



Hinc patriam sustinet

**Instituto Superior de Agronomia**  
**Universidade Técnica de Lisboa**



## **Otimização da produção de xilitol por estirpes de *Debaryomyces hansenii* em hidrolisado de *Arundo donax***

**Filipa de Sousa Bandeira**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
**Engenharia Alimentar – Processamento dos Alimentos**

Orientador: Doutor Luís Jorge Abreu Chorão de Quelhas Duarte

Co-orientador: Doutora Maria Luísa Louro Martins

### **Júri:**

Presidente: Doutora Maria Luísa Lopes de Castro e Brito, 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;

Doutor Miguel Pedro de Freitas Barbosa Mourato, Professor Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

Doutor Luís Jorge Abreu Chorão de Quelhas Duarte, Investigador Auxiliar do Laboratório Nacional de Engenharia e Geologia;

Doutor José Manuel Salgado Seara, Center of Biological Engineering – Universidade do Minho.

Lisboa, 2012



*“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.

Ao Doutor Francisco Gírio, Diretor da Unidade de Bioenergia, onde realizei o meu estágio, pela possibilidade concedida.

Aos professores Luísa Louro e Miguel Mourato pela disponibilidade, apoio e confiança que depositaram em mim.

Ao Doutor Luís C. Duarte pela sua tão alargada disponibilidade, orientação, paciência, dedicação, compreensão e pelo que me ensinou. Um muito Obrigado por ter contribuído para a minha aprendizagem e para o meu crescimento, tanto intelectual como pessoal.

À Doutora Florbela Carvalheiro, por toda a ajuda, simpatia e profissionalismo.

À Amélia, à Céu, à Margarida, à Belina e ao Carlos pelo apoio prestado a nível experimental e pela força que me deram ao longo do estágio.

A todos os bolseiros que me acompanharam nesta jornada, Patrícia, Pedro, Diana, Talita e Ivone, um Obrigada por tudo o que me ensinaram e por estarem sempre presentes quando precisei! Um especial Obrigada à Ivone e à Patrícia pelo empenho e disponibilidade que sempre demonstraram, pelo apoio e dedicação.

Aos meus colegas de laboratório André, Rita, Mafalda, Karen, Catarina, Zeny, Joana e Sofia, pelo companheirismo, simpatia e pelo excelente ambiente de trabalho. Um muito Obrigado à Rita por toda a ajuda demonstrada e às minhas amigas para a vida Karen e Mafalda pela amizade, dedicação, paciência e por todas as conversas e desabafos. Adoro-vos!

Aos meus pais e irmã, os grandes responsáveis por tudo. Obrigada pelos sacrifícios, dedicação, paciência e amor. Serão sempre os meus pilares e a força que me faz ultrapassar todos os obstáculos da vida.

Ao André, pelo apoio incondicional que me deu nos momentos mais difíceis. Um Obrigado pelo amor, amizade e companheirismo.

Aos meus avós, tios, primos e família, por simplesmente existirem!

Aos meus amigos, principalmente à Maria e à Ana Sofia pela amizade, conselhos e dedicação.

Obrigada



## **Lista de publicações**

Parte dos resultados desta tese serão divulgados como:

Bandeira, F.S., Torrado, I., Carvalheiro, F., Duarte, L.C. The effect of particle size on the production of soluble sugars from *Arundo donax* biomass. Em preparação.

Bandeira, F.S., Torrado, I., Carvalheiro, F., Duarte, L.C. Xylitol production in *Arundo donax* hemicellulosic hydrolysate: The effect of inoculum production conditions. Em preparação.



## Resumo

O *Arundo donax* L. é uma cultura energética com elevado potencial para a produção de bioenergia e produtos de valor acrescentado, mas a sua exploração num enquadramento de biorrefinaria necessita ainda de aprofundamento. Neste trabalho pretende-se contribuir para o desenvolvimento de um processo de valorização das suas hemiceluloses pela bioprodução de xilitol.

A matéria-prima foi moída tendo-se estudado a influência da granulometria na hidrólise ácida. A composição dos hidrolisados e dos resíduos sólidos obtidos não apresentou diferenças significativas para as frações ensaiadas (< 2 mm).

Comparou-se seguidamente a *performance* fermentativa de três estirpes de *Debaryomyces hansenii*, em meio quimicamente definido (MQD) e a tolerância e aclimação destas ao meio com hidrolisado. A estirpe CCMII 941 destacou-se por apresentar a maior taxa de consumo de xilose ( $0,26 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ) em MQD e maior tolerância ao hidrolisado, sendo por isso selecionada para a otimização do processo de produção de xilitol.

Os melhores resultados de rendimento e produtividade em xilitol na globalidade do processo ( $0,77 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$  e  $0,09 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ , respetivamente) foram obtidos sob condições de semi-aerobiose utilizando hidrolisado concentrado duas vezes, não suplementado, não-destoxificado e um inóculo produzido em apenas um passo de aclimação sob condições de aerobiose plena. Este rendimento é um dos mais elevados descritos na literatura para esta estirpe.

## Palavras-chave

*Arundo donax* L.

Granulometria

Hidrólise com ácido diluído

Aclimação microbiana

*Debaryomyces hansenii*

Xilitol



## Abstract

*Arundo donax* L. is a Mediterranean energy crop with a high potential for the production of bioenergy and added-value products. Nevertheless, its exploration within a biorefinery framework still requires further developments. This work aims to contribute for the development of a strategy to upgrade its hemicellulose fraction, by means of xylitol bioproduction.

The raw material was milled and the influence of particle size on acid hydrolysis was studied. The composition of the hydrolysates and residual solids obtained did not differ significantly for the different fractions tested (< 2 mm).

Three *Debaryomyces hansenii* strains were compared in chemically defined medium (CDM), and their tolerance and acclimatization were studied using non-detoxified hydrolysate-based medium (HM). Strain CCMI 941 presented the highest xylose consumption rate ( $0.26 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ) in CDM and the best tolerance to the HM. For this reason, this strain was selected for the optimization of the xylitol bioprocess.

The best results for xylitol yield and productivity in overall process ( $0.77 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$  and  $0.09 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ , respectively) were obtained under semi-aerobic conditions, using a twofold concentrated, not supplemented, non-detoxified hydrolyzate and an inoculum with a single step of acclimatization under full aerobic conditions. This yield is one of the highest reported in literature for this strain.

## Key-words

*Arundo donax* L.

Diluted acid hydrolysis

Particle size

Microbial acclimatization

*Debaryomyces hansenii*

Xylitol



## Extended Abstract

*Arundo donax* L., also known as giant reed, is an herbaceous material common in southern Europe (Mediterranean region) and widely distributed in tropical, subtropical and temperate regions. It is considered as an energy crop. Due to its high abundance and perennial growth, there is no need to use chemicals and fertilizers. As such, it is mainly used as an inexpensive energy source and an alternative way to produce paper pulp.

Stem's polysaccharide content (near 61 %), as quantified in this work make it an interesting material for the biotechnological valorization within the biorefinery concept. The high hemicellulose content (that accounts for approximately 43 % of total 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.

Previous optimized dilute acid hydrolysis conditions (liquid/solid ratio of 7, [H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>] of 1.274 %, 130 °C and 105 minutes of isothermal period) were used for the selective recovery of hemicelluloses. Heterogeneous systems, as the biomass hydrolysis reaction(s), are typically dependent of particle size that some authors consider to be among the most important variables affecting process yield. Since these studies have not been applied yet to *A. donax*, five different particle sizes (< 2 mm) were evaluated, after confirming that these granulometric fractions were similar in composition to assure that no other variables affect the results. Hydrolysate and solid residues chemical composition were chemically characterized, and no significant change between the fractions were identified, what is a further advantage of this raw material as it enables efficient operation at higher particle size, which will positively affect milling costs.

Under optimal conditions, *A. donax* L. hydrolysate contains about 28 g·L<sup>-1</sup> of xylose. Furthermore, glucose was found in relative low amounts (similar to arabinose concentration, approx. 2.5 g·L<sup>-1</sup>), rendering this hydrolysate quite interesting for studying pentose upgrade due to its high xylose/sugars ratio. The amounts of potential microbial inhibitors, furans (furfural and hydroxymethylfurfural) and phenolic compounds were low compared to other hydrolysates, e.g. as EOP (extracted olive pomace) hydrolysates. Conversely, aliphatic acids content (mainly acetic acid) is relevant. This can potentially reduce the bioconversion costs, as detoxification processes might be omitted. As such in this work, no explicit detoxification method will be assayed. The remaining solids have an increased glucan and lignin content that can be used in other applications, such as upgrading into bioethanol (e.g. through enzymatic hydrolysis) and added-value phenolic compounds, respectively, within the integrated biorefinery concept.

In order to access polyols production in *A. donax* hydrolysate, three *Debaryomyces hansenii* yeast strains, var. *hansenii* (CCMI 493) and var. *fabryi* (CCMI 496 and CCMI 941) were cultivated in an

initial chemical defined medium with  $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  of xylose in order to have some insight on their pentose metabolism. As expected, they have shown a quite different behavior. The best growth and the highest rate of xylose consumption ( $0.26 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ) were found for CCMI 941 strain. No growth or xylose assimilation was observed for the var. *hansenii* strain, unless when chemically defined medium containing glucose ( $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) was assayed.

All strains were also studied in non-detoxified hydrolysate based media. Again, CCMI 941 presented the best performance as it could be easily acclimatized to the hydrolysate in a single run. Conversely, CCMI 496 showed a lower tolerance and var. *hansenii* strain presented no significant growth. As such, CCMI 941 was selected for bioprocess optimization.

Bioprocess was optimized both concerning the biomass production phase studying oxygen availability under full aerobic conditions and standard aerobic conditions. Xylitol production was studied on a two-fold concentrated hydrolysate, evaluating the impacts of oxygen availability, supplementation and inocula preparation strategy.

For this, two hydrolysate conditioning strategies (sequence of pH correction and evaporation) were compared. As lower loss of hydrolysate volume was found when the concentration was applied after pH correction, this was the chosen strategy, although it had a high recovery of acetic acid.

As expected a higher biomass production rate was found using full aerobic conditions. And although the cells were putatively not as tune as the cultures grown under aerobic conditions, the observed xylitol yield in the xylitol production phase was higher, irrespectively of supplementation and oxygen availability conditions for the xylitol production phase.

Supplementation was also found to be negligible, as it did not induce higher yields as compared to non-supplemented hydrolysates.

As such, the best results for xylitol yield and productivity under full aerobic conditions ( $0.77 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$  and  $0.09 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ , respectively) were obtained under semi-aerobic conditions, using a twofold concentrated, not supplemented, non-detoxified hydrolyzate and an inoculum with a single step of acclimatization under full aerobic conditions. This yield is one of the highest reported in literature, thus confirming the high upgradability potential of *A. donax* hemicellulosic hydrolysate in a biorefinery framework.

# Índice Geral

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>V</b>
<b>LISTA DE PUBLICAÇÕES</b> .....	<b>VII</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>IX</b>
PALAVRAS-CHAVE .....	IX
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>XI</b>
KEY-WORDS .....	XI
<b>EXTENDED ABSTRACT</b> .....	<b>XIII</b>
<b>ÍNDICE GERAL</b> .....	<b>XV</b>
<b>ÍNDICE DE QUADROS</b> .....	<b>XVII</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>XIX</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	<b>XXI</b>
<b>ENQUADRAMENTO</b> .....	<b>XXV</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1 OS MATERIAIS LENHOCELULÓSICOS COMO MATÉRIAS-PRIMAS .....	1
1.2 ESTRUTURA DOS MATERIAIS LENHOCELULÓSICOS .....	2
1.3 COMPOSIÇÃO DOS MATERIAIS LENHOCELULÓSICOS .....	3
1.3.1 <i>Polímeros de elevada massa molecular</i> .....	4
1.3.1.1 Celulose .....	4
1.3.1.2 Hemiceluloses .....	6
1.3.1.3 Lenhina .....	7
1.3.2 <i>Outros compostos presentes nos materiais lenhocelulósicos</i> .....	8
1.4 CULTURAS ENERGÉTICAS .....	9
1.4.1 <i>Arundo donax L.</i> .....	9
1.5 FRACIONAMENTO DOS MATERIAIS LENHOCELULÓSICOS .....	12
1.5.1 <i>Hidrólise ácida</i> .....	13
1.5.2 <i>Fatores que influenciam a eficiência da hidrólise</i> .....	15
1.5.2.1 Utilização de ácidos concentrados .....	15
1.5.2.2 Utilização de ácidos diluídos .....	15
1.5.2.3 O efeito da granulometria .....	16
1.6 VALORIZAÇÃO DO MATERIAL LENHOCELULÓSICO .....	17
1.6.1 <i>Xilitol</i> .....	18
1.7 PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE XILITOL .....	21
1.7.1 <i>Microrganismos produtores de xilitol</i> .....	21
1.7.1.1 A levedura <i>Debaryomyces hansenii</i> .....	22
1.7.1.2 Metabolismo das pentoses em <i>D. hansenii</i> .....	23
1.7.2 <i>Fatores que influenciam a produção de xilitol em leveduras</i> .....	25
1.7.2.1 Fatores bióticos .....	25
1.7.2.2 Fatores abióticos .....	26
1.8 OBJETIVOS .....	30
<b>2 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>31</b>
2.1 MATÉRIA-PRIMA E SUA PREPARAÇÃO .....	31

2.2	HIDRÓLISE ÁCIDA.....	31
2.3	MÉTODOS DE CONDICIONAMENTO DO HIDROLISADO .....	32
2.3.1	Acerto pH.....	33
2.3.2	Concentração do hidrolisado .....	33
2.4	MICROORGANISMOS E CONDIÇÕES DE CULTURA.....	33
2.4.1	<i>Microorganismos</i> .....	33
2.4.1.1	Preparação de culturas <i>stock</i> .....	33
2.4.2	<i>Condições de cultura</i> .....	34
2.4.2.1	Amostragem .....	35
2.4.2.2	Controlo da pureza das culturas.....	35
2.5	MÉTODOS ANALÍTICOS .....	35
2.5.1	<i>Caracterização granulométrica</i> .....	35
2.5.2	<i>Caracterização química da matéria-prima e dos resíduos sólidos da hidrólise</i> .....	36
2.5.2.1	Determinação da humidade e cinza .....	36
2.5.2.2	Determinação dos polissacáridos e grupos acetilo .....	36
2.5.2.3	Determinação da lenhina.....	37
2.5.2.4	Determinação da proteína total.....	37
2.5.2.5	Determinação dos extrativos .....	38
2.5.3	<i>Caracterização química dos hidrolisados</i> .....	39
2.5.3.1	Doseamento dos monossacáridos, ácidos alifáticos e derivados de furano .....	39
2.5.3.2	Doseamento dos compostos fenólicos .....	39
2.5.4	<i>Determinação da concentração de biomassa celular</i> .....	40
2.5.5	<i>Doseamento de monossacáridos, compostos inibidores e produtos resultantes do metabolismo microbiano</i> .....	41
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>43</b>
3.1	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA MATÉRIA-PRIMA.....	43
3.1.1	<i>Caracterização granulométrica</i> .....	43
3.1.2	<i>Caracterização química</i> .....	44
3.2	EFEITO DA GRANULOMETRIA NA HIDRÓLISE ÁCIDA DE <i>ARUNDO DONAX</i> L.....	45
3.2.1	<i>Composição da fração líquida</i> .....	45
3.2.2	<i>Composição da fração sólida</i> .....	46
3.3	PRODUÇÃO DE HIDROLISADO DE <i>ARUNDO DONAX</i> L.....	48
3.4	AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE CONDICIONAMENTO DO HIDROLISADO NA SUA COMPOSIÇÃO QUÍMICA.....	48
3.5	COMPARAÇÃO DA FISIOLOGIA DE DIFERENTES ESTIRPES DE <i>D. HANSENII</i> EM MEIOS QUIMICAMENTE DEFINIDOS .....	51
3.6	ESTUDO DA ACLIMATAÇÃO DAS DIFERENTES ESTIRPES DE <i>D. HANSENII</i> AO HIDROLISADO DE <i>A. DONAX</i> .....	55
3.6.1	<i>Otimização da concentração inicial de inóculo</i> .....	58
3.6.2	<i>Estudo do efeito da disponibilidade de oxigénio na produção de inóculo</i> .....	60
3.7	ESTUDO DO EFEITO DO MÉTODO DE PRODUÇÃO DE INÓCULO NA PRODUÇÃO DE XILITOL .....	61
3.7.1	<i>Produção de xilitol em meio duas vezes concentrado - Efeito da disponibilidade de oxigénio</i> .....	65
<b>4</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPETIVAS .....</b>	<b>69</b>
<b>5</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>71</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>83</b>	

## Índice de Quadros

Quadro 1 – Classificação taxonómica do <i>Arundo donax</i> L. (adaptado de [Pilu <i>et al.</i> , 2012]).	10
Quadro 2 - Propriedades físico-químicas do xilitol (adaptado de [Hyvönen <i>et al.</i> , 1982]).	19
Quadro 3 - Condições de hidrólise ácida diluída otimizadas para funcionamento em autoclave.	31
Quadro 4 - Frações utilizadas para o estudo do efeito da granulometria.	32
Quadro 5 - Condições de crescimento de leveduras para preparação das culturas <i>stock</i> para inóculo.	34
Quadro 6 - Condições predominantes de disponibilidade de oxigénio de crescimento de leveduras para preparação das culturas <i>stock</i> para inóculo.	34
Quadro 7 - Dimensões dos peneiros usados na caracterização granulométrica.	36
Quadro 8 - Características do Cromatógrafo <i>Agilent 110 Series</i> .	39
Quadro 9 - Condições de operação para análise em HPLC para a coluna HPX-87H.	39
Quadro 10 - Condições de análise por eletroforese capilar.	40
Quadro 11 - Condições de operação para análise em HPLC para a coluna Sugar-Pak.	41
Quadro 12 - Composição química média do <i>A. donax</i> (percentagem em base seca) de acordo com as frações granulométrica em estudo.	44
Quadro 13 - Composição química dos hidrolisados obtidos após hidrólise ácida, para as frações granulométricas em estudo.	46
Quadro 14 - Composição química média dos resíduos sólidos de <i>A. donax</i> obtidos após hidrólise com ácido diluído (percentagem em base seca).	47
Quadro 15 - Parâmetros cinéticos para o crescimento das estirpes CCMI 496 e CCMI 941 em MQD-X suplementado com TEVM.	52
Quadro 16 - Parâmetros cinéticos e estequiométricos para o crescimento da CCMI 941 em meio de hidrolisado suplementado com TEVM para diferentes concentrações de inóculo.	60
Quadro 17 - Parâmetros cinéticos e estequiométricos para o crescimento da estirpe CCMI 941, em meio de hidrolisado suplementado com TEVM para condições de aerobiose e aerobiose plena.	61
Quadro 18 - Composição do hidrolisado após acerto de pH e concentração.	63
Quadro 19 - Influência da suplementação e das diferentes produções de inóculo nos parâmetros cinéticos e estequiométricos para a produção de xilitol pela levedura <i>D. hansenii</i> .	65
Quadro 20 - Efeito da disponibilidade de oxigénio nos parâmetros cinéticos e estequiométricos para a produção de xilitol para a levedura <i>D. hansenii</i> .	67



## Índice de Figuras

Figura 1 - Organização estrutural dos principais componentes de materiais lenhocelulósicos. (A) Diagrama esquemático dos principais componentes estruturais da estrutura primária da parede celular vegetal [Brett and Waldron, 1996]; (B) Esquema representativo da disposição dos componentes macromoleculares da estrutura secundária da parede celular vegetal [Silva, 2010].	3
Figura 2- Composição química dos materiais lenhocelulósicos.	4
Figura 3 - Representação esquemática da celulose e das suas ligações inter e intramoleculares [Morais <i>et al.</i> , 2005].	5
Figura 4 - Estrutura esquemática de heteroxilanos complexos. A-Arabinofuranose; X- Xilopirranose; G- Galactopirranose; GlcA- Ácido glucurónico; FeA- Ácido ferúlico [Saulnier <i>et al.</i> , 1995].	7
Figura 5 - Representação de uma macromolécula de lenhina.	8
Figura 6 - <i>Arundo donax</i> L. [Coelho, 2005].	11
Figura 7 – Esquema representativo do fracionamento dos materiais lenhocelulósicos [Mosier <i>et al.</i> , 2005].	13
Figura 8- Principais produtos resultantes da hidrólise de um material lenhocelulósico (adaptado de [Palmqvist <i>et al.</i> , 2000; Balat, 2010]).	14
Figura 9 - Mecanismo proposto para a cisão das ligações glicosídicas na despolimerização das hemiceluloses em meio ácido (Adaptado de [Belkacemi <i>et al.</i> , 1991]).	14
Figura 10- Fluxograma das tecnologias utilizadas na produção de xilitol, à escala industrial (adaptado de [Parajó <i>et al.</i> , 1998a; Mussatto <i>et al.</i> , 2002]).	20
Figura 11 - Passos iniciais do metabolismo da D-xilose em <i>D. hansenii</i> e mecanismo bioquímico da acumulação de xilitol [Winke lhausen <i>et al.</i> , 1998].	24
Figura 12 - Distribuição granulométrica do <i>A. donax</i> moído a 1mm e moído a 4 mm.	43
Figura 13- Fluxograma representativo do balanço de massa em produção de hidrolisados: (A) base húmida e (B) base seca.	48
Figura 14 - Influência dos diferentes métodos de condicionamento utilizados na remoção (%) de alguns compostos presentes no hidrolisado.	49
Figura 15 - Fluxograma das etapas de condicionamento de hidrolisado com acerto do pH (A) antes da concentração; (B) depois da concentração.	50
Figura 16 - Perfis de crescimento da levedura <i>D. hansenii</i> em MQD-X, para as estirpes CCMI 496 e CCMI 941, e respetivos perfis de pH.	51
Figura 17- Perfil de crescimento da levedura <i>D. hansenii</i> em MQD-GX, para a CCMI 493 e respetivo perfil de pH.	52
Figura 18- Perfis de consumo de substratos e peso seco em MQD-X e MQD - GX: (A) Estirpe CCMI 496; (B) Estirpe CCMI 941; (C) Estirpe CCMI 493.	53
Figura 19 - Perfis de crescimento para as estirpes CCMI 941 (A), CCMI 496 (B) e CCMI 493 (C) em MQD-X, em MQD-GX e em hidrolisado acertado a pH 5,5 e suplementado com TEVM: 1ª etapa, 2ª etapa e 3ª etapa.	57
Figura 20- Perfis de consumo de substrato, e de formação de biomassa e produtos metabólicos para hidrolisado não destoxificado e não concentrado, suplementado com TEVM, para diferentes concentrações iniciais de inóculo. (A) 0,15 g·L <sup>-1</sup> ; (B) 0,25 g·L <sup>-1</sup> ; (C) 0,37 g·L <sup>-1</sup> .	59
Figura 21 – Perfis de consumo de substrato, formação de biomassa e de produtos metabólicos para hidrolisado concentrado duas vezes com diferentes suplementações e forma de produção de inóculo.	64

Figura 22 - Perfis de consumo de substrato, formação de biomassa e de produtos metabólicos para hidrolisado concentrado duas vezes e em condições de semi-aerobiose, para diferentes suplementações.....66

## Lista de Abreviaturas e Siglas

<b>A</b>	Massa de amostra seca (g)
<b>Abs</b>	Absorvância num dado tempo
<b>Abs<sub>0</sub></b>	Absorvância inicial
<b>AFEX</b>	Explosão de vapor (do inglês: “ <i>Ammonia Fiber Explosion</i> ”)
<b>Ara</b>	Arabinose
<b>Arn</b>	Arabinano
<b>B</b>	Ordenada na origem na equação da reta
<b>C</b>	Cinza (g)
<b>CCMI</b>	Coleção de Culturas de Microrganismos Industriais do INETI
<b>CDM</b>	Meio Quimicamente Definido (do inglês: “ <i>Chemically Defined Medium</i> ”)
<b>CS</b>	Fator de severidade combinado
<b>DP</b>	Grau de polimerização
<b>DW</b>	Peso seco- massa de biomassa seca de levedura produzida
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamino tetra-acético
<b>EtOH</b>	Etanol
<b>UE</b>	União Europeia
<b>F</b>	Fator de correção
<b>F</b>	Furfural
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i> ( <a href="http://www.fda.gov">www.fda.gov</a> )
<b>FE</b>	Fibrilas elementares
<b>GEE</b>	Gases de efeito de estufa
<b>Glc</b>	Glucose
<b>GlyOH</b>	Glicerol
<b>Gn</b>	Glucano
<b>GRAS</b>	Geralmente considerado seguro (do inglês: “ <i>Generally Regarded as Safe</i> ”)
<b>Hac</b>	Ácido acético
<b>HAD</b>	Hidrólise ácida diluída
<b>HAQ</b>	Hidrólise ácida quantitativa
<b>Hfor</b>	Ácido fórmico
<b>Hlev</b>	Ácido levulínico
<b>HM</b>	Meio de hidrolisado (do inglês: “ <i>Hydrolysate based-medium</i> ”)
<b>HMF</b>	5-Hidroximetilfurfural
<b>HPLC</b>	Cromatografia Líquida de Alta Pressão (do inglês: “ <i>High Pressure Liquid Chromatography</i> ”)

<b>INE</b>	Instituto Nacional de Estatística
<b>IR</b>	Índice de refração
<b>ISA</b>	Instituto Superior de Agronomia
<b>LK</b>	Lenhina de Klason
<b>Ln</b>	Logaritmo natural
<b>LNEG</b>	Laboratório Nacional de Energia e Geologia
<b>ML</b>	Materiais lenhocelulósicos
<b>MQD</b>	Meio quimicamente definido
<b>MQD-GX</b>	Meio quimicamente definido de 10 g·L <sup>-1</sup> glucose e de 2 g·L <sup>-1</sup> xilose
<b>MQD-X</b>	Meio quimicamente definido de xilose (20 g·L <sup>-1</sup> )
<b>NP</b>	Solução de Azoto e Fósforo
<b>NREL</b>	<i>National Renewable Energy Laboratory</i> (www.nrel.gov)
<b>OS</b>	Oligossacáridos
<b>pKa</b>	- Logaritmo da constante de dissociação do ácido
<b>POH<sub>f</sub></b>	Concentração de polióis final (g·L <sup>-1</sup> )
<b>POH<sub>i</sub></b>	Concentração de polióis inicial (g·L <sup>-1</sup> )
<b>Q<sub>POH</sub></b>	Produtividade em polióis (g·L <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> )
<b>QPS</b>	Presunção de segurança sustentada (do inglês: “ <i>Qualified Presumption of Safety</i> ”)
<b>Q<sub>s</sub></b>	Taxa volumétrica de consumo de substrato (g·L <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> )
<b>Q<sub>x</sub></b>	Produtividade celular (g·L <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> )
<b>R<sub>0</sub></b>	Fator de severidade
<b>RIA</b>	Peso seco do resíduo insolúvel em ácido (g)
<b>RLS</b>	Razão líquido-sólido
<b>S<sub>f</sub></b>	Concentração final de substrato (g·L <sup>-1</sup> )
<b>S<sub>i</sub></b>	Concentração inicial de substrato (g·L <sup>-1</sup> )
<b>T</b>	Temperatura
<b>t</b>	Tempo
<b>TEVM</b>	Suplemento de oligoelementos, vitaminas e minerais (do inglês: “ <i>Trace Elements, Vitamins and Minerals</i> ”)
<b>t<sub>f</sub></b>	Valor final do intervalo de tempo considerado (h)
<b>t<sub>i</sub></b>	Valor inicial do intervalo de tempo considerado (h)
<b>UB</b>	Unidade de Bioenergia
<b>UV/VIS</b>	Radiação ultra violeta / Visível
<b>XDH</b>	Xilitol-desidrogenase
<b>X<sub>f</sub></b>	Concentração final de biomassa (g·L <sup>-1</sup> )
<b>X<sub>i</sub></b>	Concentração inicial de biomassa (g·L <sup>-1</sup> )

<b>Xn</b>	Xilano
<b>XR</b>	Xilose-redutase
<b>Xyl</b>	Xilose
<b>XylOH</b>	Xilitol
<b>YE</b>	Extracto de levedura (do inglês: “ <i>Yeast extract</i> ”)
<b>YM-glc</b>	<i>Yeast Malt</i> Glucose
<b>Y<sub>POH</sub></b>	Rendimento de polióis (g·g <sup>-1</sup> )
<b>Y<sub>x/s</sub></b>	Rendimento celular (g·g <sup>-1</sup> )
<b>λ</b>	Fase de latência (h)
<b>μ</b>	Taxa específica de crescimento
<b>μ<sub>máx</sub></b>	Taxa específica de crescimento máxima (h <sup>-1</sup> )



## **Enquadramento**

Este trabalho foi realizado na Unidade de Bioenergia (UB) do Laboratório Nacional de Energia e Geologia (LNEG), no âmbito do projeto “CropBioRef: Valorização de plantas Mediterrânicas energéticas, a cana e o cardo, por conversão bioquímica integrada, em pastas de elevada qualidade, etanol, xilitol e produtos à base de lenhina – um conceito complexo de biorefinaria LCF” (PTDC/AGR-CFL/103840 - 2010-2013) financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia.



# 1 Introdução

## 1.1 Os materiais lenhocelulósicos como matérias-primas

O crescente consumo de combustíveis fósseis, aliado ao aumento do preço e ao interesse social e político em reduzir as emissões de gases de efeito de estufa (GEE), levou à necessidade de reduzir a dependência energética nestas matérias-primas petroquímicas, através do desenvolvimento de energias alternativas e de novas matérias-primas renováveis. A biomassa representa toda a fração biodegradável (não fóssil) de produtos e resíduos que é suscetível de aproveitamento energético e engloba uma panóplia de produtos biocombustíveis capazes de produzir energia, associados à abundância e aos benefícios ambientais e sociais resultantes da sua utilização [Santos, 2009]. Comparativamente com outras energias renováveis, que apenas se podem traduzir em energia ou calor, a biomassa é a única fonte disponível passível de ser convertida simultaneamente em energia, produtos químicos, materiais e combustíveis líquidos, podendo ser um fator determinante para a sua viabilidade económica. Estima-se uma quantidade de biomassa vegetal anual na ordem dos  $100 \times 10^9$  toneladas em todo planeta Terra, de composição variada e de grande interesse económico, alimentar e ambiental [Kuhad *et al.*, 1993].

Embora seja necessário ultrapassar alguns obstáculos, nomeadamente relacionados com a capacidade de produção energética comparativamente ao petróleo (para atingir a mesma quantidade de energia, é necessário um peso 4,5 vezes superior ou um volume 12,5 vezes superior de biomassa [Saião, 2009]), foi citado pela Comissão Europeia, no seu Plano de Ação Biomassa, que a produção de biomassa representa atualmente cerca de 50 % das energias renováveis utilizadas na União Europeia (UE). A meta estabelecida pela UE prevê que uma contribuição de 20 % de energias renováveis em 2020 só será possível de alcançar, no caso de Portugal, recorrendo à biomassa e aos biocombustíveis, que irão estimular novas oportunidades de mercado para os setores florestal e agrícola, contribuindo para a promoção do crescimento económico e para a independência energética do país [Nunes, 2009]. Conforme referido pelo Instituto Nacional de Estatística (INE), o consumo de biomassa em Portugal para fins energéticos subiu 1,5 % entre 1995 e 2009, encontrando-se em terceiro lugar no *ranking* das fontes de energia mais utilizadas no país, sendo apenas ultrapassada pelo gásóleo e o gás natural.

A biomassa vegetal, nomeadamente os resíduos lenhocelulósicos e as culturas energéticas, constituem uma importante fonte de biomassa renovável. Estima-se que a sua produção anual represente metade da biomassa existente na terra [Sánchez, 2009]. Apesar da sua biodegradabilidade, estes resíduos e subprodutos orgânicos ricos em carbono, provenientes de práticas florestais, agrícolas, industriais e urbanos, podem constituir um problema ambiental, para o qual são necessárias soluções devido às quantidades envolvidas. O seu aproveitamento deve permitir a obtenção de produtos de valor acrescentado associado à garantia da sustentabilidade do ponto de vista ambiental. O cumprimento destes objetivos será tanto mais conseguido quanto maior for a percentagem de biomassa

utilizada. A biomassa lenhocelulósica surge como a melhor alternativa aos combustíveis fósseis, pois é produzida por fotossíntese e representa o recurso biológico renovável mais abundante [Kumar *et al.*, 2008], em contrapartida à aplicação de culturas alimentares para a produção de energia, como a cana-de-açúcar, que levanta questões paradoxais.

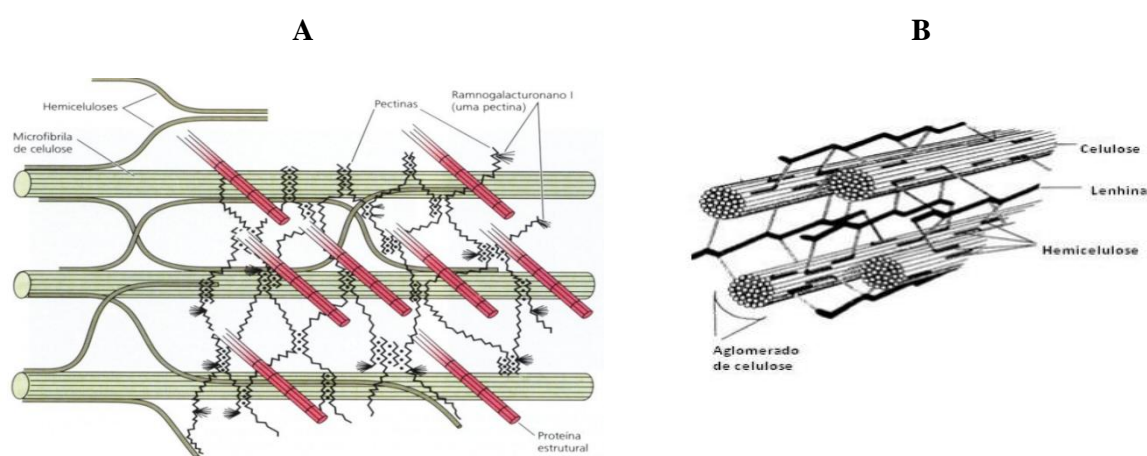
Neste contexto surgiu o conceito de biorrefinaria, que, visa um aproveitamento integrado de todos os componentes da biomassa vegetal, ou seja, tem subjacente a ideia de que todos os componentes da biomassa são passíveis de utilização. Uma biorrefinaria integrada é um conceito global de um processo integrado e diversificado, onde todas as fontes de biomassa são convertidas em uma ampla gama de produtos de valor acrescentado, sem que ocorram desperdícios, nos quais se incluem ingredientes alimentares, químicos, produtos farmacêuticos, materiais para construção, compósitos industriais complexos, energia e biocombustíveis [Gravitis *et al.*, 1999]. Em comparação com refinarias de petróleo, as biorrefinarias apontam para a utilização de uma maior variedade de matérias-primas e uma maior gama de tecnologias de processamento. O aumento da produtividade e da eficiência também podem ser alcançados por meio de operações que maximizam a utilização de toda a biomassa, usando economias de escala, operações comuns de processamento, materiais e equipamentos que reduzem os custos de produção. A biorrefinaria pode ser considerada como uma evolução de conceitos como a “química verde”, conceito que se define como sendo a utilização de técnicas e metodologias químicas não poluentes em busca da auto-sustentabilidade [Cann *et al.*, 2000]. Um dos aspetos singulares das biorrefinarias está relacionado com o facto da biomassa vegetal ser constituída por diversas frações, de composição química muito variada, o que coloca desafios importantes em termos de inovação de modo a permitir a sua utilização de forma eficiente.

