

Produção de açúcares por via enzimática, a partir de bagaço e de caroço de azeitona

Jorge Gomes Lopes Barros

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Alimentar

Orientadoras: Professora Doutora Maria Suzana Leitão Ferreira Dias Vicente

Doutora Isabel Maria Silva Sanches de Miranda

Júri:

Presidente: Doutor Vitor Manuel Delgado Alves, Professor auxiliar do instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

Vogais: Professora Doutora Maria Suzana Leitão Ferreira Dias Vicente, Professora associada com agregação do instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

Doutora Natália Maria Ferreira Rebelo de Melo Osório, Professora adjunta convidada da Escola Superior de Tecnologia do Instituto Politécnico de Setúbal.

Dedico este trabalho a minha filha Amairani Cabral Barros (em memoria).

Agradecimentos

Gostaria de agradecer à Deus pelo dom da vida e permitir que crescesse em estatura, espírito e sabedoria.

Aos meus pais Américo Barros e Inês Lopes; Minha esposa Yuranda Cabral Barros e ao meu filho Itzayani Cabral Barros, por fazerem evoluir em mim tudo de bom ao propósito de Deus.

À professora doutora Suzana Dias, pela orientação científica e moral e por fazer parte da minha vida nesta jornada como mãe. O mesmo agradecimento estende-se a professora doutora Imaculada da Conceição Matias, por tornar possível minha formação em Portugal.

À professora doutora Isabel Miranda, pela orientação científica, simpatia e disponibilidade.

À Rita Simões pelo auxílio laboratorial e inesgotável paciência.

Ao Professor Doutor Manuel Correia pelo acolhimento, conselhos, apoio e força em continuar a vencer as dificuldades.

Ao colectivo de professores do ISA, pelos ensinamentos, paciência e profissionalismo.

À Neusa e a comunidade africana do ISA, por toda a ajuda e por nunca deixarem existir um dia aborrecido.

Por fim, aos meus irmão e amigos por todo o amor, apoio e auxílio ao longo dos anos. Obrigada por me aturarem.

Esta tese foi realizada no âmbito do projecto de colaboração Portugal-Índia, FCT/DST-Índia 2017/2019 (DST/INT/Portugal/P-02/2017) a quem também dirijo meus profundos agradecimentos.

Resumo

Após a extração do azeite virgem das azeitonas, o bagaço ainda contém cerca de 3-4,5% de óleo residual, que pode ser extraído por *n*-hexano e usado para fins comestíveis após a refinação. O bagaço de azeitona extratado é um resíduo subvalorizado e estima-se que mais de 13 milhões de toneladas de bagaço húmido foram descartadas no mundo em 2017/2018, correspondendo a mais de 6 milhões de toneladas de materiais lenho-celulósicos secos. Este estudo teve como objectivo a valorização de bagaço de azeitona extratado e do caroço de azeitona por tratamento hidrotérmico moderado a 130°C durante 130 min (log de fator de severidade $R_0 = 2,99$) seguido de hidrólise enzimática para produzir glucose. A composição química do bagaço de azeitona extraído e do caroço de azeitona foi, respectivamente: cinza 7,3% e 0,6%, extrativos 34,4% e 13,7%, lenhina 31,2% e 42,1%, glucanas 13,8% e 15,3%, xilanas 18,9% e 20,3% e grupos acetilo 2,0% e 7,9%. Após o pré-tratamento hidrotérmico a 130°C (factor de severidade $R_0 = 2,99$), 65% e 75% das hemiceluloses totais (65% de xilano) foram hidrolisadas em xilo-oligossacáridos do bagaço de azeitona extratado e do caroço de azeitona, respectivamente. A celulose e a lenhina não foram substancialmente afectadas pelo tratamento hidrotérmico. Foram testadas três preparações enzimáticas (SaczymeYield, Ultimas BWL40 e Celluclast 1,5L) para sacarificação das glucanas presentes no bagaço e no caroço após pré-tratamento hidrotérmico, em três concentrações diferentes (10, 20 e 30%). Os melhores resultados foram obtidos com Saczyme e Ultimase: conversão de 80 e 90% de glucanas do bagaço, após 5h de reação, e 40% (5 h de reação) e 88% (24h) no caroço, respectivamente. Estas conversões são independentes das cargas sólidas utilizadas. A Celluclast revelou baixa actividade em presença do caroço de azeitona.

Palavras-chave: Auto-hidrólise, bagaço de azeitona, caroço de azeitona, sacarificação enzimática, tratamento hidrotérmico

Abstract

After extraction of virgin olive oil from the olives, the pomace still contains about 3-4.5% of residual oil, which can be extracted by n-hexane and used for edible purposes after refining. Extracted olive pomace is an undervalued waste and it is estimated that over 13 million tons of wet pomace was discarded worldwide in 2017/2018, corresponding to over 6 million tons of dried lignocellulosic materials. The objective of this study was the valorization of olive pomace extracted and olive pit by moderate hydrothermal treatment (130°C/130 min; log of severity factor $R_0 = 2.99$) followed by enzymatic hydrolysis to produce glucose. The chemical composition of the extracted olive pomace and the olive pits were, respectively : ash 7.3% and 0.6%, extractives 34.4% and 13.7%, lignin 31.2% and 42.1%, 13.8% and 15.3% glucana , 18.9% and 20.3% xylana and 2.0% and 7.9% acetyl groups. After the hydrothermal pre- treatment, 65% and 75% of total hemicelluloses (65% xylana) were hydrolyzed in xylo-oligosaccharides from extracted olive pomace and olive pits respectively. Cellulose and lignin were not substantially affected by the hydrothermal treatment. Three enzyme preparations (SaczymeYield , Ultimas BWL 40 and Celluclast 1.5 L) were tested for saccharification of extracted olive pomace and Caroço, in different Cargas (10, 20 e 30%). The best results were obtained with Saczyme and Ultimase : conversion 80 to 90% of glucan to the reaction residue after 5h and 40% (5 h reaction time) or 88% (24) of core , respectively . These conversions are independent of the solid Cargas used. The Celluclast was not active with core olives.

Keyword: Olive pits, olive pomace, self-hydrolysis, hydrothermal treatment, enzymatic saccharification

Lista de abreviaturas

A ₂₀₅	Absorvância a 205 nm
FPU	Atividade celulolítica total sobre papel de filtro (“ Filter paper unit”)
FTIR	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier
GAE	Equivalentes de ácido gálico (do inglês “Gallic Acid Equivalentents”)
HPLC Chromatography”)	Cromatografia Líquida de Alta Pressão (do inglês “High Pressure Liquid
ILs	Líquidos iônicos
IU	Unidades internacionais
LK	Lenhina Klason
LHW	“Liquid hot water”
MEV	Imagens de microscopia electrónica de varrimento
OGM	organismos geneticamente modificados
OS	Oligossacáridos
PNP	p-nitrofenol
RLS	Razão Líquido-sólido
S	Siringilo (dois grupos metoxilo)
TFA	Ácido trifluoroacético
UV	Ultravioleta
VIS	Visível
XOS	Xilo-oligossacáridos

INDICE	IV
1. ENQUADRAMENTO DO TEMA E OBJECTIVOS.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1. CONCEITO DE BIORREFINARIA.....	5
2.2. A BIOMASSA.....	6
2.3. MATERIAIS LENHO-CELULÓSICOS E OS SEUS COMPONENTES.....	7
2.4. PRÉ-TRATAMENTOS DA BIOMASSA LENHO-CELULÓSICA	9
2.4.1. <i>Pré-tratamentos físicos</i>	11
2.4.2. <i>Outos métodos de Pré-tratamentos</i>	13
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
3.1 MATÉRIAS-PRIMAS E ENZIMAS	17
3.2 ANÁLISE QUÍMICA DE MATÉRIAS-PRIMAS E SÓLIDOS PRÉ-TRATADOS.....	17
3.2.1 <i>Preparação da amostra</i>	17
3.2.2 <i>Determinação do teor de humidade</i>	17
3.2.3 <i>Determinação do teor de cinzas</i>	18
3.2.4 <i>Determinação de extractivos pelo método de Soxhlet</i>	18
3.2.5 <i>Determinação do teor de lenhinas</i>	18
3.3 COMPOSIÇÃO DOS AÇÚCARES ESTRUTURAIS	20
3.4 TRATAMENTO HIDROTÉRMICO - AUTO-HIDRÓLISE	20
3.5 QUANTIFICAÇÃO DA ACTIVIDADE TOTAL DA CELULASE (FILTER PAPER ACTIVITY)	21
3.6 QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE β - GLUCOSIDASE.....	22
3.7 DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES TOTAIS MÉTODO FENOL SULFÚRICO.....	23
3.8 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA (SACARIFICAÇÃO).....	23
3.9 ESPECTROSCOPIA DE FTIR.....	23
3.10 IMAGENS DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE VARRIMENTO.....	24
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
4.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO BAGAÇO DE AZEITONA EXTRACTADO.....	25
4.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO CAROÇO DE AZEITONA.....	25
4.3 PRÉ-TRATAMENTO HIDROTÉRMICO	26
4.4 ANÁLISE DE FTIR.....	33
4.5 AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES DE CELULASE E BETA-GLUCOSIDASE DAS PREPARAÇÕES ENZIMÁTICAS.....	33
4.6 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA.....	34
4.7 IMAGENS DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE VARRIMENTO.....	44
4.8 VELOCIDADES DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA	44
4.9 COMPARAÇÃO COM OUTROS ESTUDOS ENZIMÁTICOS	46
5. CONCLUSÕES	48
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

Índice de quadros

Quadro 1: Composição química de alguns materiais lenhocelulósicos.....	10
Quadro 2: Vantagens e desvantagens dos principais métodos de fracionamento da biomassa lenho-celulósica	15
Quadro 3: Soluções utilizadas na determinação da actividade celulásica	21
Quadro 4: composição química do bagaço e do caroço de azeitona extractados (expressas em % de matéria seca em estufa, % m.s.)	25
Quadro 5: Rendimento mássico após tratamento hidrotérmico do bagaço e do caroço de azeitona e caracterização química dos resíduos sólidos (% m.s.)	28
Quadro 6: Estudos de pré-tratamento e sacarificação de bagaço e caroço de azeitona realizados por vários autores	30

Índice de figuras

Figura 1- Extracção do azeite com os sistemas de prensas (a) e os sistemas contínuos trifásicos (b)	1
Figura 2- Extracção de azeite com os sistemas contínuos bifásicos	2
Figura 3- Extracção do óleo de bagaço de azeitona.....	3
Figura 4- Estrutura química da celulose.....	7
Figura 5- Estrutura química das hemiceluloses.....	8
Figura 6- Álcoois precursores da lenhina: álcool cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico e a estrutura da lenhina	9
Figura 7- Processo de pré-tratamento do material lenhocelulósico	11
Figura 8- Espectros FTIR de bagaço de azeitona extractado antes do tratamento térmico (a), após auto-hidrólise (b), e de caroço não tratado (c) e após auto-hidrólise (d)	33
Figura 9- Determinação das actividades celulásicas das preparações enzimáticas utilizadas pelo método das FPU	36
Figura 10- Concentração de glucose no meio reacional ao longo de 48 horas de sacarificação catalisada por diferentes preparações enzimáticas a 50 °C, utilizando 10, 20 ou 30% de bagaço de azeitona pré-tratado	38
Figura 11- Glucose produzida por kg de bagaço ao longo de 48 horas de sacarificação catalisada por diferentes preparações enzimáticas a 50 °C, utilizando 10, 20 ou 30% de bagaço de azeitona pré-tratado.....	39
Figura 12- Conversão de glucanas ao longo de 48 horas de sacarificação de celulose catalisada por diferentes preparações enzimáticas a 50 °C, utilizando 10, 20 ou 30% de bagaço de azeitona pré-tratado	41
Figura 13- Concentração de glucose, respectiva concentração por kg de caroço e conversão de glucanas, ao longo de 48h de sacarificação catalisada pela enzima Saczyme Yield, a 50°C, utilizando 10, 20 e 30% de caroço	42
Figura 14- Concentração de glucose, respectiva concentração por kg de caroço e conversão de glucanas, ao longo de 48h de sacarificação catalisada pela enzima Ultimase BWL 40, a 50°C, utilizando 10, 20 e 30% de caroço	43
Figura 15- Imagens de microscopia electrónica de varrimento (Mag = 30x) de (i) bagaço de azeitona extratado e do caroço, (ii) após auto-hidrólise, e (iii) após auto-hidrólise seguida de hidrólise enzimática	44
Figura 16- velocidade inicial de hidrólise da celulose.....	45

Índice de equações

Equação 1. Determinação do teor de humidade.....	17
Equação 2. Determinação do teor de cinzas.....	18
Equação 3. Determinação de extractivos	18
Equação 4. Determinação do teor de lenhina Klason sem correcção.....	19
Equação 5. Determinação do teor de lenhina Klason com correcção.....	19
Equação 6. Determinação do teor da lenhina solúvel.....	19
Equação 7. Fator de severidade.....	20
Equação 8. Cálculo de concentrações de enzimas.....	21
Equação 9. Calculo da actividade total da celulase (FPU/mL).....	22
Equação 10. Calculo da actividade da B- glucosidase	23

1. ENQUADRAMENTO DO TEMA E OBJECTIVOS

A oliveira (*Olea europaea* L.) é a principal cultura oleaginosa da bacia do Mediterrâneo. As elevadas propriedades nutricionais e funcionais do azeite, atribuídas principalmente ao elevado teor de ácido oleico (55-83%), polifenóis e tocoferóis com propriedades antioxidantes, são responsáveis pelo sucesso da dieta mediterrânica e pelas alegações de saúde específicas para o azeite (REGULAMENTO (UE) No 432/2012 DA COMISSÃO). As propriedades e o sabor único do azeite virgem desencadearam a produção e a instalação de novos olivais intensivos e super-intensivos em diferentes países. Segundo o Conselho Oleícola Internacional, a produção mundial de azeite foi de 1453 toneladas em 1990/1991 e 3314 toneladas em 2017/2018 (<http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/131-world-olive-oil-figura>), ou seja, aumentou 2,3 vezes neste período. Em 2017/2018, os países da bacia do Mediterrâneo produziram 96% do azeite mundial, sendo a União Europeia (UE) responsável por cerca de 70% da produção mundial, sendo a Espanha o primeiro produtor (58% da produção da UE), seguida de Itália (20%), Grécia (16%) e Portugal (6%).

O azeite é extraído das azeitonas exclusivamente por processos mecânicos. Atualmente, os lagares tradicionais de prensas foram substituídos por sistemas de extracção com decantadores centrífugos contínuos. Com os sistemas de prensas e os sistemas contínuos de 3 fases, são obtidas três fases (figura 1): (i) o azeite, (ii) a fase aquosa (águas residuais do lagar de azeite constituídos por água de vegetação e águas de processo designadas de “águas russas”) e (iii) a fase sólida, o bagaço, constituída por caroço e polpa da azeitona.

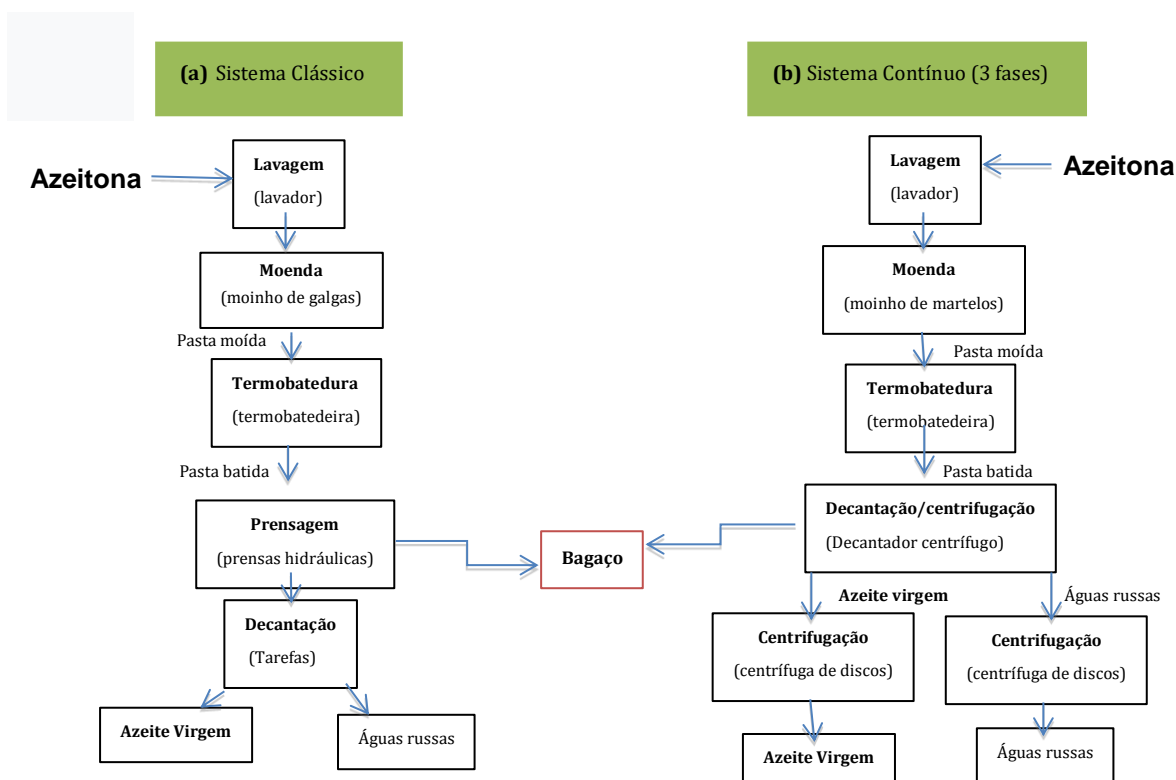


Figura 1. Extração do azeite com os sistemas de prensas (a) e os sistemas contínuos de três fases (b)

Os decantadores centrífugos de duas fases foram desenvolvidos durante a década de 1990 para superar o problema ambiental causado pelos altos volumes de águas residuais geradas (águas rússas) ricas em fenóis, altamente poluentes. Com estes decantadores, são obtidas apenas duas fases (figura 2): o azeite e o bagaço húmido, que é uma lama espessa resultante da mistura da água de vegetação com a fracção sólida do bagaço (contendo pedaços de caroço e polpa do fruto da azeitona). O teor de humidade do bagaço dos decantadores de duas fases é maior (50-70%) do que o do bagaço dos sistemas de três fases (40-54%) ou das prensas tradicionais (22-25%), o que faz com que o manuseamento e armazenamento dos bagaços dos sistemas de duas fases sejam mais difíceis (Di Giovacchino et al., 2001; Borja et al., 2006; Dermeche et al., 2013).

Seja qual for o sistema usado para a extracção de azeite, o bagaço ainda contém cerca de 3-4,5% (base húmida) de óleo residual com uma composição semelhante à do azeite (Di Giovacchino et al., 2001; Borja et al., 2006). Este óleo, conhecido como óleo de bagaço de azeitona, pode ser extraído por solvente (geralmente n-hexano) e é actualmente usado para fins comestíveis após a refinação (óleo de bagaço de azeitona refinado). O bagaço de azeitona extraído que resulta deste processo é um resíduo produzido em grandes quantidades. Pode-se estimar que mais de 13 milhões de toneladas de bagaço húmido foram descartadas no mundo em 2017/2018, correspondendo a mais de 6 milhões de toneladas de materiais lenho-celulósicos secos, se considerarmos um rendimento de extracção de azeite de 25% (base húmida) (Romero-García et al., 2014), e um bagaço húmido com 50% de humidade e 3% de óleo.

