



Optimização de pré-tratamento para a hidrólise selectiva da hemicelulose de bagaço de azeitona: estudo da bioconversão dos hidrolisados para a produção de xilitol

Vera Lúcia Costa Guerra

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Alimentar

Orientador: Doutora Florbela de Oliveira Carvalheiro Esteves Amaro

Co-orientadores: Investigador Luís Jorge Abreu Chorão de Quelhas Duarte
Doutora Maria Luísa Louro Martins

Júri:

Presidente: Doutora Margarida Gomes Moldão Martins, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

Vogais: 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, Director de investigação da Ucasul – União de Cooperativas Agrícolas do Sul, Ucrl

Lisboa, 2011

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

Agradecimentos

Gostaria de expressar a minha gratidão, a todos aqueles que de algum modo tornaram possível a realização deste trabalho.

Começo por agradecer à Professora Luísa Louro, que prontamente se disponibilizou para a orientação deste trabalho e pela confiança e optimismo que me transmitiu desde do início.

Ao Doutor Francisco Gírio, Director da Unidade de Bioenergia, na qual realizei o estágio, pela possibilidade concedida.

À Doutora Florbela Carvalheiro, por toda a simpatia, compreensão, ajuda e incansável dedicação. Um especial obrigada!

Ao Investigador Luís Duarte, por toda a transmissão de conhecimentos, disponibilidade e inesgotável paciência. Um especial obrigada!

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

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

A todos os colegas do laboratório, Patrícia, Pedro Branco, Pedro Bernardo, Talita, Cátia, Chema pela simpatia, apoio e pelo bom ambiente de trabalho que proporcionaram ao longo deste meses. Um obrigada especial à Cátia por toda a amizade, ajuda, companheirismo e boa disposição nos momentos menos fáceis passados em laboratório.

À Ivone, que para além de colega foi uma amiga, sempre pronta a transmitir boa disposição e conhecimentos que muito me ajudaram, principalmente, nos primeiros tempos deste estágio.

Aos meus pais, os grandes responsáveis por tudo, e à minha avó Dilma. Obrigada pelos sacrifícios, dedicação, paciência e amor.

À minha tia Tinita, tio José e primos que foram a minha família nesta fase da minha vida académica. Obrigada pela ajuda e pelo apoio, sem vocês tudo tinha sido mais difícil!

Ao “meu” Miguel, o meu grande amparo. Obrigada por todo o amor, amizade, paciência e ajuda concedida nos momentos mais difíceis.

Lista de publicações

Parte dos resultados desta tese estão já publicados como:

Salgado, J.M., Guerra, V., Lourenço, P., Ferreira, C., Fernandes, T., Branco, P.C., Torrado, I., Carvalheiro, F., Domínguez, J.M., Duarte, L.C. 2011. Simple one stage detoxification procedure of hemicellulosic acid hydrolysates using activated charcoal. 12th Mediterranean Congress of Chemical Engineering. 15-18 de Novembro. Barcelona. (comunicação em painel).

Duarte, L.C., Salgado, J.M., Torrado, I., Guerra, V., Ferreira, C., Fernandes, T., Branco, P.C., Carvalheiro, F., Lourenço, P., 2011. PT105977.

Resumo

O bagaço de azeitona extractado (BAE) é o resíduo proveniente da indústria da extracção de óleo de bagaço de azeitona, actualmente utilizado apenas como fonte energética de baixo valor acrescentado e que pode ser valorizado. Com vista à sua valorização no âmbito do conceito de biorrefinaria, neste trabalho é estudada uma estratégia de valorização da hemicelulose com vista à produção de xilitol, composto com aplicações potenciais na indústria alimentar, farmacêutica e cosmética.

O BAE foi submetido a uma hidrólise com ácido diluído, tendo-se estudado a influência da razão líquido/sólido, e utilizando um planeamento experimental de Doehlert, o tempo de operação e concentração de catalisador (H_2SO_4) a 130 °C. Os resultados foram interpretados através do factor de severidade combinado (CS), tendo as condições óptimas sido encontradas para o CS de 2,64, (3,5% H_2SO_4 e 130 min). Tendo por objectivo a remoção do hidrolisado de potenciais compostos inibidores, foram ensaiados vários métodos de destoxificação, tendo o escolhido sido o tratamento com carvão activado por NaOH que permitiu remover 100% de furfural, 97% de hidroximetilfurfural e 92% dos compostos fenólicos presentes.

Os ensaios de bioconversão realizados com *Debaryomyces hansenii* CCMI 941, seleccionada neste trabalho, demonstraram ser necessário o passo de destoxificação, uma vez que sem este não se detectou qualquer crescimento ou formação de produtos. Simultaneamente, estudou-se o efeito da suplementação com diferentes suplementos do hidrolisado. A maior produtividade em biomassa e polióis foi obtida apenas com a adição de sais, vitaminas e oligoelementos (TEVM), o que constitui uma vantagem relativamente a outros sistemas hidrolisados por microrganismos descritos na literatura.

Palavras-chave

Bagaço de azeitona extractado

Hidrólise com ácido diluído

Hidrolisados hemicelulósicos

Debaryomyces hansenii

Xilitol

Abstract

The extracted olive pomace (EOP) is the waste of the olive-pomace oil extraction industry, used mainly as an inexpensive energy source.

In order for its valorization within the biorefinery concept, in this work it is developed a upgrading strategy for its hemicellulose aiming for the production of xylitol, a compound with potential applications in the food, pharmaceutical and cosmetic industries.

EOP dilute acid hydrolysis was optimized by studying the effect of liquid/solid ratio, and by using the Doehlert experimental design, the effects of time and catalyst (H_2SO_4) concentration at 130 °C. The combined severity factor (CS) was used to interpret the results and the optimum conditions were established at CS of 2.64 (3.5% H_2SO_4 and 130 min). In order to achieve the removal of potential inhibitory compounds, several detoxifications procedures were tested, and the method chosen was the use of charcoal activated with NaOH that allowed to remove 100% of furfural, 97% hydroxymethylfurfural and 92% of phenolic compounds present in the hydrolysate.

The bioconversion assays carried out with *Debaryomyces hansenii* CCMI 941 (selected in this work) proved that the detoxification step is an absolute requirement, since without it, no growth, or xylitol production, were observed. Simultaneously, the effect of supplementation was also studied. The higher biomass and polyols productivity were obtained with the supplementation of low-cost salts, vitamins and trace elements, what constitutes a significant advantage over other hydrolysates described in the literature.

Key-Words

Extracted olive pomace
Dilute-acid hydrolysis
Hemicellulosic hydrolysates
Debaryomyces hansenii
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 throughout the entire Mediterranean basin, and there are no effective upgrade technologies for its valorization. As such, it is mainly used as an inexpensive energy source, either on site, or sold to other industries.

As pomace oil extraction is carried out in large centralized facilities, this material is highly geographically concentrated, and already located on an industrial site. Furthermore, its significant polysaccharide content (above 45%) as quantified in this work, make it an interesting material for the biotechnological valorization within the biorefinery concept. The hemicellulosic content (that accounts for approximately 50% of all polysaccharides) is particularly relevant and its challenging valorization is studied in this work, by the development of an upgrading strategy targeted to the production of xylitol, a compound with potential applications in the food, pharmaceutical and cosmetic industries.

For this, the dilute acid hydrolysis pre-treatment was used for the selective recovery of hemicelluloses. The effect of liquid/solid ratio (LSR) was initially studied, which enabled to define one of the lowest LSR described in literature (3) that enable to get highly concentrated pentose-rich hydrolysates and a low usage of process water.

The dilute acid hydrolysis was further optimized by using the Doehlert experimental design to study the effects of time (0 to 180 min) and catalyst (H₂SO₄) concentration (0.5 to 3.5%) at 130 °C. The combined severity factor (CS) was used to interpret the results and its limitations are highlighted, so that the use of empirical mathematical models was used instead to fine tune the operational conditions, that were established at 3.5% H₂SO₄ and 130 min (CS=2.64).

Under the optimal conditions it was possible to obtain a hydrolysate containing more than 34 g/L of xylose, one of the highest reported in literature for non-concentrated hydrolysates. Furthermore, glucose was found in relative low amounts (similar to arabinose concentration), rendering this hydrolysate quite interesting for xylose bioconversion. The amounts of potential microbial inhibitors such as aliphatic acids (mainly acetic acid), furans (furfural and hydroxymethylfurfural) and phenolic compounds were high as compared to other hydrolysates. This is a consequence of the high content of extractives (of which soluble phenolic compounds) and the high degree of acetylation of the hemicelluloses and was dealt on the subsequent task, hydrolysate detoxification. The remaining solids have an increased glucan content that can be upgraded into bioethanol, within the integrated biorefinery concept.

Hydrolysate detoxification was studied using physico-chemical treatments, specifically neutralization with alkaline agents (NaOH, Ca(OH)₂, CaCO₃), adsorption to activated charcoal, and evaporation. The best method found was the use of charcoal activated with

NaOH (patent pending from this work) that allowed to remove 100% of furfural, 97% hydroxymethylfurfural and 92% of phenolic compounds present in the hydrolysate.

In order to access polyols production in BAE hydrolysate, six *Debaryomyces hansenii* yeast strains both from var. *hansenii* (CCMI 495, CCMI 470, CCMI 493 and 494) and var. *fabryi* (CCMI 496 and CCMI 941) were cultivated in chemically defined medium, with both glucose and xylose to mimic hydrolysate composition, in order to have some insight on their pentose metabolism. As expected, they have shown a quite different behavior, with strains belonging to var. *fabryi* showing a better performance than var. *hansenii*. Nevertheless, two strains were selected, one from each group, for further studies, The selected strains were CCMI 493 and CCMI 941 that displayed a lower biomass yield, a parameter chosen as indicator that they could potentially dissipate an higher Carbon flux into products.

The bioconversion assays were carried out with both strains, in hydrolysate based media, but, conversely to CCMI 941, *Debaryomyces hansenii* CCMI 493 was not able to grow in these media. For CCMI 941 it was shown that the detoxification step is an absolute requirement, since without it, no growth, or xylitol production, were also observed. Simultaneously, the effect of hydrolysate concentration, aeration and supplementation was also studied through the addition to the hydrolysate of yeast extract, peptone, corn steep liquor and a solution of trace elements, vitamins and minerals (TEVM). The higher biomass and polyols productivity were obtained with the supplementation of low-cost salts (TEVM), what constitutes a significant advantage over other hydrolysates described in the literature.

Key-Words

Extracted olive pomace
Dilute-acid hydrolysis
Hemicellulosic hydrolysates
Debaryomyces hansenii
Xylitol

Índice Geral

Agradecimentos	V
Lista de publicações.....	VII
Resumo.....	IX
Palavras-chave	IX
Abstract.....	XI
Key-Words	XI
Extended Abstract.....	XIII
Key-Words	XIV
Índice Geral.....	XV
Índice de Quadros	XIX
Índice de Figuras.....	XXI
Abreviaturas e Siglas	XXIII
Enquadramento e objectivos	XXVII
1. Introdução	1
1.1 Os materiais lenhocelulósicos.....	2
1.1.1 Estrutura dos materiais lenhocelulósicos	3
1.1.1.1 Celulose	4
1.1.1.2 Hemiceluloses	5
1.1.1.3 Lenhina.....	6
1.1.1.4 Compostos de baixa massa molecular/extractivos	7
1.2 Produção de azeite e a obtenção do bagaço de azeitona.....	8
1.2.1 Métodos de extracção do azeite e resíduos gerados	8
1.2.2 Valorização do bagaço de azeitona	9
1.3 Fraccionamento de materiais lenhocelulósicos.....	11
1.3.1 Processos de Hidrólise	11
1.3.1.1 Hidrólise ácida	12
1.3.1.2 Métodos hidrotérmicos	16
1.3.1.3 Métodos alcalinos.....	17
1.3.1.4 Hidrólise enzimática.....	17
1.4 Métodos de destoxificação.....	18
1.4.1 Métodos de destoxificação físicos-químico	18
1.4.2 Métodos de destoxificação químicos	19
1.4.3 Métodos de destoxificação biológicos.....	20
1.5 Xilitol.....	20

1.5.1	Propriedades e aplicações.....	21
1.5.2	Processos de produção de xilitol	22
1.5.2.1	Síntese química.....	23
1.5.2.2	Produção biotecnológica	24
1.6	Microrganismos produtores de xilitol.....	24
1.7	A levedura <i>Debaryomyces hansenii</i>	25
1.7.1	Metabolismo da D-xilose em <i>Debaryomyces hansenii</i>	26
1.8	Factores que influenciam a produção biotecnológica de xilitol	27
1.8.1	Composição do meio de cultura.....	27
1.8.2	Concentração de xilose	28
1.8.3	Disponibilidade de oxigénio	29
2.	Materiais e métodos	31
2.1	Matéria-prima.....	31
2.2	Caracterização granulométrica	31
2.3	Optimização da hidrólise com ácido diluído	31
2.4	Produção de hidrolisados para os ensaios de bioconversão.....	33
2.5	Estudos da destoxificação dos hidrolisados.....	34
2.5.1	Concentração dos hidrolisados.....	34
2.5.2	Destoxificação dos hidrolisados.....	34
2.5.2.1	Correcção de pH	34
2.5.2.2	Tratamento com carvão activado.....	34
2.6	Microrganismo e condições de cultura.....	35
2.6.1	Microrganismo	35
2.6.2	Preparação do inóculo.....	36
2.6.3	Preparação dos meios de cultura	36
2.6.3.1	Meio quimicamente definido	36
2.6.3.2	Meios com base em hidrolisados.....	36
2.6.4	Condições de cultura	39
2.6.5	Amostragem	39
2.7	Métodos analíticos.....	39
2.7.1	Caracterização química da matéria-prima e resíduos sólidos resultantes das hidrólises.....	39
2.7.1.1	Determinação da humidade.....	40

2.7.1.2	Determinação da cinza	40
2.7.1.3	Determinação de glucano, xilano, arabinano e grupos acetilo	40
2.7.1.4	Determinação da lenhina	41
2.7.1.5	Determinação de proteína total.....	41
2.7.1.6	Doseamento de extractivos	41
2.7.2	Determinação da concentração de biomassa celular	41
2.7.3	Doseamento de monossacáridos, compostos inibidores e produtos resultantes do metabolismo microbiano.....	42
2.7.4	Doseamento de compostos fenólicos	42
2.7.4.1	Método espectrofotométrico	42
2.7.4.1	Método CZE	43
3.	Resultados e Discussão	44
3.1	Caracterização da matéria-prima.....	44
3.1.1	Caracterização granulométrica	44
3.1.2	Caracterização química	45
3.2	Optimização da hidrólise com ácido diluído do bagaço de azeitona extractado	46
3.2.1	Definição da razão líquido/sólido	46
3.2.2	Optimização da concentração de ácido e duração do tratamento	47
3.2.3	Caracterização química dos sólidos resultantes da hidrólise	58
3.2.4	Avaliação de metodologias de destoxificação na remoção de compostos inibidores	62
3.3	Estudo da fermentescibilidade do hidrolisado	65
3.3.1	Seleção de estirpes de <i>D. hansenii</i>	65
3.3.2	Avaliação preliminar do efeito da destoxificação e da suplementação do hidrolisado de BAE na produção de xilitol pelas estirpes CCMI 941 e CCMI 493	69
3.3.3	Identificação dos factores que afectam a produção de xilitol por <i>D. hansenii</i> em hidrolisado de BAE	74
4.	Considerações finais e perspectivas	79
5.	Referências bibliográficas	81
ANEXOS		I
I.	Meio de cultura.....	I
II.	Preparação de stock das estirpes da levedura <i>D. hansenii</i>	I
III.	Soluções de suplementos utilizadas	II
IV.	Formulário	IV
V.	Determinação de proteína total na matéria-prima.....	X
VI.	Doseamento dos extractivos.....	XI

VII.	Determinação da concentração de compostos fenólicos	XII
------	---	-----

Índice de Quadros

Quadro 1.1 - Composição em celulose, hemiceluloses e lenhina de diversos materiais lenhocelulósicos, expressos em g/100g de matéria seca	2
Quadro 1.2 - Condições operacionais utilizadas na hidrólise com ácido diluído de diferentes materiais lenhocelulósicos.....	14
Quadro 1.3 - Propriedades físicas e químicas do xilitol	21
Quadro 2.1 - Dimensões dos peneiros usados na caracterização granulométrica.....	31
Quadro 2.2 - Matriz codificada para o planeamento experimental Doehlert para duas variáveis experimentais e a correspondente matriz experimental.....	33
Quadro 2.3 - Matriz Plackett-Burman para doze experiências.....	38
Quadro 2.4 - Níveis de operação das variáveis independentes.....	39
Quadro 2.5 - Condições de análise para a coluna cromatográfica HPX-87H.....	42
Quadro 3.1 - Composição química média do bagaço de azeitona extractado.	45
Quadro 3.2 - Concentrações ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) e rendimentos (g/kg matéria matéria-prima seca) de monossacáridos e ácido acético, obtidos para a hidrólise ácida de BAE para diferentes razões líquido/sólido, com 1,2% de H_2SO_4 e a $130\text{ }^\circ\text{C}$	47
Quadro 3.3 - Concentrações ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) em monossacáridos, ácido acético e produtos de degradação obtidos na hidrólise do bagaço de azeitona extractado com ácido diluído para diferentes condições de ácido e tempo, segundo a matriz de Doehlert.	49
Quadro 3.4 - Coeficientes de regressão estimados para o modelo polinomial para as diferentes respostas analisadas.	54
Quadro 3.5 - Composição do hidrolisado de BAE obtido para o factor de severidade combinado de 2,64.....	57
Quadro 3.6 - Percentagens de recuperação de açúcares e ácido acético na fracção sólida e líquida, de lenhina na fracção sólida e respectivos balanços.....	60
Quadro 3.7 – Níveis de operação das variáveis independentes de acordo com a matriz de Plackett-Burman para 12 experiências.....	75
Quadro 3.8- Composição ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) dos meios de cultivo para o estudo da produção de xilitol de acordo com a matriz de Plackett-Burman para 12 experiências.	76

Índice de Figuras

Figura 1.1 - Principais componentes na biomassa vegetal.....	3
Figura 1.2 - Organização estrutural dos componentes macromoleculares de materiais lenhocelulósicos.....	4
Figura 1.3 - Representação das ligações inter e intramoleculares na celulose.....	4
Figura 1.4 - Modelo de uma microfibrilha de celulose com regiões cristalinas intercaladas com regiões amorfas. Legenda: - - - Hemiceluloses, — Celulose .	5
Figura 1.5 - Representação de uma molécula de hemicelulose (xilano).....	6
Figura 1.6 - Monómeros constituintes da lenhina.....	7
Figura 1.7 - Esquema representativo da extracção do óleo de bagaço de azeitona e obtenção do bagaço extractado.....	10
Figura 1.8 - Mecanismo proposto para a cisão das ligações glicosídicas na despolimerização das hemiceluloses em meio ácido.....	12
Figura 1.9 - A composição dos materiais lenhocelulósicos e potenciais produtos resultantes da sua hidrólise com ácido diluído.....	15
Figura 1.10 - Processos possíveis para a obtenção de xilitol.....	23
Figura 1.11 - Passos iniciais do metabolismo da D-xilose em <i>Debaryomyces hansenii</i> e mecanismo bioquímico da acumulação de xilitol. XR - xilose-redutase; XDH -xilitol-desidrogenase. CTE – Cadeia de transferência de electrões.....	27
Figura 3.1 - Análise granulométrica do bagaço de azeitona extractado.....	44
Figura 3.2 - Superfícies de resposta para a concentração de glucose – a), concentração de xilose - b) e concentração de arabinose - c) concentração total de açúcares – d), concentração total de pentoses – e) em função da concentração de ácido (X_1) e tempo de reacção (X_2).	51
Figura 3.3 - Superfícies de resposta para a concentração de ácido acético - a), concentração de ácido fórmico b), concentração de ácido levulínico - c), concentração de HMF - d), concentração de furfural – e) concentração de compostos fenólicos – f), total de inibidores – g) em função da concentração de ácido (X_1) e tempo de reacção (X_2).....	53
Figura 3.4 - Superfícies de resposta para a diferença entre a concentração total de açúcares e total de inibidores - a) – e da diferença entre a concentração total de pentoses e total de inibidores - b), em função da concentração de ácido (X_1) e tempo de reacção (X_2).....	56
Figura 3.5 - Efeito das condições de severidade no rendimento em sólidos (Y_s), composição polimérica e grupos acetilo obtidos após a hidrólise com ácido diluído do bagaço de azeitona extractado. Rendimentos em sólido (▲), glucano (◆), xilano (■), arabinano (▲), grupos acetilo (●) e lenhina Klason (+). ^a (g/100g matéria-prima) ^b (g/100g sólidos processados)	59
Figura 3.6 - Influência dos vários tratamentos de destoxificação na remoção de compostos inibidores e monossacáridos totais presentes no hidrolisado. Ácido acético (■), ácido fórmico (■), furfural (■), HMF (■), compostos fenólicos (■) e açúcares totais (■).....	63

Figura 3.7 - Perfis de crescimento da levedura <i>D. hansenii</i> em meio quimicamente definido. Estirpes: CCMI 941 (●), CCMI 496 (×), CCMI 493 (◆), CCMI 494 (■), CCMI 495 (▲), e CCMI 470 (×).	66
Figura 3.8 - Fase de latência (λ) (■) e taxa específica de crescimento (μ) (■) de diferentes estirpes da levedura <i>D. hansenii</i> em meio quimicamente definido.....	66
Figura 3.9 - Perfis do consumo de glucose (■) e xilose (■) pelas estirpes CCMI 494 (a), CCMI 493 (b) e CCMI 941 (c) da levedura <i>D. hansenii</i> em meio quimicamente definido.	68
Figura 3.10 - Taxa volumétrica de consumo de xilose (Q_{xyl}) (■), produtividade celular (Q_x) (■) e rendimento em biomassa ($Y_{x/s}$) (■) de diferentes estirpes da levedura <i>D. hansenii</i> em meio quimicamente definido.	68
Figura 3.11 - Variação da biomassa da levedura <i>D. hansenii</i> CCMI 941 (peso seco) em hidrolisado não destoxificado suplementado com borras de vinho (●), destoxificado suplementado com borras de vinho (■) e em hidrolisado não destoxificado suplementado com TEVM (○), destoxificado suplementado com TEVM (□).	70
Figura 3.12 - Produtividade volumétrica em polióis ($Q_{poli\acute{o}is}$) (■), produtividade celular (Q_x) (■) e concentração máxima de polióis produzidos ([polióis]) (■) resultantes do crescimento da levedura <i>D. hansenii</i> CCMI 941 em hidrolisado não-destoxificado suplementado com borras de vinho (N-Destox.BV), destoxificado suplementado com borras de vinho (Destox.BV) e em hidrolisado não-destoxificado suplementado com TEVM (N-Destox.TEVM), destoxificado suplementado com TEVM (Destox.TEVM).....	72
Figura 3.13 - Perfil de peso seco da levedura <i>D. hansenii</i> CCMI 493 em hidrolisado não destoxificado suplementado com borras de vinho (●), destoxificado suplementado com borras de vinho (■) e em hidrolisado não destoxificado suplementado com TEVM (○), destoxificado suplementado com TEVM (□).	74
Figura 3.14 - Perfis de crescimento da estirpe <i>D. hansenii</i> (estirpe CCMI 941) em hidrolisado preparado nas diferentes condições segundo a matriz Plackett-Burman. Balão 1 (●), balão 2 (○), balão 3 (■), balão 4 (□), balão 5 (▲), balão 6 (△), balão 7 (◆), balão 8 (◇), balão 9 (×), balão 10 (◆), balão 11 (■), balão 12 (▲).....	76
Figura 3.15 - Perfis de substratos, peso seco da biomassa e xilitol (exp. 7) pela levedura <i>D. hansenii</i> (estirpe CCMI 941) em hidrolisado destoxificado com TEVM. Glucose (◆), xilose (■), arabinose (▲), ácido acético (●), ácido fórmico (×), glicerol (—), xilitol + arabinol (×) biomassa celular (+).....	77

Abreviaturas e Siglas

A	Peso de amostra seca (g)
Abs	Absorvância num determinado momento
Abs₀	Absorvância inicial
Ara	Arabinose
Ara_R	Percentagem de arabinano solubilizada a arabinose (g/100 g Arn _{MP})
Ara_T	Rendimento em arabinose (g/100 g matéria prima)
Arn	Percentagem de arabinano (g/100 g sólido)
Arn_{MP}	Percentagem de arabinano na matéria-prima (g/100 g matéria-prima)
Arn_R	Percentagem de arabinano não solubilizado (g/100 g Arn _{MP})
Arn_T	Percentagem de arabinano (g/100 g matéria-prima)
b	Ordenada na origem, na equação da recta
BAE	Bagaço de Azeitona Extractado
C	Cinzas (g)
CCMI	Colecção de Culturas de Microrganismos Industriais do LNEG
CS	Factor de severidade combinado
CZE	“ <i>Capillary zone electrophoresis</i> ” (Electroforese Capilar de Zona)
dummy	Variáveis auxiliares
F	Factor de correcção
Fn	Concentração de compostos fenólicos (g·L ⁻¹)
Fn_T	Rendimento em compostos fenólicos (g/100 g matéria-prima)
Furf_R	Percentagem de xilano convertido a furfural (g/100 g Xn _{MP})
Furf_T	Rendimento em furfural (g/100 g matéria-prima)
G6PDH	Glucose-6-fosfato-desidrogenase
GAc	Percentagem de grupos acetilo (g/100 g sólido)
GAc_{MP}	Percentagem de grupos acetilo na matéria-prima (g/100 g matéria-prima)
GAc_R	Percentagem de grupos acetilo não solubilizados (g/100 g GAc _{MP})

GAc_T	Rendimento em grupos acetilo (g/100 g matéria-prima)
Glc	Glucose (g·L ⁻¹)
Glc_R	Percentagem de glucano solubilizado a glucose (g/100 g Gn _{MP})
Glc_T	Rendimento em glucose (g/100 g matéria-prima)
Gn	Percentagem de glucano (g/100 g de sólido)
Gn_{MP}	Percentagem de glucano na matéria-prima (g/100 g matéria-prima)
Gn_R	Percentagem de glucano não solubilizado (g/100 g Gn _{MP})
Gn_T	Percentagem de glucano (g/100 g matéria-prima)
HAc	Ácido acético
HAc_R	Percentagem de ácido acético recuperada na hidrólise (g/100 g GAc _{MP})
HAc_T	Percentagem de ácido acético na matéria-prima (g/100 g matéria-prima)
HFor	Ácido fórmico
HLev	Ácido Levulínico
HMF	Concentração de HMF (g·L ⁻¹)
HMF_R	Percentagem de glucano convertido a HMF (g/100 g Gn _{MP})
HMF_T	Rendimento em HMF (g/100 g matéria-prima)
HPLC	Cromatografia líquida de alta pressão (“High Pressure Liquid Chromatography”)
LK	Lenhina Klason (g/100 g sólido)
LK_{MP}	Lenhina Klason na matéria-prima (g/100 g matéria-prima)
LK_R	Percentagem de lenhina Klason não solubilizada (g/100 g LK _{MP})
LK_T	Rendimento em lenhina Klason (g/100 g matéria-prima)
LNEG	Laboratório Nacional de Energia e Geologia
Mg	Fonte de Magnésio
NP	Fonte de Azoto e Fósforo
P_f	Concentração final de produto (g·L ⁻¹)
P_H	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)
R₀	Factor de severidade
RIA	Peso seco do resíduo insolúvel em ácido (g)
RLS	Razão Líquido/Sólido
S_f	Concentração final de substratos (g·L ⁻¹)
S_i	Concentração inicial de substratos (g·L ⁻¹)
t	Tempo de residência (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/100 g sólido)
X_{nMP}	Percentagem de xilano na matéria-prima (g/100 g matéria-prima)
X_{nR}	Percentagem de xilano não solubilizado (g/100 g X _{nMP})
X_{nT}	Percentagem de xilano (g/100 g matéria-prima)
XR	Xilose-redutase
Xyl	Xilose
Xyl_R	Percentagem de xilose recuperada na hidrólise (g/100 g X _{nMP})
Xyl_T	Rendimento em xilose (g/100 g matéria-prima)

YM-glc	Meio Yeast Malt-glucose
$Y_{\text{polióis}}$	Rendimento em polióis ($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
Y_{S}	Rendimento em sólidos (g sólido recuperado/100 g matéria-prima)
Y_{XS}	Rendimento celular ($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
$\mu_{\text{máx}}$	Taxa específica máxima de crescimento (h^{-1})
ρ_{H}	Massa volúmica do hidrolisado ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)

Enquadramento e objectivos

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

O projecto 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 Extractado (BAE)

Assim, no âmbito deste projecto, o presente trabalho tem como principais objectivos:

- Caracterização físico-química do Bagaço de Azeitona Extractado
- Optimização da hidrólise ácida selectiva da hemicelulose do Bagaço de Azeitona Extractado, para obtenção de um hidrolisado rico em pentoses
- Caracterização química dos hidrolisados e resíduos sólidos obtidos
- Desenvolvimento de métodos de destoxificação dos hidrolisados obtidos
- Avaliação da viabilidade desse hidrolisado para a produção de polióis, em particular o xilitol, pela levedura *Debaryomyces hansenii*

1. Introdução

O uso de combustíveis fósseis para a produção de energia e matérias-primas, veio permitir um grande desenvolvimento industrial durante século XX. No entanto, desde há algum tempo que existem sinais, que ameaçam este modelo económico baseado na indústria petroquímica, tais como: a diminuição de stocks, aumento da procura por parte das economias emergentes, a incerteza do preço e o interesse social e político para reduzir as emissões de gases de efeito estufa. Assim, surge a necessidade de reduzir a dependência de matérias-primas petroquímicas, através do desenvolvimento de alternativas energéticas e de novas matérias-primas renováveis. Entre os potenciais recursos alternativos, os materiais lenhocelulósicos têm sido identificados como a principal fonte de biocombustíveis e de outros produtos de valor acrescentado, ao passo que as energias eólica, solar ou hidroeléctrica apenas podem traduzir-se em energia ou calor. Neste contexto, os países industrializados voltaram a considerar a biomassa como matéria-prima adequada para a produção de energia e produtos químicos, devido ao seu carácter renovável, baixo custo e ampla disponibilidade (Akpinar *et al.* 2011; Parajo *et al.* 2008). Associada a esta actualização de desenvolvimento tecnológico e industrial deu origem o conceito de biorrefinaria, análogo ao conceito de refinaria (petroquímica) (SIADEB 2011).

A conversão de biomassa é actualmente realizada em instalações, com capacidade limitada para obter produtos (como o etanol, ésteres de ácidos gordos, glicerol, metanol, etc.), em que, em geral, não se explora todo o potencial económico da biomassa. O propósito desta nova abordagem é o desenvolvimento de "biorrefinarias integradas", entendidas como instalações em que se aproveitam todos os subprodutos e fracções da biomassa para produzir uma grande variedade de produtos (Kumar *et al.* 2008) - indústrias de base biológica, utilizando uma variedade de diferentes tecnologias para a produção de produtos químicos, biocombustíveis, ingredientes alimentares, rações, biomateriais e energia utilizando a biomassa como matéria-prima (Biopol 2008).

As bioconversões de materiais lenhocelulósicos em produtos de valor acrescentado requerem, em geral, múltiplos passos de processamento, que incluem: (i) pré-tratamento (mecânico, químico ou biológico), (ii) a hidrólise de polímeros para produzir moléculas facilmente metabolizáveis (por exemplo, hexoses ou pentoses), (iii) a utilização destas moléculas por microrganismos para produção de produtos químicos (iv) e a separação e purificação destes produtos químicos.

Estas instalações, sendo já uma realidade emergente em alguns países, necessitam ainda de desenvolvimentos científicos e tecnológicos que lhes permitam ultrapassar as suas actuais limitações (SIADEB 2011). O desenvolvimento destas instalações passa por aperfeiçoar os processos e equipamentos de modo a alargar a origem da matéria-prima a utilizar e a fazer face à sua heterogeneidade e complexidade estrutural (Bozell *et al.*

2007; SIADEB 2011), de modo a minimizar o desperdício e a maximizar o rendimento, não só em combustíveis líquidos como também em produtos de valor acrescentado (Carvalho *et al.* 2008). Desde logo os custos da matéria-prima podem ser minimizados se forem considerados, por exemplo, resíduos agrícolas ou agro-industriais.

1.1 Os materiais lenhocelulósicos

Através de práticas florestais e agrícolas, indústrias de celulose, de madeira e muitas agro-indústrias, são geradas grandes quantidades de “resíduos” lenhocelulósicos (Quadro 1.1) que podem resultar num problema de poluição ambiental (Howard *et al.* 2003).

Existem assim vários tipos de biomassa lenhocelulósica que podem ser agrupados em três categorias: resíduos florestais de madeiras folhosas (ex: eucalipto, carvalho, faia), madeiras resinosas (ex: pinheiro, abeto) e resíduos e subprodutos agrícolas e agro-industriais (ex: carolo do milho, palhas de cereais, dreche cervejeira, bagaço de cana-de-açúcar) (Hasyierah *et al.* 2008). As enormes quantidades de biomassa vegetal residual consideradas “resíduos” podem, potencialmente, ser convertidas em diferentes produtos de valor acrescentado, incluindo biocombustíveis, produtos químicos, (Howard *et al.* 2003), massa proteica para fins alimentares e metabolitos de valor acrescentado, como é o caso do xilitol, ácido glutâmico, glicerol, sorbitol e arabitol (Sheldon 2011).

Quadro 1.1 - Composição em celulose, hemiceluloses e lenhina de diversos materiais lenhocelulósicos, expressos em g/100g de matéria seca (Adaptado de Gírio *et al.* 2010).

Materiais lenhocelulósicos	Celulose	Hemiceluloses	Lenhina
Madeiras resinosas (<i>softwoods</i>)			
Pinho	42,9-52,2	13,5-26	26,3-30,2
Abeto	43-51,1	15,2-26	27,3-29
Madeiras Folhosas (<i>hardwoods</i>)			
Carvalho	38,9-44	18,7-23,8	21,5-24,7
Choupo	39-51,3	21-28,4	20,3-26
Eucalipto	38-54	15-30	23,1-37
Faia	43,2-49,8	18-28,2	16-24
Plátano	40	23	22
Salgueiro	33,1-41,5	13-21,9	21-25,2
Resíduos Agro-industriais			
Bagaço de azeitona	17,3-33,7	15,3-38,7	41,2-47,5
Carolo de milho	31,7-39,4	31,9-34,7	15,9-22,3
Casca de arroz	36,7-37,7	16,7-17,3	21,3-22,1
Palha de cevada	13,8	16,7	33,75
Palha de trigo	32,3-43,8	21,9-35,5	8,9-19,8

1.1.1 Estrutura dos materiais lenhocelulósicos

Do ponto de vista químico, os componentes dos materiais lenhocelulósicos podem ser classificados em componentes de elevada e baixa massa molecular. Dos primeiros fazem parte os principais constituintes da parede celular: celulose, hemiceluloses e lenhina. Nos compostos de baixa massa molecular incluem-se os extractivos (compostos orgânicos) e, em menor percentagem, a cinza (compostos inorgânicos) (Figura 1.1).

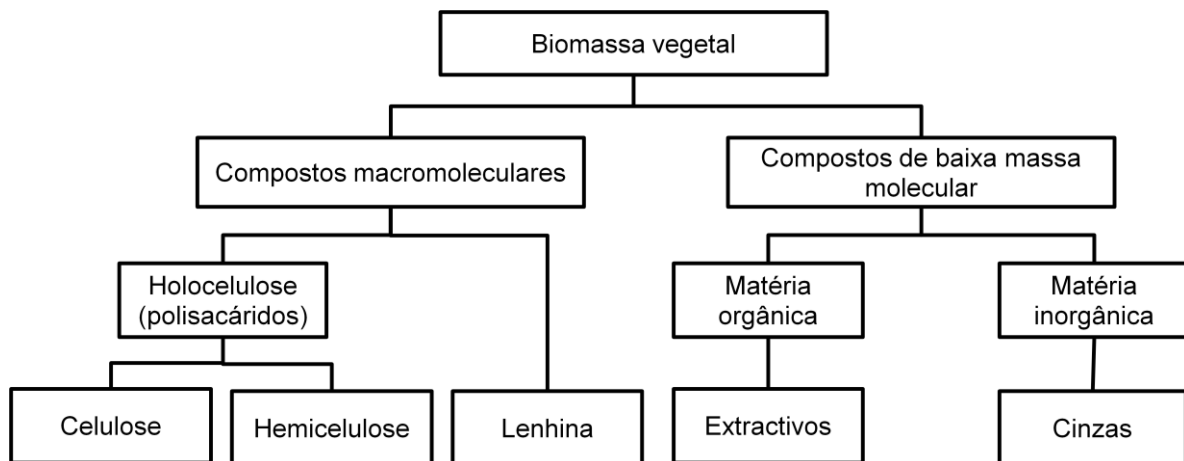


Figura 1.1 - Principais componentes na biomassa vegetal (Adaptado de Demirbas 2009).

A composição química dos materiais lenhocelulósicos varia com a origem, espécie, condições de crescimento e variações biológicas e genéticas.

A Figura 1.2 representa esquematicamente a organização da parede celular em termos de interligação entre os polímeros estruturais: um esqueleto microfibrilhar de celulose é envolto por moléculas de hemicelulose, com a lenhina ocupando os espaços vazios deixados entre as moléculas de hemiceluloses. Em conjunto formam um material compósito que confere resistência a ataques microbiológicos e enzimáticos e, por conseguinte ao seu fraccionamento (Fengel *et al.* 1983;Pereira *et al.* 2003).

Os extractivos encontram-se no lúmen celular e células parenquimatosas (Fengel *et al.* 1983;Pereira *et al.* 2003).

