



**Universidade
de Aveiro
Ano 2012/2013**

Departamento de Química

**Natália Alexandra
da Silva dos Santos**

**Processos de fracionamento para a valorização da
palha de milho**

Aveiro, 2013

**Natália Alexandra
da Silva dos Santos**

**Processos de fracionamento para a valorização da
palha de milho**

Tese apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Química com ramo nos Recursos Renováveis e Biorrefinarias, realizada sob a orientação científica do Doutora Florbela Carvalheiro, Investigadora Auxiliar do Laboratório Nacional de Energia e Geologia, e sob a co-orientação da Doutora Ana Barreto Xavier, Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Aveiro, 2013

Dedico este trabalho aos meus pais, irmão e padrinhos

o júri

Presidente

Doutor Artur Manuel Soares da Silva

Professor Catedrático do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Doutora Florbela Carvalheiro Amaro

Investigadora Auxiliar do Laboratório Nacional de Energia e Geologia

Doutora Maria da Conceição Fernandes

Investigadora Pós-Doc do Centro de Biotecnologia Agrícola e Agro-alimentar do Alentejo

Agradecimentos

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

À minha orientadora na Universidade de Aveiro, a professora Doutora Ana Xavier Barreto, pela orientação científica concedida ao longo do trabalho.

À Doutora Florbela Carvalheiro, por toda a ajuda e dedicação desde o primeiro dia, pela simpatia, compreensão, orientação e por tudo o que me ensinou ao longo deste ano. Obrigada!

Ao Investigador Luís Duarte, pela disponibilidade incondicional, paciência e profissionalismo.

Ao Doutor Rafal pelo apoio prestado nos tratamentos catalisados com CO₂.

À Doutora Luísa B. Roseiro pelo apoio prestado na caracterização das lenhinas solúveis.

À Céu e à Belina pelo apoio prestado a nível experimental.

A todos os colegas de laboratório pelo apoio prestado e excelente ambiente de trabalho proporcionado.

À Patrícia e ao Pedro, obrigado por tudo que me ensinaram e por toda a ajuda prestada, levo comigo um pouco de vocês.

À Ivone, para além de colega de trabalho tornou-se uma amiga, obrigada por teres sido mais que um pilar para mim. Obrigada por tudo que me ensinaste e por todo o profissionalismo que me inculciste. Obrigada Ivone!

À Ana, colega de casa, colega de trabalho, companheira deste difícil ano. Obrigada pelo apoio, sem dúvida há coisas que não acontecem por acaso.

À Carla, à Soraia, à Jack, à Vânia, à Daniela, à Andreia, à Liliana, o meu muito obrigada pela amizade, pela confiança e por estarem lá e me ouvirem nos momentos em que mais precisei.

À Ana Henriques, à Carla Brás, à Carla Fardilha, não fazem ideia do quanto vocês foram em muitos momentos ao meu refúgio. Obrigada por tudo o que me proporcionaram aprender, que sem dúvida me fez chegar até onde estou hoje.

Ao João Ministro, pela enorme amizade, carinho e cumplicidade. Obrigada por todo o apoio, por todas as vezes que precisava de desabafar e estavas lá, por toda a confiança, pois não duvidaste nunca nem me deixaste duvidar. A ti, meu grande amigo, o meu, Muito Obrigada!

Por fim, aos meus pais e ao meu irmão, sem eles nada disto seria possível. Obrigada por acreditarem e por todo o apoio que me deram ao longo dos anos, principalmente este ano, sem vocês, eu não conseguia. Paulo, obrigada por todo o companheirismo e cumplicidade que nos é tão característico.

palavras-chave

Biorrefinarias, dióxido de carbono, pentoses, processos hidrotérmicos, sais inorgânicos, xilitol

Resumo

O presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um processo integrado para a valorização da palha de milho tendo por base o fracionamento seletivo dos seus componentes estruturais

Para a hidrólise seletiva da hemicelulose foram estudados três processos de pré-tratamento: *i*) auto-hidrólise, e processos catalisados com *ii*) dióxido de carbono e *iii*) nitrato de ferro. Em todos os tratamentos hidrotérmicos a hemicelulose solúvel foi maioritariamente recuperada na forma oligomérica, tendo atingido valores semelhantes para a auto-hidrólise e para os processos catalisados com CO₂, respetivamente 36,5 e 32,3 g/100 g arabinoxilana. Ao contrário dos processos anteriores, no processo catalisado com Fe(NO₃)₃, a recuperação mais elevada de pentoses solúveis ocorreu na forma monomérica, 79,6 g/100 g arabinoxilana.

Os hidrolisados resultantes da hidrólise com Fe(NO₃)₃ nas condições otimizadas foram utilizados para o crescimento e, e após concentração e/ou destoxificação, como meio de cultura para a produção de xilitol pela levedura *Debaryomyces hansenii* CCM 941. Foi possível obter crescimento celular e produção de xilitol não se tendo observado uma melhoria da eficiência pela utilização de métodos de destoxificação, pelo que este processo de hidrólise apresenta elevadas potencialidades para a valorização biotecnológica da palha milho.

Para a valorização dos resíduos sólidos, ricos em celulose e lenhina, foi avaliada a remoção da lenhina através da utilização de processos *organosolv* utilizando misturas etanol-água. O rendimento de deslenhificação mais elevado, 80,4%, foi obtido para os sólidos resultantes da auto-hidrólise sendo os valores obtidos para os processos catalisados com CO₂ da ordem dos 70%. Para todas as condições, o tratamento de deslenhificação não afetou a glucana remanescente, cuja sacarificação enzimática foi significativamente aumentada relativamente à matéria-prima inicial.

Keywords

Biorefinery, carbon dioxide, hydrothermal processes, inorganic salts, pentoses, xylitol

Abstract

This work aims to develop an integrated strategy for the selective fractionation of corn straw into its structural components and to study their upgrade potential.

For the selective recovery of hemicellulose, three processes were optimized: i) auto hydrolysis, ii) carbon dioxide and iii) $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ catalyzed processes. All treatments enabled the recovery of hemicellulose-derived products, and oligosaccharides were the main products produced by auto hydrolysis and carbon dioxide assisted processes in a yield of 36.5 and 32.3 g/100 g arabinoxylan, respectively. In contrast, $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ catalyzed process produces the highest recovery of soluble pentoses, mainly in the monomeric form, 79.6 g/100 g arabinoxylan.

The later hydrolysate was used as culture medium for growth, and after concentration and/or detoxification, for xylitol production by the yeast *Debaryomyces hansenii* CCMI 941. An efficient growth and xylitol production was obtained even in non-detoxified medium, demonstrating that detoxification does not have an evident effect on xylitol production, and thus this hydrolytic process would have high potential for biotechnological upgrading of corn straw.

Lignin removal was evaluated using organosolv processes based on ethanol:water mixtures. The highest delignification yield, 80.4%, was obtained for autohydrolysis treated solids. The delignification treatment did not significantly affected glucan, whose enzymatic digestibility was significantly increased for all tested conditions as compared to the feedstock.

Símbolos e abreviaturas

Abs	Absorvância num determinado momento
Abs ₀	Absorvância inicial
AcO	Grupos acetilo ligados aos oligossacarídeos
Ara	Arabinose
ArXn	Arabinoxilanas
A(XOS)	Xilo-oligossacarídeos substituídos com arabinose
CLS	Água de maceração de milho (do inglês <i>Corn steep liquor</i>)
EtOH	Etanol
Glc	Glucose
GlcOS	Gluco-oligossacarídeos
GlyOH	Glicerol
Gn	Percentagem de glucanas (g/100 g)
HMF	5-hidroximetilfurfural
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Pressão (do inglês <i>High Pressure Liquid Chromatography</i>)
INE	Instituto Nacional de Estatística
LHW	Auto-hidrólise (<i>Liquid Hot Water</i>)
ML	Materiais lenhocelulósicos
LNEG	Laboratório Nacional de Energia e Geologia
PEA	Pré-extração aquosa
Q _s	Taxa volumétrica de consumo de substrato (g·L ⁻¹ ·h ⁻¹)
Q _{xilose}	Produtividade em xilitol (g·L ⁻¹ ·h ⁻¹)
Q _x	Produtividade celular (g·L ⁻¹ ·h ⁻¹)
R ₀	Fator de severidade
RLS	Razão líquido-sólido
TEVM	Microelementos, Vitaminas e Minerais (do inglês <i>Trace Elements, Vitamins and Minerals</i>)
TFA	Ácido trifluoroacético
XDH	Xilitol-desidrogenase
X _f	Concentração final de biomassa (g·L ⁻¹)

X_i	Concentração inicial de biomassa ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
X_n	Xilana ($\text{g}/100 \text{ g}$)
XOH	Xilitol
XR	Xilose-redutase
Xyl	Xilose
$Y_{X/S}$	Rendimento celular ($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
Y_{Xilitol}	Rendimento em xilitol ($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
$\mu_{\text{máx}}$	Taxa específica máxima de crescimento (h^{-1})

Índice

Símbolos e abreviaturas.....	XV
ÍNDICE DE FIGURAS	XXI
ÍNDICE DE TABELAS	XXIII
1. Introdução.....	1
1.1. O conceito de biorrefinaria.....	1
1.2. Os materiais lenhocelulósicos	3
1.2.1. A celulose.....	6
1.2.2. As hemiceluloses.....	6
1.2.3. A lenhina	8
1.2.4. Outros compostos poliméricos	9
1.2.5. Compostos de baixa massa molecular	10
1.3. Aproveitamento de resíduos agroindustriais: a palha de milho	10
1.4. Métodos de fracionamento dos materiais lenhocelulósicos	13
1.4.1. Métodos ácidos	14
1.4.1.1. Hidrólise com ácidos concentrados	16
1.4.1.2. Hidrólise com ácidos diluídos	16
1.4.2. Métodos hidrotérmicos	17
1.4.2.1. Auto-hidrólise.....	18
1.4.2.2. Processos catalisados com CO ₂	18
1.4.2.3. Explosão com vapor.....	19
1.4.3. Hidrólise com sais inorgânicos	19
1.4.4. Métodos enzimáticos	20
1.4.5. Métodos para o fracionamento seletivo da lenhina.....	21
1.4.6. Fator de severidade	22
1.5. Formação de inibidores durante os processos de hidrólise.....	22
1.5.1. Métodos de destoxificação.....	23
1.6. O xilitol.....	24
1.6.1. Métodos de produção do xilitol.....	25

1.6.2. Microrganismos produtores do xilitol.....	27
1.6.3. A levedura <i>Debaryomyces hansenii</i>	28
1.6.4. Metabolismo da D-xilose em leveduras	28
1.6.5. Fatores que influenciam a produção biotecnológica do xilitol	29
2. Materiais e Métodos.....	33
2.1. Matéria-prima	33
2.1.1. Caracterização granulométrica.....	33
2.2. Pré-extração aquosa da palha de milho	34
2.3. Fracionamento seletivo das hemiceluloses	34
2.3.1. Tratamento hidrotérmico catalisado com CO ₂	34
2.3.2 Auto-hidrólise	36
2.3.3. Hidrólise com sais inorgânicos	37
2.4. Deslenhificação.....	37
2.5. Hidrólise Enzimática	37
2.6. Obtenção de hidrolisados para os ensaios de bioconversão.....	38
2.6.1 Destoxificação dos hidrolisados	38
2.6.1.1. Ajuste de pH	39
2.6.1.2. Tratamento com carvão ativado.....	39
2.6.1.3. Concentração do hidrolisado	39
2.7. Bioconversão dos hidrolisados	40
2.7.1. Preparação dos meios de cultura	40
2.7.2. Microrganismo.....	40
2.7.3. Ensaios de crescimento celular.....	40
2.7.4. Ensaios de produção de xilitol.....	41
2.7.4.1. Preparação do inóculo	41
2.7.4.2. Condições de cultura	41
2.8. Métodos Analíticos	42
2.8.1. Caracterização química da matéria-prima e resíduos sólidos resultantes dos pré-tratamentos.....	42
2.8.1.1. Determinação da humidade	42
2.8.1.2. Determinação da cinza	42

2.8.1.3. Determinação do resíduo seco	43
2.8.1.4. Determinação da concentração de biomassa celular	43
2.8.1.5. Determinação do teor de extratáveis	43
2.8.1.6. Determinação da proteína	44
2.8.1.7. Determinação dos polissacarídeos e grupos acetilo	44
2.8.1.8. Determinação da lenhina Klason	45
2.8.2. Determinação de monossacarídeos, ácidos alifáticos e composto furânicos	45
2.8.3. Determinação dos oligossacarídeos	46
2.8.4. Determinação de compostos fenólicos	47
3. Resultados e Discussão	48
3.1. Caracterização da palha de milho	49
3.1.1. Caracterização granulométrica	49
3.1.2. Caracterização química	50
3.1.3. Caracterização dos licores e resíduos sólidos resultantes a pré-extração aquosa	51
3.2. Fracionamento seletivo das hemiceluloses	52
3.2.1. Tratamentos hidrotérmicos	52
3.2.1.1 Tratamento com pressão inicial de CO ₂ de 400 psi	54
3.2.1.2. Tratamento com pressão inicial de CO ₂ de 600 Psi	60
3.2.1.3. Auto-hidrólise	66
3.2.2 Hidrólise com sais inorgânicos	68
3.2.3. Deslenhificação <i>organosolv</i>	75
3.2.4. Hidrólise enzimática	78
3.3. Crescimento da levedura <i>Debaryomyces hansenii</i> em hidrolisado	79
3.4. Efeito da destoxificação na composição química do hidrolisado	83
3.5. Efeito da destoxificação e suplementação na produção de xilitol	85
4. Conclusão e perspectivas	91
Bibliografia	93
Anexos	103

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Ilustração do conceito de biorrefinaria	2
Figura 2 - Organização estrutural dos componentes macromoleculares de materiais lenhocelulósicos	5
Figura 3 - Representação esquemática de uma molécula de hemicelulose (xilana).....	8
Figura 4 - Percursos da lenhina.....	8
Figura 5 - Produção mundial de milho.	11
Figura 6 - Principais produtos resultantes da hidrólise de um material lenhocelulósico	14
Figura 7 - Mecanismo proposto para a cisão das ligações glicosídicas na despolimerização das hemiceluloses em meio ácido.....	15
Figura 8 - Fluxograma da produção de xilitol por via química e biotecnológica	26
Figura 9 – Esquema do sistema dos tratamentos hidrotérmicos catalisados com CO ₂	36
Figura 10 – Distribuição das diferentes frações granulométricas da palha de milho	49
Figura 11 – Perfis de temperatura e pressão	53
Figura 12 – Recuperação das arabinoxilanas e rendimentos em função do fator de severidade, após os tratamentos hidrotérmicos a pressão inicial de CO ₂ de 400 Psi	55
Figura 13 - Recuperação das glucanas e rendimentos em função do fator de severidade, após os tratamentos hidrotérmicos a pressão inicial de CO ₂ de 400 Psi	56
Figura 14 – Recuperação de lenhina Klason em função do fator de severidade após os tratamentos hidrotérmicos a pressão inicial de CO ₂ de 400 Psi	60
Figura 15 - Recuperação das (arabino)xilanas e rendimentos em função do fator de severidade, após os tratamentos hidrotérmicos a pressão inicial de 600 Psi	61
Figura 16 - Recuperação das glucanas e rendimentos em função do fator de severidade, após os tratamentos hidrotérmicos a pressão inicial de CO ₂ de 600 Psi	62
Figura 17 - Recuperação de lenhina Klason em função do fator de severidade após os tratamentos hidrotérmicos a pressão inicial de CO ₂ de 600 Psi	65
Figura 18 - Composição relativa dos hidrolisados obtidos para a auto-hidrólise (AH) e tratamentos hidrotérmicos com diferentes pressões iniciais de CO ₂ (400 Psi e 600 Psi) nas condições de severidade correspondentes à recuperação máxima	67
Figura 19 – Composição relativa dos resíduos sólidos obtidos para a auto-hidrólise (AH) e tratamentos hidrotérmicos com diferentes pressões iniciais de CO ₂ (400 Psi e 600 Psi) nas condições de severidade correspondentes à recuperação máxima de pentoses.....	68
Figura 20 – Recuperação das arabinoxilanas e rendimentos em função do fator de severidade, após hidrólise com Fe(NO ₃) ₃	70
Figura 21 – Recuperação das glucanas e rendimentos em função do fator de severidade, após hidrólise com Fe(NO ₃) ₃	71
Figura 22 – Recuperação da lenhina Klason em função do fator de severidade após o tratamento com Fe(NO ₃) ₃	75
Figura 23 – Recuperação dos polissacarídeos após deslenhificação dos resíduos sólidos por auto-hidrólise (AH) e tratamentos hidrotérmicos com diferentes pressões iniciais de CO ₂ (400 Psi e 600 Psi) nas condições de severidade correspondentes à recuperação máxima de pentoses.....	77

Figura 24 – Perfis de crescimento da levedura <i>D. hansenii</i> em hidrolisado resultante da condição otimizada na hidrólise com $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$	80
Figura 25 – Perfis de consumo de xilose, glucose, arabinose, ácido acético, glicerol, HMF e furfural da levedura <i>D.hansenii</i> em hidrolisado suplementado.....	82
Figura 27 – Perfil de consumo de xilose, arabinose e glucose, acumulação de xilitol, etanol e glicerol e de crescimento da levedura <i>D. hansenii</i> , em hidrolisado concentrado não-destoxificado suplementado	87

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Plantação mundial (ha) dos principais cereais	12
Tabela 2 - Composição da palha de milho (% base seca)	12
Tabela 3 - Condições operacionais utilizadas na hidrólise com ácido diluído de diferentes materiais lenhocelulósicos.	17
Tabela 4 - Principais enzimas envolvidas na hidrólise de xilanas	21
Tabela 5 - Propriedades físicas e químicas do xilitol	25
Tabela 6 – Dimensões dos peneiros usados na caracterização granulométrica	33
Tabela 7 – Ensaios realizados em hidrolisado concentrado para avaliação do efeito da destoxificação e suplementação	42
Tabela 8 – Equipamento e condições de operação para as análises por HPLC.....	46
Tabela 9 – Composição química média da palha de milho (% base seca).....	50
Tabela 10 – Rendimentos e respectivas concentrações de açúcares obtidos nos licores resultantes da pré-extração aquosa da palha de milho	51
Tabela 11 – Composição polimérica da palha de milho após pré-extração aquosa	52
Tabela 12 – Condições experimentais utilizadas nos diferentes ensaios de processamento hidrotérmico	54
Tabela 13 – Composição ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) dos licores obtidos a partir dos tratamentos hidrotérmicos catalisados com CO_2 a uma pressão inicial de 400 Psi	58
Tabela 14 – Composição polimérica dos resíduos sólidos obtidos após tratamento hidrotérmico catalisado com CO_2 a uma pressão inicial de 400 Psi.....	59
Tabela 15 – Composição ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) e respectivos valores de pH dos licores obtidos a partir dos tratamentos hidrotérmicos catalisados com CO_2 , a uma pressão inicial de 600 Psi.....	64
Tabela 16 - Composição polimérica dos resíduos sólidos obtidos após tratamento hidrotérmico catalisado com CO_2 , a uma pressão inicial de 600 Psi.....	65
Tabela 17 – Composição ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) e respectivos valores de pH dos licores obtidos a partir da hidrólise da palha de milho com $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$	72
Tabela 18 - Composição polimérica dos resíduos sólidos tratados após hidrólise com $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$	74
Tabela 19 - Composição química dos resíduos sólidos após tratamentos hidrotérmicos, sem adição do CO_2 (auto-hidrólise) e com diferentes pressões iniciais de CO_2 (400 e 600 Psi), e após deslenhificação	76
Tabela 20 – Rendimentos de sacarificação obtidos após hidrólise enzimática dos resíduos sólidos obtidos nas condições otimizadas antes (não-deslenhificados) e após deslenhificação (deslenhificados)	79
Tabela 21 – Parâmetros cinéticos e estequiométricos para a levedura <i>D. hansenii</i> cultivada em hidrolisado com microelementos, vitaminas, magnésio, fontes de azoto e fósforo (TEVM) e em hidrolisado com sais e vitaminas	80
Tabela 22 – Compostos inibidores e monossacarídeos remanescentes no hidrolisado após os vários tratamentos de destoxificação utilizados.....	84
Tabela 23 – Composição dos hidrolisados ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) utilizados nos ensaios de bioconversão	86
Tabela 24 – Efeito da destoxificação e suplementação nos parâmetros cinéticos e estequiométricos do crescimento e produção de xilitol pela levedura <i>D. hansenii</i>	88

Tabela 25 - Composição da solução de sais 40 vezes concentrada	103
Tabela 26 - Composição da solução de NP 20 vezes concentrada.....	104
Tabela 27 - Composição da solução de Mg 40 vezes concentrada	105
Tabela 28 - Composição da solução de vitaminas e cálcio 100 vezes concentradas	105
Tabela 29 – Composição stock de <i>Corn Steep Liquor</i> utilizado para a solução	106
Tabela 30 – Reagentes utilizados na determinação da proteína total.....	108

1. Introdução

O interesse pela utilização dos resíduos agroindustriais como fonte de biomassa lenhocelulósica e potencial matéria-prima para as biorrefinarias tem vindo a crescer, devido à elevada quantidade produzida anualmente, à possibilidade de valorização industrial, à sua disponibilidade e baixo custo e ao elevado potencial de bioconversão. Destes podem destacar-se os resíduos resultantes da produção de milho, uma das culturas mais importantes a nível Mundial.

No entanto, estes materiais, assim como todos os materiais lenhocelulósicos (ML) na sua generalidade, possuem uma estrutura complexa requerendo pré-tratamentos e processos de fracionamento para serem eficientemente convertidos em produtos.

Neste trabalho apresenta-se uma revisão dos processos de pré-tratamento da biomassa, em particular dos que conduzem ao fracionamento das hemiceluloses, sendo então descritos os componentes dos materiais lenhocelulósicos. É então feita uma referência particular à composição daqueles que são obtidos a partir dos resíduos da cultura do milho, potenciais substratos para a obtenção de meios de cultura ricos em pentoses para a produção biotecnológica de diversos produtos. Neste âmbito é também abordada a importância do xilitol e são referidas as principais leveduras produtoras de xilitol assim como os fatores que afetam a sua produção.

1.1. O conceito de biorrefinaria

Ao longo dos últimos anos, os materiais de origem fóssil foram substituindo gradualmente os recursos renováveis como principal fonte de materiais, de energia e químicos. No entanto, as reservas de combustíveis fósseis são cada vez mais escassas o que torna imperativa a procura de alternativas pouco poluentes e economicamente viáveis. Os avanços da investigação na área química e biológica, assim como nos processos que lhes estão associados, terão um grande impacto nas biorrefinarias do século XXI, instalações que convertem recursos renováveis, como por exemplo biomassa, em produtos químicos úteis obtidos a partir de tecnologias pouco poluentes e inovadoras. Esta variedade de produtos obtidos a partir da biomassa, começa a constituir uma alternativa aos produtos de base petroquímica (Uihlein e Schebek, 2009).

Uma biorrefinaria consiste numa unidade industrial que integra equipamentos e processos de conversão de biomassa de forma sustentável, para a produção de

combustíveis, energia, materiais e produtos químicos, preferencialmente de valor acrescentado (Figura 1).

O conceito de biorrefinaria surgiu por analogia ao das refinarias de petróleo, que produzem combustíveis e derivados de petróleo. As biorrefinarias industriais têm sido vistas como o início de um percurso promissor para uma nova indústria de base biológica (SIADEB, 2013; Biopol, 2008). No entanto, utilizar biomassa para produzir múltiplos produtos tendo como base complexas tecnologias não é considerado um processo fácil de se conseguir (Kamm e Kamm, 2004; Silvestre, 2007; Kamm e Kamm, 2007). O objetivo principal de uma biorrefinaria desenvolvida será tirar partido da complexidade da biomassa de forma a produzir produtos de elevado valor e de baixo volume e produtos de baixo valor e elevado volume, de forma a otimizar a produção de produtos de valor acrescentado (Fernando *et al.*, 2006). Embora o conceito seja similar ao das refinarias petroquímicas, a natureza química e física da biomassa requer uma especial atenção aos processos de transformação e separação sejam eles físicos ou químicos (Ragauskas *et al.*, 2006).

Biorrefinarias podem então ser classificadas de acordo com i) o processo tecnológico, ii) a matéria-prima utilizada e iii) o desenvolvimento tecnológico do processo.

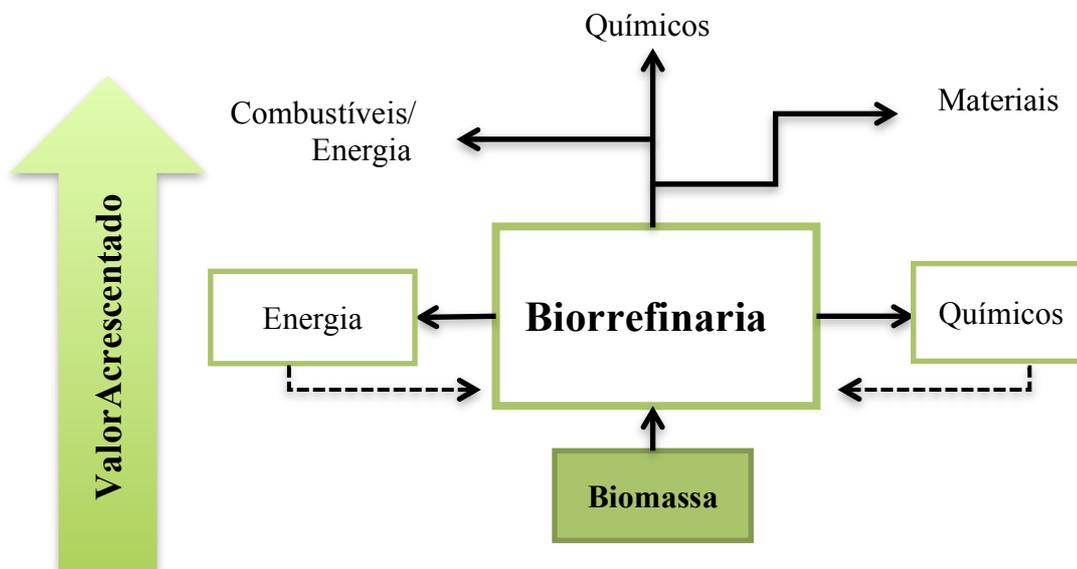


Figura 1 – Ilustração do conceito de biorrefinaria (adaptado de (SIADEB, 2013))

Uma ampla gama de processos tecnológicos podem estar envolvidos nas biorrefinarias, desde os processos de extração/separação até às conversões termoquímicas e

químicas/bioquímicas da biomassa, de forma a obter um maior número de produtos de valor acrescentado. Biorrefinarias podem então ser classificadas de acordo com os processos tecnológicos envolvidos, definindo-se em diferentes plataformas (Kamm, 2007; Kamm *et al.*, 2006). A plataforma termoquímica envolve a decomposição de biomassa com recurso a calor e a catalisadores, a partir da gaseificação e pirólise, de forma a produzir produtos de valor acrescentado. A plataforma bioquímica envolve pré-tratamentos físico-químicos tendo em vista a conversão de biomassa em açúcares simples na presença de biocatalisadores e posterior fermentação de forma a produzir combustíveis líquidos e materiais de modo sustentável. Esta permite operar a uma escala inferior à plataforma termoquímica e de modo mais descentralizado. Apesar de enfrentar barreiras tecnológicas e económicas provenientes da complexidade e resistência da parede celular, esta confere à biomassa a sua desconstrução e degradação em monossacarídeos (Naik *et al.*, 2010; Kamm *et al.*, 2006).

O uso de qualquer uma das plataformas vai depender do tipo de instalação (biorrefinaria) e desenvolvimento tecnológico que esta envolva.

O desenvolvimento destas instalações passa por aperfeiçoar os processos envolvidos na via termoquímica e bioquímica e estabelecer sinergias entre ambos de modo a alargar a origem da matéria-prima e a fazer face à sua heterogeneidade e complexidade estrutural. Em simultâneo há que conceber processos e equipamentos de modo a minimizar o desperdício e a maximizar o rendimento não só em combustíveis líquidos como também em produtos de valor acrescentado (Bozell e Petersen, 2010; Werpy *et al.*, 2004).

1.2. Os materiais lenhocelulósicos

A crescente escassez das tradicionais fontes de matérias-primas na indústria química, ou seja, os recursos fósseis, impulsiona um aproveitamento mais racional de recursos e fontes mais alternativas. Como matérias-primas, os ML apresentam a vantagem de serem atrativos para uma enorme variedade de processos químicos, são abundantes, renováveis e estão disponíveis a baixo custo de obtenção.

Os ML incluem diferentes tipos de biomassa de origem vegetal que têm como característica comum serem constituídos por polissacarídeos (celulose e hemicelulose) e lenhina (Fengel e Wegener, 1983). Os ML representam cerca de 50% da biomassa vegetal

global e têm uma produção anual estimada de 10-50 mil milhões de toneladas (Salanti *et al.*, 2010).

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

Os ML são normalmente considerados abundantes, de baixo custo e potencialmente valorizáveis. Contudo, devido às elevadas quantidades processadas, podem, em alguns casos, constituir um problema ambiental, marcando assim um encargo significativo neste sector. Então, de acordo com a sua origem, os subprodutos e os resíduos lenhocelulósicos podem também ser classificados como: florestais (provenientes das florestas e das indústrias da pasta de papel e da transformação da madeira, incluindo aparas e serradura), agrícolas (palhas, cascas, caules e espigas de cereais, podas de árvores de fruto e de videiras), agroindustriais (bagaço de azeitona extratado, dreche cervejeira, polpa, casca e sementes de frutos e vegetais) e urbanos (papéis, cartões e lixo doméstico constituídos por celulose) (Duarte *et al.*, 2007).

No decorrer dos anos tem havido um crescente interesse pelos resíduos agroindustriais devido à elevada quantidade produzida anualmente, à possibilidade de valorização industrial, à sua disponibilidade e baixo custo e ao elevado potencial de bioconversão (Carvalho *et al.*, 2008). No entanto, estes materiais, assim como todos os ML na sua generalidade, possuem uma estrutura complexa requerendo pré-tratamentos e processos de fracionamento para serem eficientemente convertidos em produtos.

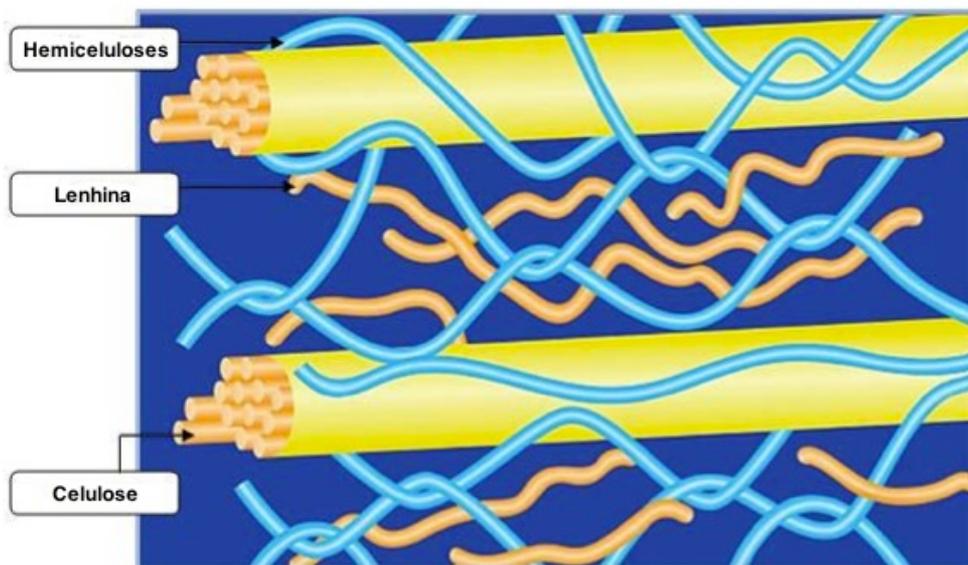


Figura 2 - Organização estrutural dos componentes macromoleculares de materiais lenhocelulósicos (adaptado de (Jeremy, 2009))

Do ponto de vista químico, os componentes dos ML podem ser classificados em componentes de elevada e baixa massa molecular. Os de elevada massa molecular são os principais constituintes da parede celular: a celulose (35-50%), a hemicelulose (20-35%) e a lenhina (10-25%). Nos materiais de baixa massa molecular, estão incluídos os extratáveis (compostos orgânicos) e a cinza (compostos inorgânicos).

A composição química dos ML é variável, dependendo completamente do tipo de material e dos fatores genéticos deste, assim como as condições de crescimento e da sua origem geográfica.

A Figura 2 representa a organização dos polímeros estruturais na parede celular. O esqueleto microfibrilar de celulose encontra-se envolto por moléculas de hemicelulose, estando a lenhina a ocupar os espaços vazios deixados entre as moléculas de hemiceluloses. No seu conjunto formam um material compósito resistente a ataques microbiológicos e enzimáticos e, conseqüentemente ao seu fracionamento (Fengel e Wegener, 1983; Pereira *et al.*, 2003).