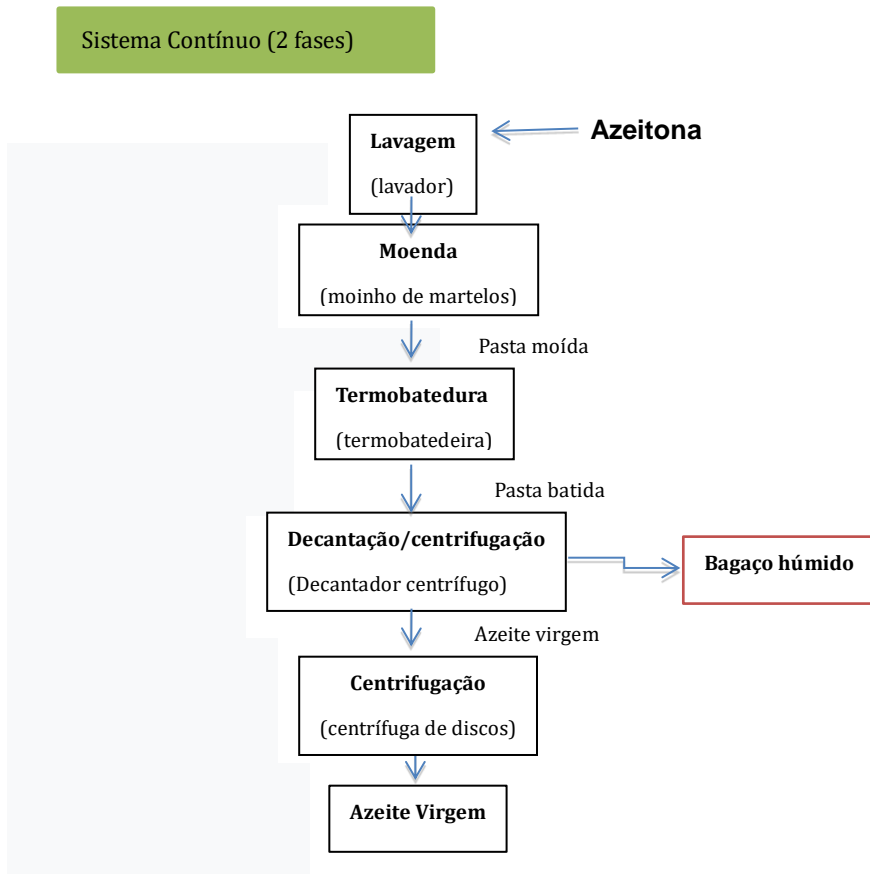


Figura 2. Extracção de azeite com os sistemas contínuos de duas fases

O bagaço de azeitona extraído é um resíduo subvalorizado que é usualmente usado como biocombustível sólido para combustão directa em unidades fabris de extração de óleo de bagaço de azeitona e em lagares ou em outros utilizadores de biomassa (Fernandes *et al.*, 2016). Pode ser utilizado como matéria-prima em biorrefinarias, nomeadamente para a produção de etanol de segunda geração, dada a sua natureza lenhocelulósica (Romero-García *et al.*, 2014). A viabilidade do uso de bagaço de azeitona de lagares com sistemas de extracção de duas fases para fins agrícolas e compostagem também pode ser uma opção (Albuquerque *et al.*, 2004). Além disso, compostos como polifenóis, tocoferóis, proteínas e esqualeno, de alto valor acrescentado, podem ser obtidos do bagaço de azeitona por extração convencional com solvente ou por métodos não convencionais, como ultrassons, microondas, extração por fluidos supercríticos (CO₂) ou líquidos pressurizados, campos elétricos pulsados e descargas de alta voltagem (Dermeche *et al.*, 2013; Roselló-Soto *et al.*, 2015).

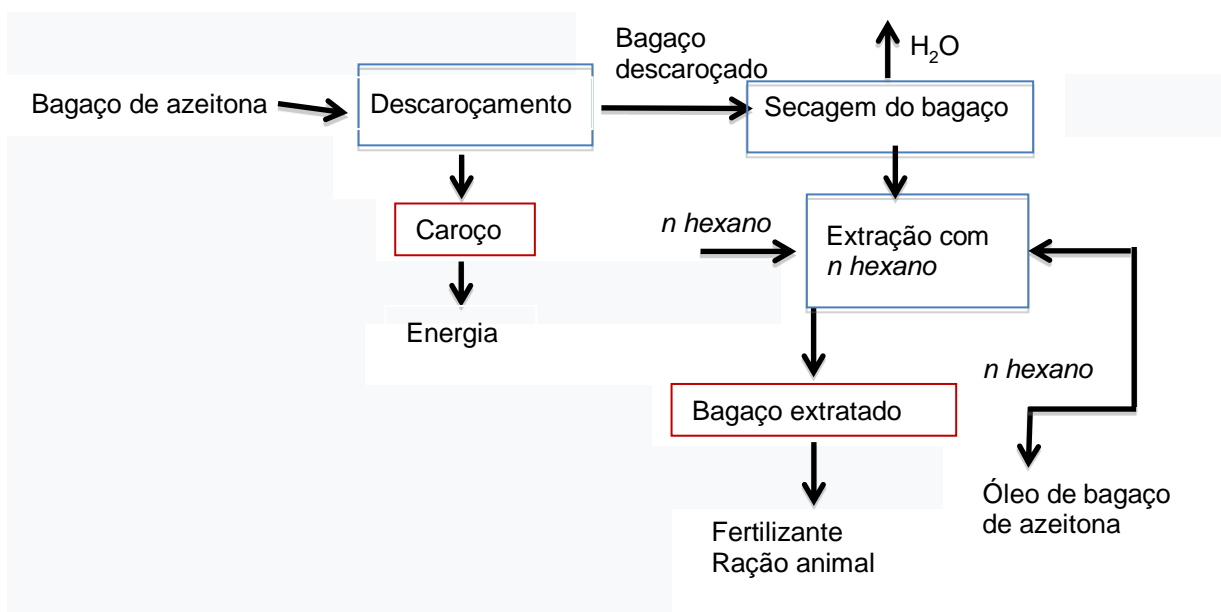


Figura 3. Extração do óleo de bagaço de azeitona

O bagaço de azeitona contém uma proporção substancial de caroço partido, representando cerca de 10% em massa das azeitonas, e difere estrutural e quimicamente da polpa. A fração constituída pelo caroço consiste principalmente em celulose (20,1-40,4%), hemiceluloses (18,5-32,5%), lenhina (25,3-48,8%), extractivos (8,9- 10,5%) e cinza (0,5-3,3%) (Fernández-Bolaños *et al.*, 1999; Demirbaş, 2002; Hernández *et al.*, 2014; Romero-García *et al.*, 2014, 2016; Cuevas *et al.*, 2015). O bagaço de azeitona é tipicamente composto de lenhina (30,0-41,6%), polissacáridos da parede celular (35,3-49,0%), óleo (7,5-14%) e minerais (4,4-6%) (Ruggeri *et al.*, 2015; Fernandes *et al.*, 2016; Leite *et al.*, 2016; Elalami *et al.*, 2018). Por conseguinte, pode ser considerada uma valorização separada dos componentes do bagaço: o caroço da azeitona pode ser separado da polpa e ambas as correntes utilizadas separadamente como combustível (calor de combustão de 4,1 kcal/kg; Durán, 1985) para secadores nos lagares, ou como matéria-prima lenho-celulósica para fraccionamento químico.

O objetivo desta tese consiste na valorização do bagaço de azeitona extratado e do caroço de azeitona numa perspectiva de biorrefinaria de base bioquímica. Ambas as fracções foram quimicamente caracterizadas e processadas por (i) um tratamento hidrotérmico com o objectivo de se obterem compostos derivados de hemiceluloses (por exemplo, xilo-oligossacáridos), seguido de (ii) hidrólise enzimática da celulose para obter glucose que poderá ser utilizada para produção de bioetanol, e lenhina para síntese de produtos químicos verdes. Os xilo-oligossacáridos (XOS) são compostos interessantes com propriedades prebióticas reconhecidas (Aachary & Prapula, 2011)

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Conceito de biorrefinaria

O conceito de biorrefinaria nasce com a preocupação moderna do reaproveitamento e desenvolvimento sustentável, crescente nos últimos anos. Esta preocupação torna-se cada vez mais acentuada e relevante com o passar dos anos, devido à conjuntura económica, política e social. As possíveis diminuições das reservas de combustíveis fósseis disponíveis, a par com as flutuações de preços de mercado, têm contribuído para uma aposta cada vez maior em fontes de energia alternativas renováveis, menos poluentes e economicamente viáveis (Martins, 2015).

Uma biorrefinaria pode definir-se como uma "instalação industrial que procura a utilização integral da biomassa, de forma sustentável, para a produção concomitante de biocombustíveis, energia, materiais e químicos" (Carvalho et al., 2008; SIADEB, 2013).

Assim, o conceito de biorrefinaria abrange uma ampla gama de tecnologias capaz de separar os diferentes recursos de biomassa nos seus constituintes (glúcidos, lenhina, proteínas, triglicéridos, compostos fenólicos, etc) que, por sua vez, podem ser convertidos em produtos de valor acrescentado (Cherubini, 2010). São exemplos de produtos que podem ser obtidos nas biorrefinarias os biocombustíveis líquidos (etanol, biodiesel), glicerol, lípidos, óleos, ácidos orgânicos, furfural, isopropanol, vitaminas, polímeros de açúcares e de proteínas e combustíveis intermédios como o carvão e os briquetes. Outros produtos que podem integrar as biorrefinarias são os plásticos e os agentes tensioativos biodegradáveis, polímeros específicos, novas fibras e enzimas (Ragauskas et al., 2003; Martins, 2015; Gravitis et al., 1999).

Existem várias classificações para as biorrefinarias: de acordo com o processo tecnológico, matéria-prima utilizada ou tecnologia dos processos. Neste tipo de instalações pode estar envolvida uma panóplia diversificada de processos tecnológicos, tais como processos de separação, de conversão, termoquímica, química ou bioquímica. O objetivo final é sempre tirar o maior partido da biomassa utilizada. Uma das classificações mais utilizadas para as biorrefinarias baseia-se no tipo de processos tecnológicos utilizados, definindo-se diferentes plataformas, i.e., bioquímica, termoquímica, biodiesel e biogás (Kamm, 2006; Kamm, 2007; Martins, 2015). De entre estas, as mais importantes são as plataformas termoquímica e bioquímica. A biorrefinaria de base termoquímica implica um processo de conversão química usando pirólise ou gaseificação de matéria que podem ser materiais lenho-celulósicos, obtendo-se como principal produto biocombustíveis por exemplo, gás de síntese, óleos de pirólise, combustíveis líquidos e gasosos, bem como, produtos de valor acrescentado (Martins, 2015). A biorrefinaria de base bioquímica consiste numa hidrólise química e/ou enzimática antes da fermentação de hexoses ou pentoses da biomassa amilácea ou lenho-celulásica.

O esquema geral para a bioconversão lenho-celulósica na abordagem da biorrefinaria de base bioquímica (utilizada neste trabalho) envolve as seguintes etapas: etapa de pré-tratamento para desconstruir as paredes celulares nos seus componentes, uma hidrólise enzimática dos polissacáridos

a monossacáridos, fermentação de monossacáridos derivados da etapa anterior em produtos alvo, separação de resíduos e finalmente, purificação dos produtos. Obviamente, cada etapa tem as suas dificuldades que adicionam custos ao processo global. O passo de pré-tratamento é dispendioso, mas é crucial para melhorar a acessibilidade das enzimas durante a etapa de sacarificação, expor a celulose, quebrar a estrutura da lenhina, alterar suas propriedades estruturais e químicas e reduzir a cristalinidade da celulose. Ao mesmo tempo, o pré-tratamento deve evitar a destruição da celulose e das hemiceluloses, a geração de inibidores para etapas subsequentes e a degradação ou perda de açúcares; deve minimizar as necessidades energéticas, o consumo de reagentes e promover a produção de monómeros de açúcar na etapa de hidrólise (Adsul *et al.*, 2011). O passo de hidrólise enzimática é outro passo caro devido ao preço das enzimas, e é difícil porque o acesso aos polissacáridos é dificultado pela presença da lenhina (Gupta *et al.* 2011; Capolupo & Faraco, 2016).

Tendo como objetivo a produção de uma larga gama de compostos, as biorefinarias podem tirar o máximo partido dos diversos componentes da biomassa para a produção de uma grande diversidade de compostos e energia, valorizando ao máximo as suas matérias-primas. Deste modo, o modelo de biorefinaria é um dos mais promissores modelos do futuro para um desenvolvimento sustentável a nível global (Escária, 2008; Martins, 2015).

2.2. A biomassa

Define-se biomassa toda a matéria orgânica renovável disponível na natureza proveniente de fontes variadas tais como: madeiras e outros materiais florestais, culturas agrícolas e silvícolas, detritos animais, subprodutos industriais e resíduos sólidos urbanos. Destes, a biomassa vegetal é a mais interessante para utilização como matéria-prima na produção de energia, combustíveis e outros materiais, devido à sua composição e abundância. É estimado que a produção anual de biomassa vegetal no planeta seja de $1,7 \times 10^{11}$ ton, das quais apenas 3,5% (6×10^9 ton) são utilizadas (Dermibas, 2009).

De entre a restante biomassa desperdiçada, encontram-se resíduos agroflorestais e industriais de natureza lenho-celulósica, constituindo uma crescente problemática ambiental. A biomassa lenho-celulósica é a biomassa bioenergética mais abundante, de baixo custo, que não interfere na produção suprimento de alimentos no que diz respeito a utilização dos solos e deriva em grandes quantidades de resíduos florestais, agrícolas e agro-industriais (Balan 2014; Saini *et al.*, 2015; Capolupo & Faraco, 2016). Esta biomassa é também sustentável a nível ambiental (USI, 2009; Martins, 2015).

A biomassa tem sido considerada, nos últimos anos, uma fonte renovável e sustentável de carbono orgânico com emissão zero de carbono (Zhou *et al.* 2011; Long *et al.* 2013; Capolupo & Faraco, 2016). É um recurso promissor para produzir produtos verdes e substituir os recursos fósseis que são limitados e apresentam muitos problemas, como as emissões de gases de efeito estufa de custos elevados. Por essa razão, a biomassa lenho-celulósica tem grande importância como principal fonte de biocombustíveis e outros bioprodutos (como ácido succínico ou ácido láctico) que podem ser utilizados

como blocos de construção para a produção de novos polímeros (Isikgor e Becer 2015; Adsul et al. 2011; Capolupo & Faraco 2016). Nos próximos anos, a fim de minimizar a dependência dos recursos fósseis e da indústria do petróleo e graças às novas tecnologias de produção de químicos verdes de diferentes fontes, as biorrefinarias de segunda geração têm cada vez mais importância (Fahd et al. 2012; Cherubini 2010; Capolupo & Faraco 2016).

Uma das limitações na utilização da biomassa reside na sua natureza heterogênea e composição complexa. Os materiais lenho-celulósicos consistem em três frações químicas estruturais, celulose (40-50%), hemiceluloses (15-35%) e lenhina (20-40%), componentes não-estruturais (extrativos, cinzas, e outros componentes menores) e outras frações menores (por exemplo, pectina, proteínas, gomas, resinas, amido, etc. (Pan *et al.*, 2009; Martins, 2015)

2.3. Materiais lenho-celulósicos e os seus componentes

O quadro 1 apresenta a composição química média de alguns materiais lenho-celulósicos que são a maior fonte de biomassa inutilizada no planeta, sendo uma grande parte composta por subprodutos de atividades agrícolas e florestais. Entende-se por materiais lenho-celulósicos a matéria orgânica de origem vegetal constituída por polissacáridos (celulose e hemicelulose) e lenhina (Fengel & Wegener, 1983; Martins, 2015). Os teores de celulose variam entre 20 e 60%, as hemiceluloses entre 20 e 40% e a lenhina representa 10 a 25% dos materiais lenho-celulósicos (Hamelinck *et al.*, 2005; Gomes, 2016).

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

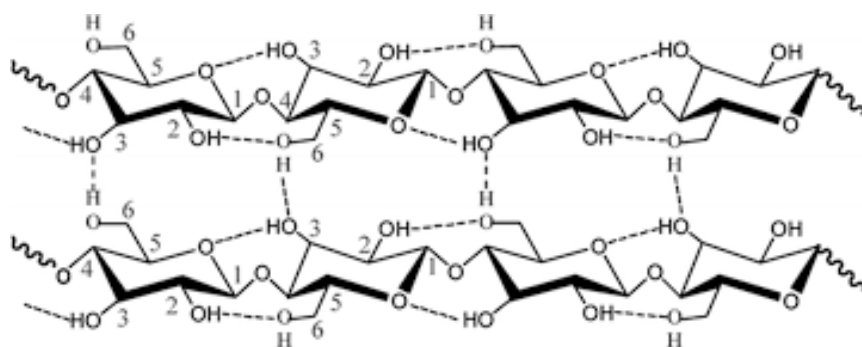


Figura 4- Estrutura química da celulose

As hemiceluloses são heteropolímeros constituídos a partir de várias hexoses (manose, glucose e galactose), pentoses (xilose e arabinose) incluindo também ácidos urónicos e apresentando substituições com grupos acetilo (Fig. 5). Em termos de estrutura molecular, as hemiceluloses apresentam uma cadeia central linear mas são sempre mais ou menos ramificadas com açúcares

ligados lateralmente à cadeia principal. As hemiceluloses são classificadas de acordo com o açúcar predominante na cadeia principal e na ramificação lateral. As xilanas são as principais hemiceluloses encontradas nas folhosas (Ren and Sun, 2010) e consistem numa cadeia com unidades de β -D-xilopiranosilo unidas por ligações glicosídicas β -(1,4), onde além da xilose podem conter arabinose, ácido glucurônico ou éter 4-O-metil, ácido acético, ácidos ferúlico e p-cumárico. As xilo-glucanas são as principais hemiceluloses nas paredes primárias das plantas superiores, e tipicamente consiste numa cadeia principal de D-glucose unidas por ligações β (1,4) contendo unidades de D-xilose unidas por ligações 1,6- α . As hemiceluloses possuem um grande número de grupos hidroxilo e acetilo na sua periferia, através dos quais podem estabelecer ligações inter-moleculares com os polímeros vizinhos. As hemiceluloses são bastante solúveis em ácidos ou soluções alcalinas, sendo hidrolisadas nos seus componentes monoméricos, apresentando uma estabilidade química e térmica inferior quando comparada com a celulose. Este facto deve-se a ausência de cristalinidade e ao seu grau de polimerização da cadeia principal mais baixo (Pereira, et al., 2003).

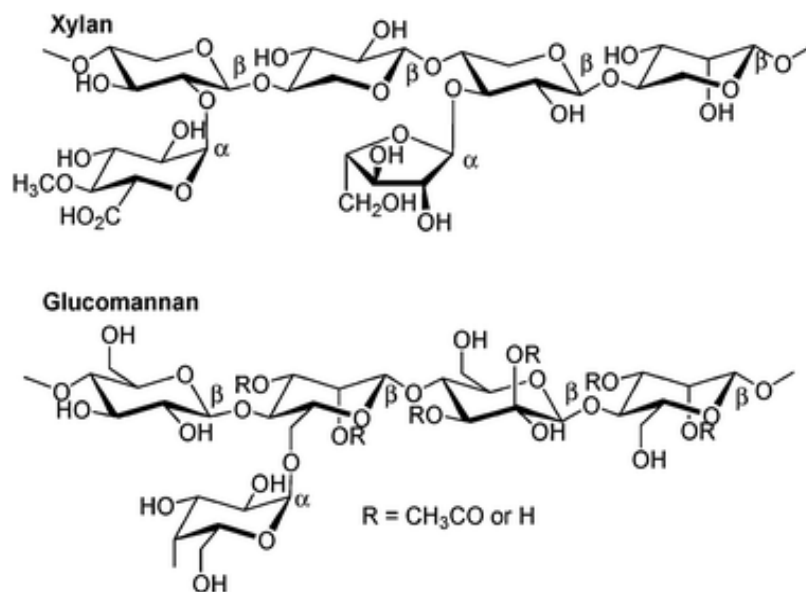


Figura 5- Estrutura química das hemiceluloses.

A lenhina é uma macromolécula formada pela polimerização de monómeros de tipo fenilpropano: os álcoois coniferílico, sinapílico e *p*-cumárico, que diferem entre si apenas no grau de substituição dos carbonos 3 e 5 por grupos metoxilo. Os monómeros da lenhina são mencionados muitas vezes apenas pela parte fenólica que os distingue: hidroxifenilo (H) (sem metoxilos), guaiacilo (G) (um substituinte metoxilo) e siringilo (S) (dois grupos metoxilo). Os monómeros encontram-se ligados entre si por dois tipos de ligações: ligações éter através do oxigénio do grupo hidroxilo do anel fenólico e ligações carbono-carbono (C-C) ditas de condensação. A maior parte as ligações encontradas nas lenhinas são do tipo éter, nomeadamente a β -O-4 e a α -O-4, que normalmente representam 50-65% de todas as ligações (Pereira *et al.*, 2003). As proporções dos monómeros participantes na construção das moléculas de lenhina dependem do material vegetal.

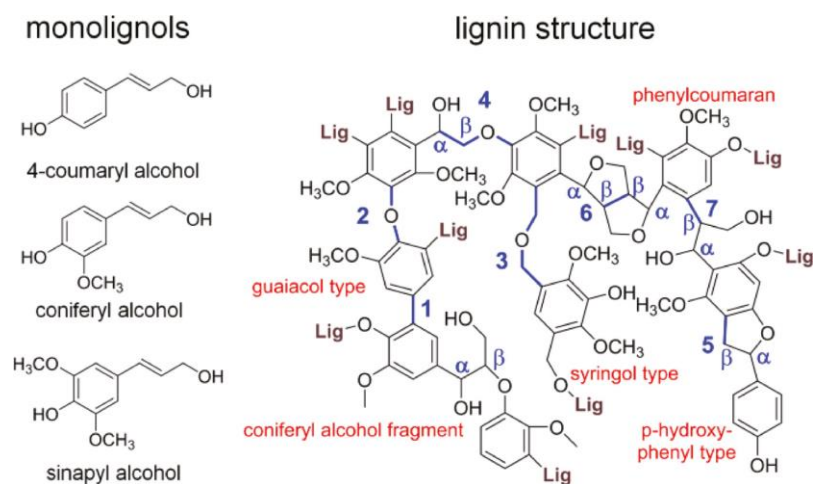


Figura 6- Álcoois percursores da lenhina: álcool cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico e a estrutura da lenhina.