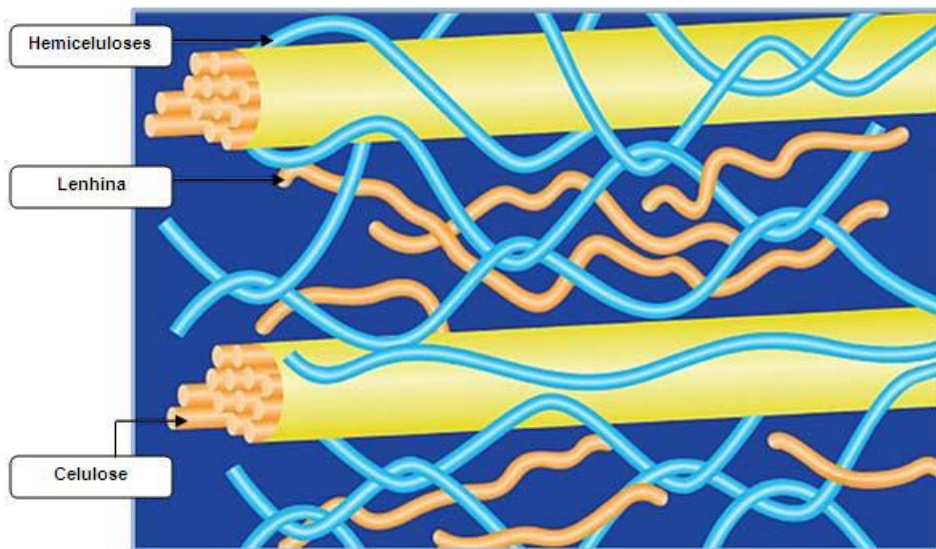


Figura 1.2 - Organização estrutural dos componentes macromoleculares de materiais lenhocelulósicos (Silva *et al.* 2009).

1.1.1.1 Celulose

A celulose é o principal componente na maioria dos materiais lenhocelulósicos (40-60%), (Khanal *et al.* 2010). É um polímero constituído por moléculas de β -D-glucopirranose (forma cíclica da glucose) unidas por ligações glicosídicas β -1,4 (Ek *et al.* 2009). Porém, cada molécula de glucose apresenta uma rotação de 180° em relação às moléculas vizinhas, pelo que a unidade básica de repetição é na realidade uma molécula de celobiose (Nag 2008). É esta organização que permite o estabelecimento de ligações entre as várias cadeias de celulose, associada ao arranjo estrutural desta molécula (Figura 1.3).

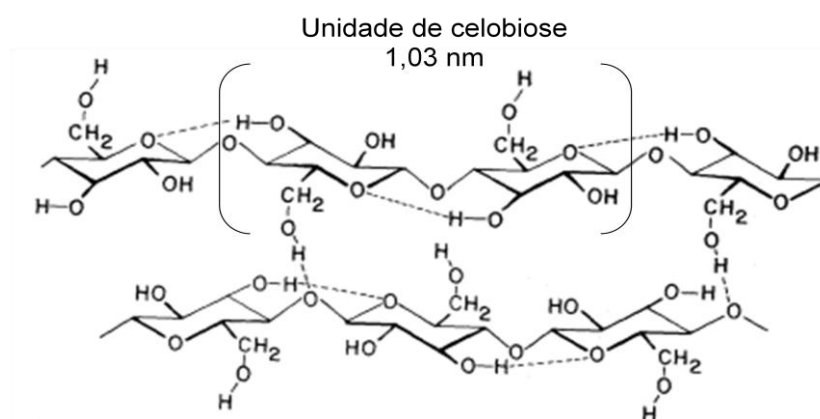


Figura 1.3 - Representação das ligações inter e intramoleculares na celulose.

A orientação das ligações e pontes de hidrogénio entre cadeias de celulose fazem um polímero altamente estável e cristalino (Khanal *et al.* 2010), apresentando um elevado grau de polimerização (cerca de 10000) (Pereira *et al.* 2003). Embora ocorram regiões desordenadas (zonas amorfas), estima-se que 70% da celulose se encontre sob a forma

cristalina e altamente ordenada (Pereira *et al.* 2003) (Figura 1.4). Nas regiões ordenadas, as ligações de hidrogénio entre as cadeias de celulose são tão intensas que a água não consegue interrompê-las por complexação com os grupos hidroxilo. Isso confere-lhe elevada resistência química, pois faz com que a celulose seja insolúvel na maioria dos solventes (incluído água), mas não em outros compostos, como seja o ácido sulfúrico ou os líquidos iónicos (Rauter *et al.* 2010).

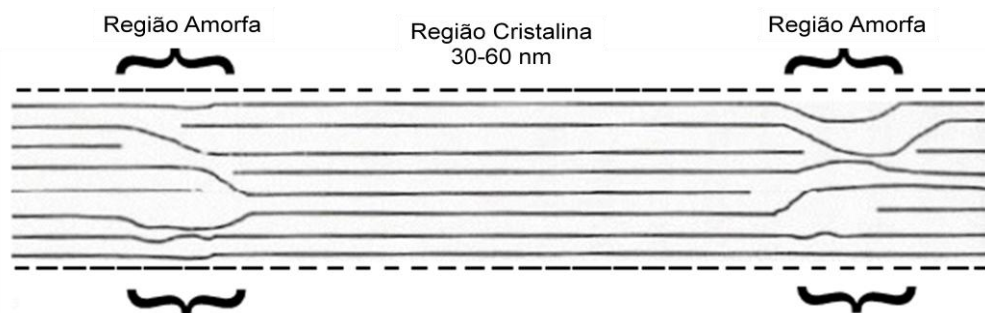


Figura 1.4 - Modelo de uma microfibrilha de celulose com regiões cristalinas intercaladas com regiões amorfas. Legenda: - - - Hemiceluloses, — Celulose (Adaptado de (Pereira *et al.* 2003).

1.1.1.2 Hemiceluloses

As hemiceluloses são o segundo polissacárido mais abundante na natureza (20-40%), (Khanal *et al.* 2010). São polímeros heterogêneos constituídos por cadeias principais de pentoses (β -D-xilose, α -L-arabinose) e/ou hexoses (β -D-manose, β -D-glucose, α -D-galactose), ramificadas com outras pentoses ou hexoses, grupos acetilo, ácidos urónicos (ácidos α -D-glucorónico, α -D-4-*o*-metilglucurónico e α -D-galacturónico) (Kumar *et al.* 2008) e/ou compostos fenólicos, por exemplo, o ácido ferúlico.

As hemiceluloses apresentam diferenças quanto à sua estrutura e composição em função da sua origem biológica. No grupo das resinosas, as hemiceluloses são essencialmente constituídas por glucomananos, possuindo assim uma proporção superior de unidades de manose e glucose, comparativamente às hemiceluloses das folhosas e resíduos agrícolas. O conteúdo de manose pode chegar aos 10% nas folhosas e até 5% nos resíduos agrícolas. Na maioria das folhosas e resíduos agrícolas, como cerca de 80% dos açúcares hemicelulósicos correspondem a xilose, é frequente associar o conteúdo em hemicelulose ao conteúdo em xilano (Moure *et al.* 2006).

Os xilanos mais comuns são formados por uma cadeia principal de xilose ligada por ligações β -1,4, onde as unidades estruturais são substituídas por arabinose, ácido glucurónico, acético, ferúlico e p-cumárico (Moure *et al.* 2006) (Figura 1.5).

Os principais componentes hemicelulósicos da azeitona são xilanos e xiloglucanos. Os xilanos são formados por uma cadeia principal de xilose ligada por ligações β -1,4, onde as

unidades estruturais são substituídas por ácido glucurónico, arabinose ou grupos acetilo. Os xiloglucanos são formados por uma cadeia de glucose, também ela ligada por ligações β -1,4, ligada a moléculas de xilose. Podem ser distinguidos dois tipos de xiloglucanos que diferem no grau de substituição de unidades de xiloses na cadeia principal. Algumas dessas unidades são substituídas com galactose ou arabinose, ou uma fucose ligada, por ligações 1,2, a uma galactose. Nos xiloglucanos são também substituídas unidades de xilose com o-acetilo (Vierhuis *et al.* 2001).

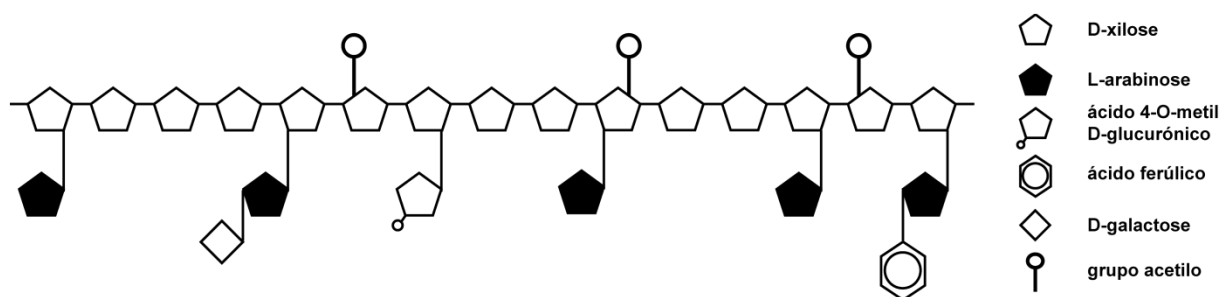


Figura 1.5 - Representação de uma molécula de hemicelulose (xilano).

As hemiceluloses apresentam uma estabilidade química e térmica inferior à celulose. Devido à falta de cristalinidade e ao grau de polimerização mais baixo (entre 40 e 200) são solúveis em meio alcalino, à temperatura ambiente, e facilmente hidrolisáveis por ácidos nos seus componentes monoméricos (Pereira *et al.* 2003).

1.1.1.3 Lenhina

A biomassa lenhocelulósica é composta por 10-25% de lenhina, é um polímero aromático complexo formado pela polimerização de 3 monómeros de fenilpropano, unidos por ligações éter e carbono-carbono com diversos padrões de ligação. Os principais monómeros constituintes da lenhina são os álcoois p-cumarílico, coniferílico e sinapílico (Fengel *et al.* 1983) (Figura 1.6). Tal como ocorre nas hemiceluloses, este polímero apresenta grande diversidade na sua composição consoante a sua origem. Nas madeiras resinosas, o álcool coniferílico é a principal unidade (90%) sendo o restante álcool p-cumarílico e sinapílico. A lenhina das madeiras folhosas é composta por unidades de álcool coniferílico e sinapílico (Khanal *et al.* 2010;Pereira *et al.* 2003).

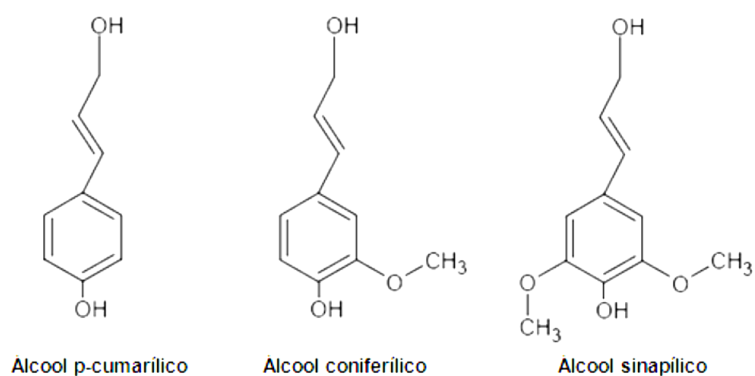


Figura 1.6 - Monómeros constituintes da lenhina.

Como resultado da sua estrutura química, a lenhina é um polímero resistente com fortes ligações covalentes distribuídas numa rede tridimensional, responsável pela natureza hidrofóbica, pela rigidez da parede celular, resistência à compressão e a ataques microbianos, desempenhando um papel fundamental no transporte de água, nutrientes e de metabolitos secundários (Pereira *et al.* 2003). Apresentam um grau de polimerização entre 20 e 400 (Fengel *et al.* 1983;Pereira *et al.* 2003).

Sendo a natureza química da lenhina diferente da dos polissacáridos, as reacções de hidrólise ácida ou enzimática, afectam pouco a lenhina, sendo por isso um dos polímeros naturais mais resistentes. No entanto, a lenhina é mais sensível que os polissacáridos a reacções de oxidação ou à acção de solventes orgânicos (Fengel *et al.* 1983;Pereira *et al.* 2003) e a sua degradação biológica já é conhecida por ter sido alcançada por fungos, especialmente actinomicetas (Nag 2008).

1.1.1.4 Compostos de baixa massa molecular/extractivos

Para além dos componentes estruturais da parede e de outros materiais poliméricos, estão presentes nas células vegetais muitos outros compostos. Representam, em geral, uma pequena fracção dos materiais lenhocelulósicos (em geral inferior a 10%), mas podem ter influência nas suas propriedades e afectar o seu processamento (Fengel *et al.* 1983). Estes compostos podem ser divididos em orgânicos (extractivos) e inorgânicos (cinza). A sua composição e quantidade relativa dependem, à semelhança dos compostos macromoleculares, de factores como a espécie, a proveniência, a idade e a localização na planta (Fengel *et al.* 1983).

Os compostos orgânicos, do tipo lipofílico e hidrofílico, compreendem uma grande variedade de terpenóides, esteróis, ácidos gordos esterificados com glicerol ou com álcoois de elevado peso molecular (ceras), ácidos gordos livres, compostos fenólicos (como os taninos), aminoácidos, pectinas, amidos e alcalóides (Mustranta *et al.* 1995;Philipp *et al.* 1988;Rydholm 1985). São normalmente quantificados a partir da sua solubilidade (total ou parcial) em solventes orgânicos neutros e/ou água, denominando-se, por essa razão,

'extractáveis' (Pereira *et al.* 2003). A maior parte dos extractivos são metabolitos secundários, importantes no desenvolvimento e crescimento celular e defesa contra ataques microbianos (Pereira *et al.* 2003).

Os compostos inorgânicos incluem elementos (em quantidades inferiores a 1%) como o potássio, magnésio e silício (Fengel *et al.* 1983).

1.2 Produção de azeite e a obtenção do bagaço de azeitona

Os países mediterrânicos produzem cerca de 96% do azeite produzido mundialmente, que se estima que seja superior a 3 mil milhões de toneladas. A Espanha produz cerca de um terço de toda a produção mundial, sendo o maior produtor. A Itália e a Grécia posicionam-se, respectivamente, como o 2º (29%) e 3º (14%) produtores. Portugal detém, actualmente, a par com a Argélia e a Jordânia, a 8ª posição no *ranking* produzindo cerca de 29 145 ton de azeite (MADRP 2007).

1.2.1 Métodos de extracção do azeite e resíduos gerados

Até há cerca de 30 anos atrás, todo o azeite era obtido por prensagem. Na década de 70, por razões económicas, os lagares foram gradualmente abandonando a prática, pois trata-se de um método muito trabalhoso. O método alternativo que surgiu foi um sistema contínuo de três fases que funciona por meio de centrifugação da pasta de azeitona moída.

Apesar das vantagens deste sistema em comparação com a prensagem (automação completa, azeite de melhor qualidade, menor área necessária), também apresenta alguns inconvenientes, nomeadamente maior consumo de água e energia, maior produção de águas residuais e instalações mais caras. Durante os anos 90, houve uma nova mudança tecnológica introduzindo-se o sistema de duas fases, que reduz o consumo de água, otimiza os custos de extracção e impede a produção de elevadas quantidades de águas ruças, um efluente altamente poluente (Moral *et al.* 2006; Roig *et al.* 2006).

O processo de produção de azeite pode ser subdividido em três fases: (1) limpeza das azeitonas (2) preparação de uma pasta homogénea e (3) extracção e purificação do azeite

Na primeira fase, os elementos de maiores dimensões tais como pedras e ramos, são retirados. A folhagem é removida com ar e as azeitonas posteriormente lavadas com água corrente (Roig *et al.* 2006).

Na segunda fase (comum aos 3 tipos de sistemas de extracção), as azeitonas são processadas por moagem sendo trituradas até se formar uma pasta. Seguidamente esta pasta é batida e aquecida numa termobatedeira de maneira a aumentar o rendimento de extracção do azeite.

Na terceira fase, procede-se à extracção propriamente dita, ou seja, à separação da fase sólida (o bagaço) das fases líquidas (o azeite e a água de vegetação) que difere consoante o sistema utilizado:

- Sistema tradicional: a massa é colocada entre os capachos e submetida a pressão para separar o mosto oleoso (mistura de azeite e água), que posteriormente se deixa decantar para obter, por diferença de densidade, o azeite;
- Sistema contínuo (por centrifugação):
 - De 3 fases: à pasta de azeitona adiciona-se água e faz-se passar por uma centrífuga horizontal onde é separada a parte sólida do mosto oleoso. O mosto passa depois por uma centrífuga vertical onde se separa o azeite da água de vegetação;
 - De 2 fases: processo praticamente igual ao anterior com a diferença de que em vez de se adicionar água à massa, a água existente no sistema sai conjuntamente com a fase sólida, mais húmida, portanto.

As águas e os sólidos são assim separados do azeite e ainda centrifugados a fim de recuperar azeite residual. O azeite é purificado através da clarificação por sedimentação ou por filtração por peneiras vibratórias. As águas também são clarificadas antes da sua eliminação. Os sólidos residuais da etapa de purificação são misturados com aqueles provenientes da etapa de extracção. A principal diferença entre os bagaços é teor de água que possuem (Niaounakis *et al.* 2006).

1.2.2 Valorização do bagaço de azeitona

Em consequência das grandes produções de azeite, surgem também elevadas produções de resíduos, nomeadamente, bagaço de azeitona e efluentes, o que impõe problemas de natureza ambiental.

Enquanto que nos lagares de prensas e sistemas contínuos de três fases, o bagaço produzido ainda representa uma mais valia em termos económicos, sendo adquirido pelas fábricas de extracção de óleo de bagaço, o bagaço húmido dos sistemas de duas fases, tem menor valor comercial, dadas as suas características de humidade e viscosidade que tornam difícil o seu transporte, armazenagem e secagem. Tendo em vista a sua utilização torna-se necessário proceder a uma pré-secagem (Moral *et al.* 2006).

A problemática destes bagaços húmidos fez-se sentir com maior incidência nas regiões do Alentejo e Trás os Montes dada a elevada laboração de azeite por sistemas de duas fases. No Alentejo, esta situação foi ultrapassada com a entrada em funcionamento em 2001 da UCASUL –União de Cooperativas do Sul, que processa os bagaços húmidos produzidos na região (MADRP 2007).

Estes bagaços depois de reduzida a sua humidade, tal como os bagaços de prensas e dos sistemas de três fases, são canalizados para de extracção de óleo de bagaço. Na UCASUL o bagaço é descarregado em lagoas de recepção, onde fica armazenado até ser submetido a um processo de secagem em grandes secadores cilíndricos rotativos, colocados horizontalmente. Quando é atingida uma percentagem de humidade de aproximadamente 8%, o bagaço é levado até um equipamento especial em que o óleo aí contido é recuperado utilizando solventes, geralmente hexano. Em seguida a mistura solvente e o óleo de bagaço é submetida a um processo de destilação, conseguindo-se a separação do óleo do hexano, podendo este último ser novamente reutilizado no processo (Figura 1.7). Este processo de extracção origina, por sua vez, um subproduto o Bagaço de Azeitona Extractado, que é frequentemente utilizado como combustível, devido ao seu elevado poder calorífico (MADRP 2007). O óleo de bagaço bruto depois de refinado é comercializado como óleo alimentar de bagaço de azeitona, sendo frequentemente utilizado para corrigir o grau de acidez de azeites. (MADRP 2007).

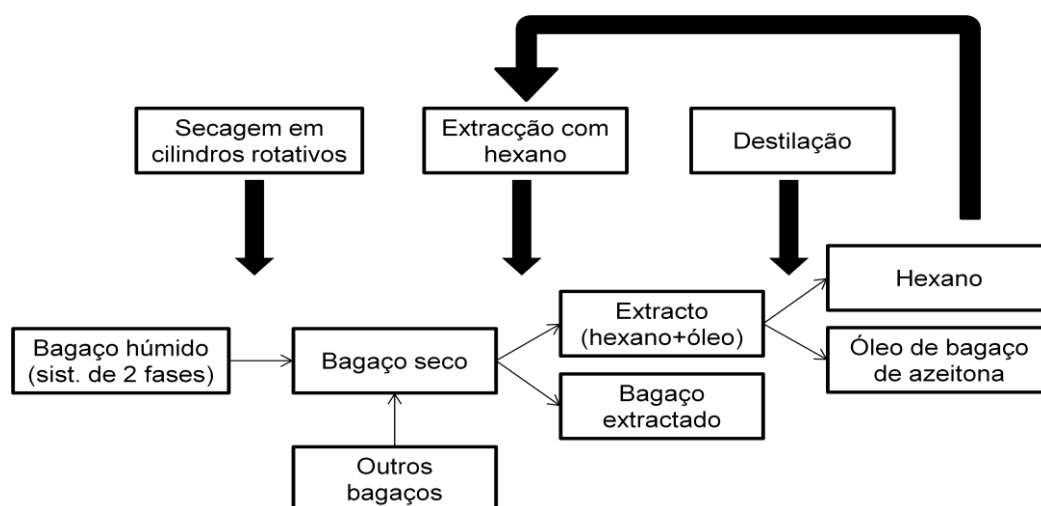


Figura 1.7 - Esquema representativo da extracção do óleo de bagaço de azeitona e obtenção do bagaço extractado.

A valorização actual do bagaço de azeitona extractado passa pela sua utilização como fonte energética na própria fábrica e para venda como matéria-prima energética de baixo valor.

Neste sentido, têm sido propostas diversas abordagens para a sua valorização:

- Aplicação directa em solos agrícolas, mediante compostagem ou queima (Kotronarou *et al.* 2003);
- Tratamento termoquímico – Combustão, Gaseificação, Pirólise (Masghouni *et al.* 2000)
- Biodegradação aeróbia e anaeróbia (Borja *et al.* 2006; Saier 2007)

- Fraccionamento tendo em conta a produção de biocombustíveis e produtos de valor acrescentado (secção 1.5.2) (Coimbra *et al.* 2010) e que será abordagem seguida neste trabalho.

1.3 Fraccionamento de materiais lenhocelulósicos

No âmbito de uma biorrefinaria, um pré-requisito para a conversão biológica de biomassa lenhocelulósica em produtos de valor acrescentado, passa por tratar e hidrolisar esta de modo a produzir monossacáridos acessíveis aos microrganismos, uma vez que a estrutura polimérica dos materiais lenhocelulósicos impede a utilização directa dos seus componentes pela maioria destes (Peters 2007).

Para isso, a biomassa tem de ser pré-tratada, seja fisicamente, quimicamente, e/ou biologicamente. A principal limitação dos métodos de fraccionamento existentes reside na dificuldade de separação de um tipo de componente sem que ocorra alguma degradação na estrutura química dos restantes, pelo que a selecção criteriosa das condições operacionais é fundamental.

As diferentes propriedades físicas e químicas da celulose, hemicelulose e lenhina reduzem os métodos disponíveis para a obtenção de uma separação selectiva destes polímeros, a um número reduzido de processos.

1.3.1 Processos de Hidrólise

Os processos de hidrólise podem abranger métodos ácidos (como a hidrólise com ácido diluído e ácido concentrado), métodos hidrotémicos (autohidrólise e explosão com vapor), métodos alcalinos, assim como métodos enzimáticos, os quais muitas vezes são combinados com hidrólises químicas (Peters 2007).

As principais opções para o processo selectivo de fraccionamento de hemiceluloses da biomassa incluem o uso de ácidos, água (no estado líquido ou vapor), solventes orgânicos e agentes alcalinos. As duas últimas opções não só são selectivas para a hemicelulose como também removem a lenhina, o que pode dificultar o processo de valorização, por exemplo, fermentação ou bioconversão, pois os compostos derivados da lenhina geralmente são inibidores do crescimento microbiano. Assim, pré-tratamentos com ácido/água/vapor são as tecnologias de aplicação mais permitindo rendendo uma solubilização selectiva de hemiceluloses e a obtenção de licores ricos em açúcares e sólidos enriquecidos em celulose que podem ser utilizados noutros processos (Gírio *et al.* 2010). No entanto, também a celulose pode ser solubilizada neste tipo de tratamentos pelo que se o objectivo for solubilizar apenas hemiceluloses, deve-se ter em conta que estas podem solubilizar em condições mais suaves, para não afectar significativamente a celulose. Dependendo das

condições operacionais, também são formados produtos de degradação a partir de açúcares (derivados de furanos e ácidos fracos) e a partir de lenhina (compostos fenólicos) (Gírio *et al.* 2010).

1.3.1.1 Hidrólise ácida

Os processos catalisados por ácidos podem ser divididos em processos que utilizam ácidos concentrados, com recurso a temperaturas moderadas, e processos que utilizam ácidos diluídos, a temperaturas elevadas. Nestes processos, o catalisador mais utilizado é o ácido sulfúrico (H_2SO_4), embora outros ácidos inorgânicos, como o ácido clorídrico (HCl), nítrico (HNO_3) e trifluoroacético (TFA), também possam ser utilizados. Em processos com ácido diluído também já se encontra descrito a utilização de ácido fosfórico (H_3PO_4) e ácidos orgânicos fracos (Carvalho *et al.* 2008;Gírio *et al.* 2010).

O mecanismo de hidrólise ácida envolve três passos principais: no primeiro dá-se a protonação do oxigénio da ligação glicosídica seguidamente ocorre a ruptura da ligação glicosídica com formação de um carbocatião e no fim dá-se a regeneração do ião H_3O^+ , por reacção do carbocatião com uma molécula de água, formando uma molécula final estável (Figura 1.8).

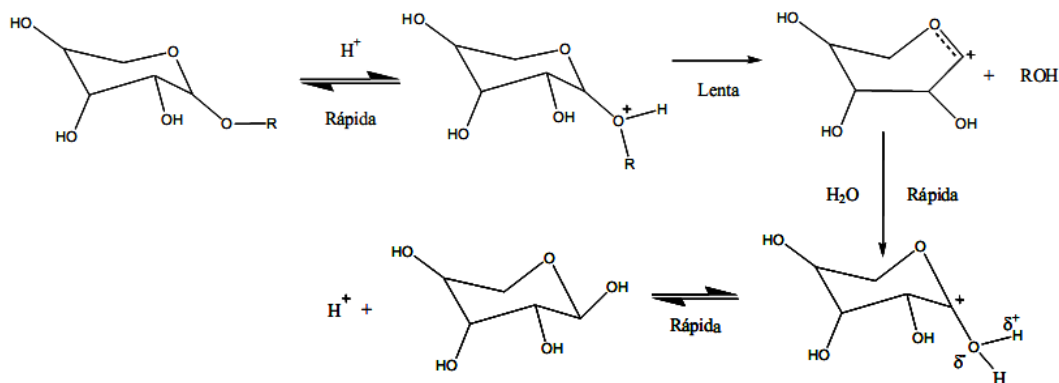


Figura 1.8 - Mecanismo proposto para a cisão das ligações glicosídicas na despolimerização das hemiceluloses em meio ácido (Adaptado de (Belkacemi *et al.* 1991).

No caso da celulose, a formação do carbocatião está dificultada pelas ligações intramoleculares das cadeias de celulose (as que conferem cristalinidade à estrutura polimérica). Este facto conduz a que a hidrólise das zonas amorfas da celulose ocorra muito mais depressa do que nas zonas cristalinas (Goldstein 1983;Wright 1988). Uma vez que as hemiceluloses não possuem uma estrutura cristalina, é de esperar que sejam solubilizadas muito mais facilmente do que a celulose. Assim, devido a estas diferenças de características entre a celulose, a hemicelulose e lenhina, é possível seleccionar as condições de operação de forma que a hidrólise seja mais selectiva. Deste modo, podem hidrolisar-se os materiais lenhocelulósicos com ácido diluído a temperaturas elevadas que solubilizam quase a totalidade das hemiceluloses ou utilizar-se ácido concentrado a temperaturas moderadas e

provocar a hidrólise total da celulose e das hemiceluloses, permanecendo a lenhina como resíduo insolúvel (Sun *et al.* 2002). As condições de operação vão depender assim dos objectivos que se pretendam.

Factor de severidade

A composição química dos hidrolisados hemicelulósicos obtidos através de uma hidrólise com ácido varia de acordo com uma série de factores tais como natureza da matéria-prima, concentração de ácido, temperatura utilizada no processo de hidrólise e tempo de reacção. Com base na necessidade de encontrar expressões que englobassem as diferentes variáveis operacionais de forma a permitir a comparação de experiências realizadas em diferentes condições Overend e Chornet (Overend *et al.* 1987), propuseram o factor de severidade (R_0), desenvolvido com base no conceito de índice de severidade utilizado na indústria do petróleo e que se traduz pela seguinte expressão:

$$R_0 = \int_0^t \exp \left(\frac{T - 100}{14,75} \right) dt \quad (\text{Eq. 1.1})$$

Onde T representa a temperatura da reacção (°C), t o tempo de residência (min) e 14,75 um parâmetro empírico relacionado com a energia de activação.

De modo a considerar o efeito da concentração de catalisador, (Chum *et al.* 1990) propuseram o factor de severidade combinado (CS) que se relaciona com a Eq.1.1 pela seguinte expressão:

$$CS = \log R_0 - pH \quad (\text{Eq. 1.2})$$

Hidrólise com ácidos diluídos

A hidrólise com ácido diluído é, em geral, a principal escolha para a hidrólise selectiva das hemiceluloses a monossacáridos, uma vez que é um método rápido e eficaz (Carvalho *et al.* 2004a; Sun *et al.* 2002). Como se pode observar pelos dados do Quadro 1.2, consoante o tipo de ácido e o tipo de material lenhocelulósico, as condições podem variar bastante (0,7 – 8,0%) (120 – 240 °C) Tipicamente, as concentrações de ácido sulfúrico usadas na hidrólise de hemiceluloses variam entre 0,5 – 1,5% e as temperaturas entre 121 – 160 °C (Sun *et al.* 2002). Dependendo do substrato utilizado e das condições operacionais, podem ser recuperados até 95% dos açúcares das hemiceluloses (Carvalho *et al.* 2004a). Contudo, é necessário um cuidado especial na optimização das condições operacionais usadas, de modo a aumentar a recuperação de monossacáridos e minimizar a formação de produtos de degradação (Carvalho *et al.* 2004a). Se são aplicadas temperaturas elevadas ou tempos longos, os monossacáridos formados continuarão a ser convertidos em produtos de degradação (Nag 2008), que para além de reduzirem os rendimentos em açúcares são potencialmente inibidores do metabolismo microbiano (Carvalho *et al.* 2004a).

Quadro 1.2 - Condições operacionais utilizadas na hidrólise com ácido diluído de diferentes materiais lenhocelulósicos.

Material	Ácido	Concentração de ácido (%)	Temperatura (°C)	Duração (min)	Referências
Resíduos agro industriais					
Palha de milho	H ₂ SO ₄	0,98	140	60	(Lloyd <i>et al.</i> 2005)
Palha de trigo	H ₂ SO ₄	1,9	140	30	(Vásquez <i>et al.</i> 2007)
Sorgo	H ₃ PO ₄	6	134	300	(Vásquez <i>et al.</i> 2007)
Resíduos de algodão	H ₂ SO ₄	6	140	15	(Akpinar <i>et al.</i> 2011)
Caroços de azeitona	H ₂ SO ₄	0,5- 2,4	220-240	< 2	(Montané <i>et al.</i> 2002)
Madeiras Folhosas					
Carvalho	H ₂ SO ₄	2,5	190	30	(Wilson <i>et al.</i> 1989)
Eucalipto	H ₂ SO ₄	3	100-130	60	(Parajó <i>et al.</i> 1997)
Faia	HCl	2,5	165-240	20-40	(Prior <i>et al.</i> 1989)
Madeiras Resinosas					
Abeto	H ₂ SO ₄	2,4	200	30	(Palmqvist <i>et al.</i> 1998)

Os inibidores podem ser classificados de acordo com a sua estrutura química. Entre eles incluem-se ácidos fracos/alifáticos, furanos e compostos fenólicos.

Os furanos incluem furfural, resultante da desidratação de pentoses e HMF, resultante da desidratação de hexoses (Lenihan *et al.* 2010) (Figura 1.10).

Por sua vez, os ácidos alifáticos (ácido acético, fórmico e levulínico) podem resultar de reacções de degradação de furanos ou da hidrólise da própria hemicelulose. O ácido acético resulta da hidrólise dos grupos acetilo das hemiceluloses (Sun *et al.* 2002). O ácido fórmico e levulínico são, geralmente, produtos resultantes da degradação do hidroximetilfurfural (HMF), sendo que o ácido fórmico também pode ser formado a partir dos grupos metoxilo, das hemiceluloses ou da degradação do furfural (Palmqvist 1998; Taherzadeh *et al.* 2004). Nos hidrolisados também são libertados vários outros compostos inibidores, como extractivos (terpenóides, compostos fenólicos, ceras, etc.) (Howard *et al.* 2003; Pereira *et al.* 2003).

Os compostos fenólicos resultam da solubilização da lenhina e incluem ácidos, álcoois e aldeídos aromáticos e cetonas de Hibbert, sendo os mais tóxicos os de baixo peso molecular.

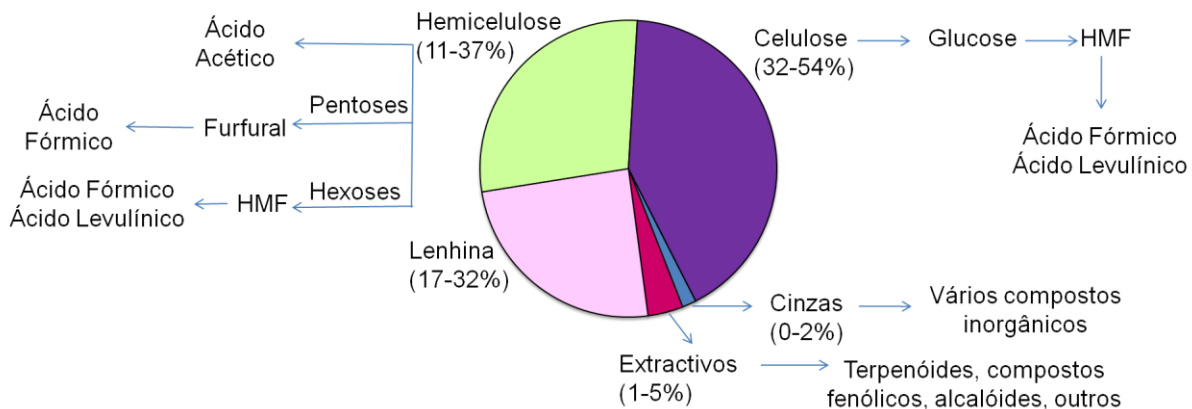


Figura 1.9 - A composição dos materiais lenhocelulósicos e potenciais produtos resultantes da sua hidrólise com ácido diluído (Adaptado de (Tahezadeh *et al.* 2004).

Este processo apresenta, em relação à hidrólise com ácidos concentrados, a vantagem de levar a um menor consumo de ácido, menores problemas de corrosão e de exigir menos energia na recuperação de ácido (Sun *et al.* 2002). Sob condições controladas, os níveis de produtos indesejáveis gerados podem ser baixos (Tahezadeh *et al.* 2004).

Hidrólise com ácidos concentrados

A hidrólise com ácido concentrado permite a hidrólise de hemiceluloses e celulose, pelo que os processos com ácidos concentrados são geralmente referidos por produzirem maior quantidade de açúcares, em comparação com processos com ácido diluído (Nag 2008). Os ácidos concentrados podem atacar as pontes de hidrogénio existentes entre as cadeias de celulose, destruindo a sua cristalinidade. Este tipo de processo ocorre geralmente a temperaturas moderadas, 20-50 °C (Goldstein 1983; Wright 1988) e em tempos relativamente curtos, 20-60 min (Gírio *et al.* 2010). A solubilização dos polissacáridos é possível utilizando concentrações variadas, por exemplo, 72% de H₂SO₄, 41% de HCl ou 100% de TFA (Gírio *et al.* 2010).

Embora este seja um método eficaz para a hidrólise da celulose e tenha a vantagem de operar a temperaturas baixas levando à redução de custos operacionais (Nag 2008), os ácidos concentrados são tóxicos, corrosivos e perigosos, e como tal, requerem reactores altamente resistentes à corrosão. O potencial comercial para este processo devido a custos de investimento e manutenção torna-se muito reduzido. Além disso, o ácido concentrado deve ser recuperado após hidrólise para tornar o processo economicamente viável (Gírio *et al.* 2010; Nag 2008). Possui ainda a vantagem de a formação de produtos de degradação ser baixa, contudo a sua taxa de formação pode ser severamente afectada por pequenas mudanças na temperatura (Hörmeyer *et al.* 1988).

1.3.1.2 Métodos hidrotérmicos

Os processos hidrotérmicos incluem principalmente a utilização de água a temperaturas elevadas (autohidrólise) e tratamentos de explosão com vapor. Normalmente, a autohidrólise é realizada a temperaturas ligeiramente mais baixas, mas por períodos mais longos que a explosão com vapor, (Hörmeyer *et al.* 1988). O objectivo de ambos os processos é a hidrólise selectiva e solubilização das hemiceluloses, deixando também a celulose mais acessível para uma posterior hidrólise (Hörmeyer *et al.* 1988). Nestes processos não é adicionado nenhum catalisador tornando-os económica e ambientalmente atractivos.

Autohidrólise

O processo de autohidrólise baseia-se no uso de água a temperaturas elevadas (pressão acima do ponto de saturação). A temperatura de operação usualmente encontra-se entre 150 °C e 230 °C e o tempo de reacção pode variar desde vários segundos a horas, dependendo da temperatura (Banerjee *et al.* 2010;Gírio *et al.* 2010).

Os catalisadores na autohidrólise são iões de hidrogénio gerados *in situ* pela auto-ionização da água e, posteriormente, do ácido acético resultante dos grupos acetilo das hemiceluloses (Banerjee *et al.* 2010).