## **1.2 Estrutura dos materiais lenhocelulósicos**

Designam-se como materiais lenhocelulósicos (ML) os diferentes tipos de biomassa de origem vegetal que têm como característica comum serem principalmente constituídos por polissacáridos (celulose e hemiceluloses), que constituem 75-80 % das paredes celulares vegetais, e lenhina [Verma *et al.*, 2011]. São polímeros insolúveis em água, com função estrutural. A estrutura primária das paredes celulares vegetais é composta por fibras rígidas, designadas por microfibrilas de celulose com propriedades cristalinas, envolvidas numa matriz hidratada constituída por hemiceluloses, pectinas e uma pequena quantidade de proteínas estruturais organizadas (Figura 1A). Nesta primeira camada, as microfibrilas não apresentam uma direção definida e encontram-se ligadas por pontes de hidrogénio, que torna a estrutura mais flexível e confere a elasticidade necessária ao crescimento das plantas. Novas camadas de celulose depositadas dentro da parede primária geram espessamento, com impregnação de camadas sucessivas de uma matriz polimérica hidrofóbica, a lenhina, em torno das fibras de celulose, formando assim a parede secundária (Figura 1B). Devido à organização das microfibrilas numa dada direção, esta camada secundária apresenta uma maior rigidez e, uma vez

formada, impede que as células cresçam. Assim, é possível a formação de um sistema vascular complexo, imprescindível a espécies de grande porte. Para além destas ligações, existe ainda uma camada entre as paredes celulares de células vizinhas (intercelular) de lamela média, quase exclusivamente constituída por lenhina, que confere coesão à estrutura celular.

Assim sendo, a parede celular apresenta baixa porosidade, o que impede a infiltração de moléculas de elevada massa molar, como enzimas, criando uma barreira ao processo biodegradativo. Desta forma, o grupo de compostos capazes de degradar os materiais lenhocelulósicos é restrito, sendo que a remoção dos elementos de estrutura mencionados apenas pode ser alcançado através de tratamentos químicos ou mecânicos, para que ocorra a despolicimerização ou solubilização [Aguar *et al.*, 2011].



**Figura 1 - Organização estrutural dos principais componentes de materiais lenhocelulósicos. (A) Diagrama esquemático dos principais componentes estruturais da estrutura primária da parede celular vegetal [Brett and Waldron, 1996]; (B) Esquema representativo da disposição dos componentes macromoleculares da estrutura secundária da parede celular vegetal [Silva, 2010].**

### 1.3 Composição dos materiais lenhocelulósicos

Do ponto de vista químico, os componentes dos ML podem ser classificados segundo a sua massa molecular e a sua solubilidade. Encontram-se presentes polímeros de alta massa molecular insolúveis, como é o caso da celulose, hemiceluloses, lenhina e outros polímeros que, juntamente com outras substâncias orgânicas de massa molecular reduzida representam a fração de extrativos. A fração inorgânica, designada por cinza, é contabilizada na definição de substâncias de baixa massa molecular, representando este conjunto de substâncias, uma pequena fração lenhocelulósica (Figura 2). Os componentes orgânicos podem ser facilmente removidos através da utilização de solventes com polaridade adequada, sem alterações significativas das características estruturais.

A composição dos ML nos constituintes apresentados varia consoante fatores como a origem, condições de crescimento, a espécie vegetal e, dentro dessa mesma espécie, com fatores genéticos e ambientais.

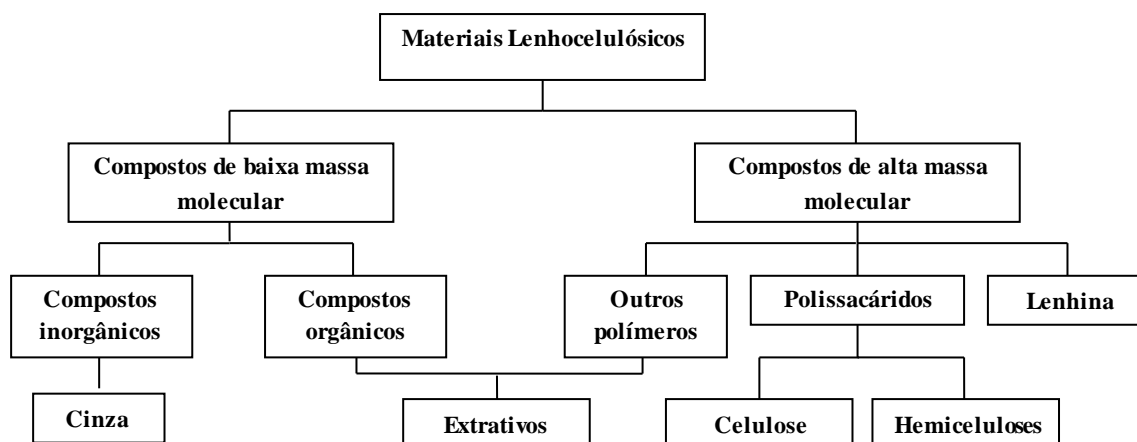


Figura 2- Composição química dos materiais lenhocelulósicos.

Os ML são habitualmente classificados de acordo com a sua composição química, propriedades físicas, químicas e mecânicas, em três grupos diferentes: materiais lenhosos, do tipo madeira, que podem ser resinosas (gimnospermas) ou folhosas (angiospermas) e materiais não-lenhosos, que incluem principalmente materiais herbáceos como os materiais agrícolas e agro-industriais. As elevadas quantidades de ML considerados como “resíduos” podem, potencialmente, ser convertidos em diferentes produtos de valor acrescentado, sendo os biocombustíveis a maior porção obtida através destes materiais. Contudo, também podem ser utilizados para a produção de massa proteica para fins alimentares e de metabolitos de valor acrescentado, como é o caso do xilitol, sorbitol e arabitol [Sheldon, 2011]. De um modo geral, os materiais agrícolas são os mais ricos em hemiceluloses, as madeiras folhosas as que apresentam um maior teor de celulose, enquanto as madeiras resinosas são as mais ricas em lenhina [Fengel *et al.*, 1984].

### 1.3.1 Polímeros de elevada massa molecular

#### 1.3.1.1 Celulose

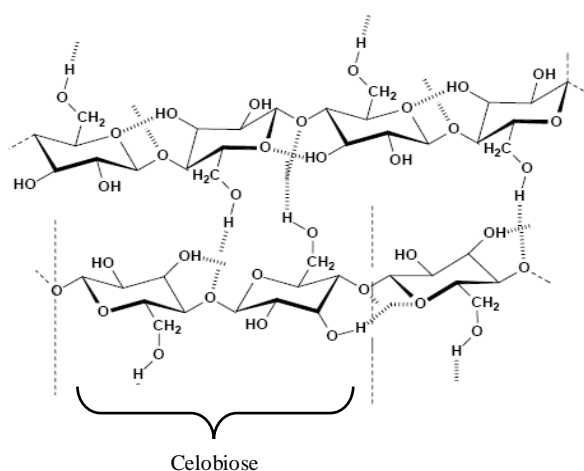
A celulose representa, em geral, a maior fração de massa seca total dos materiais lenhocelulósicos (23-25 %), podendo também ser encontrada em bactérias, fungos e algas. Confere à biomassa suporte estrutural e apresenta-se sob forma de polímero linear com um grau de polimerização (DP) que pode variar entre 9 000 e 10 000 unidades de glucose ligadas entre si capazes de formar cadeias lineares bem estruturadas [Rowell, 1992].

É assim constituída por monómeros de  $\beta$ -D-glucopiranosilo (forma cíclica de resíduos de glucose) unidas por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 (covalentes) com peso molecular de cerca de  $10^6$  Da [Buzetzi

*et al.*, 2011] apresentando cada molécula de glucose 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] (Figura 3).

Cada molécula de celulose estabelece ligações inter e intra-moleculares, através de pontes de hidrogénio estabelecidas entre unidades de glucose de moléculas adjacentes ou entre glucoses da mesma cadeia celulósica, respetivamente (Figura 3). As ligações intermoleculares são responsáveis pela rigidez e as intramoleculares pela formação de fibrilas elementares (FE) altamente ordenadas, que se associam formando filamentos longos agrupados, as microfibrilas. Estes filamentos são na sua maioria independentes mas a sua ultra-estrutura resulta em grande parte do estabelecimento de ligações covalentes, pontes de hidrogénio e forças de *Van der Waals*, sendo estas últimas as que permitem a união entre as camadas superiores dentro da parede celular [Pereira *et al.*, 2003].

As microfibrilas de celulose apresentam zonas mais ordenadas, com elevado grau de cristalinidade, e zonas desordenadas e amorfas. Estima-se que 70 % da celulose se encontre sob a forma cristalina e altamente ordenada [Pereira *et al.*, 2003]. Como resultado da sua estrutura cristalina, a celulose apresenta uma elevada resistência química sendo insolúvel na maioria dos solventes, como é o caso da água. Contudo, na presença de alguns ácidos, como por exemplo o ácido sulfúrico, e/ou de temperaturas elevadas (250-350 °C) [Buzetzi *et al.*, 2011] a celulose torna-se solúvel, podendo sofrer processos de hidrólise. É na região amorfa onde este polímero apresenta a sua maior flexibilidade [Vásquez *et al.*, 2007], em que a presença de grupos hidroxilo não envolvidos em ligações entre as cadeias, particularmente presentes nas regiões amorfas, confere à celulose propriedades higroscópicas [Pereira, 2004]. A celulose surge na natureza associada a outros componentes, estruturalmente ligada às hemiceluloses e à lenhina, conferindo-lhe resistência à hidrólise, o que representa um grande desafio para a utilização dos materiais lenhocelulósicos em aplicações biotecnológicas, com a produção de etanol de segunda geração e xilitol [Arantes *et al.*, 2010].



**Figura 3 - Representação esquemática da celulose e das suas ligações inter e intramoleculares [Morais *et al.*, 2005].**

### 1.3.1.2 Hemiceluloses

As hemiceluloses são o segundo constituinte mais abundante dos ML (cerca de 1/3 do ML), diferindo da celulose por não ser quimicamente homogênea, apresentando também uma massa molecular inferior. São polímeros heterogêneos constituídos por cadeias principais de pentoses ( $\beta$ -D-xilose e  $\alpha$ -L-arabinose) e/ou hexoses ( $\beta$ -D-glucose,  $\beta$ -D-galactose,  $\alpha$ -D-manose), ramificadas com outras pentoses ou hexoses, grupos acetilo, ácidos urónicos ( $\alpha$ -D-glucurónico,  $\alpha$ -D-4-O-metilglucurónico e  $\alpha$ -D-galacturónico) e/ou compostos fenólicos, por exemplo, ácido ferúlico [Kumar *et al.*, 2008]. Outros açúcares, como a  $\alpha$ -L-ramnose e  $\alpha$ -L-fucose podem também estar presentes em pequenas quantidades [Northey *et al.*, 2000].

A sua estrutura apresenta ramificações e cadeias laterais que interagem facilmente com a celulose, dando estabilidade e flexibilidade ao agregado. Comparadas à celulose, as hemiceluloses apresentam uma maior suscetibilidade à hidrólise ácida, pois oferecem uma maior acessibilidade aos ácidos minerais comumente utilizados como catalisadores. A falta de cristalinidade e o baixo grau de polimerização torna as hemiceluloses solúveis em meio ácido e alcalino. Estes polímeros apresentam um grau de polimerização que geralmente não ultrapassa o valor médio de 200 unidades de oses anidras [Sun *et al.*, 2005].

Os principais grupos constituintes das hemiceluloses são os xilanos e os glucomanos sendo que, consoante a origem biológica, a sua estrutura e composição varia.

Os xilanos são os principais componentes hemicelulósicos, constituindo 20-30 % da biomassa presente em plantas herbáceas e em madeiras folhosas [Ebringerová *et al.*, 2005]. Em alguns tecidos de gramíneas e cereais, os xilanos podem chegar aos 50 % [Stephen, 1983] e normalmente encontram-se em grandes quantidades como subproduto de polpas e madeiras, assim como na indústria do papel. Dependendo da origem biológica, o xilano pode ser encontrado em diferentes variações, apesar de conterem em comum a cadeia principal constituída por unidades de  $\beta$ -D-xilopiranosilo unidas por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 [Sedlmeyer, 2011]. Uma das classificações mais frequentemente utilizadas para os diferentes tipos de xilano é baseada no grau de substituição e nos tipos de cadeias laterais, podendo ser divididos em homoxilanos e heteroxilanos, sendo que estes últimos incluem os glucuronoxilanos, arabinoglucuronoxilanos, glucuronoarabinoxilanos, arabinoxilanos e heteroxilanos complexos [Ebringerová *et al.*, 2005] (Figura 4).

Os glucomanos são outro tipo de hemiceluloses mais comuns no grupo das resinosas e apresentam um teor superior de unidades de manose e de glucose.

Na maioria das folhosas, herbáceas e resíduos agrícolas, como cerca de 80 % dos monómeros hemicelulósicos correspondem à xilose, é frequente associar o conteúdo em hemiceluloses como sendo o conteúdo em xilano [Moure *et al.*, 2006].

A obtenção de xilitol está dependente de uma fase inicial de fracionamento das hemiceluloses, para a obtenção dos monossacáridos que as constituem, principalmente a xilose (pentose), de modo a

ser possível a sua bioconversão. O aproveitamento de resíduos lenhocelulósicos ricos em pentoses, como é o caso do *Arundo donax* L., otimiza a produção de xilitol, dando utilidade a materiais que seriam desperdiçados para outros efeitos, como por exemplo, para a combustão.



Figura 4 - Estrutura esquemática de heteroxilanos complexos. A-Arabinofuranose; X- Xilopirranose; G- Galactopirranose; GlcA- Ácido glucurônico; FeA- Ácido ferúlico [Saulnier *et al.*, 1995].

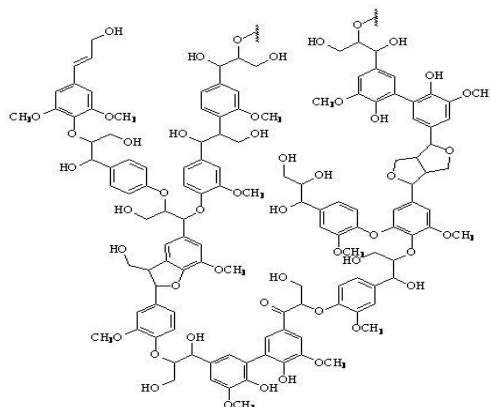
### 1.3.1.3 Lenhina

A lenhina é o terceiro polímero mais abundante na natureza e é o principal constituinte da lamela média localizada na parede celular. A lenhificação é uma das etapas finais de diferenciação das células do xilema, onde a lenhina é depositada juntamente com os hidratos de carbono, formando ligações covalentes com unidades monossacáridas das hemiceluloses. Confere assim a união dos elementos celulares entre si, tornando a parede celular rígida, impermeável e resistente a ataques microbianos e ao *stress* oxidativo. É um heteropolímero aromático e complexo, de massa molecular elevada e de natureza polifenólica, formada pela polimerização de três unidades básicas de fenilpropano unidas por ligações éter e carbono-carbono com diversas padrões de ligação. Os três principais monómeros constituintes da lenhina são os álcoois *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico (Figura 5) [Balat, 2010], sendo que a composição em cada um destes álcoois varia consoante a origem, tal como acontece com a hemicelulose [Khanal *et al.*, 2010].

Esta fração lenhocelulósica, devido às interações físicas e químicas que estabelece com os polissacáridos, principalmente com as microfibrilas de celulose, tem sido identificada como o impedimento principal para hidrólise enzimática, ácida e alcalina da biomassa lenhocelulósica. Contudo, a lenhina é mais sensível que os polissacáridos a reações de oxidação ou à ação de solventes orgânicos. Estudos realizados por Chang *et al.*[2000] e por Pereira *et al.*[2003] concluíram que a digestibilidade da biomassa é reforçada com a remoção da lenhina presente, através de processos de fracionamento.

A lenhina representa uma das maiores formas de acumulação de carbono da natureza e é o maior depósito de estruturas químicas aromáticas, constituindo-se em uma fonte potencial para a indústria química, como na recuperação de compostos fenólicos. Apesar de terem vindo a ser feitos estudos de

reaproveitamento da lenhina dada a sua complexidade, atualmente a lenhina ainda continua a ser utilizada essencialmente como fonte de energia para combustão [FitzPatrick *et al.*, 2010].



**Figura 5 - Representação de uma macromolécula de lenhina.**

### 1.3.2 Outros compostos presentes nos materiais lenhocelulósicos

Para além das substâncias estruturais (celulose, hemicelulose e lenhina), os ML possuem também outros compostos que, embora presentes em quantidades inferiores, têm relevância nas propriedades dos materiais lenhocelulósicos por apresentarem influência nas suas propriedades e por afetarem o seu processamento [Fengel *et al.*, 1984]. A sua composição e quantidade relativa dependem, tal como as macromoléculas, dos fatores já mencionados no ponto 1.3.

Os compostos orgânicos podem ser do tipo lipofílico e hidrofílico e apresentar alta ou baixa massa molecular. Exemplos de compostos de elevada massa molecular são as proteínas, pectinas e amido, facilmente extraídos com água.

As pectinas são hidrocolóides naturais presentes em plantas superiores e encontram-se naturalmente em associação com a celulose e hemicelulose auxiliando a adesão entre as células e criando uma estrutura rígida que reforça a parede celular. As plantas superiores apresentam na parede celular cerca de 30-35 % de pectinas, excetuando as gramíneas, cuja percentagem neste heteropolissacárido ronda os 10 % [Odonmmazig *et al.*, 1992]. As proteínas estruturais encontram-se na parede celular da planta e podem estar ligadas covalentemente através de ligações cruzadas com a lenhina e polissacáridos. Comparativamente com as madeiras, que são praticamente desprovidas de proteína, os materiais não-lenhosos podem apresentar teores de proteína muito elevadas. O amido é um polímero de glucose que se encontra em forma de grânulos, presente essencialmente em cereais (exemplo: sorgo) bem como em alguns resíduos, como cascas. É constituído por duas frações, amilose e amilopectina, de estrutura linear e ramificada, respetivamente. Desempenha uma função importante na planta de armazenamento de energia e carbono. Contrariamente à celulose, pela estrutura e composição que apresenta, o amido pode ser mais facilmente modificado tanto fisicamente como

quimicamente (por derivatização e hidrólise), tendo por isso uma utilidade muito maior, principalmente na área alimentar.

Outros compostos a considerar são os compostos de baixa massa molecular, que podem ser divididos em três grupos principais [Freire, 2003]: i) Compostos alifáticos, tais como alcanos, alcanóis e ceras (ésteres de álcoois alifáticos) e ácidos gordos livres. Estas frações são extraídas por solventes apolares, como é o caso do clorofórmio e do diclorometano; ii) Terpenos, terpenóides e seus derivados, como é o caso dos esteróis; iii) Compostos fenólicos, como por exemplo, flavonóides, fenóis simples e ácidos fenólicos, lignanos, estilbenos e taninos.

Além dos compostos orgânicos, é importante referir a presença de elementos inorgânicos (minerais), que englobam toda a fração de cinza. Exemplos destes compostos são o potássio, magnésio e silício.

## 1.4 Culturas energéticas

Com o previsível desenvolvimento e crescimento da aplicação do conceito de Biorrefinaria, as matérias-primas preferenciais como sejam os resíduos agrícolas e agroindustriais tenderão a ser insuficientes para a sustentação do processamento industrial. Daqui advém a necessidade da exploração do conceito de culturas energéticas como fonte de biomassa.

As culturas energéticas são culturas de baixo custo de manutenção dado apresentarem crescimento significativo sem necessidades de fertilizantes e outros produtos químicos, como pesticidas, nem de solos de elevada qualidade. De fato, são maioritariamente provenientes de campos sem atividade agrícola relevante ou marginal, não interferindo com a produção de bens alimentares [Venendaal *et al.*, 1997].

Atendendo ao tipo de matéria-prima, podem ser classificadas como glucídicas, lenhocelulósicas ou oleoginosas [Pilu *et al.*, 2012].

Entre a grande variedade de plantas herbáceas avaliadas como potenciais culturas energéticas, o *Arundo donax* L. é considerado como sendo uma das que apresenta maior potencial para a produção de biomassa, sendo um objeto preferencial de investigação [Lewandowski *et al.*, 2003].

### 1.4.1 *Arundo donax* L.

O *Arundo donax* L., também conhecido como cana-do-reino ou cana gigante (*giant reed*), é uma monocotiledónea perene pertencente à família das gramíneas (Quadro 1), comum no sul da Europa (região do Mediterrâneo) e amplamente distribuída por regiões de clima tropical, subtropical e temperado. Apresenta-se como uma estrutura tubular segmentada, semelhante ao bambu e a sua origem exata ainda não se encontra determinada, dada a facilidade em se expandir e crescer em vários tipos de solo [Gücel, 2010]. Contudo, a maior taxa de crescimento desta planta ocorreu em solos com

altos níveis de humidade, o que explica o fato de ser frequentemente encontrada em regiões ribeirinhas [Quinn *et al.*, 2008].

**Quadro 1 – Classificação taxonómica do *Arundo donax* L. (adaptado de [Pilu *et al.*, 2012]).**

<b>Classificação taxonómica</b>	
<b>Reino</b>	<i>Plantae</i>
<b>Divisão</b>	<i>Magnoliophyta</i>
<b>Classe</b>	Liliopsida
<b>Ordem</b>	<i>Poales</i>
<b>Família</b>	<i>Poaceae</i>
<b>Subfamília</b>	<i>Arundinoideae</i>
<b>Género</b>	<i>Arundo</i>
<b>Espécie</b>	<i>Arundo donax</i>

A floração inicia-se no final do verão, com formação de grandes inflorescências (30 a 60 cm) em forma de pluma de penas, esbranquiçadas e por vezes apurpuradas [Coelho, 2005]. Raramente as suas sementes são férteis sendo que se provou que, em aproximadamente 36 000 destas plumas, foram apenas encontrados cinco óvulos com viabilidade [Johnson *et al.*, 2006]. Esta planta possui um rizoma tuberculoso, crescendo sob a forma de tufos a partir da raiz [Seca *et al.*, 2000]. A reprodução é maioritariamente vegetativa, sendo obtida por quebra em secções de caules e rizomas subterrâneos, transportados e dispersos pelas forças das águas da chuva ou de lençóis freáticos. Cada fração possui aproximadamente 5 cm, contendo um nó capaz de produzir uma nova planta [Boose *et al.*, 1999].

O *Arundo donax* L. é considerado como uma das maiores gramíneas, podendo crescer até 2 a 8 metros de altura [Neto *et al.*, 1997] e atingir os 10 m em condições ótimas [Csurhes, 2009] com taxas de crescimento a rondar os 4 a 7 cm por dia [Mirza *et al.*, 2010]. As folhas atingem os 30-70 cm de comprimentos e 5-8 cm de largura [Frandsen *et al.*, 1994]. A espécie, sob condições ótimas de clima e irrigação, alcança rendimentos de 3-37 t / ha / ano de biomassa verde [Lewandowski *et al.*, 2003], sendo que a partir do segundo ou terceiro ano de cultivo pode alcançar rendimentos até 100 t / ha. O seu rápido crescimento e a sua forte capacidade vegetativa permitem uma rápida invasão de novas áreas e domínio da vegetação local [Shatalov *et al.*, 2002] (Figura 6). A sua fácil adaptabilidade a diferentes condições ecológicas complementada à sua capacidade como cultura intensiva e à composição química que apresenta, torna o *Arundo donax* L. como uma espécie não madeiras mais atrativas como fonte alternativa de fibras e de biomassa.

Recorrendo a uma análise detalhada da composição química do *Arundo donax* L. foram reveladas algumas semelhanças nas características dos materiais lenhocelulósicos comparativamente outras culturas agro-industriais, e uma maior diferença para as espécies arbóreas [Shatalov *et al.*, 2011].



**Figura 6 - *Arundo donax* L. [Coelho, 2005].**

Esta planta apresenta ciclo fotossintético C3 o que significa que, a nível do cloroplasto e na ausência de luz, o CO<sub>2</sub> é diretamente fixado pelo ciclo de Calvin, com a inicial formação de duas moléculas de 3-fosfoglicerato (3PGA), cada uma com três carbonos e posterior obtenção de glucose e outros compostos orgânicos. Este processo não permite que a planta acumule elevadas concentrações de CO<sub>2</sub>, sendo que na presença de luz aumenta a vulnerabilidade de recorrer à fotorrespiração, havendo maior necessidade de manter os estomas abertos durante mais tempo para captar mais quantidade de CO<sub>2</sub> do meio. Como consequência, ocorrem maiores perdas de água e uma diminuição na eficiência na fotossíntese [Rossa *et al.*, 1998] Todavia, estudos feitos em *Arundo donax* L. comprovam elevadas taxas e potencial fotossintético [Papazoglou *et al.*, 2005].

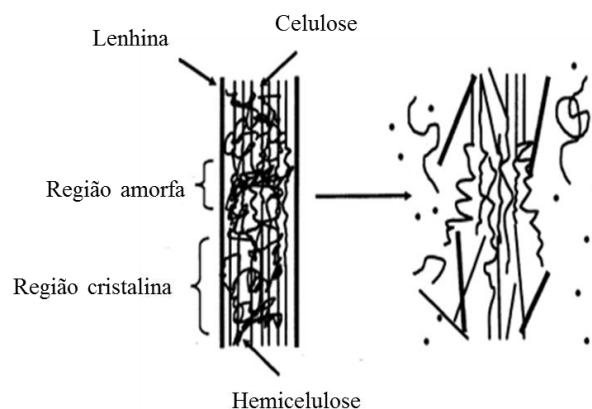
A composição química do *Arundo donax* L. varia consoante as regiões morfológicas (caule e folhas) e com o estado de maturação da planta [Neto *et al.*, 1997]. Contudo, genericamente, o teor em celulose, como sendo o principal constituinte químico, contabiliza cerca de 34 % dos compostos presentes no caule da cana [Shatalov *et al.*, 2011], não diferindo significativamente de outras plantas herbáceas da mesma família, como é o caso do bambu, que apresenta um teor em celulose de aproximadamente de 38 % [Hurter, 1988]. Dado o elevado grau de polimerização que apresenta, a celulose presente no *Arundo donax* L. tem sido objeto de estudo para a produção alternativa de pasta de papel, principalmente em países onde os recursos de materiais madeireiros são escassos ou para aqueles que apresentam abundantes resíduos agrícolas e/ ou cultivos de plantas anuais [Soffner, 2001]. A percentagem de hemiceluloses, principalmente constituída por heteroxilanos complexos, torna esta cana uma potencial fonte de pentoses, precursoras de compostos de valor acrescentado, como xilitol e arabitol. As hemiceluloses presentes no *Arundo donax* L. atingem um teor de aproximadamente 26 % no caule, sendo que 89 % são heteroxilanos [Shatalov *et al.*, 2011].

Esta cana pode ter outras utilidades, face à rigidez que o caule apresenta, como por exemplo, no fabrico de instrumentos musicais e como quebra-ventos.

## 1.5 Fracionamento dos materiais lenhocelulósicos

Um dos maiores obstáculos a ser superado, em termos de inovação tecnológica e económica e de modo a tornar o conceito de Biorrefinaria uma realidade, é a implementação de métodos eficientes na obtenção de polímeros individualizados a partir de biomassa lenhocelulósica [Moxley *et al.*, 2008]. Como método de base para o aproveitamento da biomassa lenhocelulósica, o fracionamento é considerado como um pré-requisito para a bioconversão dessa mesma biomassa em produtos de valor acrescentado. Também designado por variados autores de Pré-tratamento, esta etapa tem como objetivo a separação dos diferentes polímeros de modo a que cada polímero individualizado possa ser mais facilmente aproveitado, sendo por isso a designação fracionamento atribuída ao longo o trabalho. Consiste num conjunto de processos físicos, físico-químicos, químicos e biológicos (Figura 7) capazes de remover a lenhina, as hemiceluloses, de reduzir a cristalinidade da celulose e hidrolisá-la e de aumentar a porosidade do material [Keller *et al.*, 2003]. Contudo, o desafio de qualquer estratégia de fracionamento é separar um tipo de componente sem que ocorra alguma degradação da estrutura química dos restantes, de modo a que ocorra uma maximização do valor das diferentes frações. Para atingir tal objetivo, é necessária uma seleção cuidada das condições operacionais e optar pelo melhor método. Um processo de fracionamento eficaz e económico deve atender a requisitos como, por exemplo, maximizar o rendimento em pentoses na sua forma não degradada, produzir fibras celulósicas reativas, produzir hidrolisados com a formação mais reduzida possível de compostos inibidores ao processo de fermentação e ser economicamente eficiente [Huber *et al.*, 2006; Taherzadeh *et al.*, 2008].

Consoante a fração que se pretende separar, existem métodos distintos de fracionamento, sendo por isso um desafio isolar um componente dadas as diferentes propriedades físicas e químicas que cada um apresenta. Por exemplo, se o objetivo for solubilizar os polissacáridos, é mais frequente a utilização de processos de hidrólise [Carvalho *et al.*, 2008]. Os polissacáridos podem ser hidrolisados na presença de ácidos ou enzimas, sendo que as hemiceluloses em particular podem ser hidrolisadas através de métodos hidrotérmicos (autohidrólise/explosão de vapor), ácidos, com adição de ácidos diluídos ou concentrados, alcalinos e enzimáticos. Porém, os últimos dois tratamentos não são apenas seletivos para as hemiceluloses, o que pode levar à formação de grandes quantidades de inibidores ao crescimento microbiano. Assim sendo, métodos hidrotérmicos e ácidos são os que permitem obter uma solubilização mais seletiva das hemiceluloses [Gírio *et al.*, 2010]. Todavia, é importante mencionar que existem outros tipos de fracionamento, como métodos de deslenhificação (por exemplo, Organosolv e “Kraft”), alcalinos (tratamentos com sódio, potássio ou NaOH e tratamentos com amónia (AFEX), com líquidos iónicos e fluidos supercríticos, mais aprazíveis na solubilização e hidrólise dos outros macrocomponentes estruturais.



**Figura 7 – Esquema representativo do fracionamento dos materiais lenhocelulósicos [Mosier *et al.*, 2005].**

De entre os muitos métodos de fracionamento disponíveis, a hidrólise ácida, é daqueles se encontram descritos como os mais indicados para a recuperação das hemiceluloses em monossacáridos.

### 1.5.1 Hidrólise ácida

Hidrólises meramente químicas, como é o caso da hidrólise ácida, envolvem a exposição dos materiais lenhocelulósicos a um composto químico durante um certo período de tempo e a uma temperatura específica, resultando na formação de monómeros de açúcar e de alguns compostos provenientes da degradação desses monómeros e de grupos acetil libertados, como é o caso do furfural, HMF (hidroximetilfurfural), ácido acético e outros produtos voláteis [Ramos, 2003; Taherzadeh *et al.*, 2008] (Figura 8). Uma vez que se adiciona ácido, esta hidrólise ocorre a valores de pH relativamente mais baixos comparativamente à autohidrólise, sendo por isso indispensável a neutralização do meio após hidrólise, de modo a minimizar a formação dos compostos indesejáveis. Esta neutralização ocorre geralmente por adição de componentes básicos, como por exemplo, NaOH (hidróxido de sódio) e  $\text{Ca}_2\text{CO}_3$  (carbonato de cálcio) que, em contacto com o ácido, formam sais de baixa solubilidade facilmente separados por filtração [Gámez *et al.*, 2006].

A reação principal que surge ao longo do tratamento com ácido é a hidrólise das hemiceluloses, especialmente do xilano, sendo este composto relativamente estável na presença de ácidos. Este tipo de fracionamento tem a vantagem de manter os outros polímeros estruturais praticamente inalterados, sendo o mecanismo semelhante ao que ocorre nos processos hidrotérmicos, embora a origem dos iões  $\text{H}_3\text{O}^+$  serem inicialmente nos ácidos.

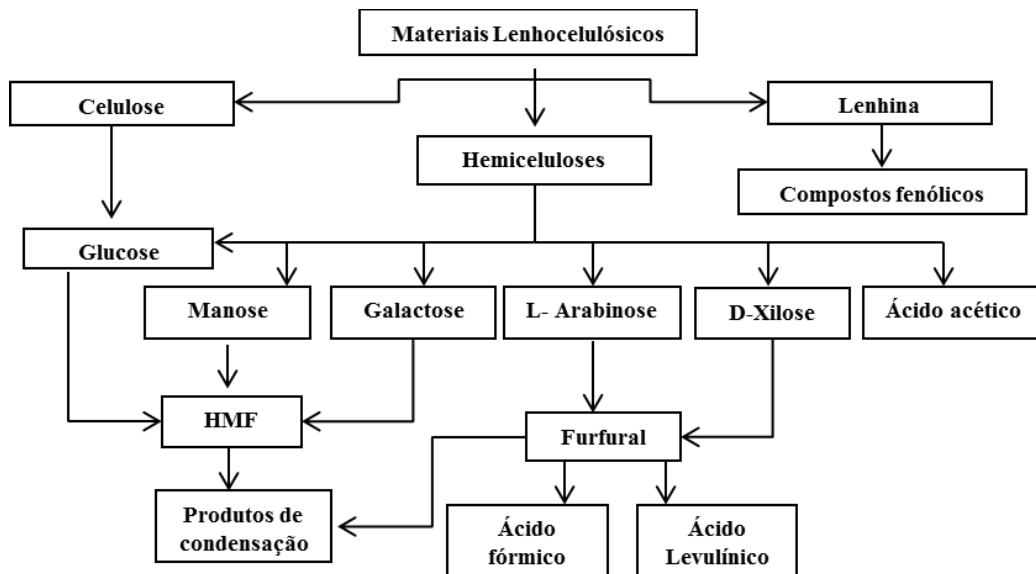


Figura 8- Principais produtos resultantes da hidrólise de um material lenhocelulósico (adaptado de [Palmqvist *et al.*, 2000; Balat, 2010]).

