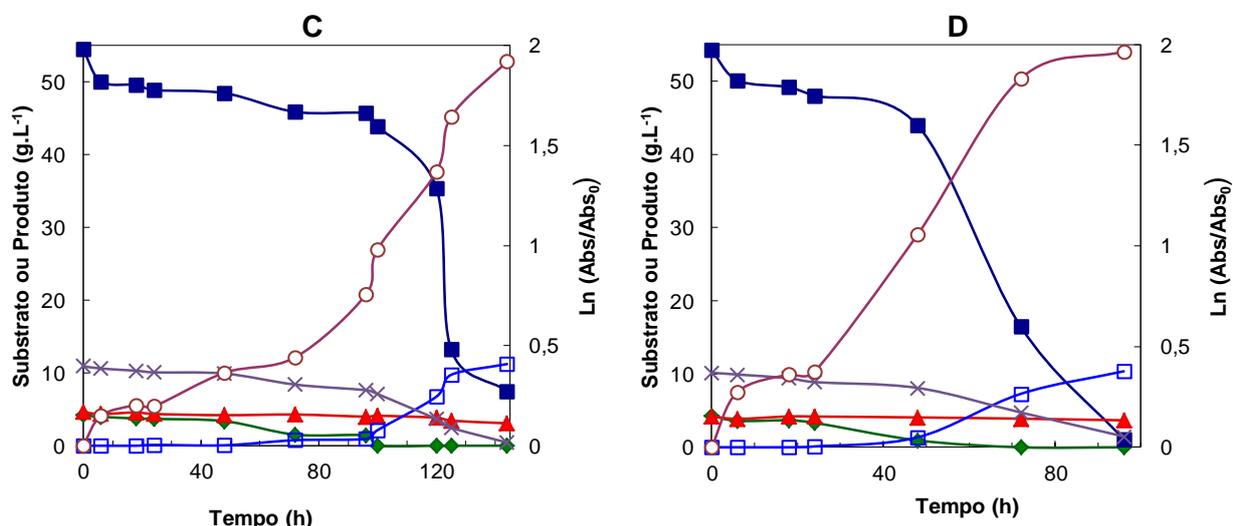


Figura 3.6. - Perfil de consumo de xilose (■), arabinose (▲), glucose (◆) e ácido acético (×), acumulação de xilitol (□) e de crescimento da levedura *D. hansenii* (○) em hidrolisado concentrado (2 vezes em massa) a pH 6,5 (C) e hidrolisado concentrado (2 vezes em massa) a pH 7,5 (D).

No hidrolisado concentrado (2 vezes) a pH 5,5 não ocorreu crescimento, ao contrário do que aconteceu para os restantes hidrolisados em que se observou um aumento significativo do crescimento celular.

Para ambos os hidrolisados observou-se uma fase de latência relativamente longa (24 h) muito similar à encontrada para o hidrolisado não-concentrado, que supõe que possa ser atribuída à elevada concentração de ácido acético, uma vez que a concentração de outros inibidores, particularmente o furfural, diminui com o processo de evaporação. No entanto, ainda assim os compostos potencialmente inibidores como o ácido acético, furfural e HMF foram consumidos na sua totalidade em ambos os ensaios (dados não apresentados).

Em ambos os casos, a glucose e a xilose foram consumidas em simultâneo, sendo a primeira consumida totalmente ao fim de 96 e 48 h de cultivo para os meios a pH 6,5 e 7,5, respetivamente. Relativamente à xilose, verificou-se uma taxa de consumo distinto nos hidrolisados testados. Ao fim de 72 h de cultivo no hidrolisado a pH 7,5 observou-se o consumo de 70% da xilose enquanto que para o hidrolisado a pH 6,5 só ocorreu um consumo expressivo de xilose (cerca de 35%) após 120 h de fermentação. O mesmo padrão relativamente à velocidade de consumo da arabinose foi observado em ambos os ensaios. Após 96 h, o consumo de arabinose foi idêntico (13%), atingindo o máximo (34%) após 144 h de cultivo no meio a pH 6,5.

Na Tabela 3.9 estão apresentados os parâmetros cinéticos e estequiométricos do crescimento e produção de xilitol por *D. hansenii* CCMI 941 nos hidrolisados referidos anteriormente.

Tabela 3.9 - Influência do processo de concentração nos parâmetros cinéticos e estequiométricos do crescimento e produção de xilitol pela levedura *D. hansenii*

Hidrolisado	Tempo ^a (h)	Q_x (g·L ⁻¹ ·h ⁻¹)	Q_{xy} (g·L ⁻¹ ·h ⁻¹)	(Xilitol) _{máx} (g·L ⁻¹)	$Q_{xilitol}$ (g·L ⁻¹ ·h ⁻¹)	$Y_{xilitol}$ (g·g ⁻¹)
Não concentrado pH 5,5	48	0,15	0,35	2,77	0,06	0,17
Concentrado 1,5 x pH 5,5	30,5	0,39	1,00	5,72	0,19	0,19
Concentrado 2 x pH 6,5	144	0,15	0,33	11,2	0,08	0,24
Concentrado 2 x pH 7,5	77	0,15	0,69	10,4	0,13	0,20

^aTodos os parâmetros foram calculados no máximo de xilitol. Q_x - produtividade celular; Q_{xy} - taxa volumétrica de consumo de xilose; (Xilitol)_{máx}- concentração máxima de xilitol; $Q_{xilitol}$ - produtividade em xilitol; $Y_{xilitol}$ - rendimento em xilitol.

A taxa de consumo de xilose apresentou o valor mais elevado para o hidrolisado concentrado (1,5 vezes) que apresentou também uma maior produtividade em xilitol. Pressupõe-se que este resultado se deva à significativa remoção de furfural pelo processo de concentração e paralelamente ao aumento da concentração de açúcares no meio. Apesar do ligeiro aumento do teor de ácido acético este não foi prejudicial para o crescimento e produção de xilitol. Nos hidrolisados concentrados 2 vezes, a taxa de consumo de xilose foi superior no hidrolisado a pH 7,5 (52% relativamente ao hidrolisado a

pH 6,5), ainda que não se tenha traduzido numa maior produção de xilitol. O fato da taxa de consumo de xilose ser superior no hidrolisado a pH 7,5, pode dever-se ao aumento do pH do meio tornar o ácido acético menos tóxico para o metabolismo microbiano. Por outro lado, esta ocorrência pode ser confirmada pelo fato de no decorrer da fermentação ocorrer a diminuição da concentração de ácido acético presente no meio, ainda que pouco significativa, permitindo concomitantemente o consumo de xilose e a produção de xilitol.

A concentração máxima de xilitol obtida foi de $11,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ao fim de 144 h de cultivo (hidrolisado concentrado 2 vezes, a pH 6,5) o que corresponde a uma produtividade e rendimento em xilitol de $0,08 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ e $0,24 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$, respetivamente. O valor máximo de produtividade foi obtido no hidrolisado concentrado 1,5 vezes, sugerindo que existe um limite de concentração, a partir do qual a produção de xilitol passa a ser negativamente afetada, particularmente devido ao aumento da concentração de ácido acético.

Por outro lado, a produtividade em xilitol no hidrolisado concentrado 2 vezes a pH 7,5 é superior (cerca de 39%) relativamente ao hidrolisado concentrado a pH 6,5. Este fato é explicado pelo aumento do pH no meio, tornando o ácido acético menos tóxico. No entanto, o rendimento mais elevado em xilitol 16% superior comparativamente ao meio com pH 7,5, foi obtido a pH 6,5, provavelmente pelo pH se encontrar mais próximo do pH ótimo (5,5).

Ao contrário do que se encontra descrito na literatura, para meios de cultivo semelhantes não ocorreu a formação de outros coprodutos tais como o etanol e glicerol. Este fato constituiu uma característica importante para a etapa de otimização da produção de xilitol, uma vez que interessa que as condições operacionais sejam aquelas que favoreçam a produção de xilitol em detrimento do crescimento celular ou de outros coprodutos.

Ainda que seja difícil uma comparação direta com os valores obtidos noutros hidrolisados por apresentarem uma composição distinta em açúcares e compostos tóxicos, comparando os resultados obtidos com a literatura com hidrolisados não-destoxificados (mas com concentrações de inibidores muito inferiores) pode afirmar-se que em termos de produtividade e rendimento em xilitol, os resultados obtidos são bastante satisfatórios (Carvalho *et al.*, 2007; Torrado *et al.*, 2010).

Os resultados globais mostram que o principal problema na limitação do crescimento nos hidrolisados não-concentrados e concentrados (2 vezes) a pH 5,5 parece ser a presença de elevadas concentrações de inibidores, nomeadamente ácido acético, realçando a necessidade de recorrer a uma metodologia de destoxificação adequada.

3.5.3. Efeito da destoxificação com carvão ativado com HCl na produção de xilitol

O rendimento em xilitol obtido nos hidrolisados concentrados (2 vezes) encontra-se muito aquém do descrito para esta levedura noutros hidrolisados, sendo também a produtividade

volumétrica correspondente relativamente baixa. Em alternativa à destoxificação com carvão ativado com NaOH foi, também, estudada a produção de xilitol utilizando hidrolisados destoxificados com carvão ativado com HCl. No final do processo de destoxificação e concentração 2x, o pH dos hidrolisados foi acertado a 5,5, 6,5 e 7,5. No ensaio com hidrolisado destoxificado e concentrado 2x a pH 6,5 foi ainda testado o efeito da disponibilidade de oxigénio na produção de xilitol. Na Figura 3.7 estão apresentados os resultados obtidos.

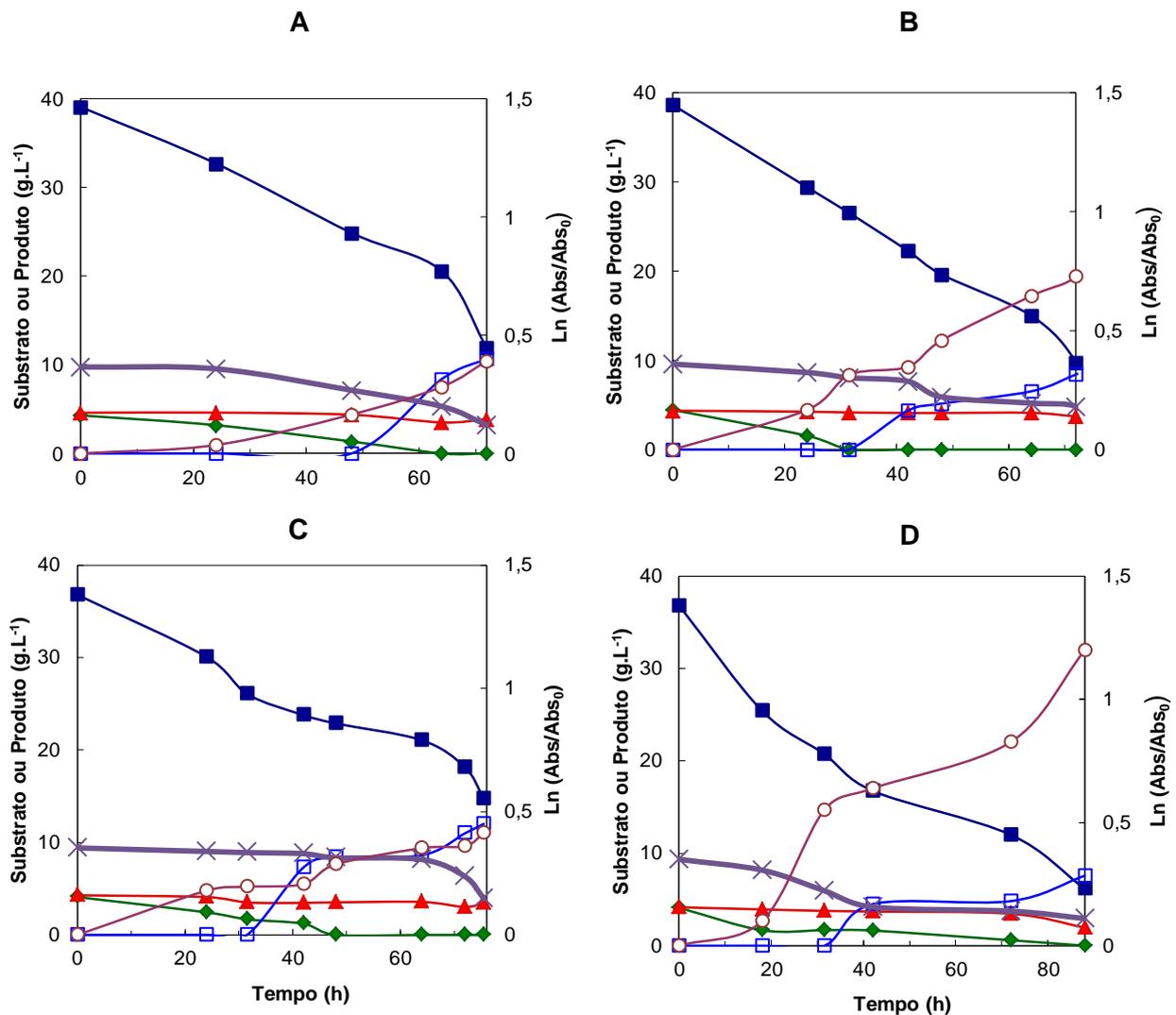


Figura 3.7 - Perfil de consumo de xilose (■), arabinose (▲), glucose (◆) e ácido acético (×), acumulação de xilitol (□) e de crescimento da levedura *D. hansenii* (○) em hidrolisado destoxificado e concentrado (2 vezes em massa) a pH 5,5 (A) hidrolisado destoxificado e concentrado (2 vezes em massa) a pH 6,5 com elevada disponibilidade de oxigénio (B) hidrolisado destoxificado e concentrado (2 vezes em massa) a pH 6,5 com baixa disponibilidade de oxigénio (C) e hidrolisado destoxificado e concentrado (2 vezes em massa) a pH 7,5 (D).