2.4. Pré-tratamentos da biomassa lenho-celulósica

O pré-tratamento do material lenho-celulósico representa um passo crucial na produção de biocombustíveis a partir da biomassa lenho-celulósica. O pré-tratamento é necessário para alterar o tamanho e a estrutura macroscópica e microscópica da biomassa, bem como a sua composição e estrutura química submicroscópica, de modo que os tratamentos subsequentes sejam facilitados, por exemplo, a hidrólise da fração de polissacáridos para açúcares monoméricos possa ser alcançada mais rapidamente e com maiores rendimentos (Figura 7).

Os métodos de pré-tratamento/fracionamento incluem processos físicos (moagem e separação granulométrica e densimétrica), químicos (ácidos, álcalis, solventes orgânicos e líquidos iônicos), físico-químicos (auto-hidrólise e explosão com vapor), biológicos ou a combinação dessas abordagens.

O pré-tratamento deve atender a alguns requisitos como: alta recuperação de glúcidos ou a capacidade posterior de obter açúcares por hidrólise enzimática, ausência ou produção em quantidades muito limitadas de produtos de degradação, baixa ou nenhuma utilização de reagentes químicos, ser rentável para aplicações industriais e aplicável a uma ampla variedade de biomassas, independentemente da sua composição química.

O principal objetivo destes processos é conseguir uma separação eficiente das hemiceluloses, da celulose e da lenhina, evitando a formação de subprodutos indesejáveis como ácidos alifáticos e furanos (resultantes da degradação de açúcares) e de compostos fenólicos, minimizando os gastos energéticos e o recurso a produtos químicos.

Quadro 1: Composição química de alguns materiais lenho-celulósicos. Adaptado de Martins (2015)

Material	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lenhina (%)	Autores
Materiais agrícolas e agroindustriais				
Bagaço de azeitona	36,4	26,8	26	(Brás <i>et al.</i> , 2014)
Bagaço de cana-de-açúcar	35-42,8	26,2-35,2	16,1-25,2	(Imman <i>et al.</i> , 2013; Geddes <i>et al.</i> , 2011)
Cana de bambu	38,8	24,9	23,9	(González <i>et al.</i> , 2011)
Carolo de milho	31,7-39,4	31,9-34,7	15,9-22,3	(Cheng <i>et al.</i> , 2010; Oliveira <i>et al.</i> , 2010)
Casca de arroz	36,7-37,7	16,7-17,3	21,3,22,1	(Mancilha & karim, 2003; Vila <i>et al.</i> 2002)
Dreche cervejeira	9-18	19-31	16-25	(Prentice & D'Appolonia, 1977; Beidman <i>et al.</i> , 1987)
Palha de arroz	36,4	25,23	16,51	(Yu <i>et al.</i> , 2010)
Palha de cevada	30,8	25,3	16,7	(Nebarlatz <i>et al.</i> , 2007)
Palha de milho	42,1	29,2	17,5	(Moniz <i>et al.</i> , 2013)
Palha de trigo	31,5	25,2	15,9	(Nebarlatz <i>et al.</i> , 2007)
Palha de sorgo	43,3	23,8	21,7	(Kim & Day, 2011)
Resíduos de milho ("corn stover")	35,1-40,9	16,8-27,7	15,1-22,3	(Torget <i>et al.</i> , 1991; Lee, 1997)
Madeiras resinosas				
Abeto	43-51,1	15,2-26	27,3-29	(Fengel & Wegener, 1983; Olsson & Hahn-Hägerdal, 1996)
Pinheiro	42,9-52,2	13,5-26	26,3-30,2	(Fengel & Wegener, 1983; Rivas <i>et al.</i> , 2012)
Madeiras folhosas				
Carvalho	38,9-44	18,7-23,8	21,5-24,7	(Kim <i>et al.</i> , 2000)
Eucalipto	38-54	15-30	23,1-37	(Mirranda & Pereira, 2002; Carrasco <i>et al.</i> , 1986)

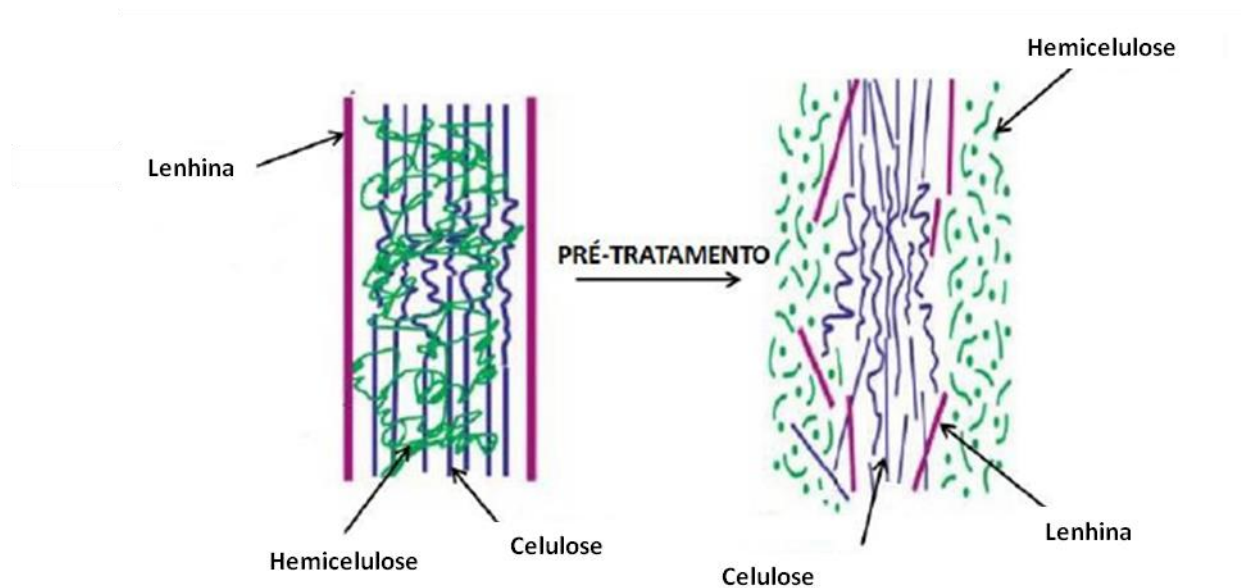


Figura 7- Processo de pré-tratamento do material lenho-celulósico. Adaptado de Martins (2015)

2.4.1. Pré-tratamentos físicos

A fragmentação mecânica tem como objectivo a desconstrução da matriz lenho-celulósica por redução do tamanho das partículas. O objectivo final é o de aumentar a área específica, aumentar a porosidade da biomassa, diminuir o grau de cristalinidade da celulose e reduzir as limitações à transferência de massa e calor (Carvalho et al, 2008). Este pré-tratamento consiste na combinação de fragmentação (10-30 mm) com a moagem e /ou trituração (0,2-2 mm). A redução de tamanho é conseguida através da combinação de diferentes tensões mecânicas, como o impacto, a compressão, a fricção ou atrito e o corte (Barakat et al., 2014). As maiores desvantagens deste processo encontram-se directamente ligadas aos elevados custos energéticos e à sua incapacidade de remover a lenhina que pode dificultar o eventual processo de hidrólise enzimática (Quilhó, 2011).

2.4.1.1. Tratamentos hidrotérmicos

Os tratamentos hidrotérmicos, em especial a auto-hidrólise (“liquid hot water”, LHW) e a explosão com vapor (“Stream explosion”, SE), baseiam-se na utilização de água ou vapor, ou ambos, e calor para o tratamento da biomassa (Carvalho et al, 2013). A auto-ionização da água gera protões que atuam como catalisadores a hidrólise das hemiceluloses, causando a clivagem dos grupos acetileno que são libertados como ácido acético. Deste modo, ocorre a dissolução total ou parcial das hemiceluloses e a sua conversão em oligossacáridos e monossacáridos

Após o pré-tratamento para hidrólise das hemiceluloses, além do licor hemicelulósico, é também obtido um resíduo sólido rico em celulose e lenhina (que poderão ser usados sozinhos ou em conjunto).

2.4.1.2. Auto-hidrólise

A auto-hidrólise utiliza água a temperaturas elevadas (> 100°C) e altas pressões (2,7 bar) para manter sua forma líquida, a fim de promover a desintegração e separação da matriz lenhocelulósica (Brodeur et al., 2011). Dessa forma, ocorre uma hidrólise relativamente elevada das hemiceluloses e uma baixa formação de compostos inibidores da actividade enzimática e microbiana em tratamentos subsequentes, enquanto a celulose e lenhina não são praticamente degradadas (Carvalho et al., 2004). Em geral, sob condições de utilização de água quente, as moléculas de água líquida podem ser ativadas, reagindo prontamente com as hemiceluloses ou moléculas de glúcidos. Assim, a hidratação dos grupos acetilo, associados à lenhina e às hemiceluloses, conduzem à acidificação do licor pela formação de iões de hidrogénio (Liu et al., 2012). A libertação desses ácidos ajuda a catalisar a despolimerização das hemiceluloses no líquido em oligossacáridos e em açúcares monoméricos que, subsequentemente, são parcialmente degradados em aldeídos (Mosier *et al.*, 2005). Desse modo, os produtos da auto-hidrólise são uma mistura de oligossacáridos, monossacáridos, ácido acético, derivados do furano, (principalmente furfural e hidroximetilfurfural (HMF)) e alguns compostos fenólicos da lenhina (Biswas e Ahring, 2016) e extrativos. A fase sólida é constituída por hemiceluloses residuais, lenhina e celulose (Chiaramonti et al., 2012).

É de salientar, que os xilo-oligossacáridos (XOS) são os principais produtos presentes nos hidrolisados provenientes da auto-hidrólise de biomassas ricas em xilanas sob condições moderadas (Gullón *et al.*, 2010). Os XOS possuem grande potencial prebiótico e podem ser usados como ingredientes ativos em muitos produtos alimentares (Aachary & Prapula, 2011). O carácter prebiótico dos XOS está relacionado principalmente com a sua capacidade de estimular o crescimento de bactérias benéficas, como bifidobactérias e lactobacilos. Entretanto, os XOS apresentam também uma gama de outras propriedades bioativas que incluem atividade antioxidante, propriedades antialérgicas, antimicrobianas, anti-infecciosas e anti-inflamatórias, atividade citotóxica, cosmética, entre outras propriedades benéficas (Moure *et al.*, 2006).

2.4.1.3. Explosão com vapor

O processo de explosão com vapor ("Stream explosion", SE) é um processo físico-químico que utiliza vapor de água saturado para o aquecimento, o que permite uma velocidade de transferência de calor elevada (Martins, 2015). Pode ser realizado com ou sem adição de produtos químicos que actuam como catalizadores (SE ou SE catalisada, respectivamente). Em geral, neste tipo de pré-tratamento são aplicadas temperaturas até 240 °C por um curto período e as principais alterações químicas, bem como a remoção de hemiceluloses permitem aumentar significativamente a digestibilidade enzimática da biomassa (Hendriks e Zeeman, 2009; Mosier et al., 2005).

Após a exposição do material, este é sujeito a uma descompressão rápida, na qual a água contida nas fibras do material vaporiza, resultando numa "explosão" (Sun & Cheng, 2002). Deste modo, dá-se uma desagregação da matriz lenho-celulósica do material, rompendo ligações intra- e intermoleculares,

resultando numa degradação do material. Este método é fundamentalmente utilizado como pré-tratamento, precedendo a hidrólise enzimática da celulose. A sua utilização como método para obtenção de hidrolisados hemicelulósicos tem a desvantagem de conduzir a uma degradação dos açúcares relativamente elevada (Sun & Cheng, 2002) quando comparado, por exemplo, com a auto-hidrólise.

2.4.2. Outros métodos de Pré-tratamentos

2.4.2.1. Pré-tratamento alcalino

Entre os processos químicos utilizados, destacam-se os processos alcalinos que embora afetem principalmente a lenhina também podem afetar as hemiceluloses. O mecanismo da hidrólise alcalina consiste na saponificação das ligações ésteres intermoleculares que ligam a lenhina às hemiceluloses (Sun & Cheng, 2002). A hidrólise alcalina também altera o grau de polimerização dos componentes do material lenho-celulósico, provocando mudanças nas propriedades físicas dos sólidos tratados, nomeadamente a área de superfície, porosidade e cristalinidade da biomassa (Kim *et al.*, 2016). Este pré-tratamento irá remover a lenhina e as hemiceluloses do material lenho-celulósico, expondo a celulose de modo a promover o aumento da eficiência da sua hidrólise enzimática. A eficiência desta hidrólise está dependente das suas condições, tais como a temperatura (até 150-200 °C) e duração (entre 30 min a semanas).

2.4.2.2. Pré-tratamento ácido

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

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

2.4.2.3. Processos Organosolv

Nos processos organosolv, ou por solventes, incluem-se todos os métodos que utilizam solventes orgânicos como agentes de deslenhificação. Têm sido testados muitos solventes: álcoois alifáticos (metanol, etanol, etilenoglicol), acetona, ácido acético, ácido fórmico, acetato de etilo, fenol, etilenodiamina, dimetilsulfóxido. A deslenhificação pode ser efectuada sem catalizadores, pois o ácido acético libertado por quebra dos grupos acetilo das hemiceluloses actuam como catalisador ao fornecer os prótons necessários à hidrólise de lenhina por catálise ácida (solvólise autocatalisada).

2.4.2.4. Pré-tratamento com líquidos iónicos (ILs)

Os líquidos iónicos (ILs) podem ser definidos como materiais compostos por um catião orgânico e um anião orgânico ou inorgânico e apresentam-se no estado líquido abaixo dos 100 °C. Estes líquidos iónicos podem dissolver os polissacáridos e/ou a lenhina. O líquido iónico cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio [BMIM]Cl combinado com um co-solvente (dimetilsulfóxido, DMSO) demonstrou ser capaz de dissolver parcialmente a madeira com tamanho inferior a 1 mm. Após a dissolução da biomassa no líquido iónico, o material rico em celulose pode ser recuperado, livre de lenhina, por precipitação com um anti-solvente, como por exemplo, água, metanol, etanol ou acetona. Após filtração, obtém-se o filtrado que é uma mistura de líquido iónico com lenhina dissolvida e anti-solvente. Depois, evapora-se o anti-solvente e a lenhina precipita. Assim, o líquido iónico pode ser recuperado e reaproveitado por destilação/evaporação do anti-solvente (Brandt *et al.*, 2013).

As principais vantagens do pré-tratamento com líquidos iónicos são o facto de não produzir produtos tóxicos ou inflamáveis, e ter boas capacidades para dissolver na totalidade a madeira. A principal desvantagem desta tecnologia prende-se com os elevados custos de recuperação e a dificuldade de recuperação total do líquido iónico o que pode tornar o pré-tratamento economicamente inviável, e de difícil implementação industrial (Brandt *et al.*, 2013).

2.4.2.5. Pré-tratamentos Biológicos

Os pré-tratamentos biológicos consistem em submeter a biomassa lenho-celulósica à acção de microrganismos ou de enzimas com o objectivo de degradar a lenhina e as hemiceluloses, conseguindo-se manter a celulose quase intacta devido à sua maior resistência face ao ataque biológico.

O Quadro 2 apresenta um resumo das vantagens e desvantagens de alguns dos principais métodos de pré-tratamento de materiais lenho-celulósicos

Quadro 2: Vantagens e desvantagens dos principais métodos de fracionamento da biomassa lenhosa-celulósica (Biswas & Ahring 2016).

Pre-tratamento	Vantagens	Desvantagens
Auto-hidrólise	Uso da água como solvente, não requer nenhum produto químico ou recuperação; utiliza temperaturas mais baixas do que a explosão com vapor; nenhuma ou pequena formação de inibidores enzimáticos ou biológicos; custo-efetivo para operação em larga escala.	Produtos solubilizados a baixa concentração; menor capacidade de remoção da lenhina; envolve grandes volumes de água.
Explosão com vapor	Não requer químicos, não necessita de reciclagem; consumo de energia comparativamente baixo; baixo custo operacional.	Destruição incompleta da lenhina e glúcidos; solubilização parcial das hemiceluloses; produz inibidores enzimáticos ou biológicos em altas temperaturas
Hidrólise ácida diluída	Uma velocidade de reação elevada; solubiliza celulose e hemiceluloses, altera a estrutura da lenhina; aumenta a área de superfície das partículas.	Uso de produtos químicos corrosivos, caros e perigosos; requer produtos alcalinos para neutralização; forma inibidores em concentrações mais altas; equipamentos e custos operacionais altos
Pré-tratamento alcalino	Aumenta a área de superfície; interrompe a estrutura da lenhina; melhora a hidrólise enzimática.	alto custo de operação; lenhinas de baixa qualidade como subproduto; custos adicionais devido ao ajuste de pH
Organosolv	Acelera a deslenhificação por dissociação do hidrogénio; possibilidade de usar temperaturas comparativamente mais baixas; lenhina e celulose reativas de alta qualidade e um fluxo aquoso de hemicelulose.	Necessidade de reciclagem do solvente para economia do processo; inibição microbiana devido ao solvente residual; perigos de explosão, preocupações ambientais, de saúde e de segurança
Líquidos iónicos	Dissolução muito eficaz da celulose; pouca ou nenhuma formação de inibidores; sintetiza produtos orgânicos de valor acrescentado.	Necessita de uma alta capacidade de reciclagem dos LI para a viabilidade do processo; ainda em fase exploratória
Biológico	Baixo consumo energético; condições de reacção moderadas, sem reagentes químicos, não gera compostos tóxicos	Velocidades de hidrólises baixas; necessidade de um meio esterilizado

Neste tipo de pré-tratamento são utilizados especialmente fungos da podridão branca (white-rot fungi) que possuem a capacidade de degradar eficientemente a lenhina em CO₂. Outros fungos capazes de degradar a biomassa lenho-celulósica são os fungos da podridão castanha que apenas conseguem modificar a lenhina, sem a degradar. As vantagens do pré-tratamento biológico são o uso de tratamentos com menor consumo energético, quando comparado com os processos químicos e físico-químicos, não necessitar de produtos químicos, ter baixos custos de capital, ser seguro e amigo do ambiente, requerendo condições de operação moderadas. No entanto, o processo é muito lento, o que o torna pouco atractivo para uso industrial (Keshwani e Cheng, 2008).

2.4.2.6. Hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática é o processo utilizado, em geral, para hidrolisar as frações celulósicas e/ou hemicelulósicas recorrendo a enzimas celulolíticas e/ou xilanolíticas após pré-tratamento dos materiais lenho-celulósico (Martins, 2015). Segundo Cara *et al.*, (2008), o objetivo do processo de hidrólise enzimática (EH) é despolimerizar os polissacáridos contidos nos substratos lenho-celulósicos pré-tratados. Devido à complexa estrutura e composição das lenho-celuloses, é necessário utilizar diferentes enzimas numa combinação apropriada para se conseguir a sua hidrólise completa.

É um processo que pode ser usado como complemento dos processos referidos anteriormente, de modo a hidrolisar a fração celulósica obtida nos seus monómeros (glucose), para que esta possa ser aproveitada noutros processos, especialmente por processos utilizando microrganismos, tais como a produção de etanol e ácidos orgânicos (Palmqvist, 2000; Martins, 2015).

Este processo requer a ação sinérgica de três enzimas: endoglucanase, exoglucanase (celobio-hidrolase) e β -glucosidases. As endoglucanases quebram as ligações glucosídicas das cadeias de celulose criando novos terminais; as exo-1,4- β -D-glucanases ou celobio-hidrolases são responsáveis pela ação nos terminais levando à formação de celobiose; e as 1,4- β -D-glucosidases que hidrolisam a celobiose em glucose. As endo-1,4- β -glucanases ou 1,4- β -D-glucano-4-glucano-hidrolases (EC 3.2.1.4) atuam aleatoriamente nas regiões amorfas da celulose, hidrolisando ligações glucosídicas β -(1,4) (Lynd *et al.*, 1999; Martins, 2015). As celobio-hidrolases (exo-1,4- β -D-glucanases, EC 3.2.1.91) atuam nos terminais redutores das cadeias de celulose, ocorrendo a formação de D-celobiose. As “ β -D-glucosidases” ou β -D- gluco-hidrolases (EC 3.2.1.21) catalisam a hidrólise em unidades monoméricas de D-glucose a partir da celobiose e celodextrinas solúveis.