A despolimerização das hemiceluloses tem início com a difusão dos grupos  $\text{H}_3\text{O}^+$  através do ML, seguida da protonação do oxigênio da ligação glicosídica e consequente formação de um carbocátion. Este promove a rutura da cadeia principal e a consequente formação de um oligómero ou de um monómero, caso a protonação tenha lugar numa posição terminal da cadeia principal. Em seguida a reação do carbocátion com uma molécula de água leva à formação de um sacárido estável com um DP específico e à regeneração do ião hidrónio (Figura 9). A propagação deste na matriz sólida por via da fase líquida leva a que estes tratamentos possam ser considerados auto-catalíticos [Fengel *et al.*, 1984].

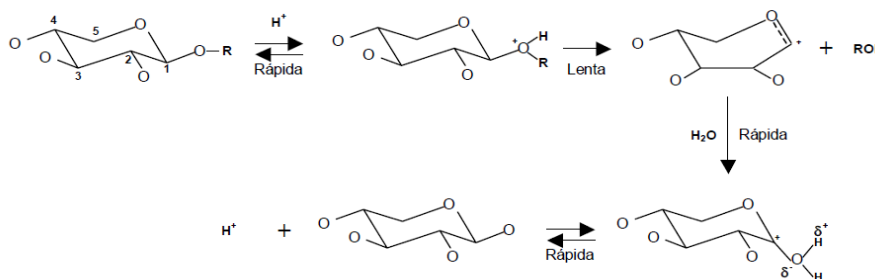


Figura 9 - Mecanismo proposto para a cisão das ligações glicosídicas na despolimerização das hemiceluloses em meio ácido (Adaptado de [Belkacemi *et al.*, 1991]).

Os processos catalisados na presença de ácido podem utilizar ácidos concentrados, com recurso a temperaturas moderadas e ácidos diluídos, com necessidade de temperaturas de hidrólise elevadas [Taherzadeh *et al.*, 2008]. O ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) é o ácido mais comumente utilizado na hidrólise das hemiceluloses, dado ser tecnologicamente mais eficiente, mais seguro e economicamente mais acessível. Contudo existem outros ácidos inorgânicos possíveis de serem utilizados, como é o caso do ácido clorídrico (HCl), ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ), o ácido trifluoroacético (TFA) e ácido fosfórico

( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) [Silverstein *et al.*, 2007; Gírio *et al.*, 2010]. Este último apresenta a vantagem de, quando neutralizado com NaOH, forma um sal capaz de servir como nutriente ao desenvolvimento de microrganismos [Gámez *et al.*, 2006]. A utilização de HCl e de TFA apresenta como vantagem a sua fácil recuperação, comparativamente com o  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , embora esta etapa seja apenas aplicada quando se utilizam grandes concentrações de ácido.

As condições de operação escolhidas de modo a que a hidrólise seja mais seletiva varia consoante o tipo de material lenhocelulósico e o de hidrolisado que se pretende, sendo a hidrólise com ácido diluído geralmente utilizada quando o pretendido é solubilizar e hidrolisar as hemiceluloses. Um ácido mais concentrado tem aplicação quando se pretende solubilizar as hemiceluloses e a celulose, mantendo a lenhina como resíduo insolúvel.

## **1.5.2 Fatores que influenciam a eficiência da hidrólise**

### **1.5.2.1 Utilização de ácidos concentrados**

A utilização de ácidos concentrados no processo de hidrólise ácida é geralmente operada a temperaturas e pressões baixas e tempos reduzidos, o que operacionalmente reduz os custos tendo em conta a baixa formação de produtos de degradação [Zhang *et al.*, 2007]. No entanto, a velocidade da formação destes produtos é bastante afetada por pequenas variações de temperatura, ao contrário do que acontece se for utilizada uma hidrólise com um ácido diluído (HAD) a temperaturas elevadas [Camacho *et al.*, 1996]. É comum a utilização de ácido sulfúrico a uma concentração de 72 % [Gírio *et al.*, 2010] e temperaturas entre os 20-50 °C durante um período que varia entre 20 minutos e uma hora, pelo que nestas condições dá-se principalmente a solubilização da celulose e das hemiceluloses. Como tal, a formação de monómeros de açúcar é reduzida dada a fraca ocorrência de hidrólise. A utilização de ácidos concentrados a elevadas temperaturas pode ser uma boa escolha se o objetivo for o estudo dos compostos de decomposição dos materiais lenhocelulósicos.

Apesar das vantagens, os inconvenientes não permitem que este método seja uma opção comercial. Se forem utilizadas temperaturas elevadas, podem existir problemas de corrosão dos equipamentos e, se as temperaturas forem moderadas, a hidrólise não ocorre em grande escala, sendo necessário um sistema biotápico e por sua vez mais gastos energéticos. Além disso, apesar de a recuperação do ácido poder ser um passo essencial para economizar o processo, os custos envolvidos têm impedido a generalização do seu uso, e por isso os gastos em ácido são elevados.

### **1.5.2.2 Utilização de ácidos diluídos**

Hidrolisar recorrendo a ácidos diluídos, a temperaturas elevadas e a tempos relativamente curtos é um dos métodos mais comuns de fracionamento, sendo também usado como pré-tratamento quando se recorre a enzimas para hidrolisar o material lenhocelulósico [Taherzadeh *et al.*, 2008]. As hemiceluloses são os polissacáridos que mais facilmente hidrolisam, sendo as celuloses parcialmente

hidrolisadas dada a dificuldade que existe na destruição da estrutura cristalina. Como tal, um dos primeiros monossacáridos a ser formado é a xilose, como fruto da hidrólise de uma hemicelulose do tipo xilano. Apresenta elevada sensibilidade ao ácido e por isso torna-se importante controlar e otimizar devidamente o processo, de modo a recuperar ao máximo os monossacáridos e de modo a minimizar a presença de compostos de degradação. Recorre-se tipicamente a temperaturas entre 121-160 °C e a concentrações de ácido sulfúrico que rondam os 0,5-1,5 %, [Sun *et al.*, 2002; Gírio *et al.*, 2010], conseguindo-se atingir elevados rendimentos em açúcares provenientes das hemiceluloses, com uma recuperação entre 70 - > 95 % [Gírio *et al.*, 2010]. A recuperação em glucose atinge um rendimento de 60 %, proveniente da degradação da celulose [Galbe *et al.*, 2002].

Comparativamente com a hidrólise com ácidos concentrados, este tratamento gera uma menor formação de compostos de degradação quando utilizadas elevadas temperaturas, menor risco de corrosão dos equipamentos e necessita de menor quantidade de ácido para que a reação ocorra [Galbe *et al.*, 2002; Balat, 2010; Gírio *et al.*, 2010].

Contudo, pelo fato de ser necessário elevadas temperaturas, os custos energéticos são superiores aos métodos que utilizam temperaturas moderadas. Tal como na hidrólise ácida concentrada, a neutralização do ácido permanece como sendo uma barreira a ultrapassar, visto que o hidrolisado deve manter-se a um pH adequado ao processo de bioconversão. Para isso, a necessidade de adicionar bases torna a esse nível o método dispendioso. Como alternativa, e dadas as vantagens de uma hidrólise com ácidos diluídos, ativa-se o carvão com uma base de modo a servir tanto para a destoxificação do hidrolisado, como para a sua neutralização, reduzindo a necessidade de utilizar a base mais que uma vez.

### **1.5.2.3 O efeito da granulometria**

Em tratamentos que envolvem transferências de massa e energia em sistemas heterogéneos como é o caso das hidrólises da biomassa, a dimensão das partículas destaca-se por ser uma das variáveis mais importantes [Ballesteros *et al.*, 2000; Vidal *et al.*, 2011].

Geralmente, quando são utilizadas partículas de maior tamanho, ocorrem problemas na transferência de calor e um exagerado tratamento na camada exterior (com subsequente formação de inibidores). Em detrimento, as camadas mais interiores das partículas sofrem tratamentos incompletos [Brownell *et al.*, 1986]. Por outro lado, partículas demasiado pequenas são de difícil manuseamento, são mais suscetíveis de serem degradadas durante o tratamento e tornam o processo mais dispendioso devido à elevada necessidade energética na fase de cominuição [Ballesteros *et al.*, 2002]. Usualmente são utilizados processos de trituração e/ou moagem, recorrendo a moinhos de martelos, de facas ou de discos [Vidal *et al.*, 2011], todos processos físicos com consumo intensivo de energia.

A natureza da matéria-prima é de extrema importância para a eficiência do processo de trituração e/ou moagem, pois seleciona o tipo de equipamento usado, a energia necessária, assim como o intervalo de tamanhos mais adequados para o posterior fracionamento da biomassa. Moinhos de

martelos e de facas são os mais universais contudo, para atingir o mesmo tamanho de partículas, é necessário recorrer a menos de metade da energia quando se tratam materiais herbáceos, comparativamente às madeiras [Aden *et al.*, 2002].

Outra condição a ter em conta é o tipo/ severidade de tratamento que se pretende aplicar. Estudos realizados utilizando modelos difusionais demonstraram que, nos processos de hidrólise com ácido sulfúrico, este demora três vezes mais a penetrar em 70 % da biomassa quando esta se encontra cortada aleatoriamente em fragmentos de 1 e 3 cm, do que quando moída entre 0,853 e 1,20 mm [Kim *et al.*, 2002]. O estudo do efeito da granulometria recorrendo a este tipo de tratamentos foi aplicado na palha de arroz [Karimi *et al.*, 2006]. Comparam-se as taxas de recuperação dos componentes lenhocelulósicas antes e depois da redução de tamanho, com partículas contidas entre 0,295 mm e 0,833 mm, sob uma pressão de 10 e 20 bar, com tempos e temperaturas fixas. Todavia, apenas a glucose apresentou um rendimento 44 % superior quando submetida a menores dimensões e a uma pressão de 10 bar. Para a casca e bagaço de arroz e utilizando partículas menores que 0,495 mm, também não se verificaram aumentos na recuperação de açúcares [Singh *et al.*, 1984]. Estudos aplicados em tratamentos por explosão de vapor vieram confirmar que, em *Pinus pinaster* [Brownell *et al.*, 1986], se obtiveram maiores recuperações de hemiceluloses e celuloses quando utiliza das partículas entre 8-12 mm, em detrimento das partículas mais pequenas. Contudo, as mesmas condições foram aplicadas a matéria herbácea (resíduos de *Brassica carinata*) mas sem efeito considerável na recuperação de açúcares [Ballesteros *et al.*, 2002].

Por análise destes exemplos torna-se claro a necessidade de continuar a estudar os efeitos da granulometria do material, analisando diferentes tamanhos de partículas, com diferentes tipo de tratamentos e de materiais lenhocelulósicos.

Embora sendo uma herbácea e uma vez otimizado o processo de hidrólise ácida diluída, considerou-se relevante o estudo do efeito da granulometria em *Arundo donax* L., sendo um dos pontos abordados neste trabalho.

## 1.6 Valorização do material lenhocelulósico

A bioconversão dos hidrolisados de hemicelulose para obtenção de produtos de valor acrescentado constitui uma alternativa à utilização de OS e pentoses. Apesar de se tornar importante produzir oligossacáridos por tratamentos hidrotérmicos, por apresentarem um conjunto de propriedades vantajosas, quer para a saúde humana quer a nível tecnológico [Nakakuki, 2003], a xilose é o monossacárido presente em maiores quantidades neste tipo de hidrolisados. Assim sendo, uma das possibilidades mais atrativas consiste na produção de polióis, nomeadamente arabitol e xilitol, sendo este último o que apresenta maior interesse e valor comercial.

### 1.6.1 Xilitol

Em vista do crescente número de pessoas que apresentam distúrbios metabólicos e que precisam, por isso, de diminuir ou mesmo cessar o consumo de alimentos compostos por sacarose, o estudo de outros elementos substitutos tem vindo a ser relevante a nível tecnológico.

O xilitol apresenta essa aplicabilidade e encontra-se classificado como sendo um composto de valor acrescentado com uma crescente procura na área dos produtos dietéticos e na busca de soluções a nível clínico. Estima-se que se produza por ano cerca de 30 000-40 000 toneladas de xilitol, inserido num mercado que está continuamente em crescimento [Rivas *et al.*, 2004; Salgado *et al.*, 2012]. É um poliól constituído por cinco carbonos, cuja sua fórmula molecular é dada por  $C_5H_{12}O_5$  (1,2,3,4,5 - pentahidroxipentano) [Mussatto *et al.*, 2002]. Existe naturalmente em vegetais, frutos, cogumelos, madeiras podendo ser sintetizado por microrganismos e por mamíferos como composto intermediário do metabolismo dos açúcares. Estudos realizados revelaram que o corpo humano produz por dia cerca de 5 a 15 g de xilitol [Pepper *et al.*, 1988]. Existem técnicas de recuperação de xilitol por extração líquido-sólido contudo, a nível tecnológico, esse método torna-se economicamente inviável, dada a presença de concentrações reduzidas (900 mg/100 g) [Parajó *et al.*, 1998a]. É, portanto, mais comum utilizar como tecnologia comercial a redução do grupo aldeído da xilose com a formação de um grupo hidroxilo, que lhe confere uma estabilidade química e microbiológica maior comparativamente com a sacarose, mantendo o mesmo poder edulcorante.

A estabilidade que o xilitol apresenta confere-lhe propriedades físico-químicas interessantes, que se encontram representadas no Quadro 2. A baixas concentrações o xilitol atua como conservante, oferecendo maior tempo de prateleira aos produtos alimentares por resistência ao crescimento e desenvolvimento de microrganismos indesejáveis [Palladino *et al.*, 2003]. Além disso, devido à ausência de grupos aldeídos na sua constituição, o xilitol não participa nas reações de *Maillard*, responsáveis pelo escurecimento e perda do valor nutricional dos alimentos. Quando continuamente ingerido na dieta e por apresentar um baixo valor calórico (menos 40% do que a sacarose), o xilitol limita a tendência para a obesidade e é indicado para diabéticos, visto que a sua metabolização não envolve a ação da insulina [Emodi, 1978]. A incorporação de xilitol em formulações alimentares melhora a cor e o sabor sem causar alterações indesejáveis nos alimentos durante o armazenamento. O xilitol é atualmente utilizado na indústria alimentar em pastilhas elásticas, iogurtes, sobremesas congeladas, gelados, refrigerantes, compotas, produtos de confeitaria, chocolates e coberturas para bolos [Carvalho, 2005]. Do conjunto de propriedades físicas e químicas do xilitol, destaca-se o valor de entalpia negativo ( $-36,60 \text{ kcal}\cdot\text{g}^{-1}$ ) que lhe confere um poder refrescante facilmente percebido em produtos onde ele é incorporado. É considerado um produto atóxico e a sua incorporação em produtos destinados à alimentação humana é permitida pela FDA (“*Food and Drug Administration*”) e classificada como um aditivo do tipo GRAS (“*Generally Regarded as Safe*”). De acordo com a literatura, o xilitol é bem tolerado pelo organismo quando ingerido em doses que

ultrapassa, num adulto, os 60 g/ dia, já que a ingestão de doses superiores às indicadas produz efeito laxativo [Mussatto *et al.*, 2002].

**Quadro 2 - Propriedades físico-químicas do xilitol (adaptado de [Hyvönen *et al.*, 1982])**

<b>Fórmula química</b>	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>
<b>Massa molecular (g·mol<sup>-1</sup>)</b>	152,15
<b>Aparência</b>	Pó cristalino
<b>Sabor</b>	Doce
<b>Odor</b>	Nenhum
<b>Cor</b>	Branco
<b>Ponto de fusão (°C)</b>	92-96
<b>Ponto de ebulição (°C a 1 atm)</b>	126
<b>pH em solução aquosa (0,1 g·L<sup>-1</sup>)</b>	5-7
<b>Poder edulcorante</b>	Equivalente à sacarose
<b>Valor calórico (k·cal·g<sup>-1</sup>)</b>	4,0
<b>Solubilidade em água (g 100 mL<sup>-1</sup> a 20 °C)</b>	168,0
<b>Viscosidade (solução aquosa a 10% a 20 °C)</b>	1,23 cP
<b>Calor de dissolução (kcal·g<sup>-1</sup>)</b>	-36,60

Este composto apresenta outras utilizações além de edulcorante, que o distingue dos restantes e que se encontra relacionado com o seu poder não-acidogénico, anticariogénico e remineralizante, na saúde oral. Na indústria farmacêutica é utilizado na formulação de xaropes e preparações vitamínicas, geralmente combinado com outros polióis ou ácido cítrico, principalmente em produtos de higiene oral, como as pastas dentífricas.

Apesar de todas as vantagens, a produção de xilitol é uma das mais caras, sendo o seu custo dez vezes superior ao da sacarose, que pode ser obtida por via física e com rentabilidade [Parajó *et al.*, 1998a]. O preço do xilitol em 2011 encontrava-se a 5-7 €/kg sendo que em 2012 já atingiu os 10 €/kg, comprovando a sua valorização ao longo dos anos. Como tal, este é normalmente adicionado juntamente com outros polióis que servem como agentes de corpo [Mäkinen *et al.*, 1998]. Os processos economicamente viáveis de obtenção de xilitol à escala industrial podem ser por via química ou por conversão biotecnológica, ambos os processos iniciados em soluções de xilose provenientes dos hidrolisados lenhocelulósicos, como se encontra esquematizado na Figura 10 [Cruz *et al.*, 2000; Tamanini *et al.*, 2009].

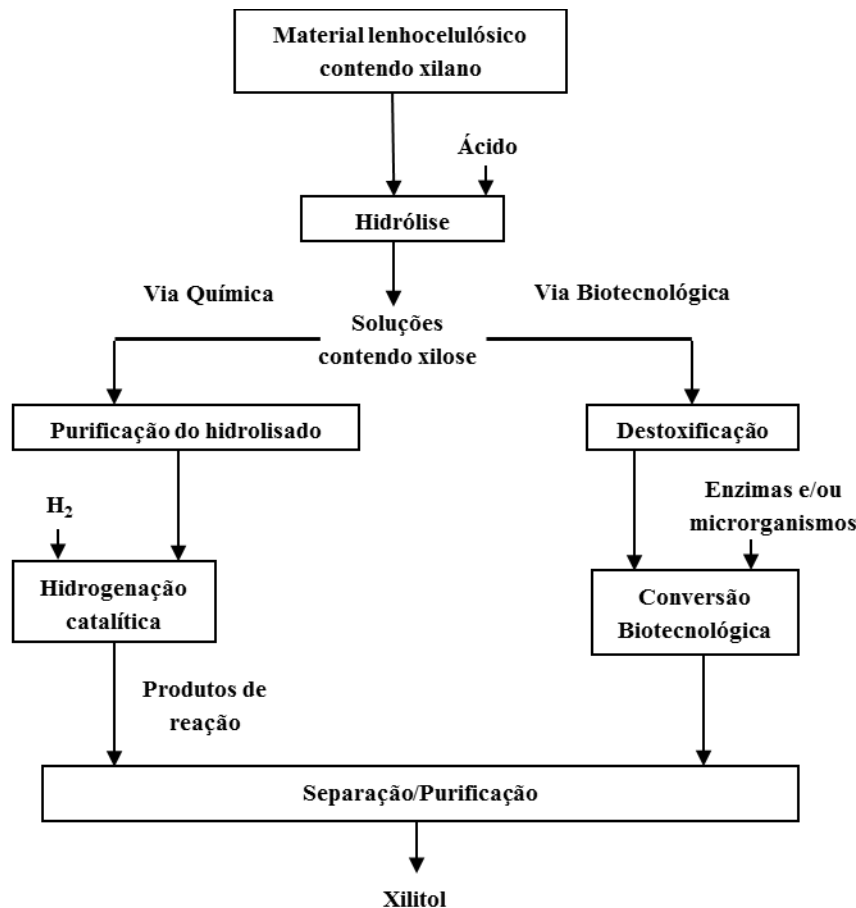


Figura 10- Fluxograma das tecnologias utilizadas na produção de xilitol, à escala industrial (adaptado de [Parajó *et al.*, 1998a; Mussatto *et al.*, 2002])

O processo por via química é o atualmente utilizado quando se pretende produzir xilitol em grande escala, visto que o tempo necessário é normalmente reduzido, variando entre 2,5-5 horas consoante as condições utilizadas [Mussatto *et al.*, 2002]. Consiste numa hidrogenação catalisada na presença de um metal, normalmente uma liga de níquel ou óxido de alumínio [Huang *et al.*, 2011], a elevados valores de pressão e temperatura. Dada a necessidade de utilizar catalisadores e a importância em incluir uma etapa purificação da xilose para o sucesso do tratamento, o processo normalmente é caro [Lima *et al.*, 2003]. Pelo método não ser seletivo, se o objetivo é obter bons rendimentos em xilitol, torna-se importante ter um hidrolisado constituído meramente de xilose, dado que o metal utilizado para desencadear a reação reduz outros compostos presentes, podendo assim levar à produção de compostos capazes de interromper de forma irreversível a hidrogenação [Mussatto *et al.*, 2002]. Sendo assim, a etapa de purificação do hidrolisado, que ocorre através de operações de troca iónica, descoloração ou fracionamento cromatográfico [Parajó *et al.*, 1998c], deve ser eficiente ao ponto de garantir a eliminação de praticamente todos os compostos futuramente indesejáveis. Além disso, a etapa de remoção do metal por separação e a obtenção de um produto puro também têm custos associados, o que explica o fato de o xilitol ser vendido a valores superiores à sacarose. Apenas cerca de 50-60 % da xilose é convertida a xilitol [Parajó *et al.*, 1998a], quando se utilizam processos

químicos de obtenção deste poliálcool, tendo por isso surgido uma alternativa, com adição de culturas de microrganismos capazes de, durante o metabolismo, produzir xilitol quando na presença de xilose.

## 1.7 Produção biotecnológica de xilitol

A produção biotecnológica de xilitol tem sido descrita por vários grupos de investigação nos últimos anos considerando-se que, desde a descoberta e caracterização de vários microrganismos capazes de fermentar a xilose em xilitol, as pesquisas apontam para a possibilidade de vir a ser viável este tipo de produção alternativa [Nolleau *et al.*, 1995]. Recentemente, este modo de produzir o xilitol tem-se tornado mais atrativo pois, além de dispensar a purificação da xilose, podem ser utilizados enzimas e microrganismos específicos que atuam somente na conversão de xilose em xilitol, o que leva a um maior rendimento em produtos e conseqüentemente facilita a sua separação [Breuer *et al.*, 2006]. Como os próprios microrganismos catalisam o processo, torna-se dispensável a utilização de metais [Parajó *et al.*, 1998a]. Por isso, este tipo de produção costuma ser menos dispendioso. Outra vantagem diz respeito ao custo dos equipamentos associados a este processo que, comparativamente aos métodos químicos são mais reduzidos pelo fato de serem utilizadas temperaturas e pressões menos acentuadas, embora para uma mesma quantidade de hidrolisado a obtenção de xilitol seja mais morosa [Kim *et al.*, 1999].

A síntese de xilitol pode ser realizada por leveduras, bactérias, fungos ou utilizando enzimas purificados provenientes destes microrganismos.

### 1.7.1 Microrganismos produtores de xilitol

A maioria dos microrganismos de interesse industrial não são capazes de assimilar naturalmente as pentoses sendo que, de entre os vários capazes de o fazer, não apresentam potencialidade de aplicação ao nível pretendido. Embora em pequeno número, têm sido identificados bactérias, fungos e leveduras capazes de utilizar a xilose como fonte de carbono e energia e de produzir xilitol, etanol e outros compostos [Winkelhausen *et al.*, 1998].

Muitas bactérias (*Enterobacter liquefaciens*, *Corynebacterium* sp. e *Mycobacterium smegmatis*) têm a vantagem de converter com eficiência e rapidez a D-xilose a etanol ou/e xilitol, bem como outros produtos de interesse mas, de um modo geral, toleram baixas concentrações de etanol e sintetizam vários produtos secundários, como ácido láctico, acético e fórmico, glicerol, butanol, acetona, entre outros, que diminuem o rendimento do produto de interesse [Michel, 2007]. Alguns fungos filamentosos (*Rhodosporidium toruloides*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium oxysporum*) apresentam também a capacidade de utilizar eficazmente as pentoses, produzindo diversos produtos de interesse, de onde se destacam enzimas como celulasas e hemicelulasas, o que se torna uma vantagem visto que possibilita a obtenção direta de monossacáridos provenientes das celulosas e das

hemiceluloses. Contudo, tanto as bactérias como os fungos apresentam baixos rendimentos e produtividades em xilitol [Parajó *et al.*, 1998a].

Comparativamente com outros microrganismos, as leveduras são consideradas como as melhores produtoras deste poliól sendo que as pertencentes ao género *Candida* e a espécie *Debaryomyces hansenii* as que mais se destacam [Winkelhausen *et al.*, 1998; Sampaio *et al.*, 2004]. Contudo, segundo alguns autores, esta última levedura tem sido a que tem mostrado capacidade de consumir todos os açúcares presentes e a maioria dos inibidores, contrariamente ao género *Candida*, que se não se encontra apta para assimilar a arabinose [Carvalho *et al.*, 2007]. Além disso, juntamente com outras leveduras assimiladoras de pentoses, como é o caso da *Kluyveromyces marxianus*, a levedura *Debaryomyces hansenii* encontra-se registada no QPS status (“Qualified Presumption of Safety”) como sendo um microrganismo isento de risco para a saúde do consumidor, podendo estar presente em alimentos e fazer parte da sua transformação [Barlow *et al.*, 2007].

### **1.7.1.1 A levedura *Debaryomyces hansenii***

O género *Debaryomyces* tornou-se um dos mais conhecidos quando, comparativamente com a primeira levedura estudada, a *Saccharomyces cerevisiae*, revelou apresentar características genéticas e bioquímicas de maior interesse tecnológico [Verachtert *et al.*, 1990; Baronian, 2004].

A levedura *D. hansenii* é uma das quinze espécies do género *Debaryomyces* e a considerada como a espécie tipo, dada a aplicabilidade que apresenta [Barnett *et al.*, 2000].

É uma espécie haplóide, que se caracteriza por apresentar reprodução vegetativa por gemulação multiláseral, com capacidade de formar pseudomicélios ou por vezes micélios bem desenvolvidos [Kurtzman, 2011]. Neste género, há possibilidade de ocorrência de conjugação isogâmica ou heterogâmica formando-se um a dois esporos, esféricos ou ovais, por asco [Lloyd, 2000]. É uma levedura osmotolerante, multiplicando-se num grande intervalo de valores de  $a_w$  [Domínguez, 2008] e halófila, por suportar meios com concentrações de NaCl de 4 M, contrariamente à estirpe *Saccharomyces cerevisiae*, que cresce em meios com menos de 1,7 M de NaCl [Breuer *et al.*, 2006]. O ecossistema marinho é um dos principais habitats a que esta levedura aparece associada e de onde foi inicialmente isolada, apesar de também ter sido identificada em cana-de-açúcar [Amaral-Collaco *et al.*, 1989]. É frequentemente encontrada em alimentos, como vinho, cerveja, frutos, vegetais, produtos ricos em açúcar, queijos e carnes [Strauss *et al.*, 2001; Durá *et al.*, 2004]. É uma dos microrganismos mais comuns em queijos tradicionais e, dada a sua atividade proteolítica e lipolítica, apresenta capacidade de produzir compostos essenciais para o característico *flavour* destes queijos durante a maturação [Arfi *et al.*, 2002]. Além da indústria dos laticínios, esta levedura é utilizada na produção de carnes fermentadas sendo que se encontra descrita como sendo capaz de formar amónia e diversos compostos voláteis e alterar o teor de aminoácidos livres, promovendo modificações de sabor em salsichas curadas [Durá *et al.*, 2004].

Apesar de todas as aplicações que esta levedura apresenta a nível tecnológico, o seu potencial interesse foca-se na sua capacidade comprovada de utilizar a generalidade dos monossacáridos presentes em hidrolisados hemicelulósicos, xilose, arabinose, glucose e galactose [Gírio *et al.*, 2000; Nobre, 2003]. Nobre descobriu que a levedura *D. hansenii*, apesar de crescer mais lentamente em meios ricos em pentoses do que em hexoses, produz rendimentos em biomassa semelhantes em ambos os meios [Nobre, 2003]. O estudo ainda revelou que esta levedura, mesmo inoculada em meios contendo misturas destes açúcares, a preferência por hexoses não inibe o consumo de pentoses. Esta vantagem é importante visto que a maioria dos hidrolisados de hemiceluloses são misturas de açúcares [Gírio *et al.*, 2010]. Esta levedura tem, então, a capacidade de utilizar de forma muito eficaz a xilose como única fonte de carbono e energia, sendo uma das leveduras mais importante para mediar a conversão desta pentose a xilitol como produto principal.

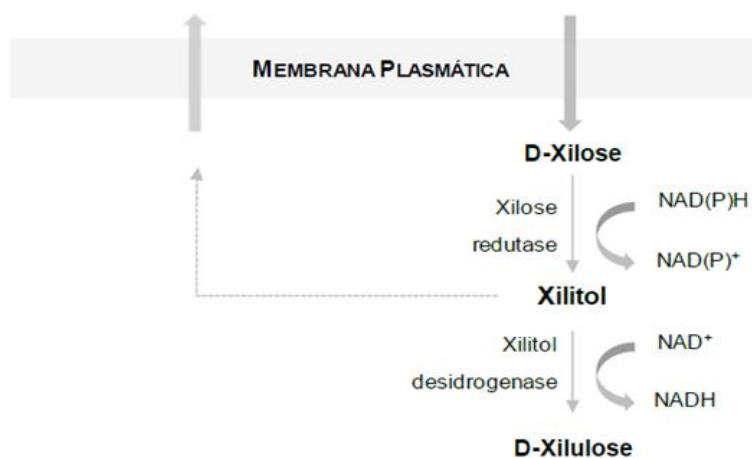
De acordo com a taxonomia atual são reconhecidas duas variedades de *D. hansenii*: variedade *hansenii* e variedade *fabryi*. Estas apresentam diferentes propriedades, nomeadamente a temperatura máxima de crescimento, sendo que para a primeira é de 31 a 35 °C e no caso da segunda 36 a 39 °C [Breuer *et al.*, 2006]. O metabolismo da xilose é diferente nas duas variedades sendo que a variedade *hansenii* necessita de suplementação para obter resultados semelhantes à variedade *fabryi*. Esta distinção pode estar relacionada com uma limitação metabólica ao nível do enzima glucose-6-fosfato desidrogenase [Nakase *et al.*, 1985a; Nakase *et al.*, 1985b]. Contudo, a variedade *hansenii* é a mais comum e aquela que se encontra melhor caracterizada.

### **1.7.1.2 Metabolismo das pentoses em *D. hansenii***

A pentose mais importante em termos quantitativos e que melhor representa este grupo de monossacáridos é a D-xilose. O transporte da xilose pela membrana plasmática das leveduras varia consoante o género e espécie em questão, podendo ocorrer por mecanismos de difusão facilitada ou processo ativo [Winkelhausen *et al.*, 1998]. A levedura *D. hansenii*, quando inoculada num meio com glucose, transporta a glucose e a xilose através de um sistema de difusão facilitada [Nobre *et al.*, 1999]. O xilitol é um dos produtos intermediários do metabolismo da D-xilose sendo que, em leveduras, a via usual consiste numa reação de redução/oxidação proveniente da ação de enzimas específicos dependentes de cofatores.

Em *D. hansenii* esta reação catabólica consiste na redução da D-xilose a xilitol, na presença do enzima xilose-redutase (XR), exclusivamente dependente do NADPH, seguida de uma oxidação do xilitol a D-xilulose, por ação do enzima xilitol-desidrogenase (XDH), cuja atividade requer a presença de NAD<sup>+</sup> (Figura 11) [Kuhn *et al.*, 1995; Duarte *et al.*, 1996; Parajó *et al.*, 1998c]. A elevada produção de xilitol obtida pela ação desta levedura é resultado da combinação entre a elevada dependência da atividade do enzima XR à presença do NADPH e da reduzida atividade do enzima XDH [Nakase *et al.* 1985b; Winkelhausen *et al.*, 1998]. A regeneração do NADPH dá-se a nível da Via dos Fosfatos de

Pentose (PPP), sendo que a regeneração de  $\text{NAD}^+$  dá-se apenas ao nível da cadeia respiratória, sendo o oxigénio o aceitador final de eletrões [Aguiar *et al.*, 1999].



**Figura 11 - Passos iniciais do metabolismo da D-xilose em *D. hansenii* e mecanismo bioquímico da acumulação de xilitol [Winkelhausen *et al.*, 1998].**

A síntese destes enzimas é induzida na presença de xilose, tendo o oxigénio um papel importante na sua regulação [Nobre *et al.*, 2002]. Quando se inocula leveduras como a *D. hansenii* em meios aneróbicos, a tendência será para que ocorra um desequilíbrio no potencial redox devido ao aumento na concentração de NADH, o que força a interrupção do metabolismo celular [Parajó *et al.*, 1998a]. Em meios com arejamento, uma elevada razão  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  promove a oxidação do xilitol a D-xilulose, com uma subsequente tendência natural de crescimentos celular, sendo o xilitol consumido na sua totalidade, e não acumulado [Parajó *et al.*, 1995]. No entanto, quando a quantidade de oxigénio é restringida (semi-aerobiose), uma vez que há um decréscimo da razão  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  por restrições à oxidação do  $\text{NAD}^+$  a NADH, ocorre a inibição do XDH e uma consequente diminuição oxidativa do xilitol a D-xilulose [Torrado *et al.*, 2012]. Assim sendo, a célula não terá a capacidade de consumir todo o xilitol produzido e o excesso é excretado para fora da célula, tornando-se possível aumentar o rendimento neste composto [Nobre *et al.*, 2002]. É garantido um fornecimento mínimo que permita a regeneração do NADH, tornando possível equilibrar o crescimento celular com a produção de xilitol.

A bioconversão da D-xilose a xilitol é um processo complexo e, apesar de se apresentar como uma alternativa ao processo químico, existem limitações a ele associadas e que devem ser controladas. São vários os fatores que limitam os resultados de uma fermentação, tais como [Parajó *et al.*, 1998b; Prakasham *et al.*, 2009]:

- Fatores bióticos: A estirpe, idade e concentração inicial do inóculo;
- Fatores abióticos: Condições de operação, sendo as mais relevantes os valores de pH e temperatura e principalmente a disponibilidade em oxigénio, mas também a composição do meio de cultura, tais como a concentração de xilose e de outros monossacáridos, suplementação e presença de inibidores.