Pela Figura 3.7 pode-se observar que tal como o observado nos hidrolisados concentrados anteriores, todos os ensaios se caracterizam por fases de latência relativamente longas (cerca de 24 h), exceto no meio destoxificado com pH 7,5 (18 h). Nas condições estudadas,

os compostos potencialmente inibidores como o furfural e HMF foram consumidos em simultâneo tendo, em todos os casos, ocorrido nas primeiras 10 h de cultivo (dados não apresentados). A fase de latência mais curta pode ser explicada pela presença de ácido acético na forma dissociada, tornando-se menos tóxico. O conjunto dos resultados corrobora com os anteriormente obtidos (Figura 5.4) relativamente à possibilidade de ter havido uma certa “dificuldade” de adaptação da levedura no caso dos meios constituídos por elevadas concentrações de ácido acético (acima das 9 g·L⁻¹) originado durante o processo de concentração.

Para todos os hidrolisados testados, a glucose e a xilose foram praticamente consumidas em simultâneo. A taxa de consumo de glucose varia de acordo com as condições testadas. Em todos os hidrolisados, com exceção para o hidrolisado a pH 6,5 com elevada taxa de arejamento, observou-se que o consumo de glucose só ocorre na totalidade entre as 45-72 h. Esta observação pode dever-se às elevadas concentrações de compostos inibidores, nomeadamente ácido acético, e à necessidade de adaptação do microrganismo a estas condições conduzindo a taxas de consumo deste substrato mais baixas.

Em nenhum dos hidrolisados a xilose foi consumida na sua totalidade sendo que no ensaio com hidrolisado destoxificado a pH 6,5 com elevada taxa de arejamento observou-se um consumo de 92% de xilose ao fim de 76 h de fermentação. Contudo, é se salientar que nos ensaios com hidrolisado destoxificado com pH 6,5 com baixa disponibilidade de oxigénio e no destoxificado com pH 5,5 o consumo máximo de xilose foi apenas de 58 e 70%, respetivamente. Deste modo, seria necessário um prolongamento do período de fermentação para que a produção máxima de xilitol fosse atingida. Também no hidrolisado a pH 7,5 se observou um comportamento distinto relativamente ao consumo de xilose, ou seja, o consumo foi mais acentuado nas primeiras 24 h, relativamente aos restantes hidrolisados. Relativamente à arabinose, o seu consumo máximo foi de 53 e 16%, nos hidrolisados destoxificado a pH 7,5 e destoxificado a pH 5,5, respetivamente. Estes dados juntamente com os do crescimento sugerem que o aumento do pH no meio promove o consumo de pentoses para a produção de biomassa ao invés da produção de xilitol.

Na Tabela 3.10 são apresentados os parâmetros cinéticos e estequiométricos do crescimento e produção de xilitol por *D. hansenii* CCMI 941 nos hidrolisados referidos anteriormente.

Tabela 3.10 - Influência do processo de destoxificação com carvão ativado com HCl nos parâmetros cinéticos e estequiométricos do crescimento e produção de xilitol pela levedura *D. hansenii*

Hidrolisado	Taxa arejamento	Tempo ^a (h)	Q _x (g·L ⁻¹ ·h ⁻¹)	Q _{xyI} (g·L ⁻¹ ·h ⁻¹)	(Xilitol) _{máx} (g·L ⁻¹)	Q _{xilitol} (g·L ⁻¹ ·h ⁻¹)	Y _{xilitol} (g·g ⁻¹)
pH 5,5	Elevada ^b	72	0,18	0,38	8,2	0,13	0,21
pH 6,5	Elevada ^b	75,5	0,28	0,47	7,2	0,10	0,17
pH 6,5	Limitada ^c	75,5	0,15	0,49	10,0	0,13	0,22
pH 7,5	Elevada ^b	88	0,27	0,35	7,6	0,11	0,16

^aTodos os parâmetros foram calculados no máximo de xilitol, ^bbalões com anteparas; ^cbalões sem anteparas; Q_x- produtividade celular; Q_{xyI}- taxa volumétrica de consumo de xilose; (Xilitol)_{máx}- concentração máxima de xilitol; Q_{xilitol}- produtividade em xilitol; Y_{xilitol}- rendimento em xilitol.

A concentração mais elevada de xilitol registada foi 10 g·L⁻¹ ao fim de 75,5 h de cultivo para o ensaio com hidrolisado a pH 6,5 em condições de limitação de oxigénio. Este resultado corrobora com os obtidos anteriormente, no qual uma elevada taxa de arejamento favorece o crescimento celular aumentando assim os respetivos requisitos de crescimento em detrimento da formação de xilitol. Estes resultados vão de encontro aos obtidos por (Sampaio *et al.*, 2008; Guerra, 2011) e por (Silva-Fernandes *et al.*, 2008) na bioconversão com *D. hansenii* em MQD, hidrolisado de BAE e palha de trigo, respetivamente.

O valor máximo de produtividade e rendimento em xilitol foram obtidos no hidrolisado com pH 6,5 e em condições de limitação de oxigénio. Contudo, comparativamente com os resultados obtidos anteriormente (5.4.3) verificou-se que a produtividade em xilitol mais elevada foi obtida em hidrolisado não-destoxificado e concentrado 1,5 vezes (0,19 g·L⁻¹·h⁻¹). Por outro lado, os rendimentos em xilitol para os hidrolisados não-destoxificados concentrados 2 vezes com pH 6,5 e 7,5 foram 20 e 30% superiores relativamente aos hidrolisados destoxificados e concentrados a pH 6,5 e 7,5. Estes resultados pressupõem que em termos de produtividade, este processo de destoxificação afetou negativamente a produção de xilitol. Os resultados obtidos podem estar relacionados com uma alteração da viscosidade do hidrolisado, visível após destoxificação com carvão ativado. Após destoxificação com este carvão, a obtenção de um hidrolisado era praticamente incolor o que constitui um indicador de uma boa destoxificação (comprovada pelas análises químicas), ainda que se tenha observado a formação de uma “goma” que terá provavelmente dificultado o crescimento microbiano e a produção de xilitol. Este resultado encontra-se em concordância com alguns resultados obtidos noutros trabalhos, nomeadamente no hidrolisado de palha de sorgo cujas taxas de produtividade e rendimento baixaram consideravelmente no hidrolisado destoxificado em comparação com o hidrolisado não-destoxificado (Torrado *et al.*, 2012). Domínguez *et al.*, 1999 demonstrou melhorias significativas no consumo de xilose e produtividade em xilitol quando sujeitaram o bagaço de cana-de-açúcar ao tratamento com carvão ativado. *D. hansenii* NRRL Y-7426 cultivada em hidrolisado de eucalipto destoxificado com carvão utilizando o sistema de reator contínuo com agitação, obteve-se um rendimento em xilitol de 0,28 g·g⁻¹.

Pela análise do conjunto de resultados conclui-se que o rendimento e produtividade em xilitol mais elevados foram obtidos em meio destoxificado com pH 6,5 com reduzida taxa de arejamento. Contudo, é de salientar que no meio destoxificado com pH 5,5 se obtiveram valores de produtividade e rendimento em xilitol muito próximos, na mesma ordem de grandeza. Assim, torna-se necessário a procura de uma outra metodologia de destoxificação para o hidrolisado a pH 5,5 em condições de limitação de oxigênio, de modo a favorecer a produção de xilitol.

Esta característica para além de inibir o metabolismo do microrganismo, também dificulta o processo de esterilização do meio, i.e., requer esterilização em autoclave, o que conduz a perdas consideráveis (cerca de 20%) de açúcares no hidrolisado.

3.5.4. Efeito da destoxificação com resinas aniónicas na produção de xilitol

De modo a reduzir a fase de latência e assim aumentar as produtividades, foi avaliada a produção de xilitol utilizando como meio de cultivo hidrolisados previamente destoxificados com resinas de troca aniónica e concentrados (2 vezes) com pH acertado a 5,5 e a 6,5. Optou-se por não avaliar o efeito do pH 7,5 neste ensaio, uma vez que os resultados anteriores demonstraram não conduzir a valores de produtividade e rendimentos satisfatórios, relativamente aos outros valores de pH. Também neste ensaio se verificou a uma ligeira alteração da viscosidade do hidrolisado (ainda que menos significativa relativamente no ensaio com carvão ativado com HCl) durante o acerto do pH a 6,5, exigindo também a esterilização do meio por autoclavagem, o que conduziu à perda de 23% dos monossacáridos totais.

Os resultados obtidos são apresentados na Figura 3.8. Ao contrário do que aconteceu nos ensaios anteriores, neste ensaio as fases de latência foram mais curtas, praticamente inexistentes, observando-se logo no início da fermentação um aumento significativo da biomassa no meio a pH 5,5 comparativamente com o pH 6,5. Pressupõe-se que este resultado seja derivado da ligeira viscosidade que se formou no hidrolisado a pH 6,5. Adicionalmente, o fato de não ter sido detetado furfural para além da formação da “goma” como ocorreu no ensaio anterior do hidrolisado destoxificado com carvão, poderão justificar as curtas fases de latência. Por outro lado, nas condições estudadas neste trabalho, o ácido acético embora presente em elevadas concentrações (acima de $9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) não se revelou muito inibitório. O seu consumo foi pouco expressivo, no total de 13 e 21 % para o hidrolisado a pH 5,5 e 6,5, respetivamente. Por último, o HMF foi totalmente consumido nas primeiras 7 h de cultivo (dados não apresentados).

Em ambos os hidrolisados a glucose e a xilose foram consumidas em simultâneo, sendo que a glucose foi consumida nas primeiras 24 h e 84% da xilose foi consumida ao fim de 67 h de cultivo. Em relação à arabinose, o seu consumo máximo foi de 15 % em ambos os hidrolisados.

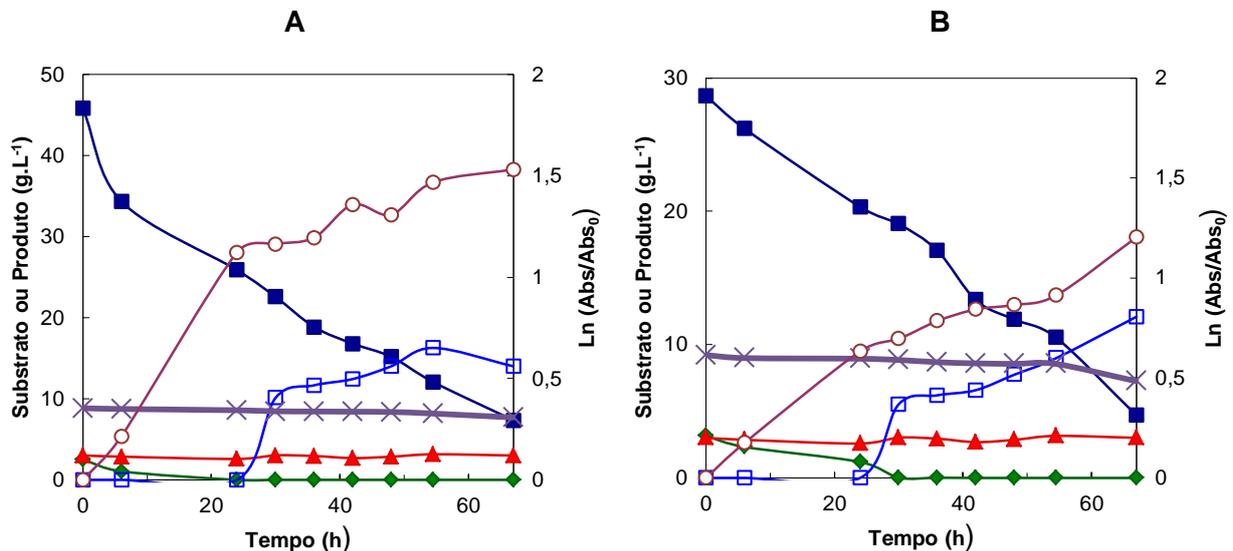


Figura 3.8 - Perfil de consumo de xilose (■), arabinose (▲), glucose (◆) e ácido acético (×), acumulação de xilitol (□) e de crescimento da levedura *D. hansenii* (○) em hidrolisado destoxificado com resinas aniônicas e concentrado (2 vezes em massa) a pH 5,5 (A) hidrolisado destoxificado com resinas aniônicas e concentrado (2 vezes em massa) a pH 6,5 (B).