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

1.2.1. A celulose

A celulose é o principal componente na maioria dos ML, podendo representar 35-50% da sua massa, e está localizada predominantemente na parede secundária. É um polímero constituído por moléculas de β -D-glucopiranosose (forma cíclica da glucose) unidas por ligações glicosídicas β -(1,4) (Ek *et al.*, 2009). Porém, cada molécula de glucose apresenta uma rotação 180° em relação às moléculas vizinhas, pelo que a unidade básica de repetição é na realidade uma molécula de celobiose (Nag, 2008). É esta organização que permite o estabelecimento de ligações entre as várias cadeias de celulose, associada ao arranjo estrutural desta molécula.

A orientação das ligações e pontes de hidrogénio entre cadeias de celulose fazem da celulose um polímero altamente estável e cristalino (Khanal, 2010), apresentando um elevado grau de polimerização (cerca de 10000) (Pereira *et al.*, 2003).

Devido à linearidade da cadeia de celulose, as cadeias adjacentes formam um conjunto de agregados denominados de fibrilhas elementares. Por sua vez, a agregação das fibrilhas origina as microfibrilas de celulose. As referidas microfibrilas são na sua maioria independentes mas a sua ultra-estrutura é em grande parte devido à presença de ligações covalentes, ligações de hidrogénio e forças de Van der Waals. As ligações de hidrogénio no interior das microfibrilas de celulose determinam a linearidade da cadeia, contudo as pontes de hidrogénio podem introduzir ordem (cristalina) ou desordem (amorfo) na estrutura da cadeia polimérica (Agbor *et al.*, 2011). A forma amorfa é facilmente degradada, sendo que a forma cristalina é mais resistente ao ataque químico e à degradação microbiana. Sabendo então que existem zonas amorfas, estima-se que 70% da celulose se encontre sob a forma cristalina e altamente ordenada. Este facto significa que a celulose é insolúvel em água e na grande maioria dos solventes, porém é solúvel em ácidos, nomeadamente ácido sulfúrico e/ou em outras soluções iónicas (Carvalho, 2005).

1.2.2. As hemiceluloses

A hemicelulose é o segundo polímero mais abundante da biomassa lenhocelulósica (20-50%). É um heteropolímero constituído a partir de vários açúcares, compreendendo dois grandes grupos: pentoses (β -D-xilose, α -L-arabinose) e hexoses (β -D-manose, β -D-glucose, α -D-galactose). Também apresenta pequenas quantidades de L-ramnose, L-fucose

e de ácidos urónicos (ácidos α -D-glucorónico, α -D-4-*O*-metilglucurónico, α -D-galacturónico). Os grupos hidroxilo dos açúcares podem ser parcialmente substituídos por grupos acetilo (Kumar *et al.*, 2008).

Entre os componentes estruturais da parede celular, a hemicelulose é mais suscetível a tratamentos químicos e termoquímicos, uma característica atribuída na sua maioria devido ao seu carácter amorfo e ao baixo grau de polimerização, permitindo que seja facilmente hidrolisável em meios ácidos e solúvel em meios alcalinos, à temperatura ambiente. A sua solubilização ocorre a partir dos 180°C, embora a partir dos 150°C ocorra solubilização parcial.

As hemiceluloses apresentam diferenças quanto à sua estrutura e composição em função da sua origem biológica. Nas madeiras folhosas as hemiceluloses predominantes são as xilanas (*O*-acetil-metilglucuronoxilana) e as glucomananas (em menor quantidade). Por outro lado, no grupo das resinosas, a hemicelulose é essencialmente constituída por galactoglucomananas (*O*-acetil-galactoglucomanana), contendo também algumas xilanas (arabino-4-*O*-metilglucuronoxilana) (Fengel e Wegener, 1983). No entanto, as resinosas possuem uma proporção superior de unidades de manose e glucose comparativamente às hemiceluloses das folhosas e resíduos agrícolas. O conteúdo de manose pode chegar aos 10% nas folhosas e até 5% nos resíduos agrícolas. Nestes dois últimos grupos de materiais, em geral, cerca de 80% dos açúcares hemicelulósicos correspondem a xilose, pelo que é frequente associar o conteúdo em hemicelulose ao conteúdo em xilanas (Moure *et al.*, 2006).

As xilanas mais comuns são formadas por uma cadeia principal de xilose ligada por ligações β -1,4, onde as unidades estruturais são substituídas por arabinose, ácido glucurónico, acético, ferúlico e *p*-cumárico (Figura 3) (Moure *et al.*, 2006).

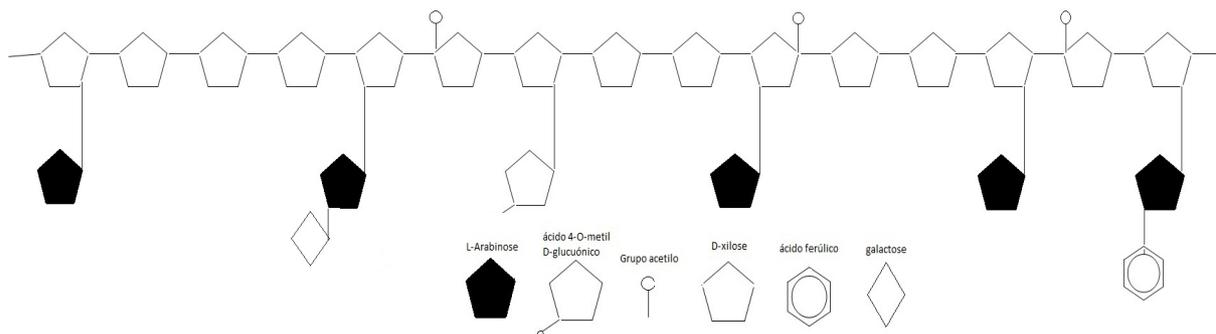


Figura 3 - Representação esquemática de uma molécula de hemicelulose (xilana) (adaptado de (Guerra, 2011))

As hemiceluloses são solúveis em soluções alcalinas e facilmente hidrolisáveis por ácidos nos seus componentes monoméricos, apresentando uma estabilidade química e térmica inferior à celulose, provavelmente devido à falta de cristalinidade e ao grau de polimerização mais baixo (até 200) (Pereira *et al.*, 2003).

Da hidrólise das hemiceluloses obtém-se hidrolisado que pode conter hexoses (glucose, manose e galactose), pentoses (xilose e arabinose), pequenas quantidades de outras hexoses (fucose e ramnose) e ainda ácidos urónicos e acético que se encontram ligados a alguns açúcares.

1.2.3. A lenhina

A lenhina é um heteropolímero complexo de massa molecular elevada e de natureza polifenólica constituído por unidades básicas de fenilpropano, unidas por ligações éter e carbono-carbono com diversos padrões de ligação. Apresenta uma estrutura tridimensional complexa e de difícil degradação microbiana (Fengel e Wegener, 1983).

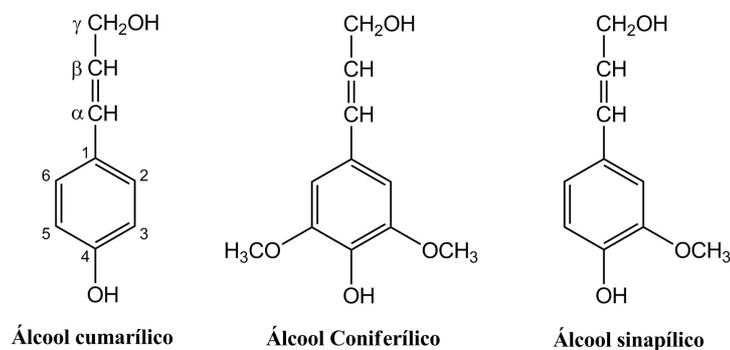


Figura 4 - Percursos da lenhina.

A lenhina é o principal constituinte da lamela média, unindo os elementos celulares entre si. Nos materiais lenhocelulósicos tem fundamentalmente um papel de suporte mecânico, condução de solutos e de proteção a agentes exteriores nas plantas superiores (Fengel e Wegener, 1983).

A macromolécula de lenhina é formada a partir de três álcoois: *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico (Figura 4). Estes três monómeros são compostos por um anel fenólico ligado a uma cadeia de três carbonos que possuem um grupo hidroxilo no carbono terminal.

O que distingue estes três monómeros é a ausência e presença do grupo metoxilo nos três álcoois. Como se pode ver pela figura o álcool cumarílico não tem qualquer tipo de substituinte metoxilo, no entanto um e dois substituintes metoxilo podem ser encontrados nos álcoois coniferílico e sinapílico, respectivamente (Fengel e Wegener, 1983).

Tal como ocorre nas hemiceluloses, este polímero apresenta uma composição muito diversa e que depende muito da origem da matéria-prima.

Devido à natureza química, a lenhina é um dos polímeros naturais mais resistentes a reações de hidrólise alcalina, ácida e enzimática, tornando-se mais suscetível do que os polissacarídeos a reações de oxidação ou a ação de solventes orgânicos (Weng *et al.*, 2008).

1.2.4. Outros compostos poliméricos

Os ML podem também conter outros polímeros, geralmente presentes em menores quantidades, e em quantidades muito variáveis tais como as pectinas, proteínas e amido.

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

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

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

1.2.5. Compostos de baixa massa molecular

Para além dos componentes macromoleculares, todas as espécies vegetais contêm pequenas quantidades de outras substâncias químicas nas suas paredes celulares. Essas substâncias químicas representam, na sua maioria, uma pequena fração dos materiais lenhocelulósicos (em geral inferior a 10%), mas no entanto podem influenciar nas suas propriedades e afetar o seu processamento (Fengel e Wegener, 1983). Estes compostos podem ser divididos em orgânicos (extratáveis) e inorgânicos (cinza). A composição e quantidade relativa desses compostos dependem de fatores como a espécie, a proveniência, a idade e a localização na planta, à semelhança do que acontece com os compostos macromoleculares (Fengel e Wegener, 1983).

Os compostos orgânicos, do tipo lipofílico e hidrofílico, compreendem uma grande variedade de terpenóides, esteróis, ácidos gordos esterificados com glicerol ou com álcoois de elevado peso molecular (ceras), ácidos gordos livres, compostos fenólicos (como os taninos), aminoácidos, pectinas, amidos e alcalóides (Mustranta *et al.*, 1995; Philipp e D'Almeida, 1988). São normalmente quantificados tendo em conta a sua solubilidade (total ou parcial) em solventes orgânicos neutros e/ou água, designando-se, por essa razão, extratáveis. A maior parte deles são metabolitos secundários, importantes para o desenvolvimento e crescimento celular e como agentes de defesa contra os ataques microbianos (Pereira *et al.*, 2003).

Os compostos inorgânicos incluem elementos como o potássio, magnésio e silício, no geral em quantidades inferiores a 1% (Fengel e Wegener, 1983).

1.3. Aproveitamento de resíduos agroindustriais: a palha de milho

O milho é uma planta da família das gramíneas e pertence à espécie *Zeamays*. Trata-se de um cereal com um valor nutricional elevado sendo fundamentalmente utilizado na alimentação humana e em rações para animais.

O milho constitui a base da alimentação de várias civilizações importantes durante séculos. Pensa-se que seja uma planta de origem americana, cuja cultura se expandiu após a descoberta da América e as grandes navegações do século XVI. O milho tornou-se então, no nosso contexto agrícola, uma das culturas arvenses mais importantes à escala mundial.

Atualmente é cultivado e consumido em quase todos o mundo e só rivaliza com a cultura do trigo e do arroz. A produção mundial do milho de acordo com os dados

divulgados pelo Conselho Internacional dos Cereais (CIC), foi de 876 milhões de toneladas em 2011/2012 prevendo-se para o ano de 2012/2013 uma produção de 830 milhões de toneladas de milho e 655 milhões de toneladas de trigo (Figura 5) (Anpromis, 2012). Esta possível redução na produção de milho pode-se dever as condições meteorológicas adversas em certas zonas do globo, nomeadamente a seca que se tem feito sentir nos Estados Unidos, principal produtor mundial do milho. No entanto, quando comparado com o arroz, a cevada e o trigo, o milho continua a liderar a área total em Portugal, chegando aos 40% de toda a área total ocupada pelos cereais (Anpromis, 2012).

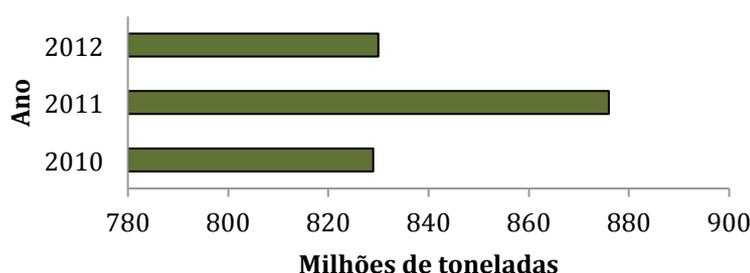


Figura 5 - Produção mundial de milho (Anpromis, 2012).

Em Portugal, em 1999, a cultura do milho chegava aos 163 497 hectares e a sua produção atingia aproximadamente um milhão de toneladas. A Região Agrária da Beira Litoral e a Zona Agrária do Baixo Mondego eram as que mais contribuía para a produção do milho.

Apesar das condições climáticas e económicas, que se têm vindo a sentir, este ano semearam-se cerca de 150 000 hectares de milho, mais 8 500 hectares que em 2010 (Tabela 2), comprovando-se que, os produtores nacionais continuam a apostar na cultura do milho (Anpromis, 2012).

De acordo com os dados disponibilizados pelo INE (Instituto Nacional de Estatística), a produção de milho aumentou cerca de 33%, quando comparada com 2010 e 2011(Anpromis, 2012).

Tabela 1 - Plantação mundial (ha) dos principais cereais (Anpromis, 2012).

	Arroz	Cevada	Milho	Trigo
2010	28 985	20 322	32 491	51 026
2011	31 213	16 213	137 413	39 546
2012*	30 965	17 516	140 723	50 693

* valores estimados

Após a colheita do milho, os principais resíduos são o caule, as folhas, que no seu conjunto constituem a palha, e o carolo. Estes resíduos têm pouco ou nenhum aproveitamento. No caso do carolo por exemplo, este é deixado no campo não tendo qualquer utilização atual. No caso particular da palha, esta pode também ser usada como cobertura do solo após a colheita, podendo ser deixada no solo, que até uma certa percentagem, é favorável para fins de adubação. Estes valores deverão ser da ordem dos 30% da palha produzida (Anpromis, 2012). Quando em excesso, pode causar problemas ambientais (Agronegócio, 2001). Será ainda de referir que as quantidades de palha produzidas são muito significativas, representando quantitativamente 40% em relação ao grão produzido (Pordesimo *et al.*, 2004).

Na Tabela 2 é apresentada a composição química da palha de milho.

Tabela 2 - Composição da palha de milho (% base seca)

Componentes	(Aguiar, 2010)	(Moniz <i>et al.</i>, 2009)
Celulose	40,9	42,1
Hemicelulose	31,5	29,2
Xilanas	25,3	22,9
Arabinanas	6,3	2,9
Grupos Acetilo	-	3,4
Lenhina	23,1	17,5
Outros	9,5	15,8
Cinza	-	4,2
Extratáveis	-	11,6

Para além da atual utilização alimentar o milho pode ainda ser utilizado para a produção de biocombustíveis ou biopolímeros, o que confere a esta cultura um grande potencial para uma possível aplicação em diversas indústrias. Os resíduos desta cultura em

particular, também se assumem como uma fonte de biomassa alternativa para a produção de energia, por exemplo, biocombustíveis líquidos, como o etanol (Chu *et al.*, 2012) com a vantagem de não competirem com as matérias-primas para utilizações alimentares. Para além disso, como qualquer outro ML pode ainda ser utilizada para a obtenção de vários químicos entre eles, produtos de valor acrescentado, tais como oligossacáridos (Moura *et al.*, 2007; Kiran *et al.*, 2008).

1.4. Métodos de fracionamento dos materiais lenhocelulósicos

No âmbito de uma biorrefinaria, um pré-requisito para a conversão biológica da biomassa é que esta seja sujeita a processos de pré-tratamento/fracionamento de modo a produzir monossacarídeos acessíveis aos microrganismos, uma vez que a estrutura polimérica dos materiais lenhocelulósicos impede a utilização direta dos seus componentes pela maioria destes (Peters, 2007).

Para tal, poderão ser utilizados processos físicos, químicos, e/ou biológicos. A principal limitação dos métodos de fracionamento existentes reside na dificuldade de separação de um tipo de componente sem que ocorra alguma degradação na estrutura química dos restantes, pelo que a seleção do método e das condições operacionais do pré-tratamento é fundamental. Existem diversos pré-tratamentos que permitem a desconstrução da biomassa, com o objetivo de remover e despolimerizar parcialmente as hemiceluloses, reduzir a cristalinidade da celulose e remover a lenhina (Taherzadeh e Karimi, 2004). Consoante o agente promotor da hidrólise estes podem ser classificados em métodos ácidos, hidrotérmicos, alcalinos e enzimáticos.

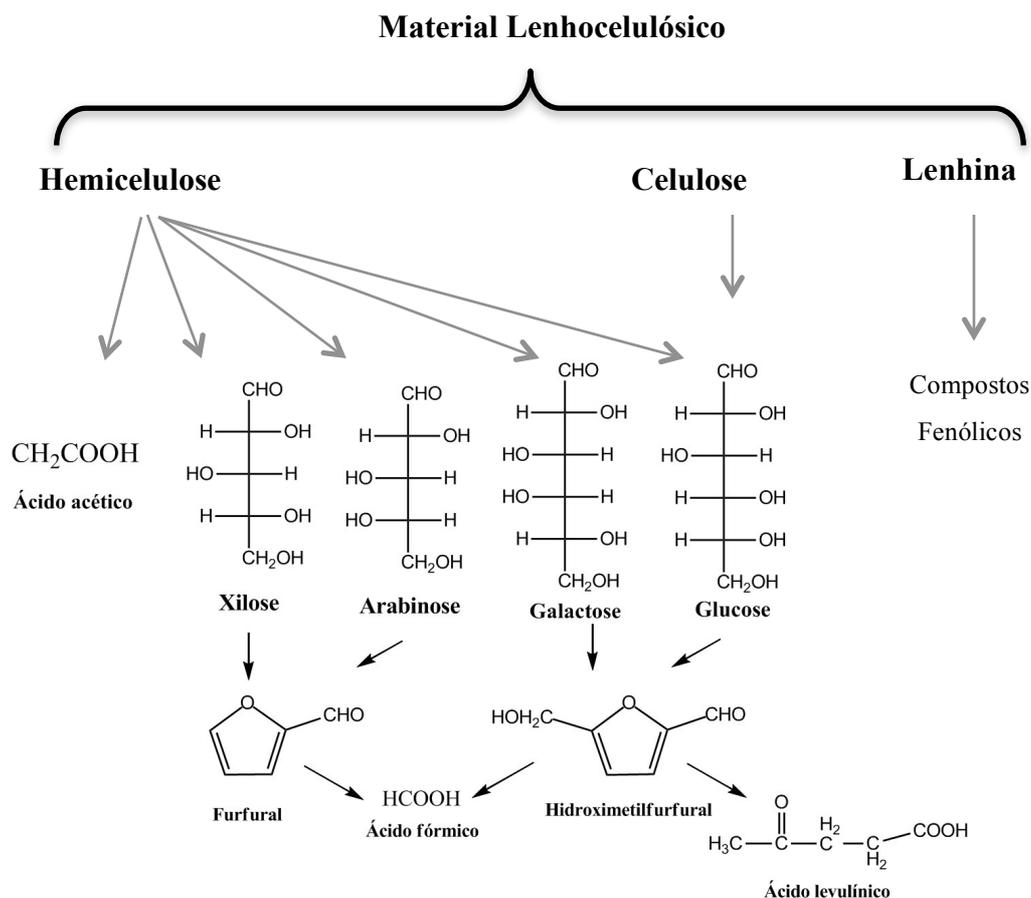


Figura 6 - Principais produtos resultantes da hidrólise de um material lenhocelulósico (adaptado de (Palmqvist e Hahn-Hagerdal, 2000).

O principal objetivo 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 (Figura 6).

1.4.1. Métodos ácidos

Os processos catalisados por ácidos podem ser divididos em processos que utilizam ácidos concentrados, com recurso a temperaturas moderadas, e processos que utilizam ácidos diluídos, a temperaturas elevadas. Nestes processos, o catalisador mais utilizado é o ácido sulfúrico (H₂SO₄), embora outros ácidos inorgânicos, como o ácido clorídrico (HCl), nítrico (HNO₃) e trifluoroacético (TFA), também possam ser utilizados (Carvalho *et al.*, 2008; Gírio *et al.*, 2010).

O mecanismo de hidrólise da hemicelulose em meio ácido envolve três passos principais (Figura 7): no primeiro dá-se a protonação do oxigénio da ligação glicosídica seguida da rutura da ligação glicosídica com a formação de um carbocatião e no fim dá-se a regeneração do ião H_3O^+ , por reação do carbocatião com a molécula de água, formando uma molécula final estável.

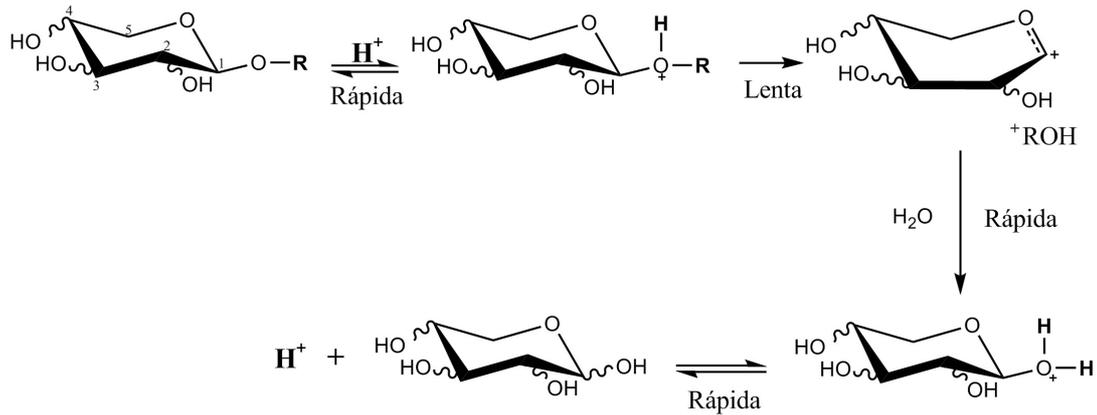


Figura 7 - Mecanismo proposto para a cisão das ligações glicosídicas na despolimerização das hemiceluloses em meio ácido (adaptado de (Belkacemi, 1991)).

No caso da celulose, a formação do carbocatião está dificultada pelas ligações intramoleculares das cadeias de celulose (as que conferem cristalinidade à estrutura polimérica). Este facto conduz a que a hidrólise das zonas amorfas da celulose ocorra muito mais depressa do que nas zonas cristalinas (Goldstein, 1982; Wright, 1988). Uma vez que as hemiceluloses não possuem uma estrutura cristalina, é de esperar que sejam solubilizadas muito mais facilmente do que a celulose. Assim, devido a estas diferenças de características entre celulose, a hemicelulose e lenhina, é possível seleccionar as condições de operação de forma que a hidrólise seja mais seletiva. Deste modo, podem hidrolisar-se os materiais lenhocelulósicos com ácido diluído a temperaturas elevadas que solubilizam quase a totalidade das hemiceluloses ou utilizar-se ácido concentrado a temperaturas moderadas e provocar a hidrólise total da celulose e das hemiceluloses, permanecendo a lenhina como resíduo insolúvel (Sun e Cheng, 2002). As condições de operação vão depender assim dos objetivos que se pretendam.

1.4.1.1. Hidrólise com ácidos concentrados

Os ácidos concentrados permitem a solubilização da celulose e das hemiceluloses, obtendo-se um resíduo sólido constituído essencialmente por lenhina. Os ácidos concentrados podem atacar as pontes de hidrogénio existentes entre as cadeias de celulose, destruindo a sua cristalinidade. Este tipo de processo ocorre geralmente a temperaturas moderadas, 20-50°C e em tempos relativamente curtos, 20-60 minutos. A solubilização dos polissacarídeos é possível utilizando concentrações variadas, por exemplo, 72% de H₂SO₄, 41% de HCl ou 100% de TFA (Gírio *et al.*, 2010). Tendo os dois últimos a vantagem de serem facilmente recuperáveis.

Apesar da formação de quantidades reduzidas de produtos de degradação e a possibilidade de operar a temperaturas e pressões baixas, os custos envolvidos na neutralização dos hidrolisados, recuperação dos ácidos (fundamental para a viabilidade económica do processo) e os problemas associados à corrosão de equipamentos, tornam este processo desvantajoso em relação à hidrólise com ácidos diluídos e métodos hidrotérmicos, por exemplo (Taherzadeh e Karimi, 2004).

1.4.1.2. Hidrólise com ácidos diluídos

A hidrólise com ácido diluído é, provavelmente, o método de pré-tratamento químico mais utilizado. Este pode ser usado, como exemplo, como método de pré-tratamento dos ML antes da hidrólise enzimática da celulose. No entanto, este não é suficientemente eficiente na dissolução da lenhina podendo afetar a sua estrutura e aumentar a susceptibilidade da celulose à hidrólise enzimática. Para além dessa fraca eficiência na dissolução da lenhina, este método é também eficaz na hidrólise seletiva da fração hemicelulósica para a obtenção de monossacarídeos, apresentando como vantagens a possibilidade de, em condições controladas, evitar a formação de produtos indesejáveis e corrosão dos equipamentos (Taherzadeh e Karimi, 2004).

No entanto, para que a fermentação dos hidrolisados seja possível, é necessário proceder à neutralização e/ou destoxificação dos hidrolisados.

Na literatura é possível observar uma grande variedade nas condições de hidrólise com ácido diluído para uma grande diversidade de ML. As diferenças encontram-se

fundamentalmente no tipo de ácido utilizado, bem como na sua concentração, temperatura e duração da reação da hidrólise (Tabela 3).

Tabela 3 - Condições operacionais utilizadas na hidrólise com ácido diluído de diferentes materiais lenhocelulósicos.

Material	Ácido	Concentração de ácido (%)	Temperatura (°C)	Duração (min)	Referências
Resíduos agroindustriais					
Cana-de-açúcar	H ₂ SO ₄	4	120-140	20	(Watson <i>et al.</i> , 1984)
Carolo de milho	HCl	2	100	120	(Domínguez <i>et al.</i> , 1997)
Palha de arroz	H ₂ SO ₄	3	140-145	20	(Roberto <i>et al.</i> , 1996)
Sorgo	H ₃ PO ₄	6	134	300	(Vázquez <i>et al.</i> , 2007)
Madeiras Folhosas					
Carvalho	H ₂ SO ₄	2,5	190	30	(Wilson <i>et al.</i> , 1989)
Eucalipto	H ₂ SO ₄	3	100-130	60	(Parajó <i>et al.</i> , 1997)
Faia	HCl	2,5	165-240	20-40	(Prior <i>et al.</i> , 1989)
Madeiras Resinosas					
Abeto	H ₂ SO ₄	2,4	200	30	(Larsson <i>et al.</i> , 1999)

1.4.2. Métodos hidrotérmicos

Os métodos hidrotérmicos baseiam-se na utilização de água, vapor, ou ambos e calor para o tratamento da biomassa. Nestas condições, ocorre hidrólise dos grupos acetilo das hemiceluloses, com a solubilização das hemiceluloses, deixando a celulose mais acessível, por exemplo, para uma posterior hidrólise enzimática (Hormeyer *et al.*, 1988). A principal diferença destes processos em relação à hidrólise com ácido diluído é que as hemiceluloses são maioritariamente recuperadas na forma oligomérica, enquanto nos processos que utilizam ácidos se obtém fundamentalmente monossacarídeos.

Entre os métodos hidrotérmicos distinguem-se dois principais: a auto-hidrólise (*liquid hot water*, LHW) e a explosão com vapor.

1.4.2.1. Auto-hidrólise

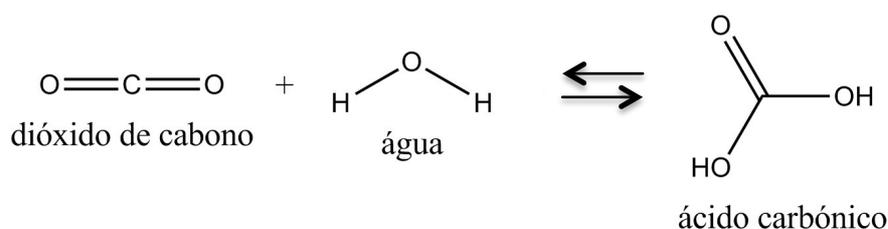
O método de auto-hidrólise baseia-se no uso de água e de calor (150-230°C). Estes tratamentos levam à obtenção de hidrolisados compostos essencialmente por derivados de hemiceluloses e um resíduo sólido composto maioritariamente por celulose e lenhina (Boussarsar *et al.*, 2009).

Os catalisadores da hidrólise, neste caso, são primeiramente os iões H_3O^+ provenientes da auto-ionização da água e numa fase seguinte os iões H_3O^+ provenientes dos grupos acetilo das hemiceluloses também atuam como catalisadores (Garrote, 2001). Uma vez que os açúcares são principalmente obtidos na forma oligomérica este poderá ser um processo preferencial para a obtenção de oligossacáridos que são compostos potencialmente pré-bióticos (Garrote, 2001; Moura *et al.*, 2007).

Pelo facto de a auto-hidrólise não utilizar outro reagente químico para além da água, apresenta algumas vantagens, nomeadamente problemas de corrosão reduzidos (Abatzoglou *et al.*, 1992), a reciclagem de ácidos assim como a remoção de precipitados podem não ser necessários, simplificando todo o processo. Tudo isto possibilita a redução de custos de capital, o que proporciona vantagens económicas e impacto ambiental reduzido (Kubikova *et al.*, 1996; Overend *et al.*, 1987) dos tratamentos aquosos relativamente a outras tecnologias.

1.4.2.2. Processos catalisados com CO_2

Como alternativa ao processo auto-hidrolítico convencional, tem sido proposta a hidrólise catalisada com CO_2 . O CO_2 em solução aquosa dá origem à formação de ácido carbónico que nessas condições é instável, mantendo-se o equilíbrio de acordo com a equação:



Alguns autores descrevem este método como um processo que pode oferecer os benefícios catalíticos do ácido sulfúrico sem as suas desvantagens (van Walsum, 2001;

Narayanaswamy *et al.*, 2011), ainda que o ácido carbônico dê origem a soluções com pH relativamente moderado, não oferecendo a mesma capacidade hidrolítica que o ácido sulfúrico. van Walsum e Shi (2004) referem que para temperaturas da ordem dos 200°C, este ácido torna-se um catalisador importante, conduzindo a um aumento do rendimento em xilose, assim como à diminuição do grau de polimerização das xilanas, em comparação com o uso de processos hidrotérmicos que utilizam exclusivamente água (van Walsum e Shi, 2004).

1.4.2.3. Explosão com vapor

O processo de explosão com vapor utiliza vapor de água saturado para o aquecimento, o que permitirá um aumento de velocidade de transferência de calor. Este pré-tratamento é caracterizado como um método hidrotérmico, que submete o material lenhocelulósico a altas pressões (0.69-4-83 MPa) e temperaturas (160-240°C) por um curto período de tempo (Sun e Cheng, 2002). Após a conclusão da operação pretendida, o material é sujeito a uma descompressão súbita, o que provoca a vaporização da água contida nas fibras, resultando numa explosão (Sun e Cheng, 2002). As forças resultantes da descompressão provocam uma desagregação da matriz lenhocelulósica, rompendo ligações inter e intramoleculares. Devido à descompressão, ocorrem ainda modificações ultra-estruturais, nomeadamente despolimerização e degradação considerável das fibras do material.

Este método é fundamentalmente utilizado como um pré-tratamento antes da hidrólise enzimática da celulose. A sua utilização como método de obtenção de hidrolisados hemicelulósicos tem a desvantagem de conduzir a uma degradação dos açúcares relativamente elevada (Sun e Cheng, 2002; Vessia, 2005).

1.4.3. Hidrólise com sais inorgânicos

Os estudos recentes mostram que o uso de sais inorgânicos tem vindo a ganhar cada vez mais interesse para o pré-tratamento da biomassa. Esses estudos referem, que os sais inorgânicos podem aumentar a taxa de hidrólise da celulose e da hemicelulose durante o processo de pré-tratamento quando comparados com hidrólises com ácidos diluídos. Esses sais podem ser, por exemplo KCl, NaCl, CaCl₂, MgCl₂, ou FeCl₃. Em comparação ao

processo da hidrólise com ácido diluído, o uso de sais inorgânicos tem demonstrado algumas vantagens como por exemplo uma maior velocidade de reação, a diminuição da corrosão e a possibilidade de recuperação dos sais (Liu *et al.*, 2009). Nguyen e Tucker (Nguyen e Tucker, 2002) descrevem que o uso de uma mistura de ácido diluído com um sal inorgânico permite obter uma maior percentagem de hidrólise da hemicelulose e celulose do que usando só o ácido diluído (Sun *et al.*, 2011b). Foi também demonstrado que o pré-tratamento com sais ajudaria na remoção da hemicelulose dos ML (Sun *et al.*, 2011a).