## 1.7.2 Fatores que influenciam a produção de xilitol em leveduras

### 1.7.2.1 Fatores bióticos

#### *Idade do inóculo*

A idade do inóculo é usualmente citada como sendo um dos fatores que influencia a atividade metabólica e a viabilidade das células [Parajó *et al.*, 1998b], resultando num decréscimo dos rendimentos de fermentação. Estudos feitos com leveduras do género *Candida* e *Debaryomyces* comprovaram que, quando mais idade uma colónia tiver, menos crescimento celular se verifica e, conseqüentemente, menos produtividade, uma vez que as colónias com o tempo vão perdendo viabilidade. Geralmente, esse resultado tende a ocorrer quando a idade do inóculo ultrapassa as 24 horas, como conseqüência do decréscimo da atividade dos enzimas XR e XDH sintetizadas pela levedura.

#### *Concentração inicial do inóculo*

De uma forma geral, o aumento da concentração inicial do inóculo tem como conseqüência o aumento do rendimento e da produtividade em xilitol [Parajó *et al.*, 1996; Parajó *et al.*, 1998b]. Estudos realizados demonstram que, para concentrações celulares de *D. hansenii* de 0,3- 3 g·L<sup>-1</sup>, a produtividade em xilitol aumenta significativamente, sendo atingidos valores de 0,6-2,25 g·L<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup> [Domínguez *et al.*, 1997]. Contudo, fatores como o tipo de microrganismo, composição do meio e as condições de fermentação adotadas exercem uma forte influência no crescimento celular.

Uma exagerada concentração inicial de células pode levar a uma redução de oxigénio disponível no meio, o que provoca uma diminuição da atividade das leveduras e uma previsível diminuição da concentração de xilitol. Todavia, uma concentração mais elevada de células pode minimizar o efeito inibitório de alguns componentes que possam estar presentes nos substratos [Chung *et al.*, 1985; Parajó *et al.*, 1996].

Como tal, é importante assegurar a existência de condições ótimas de inóculo, para que não interfira com os valores de rendimento e de produtividade, mas que possibilite a redução do efeito dos inibidores.

#### *Aclimação*

A aclimação consiste em submeter um microrganismo vivo a um ambiente modificado, causando-lhe *stress* fisiológico. Aclimatizar as células a um determinado meio torna-se um método mais eficiente e menos dispendioso, comparativamente à necessidade de destoxificação [Breuer *et al.*, 2006]. Passa por conjugar diferentes condições bióticas e abióticas submetendo os microrganismos a essas alterações, de modo a estudar o seu comportamento e selecionar as condições com melhores resultados. Aliado à disponibilidade de oxigénio, uma aclimação prévia do inóculo é considerada

com um dos parâmetros mais relevantes para uma eficiente bioconversão em xilitol [Parajó *et al.*, 1997].

Fatores como a concentração dos açúcares e outros compostos no hidrolisado e a concentração celular inicial são de elevada relevância para a aclimação celular. Estudos realizados à levedura *C. guilliermondii* em bagaço de cana-de-açúcar (herbácea) comprovaram que a produtividade em xilitol duplicou quando se utilizaram células aclimatizadas ao hidrolisado recorrendo a um meio rico em xilose ( $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) [Felipe *et al.*, 1996]. Recorrendo ao mesmo material lenhocelulósico e à mesma levedura, verificou-se uma maior capacidade celular para metabolizar compostos tóxicos, como o ácido acético, à medida que o grau de aclimação celular ocorreu.

Contudo, é importante focar a importância da concentração de xilose do hidrolisado hemicelulósico. Em bagaço de cana-de-açúcar, para concentrações acima de  $70 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  foi necessário recorrer a meios de aclimação mais rigorosos, devido à maior presença de compostos inibidores [Felipe *et al.*, 1996].

### **1.7.2.2 Fatores abióticos**

#### *pH e Temperatura*

Os valores de pH e de temperatura influenciam o crescimento dos microrganismos, sendo que é necessário garantir as condições ideais, de acordo com a estirpe em estudo.

As leveduras normalmente conseguem crescer em meios ácidos, a valores de pH entre 3,5-4,0 todavia, o limiar de tolerância encontra-se entre 2,5-8,0 [Sampaio *et al.*, 2006]. Para a levedura *D. hansenii*, o pH inicial ótimo para a produção de xilitol é de 4,5-5,5 [Domínguez *et al.*, 1997; Sampaio *et al.*, 2006], mas esta pode crescer a pHs bem mais elevados. É importante que exista um bom controlo do pH, pois assim pode-se controlar a toxicidade dos ácidos fracos, normalmente identificados como sendo inibidores do crescimento celular [Felipe *et al.*, 1995].

A temperatura ótima de crescimento para as leveduras situa-se, em geral, entre 24 e 45 °C embora algumas espécies cresçam no intervalo de 0 a 47 °C [Silva *et al.*, 1998]. Para a produção de xilitol, a temperatura mais adequada segundo [Winkelhausen *et al.*, 1998] é em geral os 30 °C sendo que, em meio quimicamente definido e a um pH inicial de 5,5, a produtividade de xilitol mais elevada conseguida pela levedura *D. hansenii*, segundo estudos realizados, atingiu-se a 35 °C [Domínguez *et al.*, 1997].

#### *Disponibilidade de oxigénio*

A disponibilidade em oxigénio surge como sendo uma das variáveis operacionais mais importantes para a acumulação de xilitol em leveduras, sendo considerada como um fator crítico na produção de xilitol [Parajó *et al.*, 1998b]. O seu efeito encontra-se descrito no ponto 1.7.1.2, na apresentação do metabolismo das pentoses. Contudo, torna-se difícil tecnicamente controlar a quantidade de oxigénio que se encontra dissolvida no meio, tornando este fator ainda mais relevante. Sendo o xilitol um

metabolito intermediário do metabolismo da D-xilose, que funciona simultaneamente como produto e como substrato de duas reações de redução / oxidação, o oxigénio terá a função de mobilizar o consumo ou a excreção/ acumulação de xilitol. Por forma a aumentar a eficiência do processo, é usualmente proposto que este processo possa ocorrer em duas etapas, a primeira com arejamento elevado para que ocorra crescimento de biomassa e a segunda em condições de baixa disponibilidade de oxigénio para favorecer a acumulação de xilitol [Nolleau *et al.*, 1995; Duarte *et al.*, 2004; Carvalheiro *et al.*, 2004; Silva-Fernandes *et al.*, 2008].

#### *Concentração de xilose e de outros monossacáridos*

O efeito da concentração inicial de xilose ( $S_0$ ) presente no hidrolisado apresenta uma próxima relação com o efeito do oxigénio presente no meio, sendo estes dois parâmetros considerados um dos mais relevantes na bioconversão da xilose a xilitol [Parajó *et al.*, 1998b]. O efeito sobre o rendimento e produtividade obtidos durante a fermentação explica-se pela influência destes fatores sobre a atividade do enzima XR, diretamente relacionado com a presença do NADPH e do NADH [Nolleau *et al.*, 1993].

Regra geral, o rendimento e produtividade em xilitol são favorecidos por elevadas concentrações de D-xilose iniciais, sendo que as concentrações ótimas encontradas são bastante variáveis e dependentes do tipo de levedura e dos parâmetros ambientais utilizados. Estudos realizados sobre o efeito da concentração inicial de xilose em leveduras *D. hansenii* comprovam que, em fermentações descontínuas, os maiores rendimentos em xilitol foram alcançados quando o meio foi submetido a concentrações de substrato entre  $50 < S_0 > 300 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , sob condições semi-aeróbicas [Converti *et al.*, 2002]. Contudo, para valores abaixo ou iguais a  $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  a fonte de carbono é preferencialmente utilizada para o crescimento celular, sendo que a valores de concentração iniciais de xilose de  $300 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  o desempenho da levedura começa a ser francamente prejudicada pela presença de níveis elevados de açúcares e substâncias tóxicas [Silva *et al.*, 1996; Converti *et al.*, 2002].

A hidrólise da fração hemicelulósica, dada a sua composição, origina um hidrolisado rico em uma mistura de monossacáridos para além da xilose, que afetam a bioconversão em xilitol [Silva *et al.*, 1996]. As hexoses, principalmente a glucose, quando presentes em grandes quantidades, são utilizadas para o crescimento celular e para a produção de etanol, com uma conseqüente redução na produção de xilitol [Winkelhausen *et al.*, 1998]. Contudo, quando em concentrações relativamente baixas, a produção deste poliól é facilitada ao proporcionar uma fase inicial de crescimento, de modo a que o inóculo se torne capaz de fermentar em meios ricos em xilose [Meyrial *et al.*, 1991; Tavares *et al.*, 2000]. No contexto de valorização dos hidrolisados lenhocelulósicos, a bioconversão da arabinose torna-se também importante. Apesar de ser a última fração de pentoses a ser consumida, pode ser também catabolizada a polióis por *D. hansenii*, mas usualmente produzindo arabitol [Gírio *et al.*, 2000].

### *Suplementação*

A suplementação é um parâmetro importante para aumentar a *performance* da fermentação, quer no rendimento e produtividade da biomassa como do xilitol [Carvalho *et al.*, 2006; Carvalho *et al.*, 2007]. Contudo, é importante identificar tanto o tipo como os requisitos mínimos de suplementos, de modo a minimizar os custos envolvidos na formulação dos meios de inóculo [Silva *et al.*, 1997]. As necessidades de suplementação dos hidrolisados podem, nalguns casos, reduzir-se a nutrientes ou grupos de elementos específicos, dado que alguns dos componentes essenciais podem já existir no próprio hidrolisado como resultado da composição do material lenhocelulósico e do processo de hidrólise em si [Pessoa *et al.*, 1996].

O meio de cultura deve satisfazer as necessidades básicas dos microrganismos em carbono, azoto, fósforo, entre outros sendo que, na otimização de hidrolisados hemicelulósicos por suplementação, geralmente é sempre necessário incorporar fontes de azoto e/ou fosfato independentemente da espécie de leveduras em uso [Pessoa *et al.*, 1996].

Aquando da produção de xilitol, o tipo e concentração da fonte de azoto são fatores importantes, que dependem fortemente da espécie de leveduras e da concentração de hidrolisado, uma vez que a altas concentrações de nutrientes pode ser favorecido o crescimento celular em detrimento da produção de xilitol [Silva *et al.*, 1997].

### *Presença de inibidores*

Os hidrolisados lenhocelulósicos contêm variados bioprodutos, cuja concentração depende da composição química do ML, mas maioritariamente da extensão da hidrólise e dos métodos de destoxificação aplicados [Larsson *et al.*, 1999; Carvalho *et al.*, 2008]. Muitos desses biocompostos limitam o consumo da fonte de carbono por parte dos microrganismos, prolongando a sua fase de latência e levando a uma consequente perda de viabilidade ao longo do processo fermentativo, sendo ocasional a obtenção de resultados com efeito sinérgico [Parajó *et al.*, 1998c; Duarte *et al.*, 2006]. Uma otimização cuidada do processo de hidrólise e das condições de destoxificação podem reduzir grande parte desses bioprodutos, contudo sem a capacidade de eliminá-los por completo [Gírio *et al.*, 2010]. É importante, por isso, ter em conta o seu impacto dado os efeitos significativos sobre o desempenho do processo.

Atualmente já se conhecem os efeitos destes compostos na produção de xilitol [Carvalho *et al.*, 2005; Duarte *et al.*, 2005; Duarte *et al.*, 2006; Carvalho *et al.*, 2007], mas a informação disponível é ainda pouca em comparação com a informação disponível para o processo de produção de etanol.

Segundo [Duarte *et al.*, 2006], os potenciais inibidores presentes em hidrolisados hemicelulósicos dividem-se em três categorias, os ácidos alifáticos (por exemplo, ácido acético, ácido fórmico e levulínico) compostos fenólicos (maioritariamente de baixa massa molecular) e derivados de furano (furfural e HMF).

A toxicidade dos ácidos alifáticos é função da concentração da sua forma não-dissociada, a qual, por sua vez, depende do pH do meio de cultura e da constante de dissociação do respetivo ácido (pKa) [Palmqvist *et al.*, 2000]. Para concentrações equimolares da forma não-dissociada, o efeito tóxico do ácido fórmico é maior que o do levulínico, que por sua vez é maior que o ácido acético [Zaldivar *et al.*, 1999; Larsson *et al.*, 1999]. Quando presente em baixas concentrações, o ácido acético pode ter um efeito benéfico na produção de etanol e no crescimento celular, sendo que a *D. hansenii* apresenta uma tolerância a este ácido superior à maioria das leveduras, com produção de biomassa favorecida quando as concentrações do ácido atingem até  $6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  [Duarte *et al.*, 2005].

Em relação aos derivados de furano, em hidrolisados hemicelulósicos, o furfural é o que apresenta maior relevância quantitativa e com efeitos mais tóxicos [Carvalho *et al.*, 2005]. O efeito sobre a *D. hansenii* é conhecido como sendo igual para leveduras como a *P. stipis* e a *K. marxianus*, em que ocorre o aumento da fase de latência, redução da taxa específica de crescimento e da produtividade celular [Duarte *et al.*, 2005]. O furfural limita seletivamente o consumo de pentoses e a sua assimilação para biomassa, reduzindo a capacidade de produzir xilitol [Duarte *et al.*, 2005]. O efeito do HMF assemelha-se ao furfural, contudo é menos tóxico [Oliva *et al.*, 2003].

Comparativamente com os inibidores metabólicos já mencionados, os efeitos tóxicos dos compostos fenólicos não têm sido extensivamente estudados, podendo dever-se ao facto destes variarem grandemente em tipo e quantidade e de poderem ser diferentes consoante as condições de hidrólise, para o mesmo ML [Duarte *et al.*, 2005]. Além disso, a sua concentração em hidrolisados é geralmente baixa, assim como a solubilização em água, tornando escassos os métodos de análise quantitativa e qualitativa [Palmqvist *et al.*, 2000]. Contudo, estes compostos têm vindo a ser descritos como um dos grupos mais tóxicos para os microrganismos, principalmente os de baixa massa molecular e mesmo em concentrações reduzidas [Mussatto *et al.*, 2004]. Comparações de diferentes níveis de inibição induzidos por todos os compostos fenólicos em diferentes microrganismos comprovaram que a *D. hansenii* foi a que apresentou maior tolerância à maioria destes compostos [Duarte *et al.*, 2005].

Foi também já demonstrado que a toxicidade de um hidrolisado hemicelulósico é resultante de efeitos combinados dos diversos compostos inibidores presentes e não de compostos individuais [Zaldivar *et al.*, 2000], tornando interessante utilizar métodos de destoxificação capazes de reduzir/eliminar a concentração da maioria dos inibidores.

O impacto no metabolismo microbológico pode ser melhorado quando controladas todas as condições já mencionadas ao longo do ponto 1.7.2, contudo a natureza do microrganismo e as suas características intrínsecas são os principais fatores de estudo para a otimização da bioconversão [Duarte *et al.*, 2005].

## 1.8 Objetivos

Tendo como meta final a redução de custos, o principal objetivo deste trabalho é a otimização da bioconversão de xilitol aplicando diferentes estirpes de *D. hansenii*, utilizando hidrolisados produzidos em condições previamente otimizadas. De modo a atingir este objetivo foram consideradas várias etapas:

- Caracterização físico-química da matéria-prima e do hidrolisado obtido;
- Estudo do efeito da granulometria na eficiência da hidrólise ácida;
- Seleção de estirpes com potencial para a produção de xilitol;
- Otimização da produção de inóculo recorrendo ao estudo da aclimação da levedura, utilizando meio não-destoxificado, diferentes concentrações iniciais de células e diferente disponibilidade de oxigénio;
- Estudo do efeito da produção de inóculo, da suplementação e da disponibilidade de oxigénio na bioconversão da xilose a xilitol, por *D. hansenii*.

## 2 Materiais e Métodos

### 2.1 Matéria-prima e sua preparação

A matéria-prima utilizada na realização deste trabalho foi a biomassa de *Arundo donax* L., recolhida na Tapada da Ajuda, no Instituto Superior de Agronomia, em Lisboa.

A matéria-prima foi rececionada na Unidade de Bioenergias do LNEG em forma de canas secas com aproximadamente 60 cm, numa saca de 5,5 kg. De modo a reduzir o tamanho, cada cana foi triturada numa bio-trituradora (Viking GE 35S, Áustria) e seguidamente moída num moinho de facas (Fritsh, Alemanha) por um crivo de 1 mm ou de 4 mm. A fração moída foi armazenada em garrações de plástico. Dadas ambas as etapas terem sido realizadas no exterior, cada garrafão foi posteriormente colocados numa estufa (JP- Selecta Dry-big, Espanha) durante 1 hora a 50-60 °C de modo a certificar que o material não absorveu água. O lote recolhido foi armazenado à temperatura ambiente no laboratório.

### 2.2 Hidrólise ácida

As condições de hidrólise ácida aplicadas foram baseadas nas condições anteriormente otimizadas recorrendo a métodos de planeamento estatístico de experiências anteriores [Shatalov *et al.*, 2011] e encontram-se descritas no Quadro 3. Estas condições foram determinadas com base no fator de severidade combinado (CS), que procura combinar num único parâmetro empírico o efeito das diferentes variáveis operacionais, nomeadamente o tempo, o pH e a temperatura.

**Quadro 3 - Condições de hidrólise ácida diluída otimizadas para funcionamento em autoclave.**

Parâmetro	Condição
Concentração em ácido sulfúrico	1,274 % (m/m)
Temperatura	130 °C
Duração	105 min
Tempo de aquecimento	12 min (de 100 a 130 °C)
Tempo de arrefecimento	76 min (de 130 a 100 °C)
Razão líquido-sólido	7 (g·g <sup>-1</sup> ) *

\*Esta razão foi calculada tendo em conta a humidade da matéria-prima

Os parâmetros de severidade empregues no estudo de tratamentos com adição de ácidos constituem uma ferramenta útil na comparação de resultados experimentais obtidos sob diferentes condições de concentração de ácido, tempo e temperatura, as quais são determinantes na composição dos hidrolisados e sólidos obtidos nos diversos tratamentos. O CS, proposto por Chum *et al.* [1990] apresenta-se na seguinte forma:

$$CS = \text{Log } R_0 - \text{pH} \quad (\text{Eq. 2.1})$$

Com  $\text{Log } R_0$  a ser dado pela fórmula:

$$R_0 = \int_0^t \exp\left(\frac{T-100}{14,75}\right) dt \quad (\text{Eq. 2.2})$$

O processo de hidrólise foi realizado em autoclave (A.J.C., Portugal), recorrendo maioritariamente a frascos *Schott* (Alemanha) de 2000 mL, com tampas *Schott* GL45 (temperatura máxima 200 °C), sendo que para volumes mais pequenos utilizaram-se frascos *Schott* de 1000 mL.

O lote de *A. donax* L. em estudo foi dividido em cinco frações com o objetivo de analisar a possível influência da dimensão das partículas no processo de hidrólise ácida. Foram avaliadas as seguintes frações (Quadro 4):

**Quadro 4 - Frações utilizadas para o estudo do efeito da granulometria.**

Fração	Tamanho	
	Mínimo (mm)	Máximo (mm)
A	-	<0,250
B	0,250	<0,500
C	0,500	<1,000
D	1,000	<1,600
E	1,600	-

Independentemente da fração/lote utilizado, após o arrefecimento as frações sólida e líquida foram separadas por prensagem, utilizando uma prensa hidráulica (Sotel, Portugal). Foram realizados vários ensaios nas condições otimizadas e no final de cada ensaio os licores obtidos de cada frasco foram misturados de modo a obter lotes uniformes, sendo armazenados a 4 °C até posterior utilização.

### 2.3 Métodos de condicionamento do hidrolisado

Dado que o hidrolisado é obtido em condições ácidas, é sempre necessário proceder ao acerto do seu pH para que possa sustentar o crescimento microbiano. Para os hidrolisados concentrados ensaiaram-se duas estratégias de condicionamento do hidrolisado, que diferem entre si na ordem em que as operações de acerto de pH e concentração são realizadas. Na estratégia 1 o hidrolisado é primeiramente acertado a pH 5,5 e depois concentrado. O contrário foi aplicado para a estratégia 2.

O acerto do pH e a concentração foram feitos do mesmo modo para ambas as estratégias, como explicado nos pontos abaixo. A esterilização do hidrolisado foi sempre feita por filtração estéril, recorrendo a filtros de 0,22 µm.

### 2.3.1 Acerto pH

O pH do hidrolisado foi acertado a 5,5 com a adição de hidróxido de sódio, na forma sólida. A adição progressiva de pequenas quantidades deste agente alcalino foi acompanhada pela agitação magnética e leitura constante do valor de pH através de um medidor de pH (Crison micropH 2002, Espanha). Após a neutralização o hidrolisado foi submetido a uma filtração rápida com filtros Filter-lab 1238, seguida de uma filtração média com filtros Filter-lab 1242 e filtração lenta (filtros de porosidade de 0,45 µm).

### 2.3.2 Concentração do hidrolisado

Neste trabalho, os hidrolisados foram submetidos a um processo de concentração (2 vezes, em massa) por evaporação, com recurso a um rotavapor (Büchi R-210, Suíça) com banho de água incorporado a uma temperatura de 70 °C, pressão de 150 mbar controlada automaticamente e agitação de 150 rpm até se atingir a concentração pretendida.

O objetivo deste processo foi aumentar a concentração de xilose e simultaneamente remover inibidores voláteis presentes no hidrolisado, tendo sido aplicado antes ou depois do acerto do pH de modo a verificar a sua influência na composição química do hidrolisado.

## 2.4 Microrganismos e condições de cultura

### 2.4.1 Microrganismos

Todas as estirpes encontram-se depositadas na Coleção de Culturas de Microrganismos Industriais do INETI (CCMI). Foram utilizadas três estirpes da levedura *Debaryomyces hansenii*: a levedura CCMI 493 da variedade *hansenii* e as leveduras CCMI 496 e CCMI 941 da variedade *fabryi*.

#### 2.4.1.1 Preparação de culturas stock

Com o objetivo de facilitar e uniformizar os diferentes ensaios que decorreram ao longo deste trabalho, foram criadas culturas *stock* em 15 % de glicerol (p/v) dos microrganismos referidos acima. Este processo iniciou-se pela revitalização das estirpes, uma vez que se encontravam congeladas em azoto líquido. Estas culturas foram ressuspensas em meio líquido *Yeast Malt Glucose* (Anexo A.1) e cultivadas a 30 °C durante 24 h com agitação orbital. Findo este tempo, 1 mL de cultura foi diluído e espalhado em placas de Petri *Yeast Malt Glucose* (Anexo A.2) e incubado durante 24-48 h numa incubadora vertical (Sanyo MIR 252, Japão). Posteriormente selecionaram-se colónias com a macro e micromorfologia típica das leveduras para inocular rampas com *Yeast Malt Glucose* que foram incubadas durante 48 h a 30 °C na mesma incubadora vertical. As rampas foram utilizadas para a produção de inóculo, nas condições referidas no Quadro 5. Ao fim de 18 h a cultura foi adicionada a glicerol estéril de forma a obter uma suspensão celular em 15% de glicerol (p/v) homogeneizada sob

agitação magnética, separada em vials estéreis (aprox. 10 mL/vial) e congelada a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  até que seja necessária a sua utilização.

**Quadro 5 - Condições de crescimento de leveduras para preparação das culturas *stock* para inóculo.**

Parâmetro	Condição
Meio	Quimicamente Definido (Anexo A.3)
Volume de meio	80 mL
Tipologia do balão	Erlenmeyer de 1000 mL com anteparas
Volume de inóculo	4 mL
Temperatura	30 °C
Agitação	150 rpm
Duração	18 horas
Incubadora	Infors Unitron HT (Suíça)

#### 2.4.2 Condições de cultura

As condições de cultura utilizadas foram diversas ao longo do trabalho, consoante o objetivo a atingir. Foram testados diferentes fatores bióticos, como a concentração e idade do inóculo, aliados a alterações das condições abióticas recorrendo a diferentes volumes de hidrolisado e tipo de balões (e consequente disponibilidade de oxigénio) e diferentes suplementações.

Para a disponibilidade de oxigénio o Quadro 6 caracteriza qualitativamente as condições predominantes em disponibilidade de oxigénio para as diferentes situações ensaiadas.

**Quadro 6 - Condições predominantes de disponibilidade de oxigénio de crescimento de leveduras para preparação das culturas *stock* para inóculo.**

Condição	Volume de Balão mL	Volume de Meio mL	Agitação rpm	Anteparas
<b>Aerobiose plena</b>	1000	80	150	Sim
<b>Aerobiose</b>	1000	80	150	Não
<b>Semi-aerobiose</b>	1000	80*	100**	Não
<b>Semi-aerobiose severa</b>	500	80*	100**	Não

\* Meio concentrado; \*\*Agitação bastante inferior, pois foi obtida na incubadora Ivyman, que apresenta menor amplitude de movimento

Num primeiro ensaio, com a finalidade de estudar o crescimento e assim seleccionar as estirpes de leveduras mais vantajosas para a realização do trabalho, realizou-se um estudo em Meios Quimicamente Definidos (MQD-X e MQD-GX) como descrito no Anexo A.3, em meio de aerobiose.

Num segundo ensaio, para a análise das condições de cultura mais favoráveis ao crescimento celular e posterior produção de inóculo, foram utilizadas condições de aerobiose plena ou de aerobiose, modulando a quantidade de oxigénio presente. Em simultâneo procedeu-se à avaliação da suplementação e da concentração inicial de inóculo, sem ou com adição de TEVM (*Trace Elements, Vitamins and Minerals*) e recorrendo diretamente ao *stock*, a pré-inóculos em Meio Quimicamente

Definido (Anexo A.3) com 24 horas de crescimento ou a centrifugações (centrífuga Sigma 2K15, EUA) em vials de 50 mL estéreis, a 8000 g, durante 10 minutos e a uma temperatura de 4 °C.

Todos os balões foram colocados numa incubadora (Infors Unitron HT, Suíça), a 30 °C e sob uma agitação orbital de 150 rpm.

Num terceiro ensaio, promoveram-se condições de semi-aerobiose e de semi-aerobiose severa sob agitação numa segunda incubadora (Optica Ivyman System, Espanha) nas mesmas condições da anterior, contudo com uma agitação notoriamente inferior (como indicado no Quadro 6). Deste modo, torna-se possível o estudo da produção da xilitol, por limitação do oxigénio. Foram também feitos testes à suplementação, sem adição de suplementos, com TEVM (Anexo B.1) ou com Extrato de levedura (YE) 3g·L<sup>-1</sup> (Anexo B.2), utilizando as condições de concentração inóculo já otimizadas no ensaio anterior.

#### **2.4.2.1 Amostragem**

Ao longo das experiências foram recolhidas amostras periodicamente para avaliação do crescimento celular, quantificação de substratos e produtos. De modo a minimizar as alterações de cultivo, o volume de amostra foi o mais reduzido possível (2,5 / 3 mL) com exceção no caso das amostras utilizadas para determinação de peso seco, de substratos e produtos em simultâneo (5 mL).

#### **2.4.2.2 Controlo da pureza das culturas**

De modo a avaliar a micromorfologia e controlar possíveis contaminações no início, no decorrer e no final de cada fermentação foram retiradas amostras para observação microscópica, recorrendo a uma ampliação de 1000 vezes.

### **2.5 Métodos analíticos**

#### **2.5.1 Caracterização granulométrica**

A caracterização granulométrica foi efetuada pelo menos em triplicado utilizando-se amostras de *A. donax* com cerca de 100 g (balança Navigator Ohaus, Suíça) durante 25-45 minutos. Para tal, recorreu-se a um agitador (EVS1, Endecotts, Inglaterra) e a uma seleção de peneiros (Retsch, Alemanha) de diâmetro 20,3 cm, dispostos em série (Quadro 7).

**Quadro 7 - Dimensões dos peneiros usados na caracterização granulométrica.**

<b>Peneiros</b>	<b>Diâmetro de poro (mm)</b>
1	0,075
2	0,150
3	0,250
4	0,300
5	0,355
6	0,500
7	0,710
8	1,00
9	1,60
10	2,36

## **2.5.2 Caracterização química da matéria-prima e dos resíduos sólidos da hidrólise**

Para cada fração obtida no Quadro 4 do ponto 2.2 foi realizada uma caracterização química, quer da matéria-prima quer do resíduo sólido resultante da hidrólise ácida. Apenas para as frações D e E foram moídas a um tamanho de partículas inferior a 0,5 mm num moinho (Ika Werck MF10, Staufen; Alemanha), dado apresentarem um tamanho que pode dificultar a sua caracterização.

### **2.5.2.1 Determinação da humidade e cinza**

Para o procedimento, foram colocados cadinhos de porcelana a secar durante um mínimo de 5 horas a 550 °C numa mufla (Heraeus, Alemanha), sendo seguidamente arrefecidos em exsiccador e tarados numa balança analítica (AG 204, Mettler, Espanha). Na determinação da humidade, para cada cadinho pesou-se aproximadamente 1 g de amostra de cada fração e colocaram-se a secar na estufa (memmert, Alemanha) a  $105 \pm 1$  °C durante um mínimo de 18 horas. Após secagem, os cadinhos foram novamente arrefecidos e pesados nas mesmas condições quando vazios.

Para a determinação da cinza, os cadinhos com a matéria-prima já seca foram queimados em placas de aquecimento e colocados na mufla, pelo menos durante 5 horas e a 550 °C. Após arrefecimento, o valor obtido na pesagem corresponde à quantidade de cinza presente na amostra. Todo o procedimento foi repetido, pelo menos, em duplicado.

### **2.5.2.2 Determinação dos polissacáridos e grupos acetilo**

A matéria-prima, nas suas frações, foi submetida a uma hidrólise ácida quantitativa (H.A.Q.) segundo o protocolo do *National Renewable Energy Laboratory* (NREL). Pesou-se para tubos de vidro 0,5 g de amostra. Com a ajuda de uma pipeta, foram adicionados 5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 72 % (w/w), sendo a mistura posteriormente incubada durante 1 hora num banho termostaticado (memmert, Alemanha) a  $30 \pm 1$  °C, com agitação ocasional com uma vareta de vidro. Após este período, todo o conteúdo dos tubos foi arrastado para frascos *Schott* de 250 mL através de arrastamento com água desmineralizada, numa quantidade suficiente para se obter uma concentração de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> de 4 %. O

conjunto foi pesado (balança AE, ADP 610 L) e autoclavado a 121 °C durante 1 hora (A.J.C., Portugal) sendo que, após o tempo de tratamento, procedeu-se a um arrefecimento lento sem abertura do esgoto, até a temperatura baixar para os 90 °C e a pressão igualar 0 bar. Com os *Schotts* devidamente arrefecidos, fez-se uma pesagem do conjunto novamente de modo a verificar se ocorreu alguma perda durante o tratamento. Por último, cada amostra foi filtrada recorrendo a cadinhos de placa porosa, de porosidade 3 e 4 previamente tarados a 550 °C em mufla (Heraeus, Alemanha) durante o mínimo de 5 horas.

A fase líquida obtida foi analisada em HPLC (como descrito em 2.5.3.1) após uma filtração a 0,22 µm, sendo o cálculo das percentagens de polímeros e de grupos acetilo obtido com base nas concentrações de glucose, xilose, arabinose e ácido acético presente no hidrolisado (Anexo C.1).

### **2.5.2.3 Determinação da lenhina**

A fase sólida obtida em 2.5.2.2, aquando a determinação dos polissacáridos, foi colocada primeiramente na estufa e posteriormente na mufla, para determinação da lenhina, segundo o método indicado no ponto 2.5.2.1. O resíduo seco, após a correção da cinza, é considerado como a fração de lenhina de Klason presente na matéria-prima (Anexo C.1).

### **2.5.2.4 Determinação da proteína total**

A proteína total da matéria-prima foi determinada de acordo com o método de *Kjeldahl*. Foram pesados para papel de pesagem 1200 HP (Filter lab, Espanha) cerca de 0,5 g de cada amostra, sendo o conjunto colocado em tubos de digestão aos quais se adicionou uma colher de mistura catalisadora e 20 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado (95-97 % p/p), com o objetivo de acelerar e tornar a digestão mais eficiente. Nesta etapa, todo o azoto presente nas amostras é convertido a sulfato de amónia. Colocaram-se os tubos na unidade de aquecimento do aparelho de digestão (Tecator, Suécia), com a respetiva cápsula de condensação de fumos. Abriu-se a fonte de vácuo e a torneira de água sendo que, nos primeiros 30 minutos a temperatura foi moderada e após esse tempo foi elevada a 420 °C durante aproximadamente 2-3 horas, até a cor da solução mudar para verde-água. Uma vez terminada a digestão e após arrefecimento da solução obtida, os tubos foram colocados na unidade de destilação (Kjeltec System modelo 1026, Tecator, Suécia) juntamente com Erlenmeyer contendo uma solução de 50 mL ácido bórico 4% (p/v) e 2 a 3 gotas de indicador de pH (indicador Tashiro), com uma cor inicial arroxeadada. Durante esta etapa, por ação de uma solução de NaOH injetada pelo equipamento, ocorre primeiramente a libertação de amoníaco que é arrastado por uma corrente de vapor água e posteriormente recolhido na solução de ácido bórico. A reação do amoníaco com o ácido bórico dá origem a iões burato e consecutivamente a uma passagem de cor para azul-marinho. Em seguida, o doseamento do ião burato é conseguido por titulação com HCl com concentração conhecida (0,1M), tornando-se novamente violeta a pH perto de 4,8. O procedimento foi feito em duplicado, para cada

fração em estudo. O fator de conversão usado foi de  $N \times 6,25$ . Os cálculos utilizados para dosear o teor proteico da matéria-prima encontram-se descritos no Anexo D.

### **2.5.2.5 Determinação dos extrativos**

#### *Preparação do material*

Inicialmente foram colocados balões de base plana a secar numa estufa a 105 °C *overnight*. Depois de secos e arrefecidos num exsiccador durante aproximadamente 1 hora, registou-se o seu peso sem adição de esferas de ebulição. Em cartuchas de extração previamente taradas, foram adicionados cerca de 2,5 g de matéria-prima, sendo seguidamente colocadas dentro de *Soxhlets*.

#### *Extração com água*

Adicionaram-se, com auxílio a uma proveta, cerca de 190 mL de água desionizada para cada balão. A base de cada balão foi incorporada em mantas de aquecimento ajustadas de modo a que por hora sejam completados 4 a 5 ciclos de extração (passagem da água pelas cartuchas). O tempo de refluxo é dependente da taxa de remoção das componentes de interesse, da temperatura do condensador e da taxa de ciclos. Neste ensaio o tempo de refluxo foi de 16 horas, sendo que no fim as mantas de aquecimento foram desligadas e os balões arrefecidos à temperatura ambiente.