A recuperação das hemiceluloses pode ser relativamente elevada na ordem de 55-84%. A celulose e lenhina não são significativamente afectadas, produzindo uma fase sólida rica nestes polímeros e uma fracção líquida em que a concentração de potenciais inibidores de fermentação é relativamente baixa (Sun *et al.* 2002).

Devido ao pH moderado, os problemas de corrosão são reduzidos, e as etapas da reciclagem de ácido e remoção de precipitados não são mais necessárias. Isto reduz os custos operacionais e trás consequências benéficas para o ambiente em comparação com outras tecnologias hidrolíticas. A principal desvantagem deste processo é que as hemiceluloses solubilizadas aparecem principalmente na forma oligomérica (Sun *et al.* 2002).

Explosão com vapor

A explosão com vapor é normalmente realizada a temperaturas da ordem 160 - 260 °C (correspondente a uma pressão de 0,69 - 4,83 MPa) durante vários segundos a alguns min antes de o material ser exposto à pressão atmosférica, o que faz com que este seja submetido a uma descompressão explosiva (Sun *et al.* 2002). As hemiceluloses são parcialmente hidrolisadas em oligómeros solúveis ou em açúcares simples. Acredita-se que esta solubilização, juntamente com o fraccionamento da lenhina, seja responsável por uma maior acessibilidade da celulose para hidrólise enzimática (Sun *et al.* 2002;Vessia 2005).

Tal como acontece com a autohidrólise, a etapa da reciclagem de ácido não é necessária, o que reduz os custos operacionais e trazem consequências benéficas para o ambiente (Sun *et al.* 2002;Vessia 2005).

As desvantagens de explosão com vapor são a elevada exigência de energia e o facto de se obter por vezes uma elevada degradação dos açúcares e formação de compostos inibidores (Sun *et al.* 2002;Vessia 2005).

1.3.1.3 Métodos alcalinos

Na bibliografia este método é habitualmente referido como pré-tratamento para aumentar a susceptibilidade do material a uma posterior hidrólise enzimática (Bjerre *et al.* 1996;Targonski 1985;Uçar 1990). Ao contrário do ácido ou dos processos hidrotérmicos, os pré-tratamentos alcalinos são muito eficazes na solubilização de lenhina (Gírio *et al.* 2010).

Apesar de realizados a temperaturas moderadas, estes tratamentos são morosos e utilizam a soluções concentradas (Carvalho *et al.* 2008). A desvantagem deste tipo de sistema alcalino está parcialmente associada à dificuldade de recuperação das bases, de modo a garantir viabilidade económica do processo (Gírio *et al.* 2010).

1.3.1.4 Hidrólise enzimática

Os pré-tratamentos eficazes no processamento de materiais lenhocelulósicos, dão origem a soluções ricas em hemiceluloses solubilizadas na forma oligomérica ou monomérica. No caso de se encontrarem na forma oligomérica é necessária a sua conversão a monossacáridos de modo a possibilitar a sua utilização pelos microrganismos (Palmqvist *et al.* 2000). Uma das possibilidades consta do uso de enzimas. A maioria dos estudos sobre hemicelulases tem-se centrado até agora sobre as enzimas que hidrolisam xilano (Gírio *et al.* 2010).

Uma das vantagens deste processo reside na utilização de temperaturas moderadas, em meios não corrosivos, estando implicitamente ligadas às vantagens económicas em termos de equipamento e energia. No entanto, apresenta as desvantagens de produtos formados poderem inibir as enzimas, causando decréscimo da eficiência da hidrólise (Palmqvist *et al.* 2000), também o custo da enzima bem como a sua recuperação no final do processo acarretam custos (Parisi 1989). Possui ainda a desvantagem de se tratar de um processo mais moroso do que, por exemplo, a hidrólise ácida e necessitar de um pré-tratamento prévio (Howard *et al.* 2003).

No âmbito da valorização dos materiais lenhocelulósicos, a hidrólise enzimática é o método mais utilizado para a hidrólise da celulose depois de um pré-tratamento, em geral, hidrotérmico ou com ácido diluído, para hidrolisar as hemiceluloses.

1.4 Métodos de destoxificação

Quando comparadas as fermentações de açúcares comerciais puros ou hidrolisados destoxificados com a fermentação de hidrolisados não destoxificados os últimos são, em geral, caracterizadas por cinéticas lentas, com rendimentos e produtividades limitados (Howard *et al.* 2003). Isto deve-se à presença de uma variedade de compostos que actuam como fortes inibidores do metabolismo microbiano. Com o objectivo de reduzir a concentração destes em hidrolisados lenhocelulósicos têm sido propostas uma variedade de técnicas físicas, químicas e biológicas para os transformar. No entanto, a eficácia de qualquer método de destoxificação depende fundamentalmente da composição do hidrolisado (Aziz 2007; Mussatto *et al.* 2004a) e da espécie de microrganismo utilizada, porque cada tipo de hidrolisado tem um grau de toxicidade diferente e cada espécie de microrganismo tem um diferente grau de tolerância aos inibidores (Mussatto *et al.* 2004a).

Os métodos de destoxificação físicos são baseados no princípio de que os inibidores podem ser removidos por separações de fase de equilíbrio, tais como a evaporação, resinas de troca iónica, carvão activado, destilação e extracção com solventes. Destoxificações químicas, tais como ajuste do pH, o sobrecalagem, tratamento com sulfito e exclusão molecular, são baseadas em modificações químicas dos inibidores num produto menos tóxico ou não tóxico, podendo resultar em precipitados (Sun *et al.* 2010).

1.4.1 Métodos de destoxificação físicos-químico

Carvão activado

A aplicação de carvão activado é um processo bastante atractivo por apresentar um baixo custo e elevada capacidade de absorção de pigmentos, ácidos gordos livres e outros produtos de oxidação (Mussatto *et al.* 2004a; Prakassham *et al.* 2009). Este tratamento permite a remoção de ácido acético, compostos fenólicos, HMF e furfural (Carvalho *et al.* 2005; Tran *et al.* 1986). No entanto, convém referir, este é um método que pode conduzir à perda de açúcares (Carvalho *et al.* 2004b).

A eficácia do tratamento de activação do carvão depende de variáveis como, o pH, temperatura, tempo de contacto e razão líquido/sólido (hidrolisado:carvão). Os ácidos orgânicos fracos (ácidos fenólicos ou ácidos carboxílicos) são mais facilmente adsorvidos na forma não-ionizada e, conseqüentemente, um pH baixo favorece a sua adsorção. Por outro lado, as bases orgânicas fracas (tais como aminas) são mais facilmente adsorvidas na forma não-ionizado e, portanto, a adsorção é favorecida pelo pH elevado (Mussatto *et al.* 2004a).

O aumento do tempo de contacto é referido por influenciar o processo de clarificação. O tempo de contacto adequado entre o carvão e o hidrolisado é essencial para permitir o estabelecimento do equilíbrio. Durante o processo de adsorção, a superfície do carvão é progressivamente bloqueada pelo composto que é adsorvido, tornando-se completamente coberta ao fim de algum tempo. Como cada partícula de carvão purifica um certo volume de líquido, aumentando as doses de carvão (ou a relação de carvão:hidrolisado), mais rapidamente se promove o equilíbrio entre composto que é adsorvido e o adsorvente, porque o número de partículas de carvão para tratar o mesmo volume líquido aumenta (Mussatto *et al.* 2004a). A adsorção aumenta também com a temperatura devido à rápida taxa de difusão de adsorção de moléculas da solução pela superfície do carvão (Mussatto *et al.* 2004a;Prakassham *et al.* 2009).

Evaporação

A evaporação sob vácuo é considerada o melhor método físico de destoxificação que ajuda na redução de compostos tóxicos voláteis como é o caso do ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural. Todavia este processo aumenta a concentração de compostos tóxicos não-voláteis e reduz o volume de hidrolisado (Prakassham *et al.* 2009). Este método tem ainda a vantagem de permitir aumentar a concentração de açúcares no hidrolisado (Prakassham *et al.* 2009).

A evolução comparativa de diferentes métodos de destoxificação mostra que, comparativamente às resinas de troca catiónica, as resinas de troca aniónica removem elevadas percentagens de compostos como o ácido acético, fenólicos, furfural, HMF além da remoção substancial de aldeídos e ácidos alifáticos dos hidrolisados (Carvalho *et al.* 2004b;Prakassham *et al.* 2009).

Extracção com solventes orgânicos

A extracção com solventes orgânicos, tais como benzeno, acetato de etilo, éter dietílico, clorofórmio e hexano, é outro método eficiente e muito usado para a remoção de inibidores (Wilson *et al.* 1989).

1.4.2 Métodos de destoxificação químicos

Os métodos químicos incluem a precipitação de compostos tóxicos e ionização de alguns dos inibidores para certos valores de pH, sendo esta última capaz de mudar o grau de toxicidade dos compostos (Mussatto *et al.* 2004a).

O ajuste de pH é considerado o método de destoxificação químico mais simples, e consiste em aumentar o pH ácido do hidrolisado, utilizando, por exemplo, Ca(OH)_2 , CaO , NaOH , KOH até valores próximos da neutralidade e adequados à actividade microbiana. Nestas

condições ocorre também precipitação de compostos fenólicos, metais pesados, furfural, acetato e terpenos (Frazer *et al.* 1989; Lee *et al.* 1983), e o precipitado é posteriormente removido.

O método designado por sobrecolagem consiste na adição ao hidrolisado de uma base com o objectivo de aumentar o pH do mesmo até 10-10,5, uma vez que a estes valores de pH, os ácidos fracos, tais como acético e maior parte dos compostos fenólicos, dissociam-se, permitindo a sua remoção parcial (Palmqvist *et al.* 1998). O pH do hidrolisado é posteriormente acertado até valores adequados para o crescimento microbiano, sendo o novo precipitado removido através de uma separação sólido-líquido.

Um outro método possível consiste no tratamento com sulfito em que os hidrolisados são neutralizados, geralmente com Na₂SO₄, permitindo a remoção de furfural e HMF (Larsson 1999).

1.4.3 Métodos de destoxificação biológicos

Os métodos biológicos englobam os tratamentos com enzimas ou microrganismos, como por exemplo, as enzimas peroxidase e lacase, obtidos a partir de fungos e que permitem sobretudo a remoção de compostos fenólicos de baixo peso molecular (Palmqvist *et al.* 2000; Prakassham *et al.* 2009) por polimerização oxidativa destes (Mussatto *et al.* 2004a).

Resumindo, entre os métodos referidos, destacam-se dois por apresentar baixo custo e bons resultados: o ajuste do pH para induzir a precipitação e/ou instabilidade dos compostos tóxicos e a adsorção destes compostos por carvão activado. As combinações desses tratamentos têm sido amplamente utilizadas para a destoxificação de hidrolisados lenhocelulósicos (Mussatto *et al.* 2004b).

Cada método é específico para determinado tipo de compostos. A escolha dos métodos de destoxificação (mais do que um) e a sua ordem de aplicação é importante para aumentar a eficiência (Prakassham *et al.* 2009).

1.5 Xilitol

A bioconversão dos hidrolisados hemicelulósicos para obtenção de produtos de valor acrescentado constitui uma alternativa para a utilização das pentoses. Nestes hidrolisados, a xilose é, em geral, o monossacárido presente em maiores quantidades. Uma das possibilidades mais atractivas para a sua valorização consiste na sua utilização para produção de polióis, nomeadamente xilitol e arabitól. Destes, o xilitol é o que apresenta maior interesse e valor comercial.

O xilitol é um intermediário do metabolismo de hidratos de carbono em mamíferos. Um homem adulto chega a produzir 5 a 15 g deste poliól por dia (Mussatto *et al.* 2002). O xilitol

é um poliol que pode ser encontrado na natureza em muitas frutas e vegetais tais como alface, couve-flor, ameixas, framboesas, morangos, uvas, bananas, assim como em leveduras, líquenes e cogumelos porém, em quantidades inferiores a 0,9 g/100g (Mussatto *et al.* 2002;Tamanini *et al.* 2004a;Tamanini *et al.* 2004b).

Este poliol tem um valor calórico de 2,4 kcal/g e apresenta características relevantes que permitem o seu uso no fabrico de alimentos, em produtos farmacêuticos e em cosméticos (Mussatto *et al.* 2002).

1.5.1 Propriedades e aplicações

A fórmula química do xilitol é $C_5H_{12}O_5$ e sua massa molecular $152,15 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Trata-se de um pó branco, cristalino, sem odor, altamente solúvel em água e apresenta ponto de fusão entre 93,4 a 94,7 °C (Aguiar *et al.* 1999) (Quadro 1.3).

Quadro 1.3 - Propriedades físicas e químicas do xilitol (adaptado de (Hyvönen *et al.* 1982)

Fórmula química	$C_5H_{10}O_5$
Massa molecular ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)	152,15
Aparência	Pó branco cristalino
Sabor	Doce
Odor	Nenhum
Poder adoçante	Equivalente à sacarose
Viscosidade (solução aquosa a 10%)	1,23 cp
Ponto de ebulição (°C) a 1 atm	126,0
pH em solução aquosa ($0,1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	5 a 7
Densidade	1,52
Calor de dissolução ($\text{kcal}\cdot\text{g}^{-1}$)	-34,80
Solubilidade ($\text{g}\cdot 100 \text{ mL}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$ a 20 °C)	168,0
Temperatura de fusão (°C)	93,0-94,5
Energia ($\text{kcal}\cdot\text{g}^{-1}$)	2,4

O poder edulcorante é de 0,8 a 1,1 vezes o da sacarose e é 2,4 vezes mais doce do que o manitol e 2 vezes mais que o sorbitol. O poder adoçante pode variar com o pH, concentração de sais e temperatura. Apresenta ainda uma agradável sensação refrescante devido ao valor negativo do calor específico de dissolução (-34,8 cal/g) (Aguiar *et al.* 1999). Devido às suas propriedades é utilizado na substituição do açúcar presente em produtos açucarados, uma vez que o xilitol não sofre reacção de Maillard durante o processamento (Aguiar *et al.* 1999). Pode ser empregue isoladamente ou em associação com outros

adoçantes em produtos de panificação, geleias, marmeladas, gelatinas, sobremesas, pastilhas elásticas, refrigerantes e gelados (Winkelhausen *et al.* 1998).

Outra propriedade importante do xilitol é o facto de não ser fermentado pela maioria dos microrganismos da cavidade bucal humana exercendo efeito anticariogénico e inibindo a desmineralização do esmalte dos dentes (Birkhed 1994;Tamanini *et al.* 2004b). Também o facto de ser lentamente absorvido no trato gastrointestinal dos mamíferos e do seu metabolismo ser independente da insulina possibilita sua utilização como adoçante para diabéticos (Winkelhausen *et al.* 1998). Sendo estes dois motivos pelo quais pode ser utilizado em produtos farmacêuticos e de higiene oral (Winkelhausen *et al.* 1998).

Também pode ser utilizado na prevenção ou tratamento de doenças como diabetes (como já foi referido), obesidade, insuficiência da enzima glucose-6-fosfato-desidrogenase, otites, osteoporose e fibrose quística (Tamanini *et al.* 2004b), desordem no metabolismo de lipídios, lesões renais e infecções pulmonares (Mussatto *et al.* 2002).

1.5.2 Processos de produção de xilitol

A obtenção de xilitol pode ser realizada de 3 formas: por extracção líquido-sólido, redução química da xilose e conversão biotecnológica de soluções contendo xilose (Mussatto *et al.* 2002). Por meio de extracção líquido-sólido, o xilitol presente em frutas e vegetais pode ser recuperado, mas como surge em baixas quantidades, menos que 0,900 g/100 g, este processo torna-se economicamente inviável (Mussatto *et al.* 2002;Roberto *et al.* 1995;Tamanini *et al.* 2004b). Já tanto o processo químico quanto o biotecnológico se iniciam com soluções de xilose provenientes da hidrólise de materiais lenhocelulósicos ricos em xilanos (Cruz *et al.* 2000;Tamanini *et al.* 2004b)(Figura 1.11).

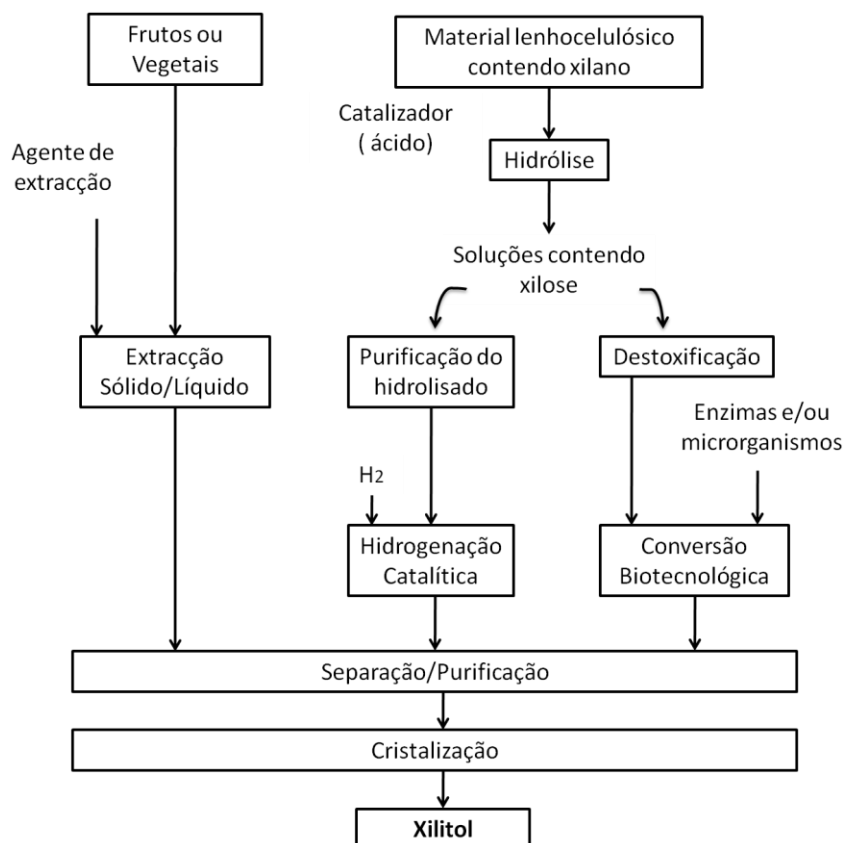


Figura 1.10 - Processos possíveis para a obtenção de xilitol (Adaptado de (Parajó *et al.* 1998).

1.5.2.1 Síntese química

O processo químico é, actualmente, o processo quase exclusivamente utilizado para produção de xilitol em larga escala. Esse processo é realizado em várias etapas, e entre essas, a purificação da xilose presente no hidrolisado é considerada a mais crítica, pois, além de requerer uma elevada eficiência (para que não ocorram problemas posteriores na produção), é a etapa mais dispendiosa de todo o processo.

A produção de xilitol à escala comercial é realizada por um processo químico patenteado (Melaja *et al.* 1977). Este processo inclui quatro etapas básicas:

1. Obtenção da xilose por hidrólise ácida de material vegetal rico em xilano;
2. Purificação da xilose obtida;
3. Hidrogenação catalítica da xilose formando xilitol;
4. Cristalização do xilitol.

O rendimento do processo químico e a qualidade do xilitol dependem da pureza da solução inicial de xilose, já que a presença de impurezas interfere na reacção catalítica. São necessárias operações de purificação (como troca iónica, descoloração e fraccionamento

cromatográfico) para obtenção de uma solução de xilose de elevada pureza. Após a remoção do catalisador por filtração e troca iónica, a solução de xilitol é concentrada, fraccionada por cromatografia e cristalizada para obtenção do produto puro. As etapas de purificação aumentam o tempo do processo e encarecem o produto (Birkhed 1994; Lima *et al.* 2003; Tamanini *et al.* 2004b).

De uma forma geral, quando comparada, por exemplo, à produção de sorbitol ou à própria obtenção de sacarose, o processo químico de produção de xilitol apresenta um custo cerca de 10 vezes superior (Mussatto *et al.* 2002).

1.5.2.2 Produção biotecnológica

Este processo consiste na bioconversão de hidrolisados hemicelulósicos obtidos de resíduos agro-industriais e pode competir com o tradicional processo químico (Faveri *et al.* 2003).

O processo biotecnológico tem-se mostrado, por diversas razões, uma boa alternativa ao processo químico, pois, além de dispensar a purificação da xilose, pode utilizar enzimas ou microrganismos específicos que actuam somente na conversão de xilose em xilitol, o que leva a um maior rendimento em produto e, conseqüentemente facilita a sua separação (Breuer *et al.* 2006). Vale a pena destacar que, entre os microrganismos, as leveduras têm sido consideradas mais aptas que as bactérias e outros fungos para produzir este edulcorante.

Do metabolismo da xilose, em leveduras, para além do xilitol podem resultar uma variedade de produtos que contém carbono e que incluem, dióxido de carbono, etanol, ácido acético, entre outros, sendo os rendimentos em produto dependentes da regulação do fluxo de carbono através das vias metabólicas disponíveis (Winkelhausen *et al.* 1998).

1.6 Microrganismos produtores de xilitol

O xilitol pode ser excretado como o principal subproduto metabólico da produção de etanol (Prior *et al.* 1989) ou como produto principal da fermentação da D-xilose (Barbosa *et al.* 1988). A bioconversão de xilose a xilitol pode ser realizada com fungos, bactérias, leveduras ou enzimas purificadas destes microrganismos (Domínguez *et al.* 1999).

Os produtores de xilitol mais estudados são as leveduras, das quais as estirpes do género *Candida* (*C. guilliermondii* (Barbosa *et al.* 1988; Roberto *et al.* 1991), *C. tropicalis* (Barbosa *et al.* 1988), *C. parapsilosis* (Furlan *et al.* 1991), *C. pelliculosa* (Kitpreechavanich *et al.* 1984), *C. boidinii* (Vandeska *et al.* 1995), *C. mogii* (Kitpreechavanich *et al.* 1984), *C. entomaea* (Saha *et al.* 1996), *C. peltata* (Saha *et al.* 1999), *C. magnoliae* (Horiuchi *et al.* 2008) e a espécie *Debaryomyces hansenii* (Amaral-Collaço *et al.* 1989; Parajó *et al.* 1995) são os

melhores produtores naturais. Este último género tem sido referido por produzir xilitol com bons rendimentos a partir de soluções sintéticas de açúcar ou hidrolisados, (Sampaio *et al.* 2004). Existem autores que referem a levedura *D. hansenii* UFV-170 como a ser melhor produtora de xilitol entre 270 leveduras diferentes (Sampaio *et al.* 2004).

O xilitol também consegue ser produzido por fungos, como *Petromyces albertensis* (Bicho *et al.* 1988) e por bactérias como *Enterobacter liquefaciens* (Lee *et al.* 1983), e *Corynebacterium sp.*

1.7 A levedura *Debaryomyces hansenii*

A levedura *D. hansenii* é uma levedura haplóide que se reproduz vegetativamente por gemulação multilateral. É uma levedura homotálica (Satyanarayana *et al.* 2009).

A levedura *D. hansenii* é uma levedura osmotolerante, halotolerante e xerotolerante (Breuer *et al.* 2006). Foi originalmente isolada de ambientes hiper-salinos como a água do mar e salmouras concentradas. É a levedura mais frequentemente encontrada em queijos tradicionais e salsichas, com uma reconhecida contribuição para o sabor destes produtos. Para além de que pode ser isolada de outras fontes como carne, vinho, cerveja, coalho, tabaco, salmão, fruta e solo, assim como de produtos de elevado açúcar. Isto mostra que a *D.hansenii* pode ser encontrada em vários habitats com baixa actividade da água. A presença desta espécie de levedura em tais ambientes é devida à sua elevada osmotolerância. Ela consegue tolerar níveis da salinidade acima dos 4 M de NaCl (Breuer *et al.* 2006).

Quando expostas a um meio de elevada osmolaridade, as leveduras respondem sintetizando solutos compatíveis, chamados de osmólitos, para contra-balançar a pressão osmótica externa (Satyanarayana *et al.* 2009). O glicerol é um desses solutos compatíveis que tem sido descrito por ser produzido na presença de elevadas concentrações de NaCl (Breuer *et al.* 2006).

A sua crio- e osmotolerância são altamente vantajosas do ponto de vista biotecnológico, pois permitem a produção polióis sob condições adversas reduzindo os custos de produção (Breuer *et al.* 2006).

Estudos feitos num passado recente mostram que *D. hansenii* tem um enorme potencial biotecnológico na indústria agro-alimentar (Breuer *et al.* 2006), nomeadamente, na produção de xilitol a partir de D-xilose ou hidrolisado lenhocelulósico. A levedura consegue usar pentoses e hexoses, quer individualmente, quer misturadas. A presença de hexoses, particularmente glucose, não inibe o consumo de pentoses como a xilose (Satyanarayana *et al.* 2009).

Foi proposto subdividir a espécie *D. hansenii* (Zopf) Lodder et Kreger van Rij em duas variedades: *D. hansenii* variedade *hansenii* e *D. hansenii* variedade *fabryi*. Segundo Nakase

e Suzuki (Hofrichter 2010), fisiologicamente, as duas variedades podem ser diferenciadas pela temperatura máxima de crescimento e pela diferença na mobilidade electroforética da enzima glucose-6-fosfato-desidrogenase (G6PDH). A temperatura máxima de crescimento para a variedade *hansenii* é 31-35 °C, enquanto para a variedade *fabryi* é 36-39 °C (Hofrichter 2010; Mussatto *et al.* 2002) o que pode ser interessante sob o ponto de vista tecnológico. Aparentemente, não há qualquer outro critério fenotípico que permita a sua distinção. Como se perceberá melhor no ponto 1.7.1, a enzima glucose-6-fosfato-desidrogenase é fundamental para o metabolismo da xilose, promovendo a produção de NADPH necessário para a redução da xilose a xilitol pela enzima xilitol-desidrogenase (XDH). No entanto, esta hipótese é contraditada por trabalhos realizados com estirpes da variedade *hansenii* (Mussatto *et al.* 2002), onde se observa um eficaz metabolismo da xilose.

1.7.1 Metabolismo da D-xilose em *Debaryomyces hansenii*

A obtenção de xilitol por via biotecnológica está associada à capacidade dos microrganismos em sintetizar a enzima xilose-redutase (XR). Esta enzima catalisa a redução de xilose a xilitol com a participação dos co-factores NADPH ou NADH. O xilitol, composto relativamente estável, ou é excretado da célula, ou é oxidado a xilulose pela enzima xilitol-desidrogenase (XDH), cuja actividade requer os co-factores NAD⁺ ou NADP (Mussatto *et al.* 2002; Tamanini *et al.* 2004b) (Figura 1.12).

Sendo a XR de *D. hansenii* classificada como exclusivamente dependente do NADPH, esta não fermenta D-xilose em anaerobiose (Aguar *et al.* 1999). A regeneração do NADPH ocorre na via das pentoses-fosfato e a regeneração do NAD⁺ ocorre somente na cadeia respiratória com o oxigénio como aceitador final de electrões. Porém, sob suprimento limitado de oxigénio, não ocorre a completa re-oxidação do cofactor, levando a um desequilíbrio redox. Uma baixa concentração de NAD⁺ diminui a taxa de oxidação do xilitol mas não afecta sua produção na mesma extensão, induzindo a sua excreção no meio de cultivo. Um alto grau de arejamento favorece o crescimento celular, prejudicando o acumular de xilitol (Aguar *et al.* 1999).

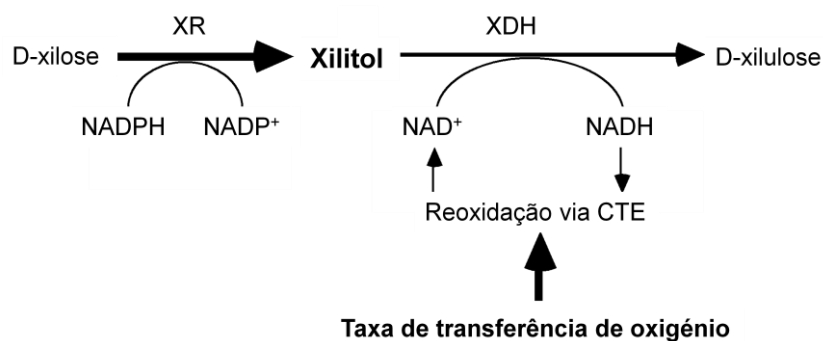


Figura 1.11 - Passos iniciais do metabolismo da D-xilose em *Debaryomyces hansenii* e mecanismo bioquímico da acumulação de xilitol. (Adaptado de (Lopes 2001). XR - xilose-redutase; XDH -xilitol-desidrogenase. CTE – Cadeia de transferência de electrões.

1.8 Factores que influenciam a produção biotecnológica de xilitol

A produção biotecnológica é fortemente influenciada por diversos factores, entre os quais a composição do meio de cultura, a concentração inicial de substrato e condições de arejamento/agitação, cuja optimização é fundamental para tornar o processo viável à escala industrial.

1.8.1 Composição do meio de cultura

O meio de cultura deve satisfazer as necessidades básicas dos microrganismos tais como carbono, oxigénio, azoto, fósforo, enxofre, entre outros, tendo influência profunda na acumulação de polióis em leveduras. Verifica-se que a concentração de D-xilose é um parâmetro crítico para a produção de xilitol, sendo esta favorecida na presença de elevadas concentrações desta pentose (Winkelhausen *et al.* 1998).

A adição de fontes de azoto (Lopes 2001;Tavares *et al.* 1999) e de outros nutrientes como os aminoácidos e vitaminas tem demonstrado potenciar a bioconversão de xilose em xilitol (Nobre 1994). Como exemplo de nutrientes complexos habitualmente utilizados para suplementar meios de cultura podem referir-se o extracto de levedura (Lopes 2001;Preziosi-Belloy *et al.* 2000;Sirisansaneeyakul *et al.* 1995), água de maceração do milho, também denominado de “corn steep liquor” (CSL) e a peptona (Lopes 2001).

Os estudos realizados em meio quimicamente definido contendo apenas hexoses ou pentoses demonstram que a acumulação de polióis por *D. hansenii* só ocorreu nos meios contendo pentoses (Gírio, et al., 2000). A presença de elevadas concentrações de hexoses, tais como a glucose ou manose, podem inibir o metabolismo da xilose por repressão e inactivação do sistema de transporte de xilose ou de enzimas catabólicas (Parajó e tal., 1998), mas em baixas concentrações podem levar a estimulação da produção de xilitol (Tavares et al., 2000).

Nos meios com base em hidrolisados, é importante considerar que, além de açúcares estes podem conter compostos tóxicos, tais como ácido acético, furfural, HMF e fenóis, os quais podem interferir no bioprocesso dependendo das concentrações em que se encontram no meio (Chaud 2010).

Em estudos realizados por (Sanchez *et al.* 1988), o furfural e o HMF provocaram retardamento no processo fermentativo no início da fermentação e inibiram o crescimento da levedura *Candida guilliermondii* (Delgenes *et al.* 1998) e (Palmqvist *et al.* 2000) verificaram que o crescimento de *Pichia stipitis* e *Saccharomyces cerevisiae* foi reduzido a 100% quando o meio de crescimento foi suplementado com HMF (1-1,5 g·L⁻¹). Foi também observado que o furfural inibiu o crescimento de vários microrganismos (25-99%), em concentrações de 0,5-2,0 g·L⁻¹ (Palmqvist *et al.* 2000;Prakassham *et al.* 2008).

O ácido acético, que pode ser encontrado nos hidrolisados hemicelulósicos, tem o seu efeito inibitório, fundamentalmente, relacionado com o pH (Palmqvist *et al.* 2000). Em meios mais ácidos, a formação não dissociada deste ácido está presente em maiores concentrações. Esta forma (não dissociada) é capaz de difundir-se através da membrana celular, atingindo o citoplasma e, ao encontrar no interior da célula valores mais elevados de pH, dissocia-se, diminuindo o pH intracelular a valores abaixo dos limites fisiológicos (Palmqvist *et al.* 2000).

A variedade de produtos de degradação de lenhina que inclui ácidos, aldeídos e álcoois aromáticos (tudo compostos fenólicos), também causam efeito inibitório no crescimento microbiano afectando a permeabilidade das membranas biológicas (Prakassham *et al.* 2009). Os compostos fenólicos têm sido descritos como um dos grupos mais tóxicos para os microrganismos, tendo grande importância na determinação da fermentescibilidade dos hidrolisados.

1.8.2 Concentração de xilose

A concentração de xilose é um parâmetro crítico para a produção de xilitol, tendo sido demonstrada a tendência para um aumento de produção de xilitol com o aumento da sua concentração inicial. De acordo com (Nigam *et al.* 1995), o aumento da concentração de xilose conduz a aumentos dos rendimentos e produtividades, desde que os microrganismos tolerem concentrações de açúcares e pressões osmóticas elevadas. O efeito favorável da concentração de xilose elevada, tem sido também associado a um aumento da actividade de enzima XR naquelas condições.

No entanto, a concentração de açúcares dos hidrolisados encontra-se muitas vezes aquém do desejado devido à elevada razão líquido/sólido que é possível utilizar nos processos de hidrólise, pelo que, antes de um processo de fermentação, o hidrolisado necessita em geral de ser concentrado (Cheng *et al.* 2010).

1.8.3 Disponibilidade de oxigénio

A disponibilidade de oxigénio é outro factor que exerce grande influência na produção de xilitol por fermentação, afectando a produção de ATP e a regeneração de coenzimas (Náhlík *et al.* 2003). Quando são utilizadas condições anaeróbias durante o processo, ocorre um desequilíbrio no potencial redox da célula, devido ao aumento na concentração de NADH, o que força a interrupção do metabolismo celular. Por outro lado, condições de elevado arejamento desviam o metabolismo microbiano para o crescimento celular, diminuindo a produção de xilitol (Winkelhausen *et al.* 1998). Desta forma, deve-se trabalhar sob condições de limitação de oxigénio (semi-aeróbias), nas quais se observa uma acumulação de xilitol, devido à limitada quantidade de cofactor oxidado necessário à actividade da xilitol desidrogenase (XDH). Por isso, para um processo eficaz, é extremamente importante determinar os níveis de oxigénio que proporcionem uma utilização balanceada do carbono quer para o crescimento como para a fermentação (Winkelhausen *et al.* 1998). No entanto, torna-se difícil definir as condições a que corresponde essa restrição de forma a assegurar o equilíbrio entre crescimento e produção de xilitol. Além disso, o controlo do oxigénio dissolvido é tecnicamente difícil de alcançar.

Considerando que a produção de xilitol por leveduras é também muito sensível à concentração do substrato, é recomendado que ambas as variáveis – arejamento e concentração do hidrolisado – sejam estudadas simultaneamente para a optimização do produção de xilitol (Santos *et al.* 2005).

Sendo a produção de polióis em leveduras condicionada por diversos factores, descritos ao longo da introdução, o presente trabalho debruçou-se sobre a optimização de um processo de hidrólise selectivo da fracção hemicelulósica de bagaço de azeitona extractado para a obtenção de um meio de cultura rico em pentoses, com baixas concentrações de inibidores sendo também avaliado o efeito da destoxificação no crescimento celular e na acumulação dos polióis pela levedura *D. hansenii*.

2. Materiais e métodos

2.1 Matéria-prima

O Bagaço de Azeitona Extractado (BAE) utilizado na realização deste trabalho foi gentilmente cedido pela União de Cooperativas Agrícolas Uclrl (UCASUL), Alvito, Beja.

O lote estudado foi recolhido no decurso da campanha 2010/2011, de entre o material processado pela UCASUL para obtenção do óleo de bagaço de azeitona (ver 1.2.2)

O lote recolhido foi mantido em sacos de cerca de 25 kg e armazenado à temperatura ambiente no laboratório.

2.2 Caracterização granulométrica

Com o objectivo de caracterizar a matéria-prima, de acordo com o tamanho de partículas e de obter uma amostra fisicamente mais homogénea, efectuou-se a separação de várias amostras de BAE de cerca de 100 g, durante 20 min, com recurso a um agitador de peneiros (Endecotts, Inglaterra, ECVS1) e a sete peneiros de diâmetro 20,3 cm (Retsch, Alemanha, ASTM E11), dispostos em série de acordo com o diâmetro do poro, tal como indicado no Quadro 2.1. Os ensaios foram analisados em triplicado.

Quadro 2.1 - Dimensões dos peneiros usados na caracterização granulométrica.

Peneiros	Diâmetro de poro (mm)	Diâmetro de 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

Realizada a caracterização granulométrica, apenas as fracções compreendidas entre 3,55 e 1 mm foram escolhidas para continuar este trabalho. Posto isto, foi fraccionado 12kg de BAE de modo a trabalhar com esta fracção escolhida ao logo do trabalho.

2.3 Optimização da hidrólise com ácido diluído

A optimização foi realizada em duas etapas:

- (1) Foram testadas as razões líquido/sólido (RLS) 2 e 4 ($g_{BAE}/g_{sol.ácido}$) com uma solução de ácido de 1,2% (p/p) e tempo de reacção (período isotérmico) de 150 min.
- (2) Testaram-se diferentes concentrações de H_2SO_4 e tempos de reacção de acordo com uma matriz experimental Doehlert (Quadro 2.2). A matriz de Doehlert foi utilizada para estabelecer os efeitos da concentração de H_2SO_4 (X_1) entre 0,5 e 3,5% (p/p) e tempo de reacção (X_2) entre 30 e 169 min, a 130 °C, numa RLS de $3 g \cdot g^{-1}$ (entre 81,2 e 84 g de BAE e entre 218,6 e 216 g de solução de ácido, consoante a humidade da matéria-prima). Dentro dos referidos intervalos, foram escolhidas 5 concentrações de H_2SO_4 e 3 tempos de operação, que permitiram a estimativa dos efeitos de curvatura para cada variável independente. A matriz resultou em 7 combinações (Quadro 2.2).

Para ambos as experiências, procedeu-se da seguinte modo:

A fracção compreendida entre 3,55 e 1 mm foi hidrolisada em autoclave (Uniclave, Portugal), em frascos Schott (Alemanha) de 500 ml, fechados com tampas Schott GL45 (temperatura máxima admissível 200 °C) a 130 °C.