As principais vantagens deste processo consistem na utilização de temperaturas moderadas as reacções ocorrem em meios não corrosivos, estando estas intimamente ligadas às vantagens económicas do processo (baixo custo energético e de equipamento). Contudo, este tipo de processo possui desvantagens que se prendem principalmente com o custo das enzimas, dificuldade da sua recuperação, e do facto de ser demorado, quando comparado com outros processos (Duarte *et al.*, 2004; Martins, 2015).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Matérias-primas e enzimas

Neste estudo utilizou-se, como matérias-primas, o bagaço de azeitona extractado e o caroço de azeitona de lagar de duas fases. O bagaço de azeitona extractado corresponde ao resíduo sólido obtido após extracção do óleo de bagaço de azeitona com n-hexano. Este bagaço não foi completamente descarado, de modo a facilitar a extracção do óleo por hexano. Antes do processo de extracção do óleo as partículas de caroço triturado foram separadas por centrifugação e também utilizadas neste estudo. As amostras de bagaço e de caroço de azeitona foram fornecidas pela empresa UCASUL-União de Cooperativas UCRL (Alvito, Beja, Portugal).

As preparações enzimáticas líquidas usadas foram gentilmente doadas pela Novozymes A/S (Bagsvaerd, Dinamarca): “Saczyme Yield” (nomeada ao longo do texto como Saczyme) é uma mistura de amiloglucosidases, celulasas e beta-glucosidases; “Celluclast 1.5 L” (nomeada ao longo do texto como Celluclast) consiste em celulasas de *Trichoderma reesei*, e “Ultimase BWL 40” (nomeada ao longo do texto como Ultimase) é uma mistura de enzimas de beta-glucanases/xilanases de uma estirpe selvagem (não OGM) de *Trichoderma reesei* desenvolvida para aplicações no fabrico de cerveja.

3.2 Análise química de matérias-primas e sólidos pré-tratados

3.2.1 Preparação da amostra

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

3.2.2 Determinação do teor de humidade

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

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

Para cada amostra, o ensaio foi realizado em duplicado.

3.2.3 Determinação do teor de cinzas

O teor de cinzas foi obtido gravimetricamente após incineração das amostras (TAPPI T 221 om-02). A incineração foi feita numa mufla (Heraeus MR 170 E) a 525°C em 2g de amostra seca, durante cerca de 24 horas até completa oxidação dos materiais orgânicos presentes.

O teor de cinzas foi determinado pela Equação 2

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

Para cada amostra o ensaio foi realizado em duplicado.

3.2.4 Determinação de extractivos pelo método de Soxhlet

A determinação dos extractivos teve por base a norma TAPPI 204 cm⁻⁹⁷. Foram pesados cerca de 2,2 g de amostra seca da fração 40-60 mesh para cartuchos de extração e submetidos a extracções sucessivas, em aparelho de Soxhlet, com solventes de polaridade crescente: diclorometano, etanol e água destilada. Utilizaram-se cerca de 170 mL de cada solvente, tendo-se feito a extracção durante 6h com diclorometano, 16h com etanol e 16h com água.

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

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

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

Para cada amostra, a determinação foi realizado em duplicado.

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

3.2.5 Determinação do teor de lenhinas

3.2.5.1 Determinação da lenhina de Klason

A determinação da lenhina Klason foi seguida de acordo com a norma TAPPI 222 om⁻⁰² (2002) que quantifica a lenhina Klason como o resíduo insolúvel resultante do ataque químico do material com ácido forte. Foram pesados 0,35g de amostra previamente extractada e seca, para um copo de precipitação. Foram adicionados 3 mL de H₂SO₄ a 72% (m/m), e a mistura colocada num banho-maria termostático a 30°C, durante 1 hora, com agitação ocasional, utilizando uma vareta de vidro. De seguida, a mistura foi transferida para um frasco de vidro com tampa hermética e adicionados 84 mL de água destilada de modo a diluir o ácido até uma concentração de 4% (V/V). De seguida os frascos

de vidro com as amostras foram colocados numa autoclave (Certoclav-EL 12/18L) durante 1 hora a 120°C. Quando atingido o tempo de reacção, após a descompressão da autoclave, os fracos foram retirados da autoclave e arrefecidos em gelo. Após o arrefecimento, procedeu-se à filtração da mistura recorrendo a cadinhos de placa porosa (porosidade 4), previamente secos e tarados. O resíduo insolúvel em ácido retido no cadinho filtrante (lenhina Klason) foi lavado com água destilada. O filtrado foi guardado para a determinação do teor de lenhina solúvel e dos açúcares estruturais.

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

O teor de lenhina Klason foi determinada após secagem do resíduo e corrigida em relação ao teor de extractivos e de cinzas, de acordo com as Equações 4 e 5.

$$A \text{ (Lenhina KLASON sem correcção (\%))} = \frac{m_{\text{resíduo amostra}}}{m_{\text{amostra seca}}} \times 100 \quad \text{(Equação 4)}$$

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

Para cada amostra, a determinação foi realizado em duplicado.

3.2.5.2 Determinação da lenhina solúvel

A determinação da lenhina solúvel em ácido foi efetuada de acordo com a norma TAPPI UM 250 (1993). A lenhina solúvel em ácido foi determinada através da absorção no ultravioleta (205 nm) do filtrado (250 mL) resultante da determinação da lenhina Klason. Foram pipetados 2mL ou 1mL do filtrado, de caroço e de bagaço de azeitona, respetivamente, para um tubo de ensaio e perpez-se o volume até aos 20mL, com água destilada. A leitura da absorvância a 250nm foi realizada num espectrofotómetro (UV-160A Recording Spectrophotometer, Shimadzu) contra água destilada.

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

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

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

Para cada amostra, a determinação foi realizada em duplicado.

3.3 Composição dos açúcares estruturais

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

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

3.4 Tratamento hidrotérmico - Auto-hidrólise

As amostras de bagaço e de caroço de azeitona foram hidrolisadas em autoclave (ajc Uniclave 88), em frascos Shott de 500mL de capacidade com tampa hermética, com as seguintes condições operatórias (Fernandes *et al*, 2016): Foram colocados 375mL de água destilada e 125g de cada amostra (razão sólido/líquido de 1:3, m/v) nos frascos shot com tampa hermética e introduzidos numa autoclave a 130°C. Quando atingido o tempo de reacção pretendido (130min), procedeu-se a descompressão da autoclave e os fracos foram retirados e arrefecidos em gelo.

A separação sólido-líquido foi realizada por filtração recorrendo a cadinhos de placa porosa (porosidade Q), previamente secos e tarados. As fracções sólidas foram cuidadosamente lavadas com água destilada e secas até massa constante, inicialmente numa estufa a 60°C, durante 24 horas e de seguida numa estufa a 100°C, durante 24 horas. Por fim foram pesados e determinada a percentagem de sólidos insolúveis e a percentagem sólidos solúveis presentes no hidrolisado resultante. O material insolúvel (resíduo sólido) proveniente da etapa de hidrólise foi quimicamente analisado, com a determinação do teor de lenhina Klason e lenhina solúvel e composição e quantificação dos açúcares estruturais.

Os efeitos do tempo e da temperatura da auto-hidrólise foram interpretados pelo fator de severidade, $\log R_0$, usado como medida de severidade do processo de degradação dos polissacáridos (Overend *et al.*, 1987).

$$R_0 = \int_0^t \exp\left(\frac{T-100}{14.75}\right) dt \quad (\text{Equação 7})$$

onde a temperatura (T, °C) é uma função do tempo (t, min), e 14,75°C⁻¹ é um parâmetro empírico relacionado com a energia de ativação e temperatura.

3.5 Quantificação da actividade total da Celulase (Filter Paper Activity)

A actividade total de celulase foi quantificada de acordo com o protocolo da IUPAC (Ghose, 1987; Adney e Baker, 2008) utilizando papel de filtro como substrato, sendo a actividade enzimática expressa como “unidades de papel de filtro” (“Filter-paper Units”, FPU) por volume de enzima. Devido à heterogeneidade do substrato sólido, o rendimento em açúcares redutores durante a hidrólise não é uma função linear da quantidade de celulase presente. Isto significa que o dobro da quantidade de enzima não representa duas vezes o rendimento em açúcares redutores em igual tempo de reacção. Uma FPU é a quantidade de enzima que produz 2mg de glucose a partir de 50mg de papel de filtro, após 60min de hidrólise, a 50°C. A actividade celulásica total de uma preparação enzimática é expressa em FPU por mL da solução original de enzima (não diluída).

Para determinação da actividade celulásica das diferentes preparações utilizadas, preparou-se uma solução diluída de 1:20 (v:v) em solução tampão de citrato (pH 4,8) a partir de cada solução enzimática original. Desta solução, prepararam-se 5 diluições, de acordo com o Quadro 3

Quadro 3: Soluções utilizadas na determinação da actividade celulásica das preparações enzimáticas utilizadas.

Volume de solução tampão (mL)	Volume de solução enzimática 1:20 (mL)	Velocidade de diluição
1,900	0,1	0,0025
1,85	0,15	0,00375
1,8	0,2	0,005
1,7	0,3	0,0075
1,65	0,35	0,00875

As diluições usadas para cada enzima, são traduzidas em termos de concentração de enzimas de acordo com a expressão seguinte:

$$[enzima] = \frac{1}{D} = \frac{V_{enz(dil)}}{V_{total(dil)}} \quad (\text{Equação 8})$$

Onde D é a diluição, $V_{enz(dil)}$ é o volume da enzima na diluição e $V_{total(dil)}$ é o volume total de diluição.

A solução tampão de citrato (50 mM, pH 4,8) foi preparada a partir da diluição (19 vezes) em água destilada de uma solução tampão de citrato 1 M, pH 4,5. Para preparar a solução a pH 4,5, dissolveram-se 210g de ácido cítrico mono-hidratado em 750 mL de água destilada, e adicionaram-se 50-60g de hidróxido de sódio, até se atingir o valor pH 4,3. Em seguida esta solução foi diluída até cerca de 1000mL e o pH ajustado a 4,5, se necessário.

Para cada diluição, prepararam-se os seguintes tubos em duplicado, contendo:

- Uma tira de papel de filtro enrolado (50mg, 1,0 x 6,0cm), submersa em 1mL de solução tampão pH 4,8 e 0,5 mL de solução de enzima diluída;
- Uma tira de papel de filtro enrolado (50mg, 1,0 x 6,0 cm), submersa em 1mL de solução tampão pH 4,8 (branco sem enzima)
- Um mL de solução tampão pH 4,8 e 0,5mL de solução de enzima diluída (branco sem substrato);

Em cada ensaio, os açúcares redutores foram quantificados em alíquotas de 25µL do meio reaccional tendo por base a quantificação das concentrações de glucose (mg/mL) determinadas através do método colorimétrico fenol sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956).

A actividade enzimática foi calculada subtraindo os valores de glucose obtidos nos ensaios apenas com o substrato e nos ensaios apenas com enzima.

Para calcular a actividade total da celulase (FPU/mL), foi estimada a concentração de enzima necessária para libertar exactamente 2,0mg de glucose, traçando uma curva da glucose libertada em função da concentração da enzima. A actividade total da celulase foi calculada através da expressão.

$$FPU = \frac{0,37}{[Enzima] \text{ para libertar } 2 \text{ mg glucose}} \text{ Unidades/mL} \quad (\text{Equação 9})$$

Onde, *[Enzima]* é a concentração de celulase necessária para libertar 2,0mg de glucose

3.6 Quantificação da actividade β- glucosidase

A actividade enzimática β- glucosidase foi quantificada de acordo com o protocolo da IUPAC (Ghose, 1987; Zhang *et al.*, 2009) utilizando celobiose como substrato. A actividade enzimática da β- glucosidase (celobiase) foi expressa em termos de “unidades internacionais” (IU) por mL da solução enzimática original (IU/mL). Uma IU é a quantidade de enzima que produz 1 micromole de glucose/min a partir da hidrólise da celobiose. Para determinar a actividade enzimática foi estimada a concentração de enzima necessária para libertar exactamente 1,0mg de glucose, traçando uma curva da glucose libertada em função da concentração da enzima.

Os açúcares solúveis totais foram quantificados tendo por base a quantificação das concentrações de glucose (mg/mL) determinadas através do método colorimétrico fenol sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956).

A actividade da β - glucosidase foi calculada segundo a expressão

$$(IU/mL) = \frac{0,0926}{[Enzima] \text{ para libertar } 1,0 \text{ mg glucose}} \quad (\text{Equação 10})$$

3.7 Determinação de açúcares totais método fenol sulfúrico

Os açúcares totais foram determinados pelo método fenol-sulfúrico. Este método, segundo Dubois *et al.* (1956), fundamenta-se no facto de que os açúcares simples (monossacáridos) ou complexos (polissacáridos), e seus derivados, incluindo ésteres metílicos com grupos redutores livres ou potencialmente livres, quando tratados com fenol e ácido sulfúrico concentrado, originam compostos de coloração amarelo-alaranjado, com uma reacção sensível e coloração estável. Este método permite dosear os açúcares solúveis totais. Este método baseia-se na degradação dos açúcares por ácido forte e/ou temperaturas altas, que levam à produção de derivados de furano, que por sua vez condensam, produzindo substâncias de cor castanha e preta. Quanto maior a intensidade da cor, maior a concentração de açúcares, podendo esta concentração ser determinada por espectrofotometria, medindo-se a absorvância a 490nm, após a reacção.

A partir de uma solução de glucose em água (1g/L), foram preparadas as soluções padrão com diferentes concentrações (entre 10 e 100mg/L) para obtenção da curva de calibração.

A 0,1mL de amostra (de cada diluição da solução de glucose) foram adicionados 1mL da solução de fenol (5%, v/v) e 2,5mL da solução de ácido sulfúrico concentrado (98%, m/m). Como a reacção é exotérmica, a mistura ficou a repousar durante 30 minutos à temperatura ambiente. Seguidamente foi efectuada a leitura no espectrofotómetro a 490nm, que corresponde ao comprimento de onda para detecção da glucose. Para obter a curva de calibração foi construído o gráfico da concentração de açúcares em função da absorvância.

A quantificação dos açúcares ao longo da hidrólise enzimática foi realizada em alíquotas de 25 μ L do meio reaccional a que se adicionaram 75 μ L de tampão citrato pH 4,8 (50 mM), 1mL de solução de fenol (5 %, v/v) e 2,5mL de H₂SO₄ concentrado (96 % m/m).

3.8 Hidrólise enzimática (sacarificação)

Após a auto-hidrólise, os resíduos sólidos obtidos do bagaço de azeitona e do caroço da azeitona foram utilizados como substratos para a sacarificação catalisada por Saczyme, Celluclast ou Ultimase. O meio reaccional consistiu em 40mL de uma suspensão do substrato seco em diferentes concentrações (10, 20 e 30% m/v) em solução tampão de citrato a pH 4,8. A quantidade de enzima usada em cada ensaio foi de 45 FPU/g de substrato seco (Fernandes *et al.*, 2016). As reacções foram realizadas a 50°C em reactores de vidro cilíndricos de 70mL com parede dupla para circulação de água e manutenção da

temperatura, fechados com uma rolha, sob agitação magnética. As reações foram realizadas em duplicado e foram retiradas amostras de 0,5mL ao longo de 48h de reacção. Em cada toma, a glucose foi quantificada em triplicado usando o método do fenol-sulfúrico. Assim, para cada tempo de reacção, a quantidade de glucose produzida foi o valor médio de 6 medições (3 de cada reactor).

Os resultados obtidos foram expressos da seguinte forma:

- Concentração de glucose por mL de meio reaccional;
- Massa de glucose (g) por kg de bagaço ou caroço;
- Conversão (%) de glucanas em glucose no bagaço e caroço, considerando os teores iniciais de 11,9% e 16% (m/m) de glucanas, respectivamente.
- Velocidade inicial de hidrólise (mg glucose/h), determinada como o declive da recta ajustada à produção de glucose durante as primeiras horas de reacção (até 3 horas de reacção).

3.9 Espectroscopia de FTIR

A espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) foi realizada usando pastilhas de KBr. Cada amostra ultra-moída com diametro inferior a 0,074mm (>200 mesh) foi seca em estufa a 60 °C durante a noite e uma alíquota de 1,5mg foi misturada com 200 mg de KBr num almofariz. Os pellets de KBr foram preparados com um compressor Carver C40000-544 e analisados em um espectrómetro Bruker FT-IR (Alpha 100382) equipado com um acessório detector de pellet KBr (Alpha-T), realizando 24 “scans” por amostra com uma resolução de 4cm⁻¹ e gama de número de onda de 375-4000 cm⁻¹. O tratamento dos dados foi realizado utilizando o software OPUS 6.5 da Bruker.

3.10 Imagens de microscopia electrónica de varrimento

As imagens de microscopia electrónica de varrimento (MEV) de bagaço e caroço de azeitona extratados, antes da auto-hidrólise, após auto-hidrólise e após hidrólise enzimática, foram realizadas em um microscópio electrónico de varrimento (MEV) Hitachi® 3030 Plus a 5 kV com diferentes ampliações e as imagens foram gravadas em formato digital.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Composição química do bagaço de azeitona extractado

A composição química do bagaço e do caroço de azeitona extractados (expressas em % de matéria seca em estufa, % m.s.) está detalhada no Quadro 4. Existem diferenças consideráveis na composição química das amostras de bagaço e caroço.

Quadro 4: Composição química do bagaço e do caroço de azeitona extractados (expressas em % de matéria seca em estufa, % m.s.)

	Bagaço	Caroço
Cinza	7,3	0,6
Extractivos:	34,4	13,7
Diclorometano	8,0	7,8
Etanol	12,4	3,1
Água	14,0	2,8
Lenhina total	31,2	42,1
Lenhina Klason	27,0	39,8
Lenhina solúvel	4,2	2,3
Polissacáridos:	36,5	45,8
Glucose	13,8	15,3
Xilose	18,9	20,3
Manose	0,5	0
Galactose	0,2	0,4
Arabinose	0,6	0,8
Ramnose	0,2	0,3
Acido Galacturónico	0,3	0,7
Acido Glucurónico	0	0,1
Grupos acetilo	2,0	7,9

O bagaço de azeitona extractado é caracterizado pelo alto teor de extractivos (34,4%), com considerável proporção de extractivos solúveis em etanol e em água (76,7 % do total de extractivos). Os extractos lipofílicos solúveis em diclorometano, que incluem uma fracção oleosa residual, representaram 8,0 % do bagaço (massa seca). Ruggeri *et al.* (2015) referem um teor de 7,5% de extractivos lipossolúveis no bagaço após extracção industrial do óleo. Essa fracção lipofílica residual provavelmente consiste em compostos de oxidação lipídica e acilgliceróis de ácidos oxidados, que são extraídos apenas em quantidades muito pequenas pelo hexano, durante a operação de extração por solvente industrial (Wolff, 1997). Eles podem ser extraídos com diclorometano, que é um solvente mais hidrofílico.

O teor de cinza da amostra de bagaço de azeitona estudada foi de 7,3 %. Este valor é mais alto do que outros valores reportados, por exemplo 4,4% (Fernandes *et al.*, 2016) e 6% (Ruggeri *et al.*, 2015). Os componentes estruturais do bagaço de azeitona extractado (Quadro 4) incluem 31,2 % de lenhina e 36,5 % de polissacáridos (13,8 % de glucanas e 22,7% de hemiceluloses). No geral, os valores obtidos estão de acordo com os valores publicados para a composição química do bagaço de azeitona extractado: Leite *et al.* (2016) relataram 41,6% de lenhina e 35,3% de polissacáridos (11,2% de celulose e 24,1% de hemiceluloses). Fernandes *et al.* (2016) referiram 33,9% de lenhina Klason, 22,9 % de glucanas e 23,3% de hemiceluloses, e Ruggeri *et al.* (2015) relataram 37% de lenhina e 49,5% de celulose e hemiceluloses. O bagaço de azeitona de duas fases é composto principalmente por água (60-70%), polissacáridos da parede celular (18-20 %), lenhina (13-15 %), óleo retido na polpa (2,5-3,0 %) e sólidos (2,5 %) (Borja *et al.*, 2002; Coimbra *et al.*, 2010).

Os polissacáridos no bagaço de azeitona extractado (Quadro 4) mostram uma predominância de xilanas acetiladas, isto é, a xilose representa 51,9 % do total de unidades monoméricas, os grupos acetilo representam 5,5 %, enquanto a glucose corresponde a 37,8% do total de unidades monoméricas. O teor de arabinose, manose, galactose e ácidos urónicos é baixo, representando 1,6%, 1,4 %, 0,6 % e 0,8 %, respectivamente. Coimbra *et al.* (2010) referiram que a parede celular de bagaço de azeitona consiste principalmente na mesma proporção de hemiceluloses (ricas em xilanas, glucuronoxilanas, xilo-glucanas, bem como mananas) e celulose.

A composição estrutural do bagaço de azeitona extractado indica claramente uma via potencial para a valorização das hemiceluloses pela produção de xilo-oligosacáridos (XOS) e monossacarídeos usando tratamentos suaves, como o tratamento hidrotérmico que foi usado neste estudo. De facto, os tratamentos hidrotérmicos mostraram-se eficientes e ecologicamente adequados para o fraccionamento de vários tipos de biomassa rica em hemiceluloses, permitindo uma hidrólise selectiva das hemiceluloses e uma alta recuperação de XOS solúvel, como a palha de milho (Moniz *et al.*, 2013), palha de arroz (Moniz *et al.*, 2014) e a “dreche” cervejeira (Carvalho *et al.*, 2004).