Na Tabela 3.11 estão apresentados os parâmetros cinéticos e estequiométricos do crescimento e produção de xilitol por *D. hansenii* CCMI 941 nos hidrolisados referidos anteriormente.

Tabela 3.11 - Influência do processo de destoxificação com resinas aniônicas nos parâmetros cinéticos e estequiométricos do crescimento e produção de xilitol pela levedura *D. hansenii*

Hidrolisado	Tempo ^a (h)	Q_x (g·L ⁻¹ ·h ⁻¹)	Q_{xy} (g·L ⁻¹ ·h ⁻¹)	(Xilitol) _{máx} (g·L ⁻¹)	$Q_{xilitol}$ (g·L ⁻¹ ·h ⁻¹)	$Y_{xilitol}$ (g·g ⁻¹)
pH 5,5	54,5	0,09	0,71	16,28	0,30	0,42
pH 6,5	54,5	0,12	0,44	12,09	0,22	0,50

^aTodos os parâmetros foram calculados no máximo de xilitol. Q_x - produtividade celular; Q_{xy} - taxa volumétrica de consumo de xilose; (Xilitol)_{máx}- concentração máxima de xilitol; $Q_{xilitol}$ - produtividade em xilitol; $Y_{xilitol}$ - rendimento em xilitol.

A concentração máxima de xilitol obtida foi 16,28 g·L⁻¹ ao fim de 54,5 h de cultivo (hidrolisado com pH 5,5), correspondendo a uma produtividade volumétrica de 0.30 g·L⁻¹·h⁻¹. Os resultados obtidos mostram que nestas condições a produção de xilitol por *D. hansenii* é bastante favorecida quando o pH do meio é próximo de 5,5 e a concentração de açúcares no meio próxima de 50 g·L⁻¹ e em condições de limitação de oxigénio.

Comparando os resultados obtidos com a literatura, pode afirmar-se que em termos de produtividade e rendimento em xilitol, os resultados obtidos neste ensaio são muito

satisfatórios. Em trabalhos anteriores, para hidrolisados de BAE, a produtividade volumétrica em xilitol obtida foi muito inferior ($0,10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) à determinada neste estudo. Os rendimentos em xilitol em hidrolisados derivados da oliveira são também muito inferiores aos obtidos. Por exemplo, *Candida tropicalis* em hidrolisado de podas de oliveira (Martin *et al.*, 2010) e *Pachysolen tannophilus* em hidrolisado de caroços de azeitona (Cuevas *et al.*, 2009) apresentam um rendimento em xilitol de $0,13 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$.

Apesar da grande toxicidade do hidrolisado de BAE, os resultados obtidos para produção de xilitol por *D. hansenii* comparam muito favoravelmente com os obtidos hidrolisados de dreche cervejeira sujeitos ao mesmo processo de destoxificação. No caso daquele hidrolisado, verificou-se até que a destoxificação prejudicava a produção de xilitol, sendo os melhores resultados obtidos com hidrolisado não-destoxificado (Carvalho *et al.*, 2005a).

Apesar das melhorias alcançadas ainda assim não foi possível atingir a performance anteriormente descrita para a levedura *D. hansenii* CCMI 941 para outros hidrolisados hemicelulósicos (Carvalho *et al.*, 2007; Silva-Fernandes *et al.*, 2008).

3.5.5. Efeito da destoxificação com membranas e suplementação na produção de xilitol

Por forma a melhorar os parâmetros cinéticos e estequiométricos do crescimento e produção de xilitol por *D. hansenii*, avaliou-se o efeito do processo de destoxificação com membranas na produção de xilitol em condições de limitação de oxigénio, concentração de xilose cerca de $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e a pH 5,5. O hidrolisado testado foi sujeito a destoxificação por membranas, seguida da concentração por evaporação (2 vezes). Nestes hidrolisados foi também avaliado o efeito da adição de diferentes tipos de suplementos, nomeadamente TEVM, extrato de levedura, “corn steep liquor” e extrato de dreche. Para efeitos de comparação, nomeadamente com ensaios anteriores, o meio suplementado com TEVM será considerado como controlo. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 3.9 e Tabela 3.12.

Pela Figura 3.9 pode observar-se uma fase de latência relativamente curta em todos os ensaios o que demonstra que a levedura não necessitou de um período de adaptação ao meio pelo que apresentou um crescimento eficiente. A ausência de HMF e furfural (Tabela 3.7) e a baixa concentração de ácido acético no meio ($4,66 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) comparativamente aos outros ensaios, contribuíram para estes resultados. O ácido acético foi maioritariamente consumido ao longo da fermentação, sendo o seu consumo de 54% obtido no hidrolisado suplementado com extrato de levedura e cerca de 62-66% para os restantes hidrolisados

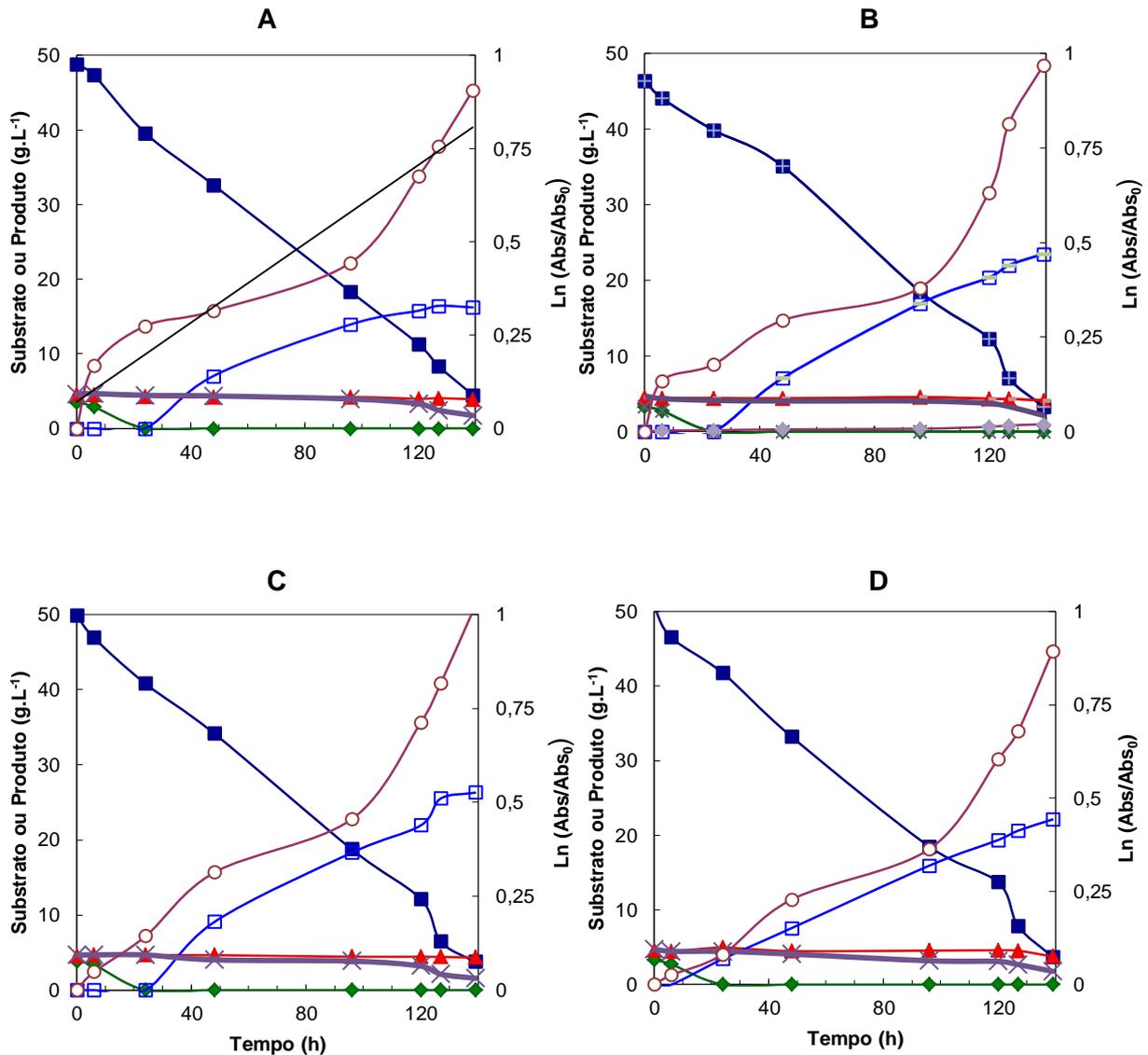


Figura 3.9 - Perfil de consumo de xilose (■), arabinose (▲) e glucose (◆) e ácido acético (×), acumulação de xilitol (□), de crescimento da levedura *D. hansenii* (○) em hidrolisado suplementado com TEVM (A) hidrolisado suplementado com EL (B) hidrolisado suplementado com CSL (C) e hidrolisado suplementado com ED (D).

A taxa de consumo de glucose foi idêntica em todos os meios testados, tendo sido completamente consumida ao fim de 12 h de cultivo. Relativamente à taxa de consumo da xilose esta foi idêntica para todos os hidrolisados (cerca de $0,30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$), sendo que a suplementação com extrato de dreche foi a que resultou numa taxa de consumo ligeiramente mais elevada ($0,34 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$). O consumo de arabinose, por sua vez, variou entre 4 a 18 % após 139 h de cultivo sendo que o mais elevado obtido para o hidrolisado suplementado com extrato de dreche.

Na Tabela 3.12 estão apresentados os parâmetros cinéticos e estequiométricos do crescimento e produção de xilitol por *D. hansenii* CCMI 941 nos hidrolisados referidos anteriormente.

Tabela 3.12 - Influência suplementação nos parâmetros cinéticos e estequiométricos do crescimento e produção de xilitol pela levedura *D. hansenii*

Hidrolisado	Tempo ^a (h)	Q_x (g·L ⁻¹ ·h ⁻¹)	Q_{xyl} (g·L ⁻¹ ·h ⁻¹)	(Xilitol) _{máx} (g·L ⁻¹)	$Q_{xilitol}$ (g·L ⁻¹ ·h ⁻¹)	$Y_{xilitol}$ (g·g ⁻¹)
Controlo	127	0,07	0,32	17,51	0,14	0,39
EL	139	0,04	0,31	23,51	0,17	0,55
CSL	139	0,06	0,33	26,29	0,19	0,57
ED	139	0,05	0,34	22,12	0,16	0,47

^aTodos os parâmetros foram calculados no máximo de xilitol. Q_x - produtividade celular; Q_{xyl} - taxa volumétrica de consumo de xilose; (Xilitol)_{máx}- concentração máxima de xilitol; $Q_{xilitol}$ - produtividade em xilitol; $Y_{xilitol}$ - rendimento em xilitol.

No hidrolisado suplementado com TEVM a concentração máxima de xilitol foi de 17,51 g·L⁻¹, ao fim de 127 h de cultivo, o que corresponde a uma produtividade volumétrica de 0,14 g·L⁻¹·h⁻¹. O fato da produtividade em xilitol obtida neste ensaio ser 53% inferior ao valor obtido no ensaio com hidrolisado destoxificado com resinas aniónicas a pH 5,5, ainda que a concentração inicial de xilose seja muito semelhante, sugere que a remoção de furanos e/ou a remoção de ácido acético poderão, de algum modo, afetar negativamente a produção de xilitol. Refira-se que a estimulação do crescimento celular em *P. stipitis*, na presença baixas concentrações de furfural tem sido descrita por alguns autores (Roberto *et al.*, 1991).

Dos nutrientes testados, verificou-se que todos favorecem a produção de xilitol, sendo o CSL aquele que demonstrou ser mais adequado, permitindo obter uma concentração de xilitol mais elevada: 26,3 g·L⁻¹. Também neste caso, se observou um efeito positivo quer na produtividade quer no rendimento em xilitol (Tabela 3.12). Também o extrato de levedura permitiu obter um rendimento bastante elevado em xilitol (28% relativamente ao controlo) sendo a produtividade 18% superior.

No conjunto dos resultados, o CSL e o extrato de levedura demonstraram ser os melhores suplementos. O CSL surge como um nutriente capaz de potenciar acentuadamente a acumulação de xilitol. Por outro lado, apresenta vantagens económicas quando comparado com outro tipo de suplementação (extrato de levedura, TEVM, entre outros) (Diz *et al.*, 2002). Também o extrato de dreche obtido no laboratório a partir de um tratamento térmico de resíduos da indústria cervejeira, possibilitou a obtenção rendimentos e produtividade em xilitol bastante satisfatórios, até superiores aos obtidos no hidrolisado suplementado com TEVM.

Ao contrário de outros trabalhos publicados, não se verificou a formação de outros produtos tais como etanol e glicerol no decorrer do processo fermentativo, tal como descrito para outros hidrolisados o que constitui uma vantagem (Carvalho *et al.*, 2007; Torrado *et al.*, 2012).