Para evaporar a água recorreu-se a um rotavapor com banho termostaticado a aproximadamente 40 °C. Foi necessário controlar a pressão até atingir 72 mbar, sendo cada balão posteriormente colocado na estufa a 105 °C durante 18 horas. Após uma hora e meia no exsiccador, os balões foram devidamente pesados.

#### *Extração com etanol*

No final da extração com água, utilizando as mesmas cartuchas, removeu-se o máximo de água residual do *Soxhlet*. Adicionaram-se, com auxílio a uma proveta, cerca de 190 mL de álcool etílico a balões previamente tarados, sendo posteriormente encaixados nos *Soxhlets* e em mantas de aquecimento ajustadas de forma a favorecer 6 a 10 ciclos por hora. No final as mantas de aquecimento foram desligadas e os balões arrefecidos à temperatura ambiente.

Para evaporar o álcool etílico recorreu-se a um rotavapor com banho termostaticado a aproximadamente 40 °C. Foi necessário controlar a pressão até atingir 175 mbar, sendo cada balão posteriormente colocado na estufa a 105 °C durante 18 horas. Após uma hora e meia no exsiccador, os balões foram devidamente pesados.

A metodologia de cálculos para a determinação de extrativos encontra-se descrita no Anexo E.

## 2.5.3 Caracterização química dos hidrolisados

### 2.5.3.1 Doseamento dos monossacáridos, ácidos alifáticos e derivados de furano

O doseamento de monossacáridos, compostos inibidores (exceto compostos fenólicos) e produtos derivados do metabolismo microbiano, foi feito por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC). Todas as amostras foram previamente filtradas através de filtros Pall Corporation com um diâmetro de poro de 0,45 µm. A D-glucose (Glc), D-xilose (Xyl), L-arabinose (Ara), ácido acético (Hac), ácido fórmico (HFor), ácido levulínico (HLev), glicerol (GlyOH), etanol (EtOH), 5-hidroxiacetilfurfural (HMF) e furfural (F) e os polióis foram analisados utilizando uma coluna Aminex HPX-87H (Bio-Rad, EUA). Para o HMF e furfural foi utilizado um detetor de UV/VIS regulado para 280 nm, e para os restantes compostos um detetor de IR. As concentrações dos compostos analisados foram calculadas a partir de curvas de calibração traçadas a partir de soluções-padrão, analisadas diariamente. Nestas condições, ocorre uma sobreposição parcial dos picos de xilose, galactose e frutose, a arabinose co-elui com a manose, assim como o xilitol se sobrepõe ao arabitól. Para este último caso opta-se sempre por falar em polióis.

As condições de operação dos sistemas associados a cada coluna estão resumidas no Quadro 8 e 9.

**Quadro 8 - Características do Cromatógrafo Agilent 110 Series.**

Bomba Quaternária	Quat pump G1315B
Detetor “Diode Array”	DAD G1315
Detetor de Índice de Refração	RID G1362A
Forno de colunas	Colcom G1316A
Injetor automático	ALS G1313A
Desgasificador	Degasser G1379A

**Quadro 9 - Condições de operação para análise em HPLC para a coluna HPX-87H.**

Coluna	HPX-87 H
Fase móvel	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 5,0 mM
Caudal	0,6 mL·min <sup>-1</sup>
Temp. da coluna	50 °C
Temp. do detetor de IR	45 °C
Comp. onda UV	280 nm
Volume de amostra	5 µl

### 2.5.3.2 Doseamento dos compostos fenólicos

#### *Método espectrofotométrico*

Os compostos fenólicos presentes no hidrolisado foram doseados com uma solução de *Folin-Ciocalteu* [Singleton *et al.*, 1965; Singleton *et al.*, 1999]. O ácido gálico (Panreac) foi utilizado como padrão neste ensaio experimental. O princípio deste método baseia-se na capacidade dos compostos

fenólicos reduzem o reagente de *Folin-Ciocalteu*, sob condições alcalinas, alterando a cor de amarelo a azul. O procedimento encontra-se no Anexo F.

#### *Método eletroforético*

O perfil de compostos fenólicos foi determinado por CZE (eletroforese capilar de zona), de acordo com [Roseiro *et al.*, 2003]. Foi utilizando um equipamento Agilent CE modelo 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. Foi utilizada uma solução tampão de 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 10.

Todas as amostras foram previamente filtradas através de filtros Millipore® com um diâmetro de poro de 0,45 µm. As identificações dos compostos foram feitas a partir dos tempos de migração e espectros UV-Vis de padrões comerciais analisados nas mesmas condições. Os padrões analisados incluem oleuropeína (Extrasynthèse), tirosol (Extrasynthèse), hidroxitirosol (Extrasynthèse), Ácidos 3-Hidróxi-benzóico (Sigma), Cafeico (Sigma), Elágico (Sigma), Ferúlico (Sigma), Siríngico (Sigma), trans-Cinâmico (Aldrich), e Vanílico (Sigma), Catequina (Sigma), Epicatequina (Sigma), Naringina (Sigma), Naringenina (Aldrich), Hidroquinona (Sigma), Siringaldeído (Aldrich) e Vanilina.

**Quadro 10 - Condições de análise por eletroforese capilar.**

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

#### **2.5.4 Determinação da concentração de biomassa celular**

A concentração celular foi regularmente estimada por medição da absorvância da cultura, ao comprimento de onda de 600 nm, contra um branco de água destilada, num espectrofotômetro (Jasco, Japão). Para valores de absorvância superiores a 0,8 foram realizadas diluições, de modo a obter leituras dentro da gama de linearidade 0,2 a 0,8. Todas as diluições foram efetuadas no mínimo em duplicado.

O peso seco foi também obtido através da quantificação da concentração de biomassa seca da cultura em amostras selecionadas. Foram filtrados, sob vácuo, aproximadamente 4 mL de suspensão celular,

através de filtros com diâmetro de poro de 0,45  $\mu\text{m}$ , previamente secos e tarados na estufa a  $105 \pm 1$  °C. A biomassa foi lavada com 8 mL de água desionizada e os filtros foram secos em estufa à temperatura de  $105 \pm 1$  °C, durante, pelo menos, 18 h. Seguidamente foram arrefecidos até à temperatura ambiente num exsiccador, durante pelo menos 30 min e pesados numa balança analítica eletrónica (Mettler Toledo, Suíça). Este procedimento foi realizado, pelo menos, em duplicado.

### **2.5.5 Doseamento de monossacáridos, compostos inibidores e produtos resultantes do metabolismo microbiano**

O doseamento dos produtos resultantes das fermentações seguiu o mesmo procedimento descrito no ponto 2.5.3.1. recorrendo a uma análise por HPLC utilizando a coluna Aminex HPX-87H. No entanto, e por forma a elucidar algumas co-eluições, utilizou-se também a coluna Sugar-Pak (Quadro 11). Especificamente, esta coluna foi utilizada para calcular com maior precisão as concentrações dos monossacáridos e principalmente dos polióis que co-eluem na coluna Aminex HPX-87H.

**Quadro 11 - Condições de operação para análise em HPLC para a coluna Sugar-Pak.**

<b>Coluna</b>	<b>Sugar-Pak</b>
Fase móvel	Ca-EDTA 50 mg·L <sup>-1</sup>
Caudal	0,5 mL·min <sup>-1</sup>
Temp. da coluna	80 °C
Temp. do detetor de IR	35 °C
Comp. onda UV	-
Volume de amostra	20 $\mu\text{l}$



### 3 Resultados e discussão

#### 3.1 Caracterização físico-química da matéria-prima

Como mencionado em 1.3., a composição química do *A. donax* varia consoante as suas regiões morfológicas e níveis de maturidade, tornando-se importante numa fase inicial do trabalho caracterizá-lo física e quimicamente, destacando a fração hemicelulósica, pois a natureza desta influencia o seu aproveitamento para a produção de xilitol.

##### 3.1.1 Caracterização granulométrica

Contrariamente ao que acontece com outros materiais, como por exemplo, o bagaço de azeitona extratado, a estrutura física da cana *Arundo donax* L. exige uma redução de tamanho com vista ao seu processamento e valorização. Tendo em conta que esta etapa requer elevados gastos energéticos e que pode introduzir heterogeneidades nas amostras moídas como consequência da resistência diferencial mesmo para a mesma zona morfológicas da planta, considerou-se importante estudar o efeito da moagem sobre esta matéria-prima.

Na figura seguinte encontram-se as distribuições granulométricas dos materiais resultantes de amostras moídas utilizando crivos de 1 ou de 4 mm.

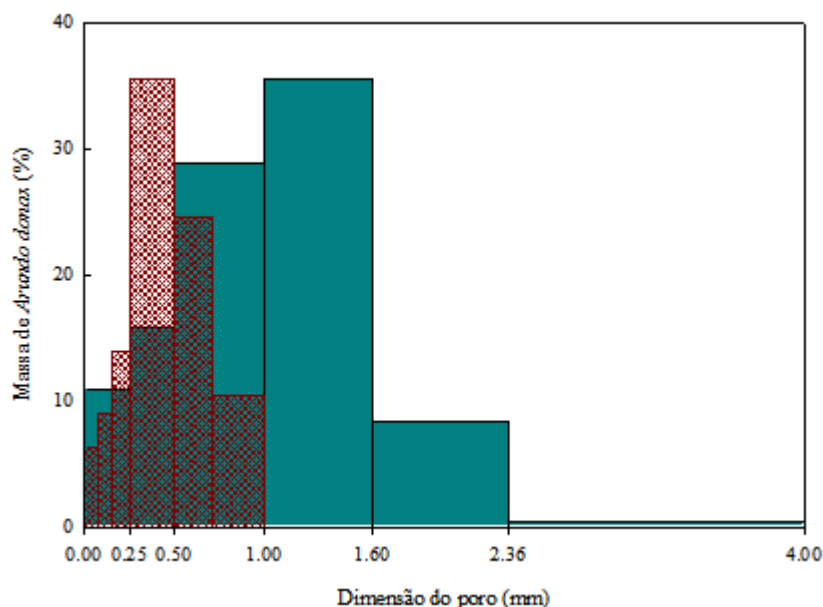


Figura 12 - Distribuição granulométrica do *A. donax* moído a 1mm (■) e moído a 4 mm (■).

Como se pode observar na Figura 12 e tendo em conta a quantidade de material retido em cada peneiro utilizado segundo o ponto 2.5.1., concluiu-se que para uma moagem recorrendo a um crivo de 1 mm o material encontra-se essencialmente dividido em 3 grandes frações: com dimensões inferiores

a 0,250 mm (29,2%); com uma dimensão entre 0,250 mm (inclusive) e 0,500 mm (35,5 %) e dimensões superiores a 0,500 mm (inclusive, 35%).

Utilizando o crivo de 4 mm, a distribuição granulométrica é diferente apresentando, como esperado, uma distribuição com uma dimensão média de partícula superior. De fato, 55,64 % do material tem uma dimensão inferior a 1 mm, com apenas 35,7 % a apresentar dimensões entre 1 mm (inclusive) e 1,6 mm, sendo que 8,45 % ficou contido a 1,6 mm. Tendo em conta as percentagens obtidas, parece ser mais vantajoso recorrer a um crivo de 4 mm no processo de moagem com vista à redução dos custos energéticos.

### 3.1.2 Caracterização química

No quadro seguinte encontra-se descrita a composição química das diferentes frações granulométricas estudadas, com as dimensões discriminadas no ponto 2.2.

**Quadro 12 - Composição química média do *A. donax* (percentagem em base seca) de acordo com as frações granulométrica em estudo.**

Componentes (%)	Frações granulométricas				
	A	B	C	D	E
Glucano	38,34	39,02	38,30	36,18	34,94
Xilano	20,10	20,62	20,60	17,55	16,36
Arabinano	2,30	2,24	2,09	1,96	1,43
Grupos acetilo	3,43	3,49	3,46	4,43	4,67
Lenhina Klason	23,45	23,30	23,54	22,22	22,56
Cinza	5,47	4,82	4,60	1,51	1,08
Proteínas	2,32	2,10	2,52	n.d.	n.d.
Extrativos	6,91	6,52	7,42	n.d.	n.d.

n.d. – não disponível

Como se pode observar no Quadro 12, não se encontram diferenças estatisticamente significativas na composição química do *A. donax* para as frações granulométricas em estudo, o que indica não haver para mesma zona morfológica resistências diferentes, nem composições químicas significativamente diferentes. As possíveis diferenças encontradas, principalmente para as frações D e E podem ser consequência de pequenos erros experimentais, provavelmente por terem sido analisadas numa altura diferente das outras.

De uma forma geral, é de destacar a elevada percentagem de polissacáridos presentes nesta matéria-prima, que atinge cerca de 61 % (p/p). Estes valores vão de encontro com os descritos anteriormente também para a mesma matéria-prima [Shatalov *et al.*, 2011; Scordia *et al.*, 2012], com elevados níveis de glucano, um razoável teor de hemicelulose maioritariamente constituída por xilose, e de lenhina. Ao comparar com outras matérias-primas semelhantes, como o sorgo [Téllez-Luis *et al.*, 2002a; Téllez-Luis *et al.*, 2002b], o *A. donax* apresenta um teor ligeiramente inferior de polissacáridos.

A percentagem de glucano como principal constituinte químico não difere grandemente dos obtidos para a palha de trigo (29-35 %), bambu (26-43 %) e bagaço de cana-de açúcar (32-44 %). Contudo, comparativamente com madeiras (38-50 %), o teor deste constituinte é ligeiramente inferior [Rossa *et al.*, 1998].

Tal como para outras herbáceas, o *A. donax* apresenta menor teor de lenhina (aprox. 23 %) e maior teor de extrativos (aprox. 7 %), quando comparado com madeiras (25-30 % e 1-5 %, respetivamente) [Beynon, 1993].

A percentagem de fração mineral (cinza) foi de aproximadamente 5 %, semelhante à obtida para a palha de arroz (4-9 %) e substancialmente mais elevada à encontrada para as madeiras, que se atinge apenas 1 % de constituintes minerais [Hurter, 1988].

Dada a elevada razão entre a xilose e as pentoses (cerca de 89 %), este material garante a obtenção de hidrolisados seletivamente ricos em xilose, pelo que se pode considerar que possui uma composição favorável para a obtenção de hidrolisados favoráveis à produção de xilitol.

### **3.2 Efeito da granulometria na hidrólise ácida de *Arundo donax* L.**

As semelhanças na composição química das diferentes frações granulométricas tornam este material muito interessante para estudos do impacto da dimensão das partículas na eficiência da hidrólise ácida.

Estudos aplicados à palha de arroz [Karimi *et al.*, 2006] para tamanhos entre 0,295 mm e 0,833 mm concluíram que não houve efeito da granulometria no processo de hidrólise ácida. Contudo, para este trabalho e tendo em conta a explicação do ponto 1.5.2.3., dada a semelhança percentual de cada fração moída a 1 mm e o interesse em analisar o mesmo efeito numa maior escala de tamanhos, foram seleccionadas para estudo as frações identificadas no Quadro 4 do ponto 2.2.

#### **3.2.1 Composição da fração líquida**

A composição química dos diversos hidrolisados produzidos para as diferentes frações granulométricas sob condições otimizadas de ácido, tempo, temperatura, valor de severidade combinado (CS) de 2,04 e uma razão líquido/sólido de 7 (explicado no ponto 2.2) encontra-se descrita no Quadro 13.

**Quadro 13 - Composição química dos hidrolisados obtidos após hidrólise ácida, para as frações granulométricas em estudo.**

Componentes (g·L <sup>-1</sup> )	Frações granulométricas				
	A	B	C	D	E
Glucose	2,30	2,39	2,74	2,08	2,57
Xilose	28,71	28,34	28,11	28,14	31,05
Arabinose	2,34	2,26	2,38	1,78	2,34
Ácido Fórmico	1,12	1,13	0,92	0,58	0,65
Ácido Acético	5,83	5,76	5,61	6,57	6,86
Ácido Levulínico	0,10	0,11	0,10	0,11	0,13
HMF	0,06	0,06	0,07	0,07	0,07
Furfural	1,26	1,41	1,44	2,05	1,37
Compostos fenólicos	1,61	1,60	1,77	1,51	1,49

Como se pode observar, comparando a composição dos diferentes hidrolisados entre si, verifica-se uma proximidade entre os valores com pequenas diferenças que estão contidas no erro experimental, não se notando qualquer tendência entre a concentração dos compostos analisados e a dimensão da fração granulométrica, com exceção do ácido acético e do ácido fórmico, para os quais parece existir uma tendência de aumento e diminuição, respetivamente, com a diminuição da dimensão da partícula. A maior diferença na composição em xilose para a fração E, quando comparada com as restantes, pode ser fruto de um qualquer erro experimental, pois esta diferença não é sustentada por diferenças noutros compostos, como seja a arabinose ou o furfural.

Independentemente da granulometria obteve-se um hidrolisado composto rico em pentoses, com uma média de 30,7 g·L<sup>-1</sup>. A xilose é a mais representativa, constituindo cerca de 93 % do total de pentoses. Este método torna-se assim altamente seletivo para solubilização e fracionamento das hemiceluloses.

A baixa concentração de glucose obtida é uma indicação de que as condições utilizadas não levam a uma degradação acentuada da celulose do material. Ao comparar estes resultados com um outro material herbáceo, por exemplo o sorgo, onde foi utilizado o mesmo ácido a concentrações semelhantes (4,28 g·L<sup>-1</sup> de glucose, 28,38 g·L<sup>-1</sup> de xilose, 5,87 g·L<sup>-1</sup> de ácido acético, 0,18 g·L<sup>-1</sup> de HMF e 1,34 g·L<sup>-1</sup> de Furfural e 1,38 g·L<sup>-1</sup> de compostos fenólicos), destaca-se uma menor concentração de glucose, sendo as concentrações restantes muito semelhantes, o que faz antever que a fermentabilidade deste hidrolisado é possível [Torrado *et al.*, 2012].

### 3.2.2 Composição da fração sólida

No Quadro 14 apresenta-se a composição química do resíduo sólido obtido pelo processo de hidrólise, para cada fração granulométrica.

**Quadro 14 - Composição química média dos resíduos sólidos de *A. donax* obtidos após hidrólise com ácido diluído (percentagem em base seca).**

Componentes (%)	Frações granulométricas				
	A	B	C	D	E
Glucano	57,19	57,18	55,56	53,22	51,01
Xilano	4,44	5,24	6,02	2,31	3,33
Arabinano	0,23	0,41	0,31	0,27	0,63
Grupos acetilo	0,00	0,00	0,00	1,19	0,79
Lenhina Klason	35,29	32,37	32,89	31,04	31,43
Cinza	3,55	2,54	2,50	1,76	1,35
Proteínas	1,43	1,46	1,54	n.d.	n.d.
Extrativos*	0	0	0	n.d.	n.d.

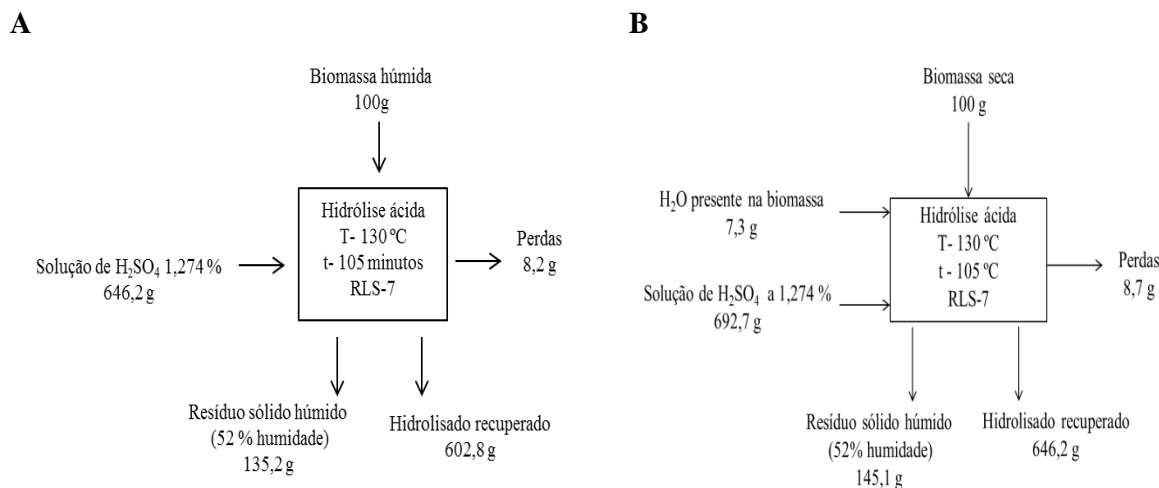
\* determinados por diferença; n.d. – não disponível

Em linha com o descrito para a composição dos hidrolisados, a dimensão da partícula não apresenta um efeito muito significativo na composição do material, sendo que as diferenças encontradas podem ser explicadas novamente pela variabilidade experimental. Estes resultados estão de acordo com os obtidos para outros resíduos agrícolas, como a casca e o bagaço de palha de arroz, onde não se verificou alterações na recuperação de açúcares para partículas menores a 0,495 mm [Singh *et al.*, 1984]. Comparam-se, para a mesma matéria-prima, as taxas de recuperação dos componentes lenhocelulósicos em partículas contidas entre 0,295 mm e 0,833 mm contudo, apenas o glucano apresentou um rendimento 44 % superior quando submetida a menores dimensões [Karimi *et al.*, 2006].

Como esperado, as condições de hidrólise ácida aplicadas conseguiram apresentar uma maior especificidade para o fracionamento das hemiceluloses sendo que a percentagem de xilano e arabinano diminuiu em comparação com a matéria-prima. Pelo contrário, a percentagem de glucano e lenhina aumentou. Dado o seu enriquecimento em glucano, este resíduo sólido pode ser aproveitado para outras aplicações sendo a mais natural, no enquadramento da biorrefinaria, a sua hidrólise enzimática para a recuperação da glucose (fração líquida) e lenhina (fração sólida) [Shatalov *et al.*, 2011]. Mas é importante focar que a percentagem de xilano, embora reduzida, ainda apresenta uma percentagem apreciável no resíduo sólido e esta poderá interferir com a eficiência da hidrólise enzimática [Gírio *et al.*, 2010]. A utilização de uma severidade superior poderia garantir uma remoção total do xilano do resíduo sólido, porém, ao aplicar uma maior severidade ir-se-ia aumentar a degradação dos monossacáridos solubilizados, principalmente arabinose e potencialmente xilose, com o concomitante aumento dos inibidores provenientes dessa degradação. Adicionalmente, aumentavam os custos de energia com o processo de hidrólise e com os métodos de destoxificação, pelo que se considera a hidrólise otimizada [Scordia *et al.*, 2011].

### 3.3 Produção de hidrolisado de *Arundo donax* L.

Tendo em conta que o tamanho das partículas não apresentou um efeito significativo na composição química do hidrolisado, todas as frações em estudo foram processadas como uma só e a produção de hidrolisado passou a ser feita em maiores volumes para a produção de meio de cultura. Na figura seguinte encontra-se esquematizado o balanço de massa para a produção de hidrolisado, em base húmida (cerca de 6-7 % de humidade) e em base seca.



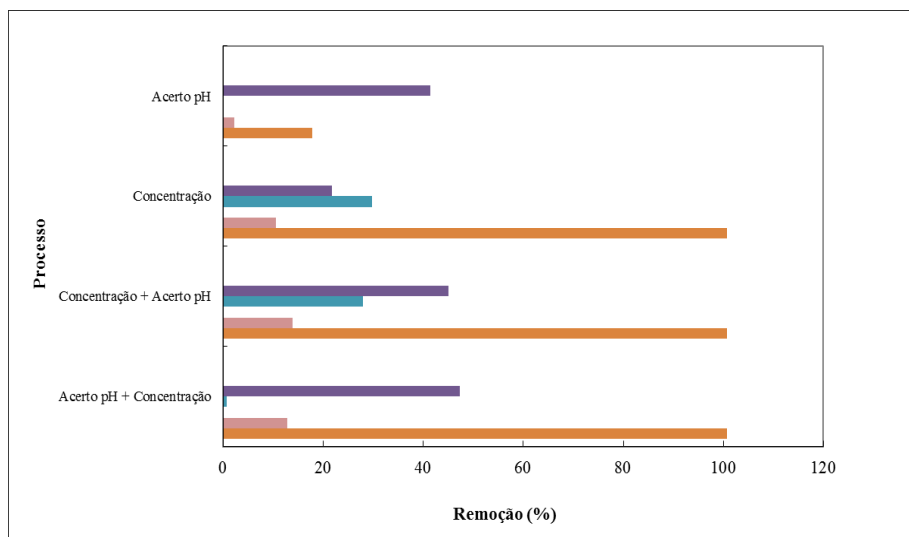
**Figura 13- Fluxograma representativo do balanço de massa em produção de hidrolisados: (A) base húmida e (B) base seca.**

Usualmente, a percentagem de perdas foi de 1,1 %. A humidade retida no resíduo sólido tratado foi de 52 %. O método de prensagem, embora mais eficiente do que submeter a uma filtração (humidade típica de 70 %), leva ainda a perdas significativas de hidrolisado. O rendimento em resíduo sólido foi de 68,7 g sólido pré-tratado por 100 g de matéria-prima seca inicial e o rendimento em hidrolisado recuperado foi de 646,3 g hidrolisado por 100 g de matéria-prima seca inicial. Teoricamente, e uma vez que a RLS utilizado foi de 7, a recuperação de hidrolisado teórica era de 700 g hidrolisado / 100 g de matéria-prima seca, demonstrando que houve perdas superiores a 53 g de hidrolisado por retenção no resíduo sólido.

### 3.4 Avaliação do processo de condicionamento do hidrolisado na sua composição química

A concentração de xilose é um dos fatores que mais influencia positivamente a produção de xilitol [Converti *et al.*, 2002]. Assim, é necessário concentrar os hidrolisados por forma a obter maiores concentrações de xilose. Como método de concentração, escolheu-se neste trabalho a evaporação. Este método tem a vantagem de levar a uma potencial destoxificação do meio, principalmente de compostos tóxicos voláteis, como sejam, por exemplo o ácido acético. A volatilidade deste composto é

potencialmente função do pH [Rodrigues *et al.*, 2001], pelo que se decidiu estudar o efeito do acerto do pH do hidrolisado antes ou depois da evaporação.



**Figura 14 - Influência dos diferentes métodos de condicionamento utilizados na remoção (%) de alguns compostos presentes no hidrolisado. Ácido acético (■), ácido fórmico (■), HMF (■), Furfural (■).**

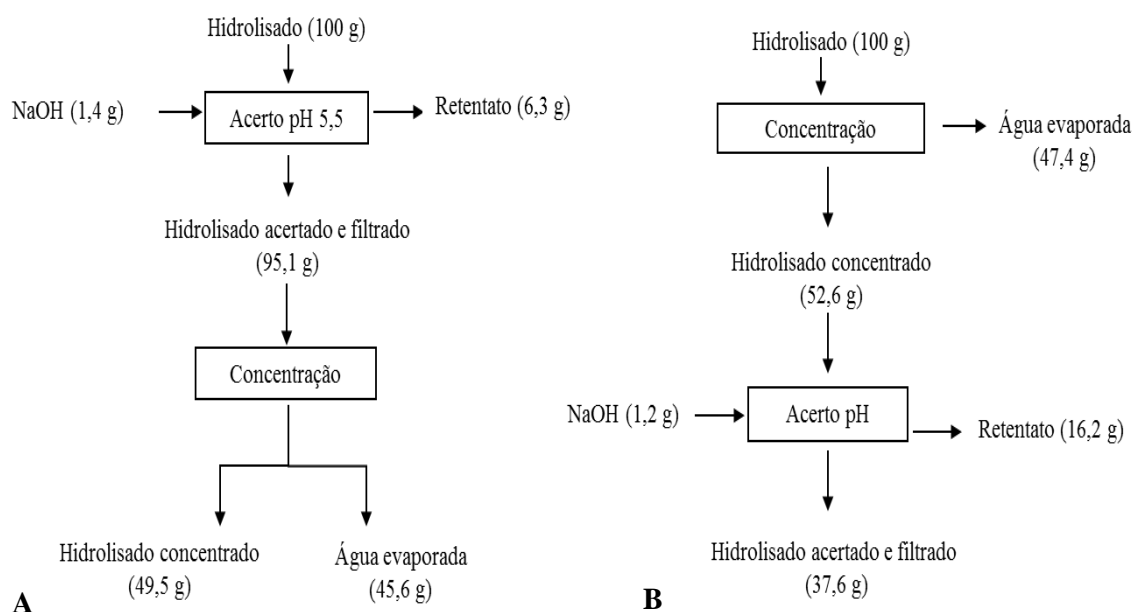
Pela análise da Figura 14 constata-se que, para todos os métodos testados, não se verificou remoção de açúcares, nem de compostos fenólicos, tendo a sua concentração aumentado para aproximadamente o dobro relativamente à inicial, como era esperado durante a concentração. A análise da composição fenólica por eletroforese capilar (dados não apresentados) demonstrou que nenhum dos processos de condicionamento provoca alterações significativas na composição qualitativa dos hidrolisados, sendo apenas confirmadas as alterações em termos quantitativos já expressas pelo método espectrofotométrico.

Para os restantes compostos, observa-se que a correção do pH para 5,5 não teve um efeito muito prenunciado na remoção da maioria compostos inibidores, reduzindo apenas a percentagem de HMF (cerca de 2 %), de furfural (cerca de 18 %) e de ácido fórmico (cerca de 41 %) e praticamente não afetando o ácido acético, o principal composto inibidor presente em termos quantitativos. Dada a relativa baixa concentração destes compostos, a composição química do hidrolisado manteve-se assim muito semelhante ao hidrolisado tal e qual, resultados concordantes com a bibliografia [Amartey e Jeffries., 1994; Carvalheiro *et al.*, 2005].

A evaporação promove uma remoção total de furfural e de cerca de 20 % de ácido fórmico. A remoção de HMF não é significativa, sendo que o ácido levulínico manteve-se inalterado. Percentagens elevadas de remoção do furfural usando métodos de concentração foram já previamente descritos por outros autores [Carvalheiro *et al.*, 2005; Carvalheiro *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2011]. Quanto ao ácido acético, houve uma remoção de aproximadamente 30 %, o que seria de esperar com a aplicação deste processo.

Contudo, este composto apresentou uma concentração duas vezes superior à inicial quando o pH é acertado antes da evaporação, não sendo verificada a sua remoção. Esta diferença de resultados está certamente relacionada com a estratégia aplicada, pois o ácido acético será mais volátil na sua forma não-dissociada (com uma remoção semelhante à obtidas apenas por evaporação) e o processo de evaporação efetuado após a correção do pH implica que o ácido acético se encontra maioritariamente na sua forma dissociada (menos volátil).

Em complemento destes dados apresenta-se, na Figura 15, os balanços de massa obtidos quando o acerto do pH é feito antes e depois da concentração, com o principal objetivo de analisar as potenciais perdas de volume de hidrolisado, tendo em conta que é uma das desvantagens destes métodos de condicionamento.



**Figura 15 - Fluxograma das etapas de condicionamento de hidrolisado com acerto do pH (A) antes da concentração; (B) depois da concentração.**

Como se pode verificar, há uma necessidade de recorrer a maiores quantidades de NaOH para acertar o pH quando esta etapa é feita antes da concentração. Contudo, essa diferença não é muito significativa. A quantidade de retentato obtida após acerto do pH e filtração é menor, com perdas de massa a rondar os 6,3 % em detrimento de 30,8 % de perdas de massa quando se concentra primeiro. Como rendimento de hidrolisado final, para o esquema (A) atingiu-se 99 % e para o esquema (B) apenas 71 %. Estas perdas arrastam grandes quantidades de monossacáridos, com um efeito muito negativo na eficiência global do processo de bioconversão da xilose em xilitol. Como se verifica um maior rendimento em massa e conseqüente maior quantidade de açúcares disponíveis, foi decidido que a preparação de hidrolisados concentrados se faria primeiramente pelo acerto do pH, mesmo sabendo que estamos a impor um maior *stress* ácido às leveduras.

### 3.5 Comparação da fisiologia de diferentes estirpes de *D.hansenii* em meios quimicamente definidos

São várias as estirpes de leveduras *D. hansenii* descritas na literatura como potenciais sobre produtoras de xilitol [Converti *et al.*, 1999].

Assim, há interesse em explorar a variabilidade intra-específica desta levedura, o que levou à seleção de estirpes de ambas as suas variedades: CCMI 493 var. *hansenii* e CCMI 941 e CCMI 496 var. *fabryi*.

Como primeira comparação foi realizado um estudo do seu crescimento em Meio Quimicamente Definido utilizando xilose (MQD-X) como principal fonte de carbono e energia com a finalidade de avaliar a eficiência do metabolismo da xilose nestas estirpes (20 g·L<sup>-1</sup> de xilose).

Na Figura 16 apresentam-se os perfis de crescimento para as leveduras pertencentes à variedade *fabryi*. Para este meio, não se verificou crescimento celular nem consumo de xilose para a estirpe CCMI 493, ao longo do tempo (resultados não apresentados). Na verdade, estirpes pertencentes à variedade *hansenii* apresentam normalmente uma maior dificuldade na assimilação de xilose, potencialmente por razões associadas ao funcionamento do enzima glucose-6-fosfato desidrogenase.

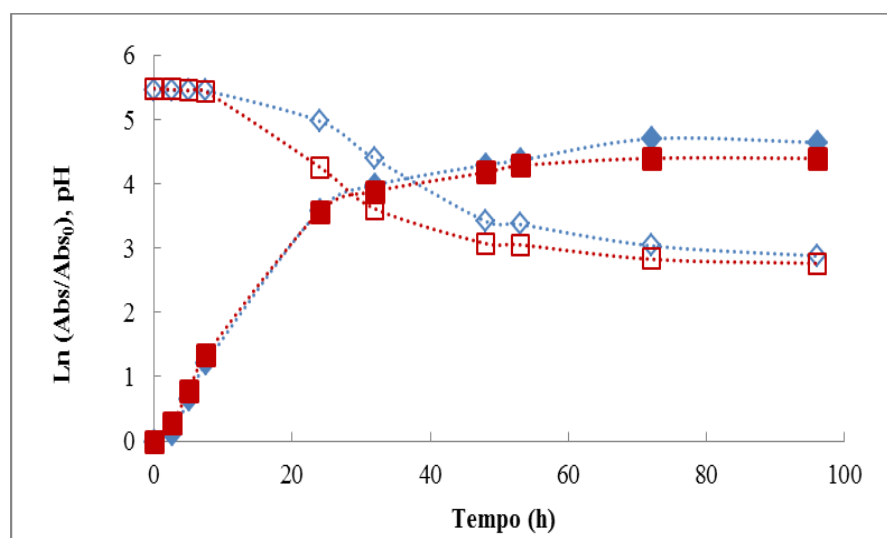


Figura 16 - Perfis de crescimento da levedura *D. hansenii* em MQD-X, para as estirpes CCMI 496 (◆) e CCMI 941 (■), e respectivos perfis de pH (CCMI 496, ◇; CCMI 941, □).