Os sais mais utilizados para o fracionamento dos ML são FeCl_3 , FeSO_4 , $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$, $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, AlCl_3 e MgSO_4 , tendo alguns deles sido testados em vários tipos de materiais lenhocelulósicos como a palha de trigo e os resíduos de milho (*cornstover*). No entanto, de acordo com os estudos já efetuados, os que promovem um melhor fracionamento e consequente remoção das hemiceluloses são o FeCl_3 e o $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ (Sun *et al.*, 2011a; Liu *et al.*, 2009), originando rendimentos elevados de xilose monomérica e oligomérica da fração líquida. Contudo o mais importante não será só a remoção e recuperação da hemicelulose, mas também garantir que a celulose seja pouco afetada (em termos quantitativos) e que a sua digestibilidade enzimática aumente bastante. Este novo método tem vantagens que se sobrepõem à hidrólise com ácidos diluídos, tem ainda a vantagem do passo da neutralização dos hidrolisados ser dispensada, pelo facto destes apresentarem um pH próximo da neutralidade, e ainda a vantagem da redução dos problemas de corrosão do equipamento.

1.4.4. Métodos enzimáticos

Os pré-tratamentos referidos anteriormente, dão origem a soluções ricas em hemiceluloses, na forma oligomérica e/ou monomérica. No caso de se encontrarem na forma oligomérica será necessária a sua conversão a monossacarídeos de modo a possibilitar a sua utilização pelos microrganismos (Palmqvist e Hahn-Hagerdal, 2000). Uma das possibilidades consiste do uso de enzimas, nomeadamente de xilanases (Gírio *et al.*, 2010), que ajudam a hidrólise completa das moléculas, por despolimerização da cadeia principal e remoção dos grupos laterais terminais do polímero ou oligómero. São diversas as enzimas envolvidas na hidrólise, sendo as xilanas as principais (Tabela 4).

Tabela 4 - Principais enzimas envolvidas na hidrólise de xilanas (adaptado de (Carvalho, 2005))

Enzimas	Modo de ação
Endo-xilanases	Hidrolisam principalmente as ligações internas de xilose β -1,4 da cadeia de xilana principal
Exo-xilanases	Hidrolisam as ligações de xilose β -1,4, produzindo xilobiose
β -Xilosidades	Produzem xilose a partir da xilobiose e de oligossacarídeos de cadeia curta
α -L-arabinofuranosidades	Hidrolisam as extremidades não redutoras de arabinofuranase
α -glucuronidasases	Hidrolisam os resíduos de ácido glucurónico e os seus ésteres 4-O-metilo

No âmbito da bioconversão dos ML, a hidrólise enzimática com celulases também é muito utilizada para a hidrólise da celulose, após pré-tratamento hidrotérmico ou com ácido diluído.

Uma das vantagens deste processo reside na utilização de temperaturas moderadas, em meios não corrosivos, o que conduz a vantagens económicas, em termos de custos de equipamento e energia. Por outro lado o preço da enzima bem como a sua recuperação no final do processo acarretam custos e além disso este é um processo demorado, em comparação por exemplo com a hidrólise ácida (Duarte *et al.*, 2004).

1.4.5. Métodos para o fracionamento seletivo da lenhina

O processo *organosolv* utiliza um único solvente ou misturas de solventes orgânicos juntamente com água para a remoção da lenhina e de forma a melhorar o processo de deslenhificação podem ser adicionados catalisadores e/ou variar a temperatura. Dependendo do processo utilizado pode também ocorrer alguma degradação dos compostos fenólicos (Kumakura e Kaetsu, 1984). Os solventes mais comumente usados são os álcoois e cetonas. As temperaturas utilizadas dependem dos solventes orgânicos escolhidos para o processo e da matéria-prima. Geralmente, temperaturas entre os 150-200°C podem ser usadas com ou sem adição de catalisadores como os ácidos orgânicos ou inorgânicos.

O principal benefício do *organosolv*, como um pré-tratamento que consiste numa produção de alta qualidade de lenhina, é a perspectiva de diminuição dos custos associados ao uso de enzimas. Neste processo, de facto, consegue-se separar a lenhina da celulose de forma eficaz antes da hidrólise enzimática. No entanto, este processo também apresenta algumas desvantagens. O solvente por si só pode ser um inibidor para os passos subsequentes à hidrólise enzimática e fermentação (Harmsen *et al.*, 2010). Assim, antes de se dar início à fermentação, o solvente deve ser previamente removido. A remoção e recuperação do solvente são passos recomendados de forma a reduzir os custos e também o impacto ambiental que poderia originar (Sun e Cheng, 2002).

1.4.6. Fator de severidade

Para determinar as condições operacionais ótimas do tratamento de hidrólise no material lenhocelulósico em particular, é necessário estabelecer a relação entre as variáveis do processo e as modificações químicas que ocorrem no substrato.

Um modo de analisar os pré-tratamentos da hemicelulose é através de parâmetros de severidade, que procuram combinar num único parâmetro empírico o efeito das diferentes variáveis operacionais (Carvalho *et al.*, 2009). Estes parâmetros, em geral, incluem a temperatura e o tempo como principais variáveis do processo para monitorizar a extensão da conversão ou rendimento em produtos. O parâmetro R_0 , denominado ordenada de reação, proposto por Overend e Chornet (Martínez *et al.*, 1995) é traduzido pela seguinte expressão:

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

Tendo T a temperatura da reação (°C), t o tempo de residência (min), 100 a temperatura de referência (°C), temperatura abaixo do qual não ocorre hidrólise e 14,75 um parâmetro empírico relacionado com a energia de ativação.

1.5. Formação de inibidores durante os processos de hidrólise

A bioconversão dos hidrolisados lenhocelulósicos requer a utilização de hidrolisados adequados ao crescimento dos microrganismos. Os hidrolisados obtidos a partir de um tratamento dos materiais lenhocelulósicos, sejam eles tratamentos hidrotérmicos, ácidos ou

com sais inorgânicos, para além da variedade de açúcares, podem dar origem à formação de determinados compostos, tais como os ácidos alifáticos, produtos de degradação de açúcares e compostos aromáticos resultantes da hidrólise da lenhina (Palmqvist e Hahn-Hagerdal, 2000). Estes compostos são subprodutos da hidrólise e são considerados potenciais inibidores do metabolismo microbiano, podendo limitar o consumo da fonte de carbono ou até reduzir a cinética de crescimento (Parajó *et al.*, 1998c). Existem essencialmente três classes de potenciais compostos inibidores nos hidrolisados lenhocelulósicos, ácidos alifáticos, compostos furânicos e compostos fenólicos. A natureza e quantidade de compostos inibidores dependem da matéria-prima e dos processos de hidrólise utilizados.

Existem diferentes possibilidades para ultrapassar esta dificuldade, nomeadamente, a utilização de condições de hidrólise moderadas, adaptação dos microrganismos, e a destoxificação dos hidrolisados, esta última na maioria dos casos é necessária. Por isso, a seleção de um método de destoxificação eficaz é de extrema importância pois acarreta custos relativamente elevados e pode afetar a viabilidade económica do processo.

1.5.1. Métodos de destoxificação

Existem vários métodos de destoxificação que, basicamente podem dividir-se em 3 classes: físicos (evaporação, separação por membranas), químicos (ajuste de pH, *overliming*, tratamento com carvão ativado ou com resinas de troca iónica) e biológicos (uso de enzimas) (Mussatto e Roberto, 2004).

Entre os métodos de destoxificação mais relevantes para este trabalho encontram-se: o **ajuste de pH** consiste no acerto do pH do hidrolisado para um valor próximo da neutralidade que seja adequado ao crescimento microbiano. Como consequência podem ocorrer precipitações, nomeadamente, de compostos fenólicos, metais pesados, furfural, acetato e terpenos sendo o precipitado posteriormente removido, por filtração. Este método é frequentemente utilizado em combinação com outros métodos pois, na maior parte dos casos, por si só não é suficiente para obter hidrolisados adequados para o processo de bioconversão (Agbogbo e Wenger, 2007).

O processo de destoxificação com **carvão ativado** consiste em colocar o hidrolisado em contacto com o carvão, em geral num processo descontínuo (Carvalho *et al.*, 2005) embora estejam descritos processos em que o hidrolisado tratado passe por uma coluna

empacotada com carvão. Este processo é caracterizado por ser eficiente e de baixo custo mas a sua eficiência depende do método de ativação do carvão (na literatura encontram-se referenciados métodos de ativação com ácido), tempo de contacto, granulometria do carvão, concentração do carvão ativado, temperatura e pH do hidrolisado (Huang *et al.*, 2008). A interação entre os fatores acima descritos, influência de modo direto a adsorção dos compostos inibidores, sendo essencial a otimização das condições de operação (Mussatto e Roberto, 2004).

O método de ativação do carvão consiste no tratamento com soluções ácidas (Duarte *et al.*, 2012). Recentemente, foi também descrita a possibilidade de ativação do carvão com soluções alcalinas (Duarte *et al.*, 2012; Salgado *et al.*, 2012) o que pode ter vantagem, relativamente ao processo ácido, de permitir a remoção de compostos tóxicos e o ajuste de pH em simultâneo.

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

1.6. O xilitol

Nos hidrolisados hemicelulósicos de palha de milho, a xilose é o monossacarídeo em maior quantidade. Uma das possibilidades bastante atrativas para a valorização destes hidrolisados consiste na sua utilização para a produção de polióis, nomeadamente o xilitol.

O xilitol é o polioliol ($C_5H_{12}O_5$) que se designa como pentano-1,2,3,4,5-pentol com poder adoçante semelhante ao da sacarose e superior ao de outros polióis como o sorbitol ou o manitol. É encontrado como intermediário normal do metabolismo de hidratos de carbono em mamíferos e também em pequenas quantidades em algumas frutas (framboesas, ameixas, peras), legumes (alface, couve-flor, espinafre, chicória) (Hyvönen *et al.*, 1982) e árvores (videiro) (Winkelhausen e Kuzmanova, 1998).

O principal foco de interesse do xilitol provém do seu potencial como edulcorante alternativo, já que apresenta um baixo valor calórico (4,0 kcal/g) e um poder adoçante semelhante ao da sacarose e superior ao de outros polióis. Trata-se de um pó branco,

cristalino, sem odor, e altamente solúvel em água. Na Tabela 5 são apresentadas algumas propriedades físico-químicas do xilitol.

O valor comercial do xilitol, assim como o seu mercado-alvo, que ao longo dos tempos tem vindo a crescer, provém de um conjunto de propriedades físicas, químicas e tecnológicas vantajosas deste produto para a utilização nas indústrias alimentar, cosmética e farmacêutica.

Tabela 5 - Propriedades físicas e químicas do xilitol [adaptado de (Peito, 1992)]

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

A concentração elevada de xilose presente em muitas espécies de biomassa vegetal e, consequentemente nos hidrolisados hemicelulósicos resultantes, poderá ser aproveitada para a obtenção de produtos de valor acrescentado como xilitol.

1.6.1. Métodos de produção do xilitol

A obtenção de xilitol pode ser realizada de 3 formas: por extração líquido-sólido de plantas, redução química da xilose e a conversão biotecnológica de soluções contendo xilose (Mussatto e Roberto, 2004). Por meio de extração líquido-sólido, o xilitol presente em frutas e vegetais pode ser recuperado, mas como está presente em baixas quantidades, as quantidades recuperadas são, em geral, inferiores a 0,900g/100g, o que torna o processo

economicamente inviável (Mussatto e Roberto, 2004; Roberto *et al.*, 1994; Tamanini e Haully, 2004b).

Os processos químicos e o biotecnológico iniciam-se pela conversão da xilose proveniente da hidrólise de ML ricos em xilanas (Cruz *et al.*, 2000).

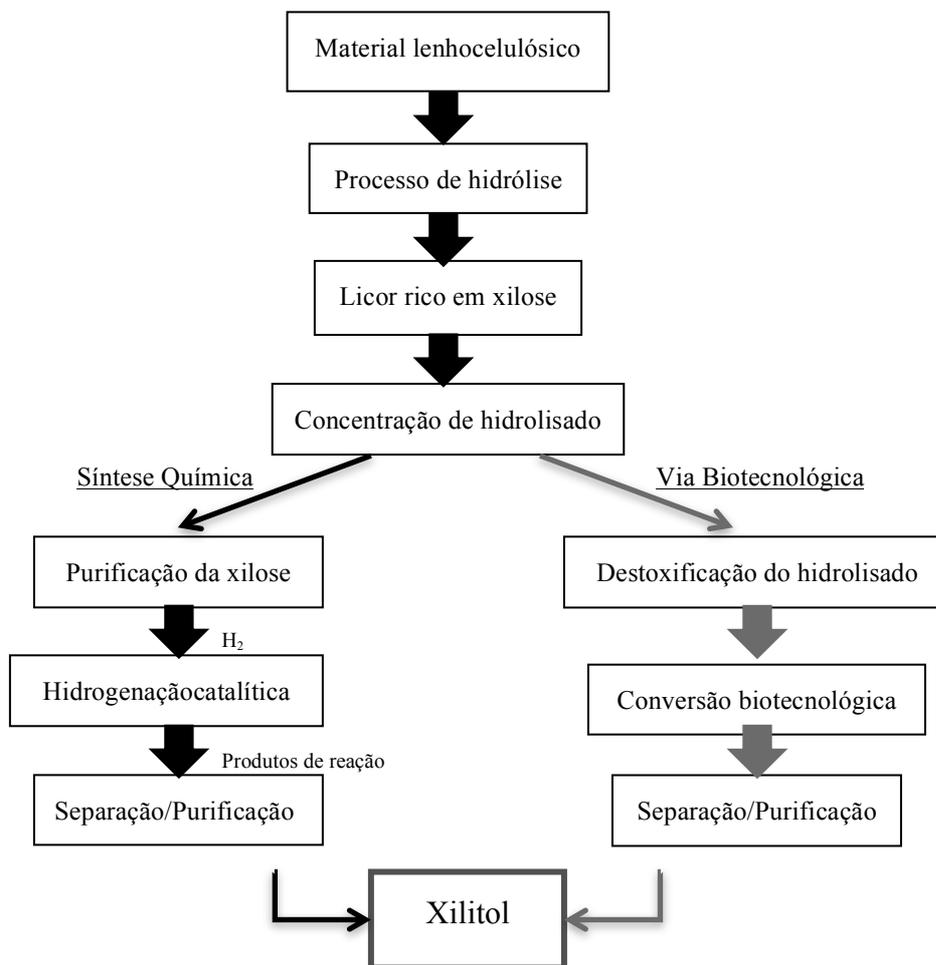


Figura 8 - Fluxograma da produção de xilitol por via química e biotecnológica (Parajó *et al.*, 1998a)

Para tal a primeira etapa consiste num fracionamento da biomassa lenhocelulósica para promover a hidrólise da hemicelulose conduzida à libertação da xilose.

Até muito recentemente, todo o xilitol produzido à escala industrial era obtido a partir da redução química da xilose por hidrogenação da xilose a xilitol na presença de um catalisador proveniente de hidrolisados hemicelulósicos (Hyvönen *et al.*, 1982; Carvalheiro *et al.*, 2004; Carvalheiro, 2005). A produção de xilitol por métodos químicos (Figura 9) envolve os seguintes passos principais:

- i) hidrólise do material lenhocelulósico;

- ii) purificação dos hidrolisados para obter soluções ricas em xilose;
- iii) hidrogenação da xilose a xilitol
- iv) purificação e cristalização do produto final

O passo (ii), ainda que possa ou não ser realizado, é importante tendo em conta a não especificidade do catalisador da reação, que catalisa também a redução de outros açúcares presentes nos hidrolisados, complicando e tornando ainda mais dispendiosas as etapas de purificação do xilitol (Parajó *et al.*, 1998c). Assim, apesar do processo químico ser o mais utilizado na indústria, este processo exige etapas de purificação da xilose, para remoção do catalisador e do produto final, tornando-o pouco competitivo.

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

1.6.2. Microrganismos produtores do xilitol

De entre os microrganismos, estudados, de uma forma geral, as leveduras são consideradas os melhores microrganismos produtores de xilitol, e por este motivo a maior parte dos estudos são feitos com leveduras.

A capacidade que as leveduras possuem em produzir xilitol a partir de D-xilose foi descrita primeiramente por Onishi e Suzuki (1966). Das leveduras produtoras de xilitol destacam-se as pertencentes ao género *Candida*: *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. pelliculosa*, *C. mogii*, *C. entomaea*, *C. peltata*, *C. magnoliae* e a espécie *Debaryomyces hansenii* que produzem xilitol como produto principal (Carvalho, 2005). Para esta última encontram-se descritos rendimentos em xilitol relativamente elevados quer a partir de soluções de xilose quer em hidrolisados. Existem autores que referem a levedura *D. hansenii* UFV-170 como sendo a melhor produtora de xilitol entre 270 leveduras diferentes (Sampaio *et al.*, 2004).

1.6.3. A levedura *Debaryomyces hansenii*

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

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

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

1.6.4. Metabolismo da D-xilose em leveduras

A D-xilose é o principal açúcar constituinte da fração hemicelulósica da biomassa vegetal (John R. Johnston, 1994). A conversão dos açúcares depende da forma como se efetua o transporte através da membrana plasmática, dependendo de uma grande variedade de condições ambientais, entre as quais, a taxa de oxigénio disponível, o valor de pH, temperatura, mistura de açúcares e concentração de inibidores. O metabolismo da D-xilose em leveduras divide-se em dois passos fundamentais para a produção de xilitol: redução da D-xilose a xilitol pela enzima xilose-reductase (XR) dependente do NADPH e oxidação do xilitol em D-xilulose através da xilitol-desidrogenase (XDH) dependendo do NADH. A presença de xilose induz a formação das referidas enzimas. O oxigénio é o fator que regula a indução destas enzimas, sendo que a regeneração dos cofatores dependem fortemente da disponibilidade deste.

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

1.6.5. Fatores que influenciam a produção biotecnológica do xilitol

Embora a produção biotecnológica de xilitol seja uma alternativa importante ao método químico, são-lhe reconhecidas algumas limitações.

A produção de xilitol é afetada por diversos fatores, entre eles, a composição do meio de cultura, a temperatura, o pH do meio, disponibilidade de oxigénio, estirpe utilizada, idade do inóculo, e respectiva concentração celular. Adicionalmente, fatores como a suplementação a concentração de açúcares e a presença de compostos inibidores também influenciam o bioprocessamento (Parajó *et al.*, 1998a; Parajó *et al.*, 1998b; Parajó *et al.*, 1998c).

Para uma **bioconversão da xilose** a xilitol eficiente é fundamental que a composição do hidrolisado hemicelulósico seja adequada para servir como meio de cultura. O grau de concentração dos hidrolisados afeta tanto as concentrações de substrato como a dos inibidores, e os seus efeitos combinados podem conduzir a um aumento da produção de xilitol ou a um decréscimo da produção, principalmente como resultado da concentração de inibidores.

Relativamente à composição do **meio de cultura**, está descrito que concentrações de xilose elevadas favorecem a produção de xilitol. No entanto a presença de hexoses, no meio de cultivo, nomeadamente a glucose ou manose, podem inibir o processo de bioconversão por repressão da atividade da enzima xilitol-reductase (XR), responsável pela

redução da xilose a xilitol, conduzindo a uma redução do rendimento em produto. Em meios contendo glucose e xilose, a glucose é consumida e quando em concentrações elevadas pode conduzir à diminuição considerável da assimilação da xilose (Tavares *et al.*, 2000). Será no entanto de referir, que no caso em que se utilizam hidrolisados, para obter as concentrações de xilose desejadas, pode também conduzir ao aumento da concentração de compostos tóxicos (com exceção dos voláteis) podendo inibir o metabolismo e sendo nesses casos necessário destoxificar os hidrolisados.

Sendo a bioconversão da xilose em xilitol também afetada pela **suplementação** do meio, é de salientar que o tipo de suplemento adicionado deve ser alvo de estudos prévios para determinar as concentrações mínimas necessárias e o tipo de suplementação mais adequado, de forma a garantir a diminuição dos custos de suplementação e consequentemente, o custo final do processo sem comprometer a produção do xilitol.

A adição de fontes de azoto e fósforo tem demonstrado potenciar o processo independentemente da espécie de levedura utilizada, sendo que o fosfato é um nutriente muito importante para o crescimento celular, assim como o extrato de levedura é muito importante para a produção de xilitol (Tavares *et al.*, 1999; Carvalheiro *et al.*, 2007). Podem também ser utilizados outros suplementos, tais como o extrato de malte, peptona, casaminoácidos, e *corn steep liquor* (CSL), este último também muito interessante por ser barato e bastante eficiente para a produção de xilitol (Carvalheiro *et al.*, 2007). Para a otimização do meio para a produção de xilitol a suplementação com vitaminas e oligoelementos pode ser também necessária (Preziosi-Belloy *et al.*, 2000).

O **arejamento** fornecido às culturas é também um fator fundamental no processo de produção de xilitol. Diversos estudos demonstraram que as condições de arejamento para a maximização da produção de xilitol devem corresponder a condições de semi-aerobiose, ou seja, condições de limitação de oxigénio (Nobre *et al.*, 2002). O fornecimento de oxigénio constitui um parâmetro chave pois com base neste parâmetro é possível promover a utilização do carbono para o crescimento ou para a produção de xilitol ou encontrar uma condição de equilíbrio para ambos (Nobre *et al.*, 2002). Uma vez que, para além da taxa de arejamento, a formação de xilitol em leveduras é muito sensível à concentração de xilose, o ideal será que estes dois parâmetros sejam primeiramente tidos em consideração, simultaneamente quando se estuda otimização da produção de xilitol, para qualquer espécie de levedura ou tipo de meio.

O objetivo deste trabalho consistiu no desenvolvimento de um processo integrado para a valorização da palha de milho tendo por base o fracionamento seletivo dos seus componentes estruturais.

Para a hidrólise seletiva da hemicelulose foram estudados três processos de pré-tratamento, hidrotérmico não-catalisado (auto-hidrólise), hidrotérmicos catalisados por dióxido de carbono a diferentes pressões iniciais e catalisados por sais inorgânicos (nitrato de ferro) com o objetivo de otimizar as condições operacionais conducentes à recuperação máxima de pentoses.

Os hidrolisados resultantes da hidrólise com $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ nas condições otimizadas foram utilizados para o crescimento e após concentração e/ou destoxificação, como meio de cultura para a produção de xilitol pela levedura *Debaryomyces hansenii* CCMI 941.

Para a valorização dos resíduos sólidos, ricos em celulose e lenhina, foi avaliada deslenhificação através da utilização de processos *organosolv* utilizando misturas etanol-água.

Nos mesmos sólidos (ricos em celulose e lenhina) bem como nos sólidos deslenhificados (ricos em celulose), foi avaliada a digestibilidade enzimática com o objetivo de estimar o seu potencial para utilização noutras aplicações.

2. Materiais e Métodos

2.1. Matéria-prima

A palha de milho utilizada neste trabalho foi colhida na região de Salvaterra de Magos e fornecida pela Associação Nacional de Produtores de Milho (Anpromis). Como descrito na literatura, os caules representam cerca de 70% e as folhas representam cerca de 30% (Pordesimo, 2004) deste material. Após recepção, a matéria-prima é seca ao sol e seguidamente moída num moinho de facas (Fritsh Industriestr, Alemanha) a partículas com tamanho igual ou inferior a 6 mm. Em seguida a matéria-prima foi armazenada em recipientes de plástico até futura utilização.

2.1.1. Caracterização granulométrica

Para a caracterização granulométrica da matéria-prima, utilizaram-se 100 g de palha de milho que foram separadas, com recurso a um agitador de peneiros (Endecotts, ECVS1, Inglaterra) e a 7 peneiros com 20,3 cm de diâmetro (Retsch, ASTM E11, Alemanha) e colocados em série de acordo com o diâmetro do poro (Tabela 6). Os ensaios foram realizados em triplicado, sendo cada ensaio realizado durante 20 min.

Tabela 6 – Dimensões dos peneiros usados na caracterização granulométrica

Peneiros	Diâmetro do poro (mm)
1	0,250
2	0,355
3	0,500
4	0,710
5	1,000
6	2,000
7	4,000

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

2.2. Pré-extração aquosa da palha de milho

A palha de milho foi sujeita a uma pré-extração aquosa (PEA) para a remoção dos principais extrativos solúveis em água, como objetivo de avaliar fundamentalmente a percentagem de açúcares livres. Esta extração foi realizada em autoclave (Uniclave, Portugal) utilizando uma razão líquido/sólido (RLS) de $10 \text{ g}_{\text{água}} \cdot \text{g}_{\text{biomassa seca}}^{-1}$, à temperatura de 100°C , durante 60 min. Após o tratamento, a fração sólida e líquida foram recuperadas por filtração rápida (Filter-Lab 1235) o licor foi submetido a uma segunda filtração, com filtros de $0,22 \mu\text{m}$ (Millipore®, EUA) e analisado por HPLC (2.8.2). O restante licor foi armazenado a 4°C .

Os resíduos sólidos foram lavados com 200 mL de água destilada, secos a $50 \pm 5^{\circ}\text{C}$, durante 48 h (estufa J.P. – Selecta, Espanha) e pesados após ter permanecido à temperatura ambiente durante 24 h. Foi utilizada uma pequena quantidade de amostra para determinação de humidade (2.8.1.1), e a restante moída num moinho de facas (IKA, Alemanha) em partículas inferiores a 0,5 mm e caracterizada quimicamente (2.8.1.6). Todos os ensaios foram realizados em duplicado.

2.3. Fracionamento seletivo das hemiceluloses

2.3.1. Tratamento hidrotérmico catalisado com CO_2

Os tratamentos hidrotérmicos catalisados com CO_2 foram realizados utilizando um reator de aço inoxidável, com um volume total de 600 mL (Parr Instruments Company, Moline, Illinois, EUA). A este reator encontrava-se ligada uma linha para fornecimento de CO_2 como mostra a Figura 9. O CO_2 utilizado (Air Liquide, AlphaGaz™, Paris, França), tinha uma percentagem de pureza de 99,99%.

Na Figura 9 está ilustrado um esquema de toda a montagem laboratorial utilizada. Todos os tratamentos foram realizados numa gama de temperaturas entre $180\text{-}240^{\circ}\text{C}$ (condições não-isotérmicas) e duas pressões iniciais, 30 e 40 bar. A temperatura foi controlada através de um controlador PID, modelo 4842 (Parr Instruments Company, EUA). Para cada ensaio, pesou-se aproximadamente de 25 g de palha de milho (massa seca), à qual se adicionou a massa de água destilada necessária de modo a obter uma RLS de $10 \text{ g}_{\text{água}} \cdot \text{g}_{\text{biomassa seca}}^{-1}$.

Após a ligação do reator e colocação da manta de aquecimento externa, ligou-se o sistema de agitação, a qual foi mantida constante durante todo o tratamento, a 100 rpm, com o auxílio de um impulsor de 2 turbinas com 4 lâminas planas. Antes de se dar início a cada ensaio propriamente dito, toda a mistura de reagentes (matéria-prima, água e CO₂) foi mantida em contacto durante 10 min, sendo de seguida iniciada a subida de temperatura para os valores pretendidos. Os perfis de aquecimento, assim como os de pressão, foram registados ao longo do tempo em todos os ensaios efetuados. Quando o reator atingiu a temperatura pretendida, procedeu-se ao seu arrefecimento, através da remoção da manta de aquecimento externa e fazendo circular água fria nas serpentinas internas do reator, até os 20°C, sendo de seguida iniciada uma lenta despressurização do sistema (aproximadamente 2 bar·min⁻¹). Ao despressurizar a fase gasosa fez-se passar o gás através de um frasco colocado num copo com gelo e contendo uma quantidade conhecida de etanol. Este procedimento permite a dissolução de compostos voláteis para posterior análise qualitativa e quantitativa.

O licor e a fase sólida foram separados através de prensagem até 200 kg·m⁻² (Sotel, Portugal) seguida de uma filtração do licor (filtros Whatman nº 1). Os licores obtidos foram armazenados em frascos para posteriores determinações analíticas (2.8.1.6), e os resíduos sólidos, foram lavados com água destilada, recolhidos numa caixa de papel previamente tarada e secos em estufa (Memmert, Alemanha) a 50±5°C, durante 48 h. Após pesagem, foi determinada a humidade desses sólidos (2.8.1.1) e a seguir foram moídos (IKA WERKE, Alemanha), com a finalidade de se obter partículas de tamanho ≤ 0,5 mm para posterior determinação da humidade e caracterização química (2.8.1.6).

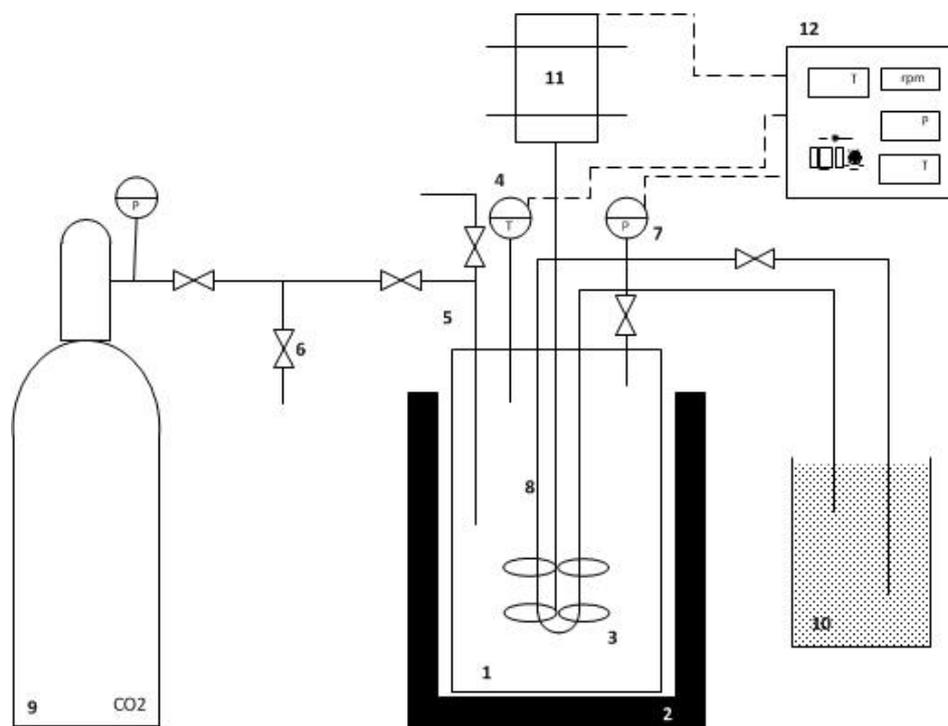


Figura 9 – Esquema do sistema dos tratamentos hidrotérmicos catalisados com CO₂. 1 – Vaso; 2 – manta externa de aquecimento; 3 e 8 – impulsor de turbinas com 4 lâminas planas; 4 – Termopar; 5 – válvula de entrada de CO₂ no sistema; 6 – válvula de segurança; 7 – transdutor de pressão; 9 – cilindro de CO₂; 10 – recipiente com etanol (recuperação fase gasosa); 11 – eixo de rotação; 12 – controlador PID de temperatura e pressão

2.3.2 Auto-hidrólise

De forma análoga aos tratamentos hidrotérmicos catalisados com CO₂, foram realizados tratamentos hidrotérmicos (auto-hidrólise) que diferem dos primeiros, pela inexistência da ligação do reator a uma linha de CO₂.

A auto-hidrólise da palha de milho foi realizada numa gama de temperaturas que variou entre 210-220°C, sendo utilizada a mesma razão líquido-sólido que em 2.3.1.

Estes ensaios diferem dos anteriores (2.3.1) pelo fato da despressurização do reator poder ser feita a uma temperatura mais elevada (cerca de 80°C) e por conseguinte o arrefecimento mais rápido. O licor e a fase sólida foram recuperados da mesma forma que foi descrita anteriormente (2.3.1).

2.3.3. Hidrólise com sais inorgânicos

Para o tratamento com os sais inorgânicos foi utilizado o mesmo reator referido em 2.3.1., assim como todo o procedimento de montagem do reator, arrefecimento e recuperação do licor e resíduos sólidos. Os ensaios foram realizados numa gama de temperaturas entre os 130-220°C. Para cada ensaio pesou-se cerca de 25 g de palha de milho (massa seca) à qual se adicionou o peso de solução de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ 45 mM, de modo a obter uma RLS de $10 \text{ g}_{\text{solução Fe}(\text{NO}_3)_3} \cdot \text{g}_{\text{biomassa seca}}^{-1}$.

2.4. Deslenhificação

Os resíduos sólidos resultantes dos tratamentos hidrotérmicos (catalisados ou não com CO_2), correspondentes às condições operacionais que permitiram a recuperação mais elevada de pentoses, foram sujeitos a um tratamento de deslenhificação, utilizando uma mistura de etanol/água (*organosolv*). As condições operacionais correspondem às previamente estudadas no LNEG-UB e descritas para a deslenhificação da palha de arroz (Moniz *et al.*, 2013a).

O processo consistiu em adicionar, às amostras do sólido pré-tratado, uma solução de etanol a 60,5% (m/m), de modo a obter, uma RLS de $10 \text{ g}_{\text{solução EtOH}} \cdot \text{g}_{\text{biomassa seca}}^{-1}$, seguindo-se a incubação num banho termostizado (Memmert, Alemanha) a 30°C durante 1 h. Os ensaios foram realizados em frascos Schott (Alemanha) de 250 mL, devidamente roscados para evitar eventuais perdas.