Após a autoclave atingir 50 °C, foram colocados os frascos no seu interior e registada a evolução da temperatura entre os 100 e os 130 °C. Concluído o tempo de hidrólise pré-definido, desligou-se o aquecimento e abriu-se imediatamente o arejo da autoclave de modo a que a temperatura baixasse até aos 100 °C, registando-se o tempo de arrefecimento. Atingidos os 100 °C abriu-se a autoclave e retirou-se os frascos para um arrefecimento mais rápido. Após arrefecimento dos frascos, estes foram pesados de modo a avaliar a ocorrência de possíveis perdas. A fracção líquida (hidrolisado) obtida foi separada com o auxílio de uma bomba de vácuo (Saskia ILMVAC, Alemanha) através de papel de filtro Filter-Lab 1235 e mantida a 4 °C até posterior utilização. Esta foi caracterizada quanto ao pH, composição química e percentagem de sólidos (2.7.1).

Os resíduos sólidos foram lavados com água desmineralizada, secos a 50 °C numa estufa (J.P. – Selecta, Espanha) durante 3 dias e pesados após terem permanecido 2 dias à temperatura ambiente. Foi usada uma amostra representativa de cada hidrólise para a determinação da humidade (2.7.1). A quantidade restante foi moída num moinho de facas (Ika Werck MF10, Staufen, Alemanha) a partículas inferiores a 0,5 mm e armazenada à temperatura ambiente em frascos fechados até posterior caracterização química (2.6.1).

Todos os ensaios experimentais foram realizados em duplicado.

Planeamento experimental - Matriz de Doehlert

O modelo usado para expressar as respostas foi uma equação polinomial de segunda ordem:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \varepsilon \quad \text{Eq. 2.1}$$

Onde, Y é a variável resposta, X as variáveis independentes, sendo X_1 referente à concentração de H_2SO_4 e X_2 ao tempo de reacção. O β_0 é o coeficiente de regressão na origem; β_1 e β_2 são os coeficientes lineares das variáveis 1 e 2, respectivamente; β_{12} é o coeficiente de interacção de segunda ordem entre as variáveis 1 e 2; β_{11} e β_{22} são os coeficientes quadráticos para as variáveis 1 e 2; e ε são os erros aleatórios independentes.

A regressão linear múltipla da equação 2.1 e a análise de variância (ANOVA) foram realizadas recorrendo ao conjunto de ferramentas de regressão do Microsoft® Excel 2007, para todas as réplicas. As melhores condições de hidrólise foram determinadas com base em equações de melhor ajuste, usando as ferramentas “solver” do Microsoft® Excel 2007.

A representação codificada das variáveis foi usada para todos os fins de cálculo.

Quadro 2.2 - Matriz codificada para o planeamento experimental Doehlert para duas variáveis experimentais e a correspondente matriz experimental.

Ensaio	Variáveis			
	Codificada		Real	
	X_1	X_2	H_2SO_4 (%)	Tempo (min)
A1	0,000	0,000	2,00	100
A2	0,000	0,000	2,00	100
B1	1,000	0,000	3,50	100
B2	1,000	0,000	3,50	100
C1	-1,000	0,000	0,50	100
C2	-1,000	0,000	0,50	100
D1	0,500	0,866	2,75	169
D2	0,500	0,866	2,75	169
E1	-0,500	-0,866	1,25	30
E2	-0,500	-0,866	1,25	30
F1	0,500	-0,866	2,75	30
F2	0,500	-0,866	2,75	30
G1	-0,500	0,866	1,25	169
G2	-0,500	0,866	1,25	169

2.4 Produção de hidrolisados para os ensaios de bioconversão

A produção de hidrolisado para os ensaios de avaliação da produção de polióis foi realizada nas condições optimizadas (3,5% H_2SO_4 (p/p), 130 °C, 130 min de tratamento e RLS=3 g/g) e de acordo com o procedimento descrito em 2.3. Foram realizados vários ensaios de modo a obter o volume de hidrolisado necessário. No final de cada tratamento o conteúdo de cada frasco de hidrólise foi prensado (Sotel, Portugal), em vez de filtrado, e os diversos

hidrolisados foram misturados de modo a obter um lote uniforme e armazenados a 4 °C, até posterior utilização.

2.5 Estudos da destoxificação dos hidrolisados

2.5.1 Concentração dos hidrolisados

A evaporação foi realizada com o propósito de aumentar a concentração em xilose, bem como a remover alguns compostos inibidores voláteis, tais como o furfural e o ácido acético. Os hidrolisados foram concentrados (2 vezes, em massa) sob vácuo num rotavapor (Büchi R-210, Suíça), com a capacidade de evaporar um volume útil individual de 400 mL. A evaporação foi realizada com um banho a 70 °C, sob agitação e 150 mbar de pressão, controlada automaticamente por uma bomba (Büchi V-700, Suíça).

2.5.2 Destoxificação dos hidrolisados

2.5.2.1 Correção de pH

O pH dos hidrolisados foi acertado até 5,5 pela adição de um agente alcalino, tendo-se testado Ca(OH)_2 , CaCO_3 e NaOH , todos na forma sólida. A adição progressiva de pequenas quantidades do agente alcalino foi acompanhada por agitação magnética e leituras constantes de pH (Hanna instruments 8417, Itália). Após acerto de pH, o hidrolisado foi filtrado utilizando, sequencialmente, filtros de filtração rápida, média e lenta (Filter-Lab 1235, Rundfilter MN713 e Pall Corporation). No entanto, apenas se procedeu desta forma na realização dos testes iniciais em que trabalhou com volumes pequenos de hidrolisado. Para efeito de bioconversão, considerou-se estes hidrolisados como “não-destoxificados”.

2.5.2.2 Tratamento com carvão activado

A destoxificação com carvão activado (c.a.) envolveu as etapas de activação do carvão, destoxificação do hidrolisado e reciclagem do carvão.

Activação do carvão

Utilizou-se carvão activado em pó, (100 – 400 mesh, Sigma, Reino Unido) o qual foi previamente lavado com água e recolhido por filtração sob vácuo com papel de filtro Filter-Lab 1235.

Após secagem à temperatura ambiente durante 1 dia, procedeu-se à activação do primeiro carvão por dois métodos diferentes: com uma solução 5 M de NaOH e com uma solução 0,4M de HCl .

Na activação do carvão pelo primeiro método, procedeu-se à pesagem do carvão e medição do volume de solução de NaOH, respeitando a razão de 1:1 (p/p). Já na realização do segundo método, pesou-se o carvão e adicionou-se a solução de HCl respeitando a razão de 1:5 (p/v). Em ambos os casos, foram a agitar durante 1h, a 30 °C e a 150rpm. Os carvões activados com NaOH foram filtrados sob vácuo por (filtros Filter-Lab 1235) e secos numa estufa a 80 °C durante 12 h. Os equilibrados com ácido foram filtrados sob vácuo (filtros Filter-Lab 1235), lavados com água e secos à temperatura ambiente durante 48 h. De referir que existe a possibilidade de reciclar a solução de NaOH desde que o processo de regeneração (descrito abaixo) seja mais eficiente.

Destoxificação do hidrolisado

O carvão tratado com HCl foi misturado com o hidrolisado (pH previamente acertado a 2,5 através da adição de NaOH sólido), numa proporção de 10% (p/v), e colocado sob agitação magnética durante 1 h à temperatura ambiente.

No caso do carvão activado com NaOH, o pH do hidrolisado foi acertado para 5,5 através da adição na quantidade necessária para obter o pH pretendido, isto sob agitação magnética, e após o acerto, deixou-se a agitar durante 1 h à temperatura ambiente.

Em ambos os casos, os hidrolisados foram separados do carvão por filtração (filtros Filter-Lab 1235). No caso do hidrolisado destoxificado com HCl (filtros Rundfilter MN713 e Pall Corporation), o seu pH foi ainda acertado para 5,5 através da adição de NaOH sólido, já depois de ter sido separado do carvão e filtrado novamente.

Reciclagem/lavagem de carvão

O carvão recolhido após a filtração do hidrolisado foi recuperado para posterior regeneração. Para o carvão activado com base o processo consistiu em submeter o carvão usado a uma lavagem com água destilada numa proporção de 1:3 (p/p) a uma temperatura de 130 °C durante 105 min em autoclave, dentro de frascos Schott (Alemanha) de 1000 mL, com tampas Schott GL45 (temp. max. 200 °C). No final deste procedimento o carvão foi filtrado (filtros Filter-Lab 1235), lavado com água fria e colocado a secar à temperatura ambiente.

2.6 Microrganismo e condições de cultura

2.6.1 Microrganismo

Inicialmente foram utilizadas 6 estirpes da levedura *Debaryomyces hansenii* depositadas na Colecção de Culturas de Microrganismos Industriais do INETI (CCMI) com os números 941, 496, 493, 494, 495, e 470.

Após revitalização das estirpes liofilizadas, as culturas foi mantida em placas de Petri contendo meio “Yeast Malt glucose” (YM-glc) (Anexo I), incubadas a 30 °C durante 48 h numa incubadora vertical (Sanyo MIR 252, Japão) e posteriormente conservadas no frio a 4 °C durante, no máximo três semanas, sendo posteriormente repicadas.

2.6.2 Preparação do inóculo

A partir de colónias de *D. hansenii* incubadas em placas de Petri (meio YM-glc) com 48 h prepararam-se rampas com meio “Yeast Malt glucose” (YM-glc) (Anexo I) que foram incubadas a 30 °C durante 22 h numa incubadora (Sanyo MIR 252, Japão).

Ensaios de Seleção de estirpes de D. hansenii

Para cada uma das rampas, adicionou-se 10 mL de água estéril, agitou-se e passou-se o conteúdo para o respectivo duplicado, de onde retirou-se 4 mL para cada um dos balões de Erlenmeyer de 1000 mL sem anteparas, contendo 80 mL de MQD.

Ensaios de bioconversão com hidrolisados

Para a preparação do inóculo, recorreu-se a um “stock”, preparado de antemão (Anexo II), de cada uma das estirpes, conservado em tubos de 12 mL a -70 °C. As culturas foram descongeladas lentamente no frigorífico e só depois à temperatura ambiente.

Para os ensaios de avaliação do efeito da destoxificação e da suplementação (2.6.3.2) foi utilizado 1 mL para inocular cada um dos balões de Erlenmeyer de 1000 sem anteparas. Já para as fermentações planeadas segundo a Plackett-Burman, inoculou-se com 1 mL de inóculo da 941, para balões de 1000 mL com anteparas e de 500 mL sem anteparas.

2.6.3 Preparação dos meios de cultura

2.6.3.1 Meio quimicamente definido

Para a preparação de 1 L de meio, pesaram-se, para 890 mL de água ultrapura, 25 g de xilose e 2,5 g de glucose. Posteriormente, em condições assépticas, procedeu-se à adição de 25 mL de uma solução de sais, 10 mL de solução de vitaminas, 50 ml de uma solução de azoto e fósforo e 25 mL de uma solução de magnésio (Anexo III). No final, o meio foi esterilizado por filtração (filtros com 0,22 µm de diâmetro de poro, Gelman Sciences, EUA).

2.6.3.2 Meios com base em hidrolisados

Na preparação deste meios, o agente escolhido para o acerto de pH, foi o NaOH uma vez que a adição de Ca(OH)_2 e CaCO_3 deram origem a precipitados muito significativos após a suplementação do meio de cultura.

Os hidrolisados destoxificados foram esterilizados por filtros de membrana $0,22 \mu\text{m}$ (Gelman Sciences, EUA). Já os hidrolisados não destoxificados foram esterilizados na autoclave (121°C , 15 min), devido ao facto de com grandes volumes observar-se a formação de um precipitado que impossibilita a esterilização por filtração. Estes últimos, antes de dar entrada na autoclave foram filtrados por filtros Filter-Lab 1235.

Avaliação do efeito da destoxificação e da suplementação

Nos ensaios preliminares de avaliação do efeito da destoxificação e da suplementação do hidrolisado na produção de polióis, para as estirpes seleccionadas em meio quimicamente definido (941 e 493), foi utilizado hidrolisado obtido nas condições optimizadas, cujo pH foi previamente acertado a 5,5 com NaOH sólido ou por destoxificação com c.a. com NaOH. Os hidrolisados foram todos esterilizados.

Após a esterilização, procedeu-se à adição para 70 mL de hidrolisado, em condições assépticas, dos nutrientes: 2 ml de uma solução de sais, 0,8 ml de solução de vitaminas, 4 ml de uma solução de azoto e fósforo e 2 ml de uma solução de magnésio (Anexo III), sendo a mistura designada a partir daqui por TEVM (trace elements, vitamins and minerals). Procedeu-se de igual modo adicionando, em vez de TEVM, 10 mL de borras de vinho provenientes de uma solução com uma concentração de $200 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Anexo III).

Avaliação dos factores que afectam a produção de xilitol/polióis

Nos ensaios de identificação dos factores responsáveis por afectar a produção de polióis foi utilizado hidrolisado concentrado e não concentrado, não destoxificado ou destoxificado com carvão activado por NaOH ou sujeito apenas a uma correcção de pH a 5,5 com NaOH sólido (não destoxificado). O carvão utilizado para estas destoxificações foi o carvão da marca Sigma (100 – 400 mesh, Reino Unido). Os hidrolisados foram todos esterilizados.

A matriz Plackett-Burman para doze experiências (Quadro 2.3, (Greasham *et al.* 1997) foi usada para determinar os efeitos de sete variáveis na produção de polióis: disponibilidade de oxigénio (dada pela razão do volume de erlenmeyer / volume do meio), concentração do hidrolisado, destoxificação, adição de suplementos como: extracto de levedura (YE), peptona, água de maceração de milho (CSL) e suplementação com uma solução de TEVM (Anexo III).

Quadro 2.3 - Matriz Plackett-Burman para doze experiências.

Ensaio	Variáveis independentes							Variáveis "Dummy"			
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	D ₁	D ₂	D ₃	D ₄
1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1
2	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1
3	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1
4	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1
5	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1
6	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1
7	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1
8	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1
9	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1
10	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1
11	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1

Em cada um dos 12 balões foram adicionados os suplementos (excepto o TEVM, devido à degradação das vitaminas a elevadas temperaturas) e/ ou a quantidade de água ultrapura, necessária para obter as concentrações finais pretendidas de acordo com a matriz do planeamento experimental. Estes foram a esterilizar na autoclave a 121 °C durante 15 min. Posteriormente, foi adicionado o hidrolisado e 9,9 mL de a solução de TEVM, em condições assépticas, de modo a obter a concentração pretendida e um volume final de meio de 90 mL.

O efeito de cada variável (E_{vi}) foi determinado de acordo com a equação. 2.2, onde os termos são a resposta média um limite mínimo (l) e nível máximo (h), e n é o número de execuções para cada nível:

$$E_{vi} = \left(\sum \frac{hR}{n} \right) - \left(\sum \frac{lR}{n} \right) \quad \text{Eq.2.2}$$

O teste de significância estatística dos coeficientes de regressão foi determinado pelo teste t de student, utilizando-se:

$$t_{xi} = \frac{E_{vxi}}{\sqrt{\sum \frac{E_D^2}{D}}} \quad \text{Eq.2.3}$$

onde (E_D) é o efeito das variáveis "dummy", e D o número de variáveis "dummy". Os níveis das variáveis investigadas neste estudo são apresentados no Quadro 2.4.

Quadro 2.4 - Níveis de operação das variáveis independentes.

Variáveis independentes	Símbolo	Limite mínimo	Limite máximo
Vol.tot /vol.liq.	X_1	500/80	1000 ^a /80
Concentração	X_2	0	2
YE	X_3	0	3,0 g·L ⁻¹
Peptona	X_4	0	1,75 g·L ⁻¹
TEVM	X_5	Não	Sim
CSL	X_6	0	5,0 g·L ⁻¹
Destoxificação	X_7	Não	Sim

^a Erlenmeyers com anteparas; YE - extracto de levedura; CSL - água de maceração de milho.

2.6.4 Condições de cultura

Para todas os ensaios, os balões foram colocados numa incubadora (Infors Unitron HT, Suíça) a 30 °C e a uma agitação de 150 rpm. Sendo que no caso da Plackett-Burman, os balões de 500 mL foram colocados numa incubadora (Orbital Comecta, Barcelona), onde apesar de se seleccionar uma agitação de 150 rpm, a agitação desta é notoriamente inferior.

2.6.5 Amostragem

No decorrer dos crescimentos foram retiradas periodicamente amostras para avaliação do crescimento celular, quantificação de substratos e produtos na suspensão celular. De modo a minimizar as alterações das condições de cultivo, nomeadamente na razão volume de líquido/volume total, o volume da amostra foi o mais reduzido possível (3 mL). Exceptuam-se os casos das amostras utilizadas para determinação de concentração de biomassa (5 mL).

2.7 Métodos analíticos

2.7.1 Caracterização química da matéria-prima e resíduos sólidos resultantes das hidrólises

Quer a fracção do BAE seleccionada no ponto 2.2, quer o resíduo sólido resultantes das hidrólises (obtidos no ponto 2.3) foram moídos a um tamanho de partículas <0,5 mm num moinho (Ika Werck MF10, Staufen, Alemanha) e armazenados à temperatura ambiente em frascos de vidro fechados para posterior caracterização química.

2.7.1.1 Determinação da humidade

Para a determinação da humidade da matéria-prima e dos resíduos sólidos, pesou-se em caixas de níquel, aproximadamente 1 g de amostra. Estes foram primeiramente secos a $100\pm 1^\circ\text{C}$ durante 16 h, arrefecidos no exsiccador durante 1 h e tarados numa balança analítica (Mettler Toledo AG204, Suíça). Pesada a amostra, esta foi seca e arrefecida nas mesmas condições das caixas vazias. Este procedimento foi repetido sempre que necessário, sendo realizado, no mínimo, em duplicado.

2.7.1.2 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 $100\pm 1^\circ\text{C}$ durante 16 h, arrefecidas e pesadas conforme o descrito em 2.7.1.1. 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 $550\pm 5^\circ\text{C}$ 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.

2.7.1.3 Determinação de glucano, xilano, arabinano e grupos acetilo

As amostras foram submetidas a uma hidrólise ácida quantitativa (H.A.Q.) para determinação de polissacáridos e grupos acetilo, de acordo com o método descrito em (Browning 1967). Para tal, foram pesadas em tubos de ensaio 0,5 g de amostra, às quais se adicionou 5 mL de H_2SO_4 72% (p/p). A mistura foi incubada a $30\pm 1^\circ\text{C}$ num banho termostaticado (Mettmert, Alemanha), durante 1 h, com agitação ocasional com uma vareta de vidro. Terminado esse tempo, todo o conteúdo do tubo de ensaio foi transferido para frascos Schott de 250 ml através do arrastamento com água desmineralizada, numa quantidade suficiente para se obter uma concentração de H_2SO_4 de 4% (p/p). Esta mistura foi autoclavada a 120°C durante 1 h, após o que se arrefeceu rapidamente a autoclave até aos 90°C e abriu-se o esgoto de modo a que a temperatura baixasse rapidamente. Após o arrefecimento dos frascos, estes foram novamente pesados para verificar a ocorrência de possíveis perdas. A mistura foi filtrada por filtros de placa porosa (Schott) de porosidade 3, previamente tarados, após secagem a $550\pm 5^\circ\text{C}$ numa mufla Heraeus D-6450 (Alemanha) durante 5 h.

Os componentes da fracção líquida foram analisados por HPLC e por electroforese capilar conforme descrito em 2.7.3 e 2.7.4, respectivamente. As concentrações de glucose, xilose,

arabinose e ácido acético obtidas permitem calcular as percentagens dos respectivos polímeros e grupos acetilo, conforme descrito no Anexo IV-B.

2.7.1.4 Determinação da lenhina

A fracção sólida, obtida em 2.7.1.3, foi lavada com 50 mL de água desmineralizada e os cadinhos com as amostras foram secos a $100\pm 1^\circ$ C durante 16h, arrefecidos e pesados conforme o descrito em 2.7.1.1. Em seguida, os resíduos foram incinerados numa mufla a $550\pm 5^\circ$ C durante 5 h, arrefecidos e pesados. O resíduo seco, após correcção da cinza, é considerado como lenhina Klason, (ver Anexo IV).

2.7.1.5 Determinação de proteína total

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

2.7.1.6 Doseamento de extractivos

Os extractivos 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 efectuados encontram-se descritos no Anexo VI.

2.7.2 Determinação da concentração de biomassa celular

A concentração celular foi regularmente estimada por medição da absorvância da cultura, a um comprimento de onda de 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 leituras dentro da gama de linearidade 0,2-0,8. Todas as diluições foram efectuadas, pelo menos, em duplicado.

A concentração de biomassa foi também obtida através da quantificação da concentração de biomassa seca da cultura em amostras seleccionadas. Foram filtrados, sob vácuo, 3 ml de suspensão celular, através de filtros (Pall Corporation) com diâmetro de poro de $0,45\ \mu\text{m}$, previamente secos e tarados. A biomassa foi lavada com 6 ml de água desionizada, e os filtros foram secos em estufa à temperatura de $100\pm 1^\circ$ C, durante, pelo menos, 16 h. Seguidamente foram arrefecidos até à temperatura ambiente num exsiccador, durante pelo menos 30 min, e pesados numa balança analítica electrónica (Mettler Toledo AG204, Suíça). Este procedimento foi realizado, pelo menos, em duplicado.

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

A D-glucose, D-xilose, L-arabinose, ácido acético, glicerol, etanol, HMF e furfural foram analisados por HPLC utilizando uma coluna Aminex HPX-87H (Bio-Rad, EUA). Para o HMF e furfural foi utilizado um detector de UV/VIS regulado para 280 nm, e para os restantes compostos um detector de IR. As condições de operação dos sistemas associados à coluna HPX-87H estão resumidas no Quadro 2.5.

Nestas condições, a xilose co-elui com a galactose e a frutose, a arabinose com a manose e o xilitol com o arabitól, pelo que se opta por falar sempre em polióis.

Apenas as amostras sujeitas à hidrólise ácida quantitativa, foram analisadas a um menor caudal e um maior volume de amostra na coluna (Quadro 2.5). Todas as amostras foram previamente filtradas através de filtros Millipore^(R) com um diâmetro de poro de 0,45 µm.

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

Quadro 2.5 - Condições de análise para a coluna cromatográfica HPX-87H.

	Amostra de hidrolisados	Amostra de H.A.Q. ¹
Fase Móvel	H ₂ SO ₄ 0,5 mM	H ₂ SO ₄ 0,5 mM
Caudal	0,6 mL min ⁻¹	0,4 mL min ⁻¹
Volume de injeção	5 µL	20 µL
Temperatura da coluna	50 °C	50 °C
Temperatura detector IR	50 °C	50 °C
Comprimento de onda UV	280 nm	-

¹Caracterização química da matéria-prima e resíduos sólidos.

2.7.4 Doseamento de compostos fenólicos

2.7.4.1 Método espectrofotométrico

Os compostos fenólicos presentes no hidrolisado foram doseados utilizando uma solução de reagente Folin-Ciocalteu com base no método descrito em (Singleton & Rossi 1986) utilizando o ácido gálico como padrão. O princípio deste método baseia-se na capacidade dos compostos fenólicos para reduzir o reagente de Folin-Ciocalteu, sob condições alcalinas, alterando a cor de amarelo a azul. O procedimento experimental encontra-se descrito em detalhe no Anexo VII.

2.7.4.1 Método CZE

O perfil de compostos fenólicos foi determinado por CZE (electroforese capilar de zona), de acordo com (Roseiro 2003). Foi utilizando um equipamento Agilent CE model G1600AX e um capilar de bolha, para maior sensibilidade, com revestimento de sílica fundida (Agilent G1600-60232), com 50 µm de diâmetro interno e 56 cm de comprimento. A solução tampão utilizada foi Tetraborato de sódio decahidratado a 20 mM em metanol a 20%, ajustado com HCl para um pH de 9.3. As condições de operação estão resumidas no Quadro 2.7.

Todas as amostras foram previamente filtradas através de filtros Millipore^(R) 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 (Extrasynthese), tirosol (Extrasynthese), hidroxitirosol (Extrasynthese), Catequina (Sigma), Epicatequina (Sigma), Ácido Vanílico (Sigma), Ácido Siríngico (Sigma), Ácido 3-hidróxi-benzóico (Sigma), e Naringina (Sigma).

Quadro 2.7 – Condições de análise por electroforese capilar de zona.

Parâmetro	Configuração
Temperatura	25 °C
Offset	8 mm do fundo do vial
Injecção	50 mBar x 15 seg. no anodo (+)
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 tampão de corrida

3. Resultados e Discussão

3.1 Caracterização da matéria-prima

3.1.1 Caracterização granulométrica

Ao contrário do que acontece com outros materiais, como as palhas de sorgo, milho ou arroz, o bagaço de azeitona extractado (BAE) não necessita de ser sujeito a uma redução de tamanho com vista à sua valorização. Tendo em conta a elevada resistência mecânica deste material, se fosse necessária a sua moagem, tal prática seria altamente dispendiosa.

Na Figura 3.1 encontram-se apresentadas as percentagens médias de BAE retido em cada um dos peneiros, resultantes da separação de três amostras representativas:

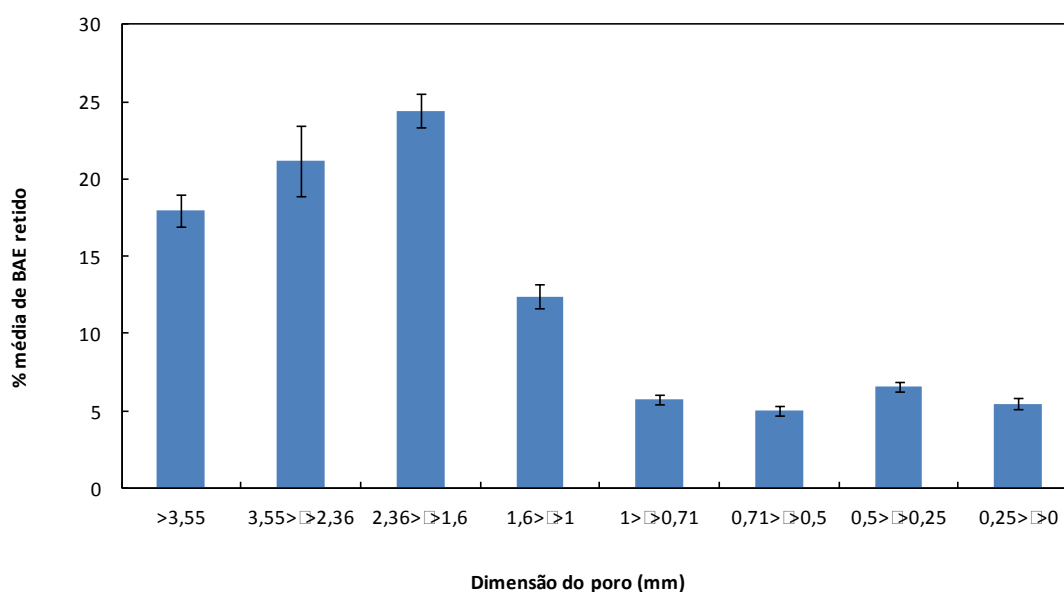


Figura 3.1 - Análise granulométrica do bagaço de azeitona extractado.

Tal como se pode observar na Figura 3.1 as fracções mais representativas correspondem às partículas com diâmetro entre 1 - 3,5 mm, e que corresponde, aproximadamente, a 60% da matéria-prima.

Desta fracção, procedeu-se à determinação do diâmetro médio das partículas (Anexo VIII, equação VIII). Este cálculo diz respeito às fracções de BAE retidas nos peneiros com dimensão de poro de 2,36, 1,6 e 1 mm e o valor obtido foi:

$$D_p = 2,6535 \text{ mm}$$

O diâmetro de partículas obtido encontra-se dentro dos valores já referidos noutros estudos realizados com materiais semelhantes (bagaço de azeitona (Derriche *et al.* 2007) e polpa de azeitona (Felizón *et al.* 2000), e tem a vantagem de dispensar a operação de redução de tamanho.

As restantes fracções não foram utilizadas nos ensaios de optimização do hidrolisado com ácido diluído, dado que:

- As partículas correspondentes às fracções acima de 3,55 mm não são indicadas para os tratamentos de hidrólise ácida, uma vez que devido às suas dimensões, podem ocorrer limitações difusionais à transferência de massa e calor;
- As fracções referidas são as mais representativas dos lotes recebidos;
- As fracções abaixo de 1 mm tornam-se de difícil de manuseamento e são mais susceptíveis de serem degradadas durante o tratamento.

3.1.2 Caracterização química

A composição química da biomassa lenhocelulósica varia consoante as condições climáticas, a idade, origem geográfica, estação do ano, métodos de colheita, bem como dos métodos analíticos utilizados. No caso do BAE, esta depende ainda da variedade da azeitona, das tecnologias empregues na extracção de azeite e do óleo de bagaço de azeitona e do modo de secagem.

A caracterização do lote seleccionado e utilizado neste trabalho é apresentado no Quadro 3.1, na qual é apresentada a composição média da matéria-prima, expressa em termos de percentagem de base seca:

Quadro 3.1 - Composição química média do bagaço de azeitona extractado.

Componentes	%
Glucano	22,87
Hemicelulose	23,34
Xilano	15,60
Arabinano	1,10
Grupos acetilo	6,64
Lenhina Klason	33,90
Cinza	4,35
Proteínas	3,66
Extractivos (água)	10,37
Extractivos (etanol)	3,14

A composição química acima apresentada sugere que o BAE é apropriado para o tipo de valorização estudada neste trabalho, por meio de hidrólise com ácido diluído. Trata-se de uma matéria-prima que contém 46% (p/p) de polissacáridos totais, dos quais, aproximadamente, metade é hemicelulose. Os valores encontrados são concordantes com outros já referidos na literatura para materiais semelhantes (bagaço de azeitona e caroço de azeitona) (Asli *et al.* 2009;Derriche *et al.* 2007;Niaounakis *et al.* 2006;Rodríguez *et al.* 2008). Conforme o que se encontra descrito na literatura para materiais semelhantes, para além da xilose e arabinose, podem encontrar-se presentes em muito menor quantidade outros

açúcares como: frutose, manose, galactose e sacarose (Niaounakis *et al.* 2006), pelo que os 15,6% de xilano apresentados no Quadro 3.1, poderão não ser exclusivamente xilose.

Já o teor em lenhina obtido é inferior ao habitualmente descrito na literatura (Albuquerque *et al.* 2004; Roig *et al.* 2006). Aqueles autores referem percentagens compreendidas entre 40 e 50%, o que no nosso caso é uma vantagem quando se pretende uma valorização do material através de bioconversão dos açúcares.

A quantidade relativamente apreciável de extractivos, pode também constituir uma mais-valia, dado o elevado valor económico associado a alguns dos compostos presentes, como seja o hidroxitirosol e o tirosol. A extração destes compostos é referida como uma estratégia válida para a valorização do bagaço de azeitona, por apresentarem propriedades antioxidantes (Fernandez-Bolanos *et al.* 1998). Além destes compostos é comum a presença de outros compostos com propriedades antioxidantes, anti-inflamatória, anti-microbiana e anti-hipertensivos com vasta aplicação farmacológica e que incluem: rutina, luteulina, oleuropeína, assim como derivados destes, e ainda esqualeno, tocoferóis (vitamina E) e triterpenos (Coimbra *et al.* 2010).

Em suma, este material possui uma composição favorável para a obtenção de hidrolisados ricos em pentoses como se pretende, uma vez que é relativamente rico em arabinoxilano, que constitui a fracção mais susceptível de ser hidrolisada por um tratamento com ácido diluído.

3.2 Optimização da hidrólise com ácido diluído do bagaço de azeitona extractado

3.2.1 Definição da razão líquido/sólido

A optimização do processo de hidrólise envolveu um estudo preliminar cujo objectivo principal foi a escolha da razão líquido/sólido (RLS), de modo a garantir a obtenção de um hidrolisado com uma concentração elevada de monossacáridos e baixa concentração de compostos potencialmente inibidores do metabolismo microbiano, tanto quanto possível com rendimentos elevados e sem problemas associados a questões de mistura e limitações difusionais à transferência de massa e calor. Para este efeito, foi realizado um ensaio no qual se testaram duas RLS, 2 e 4 $\text{g}_{\text{sol. H}_2\text{SO}_4}/\text{g}_{\text{BAE}}$, para a temperatura de 130 °C, e uma solução contendo 1,2% (p/p) de ácido sulfúrico, durante 150 min, condições operacionais previamente optimizadas para a hidrólise ácida de outros materiais (dados não publicados). A escolha destes valores de RLS teve por base, por um lado, o volume mínimo necessário para a imersão total e homogénea do sólido e, por outro, a necessidade de não utilizar volumes elevados que podem levar maiores custos com o ácido, e a hidrolisados mais diluídos que imporiam necessidades acrescidas de concentração posterior.

Os hidrolisados obtidos para as duas RLS foram caracterizados e a sua composição química é apresentada na Quadro 3.2.

Quadro 3.2 - Concentrações (g·L⁻¹) e rendimentos (g/kg matéria matéria-prima seca) de monossacáridos e ácido acético, obtidos para a hidrólise ácida de BAE para diferentes razões líquido/sólido, com 1,2% de H₂SO₄ e a 130 °C.

RLS (g/g)	Glucose		Xilose		Arabinose		Monossacáridos totais		Ácido Acético	
	g·L ⁻¹	g/kg	g·L ⁻¹	g/kg	g·L ⁻¹	g/kg	g·L ⁻¹	g/kg	g·L ⁻¹	g/kg
2	7,82	15,65	18,08	36,16	8,04	16,07	33,94	67,88	6,35	12,70
4	4,42	17,67	11,78	47,13	4,07	16,26	20,27	81,07	3,50	14,01

O ensaio com a RLS = 2, ou seja, a utilização de uma concentração de sólidos de 33% foi a que permitiu obter maior concentração de açúcares totais, superior em 40% ao ensaio com a RLS = 4 (20% de sólidos, Quadro 3.2). Porém, estas concentrações correspondem a rendimentos em monossacáridos de 20 % inferiores ao obtido para a RLS = 4. Em ambos os ensaios, o principal açúcar recuperado foi a xilose, sendo a glucose e a arabinose obtidas em menor quantidade. A recuperação de xilose foi mesmo selectivamente favorecida com o aumento da RLS, tendo-se observado um acréscimo de 30%.

No caso do ácido acético, observa-se uma recuperação 10% superior para RLS de 4, mas uma diminuição em cerca de 45% na sua concentração.

Pelo exposto, é claro ser necessário um compromisso entre estas duas RLS, de forma a obter um maior volume de hidrolisado por tratamento e, ao mesmo tempo, hidrolisados com elevadas concentrações de açúcares, aspecto que interessa tendo em conta que se pretende, posteriormente, estudar a possibilidade deste hidrolisado servir para a bioconversão de xilose em xilitol. Como compromisso definiu-se a RLS de 3 para a prossecução dos trabalhos.

De qualquer forma, independentemente da RLS utilizada, a rendimento de xilose foi sempre baixo (no máximo 20,4 % da xilose presente na matéria-prima). Comparando com outros materiais lenhocelulósicos, como por exemplo, as palhas de sorgo em condições operacionais semelhantes (concentração de ácido, duração e temperatura do tratamento) as recuperações de xilose foram mais baixas, tendo em conta que para aquele material é descrita uma recuperação da ordem dos 50%) (Torrado 2010), o que implica a necessidade de desenvolver uma estratégia de optimização das condições de operação para o BAE.

3.2.2 Optimização da concentração de ácido e duração do tratamento

A composição química dos hidrolisados hemicelulósicos varia de acordo com a matéria-prima utilizada, o tipo e a concentração de catalisador, bem como a temperatura e duração do processo. No decurso do processo hidrolítico, além dos açúcares resultantes do fraccionamento dos polissacáridos são também formados alguns compostos resultantes da degradação das hemiceluloses (grupos acetilo), dos monossacáridos e da degradação parcial da lenhina. Assim, as diversas condições operacionais que influenciam o processo

devem ser controladas e, se possível, optimizadas de modo a maximizar as concentrações de açúcares e minimizar a formação de produtos da degradação que limitam a utilização dos hidrolisados como meio de cultura (Carvalho *et al.* 2008; Gírio *et al.* 2010). A concentração de ácido e a duração do tratamento são especialmente relevantes e os parâmetros mais estudados (Gírio *et al.* 2010). Dado que o efeito destas variáveis ser interdependente, o seu estudo deve ser realizado simultaneamente.

O ácido sulfúrico é, em geral, a principal opção quando se trata da escolha do catalisador a utilizar. Neste trabalho, para a optimização da concentração de ácido e de tempo de hidrólise, utilizou-se um planeamento estatístico experimental de Doehlert para dois factores, em que se fez variar a concentração de ácido sulfúrico entre 0,5 e 3,5% e o tempo entre 0 e 180 min, para a temperatura de 130 °C. A escolha do intervalo de concentrações de ácido sulfúrico justifica-se pelo facto de que valores superiores a 3,5% tornam o método demasiado dispendioso e inferiores a 0,5% implicariam a necessidade de utilizar temperaturas elevadas para que o processo pudesse ser eficiente.

No Quadro 3.3 apresenta-se a matriz das experiências realizadas e as respectivas respostas: concentrações de monossacáridos, ácido acético e produtos de degradação.

Quadro 3.3 - Concentrações (g·L⁻¹) em monossacáridos, ácido acético e produtos de degradação obtidos na hidrólise do bagaço de azeitona extractado com ácido diluído para diferentes condições de ácido e tempo, segundo a matriz de Doehlert.