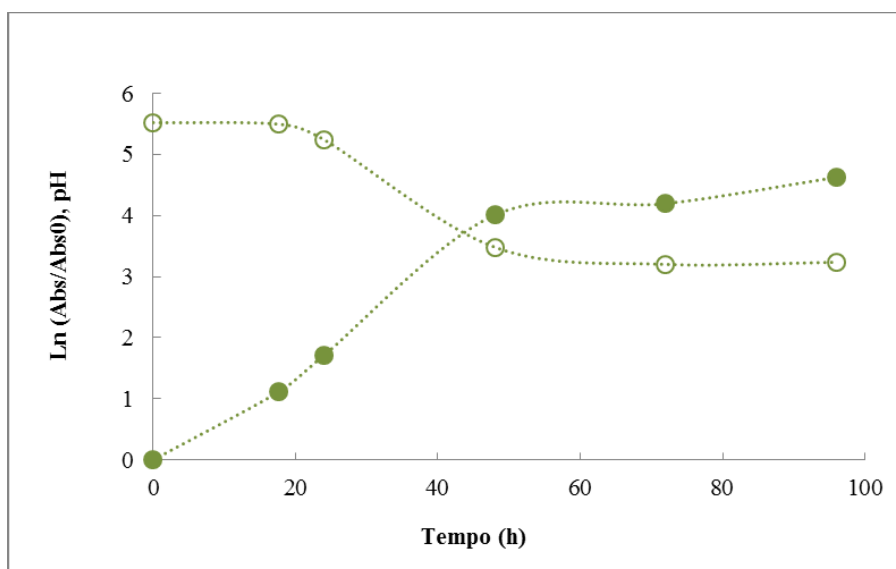
Comparando os perfis de crescimento e assimilação de xilose para as duas estirpes *fabryi*, observa-se crescimento e consumo de substrato, com uma acentuada descida do pH de 5,5 para aproximadamente 2,7, pH a partir do qual as leveduras agregam e cessa a produção de biomassa (verificado às 72 horas). O crescimento celular foi muito semelhante entre estas duas estirpes, com um final da fase exponencial às 24 horas. As taxas específicas de crescimento máximo ( $\mu_{\text{máx}}$ ) e fase de latência ( $\lambda$ ) para as estirpes CCMI 496 e 941 encontram-se no Quadro 15.

**Quadro 15 - Parâmetros cinéticos para o crescimento das estirpes CCMI 496 e CCMI 941 em MQD-X suplementado com TEVM.**

Parâmetro	Estirpes	
	CCMI 496	CCMI 941
$\mu_{\text{máx}}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	0,16	0,15
$\lambda$ (h)	0,88	0,26

Apesar de pertencerem à mesma variedade, foi necessário maior tempo de aclimação ao meio para a estirpe CCMI 496, contudo abaixo de 1 hora, o que é considerado aceitável.

Com o objetivo de avaliar o crescimento da estirpe CCMI 493 e verificar se existe consumo de xilose mesmo quando presente a baixas concentrações, esta foi cultivada em MQD-GX, um meio com  $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de glucose e  $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de xilose (Figura 17).

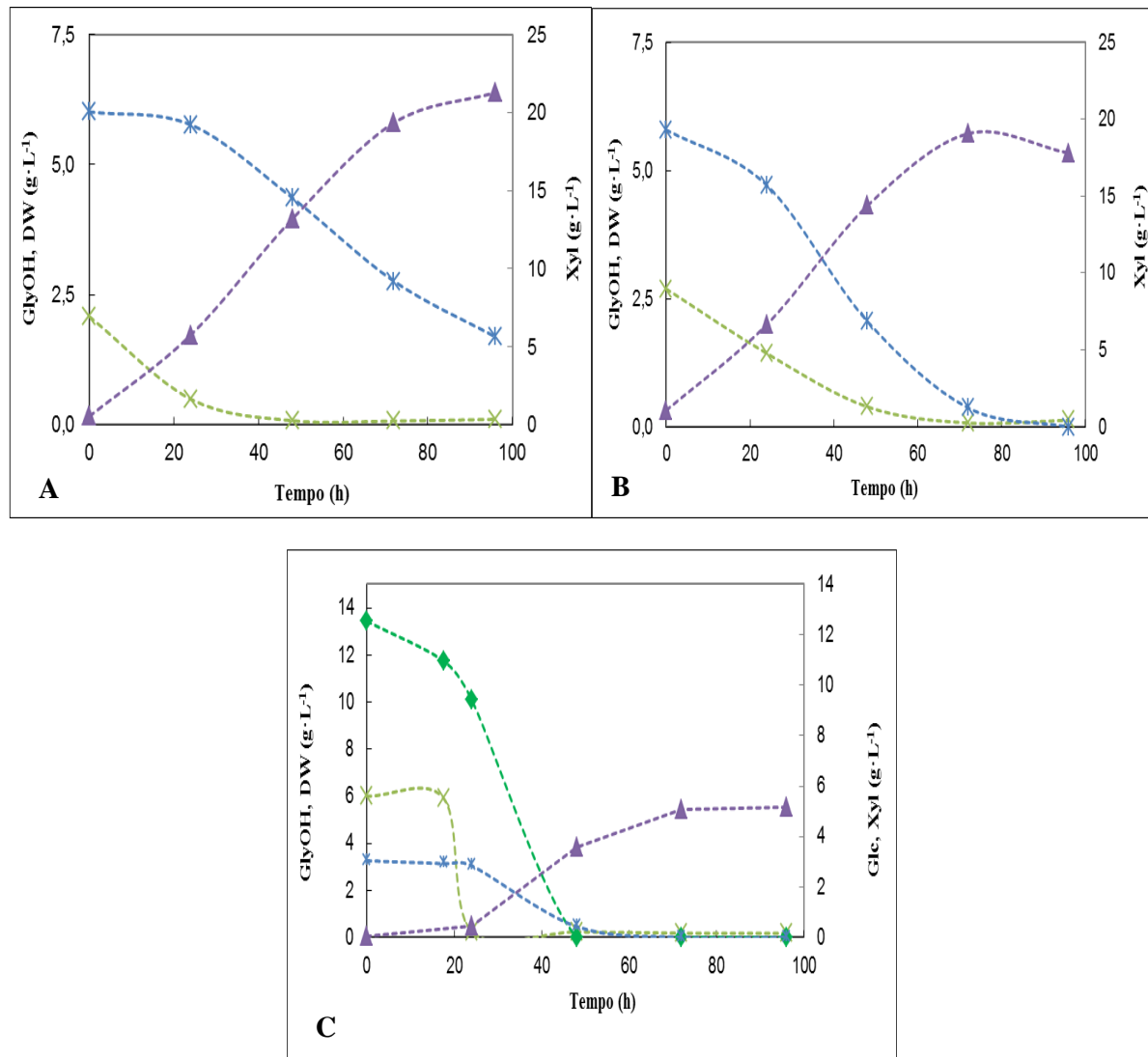


**Figura 17- Perfil de crescimento da levedura *D. hansenii* em MQD-GX, para a CCMI 493 (●) e respectivo perfil de pH (○).**

Para este meio, a estirpe CCMI 493 apresentou crescimento celular, indicando a necessidade da presença de glucose, como substrato inicial. Contudo, o final da fase exponencial verificou-se às 48 horas, o que leva a concluir que esta estirpe apresenta um crescimento mais lento, mesmo num meio rico em glucose. Isso justifica o fato de o valor para a taxa específica de crescimento máximo ( $\mu_{\text{máx}}$ ) ter sido de  $0,08 \text{ h}^{-1}$  e um tempo de latência ( $\lambda$ ) de  $2,03 \text{ h}$ , superior às outras estirpes. Todavia, a descida do pH desceu e houve consumo de xilose após o consumo de glucose.

Uma vez inoculada num meio rico em glucose, era de esperar que o crescimento desta estirpe fosse mais acentuado quando comparativamente às outras estirpes em estudo. A fase de adaptação da levedura ao meio foi demorada, o que a torna potencialmente pouco apta para crescimento em hidrolisados de *A. donax*, onde a concentração de glucose é cinco vezes mais baixa.

Na Figura 18 encontram-se os perfis de consumo de substratos para os MQD otimizados para cada estirpe em estudo.



**Figura 18-** Perfis de consumo de substratos e peso seco em MQD-X e MQD - GX: (A) Estirpe CCMI 496; (B) Estirpe CCMI 941; (C) Estirpe CCMI 493. Glucose (♦), Xilose (\*), DW (▲), Glicerol (×).

Um dos aspetos a focar por observação da Figura 18 é o consumo de glicerol por parte das estirpes em estudo. O glicerol provém, como já dito anteriormente, do *stock* de culturas utilizado para a realização deste trabalho. Através do gráfico A, verifica-se um consumo de glicerol mais acentuado nas primeiras 24 horas, em detrimento do consumo de xilose. Para a estirpe CCMI 496, a taxa de consumo de glicerol ( $Q_{\text{GlyOH}}$ ) nas primeiras 24 horas foi de  $0,07 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ , enquanto a de xilose ( $Q_{\text{xyl}}$ ) foi de  $0,03 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ . Tendo em conta estes resultados, é evidente a existência de uma repressão catabólica do glicerol sobre a xilose para esta estirpe. Provavelmente a via metabólica do glicerol é mais eficiente que a da xilose. Segundo a bibliografia encontrada, para algumas leveduras como a *Candida guilliermondii*, concentrações de  $0,7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de glicerol favorecerem a produção de biomassa e

quando acima de  $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  favoreceram o consumo de xilose, em meio de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar [Arruda *et al.*, 1994].

Atingidas as 24 horas de crescimento, a descida da concentração de glicerol levou à necessidade de consumir em simultâneo a xilose, como fonte de carbono adicional. Como consequência, às 48 h a produtividade celular ( $Q_x$ ) aumentou 21 % comparativamente às 24 horas, atingindo o seu pico máximo. Quando a concentração de glicerol atingiu  $0,07 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , o consumo de xilose deu-se a uma taxa mais acelerada por passar a ser a única fonte de carbono, contudo o crescimento celular deixou de ser exponencial por apenas estar disponível essa pentose como substrato. Para esta estirpe não ocorreu formação de produtos, como é o caso do xilitol, uma vez que as condições de crescimento foram realizadas na presença de condições de oxigénio não limitante. Como consequência, a maior parte do carbono foi utilizado para a produção de células.

Para o perfil B, ocorreu por parte da estirpe CCMI 941 um comportamento relativamente diferente, pois nas primeiras 24 horas houve consumo em simultâneo de xilose e glicerol. Esta estirpe mostrou ser menos afetada pela repressão catabólica do glicerol, com consequente facilidade em produzir biomassa apenas na presença de xilose.

É visível, pela observação do gráfico, que a taxa de consumo de xilose para a CCMI 941 é maior ( $Q_{xy1} = 0,15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ , às 24 horas) e a de glicerol menor ( $Q_{GlyOH} = 0,05 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ , às 24 horas). A xilose atinge uma taxa de consumo máxima às 48 horas, com  $0,26 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  e chega a ser consumida por completo ao fim de 96 horas. Todavia, a produção de biomassa deu-se a uma taxa semelhante à estirpe CCMI 496. O fato de se ter produzido, embora em pouca quantidade, aproximadamente 2 g de xilitol às 24 horas de crescimento (valores não apresentados) é também relevante. Às 96 h, por falta de substrato, a estirpe deixou de apresentar capacidade para crescer, verificando-se uma ligeira descida na concentração de biomassa.

Para a estirpe CCMI 493, uma vez que o crescimento foi desenvolvido na presença de glucose, este açúcar foi o primeiro a ser consumido nas primeiras 17 horas de crescimento. Contudo, verificou-se a partir dessa hora um consumo simultâneo de glucose e de glicerol. A taxa de consumo máxima de glicerol foi atingida às 24 horas ( $Q_{glyOH}$  de  $0,24 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ) de crescimento. O pico de consumo de glucose ocorreu apenas às 48 horas, quando já não havia glicerol presente no meio ( $Q_{glc}$  de  $0,26 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ). O mesmo se verificou para a xilose, embora consumida de uma forma mais gradual, apresentado às 48 horas uma taxa de consumo ( $Q_{xy1}$ ) de apenas  $0,05 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ . Verifica-se, assim, uma preferência desta estirpe pela glucose, podendo-se afirmar que o crescimento verificado para essas 48 horas provém essencialmente do consumo deste açúcar. Uma vez esgotados os substratos, o crescimento de biomassa cessou, como explicado para as outras estirpes.

O rendimento em biomassa é considerado um dos parâmetros mais importantes para a seleção das estirpes uma vez que permite avaliar o crescimento celular em função dos substratos consumidos.

O rendimento máximo em biomassa ( $Y_{x/s}$ ), contabilizando o consumo de xilose e de glicerol, foi de  $0,65 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$  e  $0,34 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$  para as estirpes CCMI 496 e CCMI 941, respetivamente (atingido para ambas às

24 horas). Para a estirpe CCMI 493, o mesmo rendimento tendo em conta o consumo adicional de glucose, foi de  $0,25 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ , atingido apenas às 72 horas. Embora tenha sido verificado menor rendimento em biomassa para a estirpe CCMI 493, o meio utilizado para o crescimento não pode ser comparável, dadas as diferenças de substratos. Sendo assim, de um modo geral, é de destacar a maior eficiência da estirpe CCMI 941 em detrimentos das restantes.

O estudo da aclimação foi, porém, feito para as três estirpes, dado o interesse em observar o comportamento destas em meio de hidrolisado, nomeadamente, a sua tolerância a este.

### **3.6 Estudo da aclimação das diferentes estirpes de *D. hansenii* ao hidrolisado de *A. donax***

Com o objetivo de estudar a aclimação das estirpes CCMI 493,496 e 941 ao hidrolisado e tendo sempre presente a necessidade de recorrer a processos economicamente mais competitivos [Carvalho *et al.*, 2006], iniciou-se o estudo cultivando as leveduras em meio de hidrolisado não suplementado, recorrendo diretamente culturas *stock*. Uma vez observado que o glicerol pode interferir no processo de assimilação da xilose, iniciou-se a experiência com baixas concentrações de inóculo (1 mL de solução *stock*), semelhantes às utilizadas para o estudo em MQD e para outros hidrolisados descritos na literatura, por exemplo, hidrolisados de palha de trigo [Silva-Fernandes *et al.*, 2008].

Nestas condições, não foi verificado crescimento celular no meio com base no hidrolisado, para nenhuma das estirpes em estudo ao fim de 24 h (resultados não apresentados). Isto levou a uma mudança de estratégia, optando-se por utilizar hidrolisado suplementado com TEVM e concentrações iniciais de inóculo bastante superiores, sendo estes inóculos obtidos a partir de cultivos nos meios quimicamente definidos, validados no ponto anterior.

Com 24 horas de crescimento, procedeu-se a uma centrifugação de  $1,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de pré-inóculo centrifugado em condições de assepsia, tendo-se utilizado o *pellet* celular para inocular 80 mL de hidrolisado suplementado com TEVM (Anexo B.1).

Os perfis de crescimento para as três estirpes utilizadas encontram-se na Figura 19. Nestas condições, apenas a estirpe CCMI 493 não apresentou crescimento em meio de hidrolisado, demonstrando a sua incapacidade de sobrevivência neste meio, pelo que se excluiu esta estirpe de estudos posteriores realizados neste trabalho.

Segundo alguns autores, recorrer a ciclos consecutivos de crescimento celular levou a um aumento da taxa de consumo da xilose e de um aumento da taxa específica de crescimento [Sene *et al.*, 1998]. Como tal, baseado na bibliografia, foram realizados ciclos por etapas, de modo a confirmar a aclimação.

Comparando as duas variedades *fabryi*, para a primeira etapa a produtividade celular ( $Q_x$ ) da estirpe CCMI 496 atingiu o pico às 24 horas, com  $0,11 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  e uma concentração de células de 4

$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Para o mesmo tempo de crescimento, a estirpe CCMI 941 já apresentava um concentração celular maior atingindo o máximo de  $17 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  com o triplo do valor de  $Q_x$  ao fim de 48 horas. Como tal, foram encontrados para as estirpes CCMI 496 e CCMI 941 taxas específicas de crescimento máximo ( $\mu_{\text{máx}}$ ) de  $0,01 \text{ h}^{-1}$  e de  $0,06 \text{ h}^{-1}$ , respetivamente.

Para a estirpe CCMI 496 apenas se verificou um pequeno consumo de furfural e glucose às 24 horas, o que justifica o reduzido crescimento celular obtido. Não se verificou consumo dos outros substratos presentes nem a produção de polióis. O mesmo não aconteceu com a estirpe CCMI 941, onde se verificou um consumo inicial e simultâneo de furfural, glucose, xilose, arabinose e ácido acético atingindo, à exceção de xilose e do ácido acético, o consumo total às 18 horas de crescimento. A taxa de consumo de xilose ( $Q_{\text{xy1}}$ ) já era de  $0,23 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  ao final de 24 horas com a respetiva produção de polióis, iniciada às mesmas horas. Não era de esperar que, em condições não tão restritas de oxigénio se verificasse produção de polióis, contudo obteve-se um máximo de  $10,46 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  às 48 horas, no momento em que a concentração de xilose atingiu cerca de  $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . O pico máximo de rendimento em biomassa ( $Y_{\text{x/s}}$ ) também foi atingido às 48 horas, com um valor de  $0,60 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$  (considerando apenas o consumo dos açúcares).

Para a 2ª etapa, a taxa específica de crescimento ( $\mu_{\text{máx}}$ ) máximo foi de  $0,02 \text{ h}^{-1}$  e de  $0,08 \text{ h}^{-1}$ , para a estirpe CCMI 496 e CCMI 941, que aumentou comparativamente aos valores obtidos para este parâmetro na primeira etapa. Contudo, para a estirpe CCMI 496 este aumento não foi muito significativo. Comparando os gráficos A e B é de salientar o crescimento celular mais acentuado para a CCMI 941. Numa terceira etapa, a levedura CCMI 941 apresenta um  $\mu_{\text{máx}}$  de  $0,13 \text{ h}^{-1}$ , aproximando-se do obtido no MQD-X. Os resultados tornam claro a capacidade desta estirpe de levedura se adaptar ao meio de hidrolisado estudado, embora recorrendo a elevadas concentrações iniciais de células. Logo, selecionou-se esta estirpe para a continuação dos estudos.

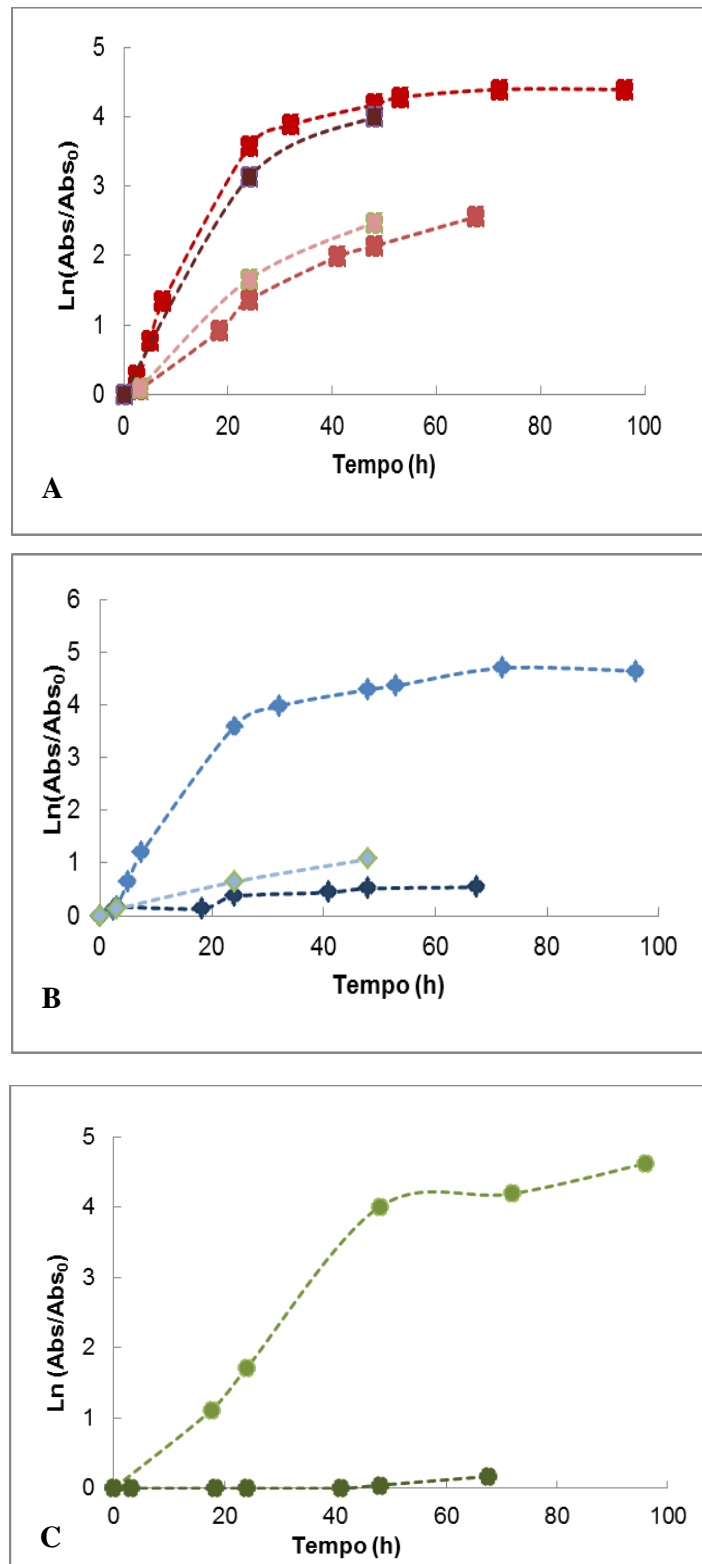


Figura 19 - Perfis de crescimento para as estirpes CCMI 941 (A), CCMI 496 (B) e CCMI 493 (C) em MQD-X (■;◆), em MQD-GX (●) e em hidrolisado acertado a pH 5,5 e suplementado com TEVM: 1ª etapa (■;◆;●), 2ª etapa (■;◆) e 3ª etapa (■).

### 3.6.1 Otimização da concentração inicial de inóculo

Uma vez selecionada a estirpe mais tolerante ao hidrolisado, foram estudadas as concentrações mínimas necessárias desta levedura para garantir crescimento, com o principal objetivo de reduzir os custos na produção de biomassa para inóculo. Para a realização deste ensaio recorreram-se a concentrações de células de 0,15, 0,25 e 0,37 g·L<sup>-1</sup> (correspondentes a volumes de 5, 7,5 e 10 mL de células *stock* centrifugadas, respetivamente), tendo os ensaios decorrido nas mesmas condições dos anteriores (80 mL de hidrolisado, suplementado com TEVM e sob condições de aerobiose).

Na Figura 20 encontram-se representados os perfis obtidos para os compostos mais relevantes. Observando meramente a figura é notável a semelhança de perfis, destacando-se apenas um aumento das taxas de consumo e produção à medida que se aumenta a concentração inicial de inóculo.

Pode-se verificar que toda a glucose foi consumida durante as primeiras 24 horas de crescimento. Contudo, este consumo foi efetuado a diferentes taxas ( $Q_{glc}$ ), como apresentadas no Quadro 16.

Focalizando o perfil A, nas primeiras 10 horas e enquanto a glucose esteve presente, verificou-se apenas um consumo de xilose e de acético, se bem que em quantidades reduzidas. Contrariamente a outras leveduras [Canilha *et al.*, 2005], a *D. hansenii* não apresenta um consumo diáuxico de glucose e xilose muito prenunciado, mas há uma nítida preferência da glucose sobre a xilose, o que vai de encontro com outros trabalhos já publicados [Carvalho *et al.*, 2007]. A concentração inicial de inóculo utilizada não restringe demasiado a presença do oxigénio no meio, o que permite o consumo do ácido acético

Apenas quando as concentrações de glucose já se encontravam abaixo de 1g·L<sup>-1</sup> é que ocorreu um consumo de xilose de 93 %, num intervalo de tempo de 24 horas. Também toda a arabinose foi consumida assim como o ácido acético, que se refletiu no aumento da produção de biomassa ( $Q_x$  de 0,15 g·L<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>). Para o mesmo intervalo de tempo a taxa de consumo de açúcares atingiu o seu máximo, assim como a taxa de produção de polióis máxima (de 0,58 g·L<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup> e uma de 0,24 g·L<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>, respetivamente). A concentração de polióis máxima [ $polióis_{máx}$ ] foi de 11,33 g·L<sup>-1</sup>.

Contudo, o máximo atingido de produção de biomassa foi mais moroso (verificado às 72 horas de crescimento), uma vez que depois de consumidos todos os substratos as células começaram a consumir os polióis presentes no meio, como modo de sustentação celular. Como tal, o  $Q_x$  e o rendimento em biomassa ( $Y_{x/s}$ ) foram de 0,19 g·L<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup> e de 0,52 g·g<sup>-1</sup>, respetivamente. Este rendimento foi feito apenas tendo em conta o consumo de açúcares, não contabilizando o consumo de acético

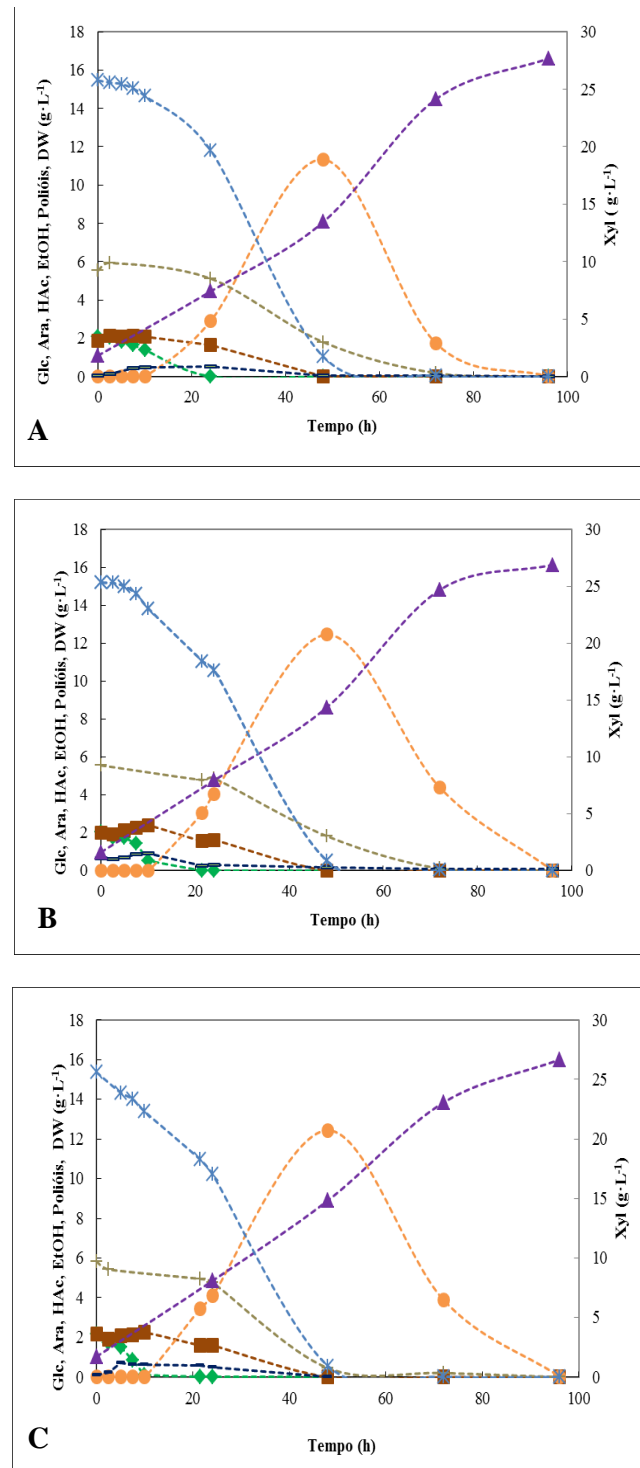


Figura 20- Perfis de consumo de substrato, e de formação de biomassa e produtos metabólicos para hidrolisado não destoxificado e não concentrado, suplementado com TEVM, para diferentes concentrações iniciais de inóculo. (A) 0,15 g·L<sup>-1</sup>; (B) 0,25 g·L<sup>-1</sup>; (C) 0,37 g·L<sup>-1</sup>. Glucose (♦) Xilose (\*); Arabinose (■); Acido Acético (+); Etanol (--), Polióis (●) Peso Seco DW (▲).

Por comparação com os restantes perfis, destaca-se principalmente um aumento significativo da taxa de consumo de açúcares e de xilose, como descrito no Quadro 16. O mesmo não ocorreu na produtividade e no rendimento em biomassa, que se mantiveram nada ou pouco inalteráveis quando

adicionado mais volume de inóculo. Este comportamento pode ser explicado dado o aumento da produção de polióis, atingindo um máximo de 12,46 e 12,44 g·L<sup>-1</sup> (no perfil B e C, respetivamente).

**Quadro 16 - Parâmetros cinéticos e estequiométricos para o crescimento da CCMI 941 em meio de hidrolisado suplementado com TEVM para diferentes concentrações de inóculo.**

Parâmetro	[Inóculo] <sub>i</sub>		
	0,15 g·L <sup>-1</sup>	0,25 g·L <sup>-1</sup>	0,37 g·L <sup>-1</sup>
μ <sub>máx</sub> (h <sup>-1</sup> )	0,16	0,14	0,15
λ (h)	4,41	3,13	2,66
Q <sub>Glc</sub> 24 h (g·L <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> )	0,03	0,15	0,21
Q <sub>xy1</sub> 24 h (g·L <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> )	0,25	0,32	0,36
Q <sub>s</sub> 24 h (g·L <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> )	0,35	0,42	0,47
Q <sub>s</sub> 72 h (g·L <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> )	0,19	0,19	0,18

Destaca-se também uma maior diferença no tempo de latência (λ), para cada concentração usada. Este resultado vai de encontro com o previsto uma vez que, à medida que a concentração celular inicial aumenta, mais facilmente é a adaptação celular inicial ao meio. O valor de μ<sub>máx</sub> é parecido para os três ensaios, o que enfatiza o fato a produtividade de biomassa ter sido semelhante, para o seu máximo.

Conclusivamente pode-se afirmar que não se justifica aumentar a concentração para 0,25 ou 0,37 g·L<sup>-1</sup>, que projetado à escala industrial aumentaria consideravelmente o volume de meio necessário ao processo de fermentação.

Também a suplementação apenas com TEVM parece ser suficiente, pois os valores de rendimento celular estão em linha com os valores teóricos para crescimentos de leveduras em limitação de carbono e energia [Duarte *et al.*, 2008]. A utilização de apenas TEVM, um conjunto de suplementos quimicamente definido e de relativo baixo custo, é uma vantagem competitiva desta levedura já também reportada para o hidrolisado de dreche cervejeira [Carvalho *et al.*, 2004; Duarte *et al.*, 2008].

O fato de se poder utilizar uma concentração inicial de células relativamente baixa e de ser dispensável a produção de mais rondas de aclimação, torna o processo de produção de inóculo economicamente rentável.

Para complementar o estudo e minimizar a produção de polióis em *prol* da produção de maior quantidade de biomassa na fase de produção de inóculo, considerou-se interessante estudar o efeito de uma maior a disponibilidade de oxigénio durante o cultivo.

### 3.6.2 Estudo do efeito da disponibilidade de oxigénio na produção de inóculo

Para complementar o estudo e minimizar a produção de polióis em *prol* da produção de maior quantidade de biomassa na fase de produção de inóculo, considerou-se interessante estudar o efeito de uma maior a disponibilidade de oxigénio durante o cultivo.

Todas as condições de cultivo foram mantidas iguais, alterando apenas a disponibilidade de oxigênio por utilização de condições de aerobiose plena, que promovem uma maior oxigenação do meio (explicado no ponto 2.4.2).

No quadro seguinte encontram-se descritos os valores para os parâmetros mais relevantes, para os diferentes balões (Quadro 17).

**Quadro 17 - Parâmetros cinéticos e estequiométricos para o crescimento da estirpe CCMI 941, em meio de hidrolisado suplementado com TEVM para condições de aerobiose e aerobiose plena.**

Parâmetro	[Inóculo] de 0,15 g·L <sup>-1</sup>	
	Aerobiose	Aerobiose plena
$\mu_{\text{máx}}$ (h <sup>-1</sup> )	0,16	0,15
$\lambda$ (h)	4,41	5,37
$Q_x$ 24h (g·L <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> )	0,14	0,32
$Q_x$ 48 h (g·L <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> )	0,15	0,26
$Q_{xy1}$ 24 h (g·L <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> )	0,25	0,59
$Y_{x/s}$ 24 h (g·g <sup>-1</sup> )	0,40	0,70

Os valores de  $\mu_{\text{máx}}$  e de  $\lambda$  foram semelhantes, recorrendo ou não a balões com anteparas. Contudo, nas primeiras 24 horas verifica-se um significativo aumento a taxa de produção volumétrica de biomassa. Na verdade, a concentração de biomassa aumentou para o dobro em condições de aerobiose plena, passando de aproximadamente 4 g·L<sup>-1</sup> para 8 g·L<sup>-1</sup>. Algo semelhante ocorreu para o mesmo parâmetro às 48 horas, onde se atingiram 13,5 g·L<sup>-1</sup> de biomassa em detrimento de 8,08 g·L<sup>-1</sup> obtidos em condições de aerobiose.

O consumo de xilose ao longo do ensaio não mostrou ser tão gradual, apresentando um elevado declive entre as 10 e as 24 horas, com uma redução de 41 % da sua concentração num espaço de tempo de 14 horas. Verificou-se assim um aumento de duas vezes mais do valor de  $Q_{xy1}$  quando submetido a um meio mais rico em oxigênio. Tal como a xilose, o consumo de arabinose e de ácido acético ocorreu mais cedo (às 24 horas), sendo totalmente consumidos. Sequentemente alcançou-se um  $Y_{x/s}$  claramente maior na presença de maiores quantidades de oxigênio e menor rendimento em polióis. Apesar de se verificar uma taxa de produção de polióis maior, derivada do aumento da taxa de consumo de substratos, a concentração máxima conseguida foi de 5 g·L<sup>-1</sup>, relativamente baixa às concentrações obtidas no ensaio sem anteparas.