Terminado esse tempo, o conteúdo dos frascos foi filtrado (filtros Whatman nº 1), separando assim as fases sólida e líquida, esta última contendo a lenhina solubilizada. Os resíduos sólidos (deslenhificados) foram lavados com o mesmo volume da solução de EtOH usado para a reação, secos a $50 \pm 5^\circ\text{C}$ numa estufa, durante 48 h, para posterior caracterização química (2.8.1.6).

2.5. Hidrólise Enzimática

Como objetivo de avaliar a percentagem de sacarificação dos resíduos sólidos pré-tratados, foi realizada a hidrólise enzimática dos resíduos provenientes dos tratamentos hidrotérmicos (catalisados ou não com CO_2), obtidos nas condições de recuperação máxima de pentoses (os mesmos que sofreram o processo de deslenhificação descrito

anteriormente). Para tal, foi utilizado um protocolo baseado no método do NREL (“National Renewable Energy Laboratory”) (Selig *et al.*, 2008a; Selig *et al.*, 2008b).

Os ensaios de hidrólise foram realizados em pequenos frascos de plástico de 25 mL com tampa, tendo-se normalizado a quantidade de sólido em cada ensaio. Nestes processos foram utilizadas as enzimas *Celluclast* 1.5 L e *Novozyme* 188 (Novozymes, Dinamarca), nas doses de 60 FPU/g de celulose e 64 pNPGU/g de celulose, respetivamente. Foi também adicionado um tampão de citrato de (pH 4,8) e uma solução de azida de sódio (2%, m/v).

Fizeram-se vários brancos de enzimas (sem biomassa) e brancos de biomassa (sem enzimas), para com isso descontar os hidratos de carbono livres presentes na biomassa e os produtos que eventualmente se formam na ausência das enzimas.

Os frascos após serem fechados, foram colocados numa incubadora (Comecta, Espanha), a 50°C durante 72 h, com uma rotação de 250 rpm. Finalizada a reação, os frascos são colocados num banho a 100°C, para inativar as enzimas. Finalmente, as amostras são filtradas sob vácuo utilizando filtros Millipore® de poro 0,45 µm, sendo o filtrado analisado por HPLC (2.8.2).

2.6. Obtenção de hidrolisados para os ensaios de bioconversão

Os hidrolisados hemicelulósicos utilizados nos ensaios de bioconversão foram produzidos utilizando o processo de hidrólise com sais inorgânicos, nas condições operacionais previamente otimizadas (2.3.3) (190°C, 45 mM de Fe(NO₃)₃). Para tal foram realizados 10 ensaios de modo a obter o volume de hidrolisado suficiente. Os hidrolisados obtidos nas condições anteriormente descritas, foram misturados de modo a obter um lote uniforme e armazenados a 4°C até posterior utilização.

2.6.1 Destoxificação dos hidrolisados

Da mistura dos hidrolisados uma parte da foi utilizada (após ajuste do pH) para o crescimento celular, e outra foi utilizada para os ensaios de produção de xilitol, após concentração e/ou destoxificação.

2.6.1.1. Ajuste de pH

Este método consiste no ajuste do pH do hidrolisado (pH inicial de 2,8), até ao valor 5,5 pela adição de um agente neutralizante, Na₂HPO₄ sólido. A adição progressiva de pequenas quantidades de Na₂HPO₄ ao hidrolisado foi acompanhada por agitação magnética e leituras constantes de pH até atingir o valor pretendido. Após o acerto de pH, os possíveis precipitados foram removidos por filtração rápida (Filter-Lab 1235) e filtração lenta (Filter-Lab 1242).

A escolha do agente neutralizante passou por diversos ensaios com diferentes reagentes, nomeadamente dihidrogenofosfato de potássio, hidróxido de sódio. O Na₂HPO₄, foi o agente escolhido pelo fato de, após as várias filtrações, este dar origem a um hidrolisado límpido ao contrário do que acontecia com outros agentes testados em que ocorre a formação de precipitados.

2.6.1.2. Tratamento com carvão ativado

O carvão utilizado (Merck, Alemanha) tinha uma granulometria de 100 a 400 mesh e foi ativado com uma solução básica, NaOH (Salgado *et al.*, 2012; Duarte *et al.*, 2012). Para tal o carvão e a solução foram misturados numa proporção de 1:5 (m/v) com agitação numa incubadora orbital (Infors HT, Bottmingen, Suíça) durante 1 h a 30±1°C e a 150 rpm. Em seguida, o carvão foi filtrado (filtros Filter-Lab 1235) e seco numa estufa a 80±1°C durante 12 h, aproximadamente.

Para a destoxificação, o carvão ativado foi, progressivamente adicionado ao hidrolisado (pH 2,8) que se encontrava sob agitação magnética, na quantidade necessária, até atingir o valor de pH pretendido (5,5). Foi mantido sob agitação durante 1 h à temperatura ambiente e no final, o hidrolisado foi recolhido por filtração (rápida e lenta) e armazenado a 4°C até posterior utilização.

2.6.1.3. Concentração do hidrolisado

De modo a aumentar a concentração de xilose no hidrolisado, bem como a remoção de alguns compostos inibidores, tais como o furfural, o hidrolisado foi sujeito a um processo de concentração por evaporação (2 vezes em massa) com recurso a um

evaporador rotativo (R-210 Buchi, Suíça), nas seguintes condições: 150 mbar, 50°C e 4 rpm. Este processo foi aplicado aos hidrolisados destoxificados e não destoxificados.

Os hidrolisados destoxificados e/ou concentrados pelos vários métodos testados foram analisados por HPLC relativamente à sua composição em açúcares, ácidos alifáticos e derivados furânicos (2.8.2). A concentração de compostos fenólicos totais foi analisada através do espectrofotómetro (2.8.4). As várias amostras concentradas foram guardadas a 4°C até posterior utilização.

2.7. Bioconversão dos hidrolisados

2.7.1. Preparação dos meios de cultura

Para os ensaios de crescimento celular foram utilizados hidrolisados não-destoxificados e não-concentrados, sujeitos a correção de pH para 5,5 com Na₂HPO₄. Os hidrolisados foram em seguida suplementados com micronutrientes, vitaminas e fonte de azoto, fósforo e magnésio (TEVM – “trace elements, vitamins and minerals”).

Nos ensaios de otimização da produção de xilitol foram utilizados hidrolisados concentrados. O hidrolisado concentrado foi suplementado de forma idêntica aos ensaios de crescimento celular (TEVM) ou com “corn steep liquor” (CSL).

A composição das diferentes soluções de suplementos encontra-se descrita no Anexo I.

Todos os hidrolisados foram esterilizados por filtração com membranas 0,22 µm (Gelman Sciences, EUA) em sistema de filtração acoplado a frascos Schott.

2.7.2. Microrganismo

O microrganismo utilizado foi a levedura *Debaryomyces hansenii*, isolada a partir de cana-de-açúcar e depositada na Coleção de Culturas de Microrganismos Industriais do LNEG (CCMI) com o número 941.

2.7.3. Ensaio de crescimento celular

Para o estabelecimento do perfil de crescimento da levedura *D. hansenii*, em hidrolisado, foi utilizado hidrolisado não-concentrado, esterilizado e suplementado

conforme descrito anteriormente (2.7.1), o qual foi inoculado com culturas stock (em 15% de glicerol) do microrganismo armazenados a -70°C . Após descongelação lenta (frigorífico) foram adicionados 2,5 mL da cultura *stock* a cada balão Erlenmeyer de 1000 mL com anteparas contendo 80 mL de hidrolisado suplementado com TEVM. Os balões foram incubados a 30°C com agitação orbital e 150 rpm (Infors Unitron HT, Suíça) até um máximo de 24 h. Os ensaios foram realizados em duplicado. Para os tempos iniciais e final foram retirados assepticamente 7 mL de amostra para a determinação da concentração da biomassa celular. Para além destes foram retirados regularmente 3 mL de amostra para a medida do crescimento celular (Abs 600 nm), pH e para análise da composição do meio de cultura por HPLC (2.8.2).

2.7.4. Ensaio de produção de xilitol

2.7.4.1. Preparação do inóculo

Para a preparação do inóculo, foi utilizado o hidrolisado não-destoxificado e não-concentrado, suplementado com TEVM, sendo as condições de produção do inóculo a mesma que a descrita para os ensaios de crescimento (2.7.3). As culturas foram incubadas durante 22 h e após esse tempo, o conteúdo dos balões foi misturado de forma a obter um inóculo homogêneo. Foram recolhidos 10 mL de inóculo para tubos Falcon estéreis que foram centrifugados (centrífuga Digicen 21-R, Espanha) durante 10 min à temperatura de 4°C . Em seguida a biomassa foi ressuspensa nos diferentes balões contendo os hidrolisados suplementados. A quantidade adicionada a cada balão foi de modo a que cada balão tivesse aproximadamente uma concentração inicial de $1-2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

2.7.4.2. Condições de cultura

Para os ensaios de produção de xilitol, adicionou-se a 54,15 mL de hidrolisado estéril os volumes adequados de TEVM ou CLS, e em seguida ressuspensa-se a biomassa celular como descrito em 2.7.4.1.

Todos os ensaios foram realizados em duplicado, em balões Erlenmeyer de 500 mL sem anteparas, previamente esterilizados, contendo no final 60 mL de meio de cultura e incubados nas mesmas condições do inóculo.

Na Tabela 7 está apresentado um resumo dos ensaios realizados para avaliar o efeito da destoxificação e suplementação na produção de xilitol.

Tabela 7 – Ensaios realizados em hidrolisado concentrado para avaliação do efeito da destoxificação e suplementação

Ensaio	Destoxificação	Acerto pH 5,5	Suplementação
A	Não	Na ₂ HPO ₄	CSL
B	Não	Na ₂ HPO ₄	TEVM
C	Sim	Carvão	TEVM

2.8. Métodos Analíticos

2.8.1. Caracterização química da matéria-prima e resíduos sólidos resultantes dos pré-tratamentos

2.8.1.1. Determinação da humidade

Uma primeira etapa consiste em tarar as caixas de níquel a 100°C durante 16 h numa estufa, seguida de arrefecimento no exsiccador e pesagem numa balança analítica (Mettler HK 160, Suíça). De seguida pesou-se, aproximadamente, 1 g de matéria-prima ou resíduo sólido para as diferentes caixas e colocaram-se a secar na estufa nas condições iniciais. Após a secagem as caixas foram uma vez mais arrefecidas num exsiccador durante 1 h e pesadas novamente. Os ensaios de determinação de humidade foram realizados em duplicado e sempre que necessário.

2.8.1.2. Determinação da cinza

Para a determinação da cinza da matéria-prima, tarou-se cadinhos de porcelana numa mufla (Heraeus D-6450, Alemanha) a $550 \pm 5^\circ\text{C}$ durante 16 h. Após esse tempo, os cadinhos foram arrefecidos em exsiccador e pesados. Em seguida, foi pesada aproximadamente 1 g de amostra seca para cada cadinho e foram colocados numa placa de aquecimento e queimados, sendo posteriormente colocados na mufla a $550 \pm 5^\circ\text{C}$ durante 5 h, arrefecidos e pesados. A diferença entre a massa da amostra, que se encontrava no

cadinho, antes e depois da inceneração na mufla, dá a quantidade de cinza. Este procedimento foi repetido sempre que necessário, sendo realizado, pelo menos, em duplicado.

2.8.1.3. Determinação do resíduo seco

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

2.8.1.4. Determinação da concentração de biomassa celular

A concentração celular foi regularmente estimada por medição da absorvância da cultura, ao comprimento de onda de 600 nm, contra um branco de água destilada, num espectrofotómetro (JASCO V-530, Japão). Para valores de absorvância superiores a 0,8 foram realizadas diluições, de modo a obter leituras dentro da gama de linearidade 0,2-0,8. Todas as diluições foram efetuadas, pelo menos, em duplicado.

A concentração de biomassa foi também obtida através da quantificação da concentração de biomassa seca da cultura em amostras selecionadas. Foram filtrados, sob vácuo, 2,5 ou 5 mL de suspensão celular, através de filtros (Gelman Sciences, EUA) com diâmetro de poro de 0,45 µm, previamente secos e tarados. A biomassa foi lavada com 10 mL de água ultra-pura, e os filtros foram secos em estufa à temperatura de $100\pm 1^{\circ}\text{C}$, durante, pelo menos, 18 h. Seguidamente foram arrefecidos até à temperatura ambiente num exsiccador, durante pelo menos 30 min, e pesados numa balança analítica eletrónica (Mettler HK 160, Suíça). Este procedimento foi realizado, pelo menos, em duplicado.

2.8.1.5. Determinação do teor de extratáveis

Os extrativos presentes na matéria-prima foram determinados de acordo com o método do Tappi T 204 cm-97 (extrativos em diclorometano) e de acordo com o protocolo experimental do NREL (Sluiter *et al.*, 2008b) (extrativos em etanol e água), utilizando um Soxhlet com 1000 mL de capacidade. Para tal as amostras foram extratadas sucessivamente com diclorometano (6 h), etanol (18 h) e água (18 h). O procedimento

experimental mais detalhado e os cálculos para a determinação dos teores de extrativos encontram-se descritos no Anexo II.

2.8.1.6. Determinação da proteína

A proteína total da matéria-prima foi determinada através do método de Kjeldahl (1975) utilizando um analisador de proteína semi-automático Kjelttec, Tecator (Suécia).

O fator de conversão utilizado foi $N \times 6,25$. O procedimento experimental e os cálculos efetuados encontram-se descritos no Anexo III.

2.8.1.7. Determinação dos polissacarídeos e grupos acetilo

As amostras dos resíduos sólidos pré-tratados foram sujeitas a uma hidrólise ácida quantitativa, de acordo com uma adaptação do protocolo do NREL (Sluiter *et al.*, 2008a). A 0,5 g de amostra foram adicionados 5 mL de H_2SO_4 a 72% (m/m) e a mistura incubada a $30 \pm 1^\circ C$ num banho termostaticado (Mettler, Alemanha) durante 1 h com agitação ocasional com uma vareta de vidro. Em seguida, todo o conteúdo do tubo foi transferido para frascos Schott de 250 mL por arrastamento com água desmineralizada, numa quantidade suficiente para se obter uma concentração de H_2SO_4 de 4% (m/m). Esta mistura foi autoclavada a $121^\circ C$ durante 1 h e após o término da reação procedeu-se a um arrefecimento rápido com a abertura do esgoto da autoclave. Após os frascos estarem devidamente arrefecidos, fez-se a pesagem do conjunto de modo a verificar a ocorrência de possíveis perdas durante o tratamento. Por último a mistura foi filtrada com filtros de placa porosa (Schott) de porosidade 3, previamente tarados a $550 \pm 5^\circ C$ numa mufla (Heraeus D-6450, Alemanha) durante 5 h.

Os componentes da fração líquida, o hidrolisado, após filtração por filtros 0,45 μm , foram posteriormente analisados por HPLC conforme descrito em 2.8.2. O cálculo das percentagens dos polímeros e grupos acetilo é feito com base nas concentrações de glucose, xilose, arabinose e ácido acético presente nos hidrolisados e encontra-se descrito no Anexo IV.

2.8.1.8. Determinação da lenhina Klason

O resíduo insolúvel obtido após as duas fases da hidrólise ácida quantitativa e após correção do valor da cinza, constitui a lenhina Klason. Este resíduo contido nos cadinhos de placa porosa foi lavado com água destilada (100 mL), filtrado e seco, numa estufa, durante 16 h a $105\pm 5^{\circ}\text{C}$. Decorrido o tempo, os cadinhos foram arrefecidos num exsiccador, à temperatura ambiente e pesados. De seguida, os cadinhos que continham o resíduo insolúvel foram colocados na mufla a $550\pm 5^{\circ}\text{C}$ durante 5 h e pesados após arrefecimento em exsiccador. O valor da cinza no resíduo insolúvel em ácido permite fazer a correção para o cálculo da lenhina Klason.

2.8.2. Determinação de monossacarídeos, ácidos alifáticos e composto furânicos

A quantificação das concentrações de D-glucose (Glc), D-xilose (Xyl), L-arabinose (Ara), ácido acético, ácido fórmico, ácido levulínico, 5-hidroxi metilfurfural (HMF) e furfural nos hidrolisados, foi realizada por HPLC (Agilent 1100 Series, Waldbronn, Alemanha) utilizando uma coluna Aminex HPX-87H (Bio-Rad, EUA).

A quantificação dos açúcares e ácidos alifáticos acima mencionados foi realizada utilizando um detector IR, enquanto a quantificação do furfural e o HMF foi realizada através do detector UV/VIS de fotodíodos.

Nos licores resultantes da pré-extração aquosa da palha de milho foi utilizada coluna HPX-87P (Bio-Rad) para a quantificação da sacarose, glucose e frutose.

Todas as amostras foram previamente filtradas antes da análise através de membranas Millipore de diâmetro de poro $0,22\ \mu\text{m}$.

As concentrações de todos os compostos analisados foram calculadas a partir das respetivas curvas de calibração e traçadas a partir de soluções padrão analisadas regularmente.

As características do equipamento e respetivas condições operacionais utilizadas encontram-se descritas na Tabela 8.

Tabela 8 – Equipamento e condições de operação para as análises por HPLC

Coluna	HPX – 87H	HPX – 87P
Fase móvel	H ₂ SO ₄ 0,5 mM	H ₂ O
Caudal	0,4 mL/min (caracterização matéria-prima e resíduos sólidos) 0,6 mL/min (outros)	0,6 mL/min
Volume de amostra	20 µL (0,4 mL/min) ou 5 µL (0,6 mL/min)	20 µL
Temperatura da coluna	50°C	80°C
Temperatura do detetor IR	45°C	55°C
Comprimento de onda UV	280 nm	

2.8.3. Determinação dos oligossacarídeos

De forma a determinar as concentrações de açúcares na forma oligomérica nos hidrolisados foi pesada sensivelmente 1 g de H₂SO₄ (72%) para frascos Schott de 100 mL e de seguida foi adicionada uma quantidade de hidrolisado de modo a obter uma solução final de 4% (m/m) de H₂SO₄. Após autoclavagem a 120±1°C durante 60 min, os pós-hidrolisados foram caracterizados quimicamente, utilizando os mesmos métodos que para os hidrolisados.

O cálculo das percentagens de oligossacarídeos é feito com base nas concentrações de glucose, xilose, arabinose e ácido acético dos hidrolisados depois e antes da pós-hidrólise e encontra-se descrito no Anexo II.

2.8.4. Determinação de compostos fenólicos

Os compostos fenólicos no hidrolisado foram doseados com uma solução de Folin-Ciocalteu, utilizando como padrão o ácido gálico. O principal objetivo deste método baseia-se na capacidade dos compostos fenólicos para reduzir o reagente de Folin-Ciocalteu o qual, em condições alcalinas, altera a cor de amarelo para azul, sendo posteriormente analisadas no espectrofotômetro a 760 nm (JASCO V-530, Japão). Todo o procedimento está descrito no Anexo V.

3. Resultados e Discussão

3.1. Caracterização da palha de milho

3.1.1. Caracterização granulométrica

A granulometria da matéria-prima é um fator importante para o armazenamento, transporte e processamento. Por esta razão, o lote da palha de milho utilizado neste trabalho, após moagem, foi caracterizado quanto à distribuição de massa consoante o tamanho de partículas.

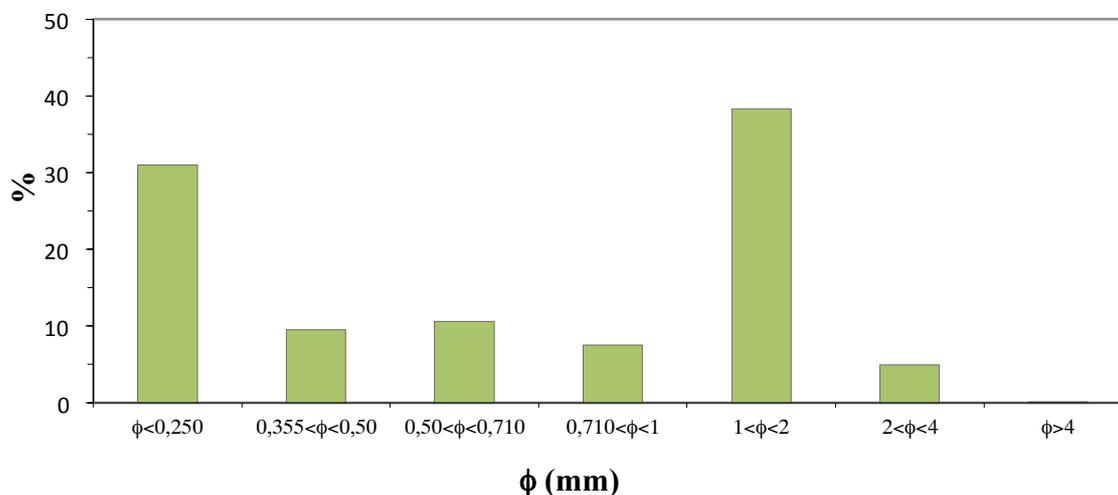


Figura 10 – Distribuição das diferentes frações granulométricas da palha de milho

Pela análise da Figura 10 pode observar-se que uma quantidade considerável da matéria-prima (38,3%) tem um diâmetro compreendido entre 1 e 2 mm, 31% é inferior a 0,250 mm e 26,5% apresenta diâmetro entre 0,355 e 0,710 mm. Comparativamente a outros materiais, como por exemplo *switchgrass* (*Panicum virgatum*) (Bridgeman *et al.*, 2007), este lote caracteriza-se por conter uma percentagem relativamente elevada de finos (<0,250 mm). Sabe-se que a distribuição granulométrica dos materiais depende das características estruturais da própria biomassa e também do método de moagem (Miranda *et al.*, 2012). O fato deste material ter sido triturado e só depois moído pode, provavelmente dar origem a uma maior percentagem de finos, até comparativamente a

outros resultados já obtidos com palha de milho, quando a palha foi sujeita a uma moagem direta (Moniz *et al.*, 2013b).

3.1.2. Caracterização química

A composição química dos materiais lenhocelulósicos varia consoante a sua origem, o tipo e condições de cultura. As diferenças residem fundamentalmente na proporção relativa dos três componentes maioritários, celulose, hemicelulose e lenhina e, em particular, na composição das hemiceluloses. Deste modo, antes do fracionamento é importante uma caracterização criteriosa da matéria-prima a utilizar.

Na Tabela 9 é apresentada a composição química média da palha de milho utilizada neste trabalho antes da pré-extração.

Tabela 9 – Composição química média da palha de milho (% base seca)

Componentes	%
Celulose (glucanas)	40,00
Hemicelulose	26,30
Xilanas	18,87
Arabinanas	3,47
Grupos acetilo	3,95
Lenhina Klason	16,74
Cinza	7,80
Proteína	3,90
Outros (por diferença)	5,26

A celulose, estimada pelo teor de glucanas, é o principal componente da palha de milho. Este material apresenta uma elevada quantidade de polissacarídeos, 66%, dos quais 60% são glucanas e 40% hemicelulose. Desta última, as xilanas são o componente maioritário, como é habitual nos materiais de origem agrícola, contendo também arabinanas e grupos acetilo. Estes dois últimos grupos de compostos foram encontrados em quantidades semelhantes às descritas para a palha de trigo (Nabarlatz *et al.*, 2007).

Em relação à quantidade de lenhina obtida, os valores são da mesma ordem de grandeza dos descritos para os materiais lenhocelulósicos com menor teor de lenhina, como é caso dos cereais (Nabarlatz *et al.*, 2007; Carvalheiro *et al.*, 2009). Para a cinza, o valor obtido foi inferior ao descritos por (Egues *et al.*, 2012) mas superior ao encontrado por (Moniz *et al.*, 2013b), para a palha de milho.

3.1.3. Caraterização dos licores e resíduos sólidos resultantes a pré-extração aquosa

De modo a remover e caracterizar os principais extrativos solúveis em água, nomeadamente os de açúcares livres, procedeu-se a uma pré-extração aquosa (PEA), utilizando as condições operacionais previamente estudadas no LNEG para a palha de sorgo (Torrado, 2010).

Na Tabela 10 são apresentados os rendimentos e as respetivas concentrações de açúcares dos licores obtidos a partir da palha de milho utilizando a pré-extração aquosa a 100°C durante 60 min.

Tabela 10 – Rendimentos e respetivas concentrações de açúcares obtidos nos licores resultantes da pré-extração aquosa da palha de milho

	g/100 g matéria-prima	g·L⁻¹
Sacarose	3,81	4,44
Glucose	2,66	3,11
Frutose	2,40	2,80
Total	8,87	10,35

Os açúcares identificados e quantificados foram a sacarose, glucose e frutose. A quantidade total de açúcares extraídos foi de 10,35 g·L⁻¹, sendo a sacarose o açúcar maioritário, seguida da glucose e frutose. As concentrações de açúcares encontrados são mais elevadas que os obtidos por exemplo para o bagaço de azeitona extratado (Moraes, 2012). Ainda assim, estes valores não são desprezáveis e poderão ter uma ligeira influência

na interpretação dos resultados dos rendimentos (principalmente para o caso das glucanas) após os pré-tratamentos.

Embora para alguns materiais, por exemplo a palha de sorgo (Torrado, 2010) tenha sido realizada a PEA antes do pré-tratamento propriamente dito, neste caso, optou-se por utilizar palha de milho sem PEA por se considerar que esta abordagem deverá estar mais próxima da realidade industrial.

O ácido acético não se encontra nos licores em concentrações apreciáveis, pressupondo que as condições utilizadas não são suficientemente severas para remover os grupos acetilo das hemiceluloses.

Na Tabela 11 é apresentada a composição da palha de milho após a PEA. Nas condições testadas, não se verificaram alterações significativas na composição dos resíduos sólidos, sugerindo que a PEA não afeta a composição macromolecular da matéria-prima.

Tabela 11 – Composição polimérica da palha de milho após pré-extração aquosa

Componentes	%
Celulose (glucanas)	38,71
Hemicelulose	24,10
Xilanas	17,86
Arabinanas	2,15
Grupos acetilo	4,09
Lenhina Klason	17,96

3.2. Fracionamento seletivo das hemiceluloses

3.2.1. Tratamentos hidrotérmicos

Os produtos que se obtêm após o processamento hidrotérmico da biomassa, bem como as suas concentrações, variam consoante a composição da matéria-prima e as condições operacionais do processo. Entre os produtos habitualmente obtidos encontram-se os oligossacarídeos, monossacarídeos, ácido acético e produtos resultantes da degradação tais como furfural, 5-hidroximetilfurfural (HMF), ácido fórmico e levulínico e compostos fenólicos (Palmqvist e Hahn-Hagerdal, 2000).

Nas condições correspondentes às recuperações máximas de pentoses, os oligossacarídeos são, em geral, os principais compostos solúveis (Carvalho *et al.*, 2008). No entanto, sendo o objetivo deste trabalho a utilização de processos químicos de hidrólise suaves, que permitam também aumentar a proporção de monossacarídeos (relativamente à de oligossacarídeos) para uma possível utilização dos hidrolisados na produção de xilitol por uma levedura, foram utilizados tratamentos hidrotérmicos catalisados com CO₂ com diferentes pressões iniciais de CO₂ (400 Psi e 600 Psi). Para uma melhor comparação dos resultados foram também realizados alguns ensaios sem adição de CO₂ (auto-hidrólise).

Na Figura 11 está apresentado o perfil de aquecimento e da variação de pressão para os diferentes ensaios.

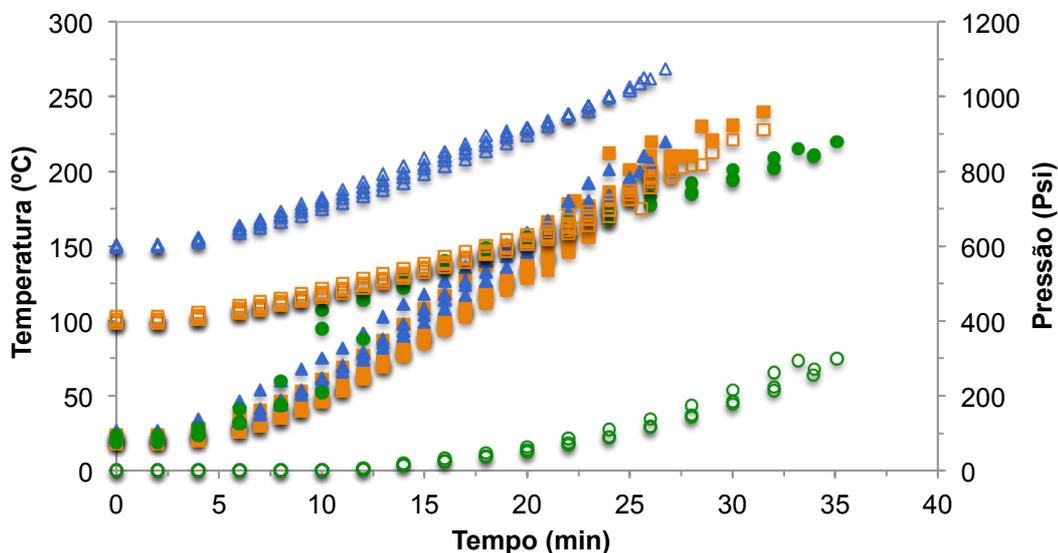


Figura 11 – Perfis de temperatura (■, ▲, ●) e pressão (□, △, ○) para os tratamentos hidrotérmicos catalisados com CO₂ (pressões iniciais de 400 Psi (■, □), 600 Psi (▲, △) e auto-hidrólise (●, ○))

De acordo com os perfis de aquecimento obtidos, conclui-se que os resultados obtidos são reproduzíveis. Assim, é possível observar que os perfis de aquecimento do reator seguem uma tendência linear, ao passo que a variação da pressão, como esperado segue uma tendência exponencial. Sendo assim possível estabelecer linhas de tendência para os perfis de temperatura e pressão em função do tempo.

Pela observação dos vários perfis de aquecimento verifica-se que no caso dos tratamentos hidrotérmicos catalisados com CO₂ os perfis de aquecimento são muito semelhantes, distinguindo-se dos tratamentos de auto-hidrólise por apresentarem uma

velocidade de aquecimento mais baixa para temperaturas inferiores a 100°C, sendo que os tratamentos hidrotérmicos catalisados com CO₂ têm uma velocidade de aquecimento da ordem dos 5°C/min, comparativamente à auto-hidrólise 7,4 °C/min. No entanto, nos tratamentos catalisados com CO₂, o tempo total necessário para atingir a temperatura pretendida é inferior, havendo uma subida da velocidade de aquecimento para 10,4 e 7,3 °C/min, para os tratamentos catalisados com CO₂ para 400 e 600 Psi, respetivamente, contrariamente aos 5 °C/min na auto-hidrólise.

O registo dos perfis de aquecimento permitiu calcular os fatores de severidade (Tabela 12) para cada temperatura de acordo com a expressão proposta por Overend (Overend *et al.*, 1987). O fator de severidade é um parâmetro empírico que agrupa numa mesma variável os efeitos do tempo e temperatura e que tem a vantagem de permitir comparar os resultados dos ensaios realizados em diferentes condições.

Tabela 12 – Condições experimentais utilizadas nos diferentes ensaios de processamento hidrotérmico

T (°C)	Fator de severidade, $\log R_0$		
	Auto-hidrólise	CO ₂ (400 Psi)	CO ₂ (600 Psi)
180	-	2,54	2,65
200	-	3,14	3,16
210	3,75	3,42	3,43
215	3,86	-	-
220	3,97	3,56	3,69
230	-	3,97	4,01
240	-	4,33	-

3.2.1.1 Tratamento com pressão inicial de CO₂ de 400 psi

Na Figura 12 são apresentados os resultados correspondentes aos perfis de hidrólise das arabinoxilanas em função do fator de severidade, $\log R_0$, para uma gama de temperaturas entre 180-240°C.