Ensaio	Variáveis				Respostas														
	Codificadas		Reais		CS	Glc	Xyl	Ara	TP	TS	HAc	HForm	HLev	Furfural	HMF	Fenólicos	TI	TP-TI	TS-TI
	X ₁	X ₂	H ₂ SO ₄ (%)	Tempo (min)															
A1*	0,000	0,000	2,00	100	2,31	7,99	18,36	7,26	25,62	33,61	7,37	1,38	0,28	0,72	1,41	4,42	15,29	10,33	18,32
A2	0,000	0,000	2,00	100	2,31	5,87	13,82	5,17	18,98	24,85	5,80	1,27	0,32	0,97	0,73	4,69	13,46	5,53	11,39
B1	1,000	0,000	3,50	100	2,55	7,50	32,21	5,63	37,84	45,34	10,23	1,72	0,80	3,71	0,91	5,53	22,11	15,73	23,24
B2	1,000	0,000	3,50	100	2,55	7,24	30,93	5,30	36,24	43,48	9,90	1,72	0,78	4,01	0,83	5,60	22,06	14,18	21,42
C1	-1,000	0,000	0,50	100	1,70	4,24	2,62	3,15	5,77	10,00	2,90	1,78	0,42	0,06	0,40	3,70	8,83	-3,06	1,17
C2	-1,000	0,000	0,50	100	1,70	3,99	2,50	2,97	5,47	9,46	2,79	1,23	0,40	0,06	0,68	3,68	8,44	-2,97	1,02
D1	0,500	0,866	2,75	169	2,63	6,71	20,06	5,56	25,61	32,32	7,77	1,52	0,57	2,76	1,19	5,44	18,67	6,95	13,66
D2	0,500	0,866	2,75	169	2,63	6,94	21,29	5,75	27,04	33,98	8,24	1,53	0,56	2,44	1,22	6,05	19,47	7,56	14,50
E1	-0,500	-0,866	1,25	30	1,77	4,50	3,06	3,39	6,45	10,95	2,65	0,96	0,23	0,10	0,77	3,93	8,42	-1,97	2,53
E2	-0,500	-0,866	1,25	30	1,77	5,17	3,41	3,75	7,16	12,33	2,89	0*	0,08	0,07	0,76	4,16	7,84	-0,68	4,49
F1	0,500	-0,866	2,75	30	2,11	5,74	8,85	5,27	14,12	19,86	4,43	1,13	0,30	0,33	0,79	4,22	10,90	3,22	8,96
F2	0,500	-0,866	2,75	30	2,11	5,85	9,52	5,19	14,71	20,56	4,50	0,32	-0,02	0,36	0,77	3,89	9,84	4,87	10,72
G1	-0,500	0,866	1,25	169	2,29	5,95	6,90	5,48	12,38	18,33	4,48	1,29	0,36	0,74	1,00	4,72	12,24	0,14	6,09
G2	-0,500	0,866	1,25	169	2,29	5,89	7,80	5,48	13,28	19,17	4,73	1,24	0,34	0,82	1,05	4,72	12,57	0,71	6,60

CS - factor de severidade combinado; Glc – Glucose; Xyl – Xilose; Ara – Arabinose; TP – Pentoses totais; TS – Açúcares totais; HAc – ácido acético; HLev – Ácido levulínico; HForm – Ácido fórmico; HMF – Hidroximetilfurfural; TP-TI - diferença entre a concentração total de pentoses e total de inibidores; TS-TI - diferença entre a concentração total de açúcares e total de inibidores; TI – Inibidores totais (ácido acético, ácido fórmico, ácido levulinico, furfural, HMF e fenólicos).

* Valores não incluídos na análise estatística.

Associado a cada ensaio é apresentado o valor do factor de severidade combinado que é um parâmetro empírico que engloba os efeitos de temperatura, tempo e pH (Anexo IV, equação IV.3) e que permite comparar ensaios realizados em diferentes condições operacionais. Neste trabalho o factor de severidade combinado variou entre 1,70 e 2,63.

Pela análise do Quadro 3.3 pode observar-se que para a maioria dos açúcares e dos compostos inibidores, os valores de concentração mais elevados foram obtidos para o factor de severidade combinado (CS) de 2,55, ou seja para a concentração mais elevada de ácido sulfúrico (3,5%) e para 100 min de tempo de hidrólise (Figuras 3.2 e 3.3). Apesar do valor de concentração destes açúcares e compostos inibidores, nesta condição, ser relativamente próxima dos valores obtidos para CS de 2,63 (ácido a 2,75%, 169 min de tratamento), o efeito da concentração de ácido parece ter maior peso que aquele causado pelo tempo de tratamento. Esta mesma situação se verifica entre as condições de severidade de 2,11 e 2,29. As excepções verificam-se para a arabinose, o HMF e compostos fenólicos que apresentam a sua concentração mais elevada para a condição de maior severidade (CS de 2,63) (Figura 3.2 – c); Figura 3.3 - d) f)), ainda que estes valores sejam próximos dos encontrados para a primeira condição referida.

A xilose é o principal composto presente nos hidrolisados para a maioria dos ensaios, sendo o monossacárido que apresenta um maior aumento na concentração. Esse aumento da concentração resulta da hidrólise de xilano da matéria-prima atingindo, para uma severidade 2,55, uma concentração de cerca de $31 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Figura 3.2 – b)), o que corresponde a um rendimento com base no xilano da matéria-prima de 41,5% (Quadro 3.6). É de ter em conta que o BAE para além de não ser dos materiais lenhocelulósicos que apresenta maior percentagem de xilano (15,6 %), é um material cuja obtenção de um elevado rendimento em xilose parece ser dificultado pela sua natureza intrínseca, acabando por se exigir condições mais severas que as citadas para outros materiais lenhocelulósicos. Quando comparado, por exemplo, com o hidrolisado obtido a partir de dreche cervejeira, produzido em condições de tratamento semelhantes ($130 \text{ }^\circ\text{C}$, 3% H_2SO_4 e 90 min), o BAE apresenta um rendimento em xilose inferior quando comparado com aquele material cujo rendimento foi de 78%. Ainda assim, e dada a possibilidade do BAE permitir a realização da hidrólise ácida com uma maior carga de sólidos, foi possível nestas condições obter uma concentração de xilose 1,5 vezes superior à obtida com a dreche cervejeira (Carvalho *et al.* 2004a).

A glucose é o segundo composto mais importante, mas encontra-se em concentrações semelhantes à arabinose. Ao contrário do que acontece com a xilose, estes dois monossacáridos não sofrem grandes variações na concentração com o aumento da severidade (Quadro 3.3, Figura 3.2 – a) e c)). Contudo, enquanto as concentrações de glucose se devem a uma baixa solubilização, as concentrações de arabinose devem-se precisamente ao oposto, a uma elevada solubilização da arabinose, uma vez que a matéria-

prima tem um teor baixo em arabinano. Estes factos, também já verificados na hidrólise com ácido diluído de outros materiais lenhocelulósicos (Duarte *et al.* 2009; Neureiter *et al.* 2002), demonstram a selectividade do tratamento utilizado para as hemiceluloses sendo também a baixa concentração de glucose um aspecto favorável, uma vez que favorece o uso do hidrolisado como meio de bioconversão da xilose em xilitol. Foi já verificado noutros trabalhos que concentrações elevadas desta hexose podem inibir o metabolismo da xilose em leveduras (Ooi *et al.* 2002; Tavares *et al.* 2000)

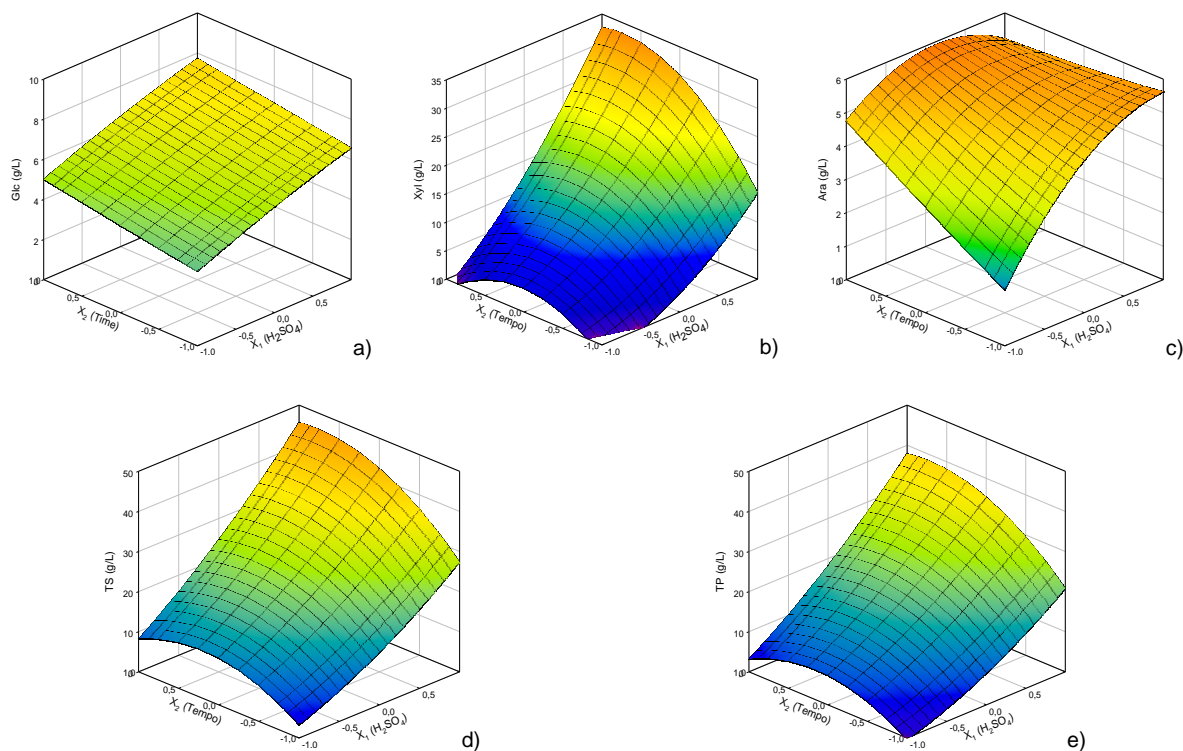


Figura 3.2 - Superfícies de resposta para a concentração de glucose – a), concentração de xilose - b) e concentração de arabinose - c) concentração total de açúcares – d), concentração total de pentoses – e) em função da concentração de ácido (X_1) e tempo de reacção (X_2).

Na condição de maior concentração de xilose (CS de 2,55), foram também obtidos os valores mais elevados para as concentrações de ácido acético, ácido fórmico e furfural. Para estes três compostos inibidores observa-se um aumento na concentração com o aumento da severidade, sendo este mais acentuado no caso do ácido acético (Quadro 3.3; Figura 3.3 – a). Tendo este material uma quantidade apreciável de grupos acetilo (6,6%) quando comparado com outros materiais lenhocelulósicos tais como palhas de trigo (Carvalho *et al.* 2009b) e caules de algodão (Akpınar *et al.* 2011) que apresentam quantidades inferiores a 3,5%, ou até mesmo os resíduos de eucalipto (Canettieri *et al.* 2007), e carolo de milho (Moniz *et al.* 2009), o aumento da concentração de ácido acético resulta da hidrólise dos grupos acetilo da matéria-prima atingindo, para uma severidade 2,55 uma concentração de cerca de 10 g·L⁻¹. Enquanto o aumento da concentração de ácido acético está relacionado

com a hidrólise da hemicelulose da matéria-prima, o aumento de outros inibidores, como o furfural e o ácido fórmico, indicam a existência de reacções de degradação da xilose, uma vez que a desidratação desta conduz à formação de furfural que por sua vez pode ser convertido em ácido fórmico. De forma semelhante, o mesmo acontece para a degradação das hexoses em HMF e este em ácido levulínico. Sendo que para estes compostos, a concentração é sempre baixa (Quadro 3.3; Figura 3.3 – c), d)), tal poderá indicar que a glucose seja pouco afectada pela variação das condições. Acontece que as concentrações de furfural e ácido fórmico no hidrolisado de BAE são superiores às encontradas nos hidrolisados de outros materiais obtidos em condições de tratamento semelhantes, como é o caso do hidrolisado de palhas de sorgo em que é obtida uma concentração de $1,18 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Torrado 2010) sob condições optimizadas, enquanto no hidrolisado de BAE se obtém $3,8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de furfural. Como foi acima referido, a natureza deste material exigiu a utilização de condições de hidrólise mais severas que as aplicadas para outros materiais.

A concentração de compostos fenólicos parece ser pouco afectada pelas diferentes condições operacionais mas ainda assim as concentrações obtidas são relativamente elevadas, variando entre $3,70$ e $6,03 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Quadro 3.3, Figura 3.3 – f)). Estes valores são relativamente elevados quando comparados com outros descritos para outros hidrolisados, que referem concentrações de compostos fenólicos totais da ordem de $0,91$, $1,38$, e $2,16 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ para hidrolisados de dreche cervejeira, palha de sorgo, e palha de trigo, respectivamente (Carvalho *et al.* 2004a; Duarte *et al.* 2009; Torrado 2010). A presença de compostos fenólicos nos hidrolisados é habitualmente associada à solubilização da lenhina. No entanto, neste trabalho a lenhina parece ser pouco afectada pelo tratamento hidrolítico obtendo-se no máximo uma solubilização de 8% apenas numa das condições (Quadro 3.6). Assim, os compostos fenólicos quantificados deverão ser compostos presentes na matéria-prima e facilmente solúveis em água e não compostos que provenham da degradação da lenhina. Refira-se que os compostos presentes no bagaço de azeitona são habitualmente referidos como compostos de fácil extracção (75-90% dos fenólicos totais encontrados para bagaço de azeitona) e incluem fenólicos como o hidroxitiroso, tirosol, oleuropeína, ácido cafeico, ácido *p*-coumarico, ácido vanílico, catecol e rutina (Niaounakis *et al.* 2006; Téllez-Luis *et al.* 2002b).

Para além dos monossacáridos, não será de excluir a possibilidade da presença de açúcares também na forma oligomérica, sobretudo nas condições de menor severidade, o que acontecer, poderá explicar, em parte, os baixos rendimento obtidos, quer em xilose, quer na recuperação de ácido acético, uma vez que a existirem oligossacáridos, estes poderão conter grupos acetilo ligados e que não estão a ser quantificados nas determinações analíticas realizadas quer no sólidos, quer nos hidrolisados.

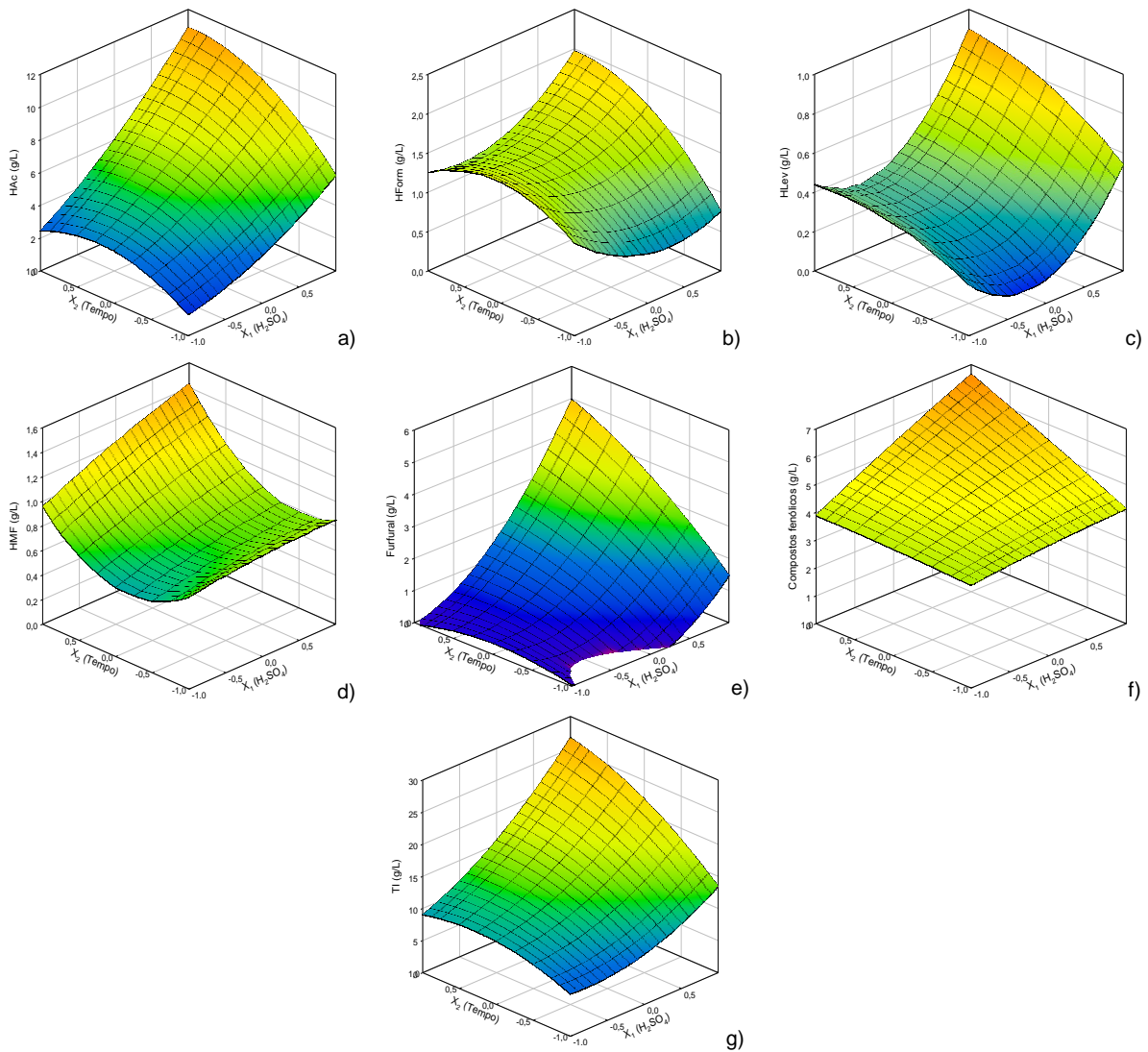


Figura 3.3 - Superfícies de resposta para a concentração de ácido acético - a), concentração de ácido fórmico b), concentração de ácido levulínico - c), concentração de HMF - d), concentração de furfural – e) concentração de compostos fenólicos – f), total de inibidores – g) em função da concentração de ácido (X₁) e tempo de reacção (X₂).

Na Quadro 3.4 é apresentada uma estimativa para os coeficientes de regressão e respectivos níveis de significância para um modelo polinomial estudado juntamente com o coeficiente de determinação múltipla (R^2) para as diferentes respostas analisadas. Todas as respostas obtidas, excepto a concentração de ácido fórmico ($R^2=0,7$), podem ser correlacionadas com as variáveis estudadas pela equação proposta (ponto 2.3, equação 2.3), obtendo-se regressões estatisticamente significativas ($p<0,05$). Também para a maioria das respostas os valores de R^2 obtidos foram superiores a 0,9 demonstrando que, existe uma boa concordância entre os dados obtidos e os esperados.

Quadro 3.4 - Coeficientes de regressão estimados para o modelo polinomial para as diferentes respostas analisadas.

Respostas	Coeficientes						R ²
	β_0	β_1	β_2	β_{12}	β_{11}	β_{22}	
Glc	5,87+/-0,37(0)	1,4+/-0,15(0)	0,61+/-0,15(0,01)	-0,03+/-0,3(0,91)	-0,13+/-0,42(0,77)	0,01+/-0,42(0,98)	0,94
Xyl	13,82+/-2,2(0)	12,88+/-0,9(0)	4,5+/-0,9(0)	4,26+/-1,8(0,05)	3,25+/-2,46(0,23)	-6,03+/-2,46(0,04)	0,97
Ara	5,17+/-0,19(0)	1,11+/-0,08(0)	0,67+/-0,08(0)	-0,86+/-0,16(0)	-0,9+/-0,22(0)	0,06+/-0,22(0,79)	0,98
TP	18,98+/-2,35(0)	13,99+/-0,96(0)	5,18+/-0,96(0)	3,4+/-1,92(0,12)	2,35+/-2,63(0,4)	-5,97+/-2,63(0,06)	0,97
TS	24,85+/-2,68(0)	15,39+/-1,1(0)	5,79+/-1,1(0)	3,36+/-2,19(0,17)	2,22+/-3(0,48)	-5,96+/-3(0,09)	0,97
HAc	5,8+/-0,5(0)	3,26+/-0,2(0)	1,55+/-0,2(0)	0,98+/-0,41(0,05)	0,66+/-0,56(0,28)	-1,33+/-0,56(0,05)	0,98
HForm	1,27+/-0,27(0)	0,08+/-0,11(0,51)	0,32+/-0,11(0,02)	0,28+/-0,22(0,23)	0,34+/-0,3(0,29)	-0,32+/-0,3(0,32)	0,74
HLev	0,32+/-0,04(0)	0,19+/-0,02(0)	0,13+/-0,02(0)	0,04+/-0,03(0,24)	0,28+/-0,05(0)	-0,06+/-0,05(0,22)	0,98
HMF	0,73+/-0,09(0)	0,14+/-0,04(0)	0,2+/-0,04(0)	0,09+/-0,07(0,22)	-0,03+/-0,1(0,78)	0,29+/-0,1(0,02)	0,91
Furfural	0,97+/-0,39(0,04)	1,61+/-0,16(0)	0,85+/-0,16(0)	0,9+/-0,32(0,03)	0,99+/-0,44(0,06)	-0,35+/-0,44(0,45)	0,96
Fenólicos	4,69+/-0,27(0)	0,8+/-0,11(0)	0,68+/-0,11(0)	0,58+/-0,22(0,03)	-0,06+/-0,3(0,84)	-0,04+/-0,3(0,9)	0,93
TI	13,78+/-1,14(0)	6,12+/-0,47(0)	3,92+/-0,47(0)	2,7+/-0,93(0,02)	2,18+/-1,28(0,13)	-2,03+/-1,28(0,16)	0,97
TS-TI	11,07+/-1,8(0)	9,26+/-0,73(0)	1,87+/-0,73(0,04)	0,67+/-1,47(0,66)	0,04+/-2,01(0,98)	-3,93+/-2,01(0,09)	0,96
TP-TI	5,2+/-1,46(0,01)	7,87+/-0,59(0)	1,26+/-0,59(0,07)	0,7+/-1,19(0,57)	0,17+/-1,63(0,92)	-3,94+/-1,63(0,05)	0,97

Todos os valores são apresentados na forma “coeficiente \pm erro padrão (p -value)”. Os coeficientes estatisticamente significativos em $p < 0,05$ encontram-se a negro.

Glc – Glucose; Xyl – Xilose; Ara – Arabinose; TP – Pentoses totais; TS – Açúcares totais; HAc – ácido acético; HForm – Ácido fórmico; HLev – Ácido levulínico; HMF – Hidroximetilfurfural; TP-TI - diferença entre a concentração total de pentoses e total de inibidores; TS-TI - diferença entre a concentração total de açúcares e total de inibidores; TI – Inibidores totais (ácido acético, ácido fórmico, ácido levulinico, furfural, HMF e fenólicos).

A concentração de ácido expressa pelo parâmetro X_1 afecta positivamente todas as respostas avaliadas, à excepção do ácido fórmico ($p > 0,05$), apresentando um maior efeito (expresso pelo parâmetro β_1) não só na recuperação de açúcares totais e pentoses totais (principalmente de xilose), mas também na formação de ácido acético, furfural e compostos fenólicos (Quadro 3.4, Figura 3.2 – d), e), b); Figura 3.3 – a), e), f)). O menor efeito deste parâmetro observa-se na formação de ácido levulínico e HMF, sendo as concentrações destes inibidores as menos expressivas.

O efeito quadrático da concentração de ácido (β_{11}) é estatisticamente significativo apenas para a arabinose e para o ácido levulínico. O valor negativo para a recuperação de arabinose sugere que, na gama estudada, as concentrações de ácido elevadas levam à degradação desta pentose (Figura 3.2 – c)), diminuindo assim a sua recuperação. Tal parece ir de encontro ao que se observa no Quadro 3.3 em que esta pentose apresenta a concentração máxima para o tratamento realizado com 2,75% de ácido e 169 min e uma concentração já ligeiramente mais baixa para o tratamento realizado com maior percentagem de ácido (3,5% de ácido e 100 min). Já o baixo valor positivo do ácido levulínico sugere que o aumento da concentração de ácido sulfúrico induz a formação deste composto (Figura 3.3 – c)), formação esta pouco significativa dadas as concentrações pouco expressivas obtidas (Quadro 3.3).

O tempo de hidrólise expresso pelo parâmetro X_2 afecta positivamente todas as respostas avaliadas, apresentando um maior efeito (expresso pelo parâmetro β_2), mais uma vez, não só na recuperação de açúcares totais e pentoses totais (principalmente de xilose), mas também na formação de ácido acético, furfural e compostos fenólicos (Quadro 3.4, Figura 3.2 – d), e), b); Figura 3.3 – a), e), f)). O menor efeito deste parâmetro observa-se, também aqui, na formação de ácido levulínico e HMF, sendo as suas concentrações as menos expressivas.

O efeito quadrático do tempo de reacção (β_{22}) é estatisticamente significativo para valores negativos de xilose e ácido acético e valor positivo de HMF (Figura 3.2 – g). A aplicação de hidrólises com longa duração induzem um efeito negativo na concentração de xilose, o que sugere a ocorrência de reacções de degradação desta pentose. O ácido acético exhibe um perfil similar ao da xilose. Já o baixo valor positivo do HMF sugere que longos tempos de hidrólise induzem a formação deste composto (Figura 3.3 – b)). Tal como se verifica para o ácido levulínico com o aumento da concentração de ácido sulfúrico, a formação de HMF é pouco significativa dadas as concentrações pouco expressivas obtidas (Quadro 3.3).

A interacção entre a concentração de ácido e o tempo de hidrólise (β_{12}) afecta positivamente a concentração de xilose, furfural, ácido acético e compostos fenólicos e negativamente a concentração de arabinose. A interacção estimada entre estes parâmetros sugere que actuam sinergicamente para aumentar a formação de xilose, a degradação, principalmente, de arabinose em furfural, a hidrólise de grupos acetilo e a solubilização de

compostos fenólicos. Comparando as respostas do coeficiente de interacção destes dois parâmetros com as respostas dos coeficientes lineares e quadráticos de cada um deles, a concentração de ácido parece apresentar um maior efeito, isto é, a concentração de ácido parece ser o parâmetro que mais influência a hidrólise do BAE. Estes resultados estão de acordo com o referido por Téllez-Luis *et al.* (2002a) para a hidrólise ácida de palhas de sorgo, onde a concentração de ácido parece ter um efeito mais significativo na hidrólise deste material que o aumento do tempo.

Tendo em conta que se pretende utilizar o hidrolisado de BAE para a bioconversão de xilose em xilitol, pretende-se seleccionar as condições que permitam maximizar a recuperação de açúcares, em especial de xilose, e minimizar a formação de compostos de degradação, uma vez que são possíveis inibidores do metabolismo das leveduras. Assim, foi também avaliada a resposta para a diferença entre a concentração total de açúcares ou o total de pentoses e o total de inibidores (TS-TI e TP-TI) que mostram que estas respostas são maioritariamente afectadas pela concentração de ácido (Figura 3.4. - a), b)). Esta mesma observação é mencionada por Cruz *et al.* (2001) para hidrólise com ácido diluído de palhas de sorgo.

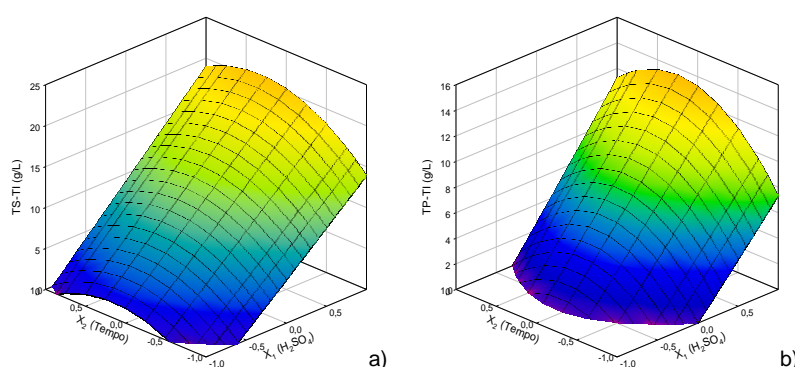


Figura 3.4 - Superfícies de resposta para a diferença entre a concentração total de açúcares e total de inibidores - a) – e da diferença entre a concentração total de pentoses e total de inibidores - b), em função da concentração de ácido (X_1) e tempo de reacção (X_2).

Com base no modelo polinomial, as condições óptimas, i.e. a máxima recuperação de monossacáridos e mínima formação de grupos acetilo e compostos de degradação livres no hidrolisado, foram obtidas pelo algoritmo do programa linear (MS solver Excel).

Entre as várias possibilidades, o critério escolhido foi a maximização da diferença directa entre a concentração de açúcares e inibidores (TS-TI). As condições em que esta diferença foi maximizada correspondem a um tempo de tratamento de 130 min ($X_2=0,323$) e 3,5% ($X_1=1,0$) de ácido (Figura 3.4 – a), Quadro 3.6.), que corresponde a um coeficiente de severidade combinado de 2,64.No Quadro 3.5 encontra-se apresentada a composição do hidrolisado de BAE obtido nessas condições.

Quadro 3.5 - Composição do hidrolisado de BAE obtido para o factor de severidade combinado de 2,64.

Componentes	(g·L⁻¹)
Glucose	2,10
Xilose	34,28
Arabinose	3,90
Ácido acético	11,87
Ácido fórmico	1,35
Ácido levulínico	0,23
HMF	0,08
Furfural	3,83
Compostos Fenólicos	4,55

O hidrolisado de BAE produzido nas condições optimizadas quando comparado com o hidrolisado produzido na condição de severidade de 2,55, condição para a qual se obteve a maior concentração de açúcares, apresenta uma concentração de xilose superior (Quadro 3.5). Comparativamente ainda a esse hidrolisado, todos os inibidores, excepto o ácido acético, apresentam concentrações inferiores no hidrolisado obtido nas condições optimizadas. Comparando as concentrações de xilose (34,28 g·L⁻¹) e arabinose (3,98 g·L⁻¹) obtidas por hidrólise do BAE com ácido diluído com as concentrações destas pentoses obtidas a partir de outros materiais lenhocelulósicos pode concluir-se que apesar de existirem matérias-primas e condições operacionais que permitem obter hidrolisados com concentrações de xilose superiores às obtidas neste trabalho, nomeadamente bagaço de cana-de-açúcar e carolo de milho (Cruz *et al.* 2001; Domínguez *et al.* 1996; van Zyl *et al.* 1988), estas são favoráveis quando comparadas com a maioria dos hidrolisados provenientes de materiais com a mesma origem, resíduos agrícolas e agro-industriais (Canilha *et al.* 2006; Téllez-Luis *et al.* 2002a). O teor dos derivados de furanos varia, exibindo um teor em HMF mais baixo, mas um teor em furfural mais elevado que outros hidrolisados (Canilha *et al.* 2006; Duarte *et al.* 2009; Téllez-Luis *et al.* 2002a). Contudo, este hidrolisado apresenta um teor de ácido acético e de compostos fenólicos significativamente superior à maioria dos hidrolisados (Canilha *et al.* 2006; Téllez-Luis *et al.* 2002a). Qualitativamente, os compostos fenólicos identificados no hidrolisado por CZE (hidroxitiroso, catequina, epicatequina, ácido vanílico, ácido sirínico, ácido 3-hidróxi-benzóico e naringina), são substancialmente diferentes dos descritos na literatura para outros hidrolisados, principalmente devido à grande preponderância de hidroxitiroso, um composto fenólico particularmente importante nos produtos derivados da oliveira.

Pela análise do conjunto dos resultados apresentados pode concluir-se que a hidrólise do BAE com H₂SO₄ 3,5% (p/p) a 130 °C durante 130 min (CS 2,64) permitiu:

- A obtenção de um hidrolisado rico em açúcares com cerca de $40,28 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de monossacáridos, dos quais $34,28 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ são xilose;
- A obtenção de hidrolisados com concentrações minimizadas de produtos potencialmente inibidores do crescimento microbiano, tais como furfural, HMF, ácido acético e compostos fenólicos.
- O aproveitamento da quase totalidade dos componentes presentes na matéria-prima, cujas fracções não hidrolisadas (essencialmente celulose e lenhina) poderão ser utilizadas posteriormente para diferentes aplicações, nomeadamente para a produção de etanol celulósico.

Estas condições de hidrólise foram escolhidas para todos os trabalhos seguintes, nomeadamente para os ensaios de bioconversão.

3.2.3 Caracterização química dos sólidos resultantes da hidrólise

Na Figura 3.3 está apresentada a composição em polissacáridos (glucano, xilano e arabinano), grupos acetilo e lenhina Klason dos resíduos sólidos obtidos após a hidrólise com ácido diluído de acordo com a matriz Doehlert. Uma vez que este tipo de hidrólise conduz principalmente à solubilização dos componentes hemicelulósicos, as alterações obtidas dos rendimentos em sólido (quantificado pela perda de massa) são úteis para confirmar a eficácia da hidrólise ácida na matéria-prima e daí ser também apresentado o correspondente rendimento em sólidos em função da severidade do tratamento.

No Quadro 3.6 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 e os respectivos balanços a cada um dos componentes poliméricos.

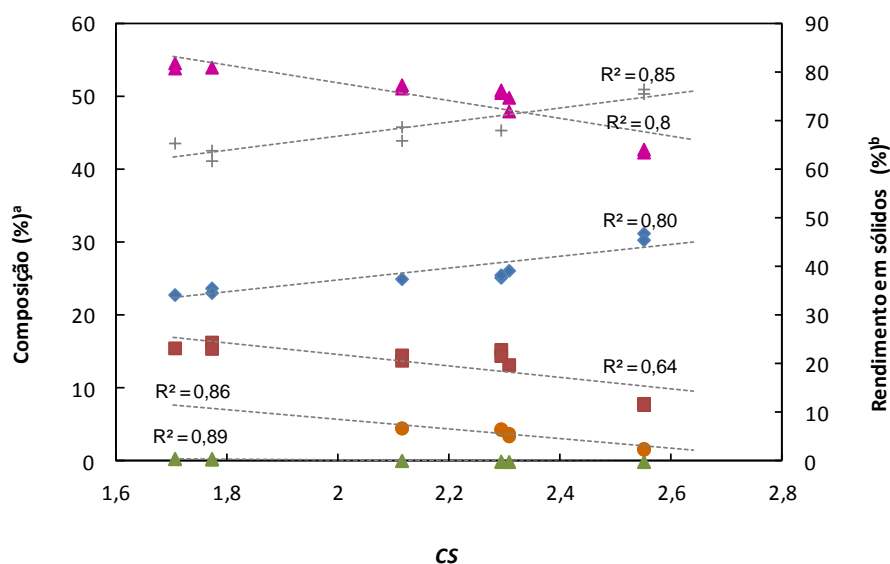


Figura 3.5 - Efeito das condições de severidade no rendimento em sólidos (Y_s), composição polimérica e grupos acetilo obtidos após a hidrólise com ácido diluído do bagaço de azeitona extractado. Rendimentos em sólido (▲), glucano (◆), xilano (■), arabinano (▲), grupos acetilo (●) e lenhina Klason (+). ^a(g/100g matéria-prima) ^b(g/100g sólidos processados)

Para cada um dos parâmetros apresentados na Figura 3.3, pode estabelecer-se uma correlação linear entre a composição dos sólidos ou a perda de massa e a severidade do tratamento.

Nas condições mais suaves, a solubilização dos sólidos que ocorreu foi muito baixa, sendo o teor de polissacáridos e de lenhina semelhante ao da matéria-prima (Quadro 3.1). À medida que a severidade aumenta, o rendimento em sólidos diminui acentuadamente atingindo o valor mais baixo 63,6% para a condição de maior severidade. Esta diminuição pode ser correlacionada com a solubilização de componentes hemicelulósicos (arabinano, xilano e grupos acetilo).

Dentro das hemiceluloses, o arabinano sendo o componente que existe em menor quantidade foi o primeiro a ser hidrolisado, sendo solubilizado cerca de 70% para a condição de menor severidade (Quadro 3.6) e a totalidade para a condição de $CS=2,31$. Como referido anteriormente, a percentagem de xilano e dos grupos acetilo solubilizados decresceu linearmente com o aumento da severidade do tratamento atingindo uma solubilização de 67,6% e 83,2%, respectivamente, para uma das condições mais severas ($CS=2,55$), o que corresponde a um teor destes componentes nos resíduos sólidos processados de 7,9% e 1,8%.

O glucano não foi significativamente afectado pelo tratamento hidrolítico. Nas condições mais severas ($CS=2,63$) ocorreu uma solubilização de 11,5%, o que é relativamente pouco sugerindo que a celulose não foi significativamente afectada pelo tratamento efectuado. Estes resultados são semelhantes aos obtidos para a hidrólise ácida diluída com outras matérias-primas, por exemplo, dreche cervejeira (Carvalho *et al.* 2004a) e ligeiramente

superiores aos descritos para a palha de sorgo (Torrado 2010). Para as condições de operação utilizadas neste trabalho, não seria de esperar que ocorresse uma solubilização significativa da lenhina. Em todos os ensaios realizados, a percentagem de lenhina Klason nos resíduos sólidos aumentou mas tendo em conta a redução de massa que ocorre pela solubilização de outros componentes (por exemplo, xilano) as recuperações de lenhina variaram entre 93,2% a 106,4%. O valor superior a 100% pode dever-se, provavelmente, a erro experimental ou ainda à ocorrência de reacções de condensação da lenhina com açúcares e/ou produtos de degradação, tais como o furfural resultando em produtos da reacção insolúveis e que causam um aumento aparente no rendimento da lenhina Klason (Montané *et al.* 2002).

Quadro 3.6 - Percentagens de recuperação de açúcares e ácido acético na fracção sólida e líquida, de lenhina na fracção sólida e respectivos balanços.