Os resultados obtidos encontram-se de acordo com trabalhos publicados, os quais demonstraram que a presença de CLS na concentração usada no presente trabalho (5 g·L⁻¹)

em hidrolisado de madeira de eucalipto, os valores de produtividade e rendimentos máximos são muito similares, na mesma ordem de grandeza (Diz *et al.*, 2002). Trabalhos realizados com hidrolisados de dreche cervejeira demonstraram que a presença de CSL resultou em valores de produtividade em xilitol 53% superiores aos valores obtidos neste trabalho, sendo o valor de rendimento em xilitol semelhante. Contudo, para aquele hidrolisado, o extrato levedura foi o suplemento que permitiu melhores resultados nos parâmetros anteriormente referidos (Carvalho *et al.*, 2007).

3.6. Resultados globais dos diferentes métodos de destoxificação e suplementação do hidrolisado de BAE na produção de xilitol por *D. hansenii*

Em síntese do conjunto dos resultados obtidos pode afirmar-se que nos ensaios em que se utilizaram hidrolisados produzidos com uma RLS 3 não houve crescimento. Para ocorrer crescimento e produção de xilitol o hidrolisado deverá ser produzido com uma RLS 5 e, neste caso o simples ajuste de pH permitiu o crescimento e a produção de xilitol mas com baixo rendimento e produtividade.

A destoxificação com carvão ativado com NaOH permitiu melhorar o desempenho da levedura conduzindo a um aumento do rendimento e produtividade em xilitol. O mesmo não se verificou para os hidrolisados destoxificados com carvão ativado com HCl. Mesmo com uma concentração de inóculo mais forte e em meios com diferentes valores de pH inicial, o rendimento e produtividade em xilitol ficaram aquém dos valores anteriormente obtidos para os hidrolisados destoxificados com carvão ativado com NaOH. Ainda assim, nestes hidrolisados o consumo de xilose foi praticamente total.

Um aspeto importante é que a simples concentração do hidrolisado (1,5 ou 2 vezes) permitiu uma melhoria do desempenho da levedura. No caso dos hidrolisados concentrados 2 vezes essa melhoria do desempenho está no entanto condicionada pelos valores de pH sendo neste caso os melhores resultados obtidos a pH 6,5, provavelmente pelo fato de nestas condições ser atenuado o efeito tóxico do ácido acético. A destoxificação com resinas aniónicas permitiu uma melhoria significativa dos resultados. A produtividade mais elevada foi obtida no hidrolisado destoxificado com resinas e a pH 5,5. Os ensaios nos hidrolisados destoxificados por nanofiltração e suplementados com diferentes nutrientes, demonstram que este tipo de destoxificação e a adição de suplementos como o CSL, o extrato de levedura e até o extrato de dreche permitem obter rendimentos em xilitol mais elevado. É de referir que no hidrolisado suplementado com extrato de dreche a concentração de biomassa inicial foi cerca 29% inferior à dos outros hidrolisados. Este fato pode explicar, os baixos valores obtidos para a produtividade e rendimento xilitol, comparativamente aos outros

hidrolisados. Ainda assim, e um pouco surpreendentemente as produtividades obtidas foram mais baixas que as previamente alcançadas noutro hidrolisado com maior concentração de inibidores. Isto parece sugerir que uma determinada concentração de compostos tóxicos pode eventualmente estimular a produção de xilitol.

Tabela 3.13 - Condições de produção de xilitol em hidrolisado de BAE.

RLS (g·g ⁻¹)	Método de destoxificação	pH	Disponibilidade de oxigênio	Suplementação	X ₀ (g·L ⁻¹)	Xyl ₀ (g·L ⁻¹)	% Xyl	Y _{XOH} (g·g ⁻¹)	Q _{XOH} (g·L ⁻¹ ·h ⁻¹)	Q _x (g·L ⁻¹ ·h ⁻¹)
3*	Carvão ativado com NaOH	5,5	Limitada ^a	TEVM	0,4	36,5	-	-	-	-
3	Carvão ativado com NaOH	5,5	Limitada ^a	TEVM	0,4	23,8	-	-	-	-
5	Carvão ativado com NaOH	5,5	Limitada ^a	TEVM	0,5	20,5	77,7	0,30	0,14	0,23
5	Ajuste de pH	5,5	Elevada ^b	TEVM	0,9	21,5	78,0	0,17	0,06	0,15
5	Concentração (1,5 vezes)	5,5	Elevada ^b	TEVM	1,6	31,0	98,4	0,19	0,19	0,39
5	Concentração (2 vezes)	5,5	Elevada ^b	TEVM	2,5	54,8	-	-	-	-
5	Concentração (2 vezes)	6,5	Elevada ^b	TEVM	1,0	54,5	86,3	0,24	0,08	0,15
5	Concentração (2 vezes)	7,5	Elevada ^b	TEVM	1,8	54,3	98,0	0,20	0,13	0,15
5	Carvão ativado com HCl	5,5	Elevada ^b	TEVM	3,2	39,1	69,6	0,21	0,13	0,18
5	Carvão ativado com HCl	6,5	Elevada ^b	TEVM	4,6	38,6	92,2	0,17	0,10	0,28
5	Carvão ativado com HCl	6,5	Limitada ^b	TEVM	4,2	36,8	99,9	0,22	0,13	0,25
5	Carvão ativado com HCl	7,5	Elevada ^a	TEVM	2,6	36,8	83,2	0,16	0,11	0,27
5	Resinas aniônicas	5,5	Limitada ^a	TEVM	3,2	45,8	83,9	0,42	0,30	0,09
5	Resinas aniônicas	6,5	Limitada ^a	TEVM	2,3	28,7	83,6	0,45	0,20	0,12
5	Membranas	5,5	Limitada ^a	TEVM	2,2	48,8	90,8	0,39	0,14	0,07
5	Membranas	5,5	Limitada ^a	EL	2,2	46,4	92,9	0,55	0,17	0,04
5	Membranas	5,5	Limitada ^a	CSL	2,1	49,9	92,5	0,57	0,19	0,06
5	Membranas	5,5	Limitada ^a	ED	1,5	50,7	92,7	0,47	0,16	0,05

*BAE com PEA. X₀, concentração de biomassa inicial; Xyl₀, concentração de xilose inicial; % Xyl, percentagem de xilose consumida; Y_{XOH}, rendimento em xilitol; Q_{XOH}, produtividade em xilitol; Q_x, produtividade celular; ^abalões sem anteparas; ^bbalões com anteparas; EL, extrato de levedura; CSL, "Corn Steep liquor"; ED, extrato de dreche cervejeira

4. Considerações finais e perspectivas

O bagaço de azeitona extratado possui uma composição favorável para a obtenção de hidrolisados ricos em pentoses, uma vez que é relativamente rico em xilano e constitui a fração mais suscetível de ser hidrolisada por um processo com ácido diluído. A pré-extração aquosa (PEA) do BAE permitiu uma remoção significativa de extrativos dos quais os compostos fenólicos representam uma parte significativa, sendo o hidroxitirosol o composto maioritário.

As condições de hidrólise otimizadas utilizando como catalisador o H_2SO_4 a 3,5% (p.p⁻¹) (130°C, 130 min e RLS 3) permitem obter um hidrolisado com cerca de 60 g·L⁻¹ de pentoses, dos quais cerca de 56 g·L⁻¹ são xilose. Simultaneamente são formados alguns compostos potencialmente inibidores do metabolismo microbiano, nomeadamente ácidos alifáticos, em particular o acético, derivados de furano e compostos fenólicos, em concentrações significativamente elevadas quando comparados com outros hidrolisados de natureza semelhante (Canilha *et al.*, 2004; Carvalheiro *et al.*, 2004a; Vazquez *et al.*, 2007).

O hidrolisado obtido nas mesmas condições operacionais mas para a RLS 5 apresentou um teor de pentoses 43% inferior. Por outro lado, esta condição resulta na produção de um hidrolisado com teor de compostos inibidores bastante inferior. A destoxificação dos diferentes tipos de hidrolisados obtidos com carvão ativado com NaOH promoveu uma remoção eficiente da maioria destes compostos, mas apenas se verificou o crescimento da levedura *Debaryomyces hansenii* nos hidrolisados obtidos para a RLS 5. Deste modo, o hidrolisado obtido nesta condição foi o escolhido para avaliar o efeito de diversos métodos de destoxificação, tais como o acerto de pH, concentração por evaporação, tratamento com carvão ativado com HCl, resinas aniónicas e membranas. A nanofiltração revelou ser o método mais eficaz permitindo a remoção de 54% do ácido acético presente, 41% de HMF, 100% do furfural e 67% dos compostos fenólicos totais. A remoção eficiente dos compostos inibidores permitiu aumentar o desempenho da levedura *D. hansenii* ao nível da fase de latência, taxa específica de crescimento, produtividade celular e rendimento em xilitol. Contudo, contrariamente ao que seria de esperar os melhores resultados da produtividade em xilitol foram obtidos nos hidrolisados destoxificados com resinas aniónicas. Outro aspeto que poderá ter influenciado a bioconversão do hidrolisado foi o arejamento e o valor de pH do meio, verificando-se que um menor arejamento e um valor de pH próximo do valor de cultivo (5,5) induzem uma maior produção de xilitol em detrimento do crescimento microbiano.

A suplementação dos hidrolisados destoxificados por nanofiltração com diferentes nutrientes demonstrou que o tipo de suplemento afeta significativamente o rendimento em xilitol. A

suplementação com “*Corn Steep Liquor*” – um dos suplementos mais baratos entre os ensaiados - foi a que garantiu um melhor desempenho da levedura *D. hansenii* neste hidrolisado, inclusivamente com rendimento e produtividade superiores aos obtidos no hidrolisado suplementado com TEVM. Demonstrou-se assim, que uma adequada destoxificação e suplementação do hidrolisado permitem obter valores de rendimento e produtividade volumétrica em xilitol bastante satisfatórias.

Em termos globais, pode concluir-se que os resultados da produção de xilitol pela levedura *D. hansenii* CCMI 941 em hidrolisado de BAE comparam favoravelmente com os trabalhos já realizados com hidrolisados hemicelulósicos desta matéria-prima bem como com outros hidrolisados, mostrando assim as potencialidades deste material e da levedura para uma melhoria do processo desenvolvido.

Para complementar os estudos realizados, dando continuidade ao processo biotecnológico de produção de xilitol por *D. hansenii* em hidrolisado de BAE seria importante estudar em maior profundidade os seguintes aspetos:

- Desenvolvimento/otimização do processo combinado para a extração aquosa de compostos fenólicos e hidrólise seletiva da fração hemicelulósica;
- Compreender o efeito dos compostos inibidores principalmente do ácido acético e compostos fenólicos na produção de xilitol;
- Desenvolver uma metodologia simples e eficaz para remoção do ácido acético;
- Desenvolver estudos de adaptação da levedura ao hidrolisado (“aclimação”), nomeadamente através da produção de inóculos nestes meios, por forma a obter um crescimento mais eficiente e conseqüentemente uma maior taxa de produção de xilitol.
- Otimizar a concentração de suplementos para a produção de xilitol;
- Avaliar o comportamento do inóculo para o processo de “scale-up”, através de crescimentos sucessivos em descontínuo;

5. Referências bibliográficas

- Agbor, V.B.; Cicek, N.; Sparling, R.; Berlin, A.; Levin, D.B.** 2011. Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. *Biotechnology Advances*. **29**:675-685.
- Akpinar, O.; Levent, O.; Bostanci, S.; Bakir, U.; Yilmaz, L.** 2011. The optimization of dilute acid hydrolysis of cotton stalk in xylose production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. **163**:313-325.
- Albuquerque, J.A.; González, J.; García, D.; Cegarra, J.** 2004. Agrochemical characterisation of "alperujo", a solid by-product of the two-phase centrifugation method for olive oil extraction. *Bioresource Technology*. **91**:195-200.
- Amirante, P.; Di Renzo, G.C.; Di Giovacchino, L.; Catalano, P.** 1993. Evolución tecnológica de las instalaciones de extracción del aceite de oliva. *Olivae: revista oficial del Consejo Oleícola Internacional* 43-53.
- Angelini, L.G.; Ceccarini, L.; Di Nassa, N.N.O.; Bonari, E.** 2009. Comparison of *Arundo donax* L. and *Miscanthus x giganteus* in a long-term field experiment in Central Italy: Analysis of productive characteristics and energy balance. *Biomass & Bioenergy*. **33**:635-643.
- Artajo, L.S.; Romero, M.P.; Suárez, M.; Motilva, M.J.** 2007. Partition of phenolic compounds during the virgin olive oil industrial extraction process. *European Food Research and Technology*. **225**:617-625.
- Bernardo-Gil, M.G.; Roque, R.; Roseiro, L.B.; Duarte, L.C.; Gírio, F.M.; Esteves, M.P.** 2011. Supercritical extraction of carob kibbles (*Ceratonia siliqua* L.). *The Journal of Supercritical Fluids*. **59**:36-42.
- Binod, P.; Sindhu, R.; Singhanía, R.R.; Vikram, S.; Devi, L.; Nagalakshmi, S.; Kurien, N.; Sukumaran, R.K.; Pandey, A.** 2010. Bioethanol production from rice straw: An overview. *Bioresource Technology*. **101**:4767-4774.
- Breuer, U.; Harms, H.** 2006. *Debaryomyces hansenii* – an extremophilic yeast with biotechnological potential. *Yeast*. **23**:415-437.
- Buzetzki, E.; Sidorova, K.; Cvangrosova, Z.; Cvangros, J.** 2011. Catalytic role of lignocellulosic materials in triacylglycerol cracking. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*. **92**:314-323.
- Canilha, L.; de Almeida e Silva; Solenzal, A.I.N.** 2004. Eucalyptus hydrolysate detoxification with activated charcoal adsorption or ion-exchange resins for xylitol production. *Process Biochemistry*. **39**:1909-1912.
- Carvalho, F.; Duarte, L.C.; Gírio, F.M.** 2008. Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments. *Journal of Scientific & Industrial Research*. **67**:849-864.
- Carvalho, F.; Duarte, L.C.; Medeiros, R.; Gírio, F.M.** 2004a. Optimization of brewery's spent grain dilute-acid hydrolysis for the production of pentose-rich culture media. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. **115**:1059-1072.