4.2 Composição química do caroço de azeitona

O caroço de azeitona difere claramente quimicamente do bagaço, pois apresenta uma natureza lenhocolúscica típica, com baixo teor de cinza e proteína, e contém 2,5 vezes menos extractivos do que os observados no bagaço (Quadro 4). O caroço de azeitona é um material altamente lenhificado com 42,1% de lenhina e 45,8% de polissacáridos (15,3 % de glucanas e 30,4% de hemiceluloses). As hemiceluloses principais são xilanas altamente acetiladas, isto é, a xilose representa 44,4% do total de unidades monoméricas e os grupos acetilo representam 17,3%, enquanto a glucose corresponde a 33,5 % do total de unidades monoméricas. O teor de arabinose, galactose e de ácidos urónicos foi baixo, representando 1,8 %, 0,9 % e 1,8 %, respectivamente, enquanto a manose não foi detectada.

Estudos anteriores sobre a composição química do caroço de azeitona referem uma variação de composição que engloba os resultados encontrados no presente trabalho: 20,1-40,4% de celulose, 18,5-32,5% de hemiceluloses, 25,3-48,4% de lenhina insolúvel em ácido, 8,9- 10,5% de extractivos e

0,5-3,3% de cinzas (Fernández-Bolaños *et al.*, 1999; Demirbaş 2002; Hernández *et al.*, 2014; Cuevas *et al.*, 2015; Romero-García *et al.*, 2016). Coimbra *et al.* (1995) isolaram e caracterizaram os polissacáridos da parede celular do caroço de azeitona e descobriram que eles são ricos em xilose e glucose, com glucuronoxilanos como os principais polissacáridos não celulósicos (em mol %: 1% ramnose, 2% arabinose, 48% xilose, 1% de galactose, 41% de glucose e 8% de ácidos urónicos). Saleh *et al.* (2014) também relataram que as hemiceluloses do caroço de azeitona são ricas em grupos xilose e acetilo (20,6% e 4,0%, respectivamente). A caracterização química do bagaço de azeitona extractado e do caroço de azeitona mostrou que eles possuem xilanas hemicelulósicas como as principais estruturas polissacarídicas. Estes compostos podem ser valorizados por um pré-tratamento para a produção de XOS e açúcares monoméricos, antes da consideração da hidrólise enzimática da fracção celulósica remanescente para a produção de glucose para fermentação.

4.3 Pré-tratamento hidrotérmico

O Quadro 5 apresenta os rendimentos e a composição química dos resíduos sólidos obtidos após os tratamentos hidrotérmicos realizados nas amostras extraídas do bagaço de azeitona e caroço de azeitona.

O pré-tratamento visa modificar a estrutura do sólido para melhorar a hidrólise enzimática subsequente da celulose. As principais variáveis na auto-hidrólise são a temperatura e o tempo de reacção. O tratamento hidrotérmico foi realizado apenas com água (ou seja, auto-hidrólise não catalisada) e a uma temperatura de 130°C durante 130 min, que corresponde a um factor de severidade de $\log R_0$ igual a 2,99, que é baixo em comparação com a maioria dos tratamentos hidrotérmicos aplicados a uma ampla gama de matérias-primas referidas na literatura. O tratamento hidrotérmico solubilizou 25,5 % do bagaço de azeitona extractado e 13,3% do caroço de azeitona, ou seja, o rendimento em sólidos obtido foi de 74,5% e 86,7%, respectivamente (Quadro 5). Como esperado, a auto-hidrólise afectou principalmente as hemiceluloses, resultando em 65% e 75% de solubilização das hemiceluloses originais do bagaço de azeitona extratado e do caroço de azeitona, respectivamente, especialmente de xilanas (cerca de 65% das xilanas originais) e grupos acetilo, todos destruídos durante a auto-hidrólise.

Quadro 5: Rendimento mássico após tratamento hidrotérmico do bagaço e do caroço de azeitona e caracterização química dos resíduos sólidos (% m.s.)

	Bagaço	Caroço
Rendimento em sólidos (% do material inicial em base seca)	74,5	86,7
(% m.s.)		
Cinza	3,9	0,3
Lenhina total	53,1	55,8
Lenhina Klason	52,1	54,2
Lenhina solúvel	1,0	1,6
Polissacáridos		
Glucose	11,9	16,0
Xilose	9,2	7,6
Manose	0	0

Em contraste com as hemiceluloses, as glucanas permaneceram essencialmente inalteradas no caroço de azeitona pré-tratado (91% das glucanas iniciais). Contudo, para o bagaço de azeitona extractado, ocorreu uma despolimerização de glucanas em oligossacáridos e glucose em certa extensão, isto é, 35% das glucanas originais foram solubilizadas, apesar das condições relativamente suaves de auto-hidrólise usadas neste estudo. Isto pode ser explicado pela hidrólise de xilo-glucanas hemicelulósicas do bagaço de azeitona, enquanto a fração de celulose permaneceu no sólido. A lenhina não foi solubilizada pelo tratamento hidrotérmico, pois apenas 1% da lenhina inicial em ambos os resíduos foi removida. Portanto, o teor de lenhina nos materiais auto-hidrolisados aumentou em comparação com a composição dos materiais iniciais para 53,1 % e 55,8 % no bagaço e caroço de azeitona, respectivamente (Quadro 4 e 5). O Quadro 6 mostra alguns exemplos de tratamentos térmicos realizados com bagaço de azeitona extractado, polpa de azeitona e caroço, e condições de sacarificação enzimática utilizadas.

Cuevas *et al.* (2015) realizaram um pré-tratamento de auto-hidrólise ao caroço de azeitona sob condições não isotérmicas com diferentes factores de severidade e observaram que os ensaios realizados a $\log R_0$ inferior a 3,0 não influenciaram os principais componentes estruturais do caroço, enquanto se verificou a solubilização completa da fracção hemicelulósica com tratamentos com factores de severidade próximo de 3,70. Ballesteros *et al.*, (2002a) avaliaram os efeitos da (explosão com vapor) de polpa de azeitona a diferentes temperaturas (150 a 250 °C) sob condições não isotérmicas e relataram que as hemiceluloses foram o principal constituinte extraído em todos os ensaios, com uma solubilização parcial somente quando se aplicaram pré-tratamentos mais leves a 150 e 180°C. Fernandes *et al.* (2012) estudaram a auto-hidrólise sob condições não isotérmicas de bagaço de azeitona extractado e mostraram que para temperaturas inferiores a 170°C, a composição do sólido pré-tratado ainda é semelhante à da matéria-prima, mas para temperaturas mais altas, os

teores relativo de glucanas e de lenhina insolúvel aumentaram significativamente enquanto o teor de hemiceluloses diminuiu significativamente, especialmente para os grupos arabinanas, xilanas e acetilo.

A auto-hidrólise aplicada a diferentes materiais de biomassa (palha de milho e palha de arroz) mostrou também que o efeito principal é observado nas hemiceluloses com pouco impacto nas fracções de celulose e lenhina (Moniz *et al.*, 2013, 2014). Com as condições suaves usadas no presente estudo, o tratamento hidrotérmico actuou como um solvente para os extractivos polares dos materiais, verificando-se apenas uma solubilização parcial das xilanas. De modo a conseguir-se uma remoção substancial de hemiceluloses a partir do bagaço e do caroço de azeitona extractado, para a produção de xilo-oligossacáridos (XOS), o pré-tratamento hidrotérmico deve ser optimizado em termos de temperatura e tempo, nomeadamente utilizando factores de severidade mais elevados (factores de severidade = 4,8; 225°C/10min).

Quadro 6: Condições de pré-tratamento e sacarificação de bagaço e caroço de azeitona realizados por vários autores.

Material	Pré-tratamento	Enzimas	[Enzimas]	Carga sólida (% m/v)	Condições de reacção	Conversão de glucanas	Kg Glucanas/100 kg de material seca	Referências
Polpa de azeitona	Sem tratamento	Celluclast 1.5 L	7.5 – 30 FPU/g	5, 10, 15 e 20	T = 50°C; t = 72 h; pH = 4.8	para 30 FPU/g: 40 – 50% (independente da concentração de substrato)	5% polpa: 7.2 10% polpa: 8.3 15% polpa: 7.7 20% polpa: 6.9	Ballesteros et al. (2002b)
Bagaço de azeitona extractado	Auto-hidrólise não isotérmica (150-230°C)	Celluclast 1.5 L	45 FPU/g	5	T = 50°C; t = 72 h; pH = 4.8	150°C: 8.72% 230°C (Melhor resultado): 83%	1.74 27.8	Fernandes et al. (2012)
	Auto-hidrólise não isotérmica (230°C)	Celluclast 1.5 L	5.73 FPU/g 11.46 FPU/g	5	T = 50°C; t = 6 d; pH = 4.8	47% 60%	15.7 20.1	
Bagaço de azeitona extractado	Hidrólise ácida diluída (3,5% de ácido sulfúrico; 130°C / 130 min)	Celluclast 1.5 L	45 FPU/g	5	T = 50°C; t = 72 h; pH = 4.8	8.9%	2.8	Fernandes et al. (2016)
		Celluclast 1.5 L + Novozyme 188 (β - glucosidase)	20 FPU/g + 14 CBU/g	15	T = 50°C; t = 72 h; pH = 4.8	22%	5.87	

Material	Pré-tratamento	Enzimas	[Enzimas]	Carga sólida (% m/v)	Condições de reacção	Conversão de glucanas	Kg Glucanas/100 kg de material seca	Referências
Bagaço de azeitona extractado	Valor de severidade da auto-hidrólise =2.99 (130°C/130 min)	Celluclast 1.5 L Saczyme Yield Ultimase BWL 40	45 FPU/g	10, 20 e 30	T = 50°C; t = 48 h; pH = 4.8	Melhor resultado: Celluclast: 45% (20% Carga; 24h); Saczyme: 80% (30% Carga; 5h); Ultimase: 90% (30% Carga; 5h)	Best results: Celluclast: 5.4 (20% Carga; 24h); Saczyme: 9.4 (30% Carga; 5h); Ultimase: 11.6 (30% Carga; 5h);	Estudo presente
Caroço de azeitona	Explosão com vapor (210°C/4 min)	Celluclast 1.5 L	15 FPU/g	10	T = 50°C; t = 72 h; pH = 4.8	40%	16.4	Ballesteros <i>et al.</i> , (2002b)
	Impregnação do caroço com ácido sulfúrico (0.5%, w/v) + explosão com vapor	Celluclast 1.5 L	15 FPU/g	10	T = 50°C; t = 72 h; pH = 4.8	53%	22.3	
Caroço de azeitona	Hidrólise ácido diluída (0.25 % ácido sulfúrico; 195°C/5 min)	Celluclast 1.5 L	10, 20 40 e 60 FPU/g sólido	10	T = 50°C; t = 72 h; pH = 4.8	Melhor resultado: 56% (40 ou 60 FPU/g)	21.9	Saleh <i>et al.</i> , (2014)

Material	Pré-tratamento	Enzimas	[Enzimas]	Carga sólida (% m/v)	Condições de reacção	Conversão de glucanas	Kg Glucanas/100 kg de material seca	Referências
Caroço de azeitona	Melhor resultados da auto-hidrólise: Valor de severidade = 4.81 (225°C/10min)	Celluclast 1.5 L	20 FPU/g sólido	10	T = 50°C; t = 72 h; pH = 4.8	54.3%	12.6	Cuevas <i>et al.</i> , (2015)*
Caroço de azeitona	Valor de severidade da auto-hidrólise=2.99 (130°C/130 min)	Saczyme Yield Ultimase BWL 40	45 FPU/g	10, 20 e 30	T = 50°C; t = 48 h; pH = 4.8	Saczyme: 35% (10% Carga; 5 h); 41% (20% Carga; 5 h); 38% (30% Carga; 5 h) Ultimase: 88% (10% Carga; 24 h); 55% (20 ou 30%; 5 h)	Saczyme: 5.7 (10% Carga; 5h); 6.7 (20% Carga; 5h); 6.2 (30% Carga; 5h) Ultimase: 14.2 (10% Carga; 24h); 8.8 (20% Caroço; 5h); 8.2 (30% Caroço; 5h)	Estudo presente Novozyme 188 (β - glucosidase)

4.4 Análise de FTIR

As alterações composicionais do material auto-hidrolisado também foram seguidas por espectroscopia de infravermelho médio (*Fourier Transformed Infrared Spectroscopy*, FTIR) (Fig. 8). As características espectrais do bagaço extractado e do caroço de azeitona estão de acordo com a composição química determinada pelo teor de humidade (Quadros 4 e 5).

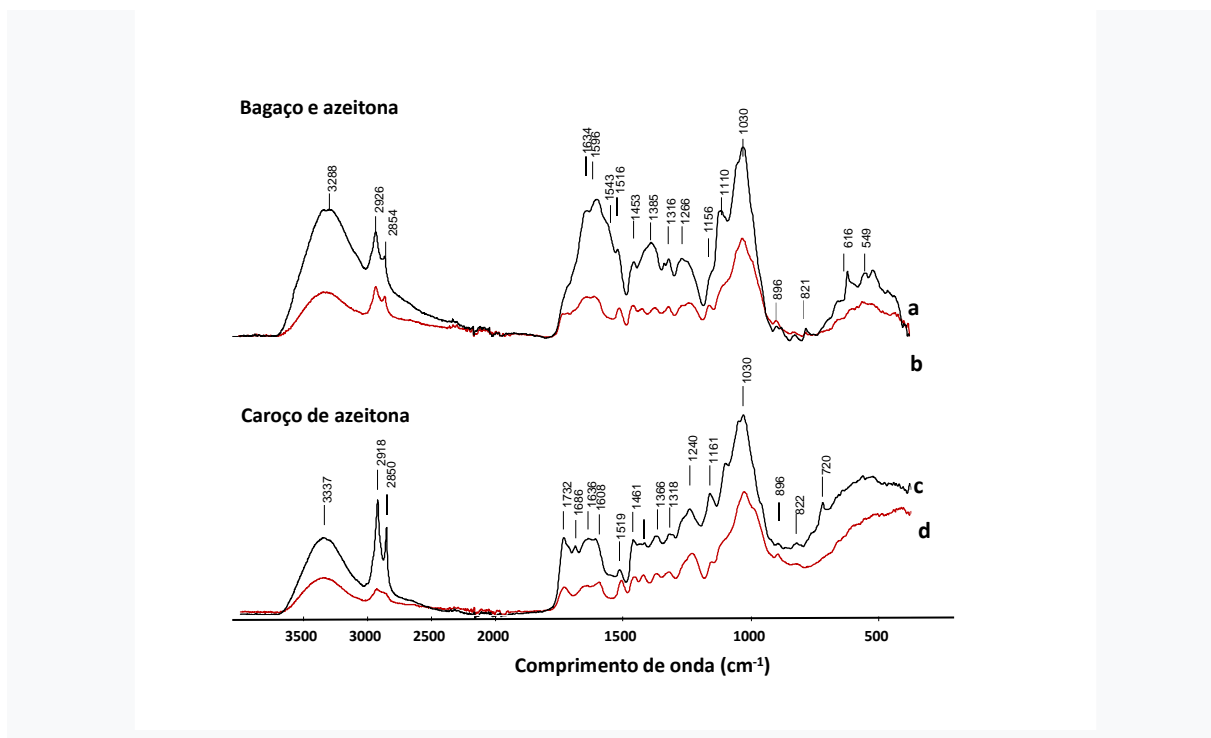


Figura 8: Espectros FTIR de bagaço de azeitona extractado antes do tratamento térmico (a), após auto-hidrólise (b), e de caroço não tratado (c) e após auto-hidrólise (d).

Os espectros de FTIR do bagaço de azeitona extractado mostraram que há diminuição na amostra sólida após auto-hidrólise das vibrações atribuídas a vários grupos como hidratos de carbono, tais como flexão de C – H ou alongamento de C – O ou C – C (1385 , 1266 , 1156 , 1110 , 1030 e 896cm^{-1}). O pico a 1596cm^{-1} , atribuído ao alongamento C = C aromático e / ou estiramento assimétrico da lenhina C-O foi maior na amostra sólida após o tratamento de auto-hidrólise. Essas observações confirmam que o resíduo sólido é mais rico em lenhina, após a auto-hidrólise, devido à hidrólise selectiva das hemiceluloses.

Os espectros de bagaço de azeitona também exibem duas bandas atribuídas aos modos de absorção de proteínas: a banda a 1650cm^{-1} é deslocada para 1634cm^{-1} (amida) e 1540cm^{-1} (amida II) atribuída a vibrações de ligações peptídicas (C = O e alongamento C – N, e flexão de N-H). A banda amida III, localizada a aproximadamente 1316cm^{-1} , é outra banda característica de absorção de proteínas (Barth e Zscherp, 2002; Ertani *et al.*, 2018). Após o tratamento hidrotérmico, há uma redução de intensidade evidente dessas bandas correspondentes à remoção de proteínas. Os espectros de bagaço de azeitona

mostram bandas a 2919 e a 2850 cm^{-1} atribuídas a lípidos (estiramento em C-H em CH_2 e CH_3). Isto mostra a presença de lípidos no bagaço, que não foi removido pelo tratamento com água.

Os espectros do caroço de azeitona não tratados mostraram duas bandas em 2918 e 2850 cm^{-1} atribuídas a lípidos (estiramento de C-H em CH_2 e CH_3) que são reduzidos na amostra sólida após auto-hidrólise. Pode-se observar também uma diminuição, após o tratamento, na absorção atribuída à vibração de alongamento C = O (1732 cm^{-1}), responsável pelas ligações ésteres entre as hemiceluloses e a lenhina, e do C-O (1240 cm^{-1}) das unidades de acetil éster nas hemiceluloses (Galia *et al.*, 2015). Tal indica uma quebra acentuada das ligações éster durante o pré-tratamento (Nitsos *et al.*, 2013), resultante da desacetilação das hemiceluloses do caroço de azeitona (Garrote *et al.*, 2001). Após a auto-hidrólise, houve uma diminuição dos picos em 1161 cm^{-1} (alongamento glicosídico C – O – C), 1030 cm^{-1} (estiramento glicosídico de CO dos grupos hidroxilo primários e secundários) e 897 cm^{-1} (deformação CH em celulose) (Liu *et al.*, 2006). Houve um aumento na intensidade dos picos a 1608 cm^{-1} e a 1519 cm^{-1} (vibrações esqueléticas dos anéis aromáticos de lenhina) (Liu *et al.*, 2006), correspondendo a um enriquecimento relativo de lenhina no material auto-hidrolisado.

4.5 Avaliação das atividades de celulase e beta-glucosidase das preparações enzimáticas

A actividade celulásica das preparações enzimáticas utilizadas foi determinada pelo método de FPU. Na figura 9 encontram-se os resultados da produção de glucose em função da diluição das preparações comerciais. A partir da equação 9, obtiveram-se os seguintes resultados: 195 FPU/mL para Saczyme, 132 FPU/mL para Celluclast e 127 FPU/mL para Ultimase.

A atividade da Beta-glicosidase foi determinada através da equação 10 e os resultados obtidos foram os seguintes: 25, 12 e 28 UI/mL para Saczyme, Celluclast e Ultimase, respectivamente.

A preparação Saczyme apresenta, pois, a maior actividade celulásica enquanto as preparações Celluclast e Ultimase apresentam actividades de celulase menores e similares. No que diz respeito à actividade da beta-glucosidase, as preparações Saczyme e Ultimase têm actividades semelhantes que são aproximadamente o dobro do valor exibido pela preparação Celluclast.

4.6 Hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática da biomassa lenho-celulósica tem sido descrita por modelos cinéticos multi-reacção, compreendendo: (a) a quebra heterogénea da celulose em celobiose e glucose, e (b) a hidrólise homogénea da celobiose em glucose (Kumar *et al.*, 2009). Durante a hidrólise enzimática global, na maioria dos casos, as limitações de transferência de massa podem ser negligenciadas e a velocidade de reacção é controlada principalmente pela quantidade de enzima adsorvida à biomassa (Kumar *et al.*, 2009).

A hidrólise enzimática foi realizada durante 48h, nas frações de bagaço de azeitona extractado e no caroço obtido após o tratamento de auto-hidrólise.

As figuras 10, 11 e 12 apresentam a cinética de hidrólise de bagaço de azeitona extractado pré-tratado presente em diferentes cargas (10, 20 e 30%, m/v), catalisada por Saczyme, Celluclast ou Ultimase, ao longo de 48h de reacção a 50°C. Os resultados encontram-se expressos em concentração de glucose (g/L) no meio reaccional (Fig. 10), a concentração de glucose no meio reaccional, a quantidade de glucose por kg de bagaço e a percentagem de conversão de glucana, respectivamente. Quando se usou Saczyme ou Ultimase, a concentração de glucose observada no equilíbrio aparente foi proporcional à quantidade de bagaço utilizada (Fig. 10), ou seja, a quantidade obtida com 30% de carga (ca 28 g/L com Saczyme e 33 g/L com Ultimase) foi cerca de duas vezes o valor obtido com 20% de carga e três vezes o valor obtido com 10% de bagaço. Para todas as cargas sólidas testadas, o equilíbrio aparente foi atingido em 5 horas ou menos, quando o Ultimase foi usado.