CS	1,70	1,77	2,11	2,29	2,31	2,55	2,63
Ensaio**	C	E	F	G	A	B	D
Rendimento em xilose (g/100 g X _{nMP})	3,4	4,4	12,7	10,1	20,5	41,5	26,4
Rendimento em xilano (g/100 g X _{nMP})	97,5	75,6	70,5	73,0	73,1	32,4	51,8
Balanço ao xilano	100,9	80,0	83,2	83,1	93,6	73,9	78,2
Solubilização de xilano (g/100 g X _{nMP})	2,5	24,4	29,5	27,0	26,9	67,6	48,2
Rendimento em xilose (g/100 g MP)	0,53	0,69	1,98	1,57	3,19	6,47	4,11
Rendimento de arabinose (g/100 g Ar _{nMP})	57,3	69,1	102,7	106,3	112,0	102,0	102,4
Rendimento de arabinano (g/100 g Ar _{nMP})	31,6	26,9	11,2	3,1	0,0	0,0	0,0
Balanço ao arabinano	88,9	96,0	113,9	109,4	112,0	102,0	102,4
Solubilização de arabinano (g/100 g Ar _{nMP})	68,4	73,1	88,8	96,9	100,0	100,0	100,0
Rendimento em arabinose (g/100 g MP)	0,63	0,76	1,13	1,17	1,23	1,12	1,12
Rendimento em ácido acético (g/100 g GAc _{MP})	9,8	9,9	16,2	16,5	22,0	34,7	26,8
Rendimento de grupos acetilo (g/100 g GAc _{MP})	56,1	54,7	53,6	51,1	41,0	16,8	33,5
Balanço aos grupos acetilo	65,9	64,6	69,8	67,6	63,0	51,5	60,3
Solubilização de grupos acetilo (g/100 g GAc _{MP})	43,9	45,3	46,4	48,9	59,0	83,2	66,5
Rendimento em ácido acético (g/100 g MP)	0,65	0,66	1,08	1,10	1,46	2,30	1,78
Rendimento em glucose (g/100 g G _{nMP})	3,8	4,6	5,6	5,6	6,1	6,8	6,1
Rendimento de glucano (g/100 g G _{nMP})	89,2	82,2	82,7	84,7	85,9	86,3	88,5
Balanço ao glucano	93,0	87,0	88,3	90,3	91,5	93,1	94,6
Solubilização de glucano (g/100 g G _{nMP})	10,8	17,8	17,3	15,3	14,1	13,7	11,5
Rendimento em glucose (g/100 g MP)	0,87	1,05	1,28	1,29	1,40	1,54	1,39
Rendimento em lenhina (g/100 g LK _{MP})	106,4	91,6	102,3	100,4	93,2	95,7	94,3
Solubilização de lenhina (g/100 g LK _{MP})	0	8,4	0	0	6,8	4,3	5,7
Rendimento em lenhina (g/100 g MP)	36,06	31,05	34,70	34,03	31,59	32,46	31,98

*MP - matéria-prima; ** Os valores apresentados correspondem à média dos ensaios efectuados

Tal como esperado, as pentoses são os componentes maioritários presentes nos hidrolisados, demonstrando a selectividade deste tratamento para as hemiceluloses. Tal como se pode observar na Quadro 3.6 o rendimento máximo em xilose é obtido para um CS

de 2,55. A arabinose é mais facilmente solubilizada que a xilose, sendo totalmente recuperada na fracção líquida para valores de CS entre 2,31 e 2,55. Assim, considerou-se que a recuperação máxima de pentoses foi obtida para um CS de 2,55, o qual corresponde a uma duração do tratamento de 100 min e uma concentração de ácido de 3,5%. Nestas condições, os rendimentos máximos em pentoses obtidos foram de 6,47 g xilose/100 g BAE e 1,12 g arabinose/100 g de BAE, ou seja, 41,5% do xilano presente na matéria-prima foi recuperado sob a forma de xilose e a totalidade do arabinano sob a forma de arabinose. Embora as concentrações de pentoses obtidas sejam relativamente elevadas ($38,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) pela baixa razão líquido/sólido que foi possível utilizar para esta matéria-prima, os rendimentos obtidos estão ainda aquém do desejável. Os valores obtidos são, no entanto, semelhantes aos descritos, por exemplo, para a hidrólise ácida de caules de algodão (47,9%) (Akpınar *et al.* 2011).

De um modo geral, verifica-se que a recuperação de xilano diminui com o aumento da severidade, variando o xilano recuperado nas fases sólida e líquida (sob a forma de xilose) entre 100,9 e 73,9%.

Estes valores podem dever-se a três razões: reacções de degradação, pequenas quantidades de oligossacáridos solúveis que não foram quantificadas, pequenas quantidades de açúcares solubilizados mas que não foram quantificados por terem ficado adsorvidos ao sólido após a filtração do hidrolisado. Nas condições de maior severidade (CS=2,55 e 2,63) as reacções de degradação foram, provavelmente, a razão que mais contribui para a menor recuperação de xilose no hidrolisado. Nestas condições entre 5,17 e 7,91% do xilano inicial foi recuperado na forma de furfural (dados não apresentados). A possibilidade de existência de oligossacáridos nos hidrolisados, embora não tenha sido confirmada experimentalmente, deverá ser muito baixa. Trabalhos anteriores de hidrólise da palha de sorgo com ácido sulfúrico diluído (1,4%) demonstraram que, em geral, todo o xilano solubilizado é recuperado na fracção líquida na forma monomérica (Torrado 2010). Um outro aspecto eventualmente a considerar poderá ser a elevada concentração de xilose, aliada à baixa RLS, que poderá ter limitado de algum modo a difusão de xilose no hidrolisado.

Relativamente à glucose, o seu rendimento aumenta pouco com a severidade do tratamento, o que é consistente com a baixa solubilização de glucano que ocorre. A concentração mais elevada de glucose obtida ($7,37 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) corresponde a um rendimento de 1,54 g/100 g de BAE, o que representa uma solubilização de glucano de apenas 13,7%, demonstrando assim a selectividade deste método de fraccionamento para a hidrólise da hemicelulose. De um modo semelhante à baixa produção de glucose, também a recuperação do seu produto de degradação, HMF, foi relativamente baixa, variando entre 0,70 e 1,53 g/100 g de glucano. Estes resultados são concordantes com a bibliografia,

no que diz respeito a este tipo de tratamento com palhas de sorgo (Torrado 2010) e dreche cervejeira (Carvalho *et al.* 2004a).

Uma vez que o hidrolisado obtido será utilizado como meio de cultura, foi dada atenção especial aos compostos tóxicos obtidos, para além do furfural e HMF, o ácido acético e compostos fenólicos. À semelhança do que foi apresentado para as concentrações (Quadro 3.3), os maiores recuperações em ácido acético e furfural, (34,7 e 7,91%, respectivamente) foram obtidas na condição de maior recuperação de xilose (CS=2,55). Para estes dois tipos de compostos observa-se um aumento da sua recuperação com o aumento da severidade. O aumento da recuperação de ácido acético está relacionado com a hidrólise dos grupos acetilo da matéria-prima e o aumento do furfural, com a degradação de xilose, como foi já descrito anteriormente. Sendo a solubilização dos grupos acetilo elevada e a recuperação de ácido acético na fracção líquida também significativa, o balanço aos grupos acetilo é ainda inferior aos 100%, ficando em todos os casos mais do que 30% de grupos acetilo por quantificar, tal poderá dever-se em parte a um problema analítico ou poderá ainda acontecer que uma parte dos grupos acetilo se encontre ligado a oligossacáridos, caso estes estejam presentes. A presença destes grupos ligados a oligossacáridos é frequente sobretudo em tratamento hidrotérmicos de materiais lenhocelulósicos (Carvalho *et al.* 2009a; Moniz *et al.* 2009).

Sendo a solubilização de lenhina pouco afectada pela severidade do tratamento, isto reforça a hipótese de que as elevadas concentrações de compostos fenólicos obtidas não sejam provenientes da hidrólise de lenhina, mas antes que se tratem de componentes não estruturais do BAE. As concentrações de compostos fenólicos obtidas são relativamente elevadas quando comparadas com as descritas para outros hidrolisados. (Carvalho *et al.* 2004a; Torrado 2010) descrevem as concentrações de 0,91 e 1,38 g·L⁻¹ de compostos fenólicos totais, que se referem a rendimentos da ordem de 0,75 e 0,83 g/100 g de dreche cervejeira e palha de sorgo, respectivamente. O rendimento máximo de compostos fenólicos totais foi de 0,39 g/100 g BAE, obtido para CS =2,63.

Como se pode verificar ao longo desta discussão, o coeficiente de severidade não parece ser o parâmetro mais indicado para comparar os resultados obtidos para os diferentes ensaios de hidrólise com ácido diluído, isto porque o cálculo deste parâmetro entra em linha de conta com os valores de pH e tempo, duas variáveis que não podem ser analisadas como se de uma única variável se tratasse, uma vez que, como se pode observar pela análise estatística, estas variáveis apresentam diferentes influências na hidrólise do BAE.

3.2.4 Avaliação de metodologias de destoxificação na remoção de compostos inibidores

No sentido de reduzir a inibição do crescimento microbiano em hidrolisados, existem várias abordagens possíveis para minimizar o impacto dos inibidores, nomeadamente a utilização de condições de hidrólise em que a sua formação seja evitada, proceder à sua remoção antes da bioconversão (destoxificação), promover a adaptação dos microrganismos aos hidrolisados, desenvolver estirpes capazes de resistir aos inibidores ou convertê-los em produtos que não interferem no metabolismo.

Em geral, a destoxificação, é o processo mais utilizado quer pela inevitabilidade da formação de inibidores, quer por ser o mais selectivo. Sendo cada método de destoxificação específico para certos tipos de compostos, podem ser obtidos melhores resultados através da combinação dois ou mais métodos (Lopes 2001).

O hidrolisado de BAE obtido na condição otimizada (130 min, 3,5% H₂SO₄, 130 °C, correspondente a um CS de 2,64) foi submetido a diferentes tratamentos de destoxificação, nomeadamente a correcção de pH para 5,5 (pH de cultivo) e adsorção em carvão activado. Ambos os tratamentos foram também testados em hidrolisados previamente sujeitos a um passo de evaporação que para além de permitir aumentar a concentração de monossacáridos (neste caso o hidrolisado foi concentrado duas vezes, em massa), pode também ser utilizado como método de destoxificação tendo em conta a volatilidade de alguns inibidores presentes como, o ácido acético, o ácido fórmico e furfural. A percentagem de remoção dos compostos inibidores e de monossacáridos totais do hidrolisado após cada tratamento está apresentada na Figura 3.6.

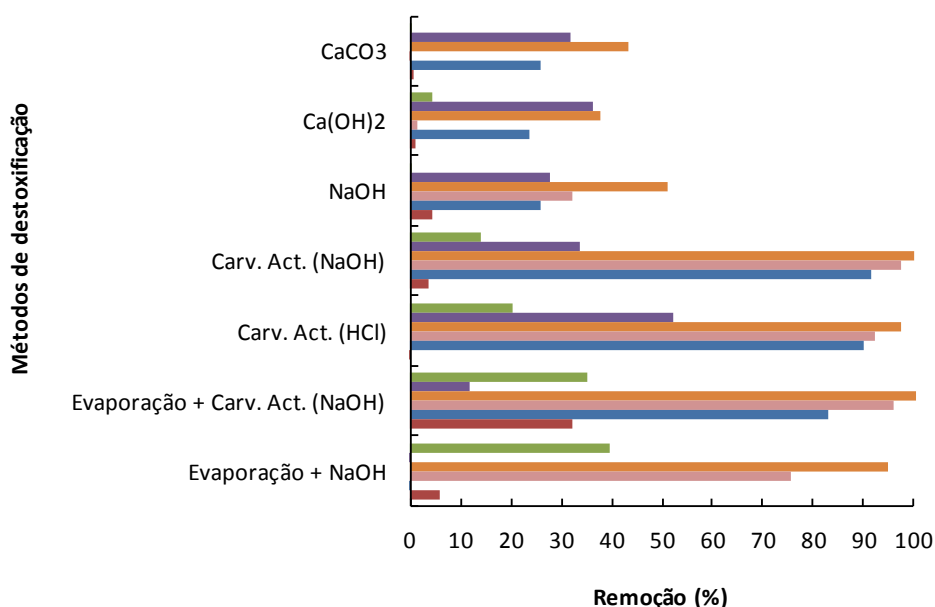


Figura 3.6 - Influência dos vários tratamentos de destoxificação na remoção de compostos inibidores e monossacáridos totais presentes no hidrolisado. Ácido acético (■), ácido fórmico (■), furfural (■), HMF (■), compostos fenólicos (■) e açúcares totais (■).

A concentração de ácido acético foi moderadamente afectada pelo tratamento com carvão activado com NaOH e HCl (14 e 20%, respectivamente) e em maior extensão, o que teve

maior impacto na remoção deste ácido alifático foi a concentração do hidrolisado por evaporação (35-39%). Outros autores também verificaram a remoção deste composto usando este método de destoxificação (Carvalho *et al.* 2005). A concentração de ácido fórmico parece não ser afectada pela evaporação e o método que mais afectou a remoção deste ácido foi o carvão activado com HCl. Dada a baixíssima concentração de ácido levulínico nos hidrolisados, qualquer um dos métodos de destoxificação aplicados removeu este ácido por completo (dados não apresentados). O método menos eficaz na remoção destes ácidos (excepto ácido fórmico), e restantes compostos inibidores, como se pode verificar na Figura 3.6, foi a correcção de pH para 5,5 com CaCO_3 ou CaOH_2 ou NaOH, resultados concordantes com a bibliografia (Carvalho *et al.* 2005). O que se pretende na realidade com este método é corrigir o pH do meio para valores adequados à actividade microbiana.

A partir da Figura 3.6 pode observar-se que os tratamentos que envolveram carvão activado reduziram consideravelmente as concentrações dos derivados de furanos. A maior remoção de HMF e furfural foi nos casos em que se aplicou carvão activado por NaOH (concentrado e não concentrado), tendo ocorrido remoções de HMF acima de 96% e 100% para o furfural. A eficiência do carvão activado para remoção deste tipo de inibidores foi também observada por outros autores (Mussatto *et al.* 2004b)(Carvalho *et al.* 2005). A concentração também se revelou muito eficiente na remoção dos derivados de furanos, removendo cerca de 75% de HMF e 95% de furfural. Sendo o furfural um composto volátil, pode facilmente ser removido por evaporação à temperatura utilizada. Outros autores descreveram também percentagens de remoção de furfural elevadas usando o método de concentração (Larsson *et al.* 1999a; Lopes 2001; Parajó *et al.* 1998a). No caso da correcção de pH, apenas o tratamento com NaOH demonstrou reduzir moderadamente a concentração de HMF (32%). Já a concentração do furfural foi reduzida de forma moderada em todos as correcções de pH (entre 43% a 51%). Estes valores de remoção, apesar de serem mais baixos que os obtidos com outros métodos de destoxificação, são ainda superiores às remoções habitualmente referidas para a correcção de pH do hidrolisado de dreche cervejeira e palhas de sorgo (Lopes 2001; Medeiros 2003; Torrado 2010).

Para além dos inibidores já referidos, foi também avaliada a remoção de compostos fenólicos. À excepção da evaporação, que foi o único método que não removeu compostos fenólicos, todos os restantes métodos aplicados permitiram a remoção de compostos fenólicos, destacando-se os métodos com carvão activado, que permitem remoções (medidas pelo método espectrofotométrico) entre 90 e 92% dos fenólicos do hidrolisado, sendo este último valor correspondente ao carvão activado com NaOH. Em termos de perfil, observa-se uma diminuição significativa de todos os compostos fenólicos presentes, de uma forma não-selectiva.

Estes resultados revelaram-se substancialmente mais eficientes quando comparado com outros trabalhos já publicados, onde se conseguiram percentagens de remoção de compostos fenólicos apenas de 58% e 27% (Carvalho *et al.* 2005).

Para além dos efeitos benéficos da utilização de métodos de destoxificação em hidrolisados, é importante salientar ainda os efeitos negativos, nomeadamente a perda de açúcares, que estes métodos por vezes acarretam. Como se pode observar na Figura 3.6, todos os métodos utilizados levaram de alguma forma a perdas de açúcares nos hidrolisados. A combinação da evaporação com carvão activado por NaOH foi de onde resultou uma perda maior de monossacáridos totais (32%), afectando sobretudo a xilose e a arabinose. O carvão activado com HCl e com NaOH revelou ser um bom método de destoxificação a considerar, apresentado apenas 3,5% de perda de monossacáridos totais no caso do carvão activado com NaOH, o que poderá considerar-se dentro do erro experimental. Num estudo publicado em que se utilizou carvão activado com HCl em hidrolisado de dreche cervejeira, a perdas foram de 13% (Carvalho *et al.* 2005).

Considerando a composição do hidrolisado obtido em condições optimizadas, nomeadamente a concentração elevada de possíveis compostos inibidores, como o furfural ($3,83 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) e de compostos fenólicos ($4,55 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) (Quadro 3.3), será de destacar a importância da aplicação dos métodos mais eficientes para a remoção destes compostos: carvão activado com NaOH, carvão activado com HCl e a combinação de evaporação e carvão activado com NaOH. Para a fase seguinte do trabalho a escolha recaiu sobre os métodos: carvão activado com NaOH e a combinação de evaporação e carvão activado com NaOH. O carvão activado com HCl foi um método logo aqui excluído para o estudo da fermentescibilidade do hidrolisado, por se tratar de um método que comparativamente ao do carvão activado com NaOH não tem muitas diferenças em termos de eficiência e que acaba por ser um método mais trabalhoso devido à necessidade de um acerto de pH com NaOH sólido, antes e após a destoxificação.

3.3 Estudo da fermentescibilidade do hidrolisado

3.3.1 Selecção de estirpes de *D. hansenii*

A capacidade e a eficiência na bioconversão de xilose em xilitol por diferentes estirpes da levedura *D. hansenii* foram avaliadas em termos fisiológicos, através de estudos do comportamento de seis estirpes: CCMI 941 e CCMI 496 da variedade *fabryi* e CCMI 493, CCMI 494, CCMI 495 e CCMI 470 da variedade *hansenii*, em meio quimicamente definido (MQD) (Anexo II).

Na Figura 3.7 são apresentados os perfis de crescimento dessas estirpes.

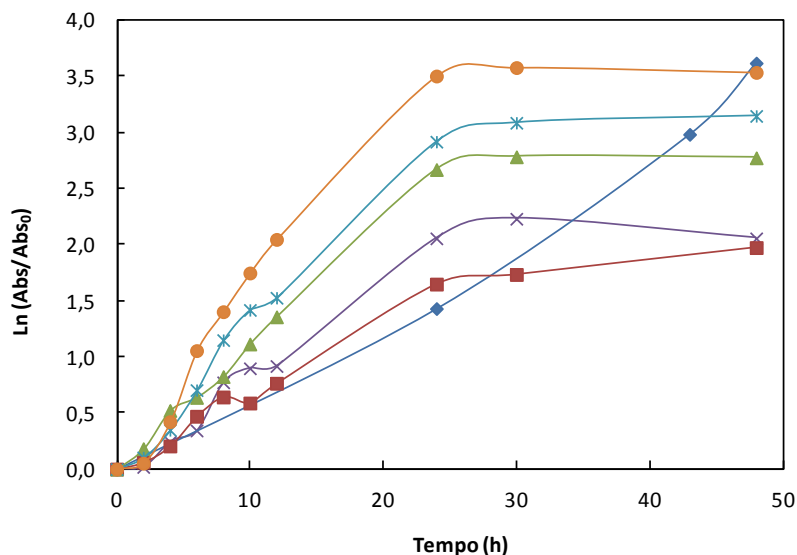


Figura 3.7 - Perfis de crescimento da levedura *D. hansenii* em meio quimicamente definido. Estirpes: CCMI 941 (●), CCMI 496 (×), CCMI 493 (◆), CCMI 494 (■), CCMI 495 (▲), e CCMI 470 (×).

Comparando os perfis de crescimento das seis estirpes observam-se algumas diferenças entre as estirpes da variedade *hansenii* e da variedade *fabryi*. As estirpes da variedade *fabryi* (CCMI 941 e CCMI 496) apresentam uma fase de latência inferior à observada na generalidade para as estirpes da variedade *hansenii*, com a exceção da estirpe CCMI 495 (ver Figura 3.8). As estirpes da variedade *fabryi* apresentam também um crescimento mais acentuado (maiores taxas específicas de crescimento e valores mais elevados da densidade óptica final) (ver Figura 3.7 e 3.8).

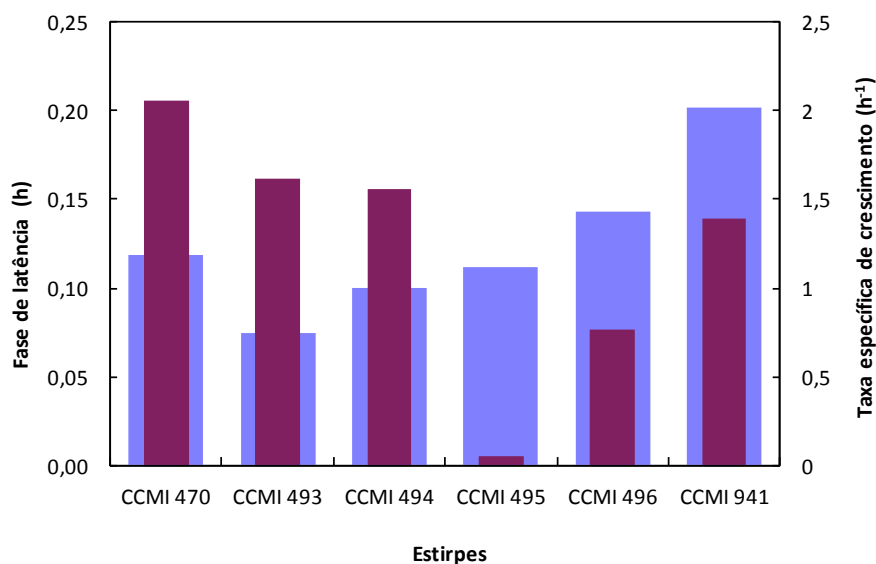
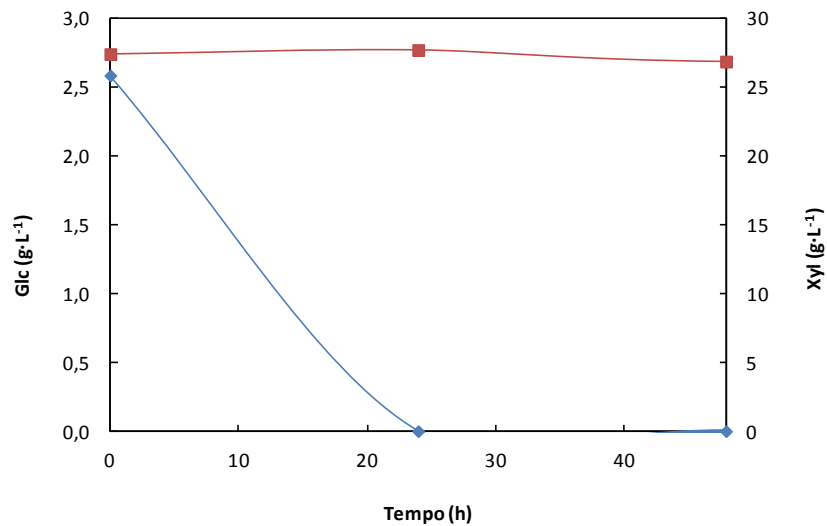


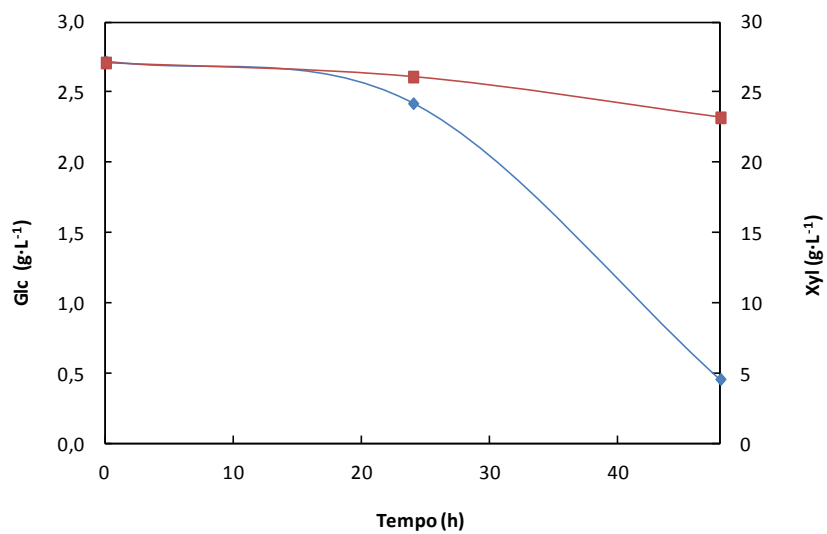
Figura 3.8 - Fase de latência (λ) (■) e taxa específica de crescimento (μ) (■) de diferentes estirpes da levedura *D. hansenii* em meio quimicamente definido.

Entre as estirpes da variedade *hansenii* a exceção é a CCMI 493, que embora apresente uma taxa específica de crescimento mais baixa, consegue, ao contrário das restantes

prolongar a sua fase exponencial, o que pode ser uma indicação de que poderá ter um metabolismo de pentoses mais eficiente. Na realidade, se observarmos o perfil de assimilação de açúcares (Figura 3.9) podemos verificar que a estirpe 493 tem um perfil totalmente diferente da estirpe 494, que se apresenta como exemplo do perfil típico encontrado para as restantes estirpes da variedade *hansenii*. Nestas apenas ocorreu assimilação de glucose, mas não de xilose. Pelo contrário, as estirpes da variedade *fabryi* apresentam um consumo de xilose significativo.



a)



b)

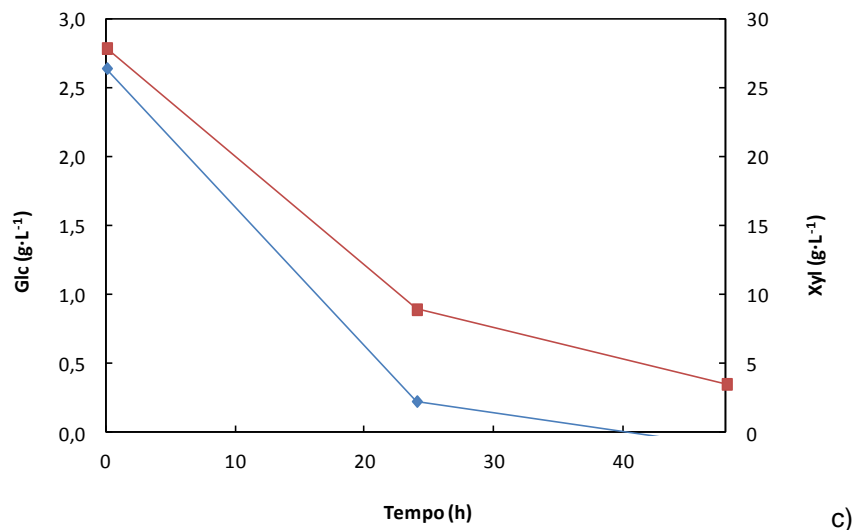


Figura 3.9 - Perfis do consumo de glucose (■) e xilose (■) pelas estirpes CCMI 494 (a), CCMI 493 (b) e CCMI 941 (c) da levedura *D. hansenii* em meio quimicamente definido.

Estes valores são traduzidos nas taxas metabólicas encontradas (Figura 3.10). De entre as estirpes da variedade *hansenii*, a estirpe CCMI 493, é a que apresenta uma produtividade celular e rendimento em biomassa mais baixos, $0,01 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ e $0,04 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$, respectivamente, mas a maior taxa de consumo de xilose, $0,08 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, tais razões levam a colocar a hipótese de que esta estirpe possa vir a canalizar a sua conversão de carbono para a produção de xilitol em detrimento da produção de biomassa, parecendo também ter uma maior robustez comparativamente a outras estirpes.

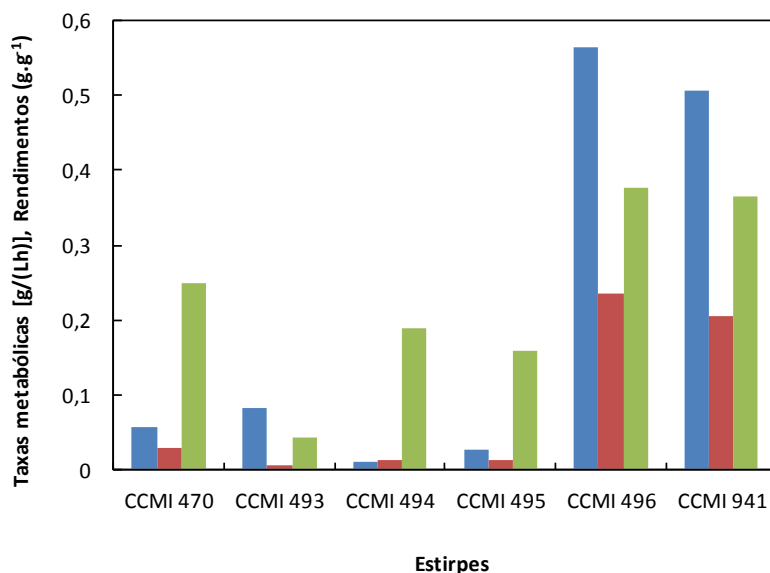


Figura 3.10 - Taxa volumétrica de consumo de xilose (Q_{xyl}) (■), produtividade celular (Q_x) (■) e rendimento em biomassa ($Y_{x/s}$) (■) de diferentes estirpes da levedura *D. hansenii* em meio quimicamente definido.

Como se pode observar pela Figura 3.10, também as produtividades celulares e os rendimentos em biomassa das estirpes da variedade *fabryi* são superiores às das estirpes

da variedade *hansenii*, atingindo as primeiras concentrações finais de biomassa entre 10,15 a 11,59 g·L⁻¹, correspondente a rendimentos em biomassa da ordem dos 0,37-0,38 g·g⁻¹. No entanto, a estirpe CCMI 941 possui uma produtividade celular mais baixa (0,21 g·L⁻¹·h⁻¹) e uma menor taxa de consumo de xilose (0,51 g·L⁻¹·h⁻¹), que a outra estirpe da mesma variedade (CCMI 496), o que sugere que possa ser mais eficiente na produção de xilitol do que esta.

Dado que estes crescimentos foram feitos em condições de excesso de oxigénio, em nenhum dos casos, ocorreu produção de polióis.

Pelas razões acima mencionadas escolheu-se as estirpes CCMI 493 e 941 para prosseguir o trabalho, nomeadamente, na pesquisa de quais os tipos de suplementos que podem maximizar a produção de polióis, os efeitos da concentração ou destoxificação do hidrolisado, e da influência da limitação de oxigénio na produção de polióis. Os dados da literatura mostram que a adição de nutrientes complexos, como por exemplo, extracto de levedura, peptona e água de maceração de milho, favorecem a assimilação de pentoses em *D. hansenii* (Carvalho *et al.* 2007; Silva-Fernandes *et al.* 2008). Também a destoxificação e/ou concentração do hidrolisado permite, em geral, uma produção de polióis manifestamente superior (Silva-Fernandes *et al.* 2008), ainda que nalguns casos, os melhores resultados tinham sido observados em hidrolisados não destoxificados e/ou não concentrados (Silva-Fernandes *et al.* 2008; Torrado 2010).

Segundo Nakase e Suzuki (Nakase *et al.* 1985), fisiologicamente, as duas variedades podem ser diferenciadas pela temperatura máxima de crescimento. A temperatura máxima de crescimento para a variedade *hansenii* é 31-35 °C, enquanto para a variedade *fabryi* é 36-39 °C (Hofrichter 2010; Nakase *et al.* 1985), pelo que poderá ser interessante, sob o ponto de vista tecnológico, estudar o comportamento destas duas variedades.

Foi também já avançada a hipótese de que as diferenças encontradas a nível da bioconversão de pentoses entre as duas variedades se deva ao facto de as estirpes da variedade *hansenii* possuírem uma diferença ao nível do funcionamento da enzima glucose-6-fosfato-desidrogenase, acabando esta por não promover da mesma forma nas duas variedades a produção do NADPH necessário para a redução da xilose a xilitol. No entanto, esta hipótese é contrariada pelos trabalhos em estirpes da variedade *hansenii* (por ex. (Converti *et al.* 2001; Diz *et al.* 2002), onde se observa um eficaz metabolismo da xilose.

3.3.2 Avaliação preliminar do efeito da destoxificação e da suplementação do hidrolisado de BAE na produção de xilitol pelas estirpes CCMI 941 e CCMI 493

A concentração máxima permitida para cada um dos inibidores num meio para bioconversão não é possível ser estabelecida, uma vez que depende de muitos factores, tais como o grau de adaptação dos microrganismos ao meio, o processo de bioconversão empregue e a presença simultânea de outros inibidores, que podem ter efeitos sinérgicos, da

suplementação e do tipo e concentração da fonte de carbono (Duarte *et al.* 2005; Duarte *et al.* 2006; Mussatto *et al.* 2005). A escolha de um método de destoxificação tem que ser feita caso a caso.

De modo a avaliar o grau de inibição do crescimento microbiano causado pelo hidrolisado de BAE produzido nas condições otimizadas, as estirpes CCMI 941 e 493 foram cultivadas em hidrolisado destoxificado (com carvão activado por NaOH) e em hidrolisado não destoxificado (sujeito apenas a correcção do pH a 5,5 com NaOH). Paralelamente, o hidrolisado foi suplementado com borras de vinho de forma a avaliar e testar o efeito destas na bioconversão, uma vez que anteriormente foi demonstrado que este suplemento foi eficiente quando utilizado em meios de cultura com base em hidrolisados, para a produção de ácido láctico por *Lactobacillus pentosus* (Bustos *et al.* 2005). Como comparação foram utilizados hidrolisados suplementados com nutrientes quimicamente definidos (TEVM) a fim de excluir possíveis limitações nutricionais dos hidrolisados.

Na Figura 3.11 é apresentado o perfil de crescimento da levedura *D. hansenii* CCMI 941 obtido em hidrolisado não destoxificado e destoxificado com carvão activado, suplementado com borras de vinho ou com TEVM.

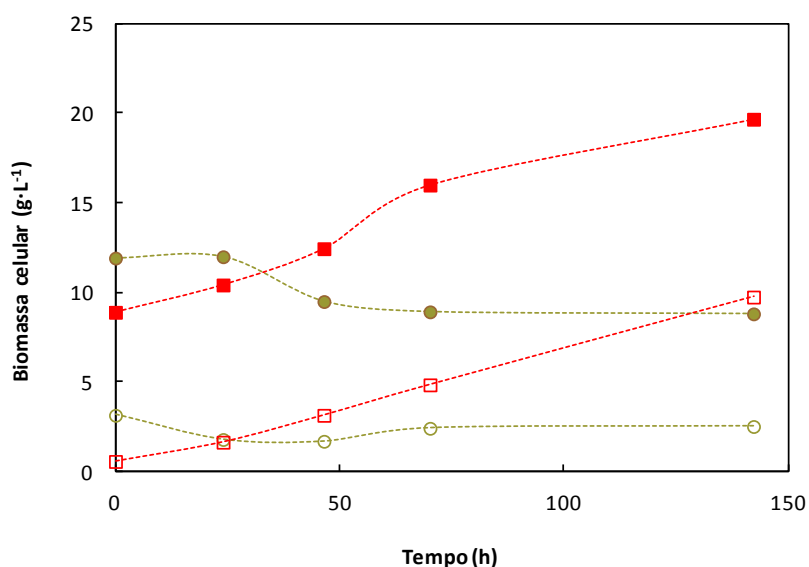


Figura 3.11 - Variação da biomassa da levedura *D. hansenii* CCMI 941 (peso seco) em hidrolisado não destoxificado suplementado com borras de vinho (●), destoxificado suplementado com borras de vinho (■) e em hidrolisado não destoxificado suplementado com TEVM (○), destoxificado suplementado com TEVM (□).

Os resultados obtidos sugerem que enquanto para os hidrolisados não destoxificados não houve crescimento, para os destoxificados observou-se um aumento significativo da biomassa (Figura 3.11). Nos hidrolisados não destoxificados verificou-se que a concentração dos inibidores, assim como dos açúcares, permanece inalterada (dados não apresentados). Já no caso dos hidrolisados destoxificados ocorreu consumo de açúcares, tendo-se esgotado primeiro a glucose, o consumo da xilose tornou-se significativo a partir

das 24 h e o consumo de arabinose a partir das 70 h de cultivo. Os únicos inibidores presentes e em concentrações elevadas são o ácido fórmico e o ácido acético, dos quais apenas o ácido acético é significativamente consumido (cerca de 50%). Como consequência da destoxificação aplicada, os outros possíveis inibidores encontram-se em concentrações muito baixas. A partir das 24 h observa-se uma produção significativa de polióis que atinge a sua concentração mais elevada às 142 h, com 5,9 e 13,8 g·L⁻¹ para o hidrolisado destoxificado suplementado com borras de vinho e para o hidrolisado destoxificado suplementado com TEVM, respectivamente.

Apesar de já se ter observado crescimento e produção de polióis para esta levedura em hidrolisados não destoxificados de dreche cervejeira (Carvalho *et al.* 2005) e de bagaço de cana-de-açúcar (Sampaio *et al.* 2007b) o hidrolisado não destoxificado de BAE apresenta concentrações de compostos inibidores superiores aos anteriores em ácido acético, furfural e compostos fenólicos, o que poderá explicar, em parte, a ausência de crescimento. (Duarte *et al.* 2005) verificou que em meio quimicamente definido a levedura *D. hansenii* na presença de uma concentração de 9 g·L⁻¹ de ácido acético não apresentou qualquer crescimento. Verificou também que para elevadas concentrações de furfural (5 g·L⁻¹) e compostos fenólicos (1 - 3 g·L⁻¹, dependendo do tipo de composto fenólico) a taxa específica de crescimento e a produtividade celular decrescem significativamente. Estes dois últimos tipos de inibidores foram já referidos por limitar o consumo e assimilação de pentoses por esta levedura, promovendo uma mudança metabólica para processos de manutenção em vez da produção de metabolitos (Duarte *et al.* 2005). Relativamente aos compostos fenólicos há ainda outro aspecto a ter em conta: a presença no hidrolisado não destoxificado de BAE de compostos fenólicos como o hidroxitirosol e ácido vanílico (ver ponto 3.1.2), também já detectados noutras ocasiões em bagaço de azeitona (Niaounakis *et al.* 2006), que podem estar na origem do desempenho aquém do esperado para esta levedura neste hidrolisado. Também a possível existência de outros compostos fenólicos, estes lipofílicos, têm sido referidos por serem capazes de reagir com membranas biológicas de microrganismos levando à perda da sua integridade, impedindo a sua função como barreira selectiva e matriz de enzimas (Duarte *et al.* 2005).