Como argumento pode-se afirmar que existe uma clara influência do oxigênio nas condições de produção de inóculo, manifestado num visível aumento da produção de biomassa e numa menor formação de polióis, tal como descrito na bibliografia [Roseiro *et al.*, 1991].

### 3.7 Estudo do efeito do método de produção de inóculo na produção de xilitol

Dado que a forma como a forma como o inóculo é produzido pode influenciar a *performance* fermentativa da levedura e especificamente a produção de xilitol [Felipe *et al.*, 1996; Sene *et al.*,

1998], torna-se necessário comparar os dois tipos de inóculos produzidos sob condições de menor ou maior disponibilidade de oxigénio, como acima referidos (condições de aerobiose e aerobiose plena, respetivamente). De fato, não só a concentração celular final em cada um deles é diferente, como as células estão em estados fisiológico-metabólicos diferentes, e que se reflete numa maior produção de xilitol no processo de produção de inóculo sob menor disponibilidade de oxigénio e portanto essa vantagem pode ser passada para a fase de produção de xilitol.

A produção do inóculo seguiu os mesmos passos dos descritos no ponto 3.6.1 e 3.6.2, sendo a biomassa recolhida e centrifugada ao fim das 24 e 72 horas, correspondentes aos tempos onde se iniciou a fase de desaceleração, para o inóculo produzido em condições de aerobiose e aerobiose plena. De modo a iniciar as duas experiências com concentrações celulares semelhantes foram centrifugados diferentes volumes de caldo celular, o que (só) foi parcialmente conseguido.

Estes ensaios são feitos com hidrolisados concentrados, dado que este processo é favorecido por uma elevada concentração de xilose inicial [Carvalho *et al.*, 2007]. Para a produção de xilitol, foram mantidos os 80 mL de hidrolisado, contudo recorrendo condições de semi-aerobiose severa, de modo a restringir a disponibilidade de oxigénio.

A composição do hidrolisado utilizado encontra-se descrita no Quadro 18, recorrendo primeiramente ao acerto do pH pelas razões explicadas anteriormente. Tendo em conta que todo o processo de aclimação foi realizado sem destoxificar, a etapa de produção de xilitol também foi efetuada do mesmo modo com a finalidade de estudar a capacidade da estirpe CCMI 941 para converter a xilose em xilitol na presença de elevadas concentrações de ácido acético.

Paralelamente ensaiou-se também o efeito da suplementação, recorrendo à não-suplementação (adição de água no mesmo volume final dos restantes suplementos), suplementação com TEVM e YE  $3\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . O efeito da adição destes compostos foi testado por outros autores para hidrolisados de dreche cervejeira, sendo o YE considerado como um dos mais eficazes no aumento da produtividade e do rendimento em xilitol para a levedura em estudo, seguido pelo TEVM [Carvalho *et al.*, 2006]. Recorreram-se a  $3\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de YE por ter sido observado também em trabalhos anteriores produtividades e rendimentos em xilitol muito semelhantes aos obtidos quando se aumentou 2 vezes a concentração deste suplemento [Carvalho *et al.*, 2007], para a mesma matéria-prima.

Quadro 18 - Composição do hidrolisado após acerto de pH e concentração

Componentes	Concentração (g·L <sup>-1</sup> )
Glucose	5,37
Xilose	55,12
Arabinose	4,84
Ácido Fórmico	0,53
Ácido Acético	12,44
Ácido Levulínico	0,24
HMF	0,10
Furfural	0,00
Compostos fenólicos	2,38

Na Figura 21 encontram-se os perfis dos consumos dos substratos mais relevantes e da produção de polióis e de biomassa, ao longo do tempo de fermentação.

Relativamente aos substratos, para todos os ensaios e nas primeiras 7,5 horas verificou-se um consumo total de HMF. Para os meios não suplementados o consumo de glucose apresentou uma taxa mais elevada, o que explica o posterior consumo de xilose mais acentuado, comparativamente aos restantes meios testados. Contrariamente ao observado por Carvalheiro *et al* [2006], em que a suplementação assegurou um maior consumo de açúcares em hidrolisado de dreche cervejeira, para o hidrolisado de *A. Donax* L. esse efeito não foi aqui visível.

Para todos os perfis verificou-se um baixo consumo de ácido acético e a concentração de arabinose manteve-se praticamente inalterada. Este fato pode ser explicado por no final da experiência ainda existir xilose por consumir, não sendo possível parte da estirpe recorrer a outros substratos.

A produtividade em biomassa ( $Q_x$ ) para todas as situações atingiu valores abaixo de  $0,1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ , dadas as restritas condições de oxigenação do meio. Contudo, é importante focar que mesmo nestas condições verificou-se crescimento. Segundo Duarte *et al* [2005], para a mesma estirpe de *D. hansenii* não houve crescimento a concentrações de acético de  $9\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  quando a levedura é cultivada em meio quimicamente definido. Com a realização deste ensaio foi possível demonstrar que o processo de produção de inóculo permite também uma boa aclimação celular, uma vez que com mais  $3\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de ácido acético, verificou-se produção de biomassa e formação de xilitol, confirmado pela coluna *Sugar-Pak* [Duarte *et al.*, 2005].

De fato, ao iniciar-se a assimilação de xilose iniciou-se a produção de xilitol. Não se verificou produção de arabitól, dado não ter sido consumida arabinose e por as células não se encontrarem sob uma situação de *stress* osmótico, dado que este metabolito é preferencialmente produzido como soluto compatível [Nobre *et al.*, 1985].

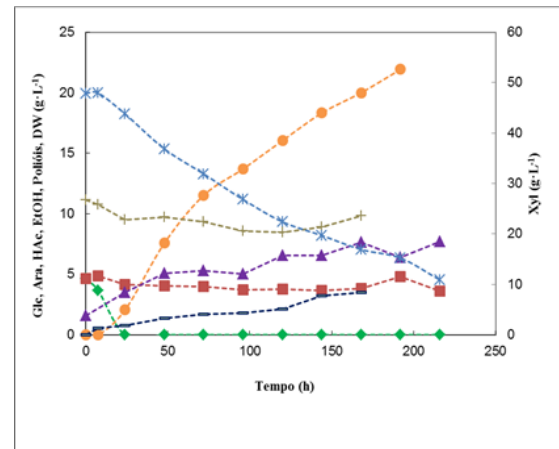
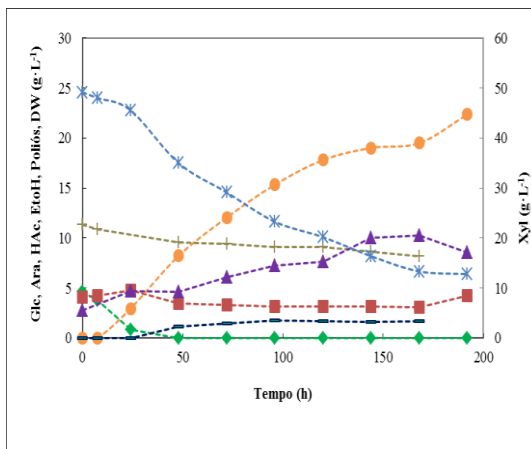
Produção de inóculo

Supl.

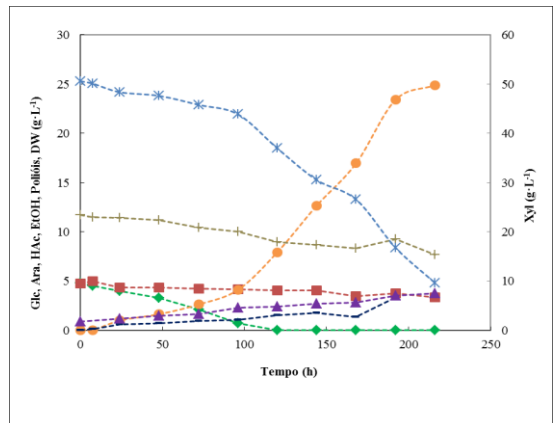
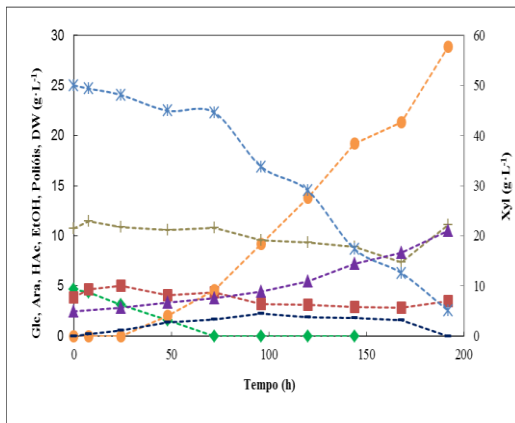
Inóculo produzido em condições de aerobiose

Inóculo produzido em condições de aerobiose plena

S/ Supl.



YE



TEVM

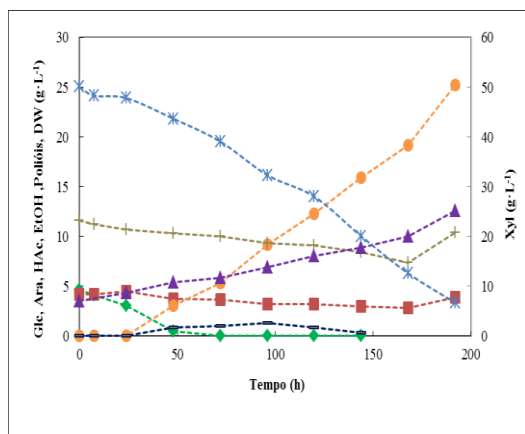


Figura 21 – Perfis de consumo de substrato, formação de biomassa e de produtos metabólicos para hidrolisado concentrado duas vezes com diferentes suplementações e forma de produção de inóculo. Glucose (♦) Xilose (\*); Arabinose (▲); Ácido Acético (+); Etanol (-), Polióis (●) Peso Seco DW (▲).

O efeito da suplementação e da produção de inóculo na produção de xilitol encontra-se resumido no Quadro 18. O efeito do TEVM em meio sob condições de aerobiose plena não foi estudado por apresentar menor rendimento em xilitol.

**Quadro 19 - Influência da suplementação e das diferentes produções de inóculo nos parâmetros cinéticos e estequiométricos para a produção de xilitol pela levedura *D. hansenii*.**

Condição do inóculo Parâmetro	Aerobiose			Aerobiose plena	
	S/suplementação	TEVM	YE	S/Suplementação	YE
$[xy1OH]_{\text{máx}}$ (g·L <sup>-1</sup> )	22,36	25,22	28,84	21,93	23,38
$Q_{xy1OH}$ (g·L <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> )	0,12	0,13	0,15	0,11	0,12
$Y_{xy1OH}$ (g·g <sup>-1</sup> )	0,61	0,58	0,64	0,67	0,65

Todos os parâmetros foram calculados às 192 horas.

Foi alcançada uma concentração máxima de xilitol de 28,84 g·L<sup>-1</sup> ao fim de 192 horas de crescimento, para o meio com YE recorrendo a condições de aerobiose. Obteve-se uma produtividade volumétrica ( $Q_{xy1OH}$ ) de 0,15 g·L<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup> e a um rendimento ( $Y_{xy1OH}$ ) de 0,64 g·g<sup>-1</sup>. Contudo, comparando este rendimento com o do ensaio obtido para as mesmas condições de oxigénio mas sem suplementação, verifica-se uma diferença de mais 5 %, que pode não justificar a necessidade de encarecer o processo com adição de YE. Os valores de produtividade volumétrica em xilitol para a estirpe CCMI 941 encontram-se dentro do intervalo de valores encontrado na bibliografia, para meios não destoxificados e concentrados de dreche cervejeira [Carvalho *et al.*, 2006]. Os valores de  $Y_{xy1OH}$  ultrapassaram mesmo os obtidos para a dreche cervejeira e o sorgo, o que indica uma potencial vantagem deste hidrolisado.

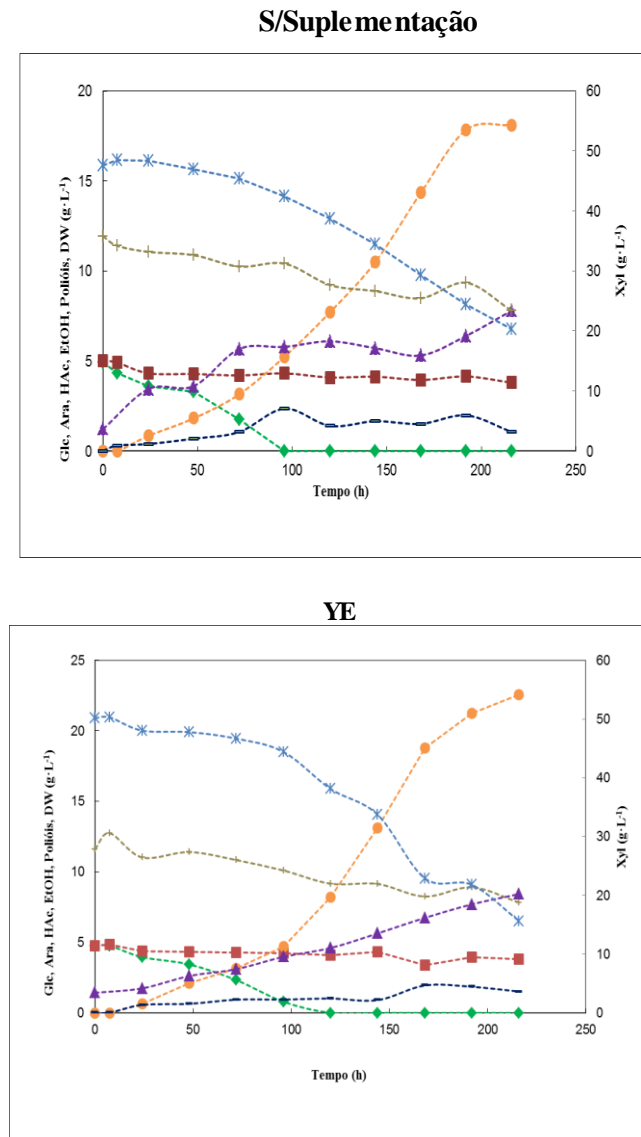
Ambos os ensaios realizado recorrendo inóculo produzido em condições de aerobiose plena, exibiram valores para  $Q_{xy1OH}$  mais baixos que os obtidos para as condições de aerobiose, contudo apresentaram melhores rendimentos em xilitol. Focando de novo a possível futura utilização deste método em reatores industriais, provavelmente as pequenas diferenças na produtividade volumétrica para estes ensaios não compensam as 48 horas a mais de funcionamento dos reatores de produção de inóculo, quando crescidos em condições com menos oxigénio.

Como conclusão, optar por utilizar uma produção de inóculo crescido sob condições de aerobiose plena, ou seja, em condições com maior disponibilidade de oxigénio, parece ser a melhor opção para obter maiores rendimentos em xilitol e poupar energia a nível industrial.

### 3.7.1 Produção de xilitol em meio duas vezes concentrado - Efeito da disponibilidade de oxigénio

Uma vez seleccionada melhor maneira de produzir inóculo (produção de inóculo em condições de aerobiose plena), foram comparados os ensaios de produção de xilitol acima descritos para essas mesmas condições com outros dois ensaios cultivados em condições de semi-aerobiose, de forma a ter

uma maior disponibilidade de oxigênio. O objetivo foi estudar qual o efeito da disponibilidade de oxigênio no processo a produção de xilitol. Foram comparados os mesmos parâmetros descritos no ponto acima. Na figura que se segue encontram-se os perfis para os mesmos compostos estudados acima.



**Figura 22 - Perfis de consumo de substrato, formação de biomassa e de produtos metabólicos para hidrolisado concentrado duas vezes e em condições de semi-aerobiose, para diferentes suplementações. Glucose (♦) Xilose (\*); Arabinose (■); Ácido Acético (+); Etanol (--), Polióis (●), Peso Seco DW (▲).**

O comportamento da estirpe CCMII 941 para este ensaio não variou consideravelmente quando comparado com os obtidos no ensaio do ponto 3.7.

Destaca-se porém, por observação dos gráficos, uma maior dificuldade no consumo de glucose para o meio não-suplementado deste ensaio, comparativamente ao ensaio anterior recorrendo a condições de semi-aerobiose severa. Por este fato, o consumo de xilose também ocorreu mais tarde assim como a produção de xilitol.

Não se verificou, também para este caso, produção de arabitol pelos mesmos motivos explicados acima.

**Quadro 20 - Efeito da disponibilidade de oxigênio nos parâmetros cinéticos e estequiométricos para a produção de xilitol para a levedura *D. hansenii*.**

Condição do inóculo Parâmetro	Aerobiose plena	
	S/Suplementação	YE
$[xy]_{OH}]_{m\acute{a}x}$ (g·L <sup>-1</sup> )	17,84	21,23
$Q_{xy}{}_{OH}$ (g·L <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> )	0,09	0,11
$Y_{xy}{}_{OH}$ (g·g <sup>-1</sup> )	0,77	0,75

Todos os outros parâmetros foram calculados às 192 horas.

Comparativamente aos ensaios, a concentração em xilitol às 192 horas foi relativamente mais baixa, contudo verificou-se um ligeiro aumento da concentração biomassa. Porém, é de salientar o elevado rendimento em xilitol obtido, tanto para meio suplementado como não suplementado. De fato, estes rendimentos são os maiores entre os descritos na literatura para esta levedura. Volta-se a levantar a questão de ser ou não necessário recorrer a suplementações dada a pouca diferença nos resultados do rendimento entre o meio suplementado com YE (suplemento caro) e não suplementado.

Relativamente à produtividade volumétrica, não se verificaram alterações nos seus valores, pelo que se torna agora necessário envidar esforços para maximizar este parâmetro, provavelmente alterando (aumentando) a concentração inicial de inóculo.

É de evidenciar a importância que o estudo do efeito das diferentes condições de operação, nomeadamente ao nível dos fatores bióticos pode contribuir para o aumento da eficiência do processo de produção de xilitol. O ponto-chave deste trabalho, comparativamente com outros, foi a produção de inóculo num só passo de aclimação, sem necessidade de qualquer destoxificação adicional para além da obtida no processo de concentração. Além disso, o efeito da suplementação não apresentou ter uma influência significativa na bioprodução de xilitol. A disponibilidade de oxigênio mostrou ser um dos fatores mais importantes e que deve ser estudado em maior profundidade.



## 4 Considerações finais e perspectivas

Os resultados apresentados ao longo deste trabalho levaram às seguintes conclusões:

- A biomassa de *Arundo donax* L. apresenta uma composição química muito favorável para a obtenção de hidrolisados ricos em pentose;
- Recorrendo a condições otimizadas de hidrólise foi possível fracionar seletivamente as hemiceluloses com uma recuperação elevada de monossacáridos e baixa concentração de inibidores;
- O efeito da granulometria, para os tamanhos de partículas estudados, não teve impacto significativo na composição química do material pré-tratado, nem dos hidrolisados;
- O acerto do pH, necessário para elevar o pH do hidrolisado para valores compatíveis com o crescimento microbiano, feito após a concentração do hidrolisado promove uma remoção significativa de ácido acético, comparativamente à estratégia de se proceder ao acerto de pH antes do processo de concentração. No entanto, para esta última estratégia, não ocorrem perdas significativas de volume de hidrolisado e consequentemente de açúcares fermentescíveis;
- A espécie *D. hansenii* apresenta uma grande variabilidade intraespecífica relativamente ao metabolismo da xilose;
- A estirpe CCMI 493 não se demonstrou apta para a bioconversão de xilitol recorrendo às condições de aclimação em estudo, pois não apresenta assimilação significativa de xilose, exceto quando cultivada na presença de concentrações superiores de glucose;
- A estirpe CCMI 496 apresentou uma produtividade celular menor que a CCMI 941 quando submetida a hidrolisado suplementado com TEVM e a diferentes concentrações de pré-inóculo, sendo excluída de trabalhos posteriores.
- A estirpe CCMI 941 mostrou ser a que melhor se aclimatizou às diferentes condições estudadas, sendo apenas necessário concentrações celulares iniciais superiores a  $0,15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  para obter uma significativa produção de biomassa, sem recorrer a pré-inóculos;
- A disponibilidade de oxigénio mostrou ter impacto na fase de produção de inóculo, obtendo-se para meios de aerobiose plena maior produtividade celular, e para meios de aerobiose maior produção de xilitol. Logo, considerou-se interessante estudar o efeito destas duas formas de produzir inóculo na bioconversão de xilose a xilitol em meios concentrados;

- Para a estirpe CCMI 941 foi possível observar a bioconversão de xilose em xilitol no meio concentrado, que apresentou relativamente elevadas concentrações de ácido acético, independentemente da forma de produção de inóculo, provavelmente por este ter sido aclimatizado.
- A produção de xilitol apresentou um maior rendimento e também uma maior produtividade global do processo (tendo em conta a duração das fases de produção de inóculo e de xilitol), quando se utilizou o inóculo produzido em condições semi-aeróbias;
- Suplementando o hidrolisado YE obteve-se um menor rendimento comparativamente ao meio não suplementado. Logo, a suplementação mostrou ter uma influência pouco significativa na bioprodução de xilitol, para as condições em estudo.

Para complementar os estudos realizados, e dando continuidade ao desenvolvimento do processo biotecnológico de produção de xilitol por *D. hansenii* em hidrolisado de *A. donax*, seria importante estudar num futuro próximo e em maior detalhe os seguintes aspetos:

- Avaliar a produção de xilitol em hidrolisado primeiramente concentrado duas vezes e posteriormente acertado, pois este não apresentaria uma tão elevada toxicidade. No entanto, isto requer o desenvolvimento de um processo mais eficiente de recuperação do hidrolisado após o acerto de pH (por exemplo pela utilização de processos de centrifugação ou a utilização), o que também se teria de otimizar.
- Explorar a vantagem competitiva que a levedura *D. hansenii* apresenta relativamente à gama de pH em que pode crescer. Dados do nosso laboratório demonstram que esta levedura tolera facilmente valores de pH próximos de 8, o que permitiria baixar o efeito tóxico da concentração da forma não-dissociada do ácido acético.
- Estudar em profundidade o efeito da disponibilidade de oxigénio na produção de biomassa neste hidrolisado;

E principalmente,

- Estudar em profundidade o efeito da disponibilidade de oxigénio na produção de xilitol, pois os nossos dados demonstram claramente que uma limitação excessiva de oxigénio não é benéfica para o processo.

Estes dois últimos pontos implicam que se determine quantitativamente a disponibilidade de oxigénio em cada condição.

## 5 Referências bibliográficas

- Aden, A.; Ruth, M.; Ibsen, K.; Jechura, J.; Neeves, K.; Sheehan, J.** 2002. Lignocellulosic biomass to ethanol process design and economics utilizing co-current dilute acid prehydrolysis and enzymatic hydrolysis for corn stover. NREL, Denver, Co.
- Aguiar, A.; Ferraz, A.** 2011. Mechanisms involved in the biodegradation of lignocellulosic materials and related technological applications. *Química Nova*. **34**:1729-1738.
- Aguiar, C.L.; Menezes, T.J.B.** 1999. Caracterização e aplicações do xilitol na indústria alimentícia.
- Amaral-Collaco, M.T.; Gírio, F.M.; Peito, M.A.** 1989. Utilization of the hemicellulosic fraction of agro-industrial residues by yeasts. in Coughlan, M.P. (ed.), Enzyme systems for lignocellulosic degradation. Elsevier Applied Science, London. p. 221-230.
- Amartey, S.; Jeffries, T.W.** 1994. Comparison of corn steep liquor with other nutrients in the fermentation of D-xylose by *Pichia stipitis* CBS 6054. *Biotechnology Letters*. **16**:211-214.
- Arantes, V.; Saddler, J.N.** 2010. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. *Biotechnol Biofuels*. **3**.
- Arfi, K.; Spinnler, H.E.; Tache, R.; Bonnarme, P.** 2002. Production of volatile compounds by cheese-ripening yeasts: requirement for a methanethiol donor for S-methyl thioacetate synthesis by *Kluyveromyces lactis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **58**:503-510.
- Arruda, P.; Rodrigues, R.; Souza, H.; Silva, J.; Felipe, M.** 1994. Influência do glicerol na fermentação do hidrolisado de Bagaço de cana por *Candida Guilliermondii*.
- Balat, M.** 2010. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy Conversion and Management*. **52**:858-875.
- Ballesteros, I.; Oliva, J.M.; Navarro, A.A.; Gonzalez, A.; Carrasco, J.; Ballesteros, M.** 2000. Effect of chip size on steam explosion pretreatment of softwood. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. **84**:97-110.
- Ballesteros, I.; Oliva, J.M.; Negro, M.J.; Manzanares, P.; Ballesteros, M.** 2002. Enzymic hydrolysis of steam exploded herbaceous agricultural waste (*Brassica carinata*) at different particule sizes. *Process Biochemistry*. **38**:187-192.
- Barlow, S.; Chesson, A.; Collins, J.D.; Dybing, E.; Flynn, A.; Frujtier-Pöloth, C.** 2007. Introduction of a qualified presumption of safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA. *Opinion of the Scientific Committee. EFSA J.* **587**:1-16.
- Barnett, J.A.; Payne, R.W.; Yarrow, D.** 2000. Yeasts: Characteristics and identification. Cambridge University Press, Cambridge.
- Baronian, K.H.R.** 2004. The use of yeast and moulds as sensing elements in biosensors. *Biosensors and bioelectronics*. **19**:953-962.
- 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.

- Beynon, R.J.** 1993. Postgraduate study in the biological sciences - A researcher's companion. Portland Press, London.
- Boose, A.B.; Holt, J.S.** 1999. Environmental effects on asexual reproduction in *Arundo donax*. *Weed Research*. **39**:117-127.
- Breuer, U.; Harms, H.** 2006. *Debaryomyces hansenii*- an extremophilic yeast with biotechnological potential. *Yeast*. **23**:415-437.
- Brownell, H.H.; Yu, E.K.C.; Saddler, J.N.** 1986. Steam explosion pretreatment of wood: Effect of chip size, acid, moisture content and pressure drop. *Biotechnology and Bioengineering*. **28**:792-801.
- Buzetzk, E.; Sidorová, K.; Cvangrosová, Z.; Cvangros, J.** 2011. Catalytic role of lignocellulosic materials in triacylglycerol cracking. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*.
- Camacho, F.; Gonzalez-Tello, P.; Jurado, E.; Robles, A.** 1996. Microcrystalline-cellulose hydrolysis with concentrated sulphuric acid. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. **67**:350-356.
- Canilha, L.; Carvalho, W.; Silva, J.B.A.** 2005. Influence of medium composition on xylitol bioproduction from wheat straw hemicellulosic hydrolysate. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. **21**:1087-1093.
- Cann, M.C.; Connelly, M.E.** 2000. Real-world cases in green chemistry. American Chemical Society.
- Carvalho, F.** 2005. Obtenção, caracterização e aplicação biotecnológica de licores de oligossacáridos de dreche cervejeira. Instituto Superior de Agronomia. Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.
- Carvalho, F.; Duarte, L.C.; Gírio, F.M.** 2008. Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments. *Journal of Scientific & Industrial Research*. **67**:849-864.
- Carvalho, F.; Duarte, L.C.; 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* CCMI 941. *Process Biochemistry*. **40**:1215-1223.
- Carvalho, F.; Duarte, L.C.; Lopes, S.; Parajó, J.C.; Pereira, H.; Gírio, F.M.** 2006. Supplementation requirements of brewery's spent grain hydrolysate for biomass and xylitol production by *Debaryomyces hansenii* CCMI 941. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. **33**:646-654.
- Carvalho, F.; Duarte, L.C.; Medeiros, R.; Gírio, F.M.** 2004. Optimization of brewery's spent grain dilute-acid hydrolysis for the production of pentose-rich culture media. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. **113-116**:1059-1072.
- Carvalho, F.; Duarte, L.C.; Medeiros, R.; Gírio, F.M.** 2007. Xylitol production by *Debaryomyces hansenii* in brewery spent grain dilute-acid hydrolysate: effect of supplementation. *Biotechnology Letters*. **29**:1887-1891.
- Chang, V.S.; Holtzapple, M.T.** 2000. Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. **84**:5-37.

- 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**:1-14.
- Chung, I.S.; Lee, Y.Y.** 1985. Ethanol fermentation of crude acid hydrolyzate of cellulose using high-level yeast inocula. *Biotechnology and Bioengineering*. **27**:308-315.
- Coelho, D.S.C.** 2005. Estudo sistemático da composição química das fibras de *Arundo donax* e a sua evolução durante a produção de pasta de papel através do processo organosolv. Universidade de Aveiro, Aveiro.
- Converti, A.; Perego, P.; Domínguez, J.M.** 1999. Xylitol production from hardwood hemicellulose hydrolysates by *Pachysolen tannophilus*, *Debaryomyces hansenii*, and *Candida guilliermondii*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. **82**:141-151.
- Converti, A.; Perego, P.; Sordi, A.; Torre, P.** 2002. Effect of starting xylose concentration on the microaerobic metabolism of *Debaryomyces hansenii*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*.
- Cruz, J.M.; Domínguez, J.M.; Domínguez, H.; Parajó, J.C.** 2000. Preparation of fermentation media from agricultural wastes and their bioconversion into xylitol. *Food Biotechnology*. **14**:79-97.
- Csurhes, S.** 2009. Giant reed (*Arundo donax*). Queensland Government, Brisbane.
- Domínguez, E.** 2008. Sistema HACCP: implementação do sistema de autocontrolo num catering de aviação.
- Domínguez, J.M.; Gong, C.S.; Tsao, G.T.** 1997. Production of Xylitol from D-Xylose by *Debaryomyces hansenii*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. **63**:117-127.
- Duarte, L.C.; Carvalheiro, 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*. **130**:461-475.
- Duarte, L.C.; Carvalheiro, F.; Lopes, S.; Marques, S.; Parajó, J.C.; Gírio, F.M.** 2004. Comparison of two posthydrolysis processes of brewery's spent grain autohydrolysis liquor to produce a pentose-containing culture medium. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. **113-116**:1041-1058.
- Duarte, L.C.; Carvalheiro, F.; Lopes, S.; Neves, I.; Gírio, F.M.** 2008. Yeast biomass production in brewery's spent grains hemicellulosic hydrolyzate. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. **148**:119-129.
- Duarte, L.C.; Carvalheiro, F.; Neves, I.; Gírio, F.M.** 2005. Effects of aliphatic acids, furfural, and phenolic compounds on *Debaryomyces hansenii* CCMII 941. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. **121**:413-425.
- Duarte, L.C.; Massano, R.; Gírio, F.M.; Amaral-Collaço, M.T.** 1996. Engenharia Metabólica do metabolismo da D-xilose em *Debaryomyces hansenii*. in Fernández-Polanco, F.; Benito, G.G.; Encina, P.A.G.; Miranda, M.M.P. (eds.), Universidad Valladolid, Valladolid. p. 77-80.
- Durá, M.; Flores, M.; Toldrá, F.** 2004. Effect of growth phase and dry-cured sausage processing conditions on *Debaryomyces* spp. generation of volatile compounds from branched-chain amino acids. *Food Chemistry*. **86**:391-399.

**Ebringerová, A.; Hromadková, Z.; Heinze, T.** 2005. Hemicellulose. *Polysaccharides* 11-67.

**Emodi, A.** 1978. Xylitol: its properties and food applications. *Food Technol.* **32**:28-32.

**Felipe, M.G.A.; Vieira, D.C.; Vitolo, M.; Silva, S.S.; Roberto, I.C.; Manchilha, I.M.** 1995. Effect of acetic acid on xylose fermentation to xylitol by *Candida guilliermondii*. *Journal of Basic Microbiology.* **35**:171-177.

**Felipe, M.G.A.; Vitolo, M.; Mancilha, I.M.** 1996. Xylitol formation by *Candida guilliermondii* grown in a cane bagasse hemicellulosic hydrolysate: Effect of aeration and inoculum adaptation. *Acta Biotechnologica.* **16**:73-79.

**Fengel, D.; Wegener, G.** 1984. Wood. Chemistry, ultrastructure, reactions. Walter de Gruyter: Berlin & New York. 613pp. Chaps. include: structure and ultrastructure.

**FitzPatrick, M.; Champagne, P.; Cunningham, M.F.; Whitney, R.A.** 2010. A biorefinery processing perspective: Treatment of lignocellulosic materials for the production of value-added products. *Bioresource Technology.* **101**:8915-8922.

**Frandsen, P.; Jackson, N.** 1994. The impact of *Arundo donax* on flood control and endangered species. in Jackson, N.; et al (eds.), *Arundo donax* workshop.

**Freire, C.S.R.** 2003. *Eucalyptus globulus* low molecular weight organic compounds: behaviour during wood kraft pulping and pulp bleaching. *Aveiro, Portugal.*

**Galbe, M.; Zacchi, G.** 2002. A review of the production of ethanol from softwood. *Applied Microbiology and Biotechnology.* **59**:618-628.

**Gámez, S.; Gonzalez-Cabriales, J.J.; Ramirez, J.A.; Garrote, G.; Vazquez, M.** 2006. Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid. *Journal of Food Engineering.* **74**:78-88.

**Gírio, F.M.; Amaro, C.; Azinheira, H.; Pelica, F.; Amaral-Collaco, M.T.** 2000. Polyols production during single and mixed substrate fermentations in *Debaryomyces hansenii*. *Bioresource Technology.* **71**:245-251.

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

**Gravitis, J. Suzuki, M.** 1999. Biomass refinery - A way to produce value added products and base for agricultural Zero Emissions System. *Proc. 99 Intern. Conference on Agric. Engineering, Beijing, China.* Citeseer.

**Gücel, S.** 2010. *Arundo donax* L.( Giant reed) use by Turkish Cypriots. *Ethnobotany.* **8.**

**Huang, C.F.; Jiang, Y.F.; Guo, G.L.; Hwang, W.S.** 2011. Development of a yeast strain for xylitol production without hydrolysate detoxification as part of the integration of co-product generation within the lignocellulosic ethanol process. *Bioresource Technology.* **102**:3322-3329.

**Huber, G.W.; Iborra, S.; Corma, A.** 2006. Synthesis of transportation fuels from biomass: chemistry, catalysts, and engineering. *Chemical Reviews.* **106**:4044-4098.