- Carvalho, F.; Duarte, L.C.; Medeiros, R.; Gírio, F.M.** 2007. Xylitol production by *Debaryomyces hansenii* in brewery spent grain dilute-acid hydrolysate: effect of supplementation. *Biotechnology Letters*. **29**:1887-1891.
- Carvalho, F.; Esteves, M.P.; Parajó, J.C.; Pereira, H.; Gírio, F.M.** 2004b. Production of oligosaccharides by autohydrolysis of brewery's spent grain. *Bioresource Technology*. **91**:93-100.
- Carvalho, F.; Duarte, L.C.; Lopes, S.; Parajó, J.C.; Pereira, H.; Gírio, F.M.** 2005a. Evaluation of the detoxification of brewery's spent grain hydrolysate for xylitol production by *Debaryomyces hansenii* CCMI 941. *Process Biochemistry*. **40**:1215-1223.
- Carvalho, F.; Duarte, L.C.; Lopes, S.; Parajó, J.C.; Pereira, H.; Gírio, F.M.** 2006. Supplementation requirements of brewery's spent grain hydrolysate for biomass and xylitol production by *Debaryomyces hansenii* CCMI 941. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. **33**:646-654.
- Carvalho, F.; Garrote, G.; Parajó, J.C.; Pereira, H.; Gírio, F.M.** 2005b. Kinetic modeling of brewery's spent grain autohydrolysis. *Biotechnology Progress*. **21**:233-243.
- Cegarra Rosique, J.; Albuquerque Méndez, J.A.; Gonzalvez, J.; Garcia, D.** 2004. Tratamiento del orujo de oliva de dos fases mediante compostaje. *Olivae: revista oficial del Consejo Oleícola Internacional* 12-17.
- Chen, L.F.; Gong, C.S.** 1985. Fermentation of Sugarcane Bagasse Hemicellulose Hydrolysate to Xylitol by a hydrolysate-acclimatized yeast. *Journal of Food Science*. **50**:226-228.
- Civantos López-Villalta, L.; Contreras Carazo, R.; Grana Gil, R.M.** 1992. Obtención del aceite de oliva virgen. *Agrícola Española*, Madrid.
- Cuevas, M.; Sanchez, S.; Bravo, V.; Cruz, N.; Garcia, J.F.** 2009. Fermentation of enzymatic hydrolysates from olive stones by *Pachysolen tannophilus*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. **84**:461-467.
- De Leonadis, A.; Aretini, A.; Alfano, G.; Macciola, V.; Ranalli, G.** 2008. Isolation of a hydroxytyrosol-rich extract from olive leaves*and evaluation of its antioxidant properties and bioactivity. *European Food Research and Technology*. **226**:653-659.
- de Vries, R.P.; Visser, J.** 2001. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **65**:497-522.
- Derriche, R.; Berrahmoune, K.S.** 2007. Valorisation of olive oil cake by extraction of hemicelluloses. *Journal of Food Engineering*. **78**:1149-1154.
- Di Giovacchino, L.** 1991. Extracción del aceite de las aceitunas por presión, centrifugación y percolación: efectos de las técnicas sobre los rendimientos en aceite. *Olivae*. **36**: 14-41, 1991.
- Diz, J.; Cruz, J.M.; Domínguez, H.; Parajó, J.C.** 2002. Xylitol production from *Eucalyptus* wood hydrolysates in low-cost fermentation media. *Food Technology and Biotechnology*. **40**:191-197.

- Domínguez, J.M.; Cruz, J.M.; Roca, E.; Domínguez, H.; Parajó, J.C.** 1999. Xylitol production from wood hydrolyzates by entrapped *Debaryomyces hansenii* and *Candida guilliermondii* cells. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. **81**:119-130.
- du Preez, J.C.** 1994. Process parameters and environmental factors affecting d-xylose fermentation by yeasts. *Enzyme and Microbial Technology*. **16**:944-956.
- Duarte, L.C.; Carvalho, F.; Neves, I.; Gírio, F.M.** 2005. Effects of aliphatic acids, furfural, and phenolic compounds on *Debaryomyces hansenii* CCMI 941. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. **121**:413-425.
- Duarte, L.C.; Bernardo, P.; Lourenço, P.M.L.; Carvalho, F.** 2012. Extracted olive pomace autohydrolysis: Process optimization and products characterization. *submitted*.
- Duarte, L.C.; Carvalho, F.; Lopes, S.; Marques, S.; Parajó, J.C.; Gírio, F.M.** 2004. Comparison of two posthydrolysis processes of brewery's spent grain autohydrolysis liquor to produce a pentose-containing culture medium. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. **113-116**:1041-1058.
- Duarte, L.C.; Carvalho, F.; Tadeu, J.; Gírio, F.M.** 2006. The combined effects of acetic acid, formic acid, and hydroquinone on *Debaryomyces hansenii* physiology. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. **129-132**:461-475.
- Duarte, L.C.; Esteves, M.P.; Carvalho, F.; Vicente, P.; Gírio, F.M.** 2007. Os subprodutos agro-industriais de natureza lenhocelulósica: caracterização da situação portuguesa. *Engenharia Química*. **5**:56-62.
- Duff, S.J.B.; Murray, W.D.** 1996. Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: A review. *Bioresource Technology*. **55**:1-33.
- Ebringerová, A.; Hromádková, Z.; Heinze, T.** 2005. Hemicellulose. *Adv Polym Sci*. **186**:1-67.
- Encinas, J.P.; Lopez-Diaz, T.M.; Garcia-Lopez, M.L.; Otero, A.; Moreno, B.** 2000. Yeast populations on Spanish fermented sausages. *Meat Science*. **54**:203-208.
- Felipe, M.G.A.; Alves, L.A.; Silva, S.S.; Roberto, I.C.; Mancilha, I.M.; Silva, J.B.A.E.** 1996. Fermentation of eucalyptus hemicellulosic hydrolysate to xylitol by *Candida guilliermondii*. *Bioresource Technology*. **56**:281-283.
- Fengel, D.; Wegener, G.** 1984. Wood. Chemistry, ultrastructure, reactions. Walter de Gruyter: Berlin & New York. 613pp.
- Fernández-Bolaños, J.; Rodríguez, G.; Gómez, E.; Guillén, R.; Jiménez, A.; Heredia, A.; Rodríguez, R.** 2004. Total recovery of the waste of two-phase olive oil processing: Isolation of added-value compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **52**:5849-5855.
- Fernández-Bolaños, J.; Rodríguez, G.; Rodríguez, R.; Guillén, R.; Jiménez, A.** 2006. Extraction of interesting organic compounds from olive oil waste. *Grasas y Aceites*. **57**:95-106.
- Fernández-Bolaños, J.; Rodríguez, G.; Rodríguez, R.; Heredia, A.; Guillén, R.; Jiménez, A.** 2002. Production in large quantities of highly purified hydroxytyrosol

from liquid-solid waste of two-phase olive oil processing or "alperujo". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **50**:6804-6811.

Ferreira, C.; Torrado, I.; Guerra, V.; Salgado, J.M.; Gírio, F.M.; Carvalheiro, F.; Duarte, L.C. 2012. Main factors affecting xylitol production in *Arundo donax* dilute acid hydrolyzate. Proceedings of the "1st Iberoamerican Congress on Biorefineries". Los Cabos, Baja California, México.

Freitas, A.C.; Pais, C.; Malcata, F.X.; Hogg, T.A. 1996. Microbiological characterization of Picante da Beira Baixa cheese. *Journal of Food Protection*. **59**:155-160.

García, G.M. 2004. Evolución temporal del alperujo procedente de almazara. Universidad de Córdoba, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos y de Montes.

Garrote, G.; Domínguez, H.; Parajó, J.C. 1999. Mild autohydrolysis: an environmentally friendly technology for xylooligosaccharide production from wood. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. **74**:1101-1109.

Gírio, F.M.; Fonseca, C.; Carvalheiro, F.; Duarte, L.C.; Marques, S.; Bogel-Lukasik, R. 2010. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. *Bioresource Technology*. **101**:4775-4800.

Gómez, L.D.; Steele King, C.G.; McQueen-Mason, S.J. 2008. Sustainable liquid biofuels from biomass: the writing's on the walls. *New Phytologist*. **178**:473-485.

Gravitis, J. Suzuki, M. 1999. Biomass refinery's way to produce value added products and base for agricultural zero emissions systems. *Proc. 99 Intern. Conference on Agric. Engineering, Beijing, China*. Citeseer.

Guerra, V. 2011. Optimização de pré-tratamento para a hidrólise selectiva da hemicelulose de bagaço de azeitona: estudo da bioconversão dos hidrolisados para a produção de xilitol. Tese de Mestrado. Instituto Superior de Agronomia.

Guerzoni, M.E.; Lanciotti, R.; Marchetti, R. 1993. Survey of the physiological properties of the most frequent yeasts associated with commercial chilled foods. *International Journal of Food Microbiology*. **17**:329-341.

Hendriks, A.T.W.M.; Zeeman, G. 2009. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*. **100**:10-18.

Hepbasli, A.; Akdeniz, R.C.; Vardar-Sukan, F.; Oktay, Z. 2003. Utilization of olive cake as a potential energy source in Turkey. *Energy Sources*. **25**:405-417.

Himmel, M.E.; Ding, S.Y.; Johnson, D.K.; Adney, W.S.; Nimlos, M.R.; Brady, J.W.; Foust, T.D. 2007. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science*. **315**:804-807.

Hyvonen, L.; Koivistoinen, P.; Voirol, F. 1982. Food technological evaluation of xylitol. *Advances in Food Research*. **28**:373-403.

Lara, M.A.; Rodríguez-Malaver, A.J.; Rojas, O.J.; Holmquist, O.; González, A.M.; Bullón, J.; Peñaloza, N.; Araujo, E. 2003. Black liquor lignin biodegradation by *Trametes elegans*. *International biodeterioration & biodegradation*. **52**:167-173.

- Larsson, S.; Reimann, A.; Nilvebrant, N.O.; Jönsson, L.J.** 1999. Comparison of different methods for the detoxification of lignocellulose hydrolyzates of spruce. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. **77-9**:91-103.
- Maiti, S.K.; Lukka Thuyavan, Y.; Singh, S.; Oberoi, H.S.; Agarwal, G.P.** 2012. Modeling of the separation of inhibitory components from pretreated rice straw hydrolysate by nanofiltration membranes. *Bioresource Technology*. **In press**.
- Martin, J.F.G.; Cuevas, M.; Bravo, V.; Sanchez, S.** 2010. Ethanol production from olive prunings by autohydrolysis and fermentation with *Candida tropicalis*. *Renewable Energy*. **35**:1602-1608.
- McCarthy, J.L.; Islam, A.** 2000. Lignin chemistry, technology, and utilization: A brief history. *Lignin : Historical, Biological, and Materials Perspectives*. **742**:2-99.
- Miro-Casas, E.; Covas, M.I.; Farre, M.; Fito, M.; Ortújo, J.; Weinbrenner, T.; Roset, P.; de la Torre, R.** 2003. Hydroxytyrosol disposition in humans. *Clinical Chemistry*. **49**:945-952.
- Mondal, S.; Wickramasinghe, S.R.** 2008. Produced water treatment by nanofiltration and reverse osmosis membranes. *Journal of Membrane Science*. **322**:162-170.
- Moure, A.; Gullón, P.; Domínguez, H.; Parajó, J.C.** 2006. Advances in the manufacture, purification and applications of xylo-oligosaccharides as food additives and nutraceuticals. *Process Biochemistry*. **41**:1913-1923.
- Mussatto, S.I.; Roberto, I.C.** 2004. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review. *Bioresource Technology*. **93**:1-10.
- Nag, A.** 2008. Biofuels refining and performance. *NICE (News & Information for Chemical Engineers)*. **26**:165.
- Nakase, T.; Suzuki, M.** 1985. Taxonomic studies on *Debaryomyces hansenii* (Zopf) Lodder et Kreger-van Rij and related species. I. Chemotaxonomic Investigations. *Journal of General and Applied Microbiology*. **31**:49-69.
- Niaounakis, M.; Halvadakis, C.P.** 2006. Olive processing waste management. Literature review and patent survey. *in* Ed.Elsevier. (ed.). p. 498.
- Nigam, P.; Singh, D.** 1995a. Processes of fermentative production of Xylitol – a sugar substitute. *Process Biochemistry*. **30**:117-124.
- Nobre, A.; Duarte, L.C.; Roseiro, J.C.; Gírio, F.M.** 2002. A physiological and enzymatic study of *Debaryomyces hansenii* growth on xylose- and oxygen-limited chemostats. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **59**:509-516.
- Nolleau, V.; Preziosi-Belloy, L.; Delgenes, J.P.; Navarro, J.M.** 1993. Xylitol production from xylose by two yeast strains: Sugar tolerance. *Current Microbiology*. **27**:191-197.
- Obied, H.K.; Allen, M.S.; Bedgood, D.R.; Prenzler, P.D.; Robards, K.; Stockmann, R.** 2005. Bioactivity and analysis of biophenols recovered from olive mill waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **53**:823-837.