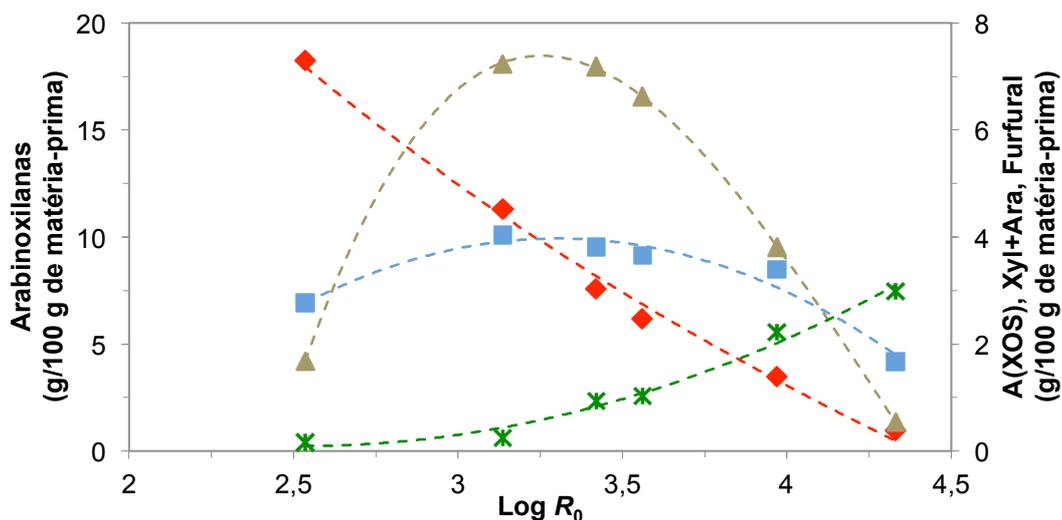


Figura 12 – Recuperação das arabinosilanas (♦) e rendimentos em xilo-oligossacarídeos (▲), pentoses monoméricas (■) e furfural (*), em função do fator de severidade, após os tratamentos hidrotérmicos a pressão inicial de CO₂ de 400 Psi, A(XOS) – xilo-oligossacarídeos substituídos com arabinose, Xyl+Ara – pentoses monoméricas

Tal como esperado, o tratamento hidrotérmico afetou significativamente a hemicelulose, conduzindo a um decréscimo significativo da recuperação da arabinosilanas até se obter uma solubilização máxima de 95,7% para as condições de maior severidade ($\log R_0 = 4,33$). A maior recuperação de A(XOS) (xilo-oligossacarídeos substituídos com arabinose) foi obtida para os tratamentos de 200 e 210°C, ($\log R_0=3,14$ e 3,42, respetivamente). Para o $\log R_0=3,42$, a recuperação de A(XOS) foi de 7,18 g/100 g de matéria-prima. Nestas condições, 66,10% das arabinosilanas iniciais foram solubilizadas e 49,20% foram recuperadas como pentoses totais. O rendimento em A(XOS) obtido, 32,20 g/100 g ArXn foi semelhante ao descrito para os tratamentos hidrotérmicos da casca de arroz e da palha de trigo (Nabarlatz *et al.*, 2007), mas ligeiramente mais baixo do que o descrito em estudos anteriores para a palha de milho, quando sujeita a auto-hidrólise (Moniz *et al.*, 2013b).

O rendimento de pentoses monoméricas atingiu o seu valor máximo de 4,03 g/100 g de matéria-prima (correspondentes a 18,05 g/100 g ArXn inicial), para $\log R_0=3,14$. Para a condição mais severa testada, houve um decréscimo na recuperação de pentoses, fundamentalmente de arabinose, provavelmente devido as reações de degradação. Como consequência, a concentração de furfural aumentou até atingir o valor de 2,98 g/100 g de matéria-prima (13,36% em relação à ArXn inicial).

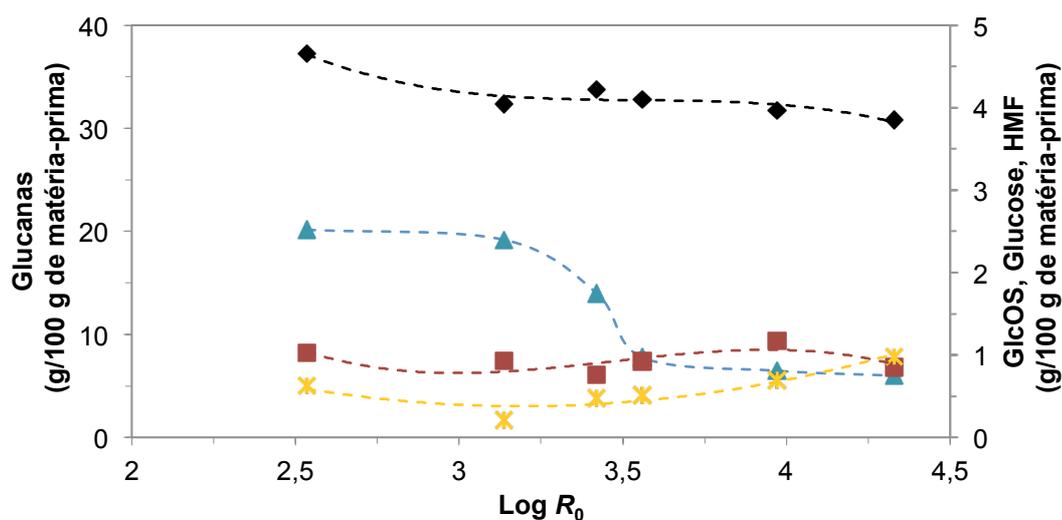


Figura 13 - Recuperação das glucanas (◆) e rendimentos em gluco-oligosacarídeos (■) (GlcOS), glucose (▲) e 5-hidroximetilfurfural (✱) (HMF) em função do fator de severidade, após os tratamentos hidrotérmicos a pressão inicial de CO_2 de 400 Psi

Ao contrário das xilanas, as glucanas são muito menos afetadas por este tipo de tratamentos ainda que exista alguma hidrólise (máximo de 27,87%) sendo recuperadas no licor na forma oligomérica (gluco-oligosacarídeos, GlcOS), monomérica (glucose) e uma pequena percentagem na forma de 5-hidroximetilfurfural (HMF). A concentração de GlcOS obtida é muito semelhante para todas as condições, correspondendo a uma recuperação de cerca de 1 g/100 g de matéria-prima (Figura 13). O máximo de rendimento de glucose atingido foi de 2,52 g/100 g de matéria-prima, para $\text{log } R_0=2,54$. Em todas as condições, as concentrações de HMF foram baixas e semelhantes aos resultados obtidos para outros materiais sem o uso do CO_2 (Moniz *et al.*, 2013b; Nabarlantz *et al.*, 2007; Egues *et al.*, 2012).

Refira-se que as recuperações de glucose na fase líquida são inferiores ao esperado tendo em conta a hidrólise das glucanas observadas. Este resultado poderá em parte ser explicado pela presença de açúcares solúveis nesta matéria-prima, nomeadamente glucose e sacarose, que podem de certa forma ocultar a hidrólise da glucose que ocorre. O valor mais elevado de GlcOS para a condição de menor severidade poderá indicar que a origem da glucose provém mais desses mesmos açúcares solúveis do que da celulose.

-Composição dos licores obtidos

Na Tabela 13 apresenta-se a composição dos licores obtidos para as diferentes temperaturas. A concentração total de pentoses, tanto na forma monomérica como oligomérica, aumenta com a severidade dos tratamentos até ao $\log R_0=3,42$. Destas, a xilose é a principal, atingindo uma concentração máxima de $3,73 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e começando a decrescer a partir de $\log R_0=3,56$, dando origem a um aumento dos produtos de degradação, nomeadamente o furfural. Embora a concentração de A(XOS) obtida seja semelhante entre para $\log R_0$ entre 3,14 e 3,56, a condição com o $\log R_0=3,42$ foi considerada a mais favorável, pois o valor de A(XOS) é mais elevado e a formação de furfural é relativamente baixa.

A concentração máxima de pentoses totais foi obtida para o fator de severidade de $\log R_0=3,14$. Nestas condições foi também obtida a recuperação total de pentoses mais elevada, estando os açúcares fundamentalmente na forma oligomérica, sendo para as pentoses a razão oligómeros/monómeros de 1,7.

Para além dos oligossacarídeos e monossacarídeos, os hidrolisados contêm também, em menores concentrações, outros produtos resultantes da hidrólise da hemicelulose, como o ácido acético que atingiu uma concentração máxima de $3,74 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Nestas condições, as concentrações de furfural e HMF foram relativamente baixas.

Para além do ácido acético, foi também detetado no hidrolisado a presença de ácido fórmico, cuja concentração aumenta com o aumento da severidade do tratamento. Pode assim verificar-se que o aumento da concentração dos ácidos alifáticos pode estar correlacionado com a diminuição do pH ($R^2 = 0,974$).

Tabela 13 – Composição (g·L⁻¹) dos licores obtidos a partir dos tratamentos hidrotérmicos catalisados com CO₂ a uma pressão inicial de 400 Psi

	Fator de severidade, log R ₀					
	2,54 (180)	3,14 (200)	3,42 (210)	3,56 (220)	3,97 (230)	4,33 (240)
pH	5,00	4,34	3,93	3,83	3,6	3,41
(A)XOS	1,65	6,98	9,88	6,56	3,63	0,52
GlcOS	2,90	0,90	0,73	0,91	1,12	0,81
AcO	0,47	0,93	1,03	1,14	1,88	0,00
Xilose	2,61	3,73	3,34	3,41	2,96	1,81
Arabinose	0,49	0,70	0,80	0,71	0,72	0,00
Glucose	2,76	2,57	1,86	1,07	0,86	0,79
Pentoses^a	5,00	12,42	12,02	11,63	7,75	2,41
Ácido acético	0,74	1,67	2,42	2,63	3,05	3,74
Ácido fórmico	0,36	0,99	2,06	2,20	3,08	3,17
HMF	0,48	0,16	0,35	0,40	0,52	0,73
Furfural	0,11	0,17	0,65	0,75	1,54	2,07

A(XOS) – xilo-oligossacarídeos substituídos com arabinose; GlcOS – gluco-oligossacarídeos; AcO – grupos acetilo ligados aos oligossacarídeos; ^a concentração determinada de pentoses na forma monomérica (depois da pós-hidrólise ácida); valores entre parêntesis indicam a temperatura final do tratamento

-Composição dos resíduos sólidos

Uma vez que os tratamentos hidrotérmicos dos materiais lenhocelulósicos conduzem fundamentalmente à hidrólise da hemicelulose, as alterações do rendimento em sólidos obtidos (quantificados pela perda de peso seco) são úteis para monitorizar a evolução dos tratamentos.

Na Tabela 14 são apresentados os dados para a composição dos resíduos sólidos após o tratamento hidrotérmico da palha de milho em função da severidade do tratamento. Para a condição de menor severidade, a solubilização do sólido foi baixa (16,1%) e a composição química dos resíduos sólidos é similar à da matéria-prima. No entanto, para as severidades superiores a log R₀=3,14, o rendimento em sólido vai sempre decrescendo com o aumento da severidade, chegando a uma solubilização máxima de cerca de 50%. Esta diminuição de massa está relacionada, principalmente, com a solubilização das

hemiceluloses. Como se pode observar, a percentagem de arabinoxilana no sólido diminui com o aumento de $\log R_0$, obtendo-se para a temperatura mais elevada uma percentagem residual deste componente (1,91%). Também a percentagem de grupos acetilo no sólido residual diminui com o aumento da severidade do tratamento, esta diminuição pode também estar correlacionada com o aumento da concentração de ácido acético na fase líquida ($R^2 = 0,974$).

Tal com referido anteriormente, a solubilização máxima das glucanas foi de 27,87%. Ainda assim, a percentagem de glucanas no resíduo sólido, após processamento, aumentou até atingir um valor máximo de cerca de 60%.

Tabela 14 – Composição polimérica dos resíduos sólidos obtidos após tratamento hidrotérmico catalisado com CO_2 a uma pressão inicial de 400 Psi

	Fator de severidade, $\log R_0$						
	(%)	2,54 (180)	3,14 (200)	3,42 (210)	3,56 (220)	3,97 (230)	4,33 (240)
Rendimento sólido^a		83,9	64,2	59,9	56,2	52,6	51,2
Arabinoxilanas^b		21,74	17,62	11,66	11,03	3,65	1,91
Glucanas^b		44,4	50,4	56,4	58,3	60,3	60,2
Grupos acetilo^b		4,23	3,28	2,46	1,93	1,06	0,70
Lenhina Klason^b		19,5	24,4	25,5	26,9	30,5	35,7

^a (g/g de matéria-prima); ^b (g/100g de resíduos sólidos tratados); Valores entre parêntesis indicam a temperatura final do tratamento

A Figura 14 mostra o efeito dos processos hidrotérmicos na lenhina Klason recuperada. Até à severidade $\log R_0=3,42$, praticamente não ocorre solubilização da lenhina mas para a severidade de $\log R_0=3,97$ ocorre uma solubilização de 14,08%, seguida de um aumento da recuperação. Ainda assim, a percentagem de lenhina nos resíduos sólidos aumenta sempre com o aumento da severidade sendo esse aumento mais acentuado para as severidades mais elevadas. (Tabela 14). Este aumento da recuperação de lenhina é bastante típico para os processos hidrotérmicos e foi descrito também para os processos com ácido diluído (Garrote *et al.*, 2002), podendo estar associado a reações de condensação da lenhina com os açúcares ou com os produtos da sua degradação, dando origem à formação de produtos insolúveis (Ramos, 2003).

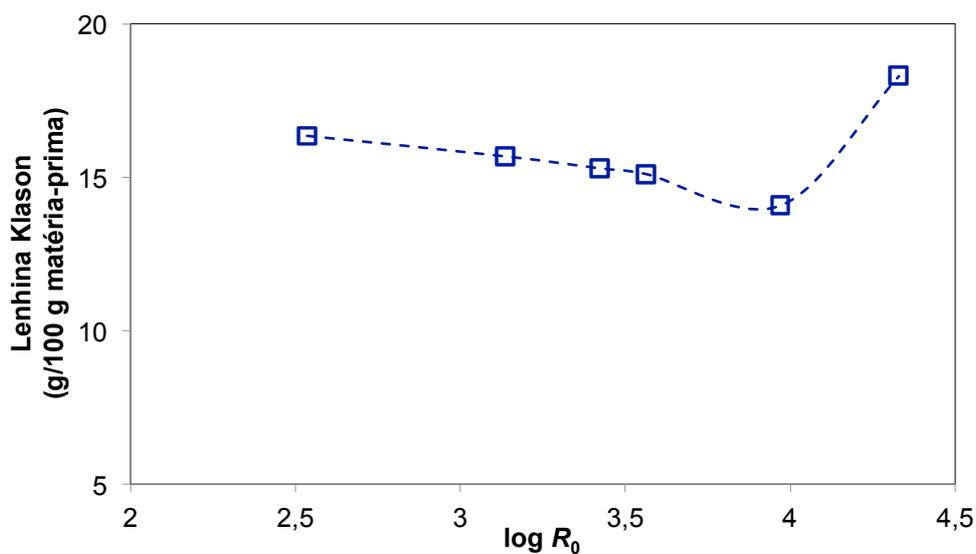


Figura 14 – Recuperação de lenhina Klason em função do fator de severidade após os tratamentos hidrotérmicos a pressão inicial de CO₂ de 400 Psi

3.2.1.2. Tratamento com pressão inicial de CO₂ de 600 Psi

Considerando que a hidrólise da hemicelulose, nas condições descritas anteriormente, deu ainda origem a uma percentagem de oligossacarídeos sempre mais elevadas que de monossacarídeos, foram realizados outros tratamentos em que se aumentou a pressão inicial de CO₂ para 600 Psi. Na Figura 12 são apresentados os resultados correspondentes aos perfis de hidrólise de arabinosilanas em função do fator de severidade, log R_0 , para uma gama de temperaturas entre 180-230°C. Neste caso, não foi realizado o ensaio para a temperaturas mais elevada (240°C), uma vez que se pretendia fundamentalmente comparar a recuperação de pentoses na condição ótima, para as diferentes pressões iniciais de CO₂.

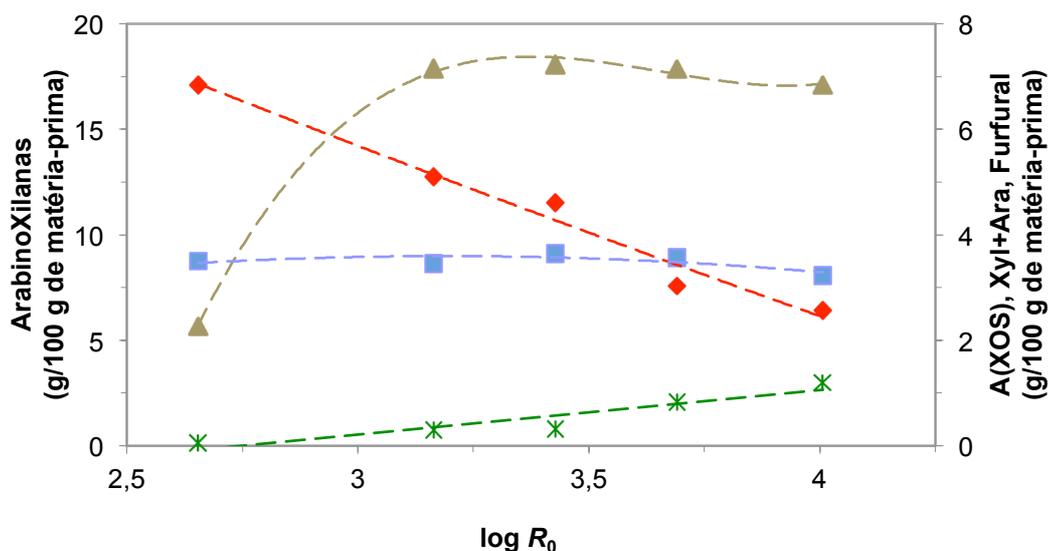


Figura 15 - Recuperação das (arabino)xilanas (♦) e rendimentos em xilo-oligossacarídeos (▲), pentoses monoméricas (■) e furfural (*), em função do fator de severidade, após os tratamentos hidrotérmicos a pressão inicial de 600 Psi, A(XOS) – xilo-oligossacarídeos substituídos com arabinose, Xyl+Ara – pentoses monoméricas

Mais uma vez, o tratamento hidrotérmico afetou significativamente a hemicelulose, conduzindo a um decréscimo significativo da recuperação da arabinóxilanas (Figura 15). A recuperação de A(XOS) foi sempre aumentando com o aumento da severidade à temperatura de 210°C ($\log R_0=3,43$). Nestas condições, a recuperação de A(XOS) foi de 7,23 g/100 g de matéria-prima, o que representa uma solubilização de 48,43% arabinóxilanas correspondendo a uma recuperação de 49,92% como pentoses totais. O rendimento máximo em A(XOS) obtido neste caso, foi ligeiramente inferior ao obtido para a pressão inicial de 400 Psi.

O rendimento de pentoses monoméricas atingiu o seu valor mais elevado (3,65 g/100 g de matéria-prima), valor este que é inferior ao obtido no ensaio de 400 Psi. Os rendimentos em furfural e HMF foram mais baixos aos obtidos anteriormente para as mesmas condições de severidade.

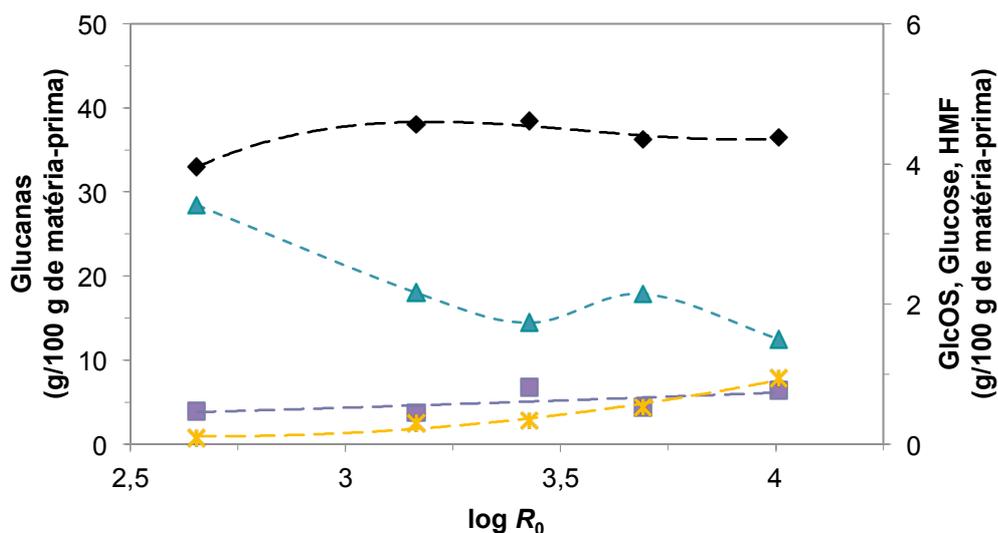


Figura 16 - Recuperação das glucanas (◆) e rendimentos em gluco-oligossacarídeos (■) (GlcOS), glucose (▲) e 5-hidroximetilfurfural (*) (HMF), em função do fator de severidade, após os tratamentos hidrotérmicos a pressão inicial de CO₂ de 600 Psi

Ao contrário das xilanas, as glucanas foram muito menos afetadas pelo tratamento, como se viu no caso anterior, existindo alguma solubilização da ordem dos 17,5% (em média), com uma recuperação máxima de oligossacarídeos (GlcOS) no licor de 0,81 g/100 g de matéria-prima (log R_0 =2,43, Figura 16). O rendimento em glucose máximo foi de 3,41 g/100 g de matéria-prima obtido para a condição de menor severidade (log R_0 = 2,65). Em todas as condições, as concentrações de HMF foram baixas e semelhantes aos resultados obtidos para outros tipos de matéria-prima sem o uso do CO₂ (Moniz *et al.*, 2013b; Nabarlantz *et al.*, 2007; Carvalheiro *et al.*, 2009).

Refira-se que para a condição de menor severidade a recuperação de glucose na fase líquida é superior ao que seria de esperar como resultado da hidrólise da celulose. No entanto, este resultado poderá em parte ser explicado pela presença de açúcares solúveis nesta matéria-prima, nomeadamente glucose e sacarose, que podem de certa forma confundir a verdadeira hidrólise da celulose que ocorre.

-Composição dos licores obtidos

Relativamente à composição dos licores verifica-se que concentração total de pentoses (monoméricas e oligoméricas), aumenta com o aumento da severidade do tratamento. Destas, a xilose é a principal sendo que a concentração de A(XOS) atingiu o seu valor mais elevado para $\log R_0=3,43$, também nestas condições foi obtida a recuperação de pentoses mais elevada.

Apesar do aumento da pressão inicial de CO_2 e potencialmente da concentração do ácido carbónico, as pentoses recuperadas continuam a aparecer fundamentalmente na forma oligomérica obtendo-se igualmente uma razão oligómeros/monómeros de 1,7.

O aumento da pressão inicial de CO_2 não permitiu assim o aumento desejado do rendimento em pentoses, nomeadamente monoméricas. As concentrações de A(XOS) foram semelhantes e a das pentoses monoméricas ligeiramente inferiores aos obtidos com a pressão inicial de CO_2 de 400 Psi.

Em relação ao ácido acético este atingiu um máximo de $3,75 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Nestas mesmas condições, e em comparação com as condições anteriormente testadas, as concentrações de furfural e HMF foram mais baixas. Esta parece ser uma vantagem importante do uso do CO_2 , que conduz fundamentalmente a uma menor formação de produtos de degradação.

Refira-se que a adição de CO_2 ao meio reacional tem influência no perfil de aquecimento embora as recuperações máximas sejam obtidas para severidades semelhantes.

Para além do ácido acético, foi também detetado no hidrolisado a presença de ácido fórmico, cuja concentração aumenta com o aumento da severidade do tratamento. Pode assim verificar-se que o aumento da concentração dos ácidos alifáticos pode estar correlacionado com a diminuição do pH ($R^2 = 0,925$).

Tabela 15 – Composição (g·L⁻¹) e respectivos valores de pH dos licores obtidos a partir dos tratamentos hidrotérmicos catalisados com CO₂, a uma pressão inicial de 600 Psi

	Fator de severidade, log R₀				
	2,65 (180)	3,16 (200)	3,43 (210)	3,69 (220)	4,01 (230)
pH	5,03	4,27	3,96	3,84	3,75
(A)XOS	2,21	6,97	7,02	6,90	6,59
GlcOS	0,46	0,44	0,79	0,51	0,74
AcO	0,14	0,65	1,02	0,66	0,00
Xilose	2,80	2,87	3,29	3,26	2,85
Arabinose	1,08	0,94	0,74	0,66	0,69
Glucose	3,69	2,34	1,87	2,30	2,85
Pentoses^a	6,43	1,78	12,07	11,82	11,09
Ácido acético	1,14	2,41	2,60	3,19	3,75
Ácido fórmico	1,12	1,20	1,24	1,43	1,36
HMF	0,07	0,23	0,25	0,39	0,41
Furfural	0,04	0,21	0,22	0,39	0,84

A(XOS) – xilo-oligossacarídeos substituídos com arabinose; GlcOS – gluco-oligossacarídeos; AcO – grupos acetilo ligados aos oligossacarídeos; ^a concentração determinada de pentoses na forma monomérica (depois da pós-hidrólise ácida); valores entre parêntesis indicam a temperatura final do tratamento

-Composição dos resíduos sólidos

Na Tabela 16 estão representadas as composições dos resíduos sólidos obtidos às diferentes condições de severidade ensaiadas. Para a condição de menor severidade, a solubilização do sólido foi baixa. No entanto, vai decrescendo ligeiramente até ao valor de 62,17%, na condição mais severa, alterando assim a proporção do resíduo sólido final. Esta diminuição de massa pode ser correlacionada com a hidrólise das hemiceluloses.

Como já foi referido, as glucanas foram menos afetadas pelos tratamentos, e assim a sua concentração nos resíduos sólidos aumenta com o aumento da severidade.

Tabela 16 - Composição polimérica dos resíduos sólidos obtidos após tratamento hidrotérmico catalisado com CO₂, a uma pressão inicial de 600 Psi

(%)	Fator de severidade, $\log R_0$				
	2,65 (180)	3,16 (200)	3,43 (210)	3,69 (220)	4,01 (230)
Rendimento sólido^a	74,4	72,0	70,8	65,0	62,17
Arabinosilanas^b	22,99	17,71	16,27	11,66	10,34
Glucanas^b	44,24	52,96	54,58	55,06	58,63
Grupos acetilo^b	3,91	3,22	3,23	1,85	1,65
Lenhina Klason^b	18,72	22,26	23,61	24,87	28,91

^a (g/g de matéria-prima); ^b (g/100g de resíduos sólidos tratados); Valores entre parêntesis indicam a temperatura final do tratamento

Como se pode observar na Figura 17, lenhina é pouco afetada por este tratamento e nos resíduos sólidos obtidos após tratamento a percentagem de lenhina aumenta, seguindo uma tendência semelhante à obtida para a pressão inicial de 400 Psi (Tabelas 13 e 14).

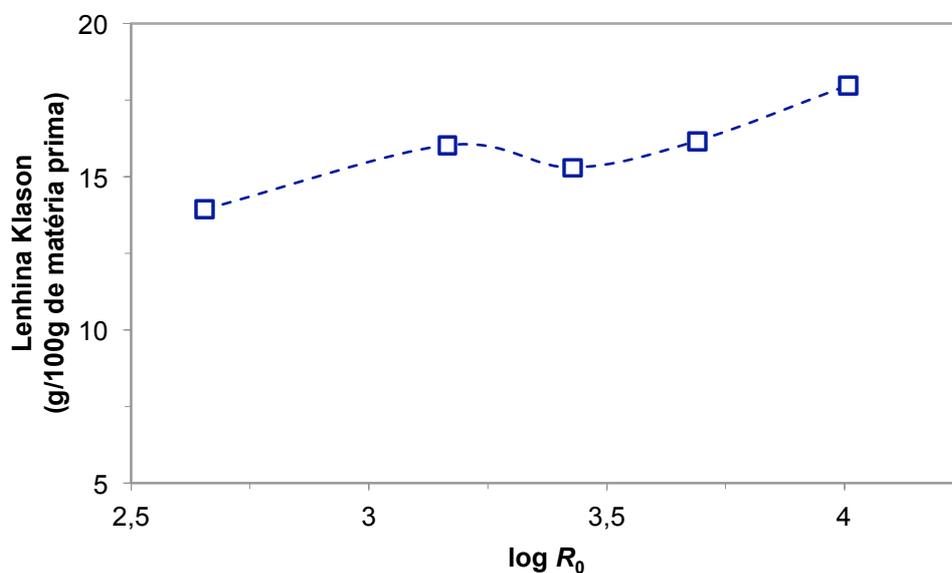


Figura 17 - Recuperação de lenhina Klason em função do fator de severidade após os tratamentos hidrotérmicos a pressão inicial de CO₂ de 600 Psi

3.2.1.3. Auto-hidrólise

Os perfis de auto-hidrólise baseiam-se no estudo do comportamento de cada componente estrutural (celulose, hemicelulose e lenhina) e dos seus derivados, ao calcular a recuperação de cada um e relacionando-as com a severidade das diferentes condições.

Tendo em conta que a hidrólise da hemicelulose dos tratamentos hidrotérmicos catalisados com CO₂ já discutidos, deu origem a uma percentagem relativamente elevada de oligossacarídeos, foram realizados três tratamentos hidrotérmicos sem adição de CO₂ (auto-hidrólise) para condições próximas das previamente otimizadas (210, 215, 220°C) (Moniz et al., 2013b). O objetivo destes ensaios foi verificar se os tratamentos catalisados com CO₂ teriam realmente vantagens e uma influência significativa nas razões pentoses/oligossacarídeos obtidas.

Nestes tratamentos a recuperação de A(XOS) mais elevada foi obtida para a temperatura de 215°C ($\log R_0=3,86$), correspondendo a 8,08 g/100 g de matéria-prima. Nestas condições, 77,41% das arabinoxilanas iniciais foram solubilizadas e 52,15% foram recuperadas como pentoses totais. O rendimento em A(XOS) obtido neste caso foi ligeiramente superior ao obtido os tratamentos catalisados com CO₂. Nestas condições o rendimento em pentoses monoméricas foi ligeiramente mais baixo que o obtido para os tratamentos catalisados com CO₂, sendo a razão oligómeros/monómeros de 2,1.

Na Figura 18 estão apresentadas as composições relativas dos diferentes hidrolisados (auto-hidrólise e processos hidrotérmicos catalisados com CO₂) nas condições correspondentes à recuperação máxima de pentoses. Como se pode observar a concentração de monossacarídeos obtidos por auto-hidrólise (22,8%) é inferior às obtidas para os tratamentos hidrotérmicos catalisados com CO₂ (29,8% e 31,0%). Já as concentrações relativas de A(XOS) são ligeiramente superiores aos valores obtidos para os processos catalisados com CO₂, o que parece mostrar que em termos da proporção relativa a adição de CO₂ favorece ligeiramente a obtenção de pentoses monoméricas em detrimento das oligoméricas. Ainda assim, a adição de CO₂ não tem um efeito significativo na hidrólise. Pode acontecer que por um lado as concentrações de CO₂ não sejam ainda suficientemente elevadas para que o ácido carbónico formado tenha efeito na hidrólise. Por outro lado, e de acordo com os resultados obtidos (van Walsum e Shi, 2004) a adição de CO₂ pode ser importante no caso de materiais muito pouco acetilados mas no caso de matérias mais acetilados, como a madeira de álamo (5% de grupos acetilo), a sua adição

parece não ter um efeito aparente nas quantidades de pentoses obtidas. Refira-se que a palha de milho utilizada neste trabalho apresenta um grau de acetilação médio (3,95% de grupos acetilo).

Refira-se ainda que os valores de pH dos hidrolisados obtidos no caso dos processos catalisados com CO₂ são ligeiramente mais elevados do que os obtidos na auto-hidrólise. Estes resultados poderão estar relacionados com a libertação de compostos alcalinos resultantes da solubilização da cinza (Moniz *et al.*, 2013b; van Walsum e Shi, 2004; McWilliams e van Walsum, 2002).

Em relação aos teores de ácidos alifáticos pode-se observar a partir da Figura 18 que no caso da auto-hidrólise os valores são superiores. O mesmo acontece para os derivados furânicos cuja proporção relativa diminui à medida que aumenta a pressão de CO₂. Tal como referido anteriormente, os tratamentos hidrotérmicos catalisados com CO₂ dão origem a perfis de aquecimento mais lentos (até 100°C) do que no caso da auto-hidrólise e perfis de aquecimento mais rápidos de 100°C até a temperatura final. O fato do processo ser mais rápido para se obter uma mesma temperatura final faz com que se obtenha um rendimento semelhante em pentoses com uma menor hidrólise das arabinoxilanas ocorrendo também menos degradação, i.e., menor formação de derivados furânicos.

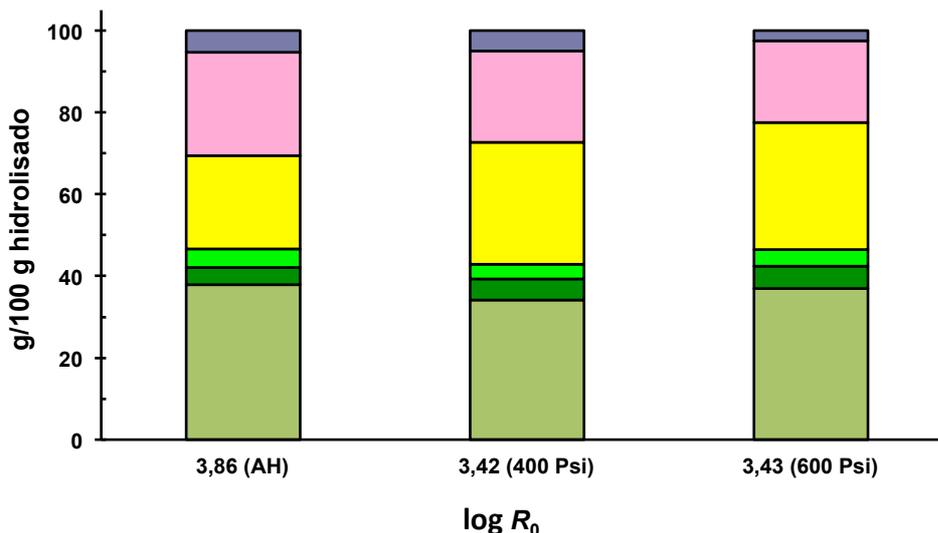


Figura 18 - Composição relativa dos hidrolisados obtidos para a auto-hidrólise (AH) e tratamentos hidrotérmicos com diferentes pressões iniciais de CO₂ (400 Psi e 600 Psi) nas condições de severidade correspondentes à recuperação máxima de Xyl+Ara (■), AcO (■), A(XOS) (■), GlcOS (■), ácidos alifáticos (■) e derivados furânicos (■)

A composição dos resíduos sólidos obtidos nas diferentes condições ótimas, está apresentada na Figura 19. Estes resultados mostram que quanto mais elevada a pressão inicial de CO₂ menor a hidrólise das arabinosilanas, ou seja, o CO₂ e o ácido carbónico formado nestas condições, são pouco eficientes no aumento da hidrólise da hemicelulose. Por outro lado, a recuperação máxima de pentoses totais foi semelhante para as duas pressões iniciais de CO₂, tendo a vantagem de ocorrer uma menor formação dos derivados furânicos na presença de CO₂.