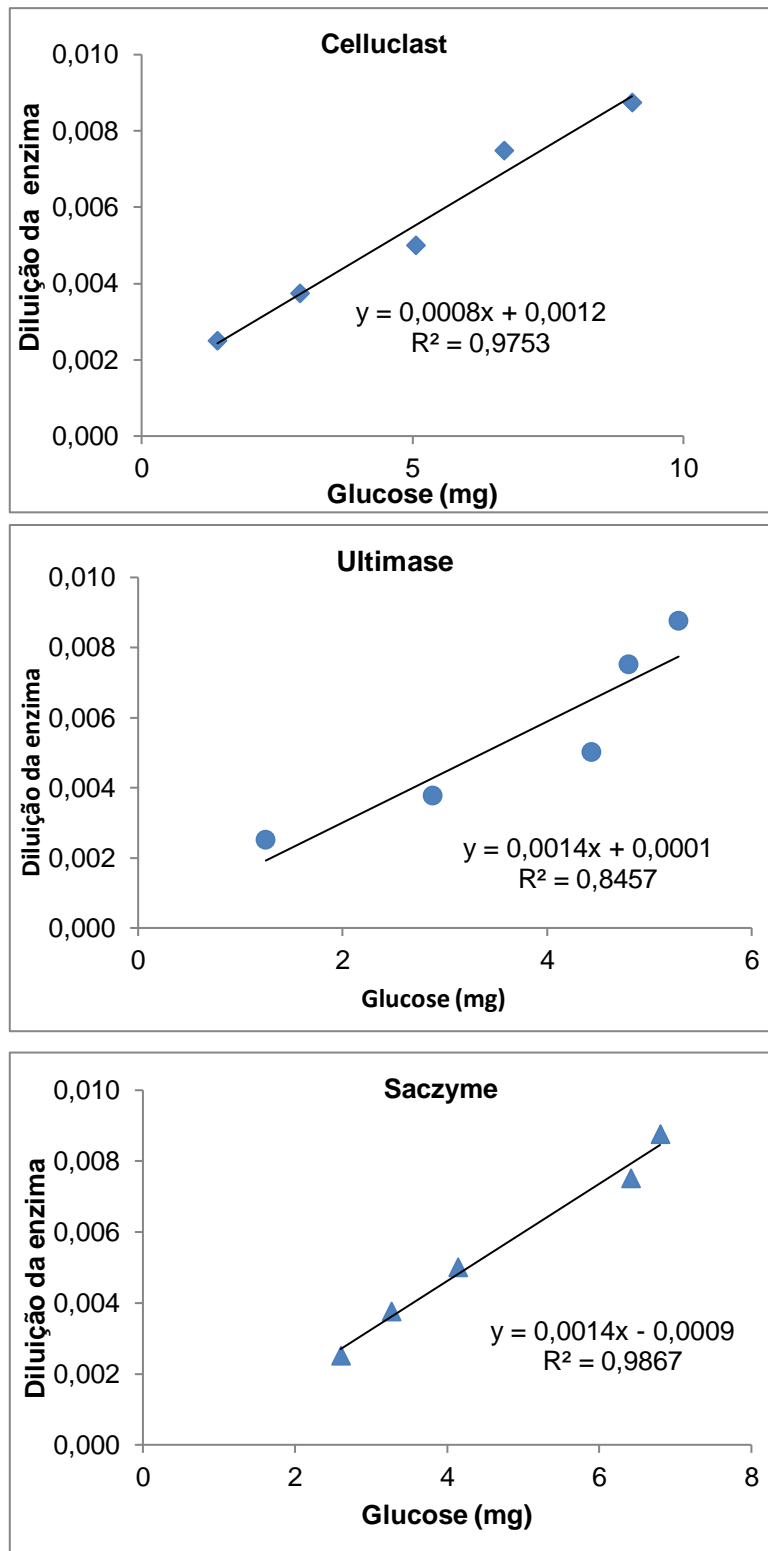


Figura 9: Determinação das actividades celulásicas das preparações enzimáticas utilizadas, pelo método das FPU.

Nos ensaios com Saczyme, o equilíbrio também foi obtido antes de 5 horas de reação para uma carga de 30% de bagaço; para cargas de 10 e 20% de bagaço, a concentração de glucose aumentou ao longo do tempo de reação de 48 horas (Figura 10). O aumento da carga de bagaço aumentará a superfície disponível para adsorção enzimática e, portanto, facilita a reação (Kumar *et al.*, 2009).

Com Celluclast, as quantidades de glucose produzidas ao longo da reação foram sempre menores do que as obtidas com Saczyme ou Ultimase, para todas as cargas sólidas utilizadas. Foi obtido um máximo de 10 g/L de glucose com 20% de bagaço, enquanto foram obtidos 25 g/L com Saczyme e Ultimase, para a mesma carga (Fig. 10). Esse comportamento pode ser explicado pelo facto de que a atividade da beta-glicosidase da preparação Celluclast (12 UI/mL) é metade dos valores apresentados da Saczyme (25 UI/mL) ou Ultimase (28 UI/mL). Portanto, a capacidade da Celluclast de hidrolisar a celobiose em glucose é bastante limitada. Além disso, para 30% de carga de bagaço, a concentração de glucose foi menor do que a concentração obtida com 20% de carga. Uma inibição de “feedback” causada por açúcares redutores pode explicar o comportamento de Celluclast na presença de cargas de substrato mais altas. Ao longo da hidrólise, as celulasas são atualmente inibidas à medida que a concentração dos produtos da reação, como celobiose e glucose, aumenta (Kumar *et al.*, 2009). Este fenómeno é responsável por um processo mais lento e menor rendimento de açúcares fermentescíveis.

A figura 11 apresenta quantidade de glucose por quantidade de bagaço pré-tratado obtido ao longo das 48h de hidrólise enzimática do bagaço. Os valores finais alcançados após 48h de reação, catalisada da Saczyme e após 5h em presença Ultimase, são similares e não dependem da carga de bagaço (95-110 g/kg de bagaço com Saczyme, 106-130 g/kg de bagaço com Ultimase). Com a Celluclast, a quantidade de glucose por unidade da massa de bagaço (30% de carga), também foi menor do que os valores obtidos com 10% e 20% de carga de bagaço.

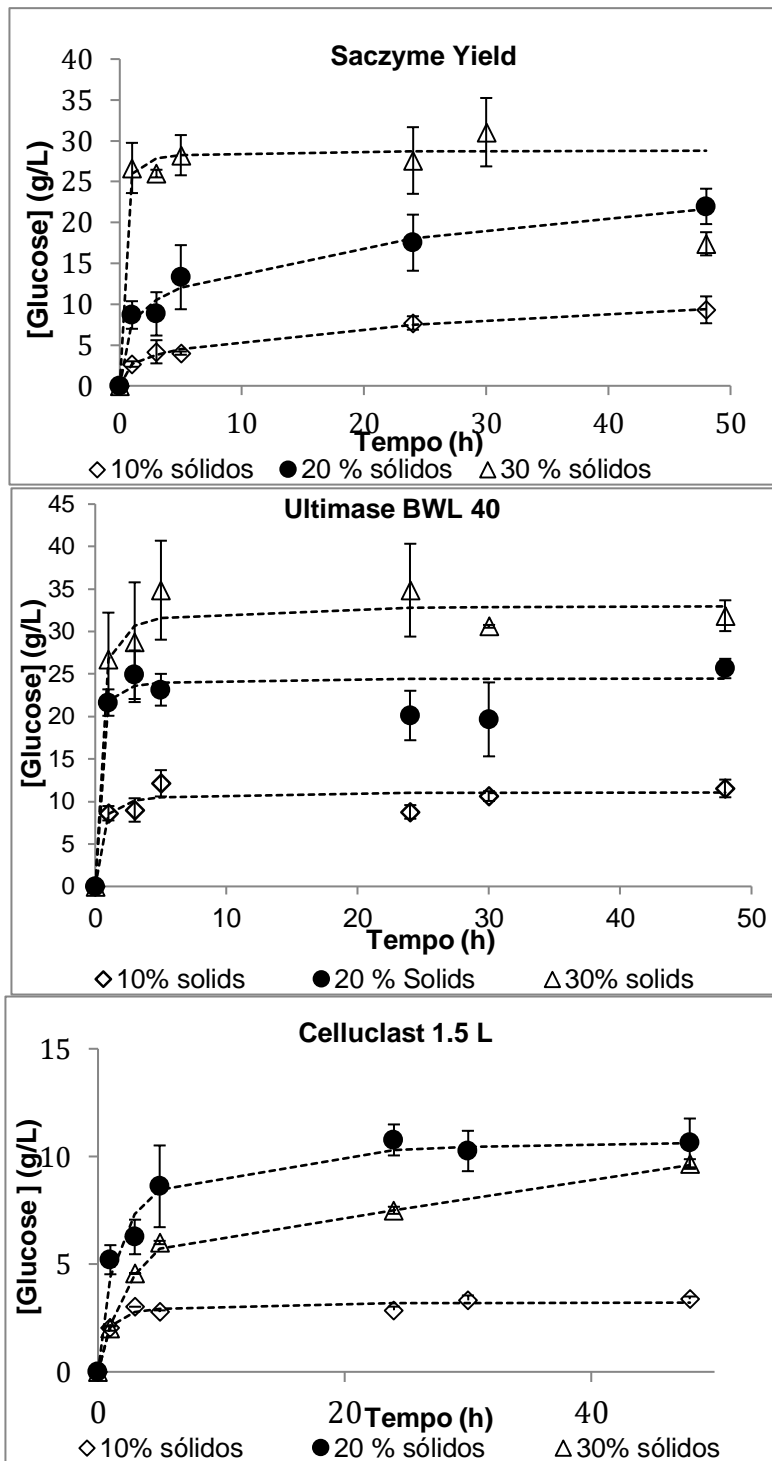


Fig. 10: Concentração de glucose no meio reacional ao longo de 48 horas de sacarificação catalisada por diferentes preparações enzimáticas a 50°C, utilizando 10, 20 ou 30% de bagaço de azeitona extractato pré-tratado.

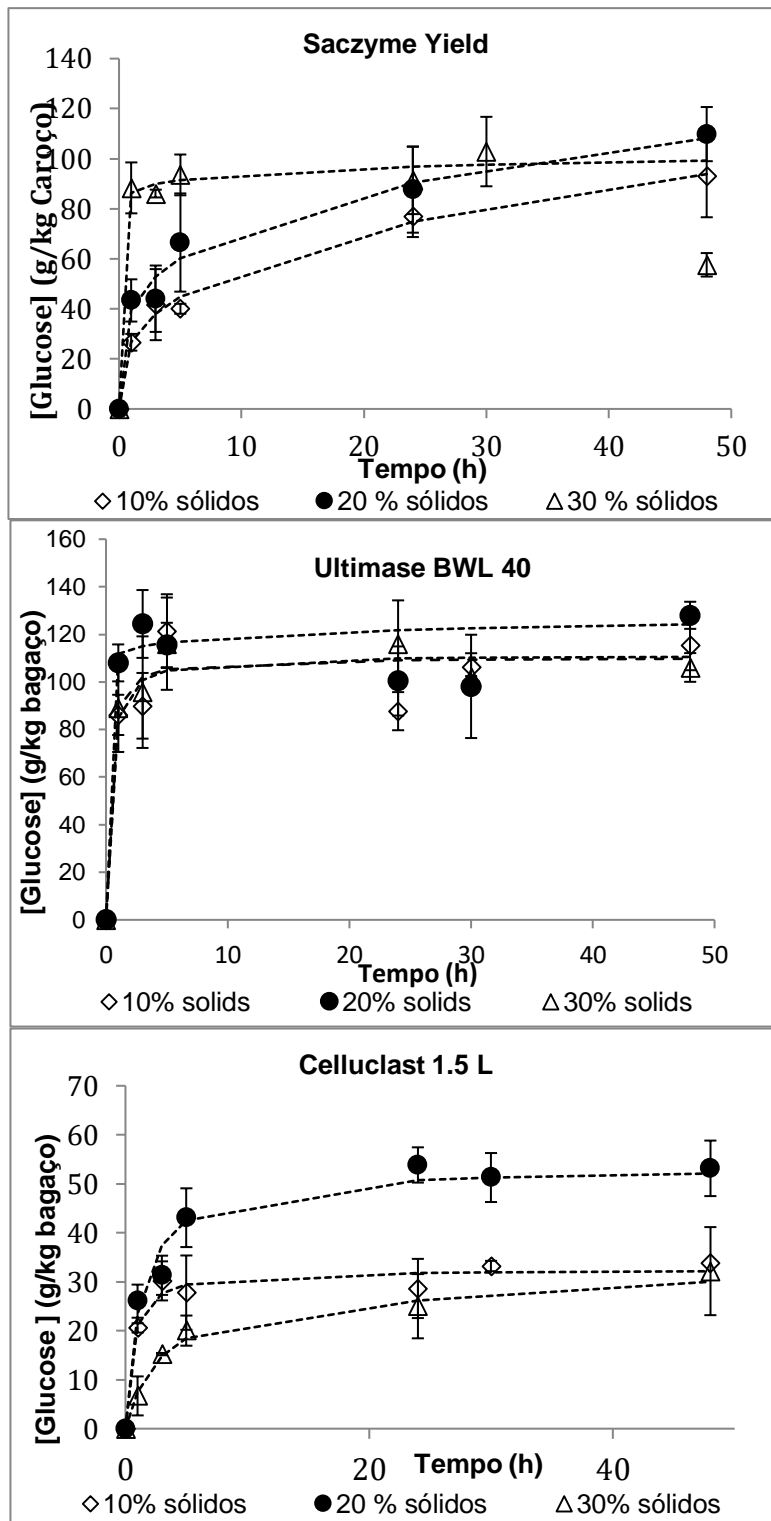


Fig. 11: Glucose produzida por kg de bagaço ao longo de 48 horas de sacarificação catalisada por diferentes preparações enzimáticas a 50 ° C, utilizando 10, 20 ou 30% de bagaço de azeitona extractado pré-tratado.

Quando os resultados são expressos em conversão de glucanas (%), os perfis (Fig. 12) refletem o comportamento observado para a quantidade de glucose produzida por unidade de massa de bagaço pré-tratado ao longo da sacarificação (Fig. 11). Para a Saczyme e a Ultimase, as conversões de glucanas foram c.a. de 80% e 90%, respectivamente. Com a Celluclast, as conversões de glucanas de 28, 45 e 40% foram obtidas com 10, 20 e 30% de carga de bagaço (Fig. 12).

Nos ensaios com caroço pré-tratado, apenas as preparações Saczyme e Ultimase foram testadas devido ao menor desempenho de Celluclast na sacarificação de bagaço de azeitona extratado e pré-tratado. Os resultados obtidos ao longo do tempo de sacarificação de caroço previamente submetidos à auto-hidrólise, catalisada por Saczyme ou Ultimase, são mostrados nas Figuras 13 e 14.

Para ambas as preparações enzimáticas, a concentração de glucose no meio reacional atingiu um equilíbrio aparente em menos de 5 horas de reação e aumentou com as cargas testadas. Com a preparação Saczyme, a concentração de glucose aumentou com a carga de caroço (Fig. 13), tal como observado com o extrato de bagaço de azeitona extratado e pré-tratado (Fig. 10). As produções obtidas (cerca de 5, 10 e 20 g/L de glucose para 10, 20 ou 30% de caroço, respectivamente) são ligeiramente inferiores aos valores obtidos com o bagaço. A hidrólise do caroço catalisada pela Saczyme é menos eficiente do que a hidrólise de bagaço: a quantidade de glucose por quantidade de caroço foi c.a. de 40-60 g/kg de caroço e apenas 30-40% de glucanas foram convertidas em glucose (Fig. 13), em contraste com os 100-120 g/kg obtidos por hidrólise do bagaço (Fig. 11) e elevadas conversões de glucanas (ca 80%) observadas com o bagaço (Fig. 12). Vale ressaltar que o caroço possui 16% de glucanas enquanto o bagaço possui apenas 11,9%, após a auto-hidrólise.

Com relação ao Ultimase, após 5 h de reação, 11, 18 e 25 g/L de glucose foram obtidos para 10, 20 ou 30% das cargas do caroço utilizado (Fig. 14). Estes valores são semelhantes aos valores obtidos na hidrólise de bagaço (Figura 10). Esses valores correspondem a c.a. de 110g de glucose por kg de caroço, para uma carga de caroço de 10%, 88 e 82 g/kg de caroço, para cargas de 20 e 30% de caroços foram utilizadas, respectivamente (contra 106-130 g/kg de bagaço obtido com a mesma preparação de enzima. Foi observado um perfil semelhante para a conversão de glucana: 69% e 88% de conversão para 10% de caroço, após 5 e 24 horas de reação respectivamente, e 55% para 20 ou 30% de carga de caroço, após 5h de hidrólise.

O caroço de azeitona é um material duro e rico em lenhina. A limitação interna de transferência de massa de substratos para as enzimas pode provavelmente explicar as conversões mais baixas de glucanas em glucose, quando comparadas com os valores obtidos com o bagaço extratado pré-tratado.

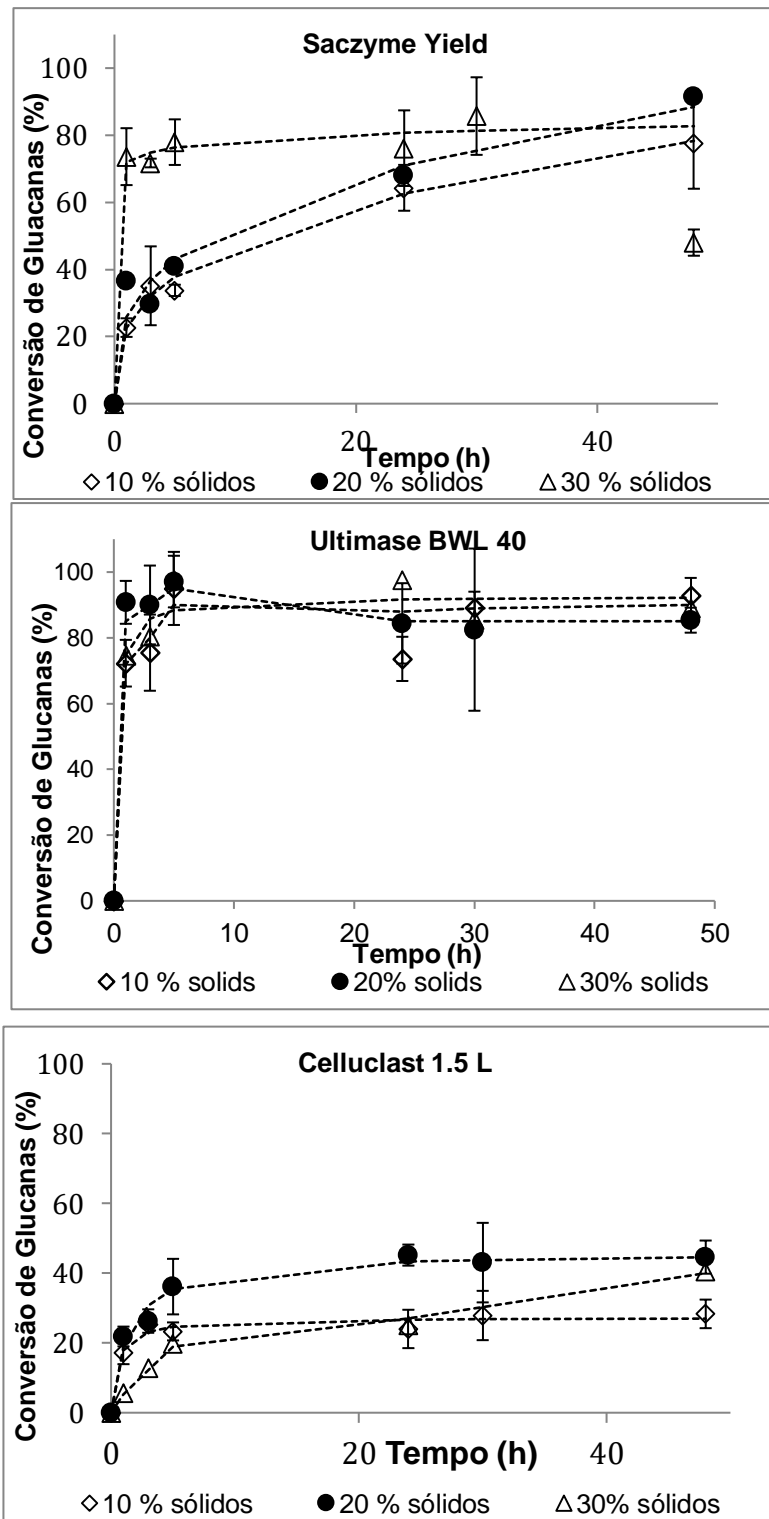


Fig. 12: Conversão de glucanas ao longo de 48 horas de sacarificação de celulose catalisada por diferentes preparações enzimáticas a 50°C, utilizando 10, 20 ou 30% de bagaço de azeitona pré-tratado.