- Palmqvist, E.; Galbe, M.; Hahn-Hägerdal, B.** 1998. Evaluation of cell recycling in continuous fermentation of enzymatic hydrolysates of spruce with *Saccharomyces cerevisiae* and on-line monitoring of glucose and ethanol. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **50**:545-551.
- Palmqvist, E.; Hahn-Hägerdal, B.** 2000. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: Inhibition and detoxification. *Bioresource Technology*. **74**:17-24.
- Parajó, J.C.; Domínguez, H.; Domínguez, J.M.** 1996a. Charcoal adsorption of wood hydrolysates for improving their fermentability: Influence of the operational conditions. *Bioresource Technology*. **57**:179-185.
- Parajó, J.C.; Domínguez, H.; Domínguez, J.M.** 1996b. Production of xylitol from concentrated wood hydrolysates by *Debaryomyces hansenii*: Effect of the initial cell concentration. *Biotechnology Letters*. **18**:593-598.
- Parajó, J.C.; Domínguez, H.; Domínguez, J.M.** 1996c. Study of charcoal adsorption for improving the production of Xylitol from wood hydrolysates. *Bioprocess Engineering*. **16**:39-43.
- Parajó, J.C.; Domínguez, H.; Domínguez, J.M.** 1997a. Improved xylitol production with *Debaryomyces hansenii* Y-7426 from raw or detoxified wood hydrolysates. *Enzyme and Microbial Technology*. **21**:18-24.
- Parajó, J.C.; Domínguez, H.; Domínguez, J.M.** 1997b. Study of the adsorption steps to improve the production of xylitol from wood hydrolysates. *Afinidad*. **54**:51-54.
- Parajó, J.C.; Domínguez, H.; Domínguez, J.M.** 1997c. Xylitol production from *Eucalyptus* wood hydrolysates extracted with organic solvents. *Process Biochemistry*. **32**:599-604.
- Parajó, J.C.; Domínguez, H.; Domínguez, J.M.** 1998a. Biotechnological production of xylitol. Part 1: Interest of xylitol and fundamentals of its biosynthesis. *Bioresource Technology*. **65**:191-201.
- Parajó, J.C.; Domínguez, H.; Domínguez, J.M.** 1998b. Biotechnological production of xylitol. Part 2: Operation in culture media made with commercial sugars. *Bioresource Technology*. **65**:203-212.
- Parajó, J.C.; Domínguez, H.; Domínguez, J.M.** 1998c. Biotechnological production of xylitol. Part 3: Operation in culture media made from lignocellulose hydrolysates. *Bioresource Technology*. **66**:25-40.
- Pepper, T.; Olinger, P.M.** 1988. Xylitol in sugar-free confections. *Food Technology*. **42**:98.
- Preziosi-Belloy, L.; Nollet, V.; Navarro, J.M.** 2000. Xylitol production from aspenwood hemicellulose hydrolysate by *Candida guilliermondii*. *Biotechnology Letters*. **22**:239-243.
- Prior, B.A.; Kilian, S.G.; Dupreez, J.C.** 1989. Fermentation of D-Xylose by the Yeasts *Candida shehatae* and *Pichia stipitis* - Prospects and Problems. *Process Biochemistry*. **24**:21-32.

- Roberto, I.C.; Lacis, L.S.; Barbosa, M.F.S.; deMancilha, I.M.** 1991. Utilization of Sugar-Cane Bagasse Hemicellulosic Hydrolysate by *Pichia-stipitis* for the Production of Ethanol. *Process Biochemistry*. **26**:15-21.
- Roberto, I.C.; Sato, S.; deMancilha, I.M.** 1996. Effect of inoculum level on xylitol production from rice straw hemicellulose hydrolysate by *Candida guilliermondii*. *Journal of Industrial Microbiology*. **16**:348-350.
- Rodriguez-Rodriguez, R.; Herrera, M.D.; de Sotomayor, M.A.; Ruiz-Gutierrez, V.** 2007. Pomace olive oil improves endothelial function in spontaneously hypertensive rats by increasing endothelial nitric oxide synthase expression. *American Journal of Hypertension*. **20**:728-734.
- Roig, A.; Cayuela, M.L.; Sanchez-Monedero, M.A.** 2006. An overview on olive mill wastes and their valorisation methods. *Waste Management*. **26**:960-969.
- Saha, B.C.** 2003. Hemicellulose bioconversion. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. **30**:279-291.
- Salanti, A.; Zoia, L.; Orlandi, M.; Zanini, F.; Elegir, G.** 2010. Structural characterization and antioxidant activity evaluation of lignins from rice husk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **58**:10049-10055.
- Salgado, J.M.; Ferreira, C.; Guerra, V.; Torrado, I.; Silva-Fernandes, T.; Branco, P.C.; Lourenço, P.M.L.; Carvalheiro, F.; Domínguez, J.M.; Duarte, L.C.** 2012. Simple one stage detoxification procedure using alkali activated charcoal. Proceedings of the "1st Iberoamerican Congress on Biorefineries". Los Cabos, Baja California, México.
- Salmén, L.; de Ruvo, A.** 1985. A model for the prediction of fiber elasticity. *Wood and Fiber Science*. **17**:336-350.
- Sampaio, F.C.; Chaves-Alves, V.M.; Converti, A.; Passos, F.M.L.; Coelho, J.L.C.** 2008. Influence of cultivation conditions on xylose-to-xylitol bioconversion by a new isolate of *Debaryomyces hansenii*. *Bioresource Technology*. **99**:502-508.
- Sannigrahi, P.; Ragauskas, A.J.; Tuskan, G.A.** 2010. Poplar as a feedstock for biofuels: A review of compositional characteristics. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*. **4**:209-226.
- Santos, J.L.; Fernandes, M.C.; Lourenço, P.M.L.; Duarte, L.C.; Carvalheiro, F.; Crespo, J.G.** 2011. Removal of inhibitory compounds from olive stone auto-hydrolysis liquors by nanofiltration. *Desalination and Water Treatment*. **27**:90-96.
- Sedlmeyer, F.B.** 2011. Xylan as by-product of biorefineries: Characteristics and potential use for food applications. *Food Hydrocolloids*. **25**:1891-1898.
- SIADÉB.** 2011. www.siadeb.org.
- Silva-Fernandes, T.; Duarte, L.C.; Almeida, S.; Carvalheiro, F.; Gírio, F.M.** 2008. Identification of the most relevant factors affecting xylitol production by *Debaryomyces hansenii* from wheat straw hydrolysates. Proceedings of the "Bioenergy: Challenges and Opportunities - International Conference and Exhibition on Bioenergy". **II**:179-184. Guimarães, Portugal, Universidade do Minho.

- Sluiter, J.B.; Ruiz, R.O.; Scarlata, C.J.; Sluiter, A.D.; Templeton, D.W.** 2010. Compositional Analysis of Lignocellulosic Feedstocks. 1. Review and Description of Methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **58**:9043-9053.
- Sonderegger, M.; Jeppsson, M.; Larsson, C.; Gorwa-Grauslund, M.F.; Boles, E.; Olsson, L.; Spencer-Martins, I.; Hahn-Hägerdal, B.+; Sauer, U.** 2004. Fermentation performance of engineered and evolved xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Biotechnology and Bioengineering*. **87**:90-98.
- Sun, Y.; Cheng, J.** 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*. **83**:1-11.
- Taherzadeh, M.J.; Karimi, K.** 2007. Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: A Review. *Bioresources*. **2**:472-499.
- Tavares, J.M.; Duarte, L.C.; Amaral-Collação, M.T.; Gírio, F.M.** 1999. Phosphate limitation stress induces xylitol overproduction by *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Microbiology Letters*. **171**:115-120.
- Tavares, J.M.; Duarte, L.C.; Amaral-Collação, M.T.; Gírio, F.M.** 2000. The influence of hexoses addition on the fermentation of D-xylose in *Debaryomyces hansenii* under continuous cultivation. *Enzyme and Microbial Technology*. **26**:743-747.
- Thomas, R.J.** 1976. Wood - Structure and Chemical Composition. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*. **172**:26.
- Torrado, I.** 2010. Optimização da hidrólise com ácido diluído para fraccionamento selectivo das hemiceluloses de palha de sorgo: estudo da bioconversão dos hidrolisados para a produção de xilitol. Tese de Mestrado. Universidade do Algarve.
- Torrado, I.; Carvalheiro, F.; Duarte, L.C.; Raposo, S.; Gírio, F.M.** 2012. Optimization of dilute acid hydrolysis for the selective recovery of hemicellulosic sugars from sorghum straw. Proceedings of the "1st Iberoamerican Congress on Biorefineries". Los Cabos, Baja California, México, SIADEB.
- Tyree, L.** 1996. The olive pit and Roman oil making. *American Journal of Archaeology*. **100**:385.
- van Zyl, C.; Prior, B.A.; du Preez, J.C.** 1988. Production of ethanol from sugar cane bagasse hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. **17**:357-370.
- Vazquez, M.; Oliva, M.; Téllez-Luis, S.J.; Ramírez, J.A.** 2007. Hydrolysis of sorghum straw using phosphoric acid: Evaluation of furfural production. *Bioresource Technology*. **98**:3053-3060.
- Vlyssides, A.G.; Loizides, M.; Karlis, P.K.** 2004. Integrated strategic approach for reusing olive oil extraction by-products. *Journal of Cleaner Production*. **12**:603-611.
- 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.
- Wilson, J.J.; Deschatelets, L.; Nishikawa, N.K.** 1989. Comparative Fermentability of Enzymatic and Acid Hydrolysates of Steam-Pretreated Aspenwood Hemicellulose by *Pichia-stipitis* CBS-5776. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **31**:592-596.

Winkelhausen, E.; Kuzmanova, S. 1998. Microbial conversion of d-xylose to xylitol. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. **86**:1-14.

Anexos

I. Procedimento da destoxificação

Para o sistema de nanofiltração, foi utilizada a membrana NF270 (Dow, USA) que apresenta um “molecular weight cut-off” de 400Da, correspondendo o “molecular weight cut-off” da membrana ao peso molecular acima do qual 90% das moléculas com peso molecular superior ao cut-off da membrana, são rejeitadas pela mesma. As principais características da membrana utilizada encontram-se na Tabela I.1.

Tabela I.1 - Características da membrana NF270

Características da membrana	
Fornecedor	Dow/Filmtec
Material da superfície	Poliamida
Temperatura de operação máxima (°C)	45
Pressão de operação máxima (bar)	41
“Cut-off” (Da)	400
Diâmetro do poro (Da)	0,68
Ponto Isoelétrico	2

Procedimento experimental

Na Figura I.1 encontra-se representado o esquema da montagem experimental utilizada neste trabalho. O sistema é constituído por um módulo GE-Sepa CF (GE Osmonics, USA) e uma bomba centrífuga de alta pressão (Hydra-cell model G13, Wanner Engineering Inc., USA). A área da superfície da membrana é de 140 cm².

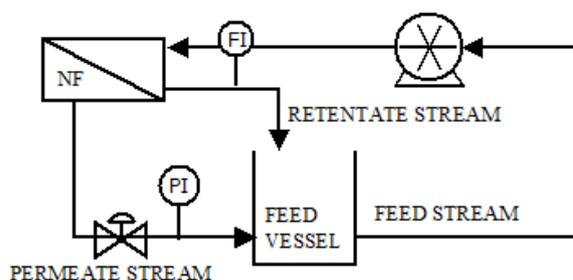


Figura I.1 - Procedimento experimental de nanofiltração (NF270). PI e o FI são os indicadores de pressão e de fluxo, respetivamente.