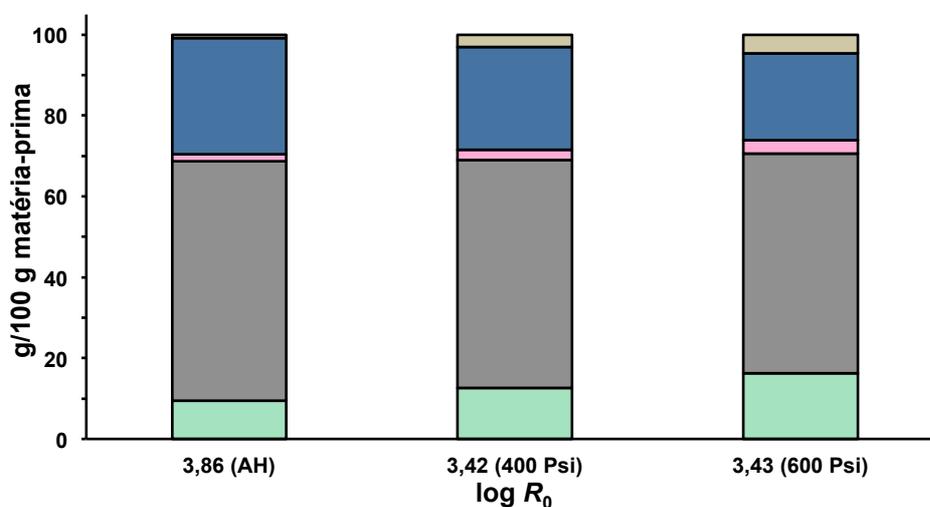


Figura 19 – Composição relativa dos resíduos sólidos obtidos para a auto-hidrólise (AH) e tratamentos hidrotérmicos com diferentes pressões iniciais de CO₂ (400 Psi e 600 Psi) nas condições de severidade correspondentes à recuperação máxima de pentoses. Lenhina Klason (■), glucanas (■), arabinosilanas (■) grupos acetilo (■) e outros (■)

Relativamente aos outros componentes poliméricos, e tendo em conta a hidrólise da hemicelulose mais elevada obtida para os tratamentos de auto-hidrólise, verifica-se que no caso dos tratamentos catalisados com CO₂, as percentagens de glucanas e lenhina nos resíduos obtidos são ligeiramente mais baixas.

3.2.2 Hidrólise com sais inorgânicos

Os sais inorgânicos podem ser considerados como ácidos de Bronsted, permitindo o

aumento da taxa de hidrólise das hemiceluloses e da celulose durante o processamento da biomassa em meio ácido, embora possam também ser utilizados isoladamente (Liu *et al.*, 2009). Como qualquer outro processo de hidrólise a composição química dos hidrolisados hemicelulósicos varia de acordo com a matéria-prima utilizada, o tipo e a concentração do catalisador (neste caso do tipo de sal utilizado), bem como a temperatura e duração do processo. Algumas das condições operacionais adotadas para a otimização da hidrólise com sais inorgânicos, nomeadamente o tipo de sal e temperatura, vêm ganhando cada vez mais interesse para o pré-tratamento da biomassa. Até ao momento existem ainda poucos trabalhos que descrevam a utilização de sais inorgânicos para a hidrólise de materiais lenhocelulósicos. Destes, os sais que demonstram apresentar maior potencial são o FeCl_3 (Marcotullio *et al.*, 2010), e também o $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ (Sun *et al.*, 2011a; Liu *et al.*, 2009).

Na Figura 20 são apresentados os resultados correspondentes aos perfis de hidrólise das arabinoxilanas em função do fator de severidade, $\log R_0$, para a hidrólise da palha de milho com $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ 45 mM, numa gama de temperaturas entre 130-220°C.

A hidrólise com sais inorgânicos afetou significativamente a hemicelulose, conduzindo a uma hidrólise significativa das arabinoxilanas até se obter a solubilização completa para as condições de severidade mais elevadas ($\log R_0 > 3,70$). A maior recuperação de xilose foi obtida para o tratamento de 190°C ($\log R_0 = 3,05$), 14,01 g/100 g de matéria-prima. Nestas condições, 78,76% das arabinoxilanas iniciais foram solubilizadas. A par da hidrólise da hemicelulose, ocorre também a formação de oligossacarídeos mas neste processo em muito menor quantidade que nos anteriores. Em comparação com os tratamentos hidrotérmicos referidos acima, este processo torna-se mais vantajoso, devido à sua elevada recuperação de pentoses, sendo assim um método mais indicado quando o objetivo é utilizar o hidrolisado para bioconversão, hidrolisando a hemicelulose de modo a obter uma maior percentagem de pentoses monoméricas livres.

O rendimento de pentoses monoméricas aumenta com a severidade atingindo o seu valor máximo de 17,79 g/100 g de matéria-prima (correspondendo a uma recuperação de 79,64 g/100 g de ArXn inicial), para o $\log R_0 = 3,05$. Este valor compara favoravelmente com muito dos resultados obtidos para a hidrólise de ácidos diluídos de materiais lenhocelulósicos (Schell *et al.*, 2003; Öhgren *et al.*, 2007; Tucker *et al.*, 2003).

No entanto, o máximo de pentoses deste trabalho foi ainda inferior aos valores obtidos por Sun (Sun *et al.*, 2011a) utilizando o mesmo sal ($\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$). Isto pode dever-se

ao fato da quantidade de sal utilizada neste trabalho (0,36 g $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3/100$ g de matéria-prima) poder não ser ainda a ótima, assim como a razão líquido-sólido ser diferente nos vários trabalhos (Liu *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2011a). Além disso, será também de referir que o material lenhocelulósico utilizado por Sun (Sun *et al.*, 2011a), resíduos de milho (*corn stover*), foi sujeito a uma ensilagem, o que pode ser visto como um pré-tratamento adicional da matéria-prima, ficando esta mais suscetível à hidrólise posterior. Desta forma se explica a menor taxa de solubilização de pentoses obtida no presente trabalho, quando comparada com os resultados obtidos por Sun (Sun *et al.*, 2011a).

Para a condição mais severa testada, houve um decréscimo na recuperação de pentoses, fundamentalmente devido as reações de degradação. Como consequência, a concentração de furfural aumentou até atingir o valor de 5,19 g/100 g de matéria-prima.

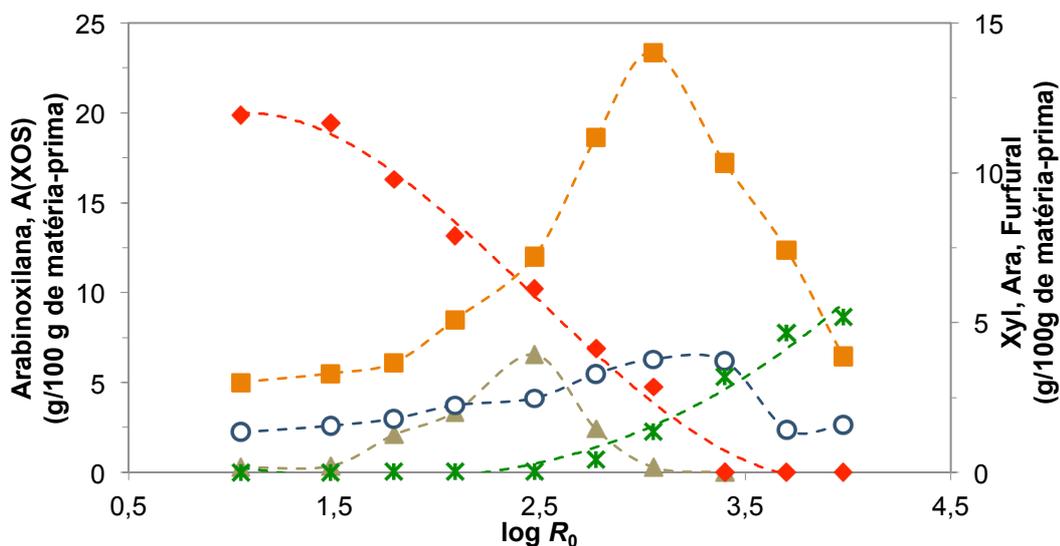


Figura 20 – Recuperação das arabinosilanas (♦) e rendimentos em xilo-oligosacarídeos (▲), Xyl (xilose) (■) (xilose), Ara (arabinose) (○) e furfural (*), em função do fator de severidade, após hidrólise com $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$

Também neste tipo de hidrólise, as glucanas são muito menos afetadas que as xilanas ainda que exista alguma solubilização (cerca de 26,1%), sendo recuperadas no licor na forma oligomérica (GlcOS), monomérica (glucose) e uma pequena percentagem degradada na forma de HMF. A concentração de GlcOS obtida é, quase sempre, da mesma ordem de grandeza independentemente da temperatura, correspondendo a uma média de recuperação de 1,56 g/100 g de matéria-prima (Figura 21). O máximo de rendimento de glucose

atingido foi de 5,57 g/100 g de matéria-prima, para $\log R_0 = 1,79$. Tal como referido anteriormente para os processos hidrotérmicos, é possível que em certa medida os resultados relacionados com as glucanas e os seus produtos de hidrólise possam estar ligeiramente afetados pela presença de açúcares solúveis nos extrativos deste material.

As concentrações de HMF foram relativamente baixas quando comparadas com os resultados obtidos para outros tipos de matéria-prima, como o *corn stover* (Sun *et al.*, 2011a) que apresentam concentrações de HMF e concentrações de furfural elevadas (nas condições mais severas).

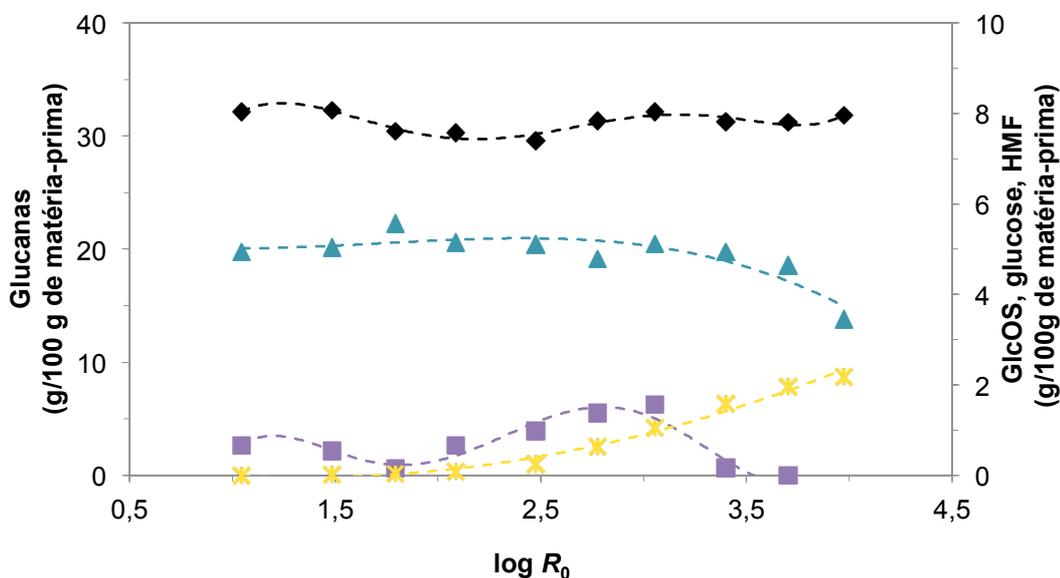


Figura 21 – Recuperação das glucanas (◆) e rendimentos em gluco-oligossacarídeos (■) (GlcOS), glucose (▲) e HMF (*), em função do fator de severidade, após hidrólise com $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$

-Composição dos licores obtidos

Na Tabela 17 apresenta-se a composição dos licores obtidos para as diferentes temperaturas. A concentração total de pentoses, na forma monomérica, aumenta com a severidade dos tratamentos até $\log R_0=3,05$. Destas, a xilose é a principal, atingindo uma concentração máxima de $15,23 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e começando a decrescer a partir do $\log R_0=3,40$, dando origem a um aumento dos produtos de degradação, nomeadamente o furfural. A concentração máxima de A(XOS) obtida foi de $6,25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ para uma severidade de 2,47. A concentração máxima de pentoses totais foi obtida para a severidade de $\log R_0=3,05$.

Contrariamente ao que acontece nos processos hidrotérmicos, neste caso, os açúcares estão fundamentalmente sob a forma monomérica, sendo a sua razão oligómeros/monómeros 0,08.

Tabela 17 – Composição ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) e respetivos valores de pH dos licores obtidos a partir da hidrólise da palha de milho com $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$

	Fator de severidade, $\log R_0$									
	1,04 (130)	1,48 (140)	1,79 (150)	2,09 (160)	2,47 (170)	2,77 (180)	3,05 (190)	3,40 (200)	3,70 (210)	3,98 (220)
pH	2,32	2,49	2,59	2,60	2,65	2,69	2,83	2,89	2,91	3,02
(A)XOS	0,29	0,35	2,04	3,24	6,25	2,30	0,27	0,00	0,00	0,00
GlcOS	0,65	0,53	0,15	0,64	0,94	1,32	1,49	0,15	0,00	0,00
AcO	0,17	0,25	0,34	0,74	1,03	1,08	1,42	0,00	0,00	0,00
Xilose	3,36	3,69	4,08	5,60	7,80	12,14	15,23	11,21	8,07	4,20
Arabinose	1,48	1,74	1,99	2,46	2,68	3,57	4,11	4,03	1,55	1,71
Glucose	5,39	4,48	6,06	5,52	5,40	5,07	5,45	5,23	4,93	3,67
Pentoses^a	4,78	5,84	8,43	11,79	17,67	18,40	19,62	12,45	6,70	3,38
Ác. Acético	0,31	0,40	0,53	0,69	0,96	3,84	5,02	6,65	7,93	6,68
Ác. Fórm.	1,25	1,34	1,02	1,30	0,60	2,33	2,90	3,61	4,40	5,64
HMF	0,00	0,01	0,03	0,07	0,18	0,47	0,79	1,17	1,46	1,63
Furfural	0,00	0,00	0,03	0,01	0,02	0,29	0,95	2,21	3,25	3,61

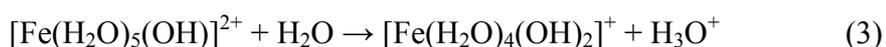
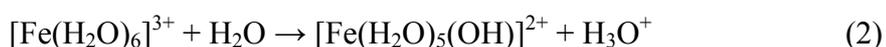
A(XOS) – xilo-oligossacarídeos substituídos com arabinose; GlcOS – gluco-oligossacarídeos; AcO – grupos acetilo ligados aos oligossacarídeos; ^a concentração potencial de pentoses na forma monomérica (depois da pós-hidrólise ácida); valores entre parêntesis indicam a temperatura final do tratamento

Para além dos monossacarídeos e oligossacarídeos, os hidrolisados contêm também, em menores concentrações, outros produtos resultantes da hidrólise da hemicelulose. Entre eles encontra-se o ácido acético que atinge uma concentração máxima de $7,93 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ superiores às concentrações obtidas com processos hidrotérmicos. No entanto, neste caso a percentagem de grupos acetilo ligados aos oligossacarídeos também é inferior, o que significa que poderá existir mais ácido acético livre no hidrolisado. Ainda assim, os valores são mais elevados do que seria de prever, tendo em conta a composição deste material. Nestas condições, as concentrações de HMF foram relativamente baixas, no entanto as concentrações de furfural podem atingir valores mais elevados para as condições de maior

severidade. Comparativamente aos tratamentos hidrotérmicos, e para as mesmas condições de severidade, a hidrólise catalisada com $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ dá origem a uma maior formação de derivados furânicos. Esta formação é ligeiramente mais elevada na condição correspondente ao máximo de pentoses, mas para as condições de severidade mais elevadas, a formação de derivados furânicos, principalmente o furfural, aumenta drasticamente. Este fato, faz que este tipo de método tenha também sido descrito para a produção de furfural (Marcotullio e de Jong, 2011).

No entanto, no caso em que se pretende utilizar o hidrolisado para bioconversão, este aspeto faz com que seja necessário uma otimização criteriosa das condições operacionais, razão pela qual se optou por utilizar uma concentração de catalisador baixa, em detrimento de se obter um menor rendimento em pentoses.

Também na Tabela 17 estão os valores de pH (à temperatura ambiente) obtidos no final de cada tratamento. Como se pode observar, o pH aumenta à medida que aumenta a severidade dos tratamentos. No entanto, o pH da solução do $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ tem um valor inferior aos obtidos nos tratamentos (pH=1,3). Esta acidez da solução é explicada através do carácter ácido Bronsted do $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ devido à formação, em solução aquosa, do complexo hidratado de $\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$, que quando em contato com a água, sofre uma hidrólise de acordo com as equações abaixo descritas:



Este complexo hidratado quando está em meio aquoso, converte um dos ligandos de H_2O a OH^- , formando o ião hidrónio (H_3O^+), sendo este o agente catalisador da hidrólise. No entanto, apesar da solução de nitrato de ferro ter um comportamento ácido, o pH do hidrolisado após os tratamentos aumenta com o aumento da severidade. Uma possível explicação para a subida do pH será a formação de acetato, que irá captar os iões H_3O^+ do meio, formando ácido acético e diminuindo assim a acidez do meio. Também os compostos inorgânicos da matéria-prima (quantificados como cinza), por terem características alcalinas, ajudam a tamponizar o meio, podendo assim estar a contribuir para a subida de pH.

-Composição dos resíduos sólidos

Uma vez que a hidrólise da palha de milho com $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ conduz fundamentalmente à hidrólise da hemicelulose, as alterações dos rendimentos em sólidos obtidos (quantificados pela perda de peso seco) são úteis para monitorizar a evolução dos tratamentos.

Na Tabela 18 são apresentados os dados para a composição dos resíduos sólidos após o tratamento hidrotérmico da palha de milho em função da severidade. Para a condição de menor severidade, a solubilização do sólido foi baixa e a composição dos resíduos sólidos é similar à composição química da matéria-prima. No entanto, para o $\log R_0$ superior a 1,48 o rendimento em sólido vai sempre decrescendo com o aumento da severidade, chegando a uma solubilização máxima de 50%. Esta diminuição de massa pode ser correlacionada principalmente com a solubilização das hemiceluloses. Como se pode observar, a percentagem de arabinoxilana no sólido diminui com o aumento da severidade, não sendo detetada para as temperaturas mais elevadas testadas. Na verdade, o rendimento em sólido mais baixo nem são obtidos para as temperaturas mais elevadas, fato que não aconteceu no caso dos processos hidrotérmicos, podendo estar relacionado com possíveis reações de precipitação do complexo de ferro, anteriormente referido.

Tabela 18 - Composição polimérica dos resíduos sólidos tratados após hidrólise com $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$

(%)	Fator de severidade, $\log R_0$									
	1,04 (130)	1,48 (140)	1,79 (150)	2,09 (160)	2,47 (170)	2,77 (180)	3,05 (190)	3,40 (200)	3,70 (210)	3,98 (220)
Rend. sólido^a	81,8	80,8	69,1	57,8	50,0	52,8	57,9	56,0	55,0	54,4
Xilanas^b	21,2	20,8	20,95	20,26	18,09	10,91	7,15	4,78	0,00	0,00
Arabinanas^b	3,14	3,24	2,66	2,52	2,35	2,12	1,04	0,00	0,00	0,00
Glucanas^b	39,3	39,9	43,9	52,4	59,1	59,5	55,5	55,8	46,8	58,4
Lenhina	18,2	18,5	19,2	20,3	22,0	24,1	24,1	27,1	30,1	33,2
Klason^b										

^a (g/g de matéria-prima); ^b (g/100g de resíduos sólidos tratados); Valores entre parêntesis indicam a temperatura da reação

Tal como referido anteriormente, a solubilização máxima das glucanas foi de 26% e não sendo essa solubilização significativa, a percentagem de glucanas no resíduo sólido, após tratamento, aumentou até atingir um valor máximo de 59,5%.

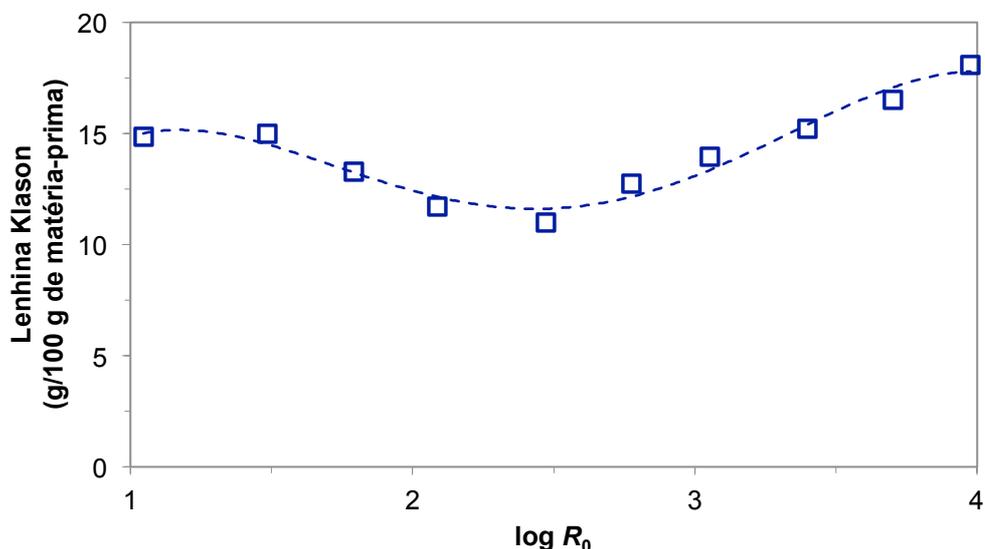


Figura 22 – Recuperação da lenhina Klason em função do fator de severidade após o tratamento com $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$

O efeito dos tratamentos com sais na lenhina Klason recuperada é demonstrado na Figura 22. Neste tipo de tratamentos podemos observar que para além de hidrolisar a hemicelulose, a lenhina é mais afetada do que se verificou no caso dos processos hidrotérmicos. A recuperação mínima de lenhina (11,11 g/100 g matéria-prima) foi obtida para a severidade de 2,47 e corresponde a uma solubilização máxima de 34,21%. Nas condições mais severas, e tal como se verificou nos casos anteriores, assistiu-se a um aumento aparente da lenhina recuperada que pode estar relacionado com reações de condensação como já referido anteriormente.

3.2.3. Deslenhificação *organosolv*

Nos resíduos sólidos resultantes dos diferentes processamentos hidrotérmicos (nas condições correspondente à recuperação máxima de pentoses) foi estudada a deslenhificação com solventes orgânicos, utilizando as condições operacionais previamente estudadas para a palha de arroz (Lino, 2012). Além da possibilidade de

recuperação das lenhinas na fração líquida, os sólidos, após deslenhificação, deverão permitir obter um aumento da recuperação de glucanas, passíveis de serem ainda valorizadas.

Na Tabela 19 estão apresentados os valores da composição química polimérica da matéria-prima, dos sólidos pré-tratados em diferentes condições e das amostras deslenhificadas. Tal como se pode observar, o tratamento de deslenhificação, com uma mistura de etanol/água 60,5% à temperatura de 30°C conduziu, em todos os casos, a uma redução significativa do teor de lenhina. A remoção de lenhina mais elevada foi obtida no tratamento da auto-hidrólise. Nos sólidos deslenhificados obteve-se também um aumento do teor de glucanas, sendo o valor mais elevado 67,59%, obtido para a deslenhificação do sólido resultante do tratamento de auto-hidrólise. Na Figura 23 são apresentados os rendimentos de deslenhificação e as respetivas recuperações de polissacarídeos obtidos após deslenhificação. Pode verificar-se que a deslenhificação foi muito seletiva, ou seja, os polissacarídeos foram pouco afetados, uma vez que se obtiveram recuperações de glucanas e xilanas superiores a 96% e 85%, respetivamente. O valor da recuperação de glucanas é inclusivamente superior aos obtidos noutros trabalhos assim como rendimento máximo de deslenhificação (Lino, 2012; Serralheiro, 2013) para outro tipo de matéria-prima, indicando assim que a palha de milho e o conjunto de processos de fracionamento utilizados têm elevado potencial.

Tabela 19 - Composição química dos resíduos sólidos após tratamentos hidrotérmicos, sem adição do CO₂ (auto-hidrólise) e com diferentes pressões iniciais de CO₂ (400 e 600 Psi), e após deslenhificação

Matéria-prima		log R ₀ = 3,86 (AH)		log R ₀ = 3,42 (CO ₂ = 400 Psi)		log R ₀ = 3,43 (CO ₂ = 600 Psi)	
		ND	D	ND	D	ND	D
Glucanas	40,00	59,30	67,59	56,40	63,79	54,58	64,86
Xilanas	18,87	7,74	7,45	11,30	11,72	14,07	16,34
Arabinanas	3,47	1,73	0,00	1,36	0,00	2,19	0,00
Grupos acetilo	3,96	1,63	1,16	2,46	2,58	3,51	2,70
Lenhina Klason	16,74	28,80	6,39	25,50	8,31	23,68	9,00

ND – não deslenhificado; D – Deslenhificado; valores entre parêntesis indicam o tipo de tratamento

O fato de ser possível separar, com rendimento elevado, cada uma destas frações, poderá assim contribuir significativamente para o aproveitamento e valorização deste material.

Será de referir que a deslenhificação com solventes orgânicos é habitualmente realizada a temperaturas elevadas (da ordem dos 200°C) (Romaní *et al.*, 2011; Huijgen *et al.*, 2012). No entanto, o fato da palha de milho ter sido sujeita a pré-tratamentos hidrotérmicos, pode facilitar o processo de deslenhificação. Refira-se que as condições utilizadas neste trabalho baseiam-se em estudos anteriores de deslenhificação da palha de arroz por processos *organosolv*, que demonstram que é possível obter uma deslenhificação significativa, a temperaturas próximas da temperatura ambiente (30°C), o que é uma vantagem em termos energéticos e dos custos de equipamento.

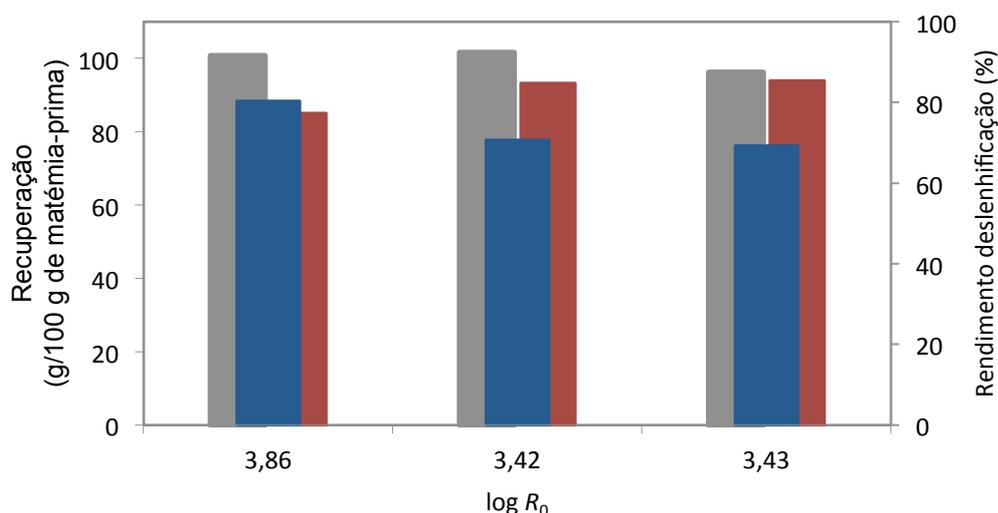


Figura 23 – Recuperação dos polissacarídeos após deslenhificação dos resíduos sólidos por auto-hidrólise (AH) e tratamentos hidrotérmicos com diferentes pressões iniciais de CO₂ (400 Psi e 600 Psi) nas condições de severidade correspondentes à recuperação máxima de pentoses. Glucanas (■), xilanas (■) e rendimento da deslenhificação (■)

Interessa que o teor de polissacarídeos seja pouco afetado pelo método da deslenhificação, para que os resíduos obtidos possam ainda ser utilizados para outras aplicações. Assim sendo, o processo utilizado tem vantagens, pois mostra ser bastante seletivo para as lenhinas, e contrariamente a outros processos utilizados, como por exemplo o processo Kraft, praticamente não afeta os polissacarídeos.

3.2.4. Hidrólise enzimática

Os tratamentos hidrotérmicos discutidos anteriormente levam a uma hidrólise significativa da hemicelulose, permitindo obter resíduos sólidos ricos em celulose e lenhina, enquanto que a deslenhificação *organosolv* permite a obtenção de resíduos sólidos ricos em celulose, e que podem ser utilizadas para outras aplicações. Uma das possibilidades de utilização da celulose consiste na sua sacarificação enzimática para a obtenção de hidrolisados ricos em glicose que podem ser utilizados em vários processos sendo o mais usual a produção de etanol.

Assim, de forma a estudar o efeito dos tratamentos hidrotérmicos na digestibilidade da celulose, foi realizada a hidrólise enzimática dos resíduos sólidos obtidos nas condições consideradas ótimas para a recuperação de pentoses, de cada tratamento acima discutido. Na Tabela 20 são apresentados os resultados dos rendimentos da hidrólise enzimática dos diferentes sólidos antes e após deslenhificação. O valor mais elevado, 83,31%, foi obtido para o sólido resultante da auto-hidrólise (não-deslenhificado). Este resultado, é relativamente surpreendente, pois é habitualmente referido que a presença de lenhina pode impedir a hidrólise enzimática (Silva-Fernandes *et al.*, 2013). Esta tendência para se obter um menor rendimento de sacarificação para as amostras resultantes do tratamento hidrotérmico catalisado com CO₂ pode estar também relacionada com a presença de uma maior percentagem de hemicelulose, comparativamente à auto-hidrólise. No entanto, é também de referir que as amostras deslenhificadas têm uma percentagem superior de glucanas (Tabela 20), e uma vez que a dose de enzima foi normalizada à quantidade de biomassa e não ao teor de glucanas, pode acontecer que essa dose seja ligeiramente mais baixa que a necessária para atingir uma sacarificação eficiente.

Tabela 20 – Rendimentos de sacarificação obtidos após hidrólise enzimática dos resíduos sólidos obtidos nas condições ótimas antes (não-deslenhificados) e após deslenhificação (deslenhificados)

Condição	% Sacarificação	
	Não - Deslenhificados	Deslenhificados
log $R_0 = 3,86$ (215°C)	83,31	65,29
log $R_0 = 2,42$ (210°C, 400 Psi)	^a	51,04
log $R_0 = 2,43$ (210°C, 600 Psi)	66,44	42,83

^a – dados não disponíveis

Os rendimentos de sacarificação comparam favoravelmente com outros valores da literatura, por exemplo, obtidos após tratamento hidrotérmico de resíduos de eucalipto (79%) e bagaço de azeitona extratado (83%) (Silva-Fernandes *et al.*, 2013; Fernandes *et al.*, 2012)

3.3. Crescimento da levedura *Debaryomyces hansenii* em hidrolisado

Todos os processos de fracionamento da hemicelulose estudados tiveram como principal objetivo obter hidrolisados adequados para bioconversões. Tendo em conta que os hidrolisados obtidos a partir da hidrólise com sais inorgânicos foram aqueles que em que se obteve a concentração mais elevada de açúcares livres (Tabela 17), foram estas as condições selecionadas para a produção de hidrolisado a ser utilizado como meio para o crescimento da levedura *Debaryomyces hansenii* CCMI 941. Para tal, efetuou-se um ensaio de comparação dos perfis de crescimento e de consumo de açúcares da levedura *D. hansenii* em hidrolisado suplementado com vitaminas, microelementos, magnésio e fontes de azoto e fósforo (TEVM) e em hidrolisado suplementado apenas com vitaminas e sais. A justificação da não-suplementação com azoto e fósforo tem a ver com o fato do hidrolisado já conter nitratos e também ter sido adicionado fosfato para correção de pH até 5,5. Os respetivos perfis de crescimento estão apresentados na Figura 24.