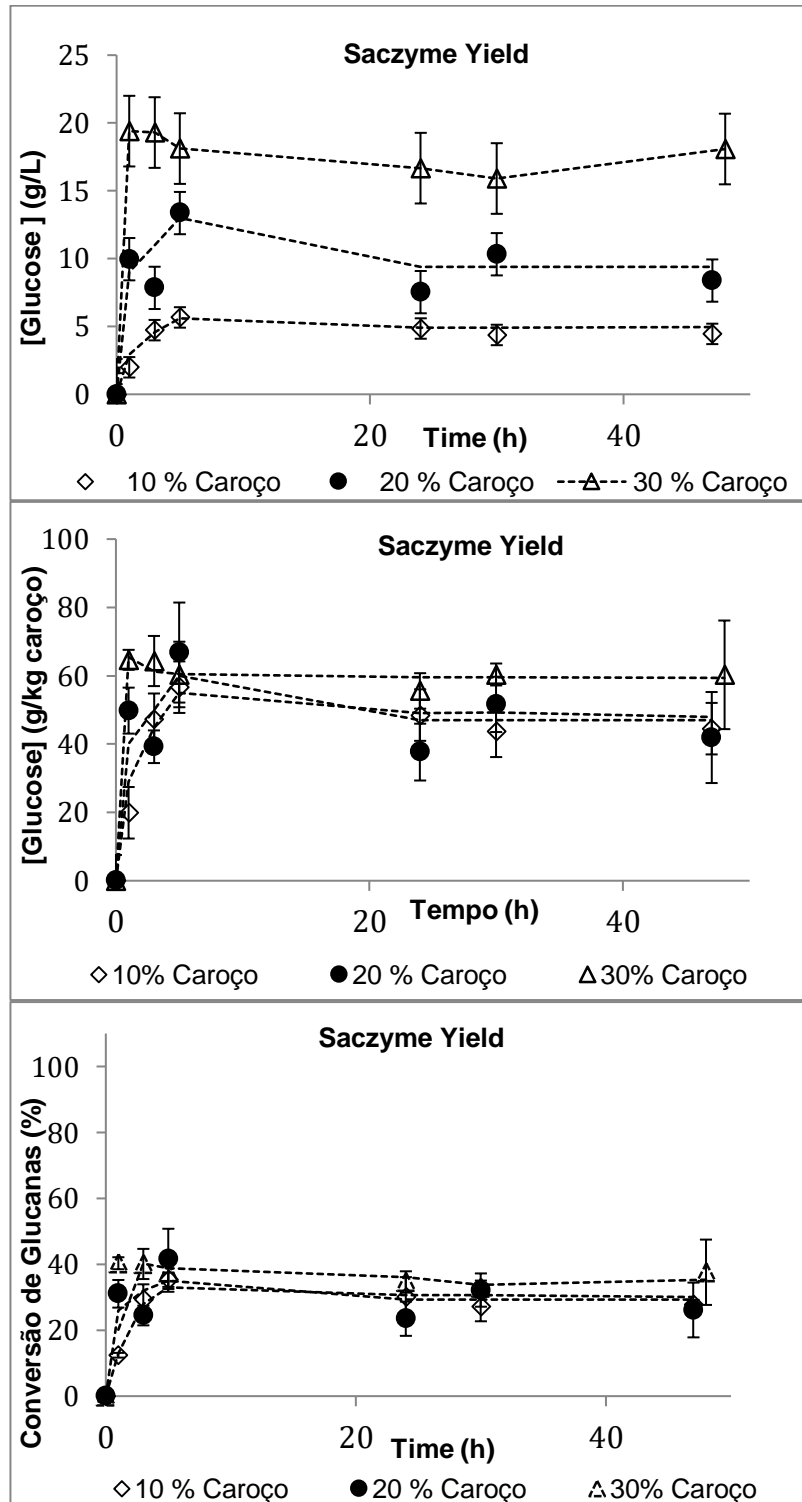


Figura 13- Concentração de glucose, respectiva concentração por kg de carço e conversão de glucanas, ao longo de 48h de sacarificação catalisada pela enzima Saczyme Yield, a 50°C, utilizando 10, 20 e 30% de carço

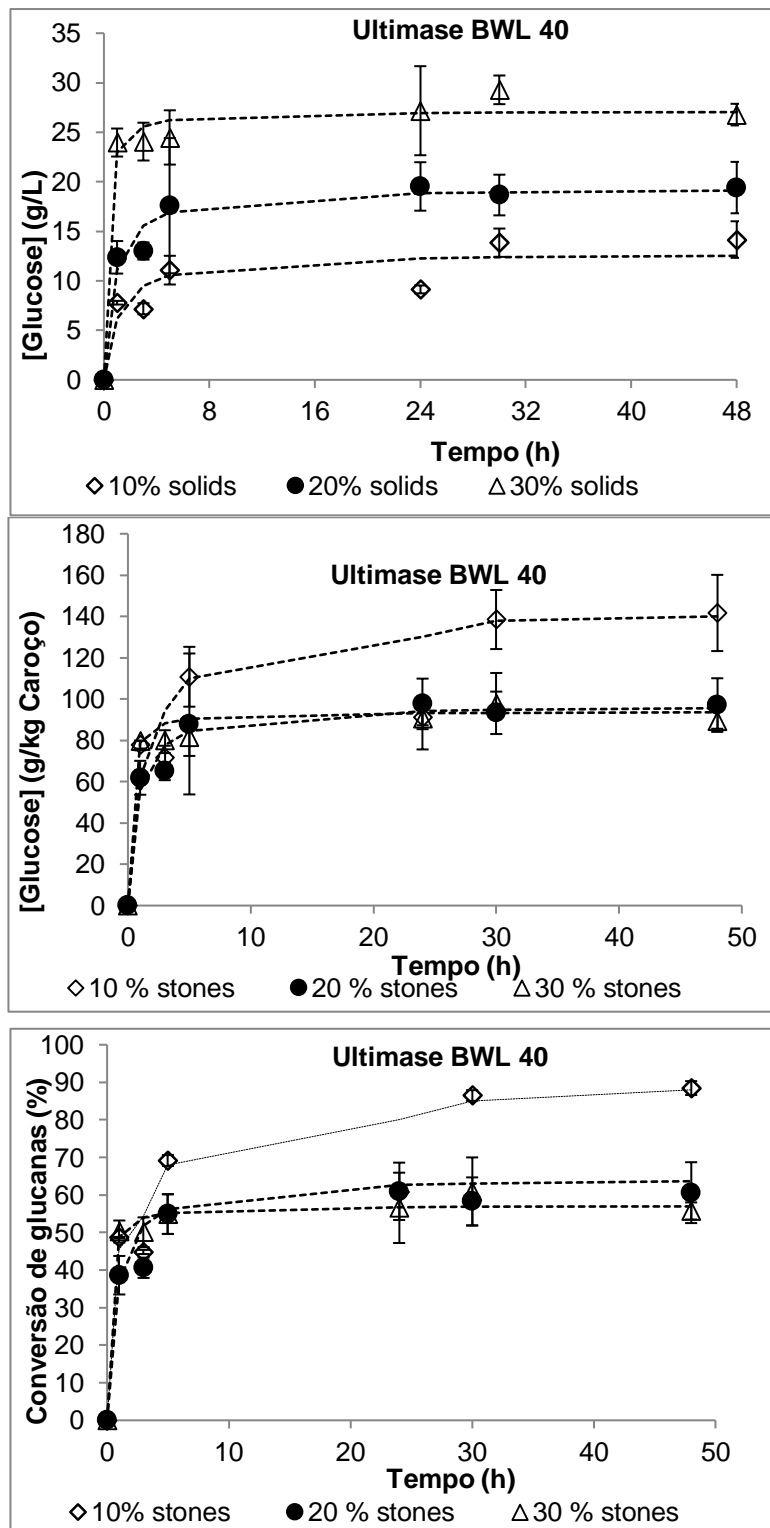


Figura 14- Concentração de glucose, respectiva concentração por kg de caroço e conversão de glucanas, ao longo de 48h de sacarificação catalisada pela enzima Ultimase BWL 40, a 50°C, utilizando 10, 20 e 30% de caroço.

4.7 Imagens de microscopia electrónica de varrimento

São apresentadas na Fig.15 as imagens de microscopia electrónica de varrimento (Mag = 30x) de (i) bagaço de azeitona extratado e do caroço, (ii) após auto-hidrólise, e (iii) após auto-hidrólise seguida de hidrólise enzimática. O bagaço, após todos os tratamentos, exhibe uma estrutura mais uniforme com partículas menores e maior porosidade que a amostra inicial. No entanto, o tratamento enzimático de caroço de azeitona não alterou substancialmente a estrutura do caroço de azeitonas observados após a auto-hidrólise, confirmando a menor eficiência dos tratamentos enzimáticos neste material.

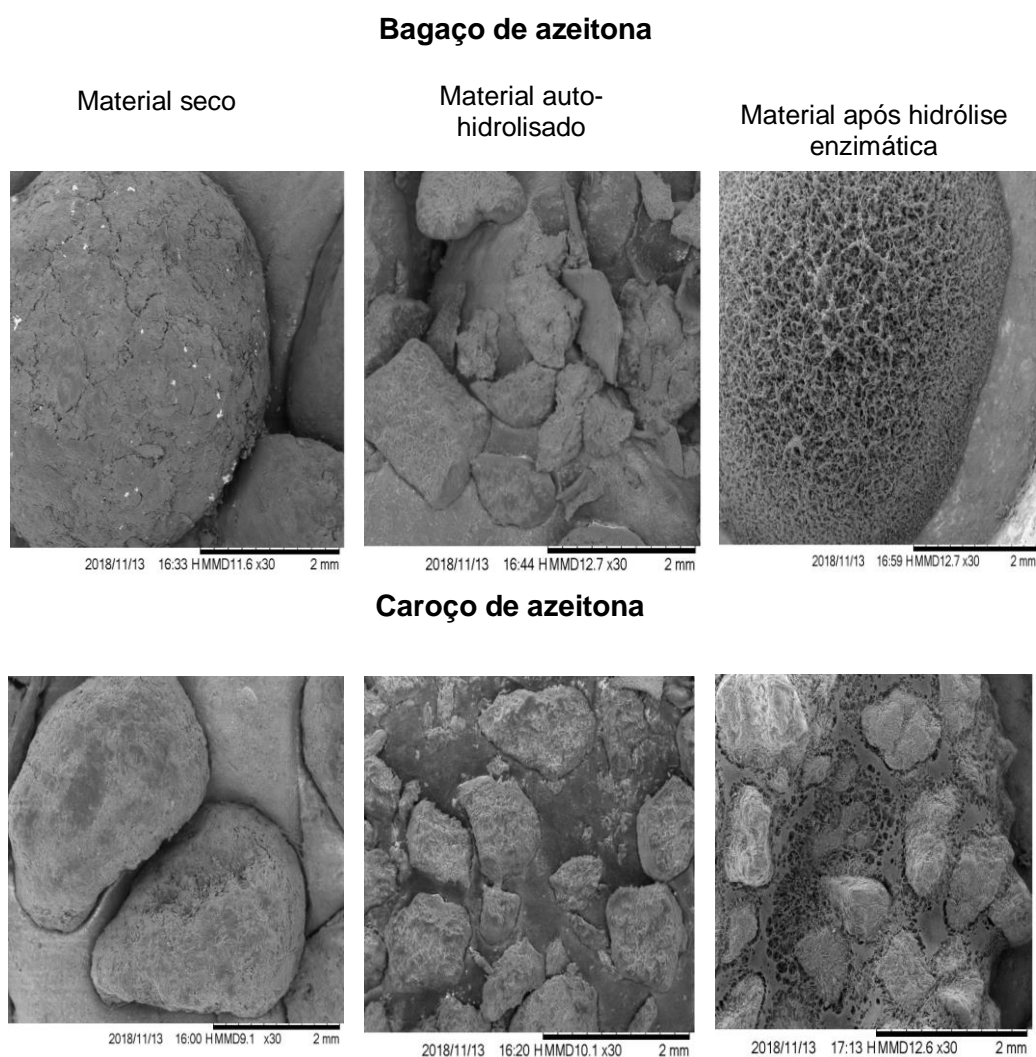


Figura 15. Imagens de microscopia electrónica de varrimento (Mag = 30x) de (i) bagaço de azeitona extratado e cálculos do caroço, (ii) após auto-hidrólise, e (iii) após auto-hidrólise seguida de hidrólise enzimática.

4.8 Velocidades de hidrólise enzimática

As velocidades iniciais de hidrólise da celulose foram estimadas para cada enzima e carga de biomassa utilizada de bagaço e de caroço de azeitona (Fig. 16). Utilizou-se em todos os ensaios a mesma razão

sólidos / enzima foi usada para o extrato e o bagaço auto-hidrolisado. As velocidades iniciais de hidrólise catalisada pelas preparações enzimáticas Saczyme e Ultimase foram semelhantes, aumentando com a carga de bagaço, seguindo um modelo de segunda ordem. Com a Celluclast, a velocidade inicial mostrou um máximo para uma carga de bagaço de 20%, diminuindo depois disso. Além disso, o valor estimado para 10% de carga (82 mg de glucose/h) foi ligeiramente inferior ao valor observado com a Saczyme (106 mg/h) ou Ultimase (103 mg/h). As velocidades iniciais observadas com a Celluclast foram muito menores para 20% (208 mg/h) ou 30% de carga de bagaço (80 mg/h) do que os respectivos valores observados para Saczyme e Ultimase. As velocidades de hidrólise iniciais mais baixas foram observadas com a Celluclast o que explica a menor eficiência desta preparação enzimática em comparação com as outras contrapartes.

Nos ensaios com caroço pré-tratado, catalisados por Saczyme ou Ultimase, as velocidades iniciais aumentaram com a carga do caroço, tal como observado para a hidrólise de bagaço. No entanto, as velocidades iniciais utilizando Ultimase foram cerca de 1,2 vezes os valores observados com a Saczyme, para a mesma carga de caroço.

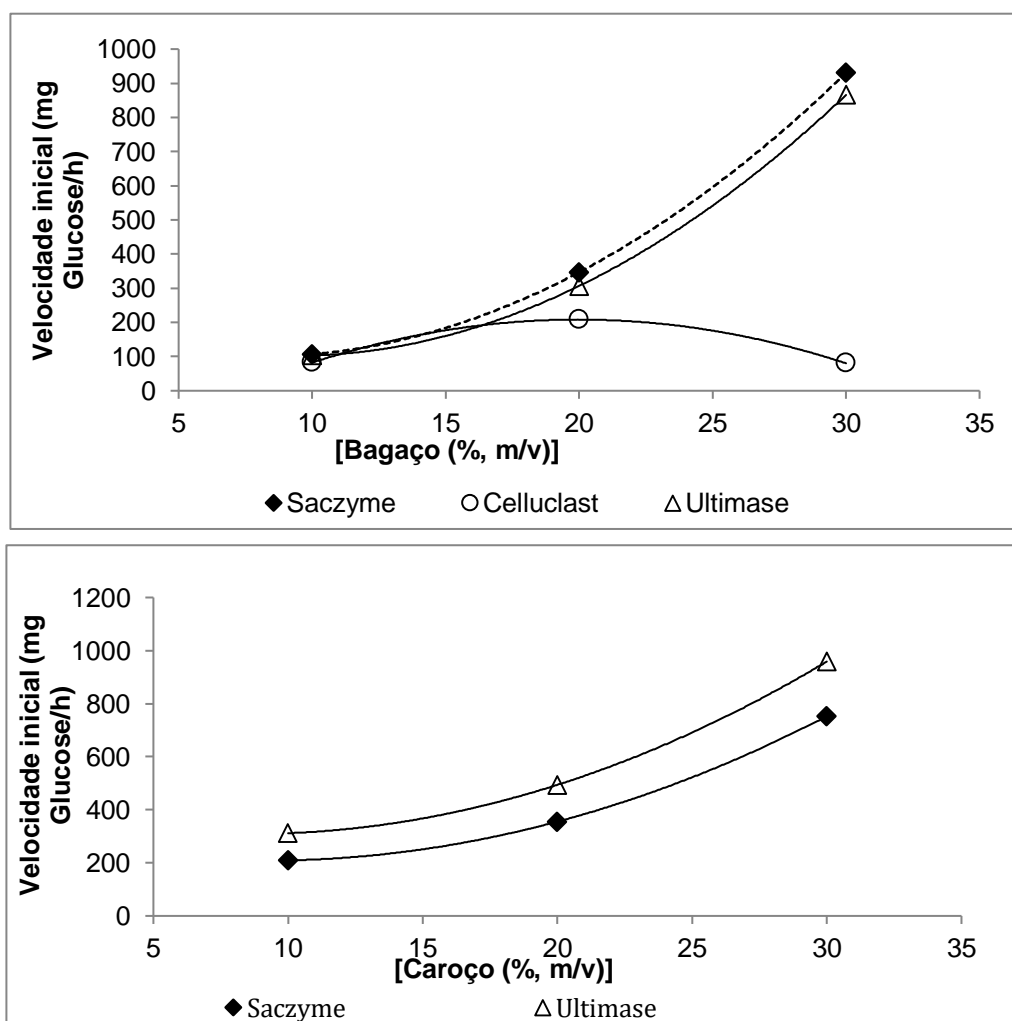


Figura 16. Velocidades iniciais de hidrólise da celulose.

4.9 Comparação com outros estudos enzimáticos

O quadro 6 apresenta alguns exemplos de sacarificação enzimática polpa de azeitona, bagaço e caroço extratado realizada por outros autores. Os pré-tratamentos e a hidrólise enzimática utilizados foram diferentes dos utilizados no presente estudo. Em todos estes estudos, Celluclast 1,5 L foi a preparação enzimática utilizada, quer para a hidrólise polpa de azeitona não tratada (Ballesteros *et al.*, 2002b), quer de bagaço ou de caroço de azeitona extratado submetidos à auto-hidrólise, hidrólise ácida diluída ou explosão com vapor. Fernandes *et al.*, (2016) testaram Celluclast 1,5 L em misturas com Novozyme 188, uma preparação de β -glucosidase, na hidrólise de bagaço de azeitona. Na maioria destes estudos, a hidrólise enzimática foi realizada a 50°C, Ph 4,8, durante 72h, e a concentração de biocatalisadores variou entre 7,73 FPU e 60 FPU por g de biomassa. No nosso estudo, a conversão de glucanas usando 20% de bagaço, catalisada por Celluclast, foi semelhante ao valor obtido com polpa não tratada (Ballesteros *et al.*, 2002b) e muito superior aos valores relatados por Fernandes *et al.* (2016), quando foi utilizado o bagaço de azeitona previamente submetido a uma hidrólise ácida diluída. Além disso, a conversão de glucanas de bagaço, quando se utilizou Saczyme ou Ultimase (80 e 90% para 30% de carga de bagaço e após 5h de reação), foi muito superior aos valores relatados na literatura. Em relação à hidrólise do caroço, os resultados da conversão de glucanas obtidos no nosso estudo com a Saczyme são semelhantes aos obtidos por Ballesteros *et al.*, (2002b), Saleh *et al.*, (2014) e Cuevas *et al.*, (2015) com Celluclast, mas com Ultimase, as conversões de glucanas obtidas foram superiores. Vale a pena notar que a hidrólise do bagaço e de caroço atingiu o equilíbrio após 5 h, com Saczyme ou Ultimase, ou após 24h, quando a Celluclast foi usada como catalisador da hidrólise do bagaço extratado. Nos estudos de outros autores, os resultados são descritos para hidrólise enzimática de 72h e as cargas sólidas nunca foram superiores a 20% (5-20% para bagaço; 5-15% para bagaço extractado e 10% para caroço). No nosso estudo, utilizaram-se cargas de sólidos de até 30% (m/v). Isso significa que a produtividade em glucose (quantidade de glucose por unidade de tempo e volume de reação) é muito maior no presente estudo, do que nos estudos previamente descritos.