Modos de operação

Modo de diafiltração: Tendo como base ensaios previamente efetuados pela equipa do Grupo de Engenharia de Processos do CEBAL, o modo de diafiltração foi efetuado a uma pressão transmembranar de 20 bar e a um pH de 3,0. O modo de operação foi o modo contínuo, mantendo-se o volume de alimentação constante, sendo este mantido com o

auxílio de um “buffer” contendo água destilada. Periodicamente foram retiradas amostras de permeado e analisadas por HPLC - RI. O tempo de diafiltração foi de 17,6 h.

O balanço mássico ao sistema permite obter:

$$C_{sf} = C_{sf_0} \exp \frac{J_v A}{V_f (1-R)} t \quad \text{(Equação I.1)}$$

Onde,

- V_f é o volume de alimentação (m^3),
- C_{sf} é a concentração do soluto na alimentação ($mol \cdot m^{-3}$),
- J_v é o fluxo volumétrico do permeado ($m^3 \cdot m^{-2} \cdot h^{-1}$),
- A a área da membrana (m^2) e t o tempo de diafiltração.

II. Meios de cultura

Meio quimicamente definido

Adicionou-se aos suplementos água ultra pura com recurso a agitação magnética, até se verificar uma mistura homogénea. Acertou-se o valor de pH para 5,5 com recurso a soluções de NaOH e HCl e acertou-se o volume num balão volumétrico. O meio foi esterilizado pelo sistema de filtração.

Tabela II.1 - Constituintes e quantidades aplicadas na preparação de 1000 mL de MQD

Constituintes	Quantidade/volume
Xilose	20 g
Solução de vitaminas 100x	10 mL
Solução de Sais	25 mL
Solução de NP	50 mL
Solução de Mg	25 mL

III. Soluções e Reagentes utilizados

III.1. Solução de nutrientes

De forma a respeitar a solubilidade de diferentes compostos e o seu comportamento a elevadas temperaturas, como é o caso da temperatura de esterilização, as soluções dos vários nutrientes foram preparadas separadamente e esterilizadas e só depois adicionadas ao meio de fermentação, nas devidas proporções.

III.2. Solução de sais

Foi preparada uma solução 40 vezes concentrada, a partir da qual foram distribuídas as quantidades adequadas para os volumes de meio utilizados. Esta fonte de micronutrientes possui a seguinte composição:

Tabela III.1 - Composição da solução de sais 40 vezes concentrada

Nutriente	Fórmula	Concentração (g·L ⁻¹)	Fornecedor	Concentração final (g·L ⁻¹)
EDTA	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈	7,500	Sigma	0,1875
Sulfato de ferro heptahidratado	FeSO ₄ ·7H ₂ O	1,400	Merck	0,0110
Sulfato de zinco heptahidratado	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,440	Merck	0,0070
Sulfato de cobre pentahidratado	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,040	Merck	0,0010
Cloreto de cobalto hexahidratado	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,080	BDH	0,0013
Molibdato de sódio dihidratado	NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0,052	Merck	0,0350
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	0,080	Merck	0,0020
Iodeto de sódio	NaI	0,013	Riedel-de-Häen	0,0003

Preparação da solução

Dissolver o EDTA e adicionar o zinco em pelo menos 800 mL de água. Acertar o pH a 5,5. Adicionar os restantes compostos pela ordem indicada mantendo o pH a 5,5. Pode ser necessário corrigir o pH mesmo antes da dissolução completa do reagente que está a adicionar. A maior descida de pH ocorre com o Fe. Colocar o volume a cerca de 1200 mL. Separar em alíquotas de 250 mL em balões de 500 mL. Ao longo da preparação a solução vai alterando a cor, inicialmente é incolor, cor-de-rosa ténue e após a adição de cobalto, azulada após adição do cobre, amarelada, após adição do Fe.

A solução foi esterilizada em autoclave (121 °C, 15 min, 1 bar) e armazenada a 4 °C,

III.3. Solução de NP

A fonte de azoto, potássio e fósforo foi preparada numa solução 20 vezes concentrada e o pH acertado a 5,5 com NaOH sólido. Esta solução foi autoclavada separadamente da solução de sais minerais de modo a evitar reações a altas temperaturas que poderiam diminuir a quantidade dos diferentes elementos disponíveis para o crescimento da levedura, nomeadamente por reações com o ião fosfato. Esta solução apresenta a seguinte composição:

Tabela III.2 - Composição da solução de NP 20 vezes concentrada

Nutriente	Fórmula	Concentração (g·L ⁻¹)	Fornecedor	Concentração final (g·L ⁻¹)
Sulfato de amónio	(NH ₄) ₂ SO ₄	235,95	Pronalab	9,438
Dihidrogenofosfato de potássio	KH ₂ PO ₄	66,50	JT Baker	2,660

III.4. Solução de Mg

A fonte de magnésio foi preparada numa solução 40 vezes concentrada e o pH acertado a 5,5 com NaOH 5M. Esta solução foi esterilizada em autoclave a 120 °C durante 15 minutos.

Tabela III.3 - Composição da solução de Mg 40 vezes concentrada

Nutriente	Fórmula	Concentração (g·L ⁻¹)	Fornecedor	Concentração final (g·L ⁻¹)
Sulfato de magnésio heptahidratado	MgSO ₄ ·7H ₂ O	12,50	Merck	0,5000

III.5. Solução de vitaminas e cálcio

A fonte de vitaminas e cálcio foi obtida através da preparação de uma solução 100 vezes concentrada, apresentando a seguinte composição:

Tabela III.4 - Composição da solução de vitaminas e cálcio 100 vezes concentradas

Nutriente	Fórmula	Concentração (g·L ⁻¹)	Fornecedor	Concentração final (g·L ⁻¹)
Mio-inositol	C ₆ H ₁₂ O ₆	10,00	Merck	0,1000
Pantotenato de hemi-cálcio	C ₉ H ₁₆ NO ₅ , 1/2Ca	2,00	Sigma	0,0200
Cloridrato de tiamina hidratado	C ₁₂ H ₁₈ C ₁₂ N ₄ OS, XH ₂ O	5,00	Merck	0,0050
Cloridrato de piridoxal	C ₈ H ₁₂ Cl(NO ₃) ₃	0,50	Merck	0,0050
Ácido nicotínico	C ₆ H ₅ NO ₂	0,50	Merck	0,0050
Ácido p-amniobenzóico	C ₇ H ₇ NO ₂	0,10	Merck	0,0010
d-Biotina (vit. H)	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₃ S	0,01	Merck	0,0001
Cloreto de cálcio dihidratado	CaCl ₂ ·2H ₂ O	5,00	Merck	0,0500

Preparação da solução

Dissolver todos os componentes um a um, mantendo a ordem, e reajustando o pH após cada adição a 6,5. Após a adição de todos os componentes, manter o pH a 6,5 e ajustar o volume a 1000 mL em um balão volumétrico. Esterilizar por filtração. Esta solução não pode ser autoclavada nem mantida à luz, uma vez que algumas vitaminas são termolábeis e fotossensíveis. Conservar a 4 °C, preferencialmente no máximo de 3 meses.

III.6. Solução de extrato de levedura

Foi preparada uma solução concentrada de extrato de levedura (2.6.4) a partir da qual foram distribuídos os volumes adequados para as concentrações pretendidas nos ensaios. A solução foi esterilizada em autoclave (121 °C, 15 min, 1 bar) e armazenadas a 4 °C até utilização.

III.7. Água de maceração de milho (CSL – Corn Steep Liquor)

Foi preparada uma solução concentrada de CSL (2.6.4). Atendendo que a autoclavagem desta solução conduz a precipitações, esta foi esterilizada por filtração, através de um filtro estéril 0,22 μm de diâmetro de poro (Millipore, USA).

Tabela III.5 - Composição da solução de *Corn Steep Liquor*

Composição	Valor médio (%)
Azoto	3,6
Proteína	22,5
Cinza	8,5
Amido total	4,0
Gordura	0,15
Fibra	0,15
Cálcio	0,5
Fósforo	1,8

III.8. Solução de extrato de dreche cervejeira

A solução de extrato de dreche cervejeira foi preparada em frascos *Schott* (Alemanha) de 50 mL com tampa *Schott* GL 45, em autoclave (20 min, 121 °C) (2.6.4). Para tal foi adicionada ao extrato de dreche água destilada de modo a obter uma razão líquido/sólido de 8 (p-p⁻¹). A fração líquida foi transferida para tubos *Falcon* estéreis e armazenados a 4 °C.

IV. Formulário

IV.1. Caracterização química da matéria-prima e resíduos sólidos

As concentrações de glucose, xilose, arabinose e ácido acético nos licores resultantes da hidrólise ácida quantitativa da matéria-prima e resíduo sólido foram utilizados para o cálculo das percentagens de glucano, xilano, arabinano e grupos acetilo, respetivamente (Eq. IV.1 – Eq. IV.4). O resíduo insolúvel em ácido, após correção da cinza, permitiu o cálculo da lenhina Klason (Eq. IV.5).

Na hidrólise ácida quantitativa uma pequena percentagem de açúcares é degradada, por isso são introduzidos fatores de correção (SIADDEB, 2011) para corrigir as perdas. De acordo com Browning essas perdas são de 2,6% para a glucose, 8,8% para a xilose e 4,7% para a arabinose. Com base nestas percentagens é possível calcular os fatores de correção (F), que permitem corrigir as várias determinações.

$$Gn = F \times \frac{100}{1005} \times \frac{162}{180} \times \frac{Glc \times P_{sol}}{A} \quad \text{(Equação IV.1)}$$

$$Xn = F \times \frac{100}{1005} \times \frac{132}{150} \times \frac{Xyl \times P_{sol}}{A} \quad \text{(Equação IV.2)}$$

$$Arn = F \times \frac{100}{1005} \times \frac{132}{150} \times \frac{Ara \times P_{sol}}{A} \quad \text{(Equação IV.3)}$$

$$GAc = \frac{100}{1005} \times \frac{60}{61} \times \frac{Ac \times P_{sol}}{A} \quad \text{(Equação IV.4)}$$

$$LK = \frac{RIA - C}{A} \times 100 \quad \text{(Equação IV.5)}$$

- Gn, Xn, Arn, GAc, LK são as percentagens de glucano, xilano, arabinano, grupos acetilo e lenhina Klason, respetivamente (g por 100 g sólido),
- F é o fator de correção, por exemplo, para o glucano, $F=1/(1-0,026)=1,027$,
- P_{sol} e A são as massas de solução e da amostra seca utilizada no ensaio, respetivamente (g),
- RIA e C são as massas do resíduo insolúvel em ácido e da cinza da amostra, respetivamente (g),
- Glc, Xyl, Ara e Ac são as concentrações de glucose, xilose, arabinose e ácido acético nos licores ($g \cdot L^{-1}$).

IV.2. Cálculo de rendimentos

O rendimento de cada um dos polímeros¹, expresso como a percentagem que permanece no resíduo sólido relativamente à respetiva percentagem na matéria-prima, após hidrólise ácida foi calculada de acordo com as Eq. IV.6 – IV.10.

$$Gn_R = \frac{Gn \times Y_S}{Gn_{MP}} \quad \text{(Equação IV.6)}$$

$$Xn_R = \frac{Xn \times Y_S}{Xn_{MP}} \quad \text{(Equação IV.7)}$$

¹ O termo polímero está a ser utilizado para designar os polissacáridos, lenhina e grupos acetilo, embora estes últimos não sejam na realidade polímeros, uma vez que do ponto de vista estrutural fazem parte da hemicelulose. A designação de “polímero” para o conjunto de componentes referidos foi adotada por uma questão de simplicidade.

$$Arn_R = \frac{Arn \times Y_S}{Arn_{MP}} \quad \text{(Equação IV.8)}$$

$$GAc_R = \frac{GAc \times Y_S}{GAc_{MP}} \quad \text{(Equação IV.9)}$$

$$LK_R = \frac{LK_n \times Y_S}{LK_{MP}} \quad \text{(Equação IV.10)}$$

- Gn_R , Xn_R , Arn_R , GAc_R , LK_R são as percentagens de cada um dos “polímeros” que permanecem no resíduo após o tratamento (g por 100 g de polímero na matéria-prima),

- Gn_{MP} , Xn_{MP} , Arn_{MP} , GAc_{MP} , LK_{MP} são as percentagens de glucano, xilano, arabinano, grupos acetilo e lenhina *Klason* na matéria-prima, respetivamente (g por 100 g matéria-prima),

- Y_S – rendimento em sólidos (g de sólido recuperado por 100 g matéria-prima).