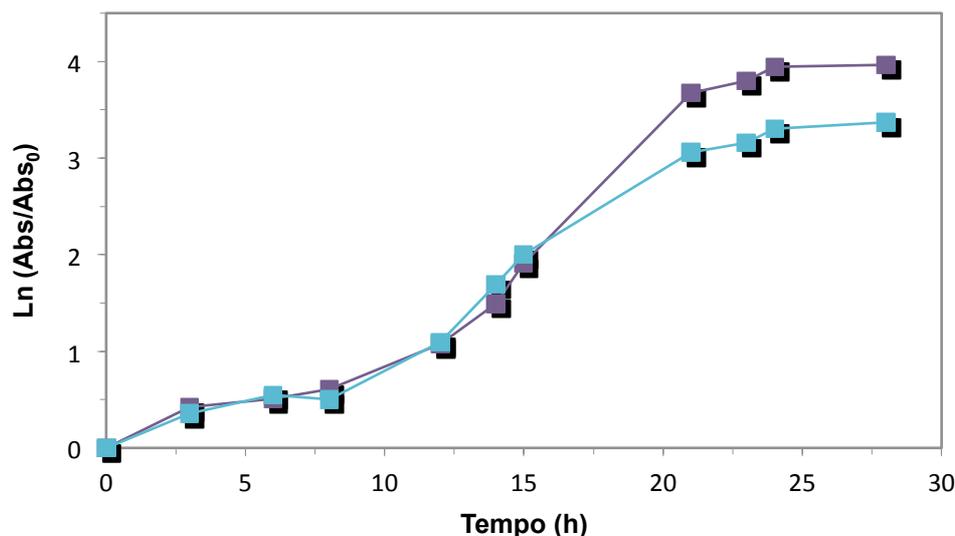


Figura 24 – Perfis de crescimento da levedura *D. hansenii* em hidrolisado resultante da condição otimizada na hidrólise com $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ e suplementado com *trace elements, vitamins and minerals* (TEVM) (■) e com sais e vitaminas (■)

Comparando os perfis de crescimento da levedura nestes dois meios verifica-se que ambos apresentam uma fase de latência semelhante.

Estes resultados podem ser justificados pelo fato de ser atribuído a esta espécie a não utilização de nitratos. Assim, como os suplementos do TEVM contêm outra fonte de azoto, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, este deverá contribuir para um crescimento mais eficiente. No entanto, neste último a taxa específica de crescimento foi mais elevada assim como a produtividade celular (cerca de duas vezes superior). Na Tabela 21 são apresentados os parâmetros cinéticos e estequiométricos obtidos nas diferentes condições de crescimento.

Tabela 21 – Parâmetros cinéticos e estequiométricos para a levedura *D. hansenii* cultivada em hidrolisado com microelementos, vitaminas, magnésio, fontes de azoto e fósforo (TEVM) e em hidrolisado com sais e vitaminas

Suplementação	$\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1})	Q_x ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)	$Y_{x/s}$ ($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
TEVM	0,27	0,31	0,30
Vitaminas e sais	0,21	0,14	0,20

μ – taxa específica de crescimento; Q_x – produtividade celular; $Y_{x/s}$ – rendimento em biomassa (calculado com base nos açúcares consumidos);

A produtividade celular assim como o rendimento em biomassa mais elevado foram obtidos no hidrolisado suplementado com TEVM (Figura 25). Os perfis de consumo de açúcares e dos compostos inibidores presentes nos hidrolisados ajudam na clarificação do metabolismo da levedura. Como se pode observar, após um consumo inicial de glucose, de xilose e glicerol, observa-se a paragem da assimilação destes açúcares em consequência do consumo de furfural que não é assimilado a biomassa, razão pela qual se observa uma fase estacionária (fase sem crescimento) entre as 3 h e as 7 h, altura em que todo o furfural é consumido. Inicia-se então o consumo de HMF, que limita a assimilação de glucose mas não a impede, ao contrário do que ocorre para a xilose e para o glicerol. Este consumo simultâneo de HMF e glucose permite então o consumo de biomassa que atinge taxas de crescimento bastante significativas. Nesta fase (a partir das 15 h), observa-se que a cultura crescida no meio suplementado com TEVM apresenta uma taxa de crescimento superior, consequência de uma taxa de assimilação de xilose e glicerol também superior. Para esta situação, também contribuirá a presença de outra fonte de azoto, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, este deverá contribuir para um crescimento mais eficiente uma vez que será uma fonte de azoto mais facilmente assimilável.

Todas estas razões justificam um maior rendimento encontrado na presença de TEVM $0,30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{h}^{-1}$ contra $0,14 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{h}^{-1}$ (Tabela 21). No entanto, os valores obtidos para o rendimento em biomassa calculados foram inferiores aos valores já descritos na literatura para esta levedura em meio quimicamente definido ($0,53\text{-}0,58 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$) (Nobre *et al.*, 2002), ainda assim bastante satisfatórios. Refira-se que neste caso se utilizou como inóculo culturas *stock* armazenadas em glicerol (15%), enquanto a utilização de pré-inóculos crescidos em hidrolisados parece permitir a obtenção de rendimentos mais elevados (Carvalho *et al.*, 2004), nomeadamente permitir a aclimatização das células. As taxas específicas de crescimento foram semelhantes mas ligeiramente superiores no meio de hidrolisado suplementado com TEVM, sendo os valores concordantes com os encontrados na literatura (Carvalho *et al.*, 2006). Todos os açúcares são consumidos ao fim de 28 h. Na Figura 25 são apresentados os perfis de consumo de açúcares nos hidrolisados com diferentes suplementações.

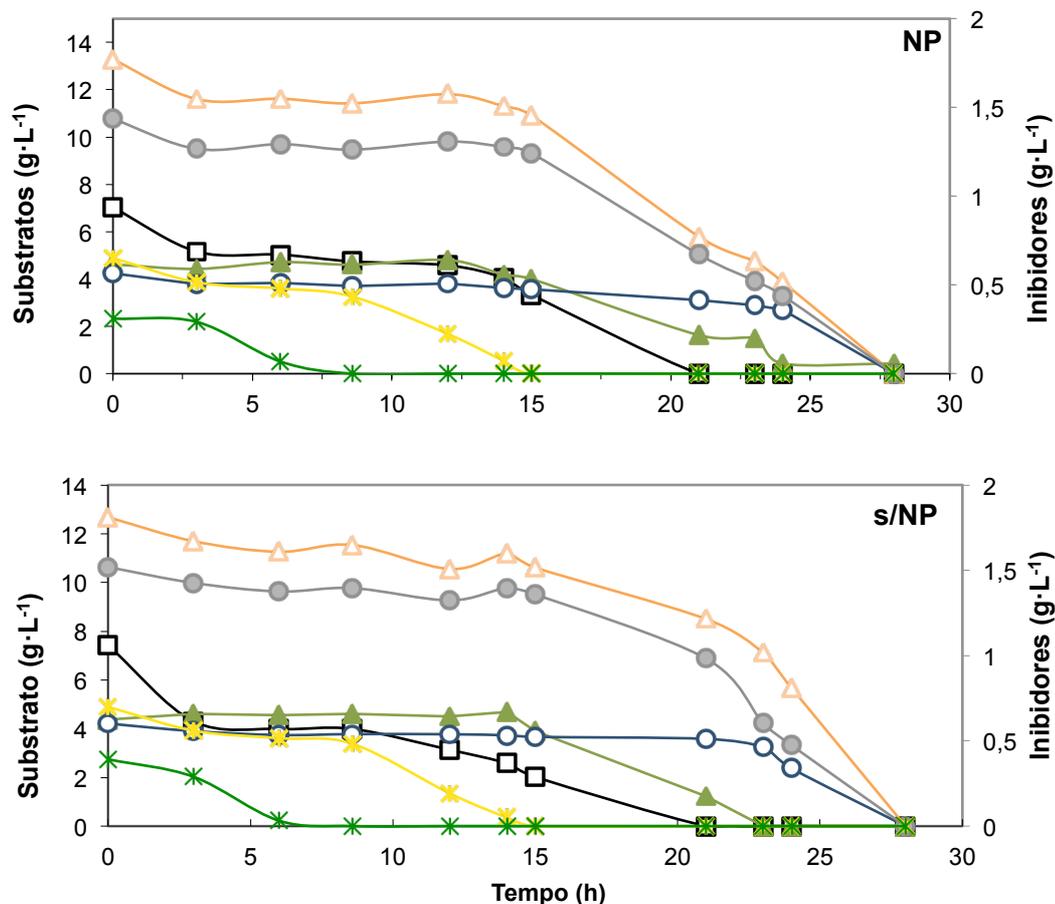


Figura 25 – Perfis de consumo de xilose (\triangle), glucose (\square), arabinose (\circ), ácido acético (\blacktriangle), glicerol (\bullet), HMF ($*$) e furfural ($*$) da levedura *D. hansenii* em hidrolisado suplementado com trace elements, vitamins and minerals TEVM (A) e vitaminas e sais (B)

O perfil de assimilação de açúcares, em ambos os casos, caracteriza-se pelo consumo em simultâneo da glucose e da xilose. Também o furfural (em primeiro lugar) e o HMF são consumidos durante o período de consumo da glucose. Após o esgotamento da glucose inicia-se o consumo do ácido acético. O consumo da arabinose só tem início quando os valores de xilose atingem os valores de $4,75 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ para o hidrolisado suplementado com TEVM e $7,11 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ para o hidrolisado suplementado com sais e vitaminas. Este perfil, relativamente ao consumo de açúcares é concordante com trabalhos anteriores utilizando esta levedura e outros hidrolisados (Carvalho *et al.*, 2004; Silva-Fernandes *et al.*, 2008; Duarte *et al.*, 2004). O tempo para que ocorra um consumo total de açúcares é semelhante para ambos os meios, sendo completamente consumidos às 28 h. No entanto para o

hidrolisado contendo TEVM as taxas de consumo global (Q_s) são ligeiramente superiores que as obtidas para o hidrolisado suplementado com vitaminas e sais (8,61 e 8,29 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, respetivamente).

Para além da biomassa, não foi detetada a acumulação significativa de quaisquer produtos metabólicos.

Tendo em conta os melhores resultados alcançados no hidrolisado suplementado com TEVM, foi este o meio utilizado para o crescimento celular e produção de inóculo nos ensaios seguintes.

3.4. Efeito da destoxificação na composição química do hidrolisado

Como descrito anteriormente, a eficiente produção de xilitol por leveduras necessita de elevadas concentrações iniciais de xilose. Para se obter essas concentrações, podem-se utilizar diversos processos, que podem levar também à concentração de inibidores do metabolismo das leveduras. No entanto, a concentração máxima permitida para cada um dos compostos potencialmente inibidores num hidrolisado não pode ser estabelecida *a priori*, pois depende de muitos fatores, tais como a estirpe de microrganismo, a presença simultânea de outros inibidores (que podem induzir efeitos sinérgicos), a suplementação, o pH e/ou a disponibilidade de oxigénio imposta.

No sentido de reduzir a inibição do crescimento microbiano em hidrolisados, existem várias abordagens possíveis para minimizar os efeitos dos inibidores, nomeadamente a utilização de condições de hidrólise em que a sua formação seja evitada, proceder à sua remoção antes da fermentação (destoxificação) e promover a aclimatização dos microrganismos aos hidrolisados. Em geral, o processo de destoxificação, quer pela inevitabilidade da formação de inibidores, quer pela seletividade na remoção dos mesmos, é o processo mais utilizado.

O hidrolisado da palha de milho obtido na condição otimizada (190°C, 45mM $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$, com um fator de severidade de 3,05) foi submetido a diferentes tratamentos de destoxificação, nomeadamente a correção de pH para 5,5 (pH de cultivo) e adsorção e correção de pH com carvão ativado alcalino. Ambos os tratamentos foram seguidos de um passo de concentração por evaporação (duas vezes em massa) que para além de permitir aumentar a concentração de monossacarídeos, pode também ser utilizado como método de destoxificação tendo em conta a volatilidade de alguns inibidores presentes. Na Tabela 22

são apresentados os resultados do impacto da destoxificação e concentração dos hidrolisados na remoção de compostos inibidores e também dos açúcares obtidos.

Tabela 22 – Compostos inibidores e monossacarídeos remanescentes no hidrolisado após os vários tratamentos de destoxificação utilizados

Método	Composição do hidrolisado ^a					
	Glc	Xyl	Ara	Ác. Acético	HMF	Furfural
Concentração ¹	90	94	95	42	89	0
Concentração, pH 5,5 ¹	84	86	86	40	87	0
Carvão ativado ²	83	94	92	62	75	64
Carvão ativado, concentração ²	77	85	66	41	69	0

^a os resultados estão apresentados sob forma de percentagem (da quantidade inicial) dos compostos que permanecem nos hidrolisados após os tratamentos; ¹ não-destoxificados; ² Destoxificados

A partir da tabela 22 pode observar-se que o furfural é o composto mais afetado pelo processo de concentração, ou seja, a concentração do hidrolisado permite remover a totalidade do furfural, obtendo-se para o processo de destoxificação com carvão ativado uma remoção de 36%. Outros autores descreveram também percentagens de remoção de furfural elevadas, usando o método de concentração (Larsson *et al.*, 1999; Lopes, 2001). O HMF é moderadamente afetado por todos os processos testados, sendo que a sua redução mais substancial foi obtida quando o hidrolisado foi destoxificado com carvão ativado e concentrado. O ácido acético presente nos hidrolisados foi também removido de forma relativamente eficiente, tratando-se de um composto volátil, embora menos volátil do que o furfural, a concentração do hidrolisado por si só permitiu uma redução importante deste composto (58%). Refira-se que apesar de volátil, o ácido acético é um dos compostos tóxicos mais difíceis de remover dos hidrolisados, pelo que os resultados obtidos foram muito satisfatórios. Este método já tinha sido descrito para a remoção deste tipo de compostos (Carvalho *et al.*, 2005). Quando se compara a destoxificação com carvão ativado com a concentração do hidrolisado verifica-se que a destoxificação com o carvão por si só, não é tão eficiente para a remoção de ácido acético e furfural como a concentração. Quanto aos compostos fenólicos observou se um aumento de concentração destes tal como descrito na literatura anteriormente. No entanto a utilização do carvão ativado permitiu obter uma remoção de cerca de 95% dos compostos fenólicos presentes, o

que é uma das vantagens do carvão ativado por agentes alcalinos em vez do carvão ativado em meio ácido (Duarte *et al.*, 2012).

Para além dos efeitos benéficos da utilização de métodos de destoxificação em hidrolisados, é importante salientar ainda os efeitos negativos, nomeadamente a perda de açúcares, que estes métodos por vezes acarretam. Como se pode observar na Tabela 22, todos os métodos utilizados levaram de alguma forma a perdas de açúcares nos hidrolisados. O método de destoxificação com carvão ativado com NaOH foi o que conduziu a uma maior perda de monossacarídeos. A perda de açúcares pelo processo de destoxificação com carvão ativado com NaOH já foi observada noutros hidrolisados (Salgado *et al.*, 2012). Este resultado pode ser atribuído ao fato dos iões hidroxilo na superfície do carvão serem capazes de ionizar e capturar monossacarídeos neutros. O método do carvão ativado com NaOH apresenta como vantagem a capacidade de destoxificar e acertar o pH para valores adequados para a conversão num só passo, constituindo uma vantagem económica comparativamente ao Na₂HPO₄, tendo que o custo do fosfato de sódio ultrapassa os custos do carvão em dobro.

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

3.5. Efeito da destoxificação e suplementação na produção de xilitol

Na sequência do estudo da destoxificação, seleccionou-se o hidrolisado concentrado e o hidrolisado destoxificado e concentrado para a preparação de meios de cultura para a produção de xilitol. A composição química desses hidrolisados é apresentada na Tabela 23.

Como já vimos anteriormente, a suplementação desempenha um papel importante na produção de xilitol, pelo que neste trabalho testou-se o efeito de TEVM, que como verificamos anteriormente apresenta bons resultados, e do CSL (*corn steep liquor*). A utilização do CSL justifica-se pelo facto de ser um suplemento barato e com o qual já foi demonstrado um impacto positivo sobre a produção de xilitol noutros hidrolisados (Morais, 2012).

Tabela 23 – Composição dos hidrolisados ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) utilizados nos ensaios de bioconversão

	Concentrado	Destoxificado e Concentrado
Glucose	8,31	7,68
Xilose	21,25	21,13
Arabinose	6,96	5,39
Ácido Acético	4,43	4,66
HMF	1,38	1,10
Furfural	0,00	0,00
Fenólicos	6,60	0,18

A Figura 26 e a Tabela 23 apresentam respectivamente os perfis de fermentação e os valores dos principais parâmetros cinéticos e estequiométricos obtidos para a produção de xilitol nos meios preparados com hidrolisado não destoxificado suplementado com CSL (A), ou TEVM (B) e para o meio preparado com hidrolisado destoxificado suplementado com TEVM (C).

Pela Figura 26 pode observar-se a ausência da fase de latência em todos os ensaios. Isto deve-se ao fato de terem sido utilizados inóculos cultivados no hidrolisado e portanto já adaptados aos inibidores presentes. É ainda importante referir que, quer a concentração quer a destoxificação permitiram a remoção de furfural que é o principal composto responsável pela difícil adaptação dos microrganismos ao meio.

Para todos os ensaios a glucose e a xilose foram consumidas em simultâneo nas primeiras 24 h. A xilose apresenta taxas de consumo diferenciadas entre os diferentes ensaios realizados, sendo maior para o ensaio B, tendo sido no entanto consumida na sua totalidade ao fim de 72 h para todos os ensaios. Quanto a arabinose, o seu consumo iniciou-se a partir das 5 h e ocorreu em paralelo com a xilose, mas a uma taxa muito menor.

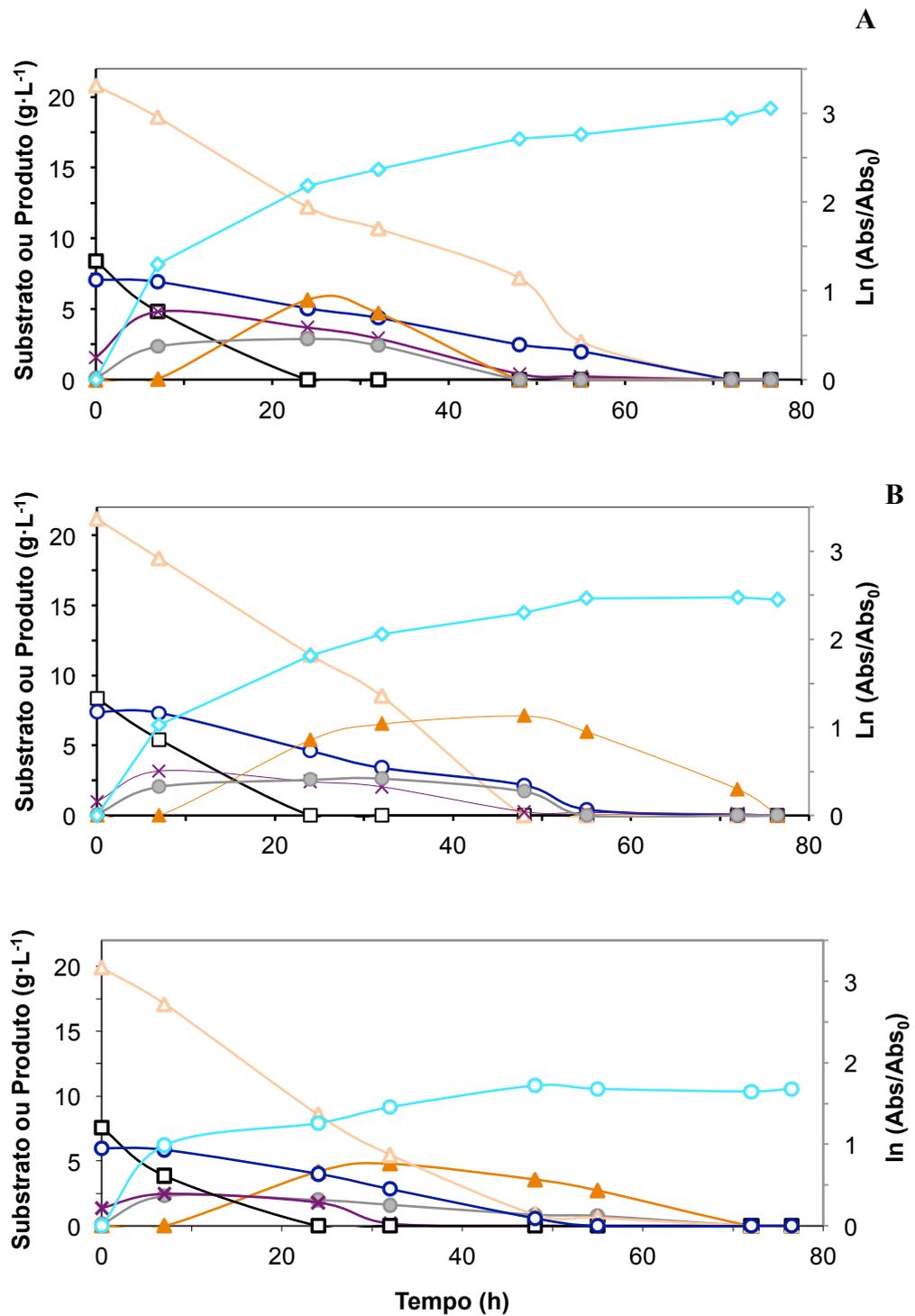


Figura 26 – Perfil de consumo de xilose (\triangle), arabinose (\circ) e glucose (\square), acumulação de xilitol (\blacktriangle), etanol (\times) e glicerol (\bullet) e de crescimento da levedura *D. hansenii* (\diamond), em hidrolisado concentrado não-detoxificado suplementado com CSL (A), TEVM (B), e detoxificado com TEVM (C)

Tabela 24 – Efeito da destoxificação e suplementação nos parâmetros cinéticos e estequiométricos do crescimento e produção de xilitol pela levedura *D. hansenii*

Ensaio	Q_x^a ($g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$)	Q_{xilose}^a ($g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$)	$Y_{x/s}^b$ ($g \cdot g^{-1}$)	$Q_{xilitol}^c$ ($g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$)	$Y_{xilitol}^c$ ($g \cdot g^{-1}$)	$[Xilitol]_{máx}$ ($g \cdot L^{-1}$)
A	0,72	0,36	0,32	0,24	0,47	4,72
B	0,76	0,44	0,32	0,20	0,52	7,09
C	0,70	0,41	0,35	0,15	0,33	4,78

Q_x - produtividade celular; Q_{xilose} - taxa volumétrica de consumo de xilose; $[Xilitol]_{máx}$ - concentração máxima de xilitol; $Q_{xilitol}$ - produtividade em xilitol; $Y_{xilitol}$ - rendimento em xilitol; ^a ao fim de 48 h; ^b ao fim de 72 h; ^c no máximo de xilitol

Quanto aos produtos metabólicos, o xilitol foi sempre, o principal produto obtido do metabolismo das pentoses. Foi também observada a produção de etanol e glicerol, mas estes produtos são essencialmente derivados do metabolismo da glucose, pois a sua produção atinge um pico cerca das 5 h de cultivo, quando o metabolismo desta hexose é mais relevante.

A concentração máxima de xilitol, $7,09 g \cdot L^{-1}$, foi observada ao fim de 48 h de cultivo para o ensaio B. No entanto, o maior valor de rendimento foi obtido às 32 h, tendo sido de $0,52 g \cdot g^{-1}$, o que implica que entre as 32 h e as 48 h de cultivo se possa obter um título maior de concentração de xilitol que não foi possível encontrar, para além de que poderá ter ocorrido o início do consumo de xilitol, dado que a xilose vê a sua concentração baixar para valores inferiores a $10 g \cdot L^{-1}$. Este consumo de xilitol é também visível no ensaio A e C. A tendência para esta levedura consumir xilitol quando as concentrações de xilose descem abaixo de um certo valor, havia já sido anteriormente observada (Carvalho *et al.*, 2007).

Dado que a suplementação TEVM foi a que apresentou melhores resultados, foi esta a suplementação selecionada para o ensaio com o meio preparado com hidrolisado destoxificado. Ao contrário do esperado a destoxificação não potenciou a produção de xilitol. Esta situação foi já descrita para outros hidrolisados, nomeadamente de sorgo (Torrado, 2010) e é de alguma forma justificado pela natureza do xilitol que é um metabolito produzido em consequência de uma desregulação redox da célula que ocorre em condições de limitação de oxigénio mas também é um metabolito produzido em condições de stress, nomeadamente stress químico. Assim, ao diminuirmos o stress químico pela destoxificação, este resultado é justificável.

Este é um resultado vantajoso, uma vez que a eliminação da etapa da destoxificação poder levar a uma redução significativa dos custos do processo.

Comparando os resultados obtidos com a literatura, pode afirmar-se que em termos de produtividade e rendimento em xilitol, os resultados aqui descritos encontram-se em linha com outras leveduras e hidrolisados. Por exemplo a produção de xilitol por *Candida parapsilosis* NRRL Y-2315 a partir de hidrolisado de palha de sorgo apresenta valores de $0,12 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{h}^{-1}$ e $0,27 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$, respetivamente para a produtividade e o rendimento (Sepúlveda-Huerta et al. 2006). Para hidrolisados derivados de subprodutos da oliveira, *Pachysolen tannophilus* em hidrolisado de caroços de azeitona (Cuevas et al., 2009) e *Candida tropicalis* em hidrolisado de podas de oliveira (Martín et al., 2010), apresentam um rendimento em xilitol muito inferior aos determinados neste estudo ($0,13 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$).

Os resultados obtidos resultantes à produção de xilitol estão ainda de acordo com trabalhos descritos para outros hidrolisados utilizando esta levedura (Duarte et al., 2004), mas ainda longe de outros resultados obtidos em hidrolisados mais concentrados (Carvalho et al., 2007). Assim, considera-se que estes resultados demonstram a potencialidade do hidrolisado obtido a partir da hidrólise da palha de milho com $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$, ser utilizado como meio de cultura adaptado para a produção de xilitol. No entanto, para uma produção mais eficiente, o hidrolisado deve ser mais concentrado e deverão ainda ser testados outros tipos de suplementos.

4. Conclusão e perspectivas

Os resultados obtidos demonstram que o processamento hidrotérmico da palha de milho conduz a uma hidrólise seletiva da hemicelulose sendo os xilo-oligossacarídeos A(XOS) os produtos principais.

A recuperação de pentoses é semelhante para todos os processos hidrotérmicos, contudo as concentrações relativas de A(XOS) variam ligeiramente dependendo da utilização ou não de CO₂, sendo que nos processos de auto-hidrólise, os valores obtidos são ligeiramente mais elevados.

O aumento da pressão inicial de CO₂ não conduziu a um aumento do rendimento em pentoses monoméricas e tem um efeito notório na menor formação de produtos de degradação, nomeadamente, furfural e HMF. Adicionalmente, um dos efeitos mais relevantes do uso de CO₂, é o seu aparente papel protetor dos oligossacarídeos, ou seja, impedindo a sua degradação para condições de severidade mais elevadas.

O tratamento com Fe(NO₃)₃ permitiu obter uma recuperação muito elevada de pentoses, quase exclusivamente na forma monomérica, com baixa formação de compostos potencialmente inibidores do metabolismo microbiano. As características da composição química destes hidrolisados sugerem a sua potencialidade para a formulação de meios de cultura para fermentação.

Este conjunto de resultados mostra também que mediante uma cuidadosa otimização das condições operacionais é possível fracionar seletivamente a hemicelulose, com uma recuperação elevada de pentoses, sem afetar negativamente a celulose e a lenhina, e o seu potencial de valorização.

Os hidrolisados resultantes do tratamento com Fe(NO₃)₃, sob condições otimizadas, constituem, após suplementação com TEVM, um meio adequado para o crescimento da levedura *D. hansenii*. Após concentração, estes hidrolisados, quando suplementados, sustentam também a produção de xilitol, tendo-se observado que a destoxificação não é necessária para que a fermentação ocorra de forma eficaz, o que se constitui mais uma vantagem técnico-económica.

A deslenhificação dos resíduos sólidos resultantes do processamento hidrotérmico, utilizando processos *organosolv* em condições suaves, ou seja, próximo da temperatura ambiente, conduziu a rendimentos de deslenhificação elevados, o que se constitui uma vantagem ambiental e económica muito relevante. Mais, o uso do etanol para a

deslenhificação torna-se vantajoso, pelo seu baixo custo e fácil recuperação, sendo ele próprio um produto das biorrefinarias. Para além disso, por não serem utilizados outros químicos para além da água e etanol, as lenhinas obtidas deverão apresentar elevada qualidade.

A sacarificação enzimática das amostras processadas pelos métodos hidrotérmicos, antes e após deslenhificação, mostrou que as amostras sujeitas apenas ao processo de auto-hidrólise são aquelas cujo rendimento de sacarificação é mais elevado, sendo que os valores encontrados podem potencialmente sustentar a obtenção de celulose para outras aplicações de forma económica.

Em suma, o conjunto de resultados obtidos demonstram que os métodos utilizados são adequados para a valorização integral da palha de milho podendo permitir a obtenção dos seguintes produtos: Xilo-oligossacarídeos, licores de pentoses, xilitol, lenhina solúvel e celulose/licores de glucose para outras aplicações.

Na sequência desta dissertação, como trabalhos futuros, propõe-se:

- Estudo do processo hidrotérmico na presença de concentrações mais elevadas de CO₂. Tendo em conta as especificações do equipamento utilizado, esse aumento poderá ser conseguido através da redução do volume de líquido do reator.

- Estudo da hidrólise com sais inorgânicos para diferentes concentrações de nitrato de ferro, por forma a tentar um aumento do rendimento em pentoses.

- Caracterização química da lenhina solúvel obtida nos ensaios de deslenhificação.

- Estudo da deslenhificação e hidrólise enzimática dos resíduos sólidos resultantes da hidrólise com sais.

- Otimização do processo de produção de xilitol através da utilização de hidrolisados mais concentrados, sendo de novo necessário estudar o efeito da destoxificação e/ou de outros suplementos.

Bibliografia

Abatzoglou, N., Chornet, E., Belkacemi, K. e Rp, O. 1992. Phenomenological kinetics of complex-systems - the development of a generalized severity parameter and its application to lignocellulosics fractionation. *Chemical Engineering Science* 47, 1109-1122.

Agbogbo, F. K. e Wenger, K. S. 2007. Production of ethanol from corn stover hemicellulose hydrolyzate using *Pichia stipitis*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 34, 723-727.

Agbor, V. B., Cicek, N., Sparling, R., Berlin, A. e Levin, D. B. 2011. Biomass pretreatment: fundamentals toward application. *Biotechnology Advances*, 29, 675-685.

Agronegócio, P. D. 2001. Disponível: <http://www.portaldoagronegocio.com.br/>. Data de acesso:15/11/2012].

Aguiar, C. M. 2010. *Hidrólise enzimática de resíduos lenhocelulósicos utilizando celulasas produzidas pelo fungo Aspergillus niger*. Tese de Mestrado, Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

Amaral-Collaço, M. T., GíRio, F. M., Peito, M. A. e Coughlan, M. P. 1989. *Utilization of the hemicellulosic fraction of agro-industrial residues by yeasts*, London, Elsevier Applied Science.

Anpromis. 2012. *RE: Associação nacional dos produtores de milho e sorgo*.

Biopol 2008. Analysis of broad scenarios concerning the implications of renewable policy, forestry policy and agricultural policy for biorefinery viability. Germany: Research institute Biopol.

Boussarsar, H., Roge, B. e Mathlouthi, M. 2009. Optimization of sugarcane bagasse conversion by hydrothermal treatment for the recovery of xylose. *Bioresouce Technology*, 100, 6537-6542.

Bozell, J. J. e Petersen, G. R. 2010. Technology development for the production of biobased products from biorefinery carbohydrates—the US Department of Energy’s “Top 10” revisited. *The Royal Society of Chemistry*.

Breuer, U. e Harms, H. 2006. *Debaryomyces hansenii* — an extremophilic yeast with biotechnological potential. *Yeast*, 23, 415-437.

Bridgeman, T. G., Darvell, L. I., Jones, J. M., Williams, P. T., Fahmi, R., Bridgwater, A. V., Barraclough, T., Shield, I., Yates, N., Thain, S. C. e Donnison, I. S. 2007. Influence of particle size on the analytical and chemical properties of two energy crops. *Fuel*, 86, 60-72.

Carvalho, F. 2005. *Obtenção, caracterização e aplicação biotecnológica de licores de oligossacáridos de dreche cerejeira*. Tese de Doutorado em Engenharia Agro-Industrial, Universidade Técnica de Lisboa.

Carvalho, F., Duarte, L., Lopes, S., Parajó, J., Pereira, H. e Gírio, F. 2006. Supplementation requirements of brewery's spent grain hydrolysate for biomass and xylitol production by *Debaryomyces hansenii* CCM1 941. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 33, 646-654.

Carvalho, F., Duarte, L. C. e Gírio, F. M. 2008. Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 67, 849-864.

Carvalho, F., Duarte, L. C., Lopes, S., Parajó, J. C., Pereira, H. e Gírio, F. M. 2005. Evaluation of the detoxification of brewery's spent grain hydrolysate for xylitol production by *Debaryomyces hansenii* CCM1 941. *Process Biochemistry*, 40, 1215-1223.

Carvalho, F., Duarte, L. C., Medeiros, R. e Gírio, F. M. 2007. Xylitol production by *Debaryomyces hansenii* in brewery spent grain dilute-acid hydrolysate: effect of supplementation. *Biotechnology Letters*, 29, 1887-1891.

Carvalho, F., Esteves, M. P., Parajó, J. C., Pereira, H. e Gírio, F. M. 2004. Production of oligosaccharides by autohydrolysis of brewery's spent grain. *Bioresource Technology*, 91, 93-100.