Em relação ao rendimento de glucose por 100 kg de material seco, não há uma relação direta com a conversão de glucana, para materiais similares, pois as condições de pré-tratamento utilizadas determinarão a quantidade de celulose disponível para a sacarificação. Por exemplo, Fernandes *et al.*, (2012) obtiveram 83% de conversão de glucanas no bagaço extratado, e previamente submetido à auto-hidrólise não isotérmica a 230°C, que continha 33,49% de glucanas, o que corresponde à produção de 27,8kg de glucose / 100 kg de bagaço seco. No presente estudo, a hidrólise do bagaço de azeitona pré-tratado, por Saczyme originou 80% de conversão de glucanas, correspondendo apenas à produção de 9,4kg de glucose por 100kg de bagaço. Isto é explicado pelo teor relativamente baixo de glucanas no bagaço de azeitona pré-tratado que usamos (11,9%) (Quadro 5). Além disso, para uma conversão de glucanas de 40% no caroço, Ballesteros *et al.*, (2002b) obtiveram 16,4kg de glucose por 100kg de caroço seco contra 6,7 kg/100kg no presente estudo. Isso porque, após a explosão a vapor do caroço, realizada por Ballesteros *et al.*, (2002b), o caroço apresentara 40,5% de celulose, contra 16% no nosso caso, após a auto-hidrólise.

Quando Cuevas *et al.*, (2005) usaram caroços pré-tratados a 150 ou 175°C durante 10 min (Log R₀ = 2,59 e 3,33, respectivamente), a conversão de glucanas da Celluclast foi muito baixa (2,2%). Quando usaram uma auto-hidrólise de alta severidade (225°C/ 10min), o ataque enzimático do caroço pré-tratado aumentou muito, o que foi explicado pelo aumento do diâmetro médio dos poros até 95,8nm, permitindo o acesso das enzimas à celulose. Também, foi observado um resultado semelhante na hidrólise direta de bagaço extratado não tratado ou com bagaço extratado submetido à auto-hidrólise não isotérmica a temperaturas inferiores a 170°C (Fernandes *et al.*, 2012). Portanto, o aumento na severidade do pré-tratamento do bagaço ou do caroço revelou promover a hidrólise seletiva das hemiceluloses e aumentar o acesso da enzima à celulose.

No presente estudo, as condições de auto-hidrólise isotérmica devem ser otimizadas para melhorar a seletividade para as hemiceluloses, mantendo as glucanas no bagaço e no caroço tratado inatacadas. Assim, isto aumentaria o rendimento em glucose por unidade de massa de bagaço ou caroço obtido por hidrólise enzimática.

5. CONCLUSÕES

O bagaço de azeitona extratado e o caroço de azeitona diferem substancialmente na sua composição química com um elevado teor de extractivos no bagaço de azeitona extratado, enquanto que o caroço de azeitona tem uma natureza lenho-celulósica com um elevado teor de lenhina e polissacáridos. Os polissacáridos apresentaram alto teor de xilanas nos dois materiais. O tratamento hidrotérmico moderado utilizado foi selectivo em relação às hemiceluloses e mostrou o potencial para a recuperação de oligossacáridos e de XOS. No entanto, uma quantidade considerável de glucanas foi destruída principalmente na fração de bagaço extratado. Na sacarificação enzimática, as preparações Saczyme e Ultimase apresentaram elevada actividade em presença de cargas sólidas elevadas (30%, m/v), atingindo 80 e 90% de conversão de glucose, após 5 h de reação, respectivamente. A afinidade destas enzimas aumentou com a concentração de substrato (10-30%, m/v). A actividade de Celluclast diminuiu para 30% das cargas de bagaço e não foi detectada actividade significativa desta preparação enzimática na hidrólise do caroço de azeitona. A severidade da auto-hidrólise isotérmica utilizada neste estudo deve ser otimizada para promover a disponibilidade de glucanas para a hidrólise enzimática.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aachary, A. A., & Prapulla, S. G. (2011). Xylooligosaccharides (XOS) as an emerging prebiotic: microbial synthesis, utilization, structural characterization, bioactive properties, and applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10(1), 2-16.

Adsul MG, Singhvi MS, Gaikawai SA, Gokhale DV (2011) Development of biocatalysts for production of commodity chemicals from lignocellulosic biomass. *BioresourTechnol* 102: 4304–4312.doi:10.1016/j.biortech.2011.01.002

Albuquerque, J.A., González, J., García, D., Cegarra, J., 2004. Agrochemical characterisation of “alperujo”, a solid by-product of the two-phase centrifugation method for olive oil extraction, *Bioresour. Technol.* 91, 195–200

Balan V (2014) Current challenges in commercially producing biofuels from lignocellulosic biomass. *ISRN biotechnology*. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/463074>

Ballesteros, I., Oliva, J.M., Negro, M.J., Manzanares, P., Ballesteros, M., 2002a. Ethanol production from olive oil extraction residue pretreated with hot water. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 98-100: 717-732

Ballesteros, I., Oliva, J.M., Negro, M.J., Manzanares, P., Ballesteros, M., 2002b. Proceso de sacarificación y fermentación simultánea para la conservación de la fracción celulósica del residuo de la extracción del aceite de oliva en etanol. *Grasas y Aceites*, 53: 282-288.

Barakat, A.; Mayer-Laigle, C.; Solhy, A.; Arancon, R. ; Vries, H.; Luque, R. (2014) “Mechanical pretreatments of lignocellulosic biomass: towards facile and environmentally sound technologies for biofuels production” *Royal Society of Chemistry*.4,48109-48127.

Barth, A., Zscherp, C., 2002. What vibrations tell us about proteins. *Q. Rev. Biophys.* 35, 369–430.

Biswas, R., & Ahring, B. K. (2016). Fractionation of Lignocellulosic Biomass Materials With Wet Explosion Pretreatment. In *Biomass Fractionation Technologies for a Lignocellulosic Feedstock Based Biorefinery* (pp. 369-384).

Borja, R., Raposo, F., Rincón, B., 2006. Treatment technologies of liquid and solid wastes from two-phase olive oil mills. *Grasas y aceites*, 57 (1), 32-46.

Borja, R., Rincón, B., Raposo, F., Alba, J., Martín, A., 2002. A study of anaerobic digestibility of two-phases olive mill solid waste (OMSW) at mesophilic temperature *Process Biochem.* 38, 733–742

Brandt, A.; Gräsvik, J.; Hallett, J.P.; Welton, T. (2013) “Deconstruction of lignocellulosic biomass with ionic liquids” *Green Chemistry*. 15(3), 537-848.

- Brodeur, G., Yau, E., Badal, K., Collier, J., Ramachandran, K. B., & Ramakrishnan, S. (2011). Chemical and physicochemical pretreatment of lignocellulosic biomass: a review. *Enzyme research*, 2011.
- Capolupo L., & Faraco V., (2016) Green methods of lignocellulose pretreatment for biorefinery development. *Appl Microbiol Biotechnol* 100:9451–9467 DOI 10.1007/s00253-016-7884-y.
- Carrasco, J., Sáiz, M., Navarro, A., Soriano, P., Sáez, F., & Martínez, J. (1994). Effects of dilute acid and steam pretreatments on the cellulose structure and kinetics of cellulosic fraction hydrolysis by dilute acids in lignocellulosic materials. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 44/45, 23–34..
- Carvalho, F., Duarte, L.C., Bogel-Lukasik, R., Moniz, P. (2013) Métodos de fraccionamento de biomassa para as biorrefinarias. *Boletim de Biotecnologia*, 84, 7-10.
- 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., Esteves, M.P., Parajó, J.C., Pereira, H., Gírio, F.M. (2004) Production of oligosaccharides by autohydrolysis of brewery's spent grain. *Bioresource technology*, 91, 93-100.
- Cherubini F (2010) The biorefinery concept: using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energy Convers Manage* 5: 1412–1421. doi:10.1016/j.enconman.2010.01.015
- Chiaromonte, D., Prussi, M., Ferrero, S., Oriani, L., Ottonello, P., Torre, P., & Cherchi, F. (2012). Review of pretreatment processes for lignocellulosic ethanol production, and development of an innovative method. *Biomass and bioenergy*, 46, 25-35.
- Coimbra, M.A., Cardoso, S.M., Lopes-da-Silva, J.A., 2010. Olive pomace, a source for valuable arabinan-rich pectic polysaccharides. *Top. Curr. Chem.* 294, 129–141.
- Coimbra, M.A., Waldron, K.W., Selvendran, R.R., 1995. Isolation and characterisation of cell wall polymers from the heavily lignified tissues of olive (*Olea europaea*) seed hull. *Carbohydr. Polym.* 27, 285-294
- Cuevas, M., García, J.F., Hodaifa, G., Sánchez, S., 2015. Oligosaccharides and sugars production from olive Carço by autohydrolysis and enzymatic hydrolysis. *Ind. Crops Prod.* 70, 100–106.
- Dekker, R. F. H., & Wallis, A. F. A. (1983). Autohydrolysis-explosion as pretreatment for the enzymic saccharification of sunflower seed hulls. *Biotechnology Letters*, 5, 311–316.
- Demirbaş, A., 2002. Fuel characteristics of olive husk and walnut, hazelnut, sunflower, and almond shells. *Energy Sources*. 24 (3), 215-221.
- Dermeche, S., Nadour, M., Larroche, C., Moulti-Mati, F., Michaud, P., 2013. Olive mill wastes: Biochemical characterizations and valorization strategies. *Process Biochem.* 48, 1532–1552.

Dermibas, A. (2009). *Biofuels*. (Springer, Ed.) (1st ed., pp. 45–85).

Di Giovacchino, L., Costantini, N., Serraiocco, A., Surrichio, G., Basti, C., 2001. Natural antioxidants and volatile compounds of virgin olive oils obtained by the two or three-phase centrifugal decanters. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 103 (5), 279-285.

Duarte, L., Carneiro, F., Lopes, S., Marques, S., Parajó, J., & Fm., G. (2004). Comparison of two posthydrolysis processes of brewery's spent grain autohydrolysis liquor to produce a pentose - containing culture medium. *Applied Biochemistry Biotechnology*, 113-116, 1041–1048.

Durán, C.Y., 1985. Propiedades termoquímicas del orujo de aceituna. Poder calorífico. *Grasas y Aceites*. 36, 45–47.

Elalami, D., Carrère, H., Abdelouahdi, K., Oukarroum, A., Dhiba, D., Arji, M., Barakat, A., 2018. Combination of dry milling and separation processes with anaerobic digestion of olive mill solid waste: Methane production and energy efficiency. *Molecules* 23 (12), 3295.

Ertani, A., Francioso, O., Ferrari, E., Schiavon, M., Nardi, S. 2018. Spectroscopic-chemical fingerprint and biostimulant activity of a protein-based product in solid form. *Molecules*. 23, 1031

Escária, S. (2008). *Análise do impactopotencial das exigências da sustentabilidade na difusão dos biocombustíveis*. Sphera Departamento de prospectiva e planeamento e relações internacionais.

Fahd S, Fiorentino G, Mellino S, Ulgiati S (2012) Cropping bioenergy and biomaterials in marginal land: the added value of the biorefinery concept. *Energy* 37:79–93. doi:10.1016/j.energy.2011.08.023

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

Fernandes, M.C., Brás, T.S., Lourenço, P.M.L., Duarte, L.C., Carneiro, F., Bernardo, P., Marques, S., Neves, L.A., 2012. The effect of autohydrolysis pretreatment on the production of second generation bioethanol from extracted olive pomace. 4th International Conference on Engineering for Waste and Biomass Valorisation. September 10-13, 2012 – Porto, Portugal

Fernandes, M.C., Torrado, I., Carneiro, F., Dores, V., Guerra, V., Lourenço, P., Duarte, L.C., 2016. Bioethanol production from extracted olive pomace: dilute acid hydrolysis. *Bioethanol*. 2(1), 103-111.

Fernández-Bolaños, J., Felizón, B., Heredia, A., Guillén, R., Jiménez, A., 1999. Characterization of the lignin obtained by alkaline delignification and of the cellulose residue from steam-exploded olive Carroço. *Bioresour. Technol.* 68(2), 121–32.

Galia, A., Schiavo, B., Antonetti, C., Galletti, A.M.R., Interrante, L., Lessi, M., Scialdone, O., Valenti, M.G., 2015. Autohydrolysis pretreatment of *Arundo donax*: a comparison between microwave-assisted batch and fast heating rate flow-through reaction systems. *Biotechnol. Biofuels* 8,218

- Garrote, G., Domínguez, H., Parajó, J.C., 2001. Study on the deacetylation of hemicelluloses during the hydrothermal processing of Eucalyptus wood. *Holz als Roh- und Werkstoff* 59 (1-2), 53-59.
- Ghose, T.K. (1987) Measurement of cellulase activities, *International Union of Pure and Applied Chemistry, Pure & Appl. Chem.*, 59 (2) 257-268.
- Gomes, D. S. J. (2016) Estudo do Pré-Tratamento Ácido e Hidrólise Enzimática da Borra de Café Visando a Produção de Bioetanol. In: Dissertação para obtenção do Grau de Mestrado em Engenharia química. Porto: instituto Superior de Engenharia do Porto-ISEP. 143p
- Gullón, B., Yáñez, R., Alonso, J. L., & Parajo, J. C. (2010). Production of oligosaccharides and sugars from rye straw: a kinetic approach. *Bioresource technology*, 101(17), 6676-6684
- Gupta R, Khasa YP, Kuhad RC (2011) Evaluation of pretreatment methods in improving the enzymatic saccharification of cellulosic materials. *Carbohydr Pol* 84:1103–1109.doi:10.1016/j.carbpol.2010.12.074
- Hendriks, A. T. W. M., & Zeeman, G. (2009). Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource technology*, 100(1), 10-18.
- Hernández, V., Romero-García, J.M., Dávila, J.A., Castro, E., Cardona, C.A., 2014. Techno-economic and environmental assessment of an olive stone based biorefinery. *Resour. Conserv. Recycl.* 92, 145–150.
- Isikgor FH, Becer CR (2015) Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers.*PolymChem* 6:4497–4559.doi:10.1039/C5PY00263J
- Kamm, B. (2007). Production of platform chemicals and synthesis gas from biomass.*Angewandte Chemie International Edition*, 46, 5056–5058.
- Kamm, B., Gruber, P. R., & Kamm, M. (2006). *Biorefineries – Industrial Processes and Products. Germany, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.*(pp. 1–497).
- Kim, J. S., Lee, Y. Y., & Kim, T. H. (2016). A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 199, 42-48.
- Kumar, S., Singh, S.P., Mishra, I.M., Adhikari, D.K., 2009. Recent advances in production of bioethanol from lignocellulosic biomass. *Chem. Eng. Technol.* 32, 517-526.
- Leite, P., Salgado, J.M., Venâncio, A., Domínguez, J.M., Belo, I., 2016. Ultrasounds pretreatment of olive pomace to improve xylanase and cellulase production by solid-state fermentation. *Bioresour. Technol.* 214, 737–746.

- Liu, C.F., Xu, F., Sun, J.X., Ren, J.L., Curling, S., Sun, R.C., Fowler, P., Baird, M.S., 2006. Physicochemical characterization of cellulose from perennial ryegrass leaves (*Lolium perenne*). *Carbohydr Res.* 341, 2677–87.
- Liu, S., Lu, H., Hu, R., Shupe, A., Lin, L., & Liang, B. (2012b). A sustainable woody biomass biorefinery. *Biotechnology Advances*, 30(4), 785-810.
- Long H, Li X, Wang H, Jia J (2013) Biomass resources and their bioenergy potential estimation: a review. *Renew SustEnergy Rev* 26:344–352. doi:10.1016/j.rser.2013.05.035
- Lynd, L. R., Wyman, C. E., & Gerngross, T. U. (1999). Biocommodity engineering. *Biotechnology Progress*, 15, 777–793.
- Martínez, J., Granado, J., Montané, D., Salvadó, J., & Farriol, X. (1995). Fractionation of residual lignocellulosics by dilute-acid prehydrolysis and alkaline extraction: application to almond shells. *Bioresouce Technology*, 52, 59–67.
- Martins P.B. L. (2015) Otimização de processos hidrotérmicos para o fracionamento seletivo da palha de cana-de-açúcar. In: Dissertação para obtenção do Grau de Mestrado em Engenharia Alimentar. Lisboa: Ulisboa-ISA. (1-31) 80p
- Moniz, P., Pereira, H., Duarte, L. C., Carvalheiro, F., 2014. Hydrothermal production and gel filtration purification of xylo-oligosaccharides from rice straw. *Ind. Crops Prod.* 62, 460–465.
- Moniz, P., Pereira, H., Quilhó, T., Carvalheiro, F., 2013. Characterisation and hydrothermal processing of corn straw towards the selective fractionation of hemicelluloses. *Ind. Crops Prod.* 50, 145–153.
- 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(6), 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(9), 1913-1923.
- Nitsos, C.K., Matis, K.A., Triantafyllidis, K.S., 2013. Optimization of hydrothermal pretreatment of lignocellulosic biomass in the bioethanol production process. *ChemSusChem.* 6, 110–122
- Official Journal of the European Union, COMMISSION REGULATION (EU) No 432/2012 of 16 May 2012 establishing a list of permitted health claims made on foods, other than those referring to the reduction of disease risk and to children's development and health, L 136; pp.40.
- Overend, R.P., Chornet, E., Gascoigne, J.A., 1987. Fractionation of lignocellulosics by steam-aqueous pretreatments. *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. A. Math. Phys. Sci.* 321 (1561), 523–536.

Palmqvist, E., & Hahn-Hägerdal, B. (2000). Fermentation of lignocellulosichydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology*, 74(1), 25–33.

Pan, Zh. Et al (2009). Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production. Biological and Agricultural Engineering Department, University of California, One Shields Avenue, Davis, CA 95616, USA; 2. Processed Foods Research Unit, USDA-ARS-WRRC, 800 Buchanan St., Albany, CA 94710, USA. Vol. 2 No.3 51. Open Access at <http://www.ijabe.org>

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

Romero-García, J.M., Martínez-Patiño, C., Ruiz, E., Romero, I., Castro, E., 2016. Ethanol production from olive stone hydrolysates by xylose fermenting microorganisms. *Bioethanol*. 2, 103–111.

Romero-García, J.M., Niño, L., Martínez-Patiño, C., Álvarez, C., Castro, E., Negro, M.J., 2014. Biorefinery based on olive biomass. State of the art and future trends. *Bioresour Technol.*159, 421-32.

Ropars, M., Marchal, R., Pourquié, J., & Vandecasteele, J. (1992). Largescale enzymatic hydrolysis of agricultural lignocellulosic biomass. Part 1: Pretreatment procedures. *Bioresouce Technology*, 42, 197–204.

Roselló-Soto, E., Kouba, M., Moubarik, A., Lopes, R.P., Saraiva, J.A., Boussetta, N., Grimi, N., Barba F.J., 2015. Emerging opportunities for the effective valorization of wastes and by-products generated during olive oil production process: Nonconventional methods for the recovery of high-added value compounds. *Trends Food Sci. Technol.* 45, 296-310.

Ruggeri, B., Battista, F., Bernardi, M., Fino, D., Mancini, G., 2015. The selection of pretreatment options for anaerobic digestion (AD): A case study in olive oil waste production. *Chem. Eng. J.* 259, 630–639.

Saini JK, Saini R, Tewari L (2015) Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recent developments. *Biotech* 5:337–353. doi:10.1007/s13205-014-0246-5

Saleh, M., Cuevas, M., García, J.F., Sánchez, S., 2014. Valorization of olive Caroço for xylitol and ethanol production from dilute acid pretreatment via enzymatic hydrolysis and fermentation by *Pachysolen tannophilus*. *Biochem. Eng. J.* 90, 286–293

Saska, M., & Ozer, E. (1995). Aqueous extraction of sugarcane bagasse hemicellulose and production of xylose syrup. *Biotechnology and Bioengineering*, 45, 517–523.

SIADÉB. (2013). Sociedade Ibero-Americana para o desenvolvimento das biorrefinarias. Retrieved September 23, 2014, from <http://www.siadeb.org/>

Sun, Y., & Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource technology*, 83(1), 1-11.

TAPPI 204 cm-97, 1997. Solvent extractives of wood and polpa. TAPPI Press, Atlanta, GA

TAPPI 211 om-93, 1993. Ash in wood, polpa, paper and paperboard: Combustion at 525 °C. TAPPI Press, Atlanta, GA.

TAPPI 222 om-02, 2002. Acid-insoluble lignin in wood and polpa. TAPPI Press, Atlanta, GA.

TAPPI UM 250, 1991. Acid-soluble lignin in wood and polpa. TAPPI Press, Atlanta, GA.

USI. (2009). USI Biorefinarias. Retrieved September 23, 2014, from www.usibiorefinarias.com.br

Wolff, J.P. (1997) Analysis and determination of lipids, In: *Analysis of Food Constituents*, Eds. W.J. Stadelman and B.A. Watkins, Wiley-VCH, New York, pp. 175-219.

Zhang, Y.H.P., Hong, J., Ye, X. (2009) Cellulase assays, In: *Biofuels: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, Springer Protocols (J. R. Mielenz, ed.), Humana Press, vol 581, pp. 213-231

Zhou C, Xia X, Lin C, Tong D, Beltramini J (2011) Catalytic conversion of lignocellulosic biomass to fine chemicals and fuels. *ChemSoc Rev* 40:5588–5617.doi:10.1039/C1CS15124J