Além das elevadas concentrações de alguns dos compostos inibidores, o efeito causado pela presença concomitante de ácidos alifáticos, furfural, HMF e compostos fenólicos, foi já referido noutros estudos como o possível causador da inibição em *D. hansenii* (Carvalho *et al.* 2007; Duarte *et al.* 2005; Sampaio *et al.* 2007a) e noutras leveduras. Especificamente foi já verificado que os compostos fenólicos aliados a elevadas concentração de ácido acético potenciam os efeitos tóxicos deste ácido, afectando negativamente o crescimento de *Candida guilliermondii* (Mussatto *et al.* 2005). Outros autores, descrevem que o efeito sinérgico de furfural e ácido acético afectam negativamente o crescimento de *S. cerevisiae* (Palmqvist 1998), e em *Kluyveromyces marxianus* verificou-se que a combinação de vanilina

com furfural tem efeitos sinérgicos significativos na redução do crescimento da levedura (Oliva *et al.* 2004).

Nos hidrolisados de BAE destoxificados, seria de esperar que as ainda elevadas concentrações de ácido acético ($11,5 - 12,4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) pudessem estar a afectar negativamente a sua bioconversão e portanto o rendimento em polióis, no entanto, o arejamento aqui aplicado, embora não muito elevado, parece ter sido o suficiente para permitir a assimilação deste ácido. A disponibilidade de oxigénio foi já verificada por (Morita *et al.* 2000; van Zyl *et al.* 1991), por determinar o efeito tóxico do ácido acético no metabolismo celular de leveduras. Outro aspecto que poderá ter contribuído para a assimilação de açúcares, poderá ter sido a presença de ácido fórmico, pois apesar de ser visto como um inibidor, foi já verificado em bioconversões realizadas com *D. hansenii*, que concentrações baixas deste ácido ($1,50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), geram um efeito tampão, permitindo uma maior assimilação dos monossacáridos por parte desta (Duarte *et al.* 2005).

Para o hidrolisado destoxificado suplementado com TEVM, observa-se uma taxa específica de crescimento 4,4 vezes superior à obtida no hidrolisado suplementado com borras de vinho (dados não apresentados). Estas diferenças sugerem que a taxa específica de crescimento máxima para além de ser afectada pela presença de inibidores é afectada pela carência do hidrolisado em algum ou alguns nutrientes essenciais para a bioconversão pela levedura, e que as borras de vinho também parecem não possuir ou possuir em concentrações demasiado baixas. Este resultado vem assim reafirmar a importância da suplementação do meio no crescimento e formação de produtos (Carvalho *et al.* 2007).

Na Figura 3.12 é apresentada a produtividade celular, produtividade volumétrica e concentração máxima de polióis.

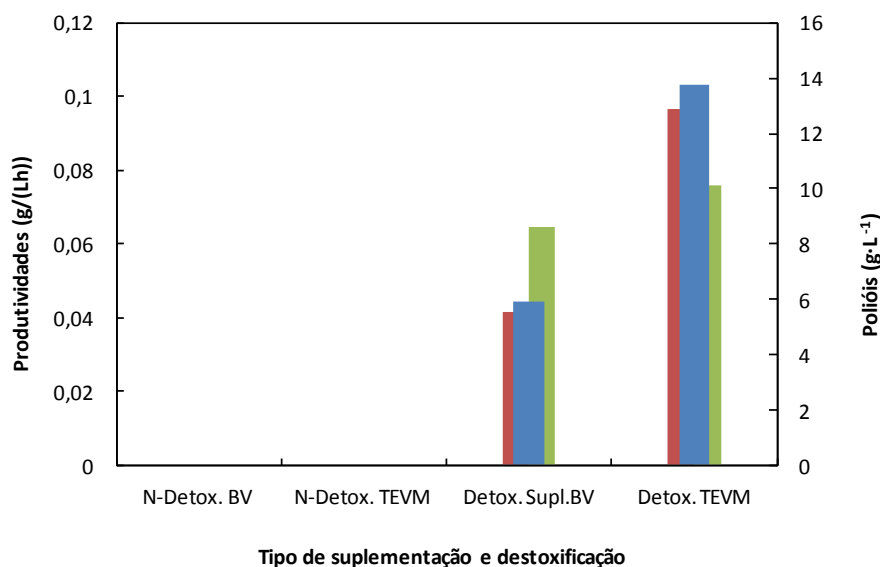


Figura 3.12 - Produtividade volumétrica em polióis ($Q_{\text{polióis}}$) (■), produtividade celular (Q_x) (■) e concentração máxima de polióis produzidos ([polióis]) (■) resultantes do crescimento da levedura *D. hansenii* CCM1 941 em hidrolisado não-destoxificado suplementado com borras de vinho (N-Detox.BV),

destoxificado suplementado com borras de vinho (Destox.BV) e em hidrolisado não-destoxificado suplementado com TEVM (N-Destox.TEVM), destoxificado suplementado com TEVM (Destox.TEVM).

Como se pode observar pela Figura 3.12, a produção de polióis apenas ocorre para os ensaios em que foram utilizados hidrolisados destoxificados, sendo atingida a concentração máxima de $5,94 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e $13,77 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ao fim de 142 h de cultivo (hidrolisado suplementado com borras de vinho e TEVM, respectivamente), correspondente a uma produtividade em polióis de $0,04 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ e $0,10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, respectivamente. Para além dos polióis e biomassa, não se observou a produção de qualquer outro metabolito.

Na comparação com outros hidrolisados destoxificados e suplementados com TEVM, a bioconversão do hidrolisado de BAE apresenta um valor de produtividade em polióis e em biomassa baixo. Em parte, esses valores podem justificar-se pela concentração de inóculo utilizada ser, talvez, demasiado baixa ($0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). Um estudo realizado com esta estirpe em hidrolisado de dreche cervejeira suplementado com TEVM, em que a concentração de inóculo utilizada foi de $4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, revelou uma produtividade celular de $0,27 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ e uma produtividade em polióis de $0,55 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. Outro aspecto que poderá estar a contribuir para que os valores de produtividade em polióis e em biomassa não sejam mais elevados poderá ser a taxa de arejamento. Uma vez que este ensaio foi realizado em balões de 500 mL e sem anteparas, a taxa de arejamento fornecida poderá ter sido demasiado baixa e, conseqüentemente, a intensidade da restrição de oxigénio imposta poderá ter impedido uma maior produção de xilitol. Embora na literatura a produção de polióis seja favorecida em condições de limitação de oxigénio (Winkelhausen *et al.* 1998), a definição dessa limitação é por vezes difícil de determinar, pois existe uma interdependência entre a taxa de arejamento, o crescimento celular e a taxa global e específica de consumo de oxigénio.

A análise global destes resultados permite concluir que o principal problema na limitação do crescimento nos hidrolisados não destoxificados parece ser a presença de levadas concentrações de inibidores e o seu efeito sinérgico, o que justifica recorrer a uma metodologia de destoxificação para a sua remoção. Já no hidrolisado destoxificado suplementado com borras de vinho, além de ser possível algum crescimento, este é ainda pouco significativo, tendo as borras de vinho demonstrado não ser o suplemento mais apropriado. Torna-se necessário testar outros suplementos de modo a encontrar um suplemento que leve a maximizar a produção de polióis. Já os resultados obtidos com o hidrolisado suplementado com TEVM sugerem que a introdução de um inóculo mais forte poderá ser uma opção a considerar de modo a obter um processo mais eficiente.

A diversidade de parâmetros encontrados para as condições estudadas confirma a importância das variáveis estudadas, a fim de chegar a uma eficiente utilização dos açúcares e da produção de polióis.

Na Figura 3.13 é apresentado o perfil de crescimento da levedura *D. hansenii* CCMI 493 obtido em hidrolisado não destoxificado e destoxificado com carvão activado, suplementado com borras de vinho ou com TEVM.

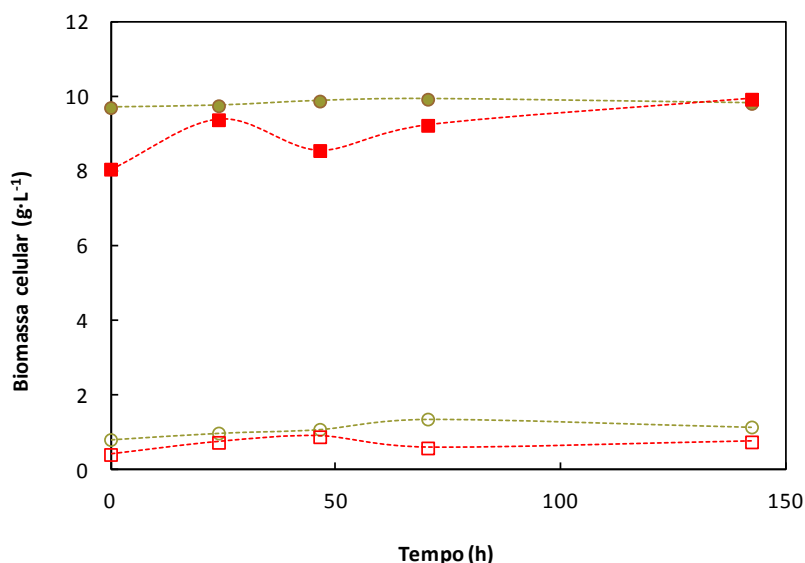


Figura 3.13 - Perfil de peso seco da levedura *D. hansenii* CCMI 493 em hidrolisado não destoxificado suplementado com borras de vinho (●), destoxificado suplementado com borras de vinho (■) e em hidrolisado não destoxificado suplementado com TEVM (○), destoxificado suplementado com TEVM (□).

No ensaio realizado com a estirpe CCMI 493 não ocorreu crescimento (Figura 3.13), nem se observou qualquer consumo de açúcares ou inibidores, seja em hidrolisado destoxificado ou em hidrolisado não destoxificado. Concordando com a não ocorrência de crescimento, não ocorreu a produção de polióis ou de quaisquer outros metabolitos.

Sabendo que se tratam dos mesmos hidrolisados a ausência de crescimento nos hidrolisados de BAE não destoxificados poderá dever-se aos mesmos motivos apontados para a ausência de crescimento pela estirpe CCMI 941, no entanto, nos hidrolisados destoxificados a ausência de crescimento, poderá dever-se a uma menor tolerância da estirpe aos inibidores. Uma vez que não foi possível observar crescimento, também não foi possível averiguar qual o efeito dos diferentes suplementos na bioconversão por esta estirpe.

3.3.3 Identificação dos factores que afectam a produção de xilitol por *D. hansenii* em hidrolisado de BAE

Como já se verificou anteriormente (3.3.2), o impacto do hidrolisado no desempenho dos microrganismos deve ser cuidadosamente estudado. Na verdade, factores como a suplementação, a destoxificação, a concentração de açúcares e disponibilidade de oxigénio são considerados os parâmetros mais relevantes que influenciam o bioprocessamento e, consequentemente, a produção de xilitol (Sampaio *et al.* 2008). Como estes factores estão fortemente ligados entre si, o seu estudo deve ser cuidado. Nesse sentido recorreu-se a um

método de planeamento estatístico experimental para identificação dos factores responsáveis por afectar a produção de xilitol por *D. hansenii* em hidrolisado de BAE. Foi utilizado um planeamento estatístico de Plackett-Burman para 12 experiências em que os factores estudados foram: a concentração do hidrolisado, a destoxificação (com carvão activado por NaOH), a disponibilidade de oxigénio, e a adição de suplementos: extracto de levedura (YE), peptona, água de maceração de milho (CSL) e solução de TEVM (Quadro 3.7).

Quadro 3.7 – Níveis de operação das variáveis independentes de acordo com a matriz de Plackett-Burman para 12 experiências.

Exp.	Variáveis independentes						
	Vt/Vliq ^a	Conc.	YE ^b	Peptona ^b	TEVM ^b	CSL ^b	Destox
1	1000 ^c /80	2x	0	1,75	6,8	5	Não
2	500/80	2x	3	0	6,8	5	Sim
3	1000 ^c /80	0	3	1,75	0	5	Sim
4	500/80	2x	0	1,75	6,8	0	Sim
5	500/80	0	3	0	6,8	5	Não
6	500/80	0	0	1,75	0	5	Sim
7	1000 ^c /80	0	0	0	6,8	0	Sim
8	1000 ^c /80	2x	0	0	0	5	Não
9	1000 ^c /80	2x	3	0	0	0	Sim
10	500/80	2x	3	1,75	0	0	Não
11	1000 ^c /80	0	3	1,75	6,8	0	Não
12	500/80	0	0	0	0	0	Não

^a Razão volume total do balão:Volume do meio. ^b Concentrações finais (g·L⁻¹). ^c Erlenmeyers com anteparas

Como já foi visto anteriormente (3.2.4), a composição do hidrolisado é significativamente afectada pela evaporação e pela destoxificação. O hidrolisado foi concentrado duas vezes em massa o que permitiu aumentar a concentração de açúcares e, nalguns casos, a remoção de inibidores. O furfural, por exemplo, foi quase todo removido pelo processo de evaporação. Ainda que a concentração por evaporação permita a remoção de uma percentagem do ácido acético e fórmico, a concentração destes ácidos nos meios concentrados aumenta ligeiramente pelo facto do efeito da evaporação não ser tão significativo, como acontece com o furfural (Quadro 3.8). A destoxificação também induz alguma perda de açúcares, mais significativa para as pentoses do que para as hexoses.

Na Figura 3.14 estão representados os resultados do crescimento observado para as 12 experiências.

Quadro 3.8- Composição (g·L⁻¹) dos meios de cultivo para o estudo da produção de xilitol de acordo com a matriz de Plackett-Burman para 12 experiências.

Exp.	Composição							
	Glc	Xyl	Ara	HAc	HForm	HLev	Furfural	HMF
1	5,26	28,15	3,90	15,59	3,82	0,00	0,64	0,04
2	3,77	63,17	5,67	13,71	3,96	0,00	0	0,07
3	1,83	31,82	2,89	11,41	2,77	0,00	0,29	0,02
4	3,80	63,39	5,80	14,18	4,48	0,00	0	0,01
5	2,65	18,27	2,15	11,47	1,92	0,00	0,93	0,10
6	1,84	31,72	2,87	11,34	2,74	0,00	0,26	0,02
7	1,70	31,25	2,80	11,23	2,66	0,00	0,27	0,02
8	5,67	28,93	4,01	16,08	3,96	0,00	0,55	0,05
9	3,95	66,96	6,09	14,92	4,72	0,00	0	0,01
10	5,49	28,53	3,99	15,98	3,98	0,00	0,44	0,04
11	2,50	18,33	2,18	11,59	1,87	0,00	0,85	0,04
12	2,62	18,81	2,24	11,90	1,92	0,00	0,93	0,04

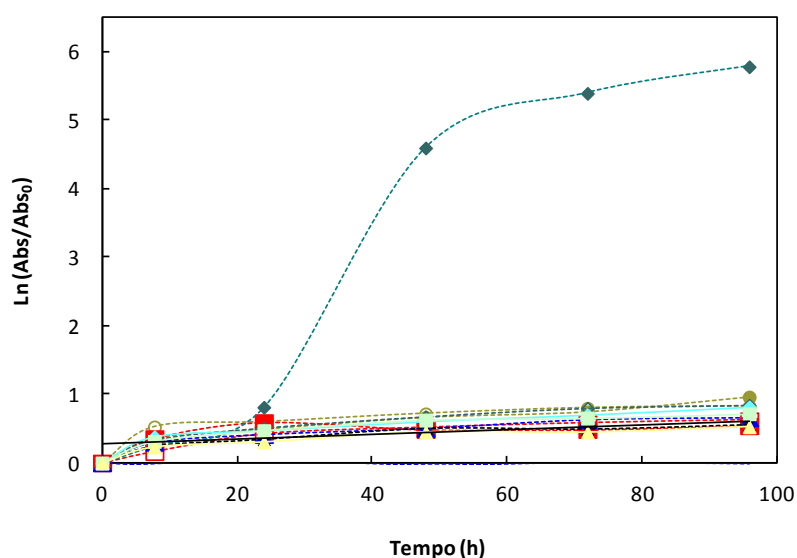


Figura 3.14 - Perfis de crescimento da estirpe *D. hansenii* (estirpe CCMI 941) em hidrolisado preparado nas diferentes condições segundo a matriz Plackett-Burman. Balão 1 (●), balão 2 (○), balão 3 (■), balão 4 (□), balão 5 (▲), balão 6 (△), balão 7 (◆), balão 8 (◇), balão 9 (×), balão 10 (◇), balão 11 (■), balão 12 (▲).

Tal como se pode observar pela Figura 3.14, a experiência 7 (hidrolisado destoxificado, não concentrado, suplementado com TEVM num balão de 1000 mL com anteparas) foi a única em que se observou um crescimento significativo. Em qualquer das outras experiências não ocorreu consumo de açúcares ou inibidores. Na experiência 7 observou-se uma fase de latência relativamente expressiva (19 h) embora a estirpe tenha apresentado uma taxa específica de crescimento elevada (0,16 h⁻¹) o qual foi acompanhada pelo consumo simultâneo de glucose, xilose e ácido acético (Figura 3.15). O consumo destes três substratos foi acompanhado pelo aumento da produção de polióis que atingiu o seu máximo

às 72 h ($8,23 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), quando a concentração de xilose era de cerca de $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. O consumo de arabinose teve início após as 48 h, logo após o esgotamento da glucose e quando a concentração de xilose era de $21,6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. O ácido fórmico estando presente no meio só foi consumido quando se deu o esgotamento dos outros nutrientes.

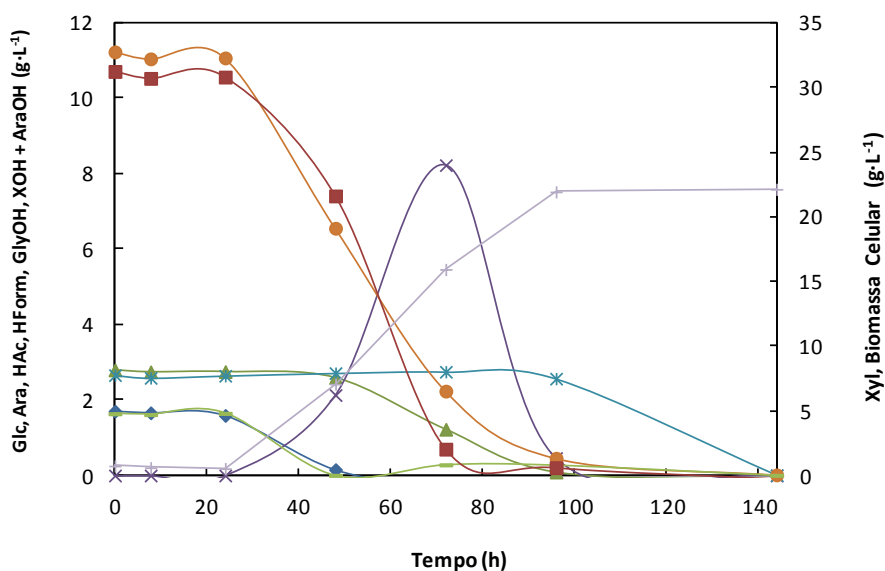


Figura 3.15 - Perfis de substratos, peso seco da biomassa e xilitol (exp. 7) pela levedura *D. hansenii* (estirpe CCM1 941) em hidrolisado destoxificado com TEVM. Glucose (◆), xilose (■), arabinose (▲), ácido acético (●), ácido fórmico (×), glicerol (→), xilitol + arabinol (×) biomassa celular (+).

Quando se compara os valores aqui obtidos com os descritos no ponto 3.3.2, é possível verificar que se obtêm produtividades semelhantes ($0,11$ contra $0,10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$), mas uma concentração máxima de polióis mais baixa e um menor rendimento ($0,27$ contra $0,40 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$). Esta diferença poderá dever-se a um maior arejamento neste ensaio, uma vez que aqui foi utilizado um balão de 1000 mL com anteparas. Este aumento de arejamento, provavelmente favoreceu o crescimento celular por um aumento da disponibilidade de oxigênio, aumentando assim a manutenção celular e respectivos requisitos de crescimento em detrimento da formação de xilitol. Estes resultados vão de encontro aos obtidos por (Sampaio *et al.* 2008) e por (Silva-Fernandes *et al.* 2008) na bioconversão com *D. hansenii* em MQD e em hidrolisado de palha de trigo, respectivamente, em que também observaram que o aumento do arejamento conduz à redução do tempo necessário para o consumo de xilose e a uma menor produção de xilitol. Embora na literatura a produção de polióis seja descrita por ser favorecida em condições de limitação de oxigênio (Winkelhausen *et al.* 1998), a definição dessa limitação é por vezes difícil de determinar, pois existe uma interdependência entre a taxa de arejamento, o crescimento celular e a taxa global e específica de consumo de oxigênio. Estas duas últimas taxas por sua vez são influenciadas pela concentração de substrato inicial, ou seja, para uma mesma concentração celular, quanto mais elevada for a concentração de substrato (açúcares e compostos inibidores), maiores são as necessidades de oxigênio, o que indica que os níveis de oxigênio no meio

também são importantes para a metabolização dos inibidores. Poderão ser exemplo disto mesmo, os diferentes rendimentos em polióis verificados para a experiência 7 e o ensaio do ponto 3.3.2, tendo em conta as elevadas concentrações de ácido acético (11,23 e 11,48 g·L⁻¹, respectivamente), pois tal sugere que o arejamento mais elevado nesta condição (experiência 7) permitiu aumentar as taxas de conversão, minimizando assim os efeitos deste inibidor. Tal também se poderia aplicar aos compostos fenólicos presentes, mas sendo a concentração destes ser inferior a 0,5 g·L⁻¹, pressupõe-se que os resultados obtidos dever-se-ão essencialmente ao metabolismo do ácido acético.

Comparando os resultados obtidos com a literatura, pode afirmar-se que em termos de produtividade e rendimento em xilitol, os resultados obtidos encontram-se em linha com outras leveduras e hidrolisados. A produção de xilitol por *Candida parapsilosis* NRRL Y-2315 (Sepúlveda-Huerta *et al.* 2006) a partir de hidrolisado de palha de sorgo em frascos agitados, apresenta uma produtividade semelhante, mas um rendimento inferior (0,12 g·L⁻¹·h⁻¹ e 0,27 g·g⁻¹, respectivamente). Para hidrolisados derivados de subprodutos da oliveira, *Pachysolen tannophilus* em hidrolisado de caroços de azeitona (Cuevas *et al.* 2009) e *Candida tropicalis* em hidrolisado de podas de oliveira (Martin *et al.* 2010), apresentam um rendimento em xilitol muito inferior aos determinados neste estudo, 0,13 g·g⁻¹.

D. hansenii NRRL Y-7426 cultivada em hidrolisado de eucalipto destoxificado com carvão (Domínguez *et al.* 1996), utilizando o sistema de reactor contínuo com agitação, obteve-se um rendimento em xilitol de 0,28 g·g⁻¹, semelhante/menor aos rendimentos obtidos neste trabalho. Ainda assim, é importante referir que neste trabalho, não se atingiu a performance descrita para a levedura *D. hansenii* CCMI 941 em hidrolisados hemicelulósicos de palhas de sorgo (Torrado 2010) e dreche cervejeira (Carvalho *et al.* 2005).

Pelas mesmas razões mencionadas em 3.3.2, todos os hidrolisados concentrados (experiências 1,2,4,8,9 e 10), tal como os não destoxificados (experiências 1,5,8,10,11 e 12) possuem concentrações de inibidores elevadas que não permitem o crescimento da levedura *D. hansenii*, o que demonstra que neste hidrolisado é imprescindível a destoxificação. Além disso, a concentração de ácido acético presente nos hidrolisados não concentrados e destoxificados veio demonstrar que é necessário aplicar um método de destoxificação a pensar na remoção deste composto. Nas experiências 3 e 6 onde foi também utilizado hidrolisado não concentrado destoxificado, não se verificou no entanto qualquer crescimento. Uma explicação para este facto poderá ser encontrada ao nível dos suplementos utilizados (extracto de levedura, peptona e água de maceração de milho) não têm o mesmo efeito que o TEVM, uma vez que na experiência 7, onde apenas o TEVM foi utilizado ocorreu crescimento e produção de polióis. Também no trabalho realizado por (Silva-Fernandes *et al.* 2008), se verificou que o rendimento em biomassa foi positivamente influenciado pela destoxificação de hidrolisado e a produtividade da biomassa pela suplementação com TEVM.

4. Considerações finais e perspectivas

O bagaço de azeitona extractado possui uma composição favorável para a obtenção de hidrolisados ricos em pentoses, uma vez que é relativamente rico em xilano e arabinano, que constituem a fracção mais susceptível de ser hidrolisada por um processo com ácido diluído. As condições de hidrólise optimizadas utilizando como catalisador H_2SO_4 3,5% (p/p) (130°C durante 130 min e RLS 3) correspondentes a um valor de CS de 2,64, permitem obter um hidrolisado com cerca de 40,28 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de monossacáridos, dos quais 34,28 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ são xilose. Estes resultados demonstram que mediante uma cuidadosa optimização das condições operacionais é possível fraccionar selectivamente a hemicelulose com uma recuperação elevada de monossacáridos sem afectar praticamente a celulose, o que constitui uma vantagem tendo em conta a possível utilização dos resíduos sólidos noutros processos envolvendo a biocobversão da glucose, por exemplo para a produção de bioetanol. Simultaneamente são formados alguns compostos potencialmente inibidores do metabolismo microbiano, nomeadamente ácidos alifáticos, derivados de furano e compostos fenólicos, em concentrações relativamente elevadas quando comparados com outros hidrolisados de natureza semelhante (Duarte *et al.* 2009; Lopes 2001). Neste sentido foram testados alguns métodos de destoxificação, nomeadamente o acerto de pH a 5,5, tratamento com carvão activado e concentração por evaporação, onde a combinação do tratamento com carvão activado com a evaporação, se revelou ser o melhor, com cerca de 35% de remoção do ácido acético presente e acima de 95% dos derivados de furano. A remoção eficiente dos compostos inibidores permitiu aumentar o desempenho da levedura *Debaryomyces hansenii* ao nível da taxa específica de crescimento, da produtividade celular e rendimento em xilitol.

Neste trabalho, foi também avaliada a influência da suplementação do hidrolisado com diferentes suplementos, tendo-se observado um efeito positivo no rendimento em polióis. A suplementação com micronutrientes, vitaminas e fonte de azoto, fósforo e magnésio foi a que garantiu um melhor desempenho da levedura *D. hansenii* neste meio. Demonstrou-se assim que o hidrolisado necessita tanto de ser destoxificado, assim como suplementado para que a produção de xilitol seja induzida.

Outro aspecto que parece ter influenciado a bioconversão do hidrolisado foi o arejamento, verificando-se que um maior arejamento induz um maior crescimento microbiano, mas menor produção de xilitol.

No que diz respeito à estirpe CCMI 493 os resultados mostraram-se bastante insatisfatórios, não se registando assimilação de nenhum dos substratos nem produção de qualquer metabolito, independentemente do hidrolisado ter sido destoxificado e/ou suplementado.

Os resultados globais deste trabalho mostram que a produção de xilitol, através da bioconversão de hidrolisados de BAE utilizando a levedura *D. hansenii* CCMI 941, necessita

ainda de mais estudos de forma a ultrapassar as limitações encontradas. No entanto, os resultados já obtidos nesta primeira fase de optimização estão em linha com dados já publicados para outros hidrolisados provenientes de materiais mais estudados, e com outras leveduras, demonstrando assim a potencialidade deste material, da levedura e do processo desenvolvido.

De modo a complementar-se os estudos realizados, dando continuidade à optimização do processo biotecnológico de produção de xilitol por *Debaryomyces hansenii* em hidrolisado de bagaço de azeitona extractado, seria importante estudar, num futuro próximo, em maior profundidade os seguintes aspectos:

- Desenvolver um método/estratégia para a remoção específica do ácido acético do hidrolisado.
- Optimizar a concentração de suplementos para a produção de biomassa e de xilitol.
- Avaliar o comportamento do inóculo para o processo de “scale-up”, através de crescimentos sucessivos em descontínuo, tendo como meio de cultivo o meio optimizado neste trabalho.
- Estudar a aclimatização da levedura a concentrações de ácido acético iguais/superiores a $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$

Dando continuidade aos trabalhos realizados, seria também importante desenvolver estudos que permitissem elucidar os seguintes pontos:

- Quais os nutrientes específicos presentes nos suplementos utilizados que potenciam a produção de xilitol.
- Avaliar o efeito dos inibidores pela adição selectiva de compostos inibidores ao hidrolisado destoxificado ou meio quimicamente definido com uma composição análoga, e observar o reaparecimento da inibição.

5. Referências bibliográficas

1. Aguiar,C.L., Oetterer,M., & Menezes,T.J.B. (1999) Caracterização e aplicações do xilitol na indústria alimentícia. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia e Alimentos* **33**, 184-193.
2. 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.
3. Alburquerque,J.A., Gonzalvez,J., Garcia,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.
4. Amaral-Collaco,M.T., Gírio,F.M., Peito,M.A., & Coughlan,M.P. (1989) Utilization of the hemicellulosic fraction of agro-industrial residues by yeasts. In: *Enzyme systems for lignocellulosic degradation*, pp. 221-230. London: Elsevier Applied Science.
5. Asli,A. & Qatibi,A. (2009) Ethanol production from olive cake biomass substrate. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* **14**, 118-122.
6. Aziz, B. A. A. (2007). Reactive extraction of sugars from oil palm empty fruit bunch hydrolysate using naphthalene-2-boronic acid. Tese de mestrado. Universiti Sains Malaysia.
7. Banerjee,S., Mundliar,S., Sen,R., Giri,B., Satpute,D., Chakrabarti,T., & Pandey,R.A. (2010) Commercializing lignocellulosic bioethanol: technology bottlenecks and possible remedies. *Biofuels, Bioproducts Biorefining* **4**, 77-93.
8. Barbosa,M.F.S., de Medeiros,M.B., de Mancilha,I.M., Schneider,H., & Lee,H. (1988) Screening of yeasts for production of xylitol from D-xylose and some factors which can affect xylitol yield in *Candida guilliermondii*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **3**, 241-251.
9. Belkacemi,K., Abatzoglou,N., Overend,R.P., & Chornet,E. (1991) Phenomenological kinetics of complex systems - mechanistic considerations in the solubilization of hemicelluloses following aqueous steam treatments. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **30**, 2416-2425.
10. Bicho,P.A., Runnals,P.L., Cunningham,J.D., & Lee,H. (1988) Induction of xilose reductase and xylitol dehydrogenase activities in *Pachysolen tannophilus* and *Pichia stipitis* on mixed sugars. *Applied Environmental Microbiology* **54**, 50-54.
11. Biopol. (2008). Analysis of broad scenarios concerning the implications of renewable policy, forestry policy and agricultural policy for biorefinery viability. Research Institute Biopol, Germany, 1-51.
12. Birkhed,D. (1994) Cariologic aspects of xilitol and its use in chewing gum: a review. *Acta odontologica Scandinavica* **52**, 117-127.
13. Bjerre,A.B., Olesen,A.B., Fernqvist,T., & Ploger Schmidt,A.S. (1996) Pretreatment of rice straw using combined wet oxidation and alkaline hydrolysis resulting in convertible cellulose and hemicellulose. *Biotechnology and Bioengineering* **49**, 568-577.
14. Borja,R., Raposo,F., & Rincon,B. (2006) Treatment technologies of liquid and solid wastes from two-phase olive oil mills. *Grasas y aceites* **57**, 32-46.
15. Bozell,J.J., Holladay,J.E., Johnson,D., & White,J.F. (2007) Results of Screening for Potential Candidates From Biorefinery Lignin. In: *Top Value Added Chemicals From Biomass* Oak Ridge: Department of Energy (DOE).
16. Breuer,U. & Harms,H. (2006) *Debaryomyces hansenii* - an extremophilic yeast with biotechnological potential. *Yeast* **23**, 415-437.
17. Browning,B.L. (1967) *Methods of wood chemistry* New York: Interscience.
18. Bustos,G., Moldes,A.B., Cruz,J.M., & Domínguez,J.M. (2005) Production of lactic acid from vine-trimming wastes and viticulture lees using a simultaneous saccharification fermentation method. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **85**, 466-472.

19. Canettieri, E.V., Rocha, G.J.D.M., de Carvalho, J.A., & Silva, J.B.D.A. (2007) Optimization of acid hydrolysis from the hemicellulosic fraction of *Eucalyptus grandis* residue using response surface methodology. *Bioresource Technology* **98**, 422-428.
20. Canilha, L., Carvalho, W., & Silva, J.B.A.E. (2006) Xylitol bioproduction from wheat straw: hemicellulose hydrolysis and hydrolyzate fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **86**, 1371-1376.
21. Carvalho, F., Duarte, L.C., & Gírio, F.M. (2008) Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments. *Journal of Scientific & Industrial Research* **67**, 849-864.
22. Carvalho, F., Duarte, L.C., Lopes, S., Parajó, J.C., Pereira, H., & Gírio, F.M. (2005) Evaluation of the detoxification of brewery's spent grain hydrolysate for xylitol production by *Debaryomyces hansenii* CCM1 941. *Process Biochemistry* **40**, 1215-1223.
23. 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* **113**, 1059-1072.
24. 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.
25. Carvalho, F., Duarte, L.C., Silva-Fernandes, T., Lopes, S., Moura, P., Pereira, H., & Gírio, F.M. (2009a) Hydrothermal processing of hardwoods and agro-industrial residues: evaluation of xylo-oligosaccharides production. *Wood Nordic Biorefinery Conference* 96-102.
26. 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.
27. Carvalho, F., Silva-Fernandes, T., Duarte, L.C., & Gírio, F.M. (2009b) Wheat straw autohydrolysis: process optimization and products characterization. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **153**, 84-93.
28. Chaud, L. C. S. (2010). Avaliação do carvão vegetal ativado e polímero vegetal na destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaco de cana-de-acucar para a produção biotecnológica de xilitol. Tese de mestrado. Universidade de São Paulo - Escola de Engenharia de Lorena.
29. Cheng, K., Zhang, J., Chavez, E., & Li, J. (2010) Integrated production of xylitol and ethanol using corncob. *Applied Microbiology and Biotechnology* **87**, 411-417.
30. Chum, H.L., Johnson, D.K., Black, S.K., & Overend, R.P. (1990) Pretreatment catalyst effects and the combined severity parameter. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **24-5**, 1-14.
31. Coimbra, M.A., Cardoso, S.M., & Lopes-da-Silva, J.A. (2010) Olive pomace, a source for valuable arabinan-rich pectic polysaccharides. *Carbohydrates in Sustainable Development I: Renewable Resources for Chemistry and Biotechnology* **294**, 129-141.
32. Converti, A. & Dominguez, J.M. (2001) Influence of temperature and pH on xylitol production from xylose by *Debaryomyces hansenii*. *Biotechnology and Bioengineering* **75**, 39-45.
33. Cruz, J.M., Domínguez, J.M., Domínguez, H., & Parajó, J.C. (2000) Preparation of fermentation media from agricultural wastes and their bioconversion to xylitol. *Food biotechnology* **14**, 79-97.
34. Cruz, J.M., Domínguez, J.M., Domínguez, H., & Parajó, J.C. (2001) Antioxidant and antimicrobial effects of extracts from hydrolysates of lignocellulosic materials. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**, 2459-2464.
35. 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.
36. Delgenes, J.P., Escare, M.C., Laplace, J.M., Molleta, R., & Navarro, J.M. (1998) Biological production of industrial chemicals - xylitol and ethanol from lignocelluloses by controlled mixed culture systems. *Industrial Crops and Products* **7**, 101-111.