**Hurter, A.M.** 1988. Utilization of annual plants and agricultural residues for the production of pulp and paper. *Proceedings TAPPI pulping conference.*

- Hyvönen, L.; Koivistoinen, P.,& Voirol,F.** 1982. Food technological evaluation of xylitol. *Advances Food Research* **28**, 373-403.
- Johnson, M.; Dudley, T.; Burns, C.** 2006. Seed production in *Arundo donax*. *Cal-IPC News*. **14**:12-13.
- Karimi, K.; Kheradmandinia, S.; Taherzadeh, M.J.** 2006. Conversion of rice straw to sugars by dilute-acid hydrolysis. *Biomass & Bioenergy*. **30**:247-253.
- Keller, F.A.; Hamilton, J.E.; Nguyen, Q.A.** 2003. Microbial pretreatment of biomass. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. **105**:27-41.
- Khanal, S.K.; Surampalli, R.Y.; Zhang, T.C.; Lamsal, B.P.; Tyagi, R.D.** 2010. Bioenergy and biofuel from biowastes and biomass. Amer Society of Civil Engineers.
- Kim, J.H.; Ryu, Y.W.; Seo, J.H.** 1999. Analysis and optimization of a two-substrate fermentation for xylitol production using *Candida tropicalis*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. **22**:181-186.
- Kim, S.B.; Lee, Y.Y.** 2002. Diffusion of sulfuric acid within lignocellulosic biomass particles and its impact on dilute-acid pretreatment. *Bioresource Technology*. **83**:165-171.
- Kuhad, R.C.; Singh, A.** 1993. Lignocellulose Biotechnology - Current and Future-Prospects. *Critical Reviews in Biotechnology*. **13**:151-172.
- Kuhn, A.; van Zyl, C.; van Tonder, A.; Prior, B.A.** 1995. Purification and partial characterization of an aldo-keto reductase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*. **61**:1580-1585.
- Kumar, R.; Singh, S.; Singh, O.V.** 2008. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. **35**:377-391.
- Kurtzman, C.P.** 2011. The yeasts: a taxonomic study. Elsevier Science Ltd.
- Larsson, S.; Palmqvist, E.; Hahn-Hägerdal, B.; Tengborg, C.; Stenberg, K.; Zacchi, G.; Nilvebrant, N.O.** 1999. The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. *Enzyme and Microbial Technology*. **24**:151-159.
- Lewandowski, I.; Scurlock, J.M.O.; Lindvall, E.; Christou, M.** 2003. The development and current status of perennial rhizomatous grasses as energy crops in the US and Europe. *Biomass and Bioenergy*. **25**:335-361.
- Lima, L.H.A.; Berlinck, C.N.** 2003. Xilitol, o adoçante do futuro. *Ciência Hoje*. **33**:66-69.
- Lloyd, D.** 2000. Yeasts Characteristics and Identification. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*. **47**:598.
- Mäkinen, K.K.; Olak, J.; Russak, S.; Saag, M.; Seedre, T.; Vasar, R.; Vihalemm, T.; Mikelsaar, M.; Mäkinen, P.L.** 1998. Polyol-combinant saliva stimulants: a 4-month pilot study in young adults. *Acta Odontologica*. **56**:90-94.
- Meyrial, V.; Delgenes, J.P.; Moletta, R.; Navarro, J.M.** 1991. Xylitol production from D-xylose by *Candida guilliermondii*: Fermentation behaviour. *Biotechnology Letters*. **13**:281-286.
- Michel, Â. C. S.** 2007. Produção biotecnológica de xilitol e etanol a partir de hidrolisado de casca de soja.

- Mirza, N.; Mahmood, Q.; Pervez, A.; Ahmad, R.; Farooq, R.; Shah, M.M.; Azim, M.R.** 2010. Phytoremediation potential of *Arundo donax* in arsenic-contaminated synthetic wastewater. *Bioresource Technology*. **101**:5815-5819.
- Morais, S.A.L.; Nascimento, E.A.; Melo, D.C.** 2005. Chemical analysis of *Pinus oocarpa* wood part I: quantification of macromolecular components and volatile extractives. *Revista árvore*. **29**:461-470.
- Mosier, N.; Wyman, C.; Dale, B.; Elander, R.; Lee, Y.Y.; Holtzapple, M.; Ladisch, M.** 2005. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*. **96**:673-686.
- 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.
- Moxley, G.; Zhu, Z.; Zhang, Y.H.P.** 2008. Efficient sugar release by the cellulose solvent-based lignocellulose fractionation technology and enzymatic cellulose hydrolysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **56**:7885-7890.
- Mussatto, S.I.; Roberto, I.C.** 2002. Xilitol: Edulcorante com efeitos benéficos para a saúde humana. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. **38**.
- Mussatto, S.I.; Roberto, I.C.** 2004. Kinetic behavior of *Candida guilliermondii* yeast during xylitol production from highly concentrated hydrolysate. *Process Biochemistry*. **39**:1433-1439.
- Nag, A.** 2008. Biofuels refining and performance. *NICE (News & Information for Chemical Engineers)*. **26**:165.
- Nakakuki, T.** 2003. Development of functional oligosaccharides in Japan. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*. **15**:57-64.
- Nakase, T.; Suzuki, M.** 1985a. Taxonomic studies on *Debaryomyces hansenii* (Zopf) Lodder et Kreger-van Rij and related species. I. Chemotaxonomic Investigations. *Journal of General and Applied Microbiology*. **31**:49-69.
- Nakase, T.; Suzuki, M.** 1985b. 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.
- Neto, C.P.; Seca, A.; Nunes, A.M.; Coimbra, M.A.; Domingues, F.; Evtuguin, D.; Silvestre, A.; Cavaleiro, J.A.S.** 1997. Variations in chemical composition and structure of macromolecular components in different morphological regions and maturity stages of *Arundo donax*. *Industrial Crops and Products*. **6**:51-58.
- Nobre, A.** 2003. Abordagem multidisciplinar ao estudo da utilização de substratos simples e substratos mistos por *Debaryomyces hansenii*. Ph.D. thesis Universidade do Minho.
- Nobre, A.; Duarte, L.C.; Roseiro, J.C.; Gírio, F.M.** 2002. A physiological and enzymatic study of *Debaryomyces hansenii* growth on xylose- and oxygen-limited chemostats. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **59**:509-516.
- Nobre, A.; Lucas, C.; Leão, C.** 1999. Transport and utilization of hexoses and pentoses in the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Applied and Environmental Microbiology*. **65**:3594-3598.

- Nobre, M.F.; da Costa, M.S.** 1985. Factors favouring the accumulation of arabinitol in the yeast *Debaryomyces hansenii*. *Canadian Journal of Microbiology*. **31**:467-471.
- Nolleau, V.; Preziosi-Belloy, L.; Delgenes, J.P.; Navarro, J.M.** 1993. Xylitol production from xylose by two yeast strains: sugar tolerance. *Current Microbiology*. **27**:191-197.
- Nolleau, V.; Preziosi-Belloy, L.; Navarro, J.M.** 1995. The reduction of xylose to xylitol by *Candida guilliermondii* and *Candida parapsilosis*: Incidence of oxygen and pH. *Biotechnology Letters*. **17**:417-422.
- Northey, R.A.; Glasser, W.G.; Schultz, T.P.; American Chemical Society. Cellulose, P.a.T.D.; American Chemical Society.** 2000. Lignin: historical, biological, and materials perspectives. American Chemical Society.
- Nunes, P.S.** 2009. Panorama actual da Energia Nuclear. *Ingenium*.
- Odonmmazig, P.; Badga, D.; Ebringerová, A.; Alföldi, J.** 1992. Structures of pectic polysaccharides isolated from the Siberian apricot (*Armeniaca siberica* Lam.). *Carbohydrate Research*. **226**:353-358.
- Oliva, J.M.; Sáez, F.; Ballesteros, I.; González, A.; Negro, M.J.; Manzanares, P.; Ballesteros, M.** 2003. Effect of lignocellulosic degradation compounds from steam explosion pretreatment on ethanol fermentation by thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. **105**:141-153.
- Palladino, F.; Silva, D.D.V.; Felipe, M.G.A.** 2003. Avaliação do efeito da relação xilose/xilitol na fermentação de xilose em xilitol por *Candida guilliermondii*. *XIV Simpósio Nacional de Fermentações*.
- Palmqvist, E.; Hahn-Hägerdal, B.** 2000. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology*. **74**:25-33.
- Papazoglou, E.G.; Karantounias, G.A.; Vemmos, S.N.; Bouranis, D.L.** 2005. Photosynthesis and growth responses of giant reed (*Arundo donax* L.) to the heavy metals Cd and Ni. *Environment International*. **31**:243-249.
- Parajó, J.C.; Domínguez, H.; Domínguez, J.M.** 1995. Production of xylitol from raw wood hydrolysates by *Debaryomyces hansenii* NRRL Y-7426. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. **13**:125-131.
- Parajó, J.C.; Domínguez, H.; Domínguez, J.M.** 1996. Production of xylitol from concentrated wood hydrolysates by *Debaryomyces hansenii*: effect of the initial cell concentration. *Biotechnology Letters*. **18**:593-598.
- Parajó, J.C.; Domínguez, H.; Domínguez, J.M.** 1997. Improved xylitol production with *Debaryomyces hansenii* Y-7426 from raw or detoxified wood hydrolysates. *Enzyme and Microbial Technology*. **21**:18-24.
- Parajó, J.C.; Domínguez, H.; Domínguez, J.M.** 1998a. Biotechnological production of xylitol. Part 1: Interest of xylitol and fundamentals of its biosynthesis. *Bioresource Technology*. **65**:191-201.
- Parajó, J.C.; Domínguez, H.; Domínguez, J.M.** 1998b. Biotechnological production of xylitol. Part 2: Operation in culture media made with commercial sugars. *Bioresource Technology*. **65**:203-212.

- Parajó, J.C.; Domínguez, H.; Domínguez, J.M.** 1998c. Biotechnological production of xylitol. Part 3: Operation in culture media made from lignocellulose hydrolysates. *Bioresource Technology*. **66**:25-40.
- Pepper, T.; Olinger, P.M.** 1988. Xylitol in sugar-free confections. *Food Technology*. **42**.
- Pereira, C.A.G.** 2004. Elaboração e caracterização de compósitos. Cimento - material lenhocelulósico de origem portuguesa. Universidade de Aveiro, Aveiro.
- Pereira, H.; Graça, J.; Rodrigues, J.C.** 2003. Wood chemistry in relation to quality. In: Wood quality and its biological basis. Oxford.
- Pessoa, A.; Mancilha, I.M.; Sato, S.** 1996. Cultivation of *Candida tropicalis* in sugar cane hemicellulosic hydrolyzate for microbial protein production. *Journal of Biotechnology*. **51**:83-88.
- Pilu, R.; Bucii, A.; Badone, F.C.; Landoni, M.** 2012. Giant reed (*Arundo donax* L.): A weed plant or a promising energy crop? *African Journal of Biothechnology*. **11**.
- Prakasham, R.S.; Sreenivas Rao, R.; Hobbs, P.J.** 2009. Current trends in biotechnological production of xylitol and future prospects. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*. **3**.
- Quinn, L.D.; Holt, J.S.** 2008. Ecological correlates of invasion by *Arundo donax* in three southern California riparian habitats. *Biological Invasions*. **10**:591-601.
- Ramos, L.P.** 2003. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. *Química Nova*. **26**:863-871.
- Rivas, B.; Moldes, A.B.; Domínguez, J.M.; Parajó, J.C.** 2004. Development of culture media containing spent yeast cells of *Debaryomyces hansenii* and corn steep liquor for lactic acid production with *Lactobacillus rhamnosus*. *International Journal of Food Microbiology*. **97**:93-98.
- Rodrigues, N.; Goncalves, G.; Pereira-da-Silva, S.; Malfeito-Ferreira, M.; Loureiro, V.** 2001. Development and use of a new medium to detect yeasts of the genera *Dekkera/Brettanomyces*. *Journal of Applied Microbiology*. **90**:588-599.
- Roseiro, J.C.; Peito, M.A.; Gírio, F.M.; Amaral-Collaco, M.T.** 1991. The effects of the oxygen transfer coefficient and substrate concentration on the xylose fermentation by *Debaryomyces hansenii*. *Archives of Microbiology*. **156**:484-490.
- Roseiro, L.B.; Gomez-Ruiz, J.A.; Garcia-Risco, M.; Molina, E.** 2003. Vegetable coagulant (*Cynara cardunculus*) use evidenced by capillary electrophoresis permits PDO Serpa cheese authentication. *Lait*. **83**:343-350.
- Rossa, B.; Tuffers, A.V.; Naidoo, G.; von Willert, D.J.** 1998. *Arundo donax* L. (*Poaceae*) - a C-3 species with unusually high photosynthetic capacity. *Botanica Acta*. **111**:216-221.
- Rowell, R.M.** 1992. Opportunities for lignocellulosic materials and composites. **476**:12-27. ACS Publications.
- Saião, M. G. C. M.** 2009. Implementação de uma central de biomassa. Análise de sustentabilidade ambiental e económica.
- Salgado, J.M.; Rodríguez, N.; Cortés, S.; Domínguez, J.M.** 2012. Effect of Nutrient Supplementation of Crude or Detoxified Concentrated Distilled grape marc hemicellulosic

- Hydrolysates on the xylitol production by *Debaryomyces hansenii*. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*. **42**:1-14.
- Sampaio, F.C.; de Moraes, C.A.; De Faveri, D.; Perego, P.; Converti, A.; Passos, F.M.L.** 2006. Influence of temperature and pH on xylitol production from xylose by *Debaryomyces hansenii* UFV-170. *Process Biochemistry*. **41**:675-681.
- Sampaio, F.C.; Torre, P.; Passos, F.M.L.; Perego, P.; Passos, F.J.V.; Converti, A.** 2004. Xylose metabolism in *Debaryomyces hansenii* UFV-170. Effect of the specific oxygen uptake rate. *Biotechnology Progress*. **20**:1641-1650.
- Sánchez, C.** 2009. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*. **27**:185-194.
- Santos, J.M.C.F.** 2009. Avaliação da biomassa de plantas bioenergéticas. Instituto Superior de Agronomia. Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.
- Santos, J.L.; Fernandes, M.C.; Lourenço, P.M.L.; Duarte, L.C.; Carvalheiro, F.; Crespo, J.G.** 2011. Removal of inhibitory compounds from olive stone auto-hydrolysis liquors by nanofiltration. *Desalination and Water Treatment*. **27**:90-96.
- Saulnier, L.; Marot, C.; Chanliaud, E.; Thibault, J.F.** 1995. Cell wall polysaccharide interactions in maize bran. *Carbohydrate Polymers*. **26**:279-287.
- Scordia, D.; Cosentino, S.; Lee, J.W.; Jeffries, T.W.** 2012. Bioconversion of giant reed (*Arundo donax* L.) hemicellulose hydrolysate to ethanol by *Scheffersomyces stipitis* CBS6054. *Biomass and Bioenergy*. **In press**.
- Scordia, D.; Cosentino, S.L.; Lee, J.W.; Jeffries, T.W.** 2011. Dilute oxalic acid pretreatment for biorefining giant reed (*Arundo donax* L.). *Biomass and Bioenergy*. **35**:3018-3024.
- Seca, A.M.; Cavaleiro, J.A.S.; Domingues, F.M.J.; Silvestre, A.J.D.; Evtuguin, D.; Neto, C.P.** 2000. Structural characterization of the lignin from the nodes and internodes of *Arundo donax* reed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **48**:817-824.
- Sedlmeyer, F.B.** 2011. Xylan as by-product of biorefineries: Characteristics and potential usfor food applications. *Food Hydrocolloids*. **25**:1891-1898.
- Sene, L.; Felipe, M.G.A.; Vitolo, M.; Silva, S.S.; Mancilha, I.M.** 1998. Adaptation and reutilization of *Candida guilliermondii* cells for xylitol production in bagasse hydrolysate. *Journal of Basic Microbiology*. **38**:61-69.
- Shatalov, A.A.; Pereira, H.** 2002. Influence of stem morphology on pulp and paper properties of *Arundo donax* L. reed. *Industrial Crops and Products*. **15**:77-83.
- Shatalov, A.A.; Pereira, H.** 2011. Xylose production from giant reed (*Arundo donax* L.): Modeling and optimization of dilute acid hydrolysis. *Carbohydrate Polymers*.
- Sheldon, R.A.** 2011. Utilisation of biomass for sustainable fuels and chemicals : Molecules , methods and metrics . Catalysis Today.
- Silva, N.L.C.** 2010. Produção de etanol de segunda geração a partir de biomassa residual da indústria de celulose. Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro.

**Silva, S.S.; Felipe, M.G.A.; Mancilha, I.M.** 1998. Factors that affect the biosynthesis of xylitol by xylose-fermenting yeasts. A review. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. **70-72**:331-339.

**Silva, S.S.; Quesada-Chanto, A.; Vitolo, M.** 1997. Upstream parameters affecting the cell growth and xylitol production by *Candida guilliermondii* FTI 20037. *Zeitschrift fur Naturforschung. C, Journal of biosciences*. **52**:359.

**Silva, S.S.; Roberto, I.C.; Felipe, M.G.A.; Mancilha, I.M.** 1996. Batch fermentation of xylose for xylitol production in stirred tank bioreactor. *Process Biochemistry*. **31**:549-553.

**Silva-Fernandes, T.; Duarte, L.C.; Almeida, S.; Carneiro, F.; Gírio, F.M.** 2008 Identification of the most relevant factors affecting xylitol production by *Debaryomyces hansenii* from wheat straw hydrolysates. Proceedings of the "Bioenergy: Challenges and Opportunities - International Conference and Exhibition on Bioenergy". **II**:179-184. Guimarães, Portugal, Universidade do Minho.

**Silverstein, R.A.; Chen, Y.; Sharma-Shivappa, R.R.; Boyette, M.D.; Osborne, J.** 2007. A comparison of chemical pretreatment methods for improving saccharification of cotton stalks. *Bioresource Technology*. **98**:3000-3011.

**Singh, A.; Das, K.; Sharma, D.K.** 1984. Production of xylose, furfural, fermentable sugars and ethanol from agricultural residues. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology. Chemical Technology*. **34**:51-61.

**Singleton, V.L.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventos, R.M.** 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Oxidants and Antioxidants, Pt A*. **299**:152-178.

**Singleton, V.L.; Rossi, J.A.Jr.** 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*. **16**:144-158.  
**Soffner, M. L. A. P.** 2001. Produção de polpa celulósica a partir de engaço de bananeira.

**Stephen, A.M.** 1983. The Polyssaccharides. Academic Press, New York.

**Strauss, M.L.A.; Jolly, N.P.; Lambrechts, M.G.; Van Rensburg, P.** 2001. Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-*Saccharomyces* wine yeasts. *Journal of Applied Microbiology*. **91**:182-190.

**Sun, Y.; Cheng, J.** 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*. **83**:1-11.

**Sun, Y.; Cheng, J.J.** 2005. Dilute acid pretreatment of rye straw and bermudagrass for ethanol production. *Bioresource Technology*. **96**:1599-1606.

**Taherzadeh, M.J.; Karimi, K.** 2008. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. *International Journal of Molecular Sciences*. **9**:1621-1651.

**Tamanini, C.; Haully, M.C.O.** 2009. Resíduos agroindustriais para produção biotecnológica de xilitol. *Semina: Ciências Agrárias*. **25**:315-330.

**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.

- Téllez-Luis, S.J.; Ramírez, J.A.; Vázquez, M.** 2002a. Mathematical modelling of hemicellulosic sugar production from sorghum straw. *Journal of Food Engineering*. **52**:285-291.
- Téllez-Luis, S.J.; Ramírez, J.A.; Vázquez, M.** 2002b. Modelling of the hydrolysis of sorghum straw at atmospheric pressure. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **82**:505-512.
- Torrado, I.; Carvalheiro, F.; Duarte, L.C.; Raposo, S.; Gírio, F.M.** 2012. Optimization of dilute acid hydrolysis for the selective recovery of hemicellulosic sugars from sorghum straw. Proceedings of the "1st Iberoamerican Congress on Biorefineries". Los Cabos, Baja California, México, SIADEB.
- Vásquez, M.P.; Silva, J.N.C.; Souza, M.B.; Pereira, N.** 2007. Enzymatic hydrolysis optimization to ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 141-153.
- Venendaal, R.; Jørgensen, U.; Foster, C.A.** 1997. European energy crops: A synthesis. *Biomass & Bioenergy*. **13**:147-185.
- Verachtert, H.; De Mot, R.** 1990. Yeast: biotechnology and biocatalysis. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Verma, A.; Kumar, S.; Jain, P.K.** 2011. Key pretreatment technologies on cellulosic ethanol production. *Journal of Scientific Research*. **55**:57-63.
- Vidal, B.; Dien, B.; Ting, K.; Singh, V.** 2011. Influence of feedstock particle size on lignocellulose conversion: A review. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. **164**:1405-1421.
- Winkelhausen, E.; Kuzmanova, S.** 1998. Microbial conversion of D-xylose to xylitol. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. **86**:1-14.
- Zaldivar, J.; Ingram, L.O.** 1999. Effect of organic acids on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli* LY01. *Biotechnology and Bioengineering*. **66**:203-210.
- Zaldivar, J.; Martinez, A.; Ingram, L.O.** 2000. Effect of alcohol compounds found in hemicellulose hydrolysate on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*. **68**:524-530.
- Zhang, Y.H.P.; Ding, S.Y.; Mielenz, J.R.; Cui, J.B.; Elander, R.T.; Laser, M.; Himmel, M.E.; McMillan, J.R.; Lynd, L.R.** 2007. Fractionating recalcitrant lignocellulose at modest reaction conditions. *Biotechnology and Bioengineering*. **97**:214-223.



## Anexos

### Anexo A- Meios de Culturas

#### A.1. Meio *Yeast Malt* Glucose líquido

Quadro A.1- Composição química do meio YM-glc Líquido (1 L)

Nutrientes	Concentração (g·L <sup>-1</sup> )	Marca comercial
Extrato de levedura	3,0	Oxoid
Extrato de malte	3,0	Oxoid
Peptona	5,0	Difco
Glucose	10,0	Oxoid

#### A.2. Meio *Yeast Malt* glucose (YM-glc)

Quadro A.2- Composição química do meio YM-glc (1 L)

Nutrientes	Concentração (g·L <sup>-1</sup> )	Marca comercial
Extrato de levedura	3,0	Oxoid
Extrato de malte	3,0	Oxoid
Peptona	5,0	Difco
Glucose	10,0	Oxoid
Agar	30,0	Difco

Todos os compostos foram adicionados a 1000 mL de água destilada.

O meio foi aquecido, distribuído em frascos e esterilizado em autoclave a 121 °C durante 15 minutos a 1 bar. Após arrefecimento entre 50 a 55 °C o meio sólido foi distribuído assepticamente em placas de Petri estéreis. Por fim foram armazenados a 4 °C.

#### A.3 Meio Quimicamente Definido

Os suplementos utilizados na preparação deste meio foram misturados em água ultra pura com recurso à agitação magnética. Assim que se verificou uma mistura homogénea corrigiu-se o valor de pH para 5,5 com soluções de NaOH e HCl e acertou-se o volume num balão volumétrico. Por último o meio foi esterilizado pelo sistema de filtração.

Quadro A.3- Constituintes e quantidades aplicadas na preparação de 1L de MQD

Compostos	Para produção de stock	Para o crescimento estirpe 493	Para o crescimento estirpes 493,496 e 941
Xilose	25 g	2 g	20
Glucose	2,5 g	10 g	0
Solução de Vitaminas (100 x)	10 mL	10 mL	10 mL
Solução de Sais (40x)	25 mL	25 mL	25 mL
Solução de NP (20x)	50 mL	50 mL	50 mL
Solução de Mg (25x)	25 mL	25 mL	25 mL

### Anexo B- Soluções e suplementos utilizados

#### **Anexo B.1- Solução TEVM (*Trace Elements, Vitamins and Minerals*)**

Todas as soluções foram preparadas para 1 L de água ultra pura e esterilizadas separadamente e só depois adicionadas aos meios de fermentação, nas devidas proporções.

#### **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 2M. A solução foi esterilizada em autoclave a 121 °C durante 15 min a 1 bar e armazenada no final a 4 °C.

Quadro B1.1- Composição da solução de NP 25 vezes concentrada

Nutriente	Fórmula	Conc. (g·L <sup>-1</sup> )	Fornecedor	Conc. final (g·L <sup>-1</sup> )
Hidrogenofosfato de di-Amónio	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4,00	Merck	80,00
Dihidrogenofosfato de Potássio	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,00	Riedel-deHaën	40,00
Dihidrogenofosfato de Amónio	(NH <sub>4</sub> )H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	12,00	Merck	240,00

#### **Solução Mg**

A fonte de magnésio foi preparada numa solução 25 vezes concentrada e o pH acertado a 5,5 com NaOH 0,1M. A solução foi esterilizada em autoclave a 121 °C durante 15 min a 1 bar e armazenada no final a 4 °C.

Quadro B1.2- Composição da solução de Mg 25 vezes concentrada

Nutriente	Fórmula	Conc. (g·L <sup>-1</sup> )	Fornecedor	Conc.final (g·L <sup>-1</sup> )
Sulfato de magnésio Heptahidratado	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	12,50	Merck	0,5000

### Solução de Vitaminas

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

Quadro B1.3- Composição da solução de vitaminas e cálcio 100 vezes concentrada.

Nutriente	Fórmula	Conc. (g·L <sup>-1</sup> )	Fornecedor	Conc. Final (g·L <sup>-1</sup> )
Mio-inositol	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	10,000	Merck	0,1000
Pantotenato de hemi-cálcio	C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> NO <sub>5</sub> ·1/2Ca	2,00	Sigma	0,0200
Cloridrato de tiamina hidratado	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> C <sub>12</sub> N <sub>4</sub> OS·XH <sub>2</sub> O	5,00	Merck	0,0050
Ácido nicotínico	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>	0,500	Merck	0,0050
Ácido p-aminobenzóico	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub>	0,10	Merck	0,0010
d-Biotina ( vit.H)	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S	0,01	Merck	0,0001
Cloreto de cálcio dihidratado	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	5,00	Merck	0,0500

### Procedimento

Dissolveu-se todos os componentes um a um, mantendo a ordem, e reajustando o pH após cada adição a 6,5. Por fim o volume foi ajustado a 1000 mL em balão volumétrico e o pH final de 6,5 foi assegurado. Esta solução não pode ser autoclavada nem mantida à luz, pois as vitaminas são termolábeis e fotossensíveis. Assim sendo, recorreu-se a uma esterilização por filtração, utilizando filtros de 0,20 µm. Conservar a 4 °C, preferencialmente no máximo de 3 meses.

### 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.

Quadro B1.4- Composição da solução de sais 40 vezes concentrada

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

### Procedimento

Dissolveu-se o EDTA e adicionou-se o zinco em pelo menos 800 mL de água. Acertou-se o pH entre 5,5 e 6,0. Os restantes compostos foram adicionados pela ordem indicada mantendo o pH sempre intervalo referido. A maior descida de pH ocorreu com o ferro. Colocou-se o volume a cerca de 1200 mL. Separaram-se em alíquotas de 250 mL em balões de 500 mL. Ao longo da preparação a solução foi alterando a sua cor, inicialmente era incolor, cor-de-rosa ténue e após a adição de cobalto, azulada após a adição de cobre, amarelada, após adição do ferro.

A solução foi esterilizada em autoclave a 121 °C durante 15 min a 1 bar e armazenada no final a 4 °C.

### Anexo B.2- Solução de Extrato de Levedura

Para a preparação de uma solução de 250 mL (40 g·L<sup>-1</sup>) pesou-se cerca de 10 g de Extrato de Levedura e deixou-se dissolver em água ultrapura sob agitação magnética, a 50 °C durante 15 minutos. A solução foi colocada num frasco Schott de 500 mL e esterilizada em autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Para utilização nas fermentações, de modo a ter uma concentração de 3 g·L<sup>-1</sup>, a solução foi diluída com adição de água estéril nas proporções certas.

### Anexo C- Formulário

#### Anexo C.1- Caracterização química da matéria-prima e resíduos sólidos

As concentrações de glucose, xilose, arabinose e ácido acético nos licores resultantes da hidrólise ácida quantitativa da matéria-prima e resíduo sólido foram utilizados para o cálculo das percentagens de glucano, xilano, arabinano e grupos acetilo, respetivamente (Eq.C1 a C4). O resíduo insolúvel em ácido, após correção da cinza, permitiu o cálculo da lenhina Klason (Eq.C5).

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

$$Gn = F \times \frac{100}{1005} \times \frac{162}{180} \times \frac{Glc \times P_{sol}}{A} \quad (\text{Eq.C1})$$

$$Xn = F \times \frac{100}{1005} \times \frac{132}{150} \times \frac{Xyl \times P_{sol}}{A} \quad (\text{Eq.C2})$$

$$Arn = F \times \frac{100}{1005} \times \frac{132}{150} \times \frac{Ara \times P_{sol}}{A} \quad (\text{Eq.C3})$$

$$GAc = \frac{100}{1005} \times \frac{60}{61} \times \frac{Ac \times P_{sol}}{A} \quad (\text{Eq.C4})$$

$$LK = \frac{RIA - C}{A} \times 100 \quad (\text{Eq.C5})$$

Sabendo que:

-  $Gn$ ,  $Xn$ ,  $Arn$ ,  $GAc$  e  $LK$  são as percentagens (g/100g sólido) de glucano, xilano, arabinano, grupos acetilo e lenhina Klason, respetivamente.

-  $F$  é o fator de correção. Por exemplo para o glucano:

$$F = \frac{1}{1 - 0,026} = 1,027 \quad (\text{Eq.C6})$$

-  $P_{sol}$  e  $A$  são as massas (g) de solução e da amostra seca utilizada no ensaio, respetivamente.

-  $RIA$  e  $C$  são as massas (g) do resíduo insolúvel em ácido e da cinza da amostra, respetivamente.

-  $Glc$ ,  $Xyl$ ,  $Ara$  e  $Ac$  são as concentrações (g·L<sup>-1</sup>) de glucose, xilose, arabinose e ácido acético nos licores, respetivamente.

## Anexo C.2- Parâmetros cinéticos e estequiométricos

### Taxa específica de crescimento ( $h^{-1}$ )

$$\mu = \frac{\ln\left(\frac{Abs}{Abs_0}\right) - b}{t} \quad (\text{Eq.C7})$$

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

### Produtividade celular ( $g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$ )

$$Q_x = \frac{X_f - X_i}{t_f - t_i} \quad (\text{Eq.C8})$$

-  $X_i$  e  $X_f$  são as concentrações iniciais e finais de biomassa, respetivamente ( $g \cdot L^{-1}$ ).

### Taxa volumétrica de consumo de substrato ( $g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$ )

$$Q_s = \frac{S_i - S_f}{t_f - t_i} \quad (\text{Eq.C9})$$

-  $S_i$  e  $S_f$  são as concentrações iniciais e finais de substrato, respetivamente ( $g \cdot L^{-1}$ ). Substrato: xilose e/ou glucose e/ou arabinose.

### % Substrato consumido

$$\% \text{ substrato consumido} = \frac{(S_i - S_f)}{S_i} \times 100 \quad (\text{Eq.C10})$$

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

$$Q_{POH} = \frac{POH_f - POH_i}{t_f - t_i} \quad (\text{Eq.C11})$$

-  $POH_i$  e  $POH_f$  são as concentrações iniciais e finais de polióis, respetivamente ( $g \cdot L^{-1}$ ).

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

$$Y_{X/S} = \frac{X_f - X_i}{S_i - S_f} \quad (\text{Eq.C12})$$

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

$$Y_{\text{POH/S}} = \frac{\text{POH}_f - \text{POH}_i}{S_i - S_f} \quad (\text{Eq.C13})$$

-  $S_i$  e  $S_f$ ,  $\text{POH}_i$  e  $\text{POH}_f$  representam as concentrações iniciais e finais ( $g \cdot L^{-1}$ ) de xilose e de polióis, respetivamente.

Anexo D- Doseamento da proteína total

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

<b>Mistura catalisadora</b>	Sulfato de cobre	3 g
	Óxido de titânio	3 g
	Ácido esteárico	1 g
<b>Solução de ácido bórico</b>	4 % (p/v)	
<b>Solução de ácido clorídrico</b>	0,1 N	
<b>Solução de hidróxido de sódio</b>	50 % (p/v)	
<b>Indicador</b>	Indicador de Tashiro <sup>1</sup>	

<sup>1</sup> Dissolveram-se 2 g de vermelho de metilo e 1 g de azul de metileno em 100 mL de álcool etílico 95 % (v/v).

Expressão de resultados

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

$$\text{Azotototal (\%)} = 0,14 \times \frac{(V - V_0)}{A} \quad (\text{Eq.D1})$$

Onde:

V - Volume (mL) de solução de HCl 0,1 N gasto na titulação;

$V_0$  - Volume (mL) da solução de HCl 0,1 N gasto na titulação do ensaio em branco;

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

Anexo E- Determinação de extrativos

A percentagem de extrativos é determinada utilizando a seguinte expressão:

$$\text{Extrativos (\%)} = \frac{(m - m_0)}{A} \times 100 \quad (\text{Eq.E1})$$

m - Massa do balão mais extrativos, após cada uma das extrações (g);

$m_0$  - Tara do balão (g);

A - Massa da amostra pesada para cada cartucha (g).

## **Anexo F- Determinação da concentração de compostos fenólicos**

### **Preparação de soluções e amostras**

#### **Solução stock de Ácido Gálico 0,6 g·L<sup>-1</sup>**

Pesaram-se 0,0300 g de Ácido Gálico e diluíram-se em água ultra pura, perfazendo o volume de 50 mL num balão volumétrico. Considerou-se o reagente comercial como puro, não se fazendo qualquer correção para a pureza real.

#### **Solução stock de Carbonato de Sódio 7,5 % ( m/v)**

Pesaram-se 18,75 g de Carbonato de Sódio e dissolveram-se em água ultra pura. Perfez-se o volume a 250 mL num balão volumétrico.

#### **Solução de Folin-Ciocalteu 1/10 (v/v)**

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

#### **Amostras**

As amostras foram devidamente filtradas e diluídas com água de modo a obter uma concentração de compostos fenólicos inferior a 0,6 mg·mL<sup>-1</sup>.

### **Procedimento**

Num tubo de ensaio com tampa devidamente identificado adicionaram-se 100 µL de amostra, 4 mL de solução Folin-Ciocalteu 1/10 (v/v) e 4 mL de solução de Carbonato de Sódio 7,5 % (m/v), agitando-se no *vórtex* a cada adição. Os tubos foram incubados em banho-maria a 45 °C durante 15 minutos. Por fim agitaram-se novamente e leram-se as absorvâncias a 765 nm (espectrofotómetro Jasco V-530, Japão). Este procedimento foi feito em triplicado de modo a minimizar o erro associado às diluições.

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

### **Cálculos**

Os resultados são expressos em equivalente de ácido gálico (GAE) mg·mL<sup>-1</sup> de solução da amostra por comparação com a curva padrão de GAE.