A percentagem de cada um dos polímeros solubilizada a monómeros e de monómeros convertida em produtos de degradação, foi calculada de acordo com as Eq.IV.11 – Eq.IV.16. onde (162/180), (132/150), (60/61), (132/96) e (162/126,1) são fatores estequiométricos para a conversão da glucose, xilose e arabinose, ácido acético, furfural e HMF para glucano, xilano e arabinano, grupos acetilo, xilano e glucano, respetivamente.

$$Glc_R = \frac{162}{180} \times \frac{Glc \times P_H}{Gn_{MP} \times A \times 0,01\rho_H} \times 100 \quad \text{(Equação IV.11)}$$

$$Xyl_R = \frac{132}{150} \times \frac{Xyl \times P_H}{Xn_{MP} \times A \times 0,01\rho_H} \times 100 \quad \text{(Equação IV.12)}$$

$$Ara_R = \frac{132}{150} \times \frac{Ara \times P_H}{Arn_{MP} \times A \times 0,01\rho_H} \times 100 \quad \text{(Equação IV.13)}$$

$$Ac_R = \frac{60}{61} \times \frac{Ac \times P_H}{GAc_{MP} \times A \times 0,01\rho_H} \times 100 \quad \text{(Equação IV.14)}$$

$$Furf_R = \frac{132}{96} \times \frac{Furf \times P_H}{Xn_{MP} \times A \times 0,01\rho_H} \times 100 \quad \text{(Equação IV.15)}$$

$$HMF_R = \frac{162}{126,1} \times \frac{HMF \times P_H}{Gn_{MP} \times A \times 0,01\rho_H} \times 100 \quad \text{(Equação IV.16)}$$

- Glc_R , Xyl_R , Ara_R , Ac_R , $Furf_R$, HMF_R , são as percentagens de glucose, xilose, arabinose, ácido acético, furfural e HMF recuperados no hidrolisado (g por 100 g de polímero),

- Furf e HMF são as concentrações de furfural e HMF nos licores ($g \cdot L^{-1}$),

- P_H é a massa de hidrolisado obtido no ensaio (g),
- A é a massa de amostra utilizada no ensaio (g),
- ρ_H é a massa volúmica do hidrolisado ($\text{g}\cdot\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).

A percentagem de cada um dos “polímeros” relativamente ao total de amostra inicial foi calculada de acordo com as Eq.IV.17 – IV.21.

$$Gn_T = \frac{Gn_R \times Gn_{MP}}{100} \quad \text{(Equação IV.17)}$$

$$Xn_T = \frac{Xn_R \times Xn_{MP}}{100} \quad \text{(Equação IV.18)}$$

$$Arn_T = \frac{Arn_R \times Arn_{MP}}{100} \quad \text{(Equação IV.19)}$$

$$GAc_T = \frac{GAc_R \times GAc_{MP}}{100} \quad \text{(Equação IV.20)}$$

$$LK_T = \frac{LK_R \times LK_{MP}}{100} \quad \text{(Equação IV.21)}$$

- Gn_T , Xn_T , Arn_T , GAc_T , LK_T são as percentagens de cada um dos “polímeros” (g por 100 g de matéria-prima).

As percentagens de glucose, xilose, arabinose, ácido acético, fórmico e levulínico, furfural, HMF e compostos fenólicos relativamente ao total de amostra inicial foram calculadas de acordo com as Eq. IV.22 – IV.30.

$$Glc_T = \frac{Glc_R \times Glc_{MP}}{100} \quad \text{(Equação IV.22)}$$

$$Xyl_T = \frac{Xyl_R \times Xyl_{MP}}{100} \quad \text{(Equação IV.23)}$$

$$Ara_T = \frac{Ara_R \times Ara_{MP}}{100} \quad \text{(Equação IV.24)}$$

$$Ac_T = \frac{Ac_R \times Ac_{MP}}{100} \quad \text{(Equação IV.25)}$$

$$Furf_T = \frac{Furf_R \times Furf_{MP}}{100} \quad \text{(Equação IV.26)}$$

$$HMF_T = \frac{HMF_R \times HMF_{MP}}{100} \quad \text{(Equação IV.27)}$$

$$CFn_T = \frac{CFn_R \times P_H}{\rho_H \times A} \times 100 \quad \text{(Equação IV.28)}$$

- Glc_T, Xyl_T, Ara_T, Ac_T, Furf_T, HMF_T e CFn_T são as percentagens de glucose, xilose, arabinose, ácido acético, furfural, HMF e compostos fenólicos (g por 100 g de matéria-prima),

- CFn é a concentração de compostos fenólicos presentes no hidrolisado (g·L⁻¹).

IV.3. Parâmetros cinéticos e estequiométricos

- Taxa específica de crescimento (h⁻¹)

$$\mu = \frac{\ln\left(\frac{Abs}{Abs_0}\right) - b}{t} \quad \text{(Equação IV.29)}$$

Calculado a partir da regressão linear com os dados da fase exponencial da curva de crescimento, onde Abs_i e Abs são a absorvância inicial e num determinado tempo (t), respetivamente; b é a ordenada na origem.

- Produtividade celular (g·L⁻¹·h⁻¹)

$$Q_x = \frac{X_f - X_i}{t_f - t_i} \quad \text{(Equação IV.30)}$$

X_i e X_f são as concentrações iniciais e finais de biomassa, respetivamente (g·L⁻¹).

- Taxa volumétrica de consumo de substrato (g·L⁻¹·h⁻¹)

$$Q_s = \frac{S_f - S_i}{t_f - t_i} \quad \text{(Equação IV.31)}$$

S_i e S_f são as concentrações iniciais e finais de substrato, respetivamente (g·L⁻¹), Substrato: xilose e/ou glucose e/ou arabinose.

- % Substrato consumido

$$\% \text{ substrato consumido} = \frac{S_i - S_f}{S_i} \times 100 \quad \text{(Equação IV.32)}$$

- Taxa volumétrica de formação de xilitol ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)

$$Q_{XOH} = \frac{Xilitol_f - Xilitol_i}{t_f - t_i} \quad \text{(Equação IV.33)}$$

Xilitol_i e xilitol_f são as concentrações iniciais e finais de xilitol, respetivamente ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).

- Rendimento celular ($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)

$$Y_{X/S} = \frac{X_f - X_i}{S_i - S_f} \quad \text{(Equação IV.34)}$$

- Rendimento em xilitol ($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)

$$Y_{XOH/S} = \frac{XOH_f - XOH_i}{S_i - S_f} \quad \text{(Equação IV.35)}$$

S_i e S_f , XOH_i e XOH_f representam as concentrações iniciais e finais ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) de xilose e de xilitol, respetivamente.

- Razão XOH/Produtos

$$XOH / \text{Produtos} = \frac{Xilitol}{Arabitol + Glicerol + Etanol + Xilitol} \quad \text{(Equação IV.36)}$$

Arabitol, glicerol e etanol são concentrações destes produtos quando a concentração de xilitol é máxima.

IV.4. Determinação do diâmetro médio das partículas

$$Dp = \frac{\sum xidi^4}{\sum xidi^3} \quad \text{(Equação IV.37)}$$

Onde,

x_i - Fração de partículas retidas em cada peneiro,

d_i – Diâmetro médio das partículas retidas em cada peneiro.

V. Determinação da proteína total

A proteína total foi determinada de acordo com o método de *Kjedahl* (1975). As amostras a analisar foram pesadas diretamente nos tubos de digestão. Foi tomada uma massa de 0,5 g de amostra à qual se adicionou 10 g de mistura catalisadora e 20 mL de H₂SO₄ concentrado (96% p-p⁻¹), e colocaram-se os tubos com as amostras preparadas na unidade de aquecimento do aparelho de digestão (Digestion System 6 Modelo 1007, Tecator, Suécia). Seguidamente colocaram-se as cápsulas do sistema de extração de fumos e abriu-se a fonte de vácuo. Nos primeiros 30 min do processo, a temperatura foi moderada e após este período foi elevada até 420 °C, durante 1,5 h. Uma vez terminada a digestão, e após arrefecimento do conteúdo dos tubos, adicionou-se 100 mL de água destilada e 50 mL de ácido bórico 4% (p/v). Em seguida colocaram-se os tubos na unidade de destilação (Kjeltec System modelo 1026, Tecator, Suécia). Durante esta operação de destilação foi libertado amoníaco, por adição da solução de NaOH, que é arrastado por uma corrente de vapor de água sendo depois recolhido na solução de ácido bórico. Em seguida, o amoníaco foi doseado por titulação com HCl 0,1 N, em presença da solução indicadora de pH (indicador de Tashiro) que se torna violeta a pH 4,8. Para o ensaio em branco procedeu-se da mesma forma, substituindo a massa da amostra por água destilada.

Tabela V.1 - Reagentes utilizados na determinação da proteína total

Reagentes	
Mistura catalisadora	Sulfato de cobre 3 g
	Óxido de titânio 3 g
	Ácido esteárico 1 g
	Sulfato de potássio 93 g
Solução de ácido bórico	4% (p/v)
Solução de ácido clorídrico	0,1 N
Solução de hidróxido de sódio	50% (p/v)
Indicador	Indicador de Tashiro ^a

^a Dissolveram-se 2 g de vermelho de metilo e 1 g de azul de metileno em 100 mL de álcool etílico 95% (v/v). A solução foi conservada em frasco escuro.

Expressão dos resultados

A percentagem de azoto total é determinada utilizando a seguinte expressão:

$$\text{Azoto total (\%)} = 0,14 \cdot \frac{(V - V_0)}{A} \quad \text{(Equação V.1)}$$

Onde,

V- volume da solução de HCl 0,1 N gasto na titulação (mL),

V₀- volume da solução de HCl 0,1 N gasto na titulação do ensaio em branco (mL),

A - massa de amostra (g) (em massa seca).

VI. Doseamento de extrativos

Começou-se por colocar 2 balões de vidro numa estufa a 103 °C por um período mínimo de 12h. Após esse período, deixou-se os balões voltarem à temperatura ambiente num exsiccador. Registou-se a sua massa e adicionou-se algumas esferas de vidro no seu interior. Seguidamente, colocaram-se os balões em mantas de aquecimento.

Pesou-se para uma cartucha de celulose 2,5 g de BAE, tapou-se com um pouco de algodão e colocou-se esta no interior do Soxhlet.

Começou-se por proceder à extração com água mili-Q, adicionando 190 mL de água ultrapura em cada um dos balões já tarados. Encaixou-se um soxhlet em cada balão, ligou-se o sistema de arrefecimento (água) e as mantas, de modo a fornecer um mínimo de ciclos de 5-4 por hora. Esta extração decorreu durante 17 horas. O tempo de refluxo necessário depende da taxa de remoção de componentes de interesse, da temperatura do condensador, e da taxa de ciclos. Qualquer material restante solúvel em água que não tenha sido extraído, será captado durante a extração de etanol.

Concluído o refluxo, desligou-se as mantas, deixou-se arrefecer os balões até à temperatura ambiente. Seguidamente, removeu-se a maior quantidade possível de água residual contida no Soxhlet e colocaram-se os balões na estufa, procedendo-se da mesma forma ao inicialmente descrito.

Antes de proceder à extração por etanol, tal como se procedeu no início, tararam-se mais 2 balões. A cada um deles adicionou-se 190 mL de álcool etílico. Encaixaram-se estes nos Soxhlet e ajustaram-se as mantas de aquecimento para fornecer um mínimo de 6-10 ciclos por hora. Conclui-se a extração ao fim de 17h. Deixou-se arrefecer tudo à temperatura ambiente e pesou-se os balões e a cartucha.

$$\text{Extrativos \%} = \frac{m - m_0}{A} \times 100 \quad \text{(Equação VI.1)}$$

- *m* refere-se à massa do balão mais extrativos, após cada uma das extrações (g);

- *m*₀ refere-se à massa do balão (vazio) determinada inicialmente (g);

- A representa a massa da amostra (g) pesada para dentro da cartucha.

VII. Determinação da concentração de compostos fenólicos

Protocolo experimental para o doseamento dos compostos fenólicos, de acordo com o método *Folin-Ciocalteu*.

Preparação das Soluções

- Solução stock de ácido gálico 0,6 g·L⁻¹

Pesaram-se 0,0300 g de ácido gálico e dilui-se em água ultra pura, perfazendo o volume a 50 mL, em balão volumétrico. A solução é estável por alguns dias a 4 °C.

- Solução stock de carbonato de sódio 7,5% (p·v⁻¹)

Pesaram-se 18,75 g de carbonato de sódio e dissolver em água ultra pura, Perfez-se a 250 mL num balão volumétrico. Esta solução é difícil de dissolver. É estável durante algumas semanas.

- Solução de *Folin-Cicalteu* 1/10 (v·v⁻¹)

Diluiu-se 25 mL de reagente de *Folin-Ciocalteu* comercial em água ultra pura. Perfez-se o volume a 250 mL num balão volumétrico. Preparar diariamente.

Procedimento

Num tubo de ensaio com tampa, adicionou-se 4 mL de solução de *Folin-Ciocalteu* 1/10 e 4 mL de carbonato de cálcio 7,5% (p·v⁻¹) a 100 µL de amostra, agitando no *vórtex* a cada adição. Incubou-se em banho-maria, a 45 °C durante 15 min. Agitou-se novamente e leu-se a absorvância a 765 nm.

A curva de calibração foi construída da mesma forma, utilizando soluções de ácido gálico a diferentes concentrações (0; 0,06; 0,15; 0,30; 0,45; 0,54 e 0,60 mg·mL⁻¹)

Cálculos

Os resultados são expressos em equivalente de ácido gálico (GAE) mg·mL⁻¹ de solução da amostra por comparação com a curva de calibração de ácido gálico.