37. Demirbas, M.F. (2009) Biorefineries for biofuel upgrading: A critical review. *Applied Energy* **86**, 151-161.
38. Derriche, R. & Berrahmoune, K.S. (2007) Valorization of olive cake by extraction of hemicelluloses. *Journal of Food Engineering* **78**, 1149-1154.
39. 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.
40. Domínguez, J.M., Cao, N., Gong, C.S., & Tsao, G.T. (1996) Dilute acid hemicellulose hydrolysates from corn cobs for xylitol production by yeast. *Bioresource Technology* **61**, 85-90.
41. Domínguez, J.M., Cruz, J.M., Roca, E., Domínguez, H., & Parajó, J.C. (1999) Xylitol production from wood hydrolyzate by entrapped *Debaryomyces hansenii* and *Candida guilliermondii* cells. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **81**, 119-130.
42. Duarte, L.C., Carneiro, F., Neves, I., & Gírio, F.M. (2005) Effects of aliphatic acids, furfural, and phenolic compounds on *Debaryomyces hansenii* CCMI 941. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **124**.
43. Duarte, L.C., Carneiro, 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**, 129-132.
44. Duarte, L.C., Silva-Fernandes, T., Carneiro, F., & Gírio, F.M. (2009) Dilute acid hydrolysis of wheat straw oligosaccharides. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **153**, 116-126.
45. Ek, M., Gellerstedt, G., & Henriksson, G. (2009) Wood chemistry and wood biotechnology, pp. 1-299. Walter de Gruyter.
46. Faveri, D., Torre, P., Perego, P., & Converti, A. (2003) Optimization of xylitol recovery by crystallization from synthetic solutions using response surface methodology. *Journal of Food Engineering*.
47. Felizón, B., Fernández-Bolanós, J., Heredia, A., & Guillén, R. (2000) Steam-explosion pretreatment of olive cake. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **17**, 15-22.
48. Fengel, D. & Wegener, G. (1983) Wood: chemistry, ultrastructure, reactions, pp. 1-613. Berlin: Walter de Gruyter & Co.
49. Fernandez-Bolanos, J., Felizón, B., Brenes, M., Guillen, R., & Heredia, A. (1998) Hydroxytyrosol and tyrosol as the main compounds found in the phenolic fraction of steam-exploded olive stones. *Journal of the American Oil Chemists Society* **75**, 1643-1649.
50. Frazer, F.R. & McCaskey, T.A. (1989) Wood hydrolyzate treatments for improved fermentation of wood sugars to 2,3-butanediol. *Biomass* **18**, 31-42.
51. Furlan, S.A., Booullioud, P., Strehaiano, P., & Riba, J.P. (1991) Study of xylitol formation from xylose under oxygen limiting conditions. *Biotechnology Letters* **13**, 203-206.
52. Gírio, F.M., Fonseca, C., Carneiro, F., Duarte, L.C., Marques, S., & Bogel-Lukasik, R. (2010) Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. *Bioresource Technology* **101**, 4775-4800.
53. Goldstein, I.S. (1983) Acid processes for cellulose hydrolysis and their mechanisms., pp. 315-328. New York: Academic Press Inc.
54. Greasham, R.L. & Herber, W.K. (1997) Applied microbial physiology. A practical approach Oxford: Oxford University Press.
55. Hasyierah, M.S.N., Zulkali, M.M.D., & Ku Syahidah, K.I. (2008) Ferulic acid from lignocellulosic biomass: review. *Malaysian Universities Conferences on Engineering and Technology* **1**, 1-8.
56. Hofrichter, M. (2010) Industrial Applications. In: *The Mycota* (ed K.Esser), pp. 1-477. Heidelberg: Springer.
57. Horiuchi, J.I. & Tada, K. (2008) Bioprocess development for microbial xylitol production from agricultural wastes. *Journal of Biotechnology* **13**, 460-495.
58. Hörmeyer, H.F., Schwald, W., & Bobleter, G.B. (1988) Hydrothermolysis of birch wood as pretreatment for enzymatic saccharification. *Physics and Technology of Wood* **42**, 95-98.

59. Howard,R.L., Abotsi,E., Jansen van Rensburg,E.L., & Howard,S. (2003) Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *African Journal of Biotechnology* **2**, 602-619.
60. Hyvönen,L., Koivistoinen,P., & Voirol,F. (1982) Food technological evaluation of xylitol. *Advances Food Research* **28**, 373-403.
61. Khanal,S.K., Surampalli,R.Y., Zhang,T.C., Lamsal,B.P., Tyagi,R.D., & Kao,M.C. (2010) Bioenergy and biofuel from biowastes and biomass, p. -522 pp. American Society of Civil Engineers.
62. Kitpreechavanich,V., Hayashi,M., Nishio,N., & Nagai,S. (1984) Conversion of D-Xilose into xylitol by xylose reductase from *Candida pelliculosa* coupled with the oxidoreductase system of methanogen strain HU. *Biotechnology Letters* **6**, 651-656.
63. Kotronarou, N. and Méndez, M. (2003). IMPEL - Olive oil project. 2003/3, 1-100.
64. Kumar,R., Singh,S., & Singh,O.V. (2008) Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **35**, 377-391.
65. Larsson,S. (1999) The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. *Enzyme and Microbial Technology* **24**, 151-159.
66. Lee,Y. & McCaskey,T. (1983) Hemicelulosic hydrolysis treatments and fermentation of resulting pentoses to ethanol. *Tappi J* **66**, 102-107.
67. Lenihan,P., Orozco,A., O'Neill,E., Ahmad,M.N.M., Rooney,D.W., & Walker,G.M. (2010) Dilute acid hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Chemical Engineering Journal* **156**, 395-403.
68. Lima,L.H.A., Felipe,M.G.A., & Torres,A.G.T. (2003) Reclassification of *Candida guilliermondii* FTI 20037 as *Candida tropicalis* based on molecular phylogenetic analysis. *Journal of Microbiology* **34**.
69. Lloyd,T.A. & Wyman,C.E. (2005) Combined sugar yields for dilute sulfuric acid pretreatment of corn stover followed by enzymatic hydrolysis of the remaining solids. *Bioresource Technology* **96**, 1967-1977.
70. Lopes, S. (2001). Optimização do meio de cultivo para a produção de polióis pela levedura *Debaryomyces hansenii* em hidrolisado hemicelulósico. Tese de mestrado. Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias.
71. MADRP. (2007). Olivicultura. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas, 1-52.
72. 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.
73. Masghouni,M. & Hassairi,M. (2000) Energy applications of olive-oil industry by-products: I. The exhaust foot cake. *Biomass & Bioenergy* **18**, 257-262.
74. Medeiros, R. C. (2003). Desenvolvimento e optimização de um meio de cultivo para a produção de polióis por *Debaryomyces hansenii* CCMI 941.Tese de mestrado. Faculdade de Engenharia e Recursos Naturais. Universidade do Algarve..
75. Melaja, A. and Hamalainen, L. (1977). Process for making xylitol. United States.588022(14,008,285).
76. Moniz,P., Gírio,F.M., Pereira,H., & Carvalheiro,F. (2009) Hydrothermal processing of corn residues: process optimization and products characterization. *Wood Nordic Biorefinery Conference* 89-95.
77. Montané,D., Salvadó,J., Torras,C., & Farriol,X. (2002) High-temperature dilute-acid hydrolysis of olive stones for furfural production. *Biomass and Bioenergy* **22**, 295-304.
78. Moral,P.S. & Méndez,M.V.R. (2006) Production of pomace olive oil. *Grasas y aceites* **57**, 47-55.
79. Morita,T.A. & Silva,S.S. (2000) Inhibition of microbial xylitol production by acetic acid and its relation with fermentative parameters. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **84-86**, 801-808.
80. 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.

81. Mussatto,S.I., Dragone,G., & Roberto,I. (2005) Influence of the toxic compounds present in brewer's spent grain hemicellulosic hydrolysate on xylose-to-xylitol bioconversion by *Candida guilliermondii*. *Process Biochemistry* **40**, 3801-3806.
82. Mussatto,S.I. & Roberto,I.C. (2002) Produção biotecnológica de xilitol a partir da palha de arroz. *Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento* **28**, 1-6.
83. Mussatto,S.I. & Roberto,I.C. (2004a) Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review. *Bioresource Technology* **93**, 1-10.
84. Mussatto,S.I., Santos,J.C., & Roberto,I.C. (2004b) Effect of pH and activated charcoal adsorption on hemicellulosic hydrolysate detoxification for xylitol production. *Chemical Technology and Biotechnology* **79**, 590-596.
85. Mustranta,A., Fagernas,L., & Viikari,L. (1995) Effects of lipases on birch extractives. *Tappi Journal* **78**, 140-146.
86. Nag,A. (2008) Biofuels refining and performance, pp. 1-312. McGraw-Hill.
87. Náhlík,J., Palatová,M., Gírio,F.M., & Roseiro,C. (2003) Model identification and physiological control of xylitol production using *Debaryomyces hansenii*. *Process Biochemistry* **38**, 1695-1705.
88. Nakase,T. & Suzuki,M. (1985) Taxonomic studies on *Debaryomyces hansenii* (Zopf) Lodder et Kreger-van Rij and related species. II. Practical discrimination and nomenclature. *Journal of General and Applied Microbiology* **31**, 71-86.
89. Neureiter,M., Danner,H., Thomasser,C., Saidi,B., & Braun,R. (2002) Dilute-acid hydrolysis of sugarcane bagasse at varying conditions. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **98-100**, 49-58.
90. Niaounakis,M. & Halvadakis,C.P. (2006) Olive processing wastes management literature review and patent survey Athens, Greece: Typothito Publications.
91. Nigam,P. & Singh,D. (1995) Processes for fermentative production of xylitol - A sugar substitute. *Process Biochemistry* **30**, 117-124.
92. Nobre, A. (1994). Metabolismo da D-xilose em *Debaryomyces hansenii* crescida em cultura contínua. Tese de mestrado. Universidade Técnica de Lisboa.
93. Oliva,J.M., Ballesteros,I., Negro,M.J., Manzanares,P., Cabanas,A., & Ballesteros,M. (2004) Effect of binary combinations of selected toxic compounds on growth and fermentation of *Kluveromyces marxianus*. *Biotechnology Progress* **20**, 715-720.
94. Ooi,B., Le,T., & Markuszewski,B. (2002) The effects of glucose on the yeast conversion of xylose into xylitol by *C.guilliermondii* and *C.tropicalis*. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry* **3**, 189-202.
95. Overend,R.P. & Chornet,E. (1987) Fractionation of lignocellulosics by steam-aqueous pretreatments. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series A-Mathematical Physical and Engineering Sciences* **321**, 523-536.
96. Palmqvist, E. (1998). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates: inhibition and detoxification. Lund University.
97. Palmqvist,E., Galbe,M., & Hahn-Hägerdal,B. (1998) The generation of fermentation Inibitors during dilute acido hydrolysis of soft wood. *Enzime Microbial Technology* **24**, 151-159.
98. Palmqvist,E. & Hahn-Hagerdal,B. (2000) Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. *Bioresource Technology* **74**, 17-24.
99. Parajó,J.C., Domínguez,H., & Domínguez,J.M. (1998) Biotecnological production of xylitol. Part 1: interest of xylitol and fundamentals of its biosynthesis. *Bioresource Technology* **65**, 191-201.
100. Parajó,J.C., Domínguez,H., & Domínguez,J.M. (1995) Production of xylitol from raw wood hydrolysates by *Debaryomyces hansenii* NRRL Y-7426. *Bioprocess Engineering* **13**, 125-131.
101. Parajó,J.C., Domínguez,H., & Domínguez,J.M. (1997) Xylitol production from *Eucalyptus* wood hydrolysates extracted with organic solvents. *Process Biochemistry* **32**, 599-604.
102. Parajo,J.C., Dominguez,H., Santos,V., Alonso,J.L., & Garrote,G. (2008) Teaching sustainable development concepts in the laboratory: A solid-liquid extraction experiment. *Journal of Chemical Education* **85**, 972-975.

103. Parisi, F. (1989) Advances in lignocellulosics hydrolysis and the utilization of the hydrolysates. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* **38**, 53-87.
104. Pereira, H., Graça, J., & Rodrigues, J.C. (2003) Wood chemistry in relation to quality. In: *Wood quality and its biological basis* (eds Barnett J.R. & Jeronimidis G.), pp. 53-86. Oxford: Blackwell Publishing.
105. Peters, D. (2007) White Biotechnology. In: *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, pp. 1-30. Springer.
106. Philipp, P. & D'Almeida, M.L.O. (1988) Celulose e Papel - Tecnologia de fabricação de pasta celulósica São Paulo: SENAI.
107. Prakassham, R.S., Rao, R.S., & Hobbs, P.J. (2009) Current trends in biotechnological production of xylitol and future projects. *Current trends in biotechnology and Pharmacy* **3**, 8-36.
108. Prakassham, R. S., Suvana, L. G., and Sreenivas, R. R. (2008). Growth pattern of isolated *Candida tropicalis* in presence of hydroxymethyl furfural.
109. Preziosi-Belloy, L., Nollet, V., & Navarro, J.M. (2000) Xylitol production from aspenwood hemicellulose hydrolysate by *Candida guilliermondii*. *Biotechnology Letters* **22**, 239-243.
110. Prior, B.A., Kilian, S.G., & du Preez, J.C. (1989) Fermentation of D-xylose by yeasts *Candida sheatae* and *Pichia stipits*: prospects and problems. *Process Biochemistry* **24**, 21-32.
111. Rauter, A.P., Vogel, P., & Queneau, Y. (2010) Carbohydrates in sustainable development. I - Renewable resources for chemistry and biotechnology, pp. 1-200. Springer.
112. Roberto, I.C., Felipe, M.G.A., Lacerda, L., Silva, S.S., & Mancilha, I.M. (1991) Utilization of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *Candida guilliermondii* for xylitol production. *Bioresource Technology* **16**, 1211-1216.
113. Roberto, I.C., Felipe, M.G.A., Mancilha, I.M., Vitolo, M., Sato, S., & Silva, S.S. (1995) Xylitol production by *Candida guilliermondii* as an approach for the utilization of agro-industrial residues. *Bioresource Technology* **51**, 255-257.
114. Rodríguez, G., Lama, A., Rodríguez, R., Jiménez, A., Guillén, R., & Fernández-Bolanós, J. (2008) Olive stones an attractive source of bioactive and valuable compounds. *Bioresource Technology* **99**, 5261-5269.
115. 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.
116. Roseiro, L. B. (2003). Characterization and authentication of Serpa cheese. Reading University.
117. Rydholm, S.A. (1985) Pulping processes N.Y.: John Wiley & Sons.
118. Saha, B.C. & Bothast, R.J. (1996) Production of L-arabitol from L-arabinose by *Candida entomaeae* and *Pichia guilliermondii*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **45**, 299-306.
119. Saha, B.C. & Bothast, R.J. (1999) Production of xylitol by *Candida peltata*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **22**, 633-636.
120. Saier, M.H. (2007) Beneficial bacteria and bioremediation. *Water Air Soil Pollut* **184**, 1-3.
121. 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.
122. Sampaio, F.C., Torre, P., Passos, F.M., Perego, P., Passos, F.J., & Converti, A. (2004) Xylose metabolism in *Debaryomyces hansenii* UFV-170. Effect of the specific oxygen uptake rate. *Biotechnology Progress* **20**, 1641-1650.
123. Sampaio, F.C., Torre, P., Passos, F.M.L., Moraes, C.A., Perego, P., & Converti, A. (2007a) Influence of Inhibitory Compounds and Minor Sugars on Xylitol Production by *Debaryomyces hansenii*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **136**, 165-181.
124. Sampaio, F.C., Torre, P., Passos, F.M.L., Moraes, C.A., Perego, P., & Converti, A. (2007b) Influence of inhibitory compounds and minor sugars on xylitol production by *Debaryomyces hansenii*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **136**, 165-181.

125. Sanchez,B. & Bautista,S. (1988) Effects of furfural and 5-hidroxymethylfurfural he fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* and biomass production from *Candida guilliermondii*. *Enzyme and Microbial Technology* **10**, 315-318.
126. Santos,J.C., Mussatto,S.I., Converti,A., & Silva,S.S. (2005) Influence of aeration rate and carrier concentration on xylitol production from sugarcane hydrolyzate in immobilized-cell fluidized bed reactor. *Process Biochemistry* **40**, 113-118.
127. Satyanarayana,T. & Kunze,G. (2009) Yeast biotechnology: diversity and applications, pp. 1-737. Springer.
128. Sepúlveda-Huerta,E., Tellez-Luis,S.J., Bocanegra-Garcia,V., Ramirez,J.A., & Vazquez,M. (2006) Production of detoxified sorghum straw hydrolysates for fermentative purposes. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **86**, 2579-2586.
129. Sheldon,R.A. (2011) Utilisation of biomass for sustainable fuels and chemicals: Molecules, methods and metrics. *Catalysis Today* **167**, 3-13.
130. SIADEB. (2011). Sociedade Ibero-Americana para o Desenvolvimento das Biorrefinarias.
131. Silva,R., Haraguchi,S., Muniz,E., & Rubira,A. (2009) Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos. *Química Nova* **32**.
132. Silva-Fernandes,T., Duarte,L.C., Carvalheiro,F., & Gírio,F.M. (2008) Identificarion of the most relevant factors affecting xylitol production by *Debaryomyces hansenii* from wheat straw hydrolyzates. *International Conference and Exhibition on Bioenergy* 1-6.
133. Sirisansaneeyakul,S., Staniszewski,M., & Rizzi,M. (1995) Screening of yeasts for production of xylitol from D-xylose. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **80**, 565-570.
134. Sluiter, A., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., and Templeton, D. (2008). Determination of extractives in biomass. Laboratory Analytical Procedure , 1-12.
135. Sun,W.L. & Tao,W.Y. (2010) Comparison of cell growth and ethanol productivity on different pretreatment of rice straw hemicellulose hydrolysate by using *Candida shehatae* CICC 1766. *African Journal of Microbiology Research* **4**, 1105-1109.
136. Sun,Y. & Cheng,J.Y. (2002) Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology* **83**, 1-11.
137. Taherzadeh,M.J. & Karimi,K. (2004) Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. *BioResources* **2**, 472-499.
138. Tamanini, C. and Haully, M. C. O. (2004a). Resíduos agroindustriais para produção biotecnológica de xilitol. *Ciências Agrárias*(25), 315-330.
139. Tamanini, C. and Haully, M. C. O. (2004b). Resíduos agroindustriais para produção biotecnológica de xilitol. *Ciências Agrárias*(25), 315-330.
140. Targonski,Z. (1985) process for enhancing susceptibility of autohydrolysed beech sawdust enzymatic hydrolysis. *Enzyme and Microbial Technology* **7**, 126-128.
141. Tavares,J.M., Duarte,L.C., Amaral-Collaço,M.T., & Gírio,F.M. (1999) Phosphate limitation stress induces xylitol overproduction by *Debaryomyces hansenii*. *Fems Microbiology Letters* **171**, 115-120.
142. Tavares,J.M., Duarte,L.C., Amaral-Collaço,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.
143. Téllez-Luis,S.J., Ramírez,J.A., & Vásquez,M. (2002b) Mathematical modelling of hemicellulosic sugar production from sorghum straw. *Journal of Food Engineering* **52**, 285-291.
144. Téllez-Luis,S.J., Ramírez,J.A., & Vásquez,M. (2002a) Mathematical modelling of hemicellulosic sugar production from sorghum straw. *Journal of Food Engineering* **52**, 285-291.
145. Torrado, I. (2010). Optimização da hidrólise com ácido diluído para o fraccionamento selectivo das hemiceluloses de palha de sorgo: estudo da bioconversão dos hidrolisados para a produção de xilitol. Tese de mestrado. Faculdade de Ciências e Tecnologia - Universidade do Algarve.

146. Tran,A.V. & Chambers,R.P. (1986) Ethanol fermentation of red oak acid prehydrolysate by the yeast *Pichia stipitis* CBS 5776. *Enzyme and Microbial Technology* **8**, 439-444.
147. Uçar,G. (1990) Pretreatment of poplar by acid and alkali for enzymatic hydrolysis. *Wood Science and Technology* **24**, 171-180.
148. van Zyl,C., Prior,B.A., & du Preez,J.C. (1991) Acetic acid inhibition of D-xylose fermentation by *Pichia stipitis*. *Enzyme and Microbial Technology* **13**, 82-86.
149. van Zyl,C., Prior,B.A., & Dupreez,J.C. (1988) Production of ethanol from sugar-cane bagasse hemicellulose hydrolyzate by *Pichia stipitis*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **17**, 357-369.
150. Vandeska,E., Kuzmanov,S., & Jeffries,T.W. (1995) Xylitol formation and key enzyme activities in *Candida boidinii* under different oxygen transfer rates. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **80**, 513-516.
151. Vásquez,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.
152. Vessia, Ø. (2005). Biofuels from lignocellulosic material. Technology, potential and costs, Norwegian University of Science and Technology - Faculty of information technology, mathematics and electrical engineering, 1-101.
153. Vierhuis,E., Schols,H.A., Beldman,G., & Voragen,A.G.J. (2001) Structural characterisation of xyloglucan and xylans present in olive fruit (*Olea europaea* cv koroneiki). *Carbohydrate Polymers* **44**, 51-52.
154. 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.
155. Winkelhausen,E. & Kuzmanova,S. (1998) Microbial conversion of D-xylose to xylitol. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **86**, 1-14.
156. Wright,J.D. (1988) Ethanol from biomass by enzymatic hydrolysis. *Chemical Engineering Progress* **84**, 62-74.

ANEXOS

I. Meio de cultura

Quadro 5.1 - Composição do meio Yeast Malt-glucose (YM-glc).

Nutriente	Conc. (g·L ⁻¹)	Marca comercial
Extracto de levedura	3,0	Oxoid
Extracto de malte	3,0	Oxoid
Peptona	5,0	Difco
Glucose	10,0	Oxoid
Agar	20,0	Merck

O meio foi aquecido, distribuído em frascos (aproximadamente 100 ml/frasco) e esterilizado na autoclave (121 °C, 15 min, 1 bar). Após arrefecimento até 50-55 °C, o meio foi distribuído assépticamente em placas de Petri estéreis. Estas foram armazenadas a 4 °C.

Para a preparação das rampas, o meio foi preparado do mesmo modo sendo, após arrefecimento até 50-55 °C, distribuído asépticamente em tubos de ensaio estéreis (6 mL/tubo) e deixado a solidificar inclinado, à temperatura ambiente.

As rampas e os frascos de meio “stock” foram armazenados a 4 °C.

II. Preparação de stock das estirpes da levedura *D. hansenii*

Nas condições que são referidos no ponto 2.5.2, foram incubadas duas rampas com cada uma das seis estirpes da levedura *D.hansenii*. Para uma das rampas, adicionou-se um pouco de MQD (2.5.3.1), agitou-se, passou-se o conteúdo para a outra rampa e agitou-se novamente. Desta última retirou-se 4 mL, em condições assépticas, para cada um dos balões Erlenmeyer de 1000 mL sem anteparas (em duplicado), contendo 85 mL de MQD. Os balões de inóculo foram incubados a 30 °C com agitação orbital de 150 rpm numa incubadora Infors Unitron HT (Suíça). Depois de 18 h de crescimento, o conteúdo dos balões de cada estirpe foi misturado com o respectivo duplicado, de forma a obter um inóculo homogéneo. Foram medidos numa proveta estéril 85 mL de cada um dos inóculos e cada um deles foi derramado para dentro de um balão de 500 mL com 18,5 g de glicerol a 15%. Colocaram-se estes balões sob agitação por 5 - 10 min, distribuído o conteúdo por vários tubos falcon e levaram-se a congelar numa arca a -70 °C.

III. Soluções de suplementos utilizadas

Soluções de nutrientes

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

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:

Quadro 0.1 - Composição da solução de sais 40 vezes concentrada.

Nutriente	Fórmula	Conc. (g·L ⁻¹)	Fornecedor	Conc. 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

Procedimento

Dissolver o EDTA e adicionar o Zinco em pelo menos 800 mL de água. Acertar o pH a 5,5-6,0. Adicionar os restantes compostos pela ordem indicada mantendo o pH sempre nesse intervalo. Caso seja necessário corrija 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 na autoclave (121 °C, 15 min, 1 bar) e armazenada a 4 °C.

Solução NP

A fonte de Azoto, Potássio e Fósforo foi preparada numa solução 20 vezes concentrada e o pH acertado a 5,5 com NaOH 5M. Esta solução foi autoclavada separadamente da solução de sais minerais de modo a evitar reacções a altas temperaturas que poderiam diminuir a

quantidade dos diferentes elementos disponíveis para o crescimento da levedura, nomeadamente por reacções com o ião fosfato. Esta solução apresenta a seguinte composição:

Quadro 0.2 - Composição da solução de NP 20 vezes concentrada

Nutriente	Fórmula	Conc. (g·L ⁻¹)	Fornecedor	Conc. final (g·L ⁻¹)
Dihidrogenofosfato de potássio	KH ₂ PO ₄	20,00	JT Baker	1,0000
Hidrogenofosfato de amónio	(NH ₄) ₂ HPO ₄	40,00	JT Baker	2,0000
Dihidrogenofosfato de Amónio	(NH ₄)H ₂ PO ₄	120,00	JT Baker	6,0000

Solução MgSO₄

A fonte de magnésio foi preparada numa solução 20 vezes concentrada e o pH acertado a 5,5 com NaOH 5M. Esta solução foi esterilizada na autoclave a 120 °C durante 15 min.

Quadro 0.3 - Composição da solução de Mg 40 vezes concentrada

Nutriente	Fórmula	Conc. (g·L ⁻¹)	Fornecedor	Conc. final (g·L ⁻¹)
Sulfato de magnésio heptahidratado	MgSO ₄ ·7H ₂ O	20,00	Merck	0,5000

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:

Quadro 0.4 - Composição da solução de vitaminas e cálcio 100 vezes concentrada.

Nutriente	Fórmula	Conc. (g·L ⁻¹)	Fornecedor	Conc. 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 timina hidratado	C ₁₂ H ₁₈ C ₁₂ N ₄ OS·XH ₂ O	5,00	Merck	0,0050
Cloridato 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

Procedimento

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.

Solução de Peptona

Para a preparação de uma solução de 200 mL (de 90 g·L⁻¹), pesou-se 18 g de extracto de levedura e deixou-se dissolver em água ultrapura sob agitação magnética, a 50 °C. A solução foi colocada num frasco Schot de 500 mL e esterilizada na autoclave a 121 °C, durante 15 min.

Solução de Extracto de Levedura

Para a preparação de uma solução de 250 mL (de 90 g·L⁻¹), pesou-se 22,5 g de extracto de levedura e deixou-se dissolver em água ultrapura sob agitação magnética, a 50 °C. A solução foi colocada num frasco Schot de 500 mL e esterilizada na autoclave a 121 °C, durante 15 min. Confirmar com a Cátia se foi autoclave ou filtração.

Solução de borras de vinho

Para a preparação de uma solução de 50 mL (de 200 g·L⁻¹), pesaram-se e juntaram-se 10 g de borras liofilizadas em água ultrapura. A solução foi agitada e colocada num frasco Schot de 250 mL e esterilizada na autoclave a 121 °C, durante 15 min.

IV. Formulário

A. Factor de severidade combinado

O factor de severidade tal como proposto por Overend e Chornet (1987), pode ser calculado pela seguinte expressão:

$$R_0 = \int_0^t \exp\left(\frac{T-100}{14,75}\right) dt \quad (\text{Eq.IV.1})$$

Onde,

-T é a temperatura (°C)

-t é o tempo (min)

14,75- Parâmetro empírico relacionado com a energia de activação e com o tipo de processo

Atendendo que nos processos de hidrólise existe um período de aquecimento (não-isotérmico) cuja contribuição não deve ser desprezada, a Eq.VI.1 deve ser expressa na forma seguinte:

$$R_0 = \int_0^{t_{aq}} \exp\left(\frac{T-100t}{14,75}\right) dt + \int_{t_{aq}}^t \exp\left(\frac{T-100}{14,75}\right) dt \quad (\text{Eq. IV.2})$$

Onde, o primeiro termo da equação corresponde à fase de aquecimento até à temperatura pré-estabelecida (T), e o segundo ao período isotérmico da hidrólise.

De modo a considerar o efeito da concentração de catalisador, foi calculado o factor de severidade combinado (CS) pela Eq.VI.3:

$$CS = \log R_0 - pH \quad (\text{Eq. IV.3})$$

pH – valor do pH do hidrolisado medido experimentalmente.

B. 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, respectivamente (Eq.IV.4-IV.7). O resíduo insolúvel em ácido, após correcção das cinzas, permitiu o cálculo da lenhina Klason (Eq. IV.8)

Na hidrólise ácida quantitativa uma pequena percentagem de açúcares é degradada, por isso são introduzidos factores de correcção 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 factores de correcção (F), que permitem corrigir as várias determinações.

$$Gn = F \times \frac{100}{1005} \times \frac{162}{180} \times \frac{Glc \times P_{sol}}{A} \quad (\text{Eq.IV.4})$$

$$Xn = F \times \frac{100}{1005} \times \frac{132}{150} \times \frac{Xyl \times P_{sol}}{A} \quad (\text{Eq.IV.5})$$

$$Arn = F \times \frac{100}{1005} \times \frac{132}{150} \times \frac{Ara \times P_{sol}}{A} \quad (\text{Eq.IV.6})$$

$$GAc = \frac{100}{1005} \times \frac{60}{61} \times \frac{Ac \times P_{sol}}{A} \quad (\text{Eq.IV.7})$$

$$LK = \frac{RIA - C}{A} \times 100 \quad (\text{Eq.IV.8})$$

- Gn, Xn, Arn, GAc, LK são as percentagens de glucano, xilano, arabinano, grupos acetilo e lenhina Klason (g por 100 g de sólido), respectivamente.
- F é o factor de correcção, por exemplo, para o glucano, $F=1/(1-0,026)=1,027$.
- P_{sol} e A são os pesos da solução e da amostra seca utilizada no ensaio, respectivamente (g).
- RIA e C são os pesos do resíduo insolúvel em ácido e das cinzas da amostra, respectivamente (g).
- Glc, Xil, Ara e Ac são as concentrações de glucose, xilose, arabinose e ácido acético nos licores (g·L⁻¹), respectivamente.

C. Cálculo de rendimentos

O rendimento de cada um dos polímeros¹, expresso como a percentagem que permanece no resíduo sólido relativamente à respectiva percentagem na matéria-prima, após hidrólise ácida foi calculada de acordo com as Eq.IV.9-IV.13.

$$Gn_R = \frac{Gn \times Y_S}{Gn_{MP}} \quad (\text{Eq.IV.9})$$

$$Xn_R = \frac{Xn \times Y_S}{Xn_{MP}} \quad (\text{Eq.V.10})$$

$$Arn_R = \frac{Arn \times Y_S}{Arn_{MP}} \quad (\text{Eq.IV.11})$$

$$GAc_R = \frac{GAc \times Y_S}{GAc_{MP}} \quad (\text{Eq.IV.12})$$

$$LK_R = \frac{LK \times Y_S}{LK_{MP}} \quad (\text{Eq.IV.13})$$

- 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/100 g de polímero na matéria-prima).

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 façam parte da hemicelulose. A designação de “polímero” para o conjunto de componentes referidos foi adoptada por uma questão de simplicidade.

- 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, respectivamente (g/100 g matéria-prima).
- Y_S – rendimento em sólidos (g de sólido recuperado/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.14-IV.19, onde (162/180), (132/150), (60/61), (132/96) e (162/126,1) são factores estequiométricos para a conversão da glucose, xilose e arabinose, ácido acético, furfural e HMF para glucano, xilano e arabinano, grupos acetilo, xilano e glucano, respectivamente.

$$Glc_R = \frac{162}{180} \cdot \frac{Glc \cdot P_H}{Gn_{MP} \cdot A \cdot 0,01 \cdot \rho_H} \cdot 100 \quad (\text{Eq.IV.14})$$

$$Xyl_R = \frac{132}{150} \cdot \frac{Xil \cdot P_H}{Xn_{MP} \cdot A \cdot 0,01 \cdot \rho_H} \cdot 100 \quad (\text{Eq.IV.15})$$

$$Ara_R = \frac{132}{150} \cdot \frac{Ara \cdot P_H}{Arn_{MP} \cdot A \cdot 0,01 \cdot \rho_H} \cdot 100 \quad (\text{Eq.IV.16})$$

$$HAc_R = \frac{60}{61} \cdot \frac{HAc \cdot P_H}{GAc_{MP} \cdot A \cdot 0,01 \cdot \rho_H} \cdot 100 \quad (\text{Eq.IV.17})$$

$$Furf_R = \frac{132}{96} \cdot \frac{Furf \cdot P_H}{Xn_{MP} \cdot A \cdot 0,01 \cdot \rho_H} \cdot 100 \quad (\text{Eq.IV.18})$$

$$HMF_R = \frac{162}{126,1} \cdot \frac{HMF \cdot P_H}{Gn_{MP} \cdot A \cdot 0,01 \cdot \rho_H} \cdot 100 \quad (\text{Eq.IV.19})$$

- Glc_R , Xyl_R , Ara_R , HAc_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 ($g \cdot L^{-1}$).

A percentagem de cada um dos “polímeros” relativamente ao total de amostra inicial foi calculada de acordo com as Eq.IV.20-IV.24.

$$Gn_T = \frac{Gn_R \times Gn_{MP}}{100} \quad (\text{Eq.IV.20})$$

$$Xn_T = \frac{Xn_R \times Xn_{MP}}{100} \quad (\text{Eq.IV.21})$$

$$Arn_T = \frac{Arn_R \times Arn_{MP}}{100} \quad (\text{Eq.IV.22})$$

$$GAc_T = \frac{GAc_R \times GAc_{MP}}{100} \quad (\text{Eq.IV.23})$$

$$LK_T = \frac{LK_R \times LK_{MP}}{100} \quad (\text{Eq.IV.24})$$

- 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, ácidos acético, fórmico e levulínico, furfural, HMF e compostos fenólicos relativamente ao total de amostra inicial foram calculadas de acordo com as Eq.IV.25-IV.31.

$$Glc_T = \frac{Glc_R \times Glc_{MP}}{100} \quad (\text{Eq.IV.25})$$

$$Xyl_T = \frac{Xyl_R \times Xil_{MP}}{100} \quad (\text{Eq.IV.26})$$

$$Ara_T = \frac{Ara_R \times Ara_{MP}}{100} \quad (\text{Eq.IV.27})$$

$$HAc_T = \frac{HAc_R \times HAc_{MP}}{100} \quad (\text{Eq.IV.28})$$

$$Furf_T = \frac{Furf_R \times Furf_{MP}}{100} \quad (\text{Eq.IV.29})$$

$$HMF_T = \frac{HMF_R \times HMF_{MP}}{100} \quad (\text{Eq.IV.30})$$

$$CFn_T = \frac{CFn \times P_H}{\rho H.A} .100 \quad (\text{Eq.IV.31})$$

- 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).

D. Parâmetros cinéticos e estequiométricos

- Taxa específica de crescimento (h⁻¹)

$$\mu = \frac{\ln\left(\frac{Abs}{Abs_0}\right) - b}{t} \quad (\text{Eq.IV.32})$$

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

- Produtividade celular (g·L⁻¹·h⁻¹)

$$Q_x = \frac{X_f - X_i}{t_f - t_i} \quad (\text{Eq.IV.33})$$

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

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

$$Q_s = \frac{S_f - S_i}{t_f - t_i} \quad (\text{Eq.IV.34})$$

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

- Taxa volumétrica de formação de xilitol (g·L⁻¹·h⁻¹)

$$Q_{\text{Polióis}} = \frac{\text{Polióis}_f - \text{Polióis}_i}{t_f - t_i} \quad (\text{Eq.IV.35})$$

Xilitol_i e xilitol_f são as concentrações iniciais e finais de xilitol, respectivamente (g·L⁻¹).

- Rendimento celular (g·g⁻¹)

$$Y_{x/s} = \frac{X_f - X_i}{S_f - S_i} \quad (\text{Eq.IV.36})$$

- Rendimento em xilitol (g·g⁻¹)

$$Y_{\text{Polióis } S} = \frac{\text{Polióis}_f - \text{Polióis}_i}{S_f - S_i} \quad (\text{Eq.IV.37})$$

S_i e S_f, XOH_i e XOH_f representam as concentrações iniciais e finais (g·L⁻¹) de xilose e de xilitol, respectivamente.

E. Determinação do diâmetro médio das partículas

$$D_p = \frac{\% \text{ sól.cribo } 2 \times (d^2)^4 + \% \text{ sól.cribo } 3 \times (d^2)^4 + \% \text{ sól.cribo } 4 \times (d^2)^4}{\% \text{ sól.cribo } 2 \times (d^2)^3 + \% \text{ sól.cribo } 3 \times (d^2)^3 + \% \text{ sól.cribo } 4 \times (d^2)^3} \quad (\text{Eq. IV.40})$$

- % sol.cribo 2: percentagem de sólidos no crivo número 2;
- % sol.cribo 3: percentagem de sólidos no crivo número 3;
- % sol.cribo 4: percentagem de sólidos no crivo número 4;
- d: diâmetro;
- D_p: diâmetro médio das partículas sólidas (mm)

V. Determinação de proteína total na matéria-prima

A proteína total foi determinada de acordo com o método de Kjeldahl (1975). Foram pesadas 0,5 g de amostra em quadrinhos de papel de pesagem e colocadas directamente nos tubos de digestão aos quais se adicionou 10 g de mistura catalisadora e 20 ml de H₂SO₄ concentrado (96% p/p). 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 de condensação de fumos, abriu-se a fonte de vácuo e a tromba de água. Nos primeiros 30 min do processo, a temperatura foi moderada e após este período foi elevada até 320°C, durante 1,5 h. Terminada a digestão e arrefecido o conteúdo dos tubos, colocaram-se estes na unidade de destilação (Kjeltec System modelo 1026, Tecator, Suécia). Em simultâneo com cada tubo foi colocado um balão erlenmeyer contendo 50 mL de solução de ácido bórico a 4 %. 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 que se torna violeta a pH 4,8. Para o ensaio em branco procedeu-se da mesma forma, substituindo o peso da amostra por água destilada.

Quadro 0.5 - Reagentes utilizados na determinação da proteína total.

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.

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

$$\text{Azoto total (\%)} = \left(\frac{V - V_0}{A} \right) \times 0,14 \quad (\text{Eq.VI.1})$$

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- peso de amostra (g)

Na transformação dos resultados em peso de proteína utilizou-se o coeficiente 6,25.

VI. Doseamento dos extractivos

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 extracção 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 extracção 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 extracção 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 extracção 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 este nos Soxhlet e ajustaram-se as mantas de aquecimento para fornecer um mínimo de 6-10 ciclos

por hora. Conclui-se a extracção ao fim de 17h. Deixou-se arrefecer tudo à temperatura ambiente e pesou-se os balões e a cartucha.

$$\text{Extractivos (\%)} = \left(\frac{m - m_0}{A} \right) \times 100 \quad (\text{Eq.VI})$$

- m refere-se à massa do balão mais extractivos, após cada uma das extracções (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)

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-Ciocalteu 1/10 (v/v)

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, a 100 µl de amostra, 5 ml de solução de Folin-Ciocalteu 1/10 e 4 mL de carbonato de cálcio 7,5% (p/v), agitando no vortex a cada adição. As amostras foram incubadas em banho-maria, a 45 °C durante 15 min. Após o que se agitou novamente e leu 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 0,6 g·L⁻¹)

Cálculos

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