Carvalho, F., Silva-Fernandes, T., Duarte, L. C. e Gírio, F. M. 2009. Wheat Straw Autohydrolysis: Process Optimization and Products Characterization. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 153, 84-93.

Chu, D. Q., Zhang, J. e Bao, J. 2012. Simultaneous saccharification and ethanol fermentation of corn stover at high temperature and high solids loading by a thermotolerant strain *Saccharomyces cerevisiae* DQ1. *Bioenergy Research*, 5, 1020-1026.

Cruz, J. M., Domínguez, J. M., Domínguez, H. e Parajó, J. C. 2000. Preparation of fermentation media from agricultural wastes and their bioconversion to xylitol *Food biotechnology* 14, 79-97.

Cuevas, M., Sánchez, S., Bravo, V., Cruz, N. e García, J. F. 2009. Fermentation of enzymatic hydrolysates from olive stones by *Pachysolen tannophilus*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 84, 461-467.

De Vries, R. P. e Visser, J. 2001. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65, 497-522.

Domínguez, J. M., Cao, N., Gong, C. S. e Tsao, G. T. 1997. Dilute acid hemicellulose hydrolysates from corn cobs for xylitol production by yeast. *Bioresource Technology*, 61, 85-90.

Domínguez, J. M., Cruz, J. M., Roca, E., Domínguez, H. e Parajó, J. C. 1999. Xylitol production from wood hydrolyzate by entrapped *Debaryomyces hansenii* and *Candida guilliermondii* cells *Applied Biochemistry and Biotechnology* 81, 119-130.

Duarte, L., Carvalho, F., Lopes, S., Marques, S., Parajó, J. e Gírio, F. M. 2004. Comparison of two posthydrolysis processes of brewery's spent grain autohydrolysis liquor

to produce a pentose - containing culture medium. *Applied Biochemistry Biotechnology* 113-116, 1041-1048.

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

Duarte, L. C., Salgado, J. M., Torrado, I., Guerra, V., Ferreira, C., Fernandes, T., Branco, P. C., Carvalheiro, F. e Lourenço, P. 2012. *Método para o acondicionamento e destoxificação de hidrolisados ácidos de materiais vegetais*.

Egues, I., Sanchez, C., Mondragon, I. e Labidi, J. 2012. Antioxidant activity of phenolic compounds obtained by autohydrolysis of corn residues. *Industrial Crops and Products*, 36, 164-171.

Ek, M., Gellerstedt, G. e Henriksson, G. 2009. *Pulp and paper chemistry and technology, Vol 1: Wood chemistry and wood biotechnology*, Stockholm, Walter de Gruyter & Co.

Fengel, D. e Wegener, G. 1983. *Wood: chemistry, ultrastructure, reactions*, Berlin, Walter de Gruyter & Co.

Fernandes, M. C., Brás, T. S., Lourenço, P. M. L., Duarte, L. C., Carvalheiro, F., Bernardo, S. M. e Neves, L. A. The effect of autohydrolysis pretreatment on the production of second generation bioethanol from extrated olive pomace. 4th International Conference on Engineering for waste and Biomass Valorisation, 13-10-2012 2012 Porto, Portugal. pp. 1142-1147.

Fernando, S., Adhikari, S., Chandrapal, C. e Murali, N. 2006. Biorefineries: Current Status, Challenges, and Future Direction. *Energy & Fuels*, 20, 1727-1737.

Garrote, G. 2001. *Estudio del procesamiento hidrotérmico de materiales lignocelulósicos*. Tese de Doutoramento, Universidade de Vigo, Espanha.

Garrote, G., Domínguez, H. e Parajó, J. C. 2002. Autohydrolysis of corncob: study of non-isothermal operation for xylooligosaccharide production. *Journal of Food Engineering*, 52, 211-218.

Gírio, F. e Roseiro, J. 1993. Metabolismo da xilose e produção de xilitol por leveduras. *Boletim Biotecnologia*, 45, pp. 13-17.

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

Goldstein, I. S. 1982. Acid processes for cellulose hydrolysis and their mechanisms. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, 184, 55-76.

Guerra, V. 2011. *Optimização de pré-tratamento para a hidrólise selectiva da hemicelulose de bagaço de azeitona: estudo da bioconversão dos hidrolisados para a produção de xilitol*. Tese de Mestrado, Universidade Técnica de Lisboa.

Harmsen, P., Huijgen, W., Bermudez, L. e Bakker, R. 2010. Literature review of physical and chemical pretreatment processes for lignocellulosic biomass. *Report no. 1184*. Wageningen: Food & Biobased Research, Wageningen UR.

Hormeyer, H. F., Schwald, W., Bonn, G. e Bobleter, O. 1988. Hydrothermolysis of birch wood as pretreatment for enzymatic saccharification *Holzforschung*, 42, 95-98.

Huang, H.-J., Ramaswamy, S., Tschirner, U. W. e Ramarao, B. V. 2008. A review of separation technologies in current and future biorefineries. *Separation and Purification Technology*, 62, 1-21.

Huijgen, W. J. J., Smit, A. T., De Wild, P. J. e Den Uil, H. 2012. Fractionation of wheat straw by prehydrolysis, organosolv delignification and enzymatic hydrolysis for production of sugars and lignin. *Bioresource Technology*, 114, 389-398.

HyvöNen, L., Koivistoinen, P. e Voirol, F. 1982. Food technological evaluation of xylitol. *Advances Food Research* 28, 373-403.

Jeremy, C. S. 2009. *Overcoming Plant Recalcitrance* [Online]. Scientific Discovery through Advanced Computing. Disponível: <http://www.scidacreview.org/0905/html/biofuel.html>. Data de acesso:15/10/2013].

John R. Johnston 1994. *Molecular Genetics of Yeast*, USA, Oxford University Press.

Kamm, B. 2007. Production of platform chemicals and synthesis gas from biomass. *Angewandte Chemie International Edition*, 46, 5056-5058.

Kamm, B., Gruber, P. R. e Kamm, M. 2006. *Biorefineries – Industrial Processes and Products*, Germany, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

Kamm, B. e Kamm, M. 2004. Principles of biorefineries. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64, 137-145.

Kamm, B. e Kamm, M. 2007. Biorefineries – Multi Product Processes. *In: Ulber, R. e Sell, D. (eds.) White Biotechnology*. Springer Berlin Heidelberg.

Khanal, S. K. 2010. Bioenergy and biofuel from biowastes and biomass. *In: Khanal, S. K., Surampalli, R. Y., Zhang, T. C., Lamsal, B. P., Tyagi, R. D. e Kao, M. C. (eds.) Bioenergy and biofuel from biowastes and biomass*. Virginia, Estados Unidos da America: American Society of Civil Engineers.

Kiran, L. K., Chim, Y. C. e Lawrence, W. B. 2008. Flexible biorefinery for producing fermentation sugars, lignin and pulp from corn stover. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 35, 331-341.

Kubikova, J., Zemann, A., Krkoska, P. e Bobleter, O. 1996. Hydrothermal pretreatment of wheat straw for the production of pulp and paper *Tappi Journal*, 79, 163-169.

Kumakura, M. e Kaetsu, I. 1984. Pretreatment by radiation and acids of chaff and its effect on enzymatic hydrolysis of cellulose. *Agricultural Wastes*, 9, 279-287.

Kumar, R., Singh, S. e Singh, O. 2008. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 35, 377-391.

Larsson, S., Palmqvist, E., Hahn-Hägerdal, B., Tengborg, C., Stenberg, K., Zacchi, G. e Nilvebrant, N.-O. 1999. The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. *Enzyme and Microbial Technology*, 24, 151-159.

Lino, J. 2012. *Fracionamento Seletivo da Hemicelulose e Lenhina da Palha de Arroz* Projeto de Licenciatura, Universidade Nova de Lisboa.

Liu, L., Sun, J., Cai, C., Wang, S., Pei, H. e Zhang, J. 2009. Corn stover pretreatment by inorganic salts and its effects on hemicellulose and cellulose degradation. *Bioresource Technology*, 100, 5865-5871.

Lopes, S. 2001. Optimização do meio de cultivo para a produção de polióis pela levedura *Debayomyces hansenii* em hidrolisado hemicelulósico. Lisboa: Universidade Lusófona de humanidade e Tecnologia.

Marcotullio, G. e De Jong, W. 2011. Furfural formation from D-xylose: the use of different halides in dilute aqueous acidic solutions allows for exceptionally high yields. *Carbohydrate Research*, 346, 1291-1293.

Martín, G. J. F., Cuevas, M., Bravo, V. e Sánchez, S. 2010. Ethanol production from olive prunings by autohydrolysis and fermentation with *Candida tropicalis*. *Renewable Energy*, 35, 1602-1608.

Martínez, J. M., Granado, J. M., Montané, D., Salvadó, J. e Farriol, X. 1995. Fractionation of residual lignocellulosics by dilute-acid prehydrolysis and alkaline extraction: Application to almond shells. *Bioresource Technology*, 52, 59-67.

Mcwilliams, R. C. e Van Walsum, G. P. 2002. Comparison of Aspen Wood Hydrolysates Produced by Pretreatment with Liquid Hot Water and Carbonic Acid. In: Finkelstein, M., Mcmillan, J. e Davison, B. (eds.) *Biotechnology for Fuels and Chemicals*. Humana Press.

Miranda, I., Gominho, J., Mirra, I. e Pereira, H. 2012. Chemical characterization of barks from *Picea abies* and *Pinus sylvestris* after fractioning into different particle sizes. *Industrial Crops and Products*, 36, 395-400.

Moniz, P., Duarte, L. C., Lino, J., Roseiro, L. B., Pereira, H. e Carvalheiro, F. Rice straw organosolv delignification under mild conditions. 2-CIAB: 2nd IberoAmerican Congress on Biorefineries, 10-12 Abril, Jaén, Espanha 2013a. pp. 167-168.

Moniz, P., Gírio, F. M., Carvalheiro, F. e Pereira, H. Hydrothermal processing of corn residues: process optimisation and products characterisation. Proceedings of the 2nd Wood Nordic Biorefinery Conference, 2009 Helsingin, Finlândia. 89-95.

Moniz, P., Pereira, H., Quilhó, T. e Carvalheiro, F. 2013b. Characterisation and hydrothermal processing of corn straw towards the selective fractionation of hemicelluloses. *Industrial Crops and Products*, 50, 145-153.

Morais, A. R. 2012. *Otimização de meios de cultura para a produção de xilitol com base em hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de azeitona extratado*. Dissertação de Mestrado, Universidade Técnica de Lisboa.

Moura, P., Barata, R., Carvalheiro, F., Gírio, F. M., Loureiro-Dias, M. C. e Esteves, M. P. 2007. *In vitro* fermentation of xylo-oligosaccharides from corn cobs autohydrolysis by *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* strains. *Food Science and Technology* 40, 963-972.

Moure, A., Gullon, P., Domínguez, H. e Parajó, J. C. 2006. Advances in the manufacture, purification and applications of xylo-oligosaccharides as food additives and nutraceuticals. *Process Biochemistry*, 41, 1913-1923.

Mussatto, S. I. e Roberto, I. C. 2004. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review. *Bioresource Technology*, 93, 1-10.

Mustranta, A., Fagernas, L. e Viikari, L. 1995. Effects of lipases on birch extractives. *Tappi Journal*, 78, 140-146.

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

Nag, A. 2008. Biofuels refining and performance. *News & Information for Chemical Engineers*, 26, 1-312.

Naik, S. N., Goud, V. V., Rout, P. K. e Dalai, A. K. 2010. Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14, 578-597.

Narayanaswamy, N., Faik, A., Goetz, D. J. e Gu, T. 2011. Supercritical carbon dioxide pretreatment of corn stover and switchgrass for lignocellulosic ethanol production. *Bioresource Technology*, 102, 6995-7000.

Nguyen, Q. A. e Tucker, M. P. 2002. US Patent patent application 6423145.

Nobre, A., Duarte, L., Roseiro, J. e Gírio, F. 2002. A physiological and enzymatic study of *Debaryomyces hansenii* growth on xylose and oxygen-limited chemostats. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59, 509-516.

Öhgren, K., Bura, R., Saddler, J. e Zacchi, G. 2007. Effect of hemicellulose and lignin removal on enzymatic hydrolysis of steam pretreated corn stover. *Bioresource Technology*, 98, 2503-2510.

Overend, R. P., Chornet, E. e Gascoigne, J. A. 1987. Fractionation of lignocellulosics by steam-aqueous pretreatments. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series A-Mathematical Physical and Engineering Sciences*, 321, 523-536.

Palmqvist, E. e Hahn-Hagerdal, B. 2000. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. *Bioresource Technology*, 74, 17-24.

Parajó, J. C., Domínguez, H. e Domínguez, J. M. 1997. Xylitol production from Eucalyptus wood hydrolysates extracted with organic solvents. *Process Biochemistry*, 32, 599-604.

Parajó, J. C., Domínguez, H. e Domínguez, J. M. 1998a. Biotechnological production of xylitol. Part 1: Interest of xylitol and fundamentals of its biosynthesis. *Bioresource Technology*, 65, 191-201.

Parajó, J. C., Domínguez, H. e Domínguez, J. M. 1998b. Biotechnological production of xylitol. Part 2: Operation in culture media made with commercial sugars. *Bioresource Technology*, 65, 203-212.

Parajó, J. C., Domínguez, H. e Domínguez, J. M. 1998c. Biotechnological production of xylitol. Part 3: Operation in culture media made from lignocellulose hydrolysates. *Bioresource Technology*, 66, 25-40.

Peito, M. 1992. *Isolamento, selecção e caracterização de leveduras que utilizam a D-xilose* Tese de Doutoramento, Universidade de Lisboa.

Pereira, H., Graça, J. e 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. ed. Oxford: Blackwell Publishing.

Peters, D. 2007. White biotechnology. In: Scheper, T., Belkin, S., Doran, P. M., Endo, I., Gu, M. B., Hu, W. S., Mattiasson, B., Nielsen, J., Stephanopoulos, G. N., Ulber, R., Zeng, A. P. e Zhong, J. J., Zhou, W. (eds.) *Advances in biochemical engineering/biotechnology*. Estados Unidos da America: Springer.

Philipp, P. e D'almeida, M. L. O. 1988. Celulose e Papel - Tecnologia de fabricação de pasta celulósica. São Paulo: SENAI.

Pordesimo, L. O., Edens, W. C. e Sokhansanj, S. 2004. Distribution of aboveground biomass in corn stover. *Biomass and Bioenergy*, 26, 337-343.

Preziosi-Belloy, L., Nolleau, V. e Navarro, J. 2000. Xylitol production from aspenwood hemicellulose hydrolysate by *Candida guilliermondii*. *Biotechnology Letters* 22, 239-243.

Prior, B. A., Kilian, S. G. e Du Preez, J. C. 1989. Fermentation of *D*-xylose by the yeasts *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*: prospects and problems. *Process biochemistry*, 24, 21-32.

Ragauskas, A. J., Williams, C. K., Davison, B. H., Britovsek, G., Cairney, J., Eckert, C. A., Frederick, W. J., Hallett, J. P., Leak, D. J., Liotta, C. L., Mielenz, J. R., Murphy, R., Templer, R. e Tschaplinski, T. 2006. The Path Forward for Biofuels and Biomaterials. *Science*, 311, 484-489.

Ramos, L. P. 2003. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. *Química Nova*, 26, 863-871.

Roberto, I., Mancilha, I., Souza, C., Felipe, M., Sato, S. e Castro, H. 1994. Evaluation of rice straw hemicellulose hydrolysate in the production of xylitol by *Candida guilliermondii* *Biotechnology Letters* 16, 1211-1216.

Roberto, I. C., Sato, S. e Mancilha, I. M. 1996. Effect of inoculum level on xylitol production from rice straw hemicellulose hydrolysate by *Candida guilliermondii*. *Journal of Industrial Microbiology*, 16, 348-350.

Romaní, A., Garrote, G., López, F. e Parajó, J. C. 2011. Eucalyptus globulus wood fractionation by autohydrolysis and organosolv delignification. *Bioresource Technology*, 102, 5896-5904.

Salanti, A., Zoia, L., Orlandi, M., Zanini, F. e Elegir, G. 2010. Structural characterization and antioxidant activity evaluation of lignins from rice husk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 10049-10055.

Salgado, J. M., Ferreira, C., Guerra, V., Torrado, I., Fernandes, T., Branco, P. C., Lourenço, P., Carvalheiro, F., Domínguez J. M. e Duarte, L. C. Simple one stage detoxification procedure using alkaly activated charcoal. 1st Iberoamerican Congress on Biorefineries, 2012 Los Cabos, Baja California, México.

Sampaio, F. C., Torre, P., Passos, F. M. L., Perego, P., Passos, F. J. V. e Converti, A. 2004. Xylose metabolism in *Debaryomyces hansenii* UFV-170. Effect of the specific oxygen uptake rate. *Biotechnology Progress*, 20, 1641-1650.

Schell, D., Farmer, J., Newman, M. e Mcmillan, J. 2003. Dilute-Sulfuric Acid Pretreatment of Corn Stover in Pilot-Scale Reactor. In: Davison, B., Lee, J., Finkelstein, M. e Mcmillan, J. (eds.) *Biotechnology for Fuels and Chemicals*. Humana Press.

Selig, M., Weiss, N. e Ji, Y. 2008a. Enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass *Laboratory analytical procedure (LAP)*.

Selig, M., Weiss, N. e Ji, Y. 2008b. Enzymatic Saccharification of Lignocellulosic Biomass *Laboratory Analytical Procedure (LAP)* National Renewable Energy Laboratory.

Serralheiro, C. 2013. *Estudo do processo de deslenhificação e recuperação da lenhina em palha de arroz*. Projeto de licenciatura, Universidade Nova de Lisboa.

Siadeb. 2013. *Sociedade Ibero-Americana para o desenvolvimento das biorrefinarias* [Online]. Disponível: <http://www.siadeb.org/>. Data de acesso:25/1/2013].

Silva-Fernandes, T., Carvalheiro, F., Duarte, L. C., Marques, S., Fonseca, C. e Gírio, F. Upgrading eucalyptus residues for sugar-based biorefineries: Integration of hydrothermal pre-treatment and enzymatic hydrolysis. XXII TECNICELPA - Conferência Internacional da Floresta, Pasta e Papel, 2-4 Outubro 2013 2013 Tomar. pp. 1-8.

Silva-Fernandes, T., Duarte, L. C., Almeida, S., Carvalheiro, F., ; e Gírio, F. M. Identification of the most relevant factors affecting xylitol production by *D. hansenii* from wheat straw hydrolysates. Proceedings of the International Conference: Bioenergy: Challenges and Opportunities, 2008 Guimarães, Portugal. pp. 179-184.

Silvestre, A. 2007. Biorefineries: On the way to sustainability. Aveiro: Universidade de Aveiro.

Sluiter, A. D., Hames, B. R., Ruiz, R., Scarlata, C. J., Sluiter, J. B. e Templeton, D. W. 2008a. Determination of Total Solids in Biomass and Total Dissolved Solids in Liquid Process Samples. *Laboratory Analytical Procedure (LAP)*. National Renewable Energy Laboratory.

Sluiter, A. D., Ruiz, R. O., Scarlata, C. J., Sluiter, J. B. e Templeton, D. W. 2008b. Determination of Extractives in Biomass. *Laboratory Analytical Procedure (LAP)*. National Renewable Energy Laboratory.

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

Sun, Y., Lu, X., Zhang, R., Wang, X. e Zhang, S. 2011a. Pretreatment of corn stover silage with Fe(NO₃)₃ for fermentable sugar production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 164, 918-928.

Sun, Y., Lu, X., Zhang, S., Zhang, R. e Wang, X. 2011b. Kinetic study for Fe(NO₃)₃ catalyzed hemicellulose hydrolysis of different corn stover silages. *Bioresource Technology*, 102, 2936-2942.

Taherzadeh, M. J. e Karimi, K. 2004. Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. *BioResources*, 2, 472-499.

Tamanini, C. e Haully, M. C. O. 2004b. Resíduos agroindustriais para produção biotecnológica de xilitol. *Ciências Agrárias*, 25, 315-330.

Tavares, J. M., Duarte, L. C., Amaral-Collaço, M. T. e Gírio, F. M. 1999. Phosphate limitation stress induces xylitol overproduction by *Debaryomyces hansenii*. *Federation of European Microbiological Societies*, 171, 115-120.

Tavares, J. M., Duarte, L. C., Amaral-Collaço, M. T. e Gírio, F. M. 2000. The influence of hexoses addition on the fermentation of D-xylose in *Debaryomyces hansenii* under continuous cultivation. *Enzyme and Microbial Technology* 26, 743-747.

Torrado, I. 2010. *Optimização da hidrólise com ácido diluído para o fracionamento selectivo das hemiceluloses de palha de sorgo: estudo da bioconversão dos hidrolisados para a produção de xilitol*. Dissertação de Mestrado, Universidade do Algarve.

Tucker, M., Kim, K., Newman, M. e Nguyen, Q. 2003. Effects of Temperature and Moisture on Dilute-Acid Steam Explosion Pretreatment of Corn Stover and Cellulase Enzyme Digestibility. *In: Davison, B., Lee, J., Finkelstein, M. e Mcmillan, J. (eds.) Biotechnology for Fuels and Chemicals*. Humana Press.

Uihlein, A. e Schebek, L. 2009. Environmental impacts of a lignocellulose feedstock biorefinery system: An assessment. *Biomass and Bioenergy*, 33, 793-802.

Van Walsum, G. P. 2001. Severity function describing the hydrolysis of xylan using carbonic acid. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 91-93, 317-329.

Van Walsum, P. G. e Shi, H. 2004. Carbonic acid enhancement of hydrolysis in aqueous pretreatment of corn stover. *Bioresource Technology*, 93, 217-226.

Vázquez, M., Oliva, M., Téllez-Luis, S. J. e Ramírez, J. A. 2007. Hydrolysis of sorghum straw using phosphoric acid: Evaluation of furfural production. *Bioresource Technology*, 98, 3053-3060.

Vessia, Ø. 2005. *Biofuels from lignocellulosic material: Technology, potential and costs*. Tese de Mestrado, Universidade de Ciência e Tecnologia da Noruega.

Watson, N. E., Prior, B. A., Lategan, P. M. e Lussi, M. 1984. Factors in acid treated bagasse inhibiting ethanol production from d-xylose by *Pachysolen tannophilus*. *Enzyme and Microbial Technology*, 6, 451-456.

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

Werpy, T., Petersen, G., Aden, A., Bozell, J., Holladay, J., White, J., Manheim, A., Eliot, D., Lasure, L. e Jones, S. 2004. Top Value Added Chemicals From Biomass. Volume 1 - Results of Screening for Potential Candidates From Sugars and Synthesis Gas. Washington DC: U.S. Department of energy.

Wilson, J. J., Deschatelets, L. e Nishikawa, N. 1989. Comparative fermentability of enzymatic and acid hydrolysates of steam-pretreated aspenwood hemicellulose by *Pichia stipitis* CBS 5776. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 31, 592-596.

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

Wright, J. D. 1988. Ethanol from biomass by enzymatic hydrolysis. *Chemical Engineering Progress*, 84, 62-74.

Anexos

I. Soluções e Reagentes utilizados

i. Solução de nutrientes

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

ii. Solução de sais

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

Tabela 25 - Composição da solução de sais 40 vezes concentrada

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

Preparação da solução

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

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

iii. Solução de NP

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

Tabela 26 - Composição da solução de NP 20 vezes concentrada

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

iv. Solução de Mg

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

Tabela 27 - Composição da solução de Mg 40 vezes concentrada

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

v. Solução de vitaminas e cálcio

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

Tabela 28 - Composição da solução de vitaminas e cálcio 100 vezes concentradas

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

Preparação da solução

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

vi. Água de maceração de milho (CSL – *Corn Steep Liquor*)

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

Tabela 29 – Composição stock de *Corn Steep Liquor* utilizado para a solução

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

II. Métodos analíticos

A humidade (H) das amostras foi calculada segundo a seguinte equação:

$$\%H = \frac{\text{Peso da amostra húmida (g)} - \text{Peso amostra seca (g)}}{\text{Peso da amostra húmida (g)}} \times 100 \quad \text{(Equação 1)}$$

A cinza (C) das amostras foi calculada usando a seguinte expressão:

$$\%Cinza = \frac{\text{Peso da cinza (g)}}{\text{Peso da amostra seca (g)}} \times 100 \quad \text{(Equação 2)}$$

A
percentagem
de
extratáveis
é

determinada pela equação seguinte:

$$\text{Extratáveis (\%)} = \frac{m - m_0}{A \cdot (1 - H)} \times 100 \quad \text{(Equação 3)}$$

Onde,

m é a massa do balão mais extratáveis, após cada uma das extrações (g);

m₀ é a massa do balão (vazio) determinada inicialmente (g);

A é a massa da amostra (g) pesada para dentro do cartucho.

H é a humidade da amostra

A percentagem de azoto total é calculada através de:

$$\text{Azoto total (\%)} = 0,14 \cdot \left(\frac{V - V_0}{A} \right) \quad \text{(Equação 4)}$$

Onde,

V é o volume de solução de HCl 0,1 N gasto na titulação (mL);

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

A é a massa de amostra (g) (em massa seca)

O fator de conversão utilizado para o cálculo da proteína foi $N \times 6,25$.

III. Determinação da proteína total

A proteína total foi determinada de acordo com o método de *Kjedahl* (1975). As amostras a analisar foram pesadas diretamente nos tubos de digestão. Foi tomada uma massa de 0,5 g de amostra à qual se adicionou 10 g de mistura catalisadora e 20 mL de H_2SO_4 concentrado (96% p.p⁻¹), e colocaram-se os tubos com as amostras preparadas na unidade de aquecimento do aparelho de digestão (Digestion System 6 Modelo 1007, Tecator, Suécia). Seguidamente colocaram-se as cápsulas do sistema de extração de fumos e abriu-se a fonte de vácuo. Nos primeiros 30 min do processo, a temperatura foi moderada e após este período foi elevada até 420 °C, durante 1,5 h. Uma vez terminada a digestão, e após arrefecimento do conteúdo dos tubos, adicionou-se 100 mL de água destilada e 50 mL de ácido bórico 4% (p/v). Em seguida colocaram-se os tubos na unidade de destilação (Kjeltec System modelo 1026, Tecator, Suécia). Durante esta operação de destilação foi libertado amoníaco, por adição da solução de NaOH, que é arrastado por uma corrente de vapor de água sendo depois recolhido na solução de ácido bórico. Em seguida, o amoníaco foi doseado por titulação com HCl 0,1 N, em presença da solução indicadora de pH (indicador de Tashiro) que se torna violeta a pH 4,8. Para o ensaio em branco procedeu-se da mesma forma, substituindo a massa da amostra por água destilada.

Tabela 30 – Reagentes utilizados na determinação da proteína total

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

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

IV. Formulário

i. Caracterização química da matéria-prima e resíduos sólidos

As concentrações de glucose, xilose, arabinose e ácido acético nos licores resultantes da hidrólise ácida quantitativa da matéria-prima e resíduo sólido foram utilizados para o cálculo das percentagens de glucana, xilana, arabinana e grupos acetilo, respetivamente (Eq. 5 – Eq. 8). O resíduo insolúvel em ácido, após correção da cinza, permitiu o cálculo da lenhina Klason (Eq. 9).

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

$$Gn = F \times \frac{100}{1005} \times \frac{162}{180} \times \frac{Glc \times P_{sol}}{A} \quad \text{Equação 5}$$

$$Xn = F \times \frac{100}{1005} \times \frac{132}{150} \times \frac{Xyl \times P_{sol}}{A} \quad \text{Equação 6}$$

$$Arn = F \times \frac{100}{1005} \times \frac{132}{150} \times \frac{Ara \times P_{sol}}{A} \quad \text{Equação 7}$$

$$GAc = \frac{100}{1005} \times \frac{60}{61} \times \frac{Ac \times P_{sol}}{A} \quad \text{Equação 8}$$

$$LK = \frac{RIA - C}{A} \times 100 \quad \text{Equação 9}$$

- Gn, Xn, Arn, GAc, LK são as percentagens de glucana, xilana, arabinana, grupos acetilo e lenhina Klason, respetivamente (g /100 g sólido),

- F é o fator de correção, por exemplo, para a glucana, $F = 1/(1-0,026) = 1,027$,

- P_{sol} e A são as massas de solução e da amostra seca utilizada no ensaio, respetivamente (g),
- RIA e C são as massas do resíduo insolúvel em ácido e da cinza da amostra, respetivamente (g),
- Glc , Xyl , Ara e Ac são as concentrações de glucose, xilose, arabinose e ácido acético nos licores ($g \cdot L^{-1}$).

ii. Cálculo de rendimentos

O rendimento de cada um dos polímeros¹, expresso como a percentagem que permanece no resíduo sólido relativamente à respetiva percentagem na matéria-prima, após hidrólise ácida foi calculada de acordo com as Eq. 10 – 14.

$$Gn_R = \frac{Gn \times Y_S}{Gn_{MP}} \quad \text{Equação 10}$$

$$Xn_R = \frac{Xn \times Y_S}{Xn_{MP}} \quad \text{Equação 11}$$

$$Arn_R = \frac{Arn \times Y_S}{Arn_{MP}} \quad \text{Equação 12}$$

$$GAc_R = \frac{GAc \times Y_S}{GAc_{MP}} \quad \text{Equação 13}$$

$$LK_R = \frac{LK \times Y_S}{LK_{MP}} \quad \text{Equação 14}$$

- Gn_R , Xn_R , Arn_R , GAc_R , LK_R são as percentagens de cada um dos “polímeros” que permanecem no resíduo após o tratamento (g /100 g de polímero na matéria-prima),
- Gn_{MP} , Xn_{MP} , Arn_{MP} , GAc_{MP} , LK_{MP} são as percentagens de glucana, xilana, arabinana, grupos acetilo e lenhina *Klason* na matéria-prima, respetivamente (g /100 g matéria-prima),
- Y_S – rendimento em sólidos (g /100 g matéria-prima).

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

$$Glc_R = \frac{162}{180} \times \frac{Glc \times P_H}{Gn_{MP} \times A \times 0,01 \rho_H} \times 100 \quad \text{Equação 15}$$

$$Xyl_R = \frac{132}{150} \times \frac{Xyl \times P_H}{Xn_{MP} \times A \times 0,01 \rho_H} \times 100 \quad \text{Equação 16}$$

$$Ara_R = \frac{132}{150} \times \frac{Ara \times P_H}{Arn_{MP} \times A \times 0,01 \rho_H} \times 100 \quad \text{Equação 17}$$

$$Ac_R = \frac{60}{61} \times \frac{Ac \times P_H}{GAc_{MP} \times A \times 0,01 \rho_H} \times 100 \quad \text{Equação 18}$$

$$Furf_R = \frac{132}{96} \times \frac{Furf \times P_H}{Xn_{MP} \times A \times 0,01 \rho_H} \times 100 \quad \text{Equação 19}$$

$$HMF_R = \frac{162}{126,1} \times \frac{HMF \times P_H}{Gn_{MP} \times A \times 0,01 \rho_H} \times 100 \quad \text{Equação 20}$$

- Glc_R , Xyl_R , Ara_R , Ac_R , $Furf_R$, HMF_R , são as percentagens de glucose, xilose, arabinose, ácido acético, furfural e HMF recuperados no hidrolisado (g por 100 g de polímero),
- Furf e HMF são as concentrações de furfural e HMF nos licores ($g \cdot L^{-1}$),
- P_H é a massa de hidrolisado obtido no ensaio (g),
- A é a massa de amostra utilizada no ensaio (g),
- ρ_H é a massa volúmica do hidrolisado ($g \cdot g^{-1} \cdot L^{-1}$).

A percentagem de cada um dos “polímeros” relativamente ao total de amostra inicial foi calculada de acordo com as Eq. 21 – 25.

$$Gn_T = \frac{Gn_R \times Gn_{MP}}{100} \quad \text{Equação 21}$$

$$Xn_T = \frac{Xn_R \times Xn_{MP}}{100} \quad \text{Equação 22}$$

$$Arn_T = \frac{Arn_R \times Arn_{MP}}{100} \quad \text{Equação 23}$$

$$GAc_T = \frac{GAc_R \times GAc_{MP}}{100} \quad \text{Equação 24}$$

$$LK_T = \frac{LK_R \times LK_{MP}}{100} \quad \text{Equação 25}$$

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

As percentagens de glucose, xilose, arabinose, ácido acético, fórmico e levulínico, furfural, HMF e compostos fenólicos relativamente ao total de amostra inicial foram calculadas de acordo com as Eq. 26 – 32.

$$Glc_T = \frac{Glc_R \times Glc_{MP}}{100} \quad \text{Equação 26}$$

$$Xyl_T = \frac{Xyl_R \times Xyl_{MP}}{100} \quad \text{Equação 27}$$

$$Ara_T = \frac{Ara_R \times Ara_{MP}}{100} \quad \text{Equação 28}$$

$$Ac_T = \frac{Ac_R \times Ac_{MP}}{100} \quad \text{Equação 29}$$

$$Furf_T = \frac{Furf_R \times Furf_{MP}}{100} \quad \text{Equação 30}$$

$$HMF_T = \frac{HMF_R \times HMF_{MP}}{100} \quad \text{Equação 31}$$

$$CFn_T = \frac{CFn_R \times P_H}{\rho_H \times A} \times 100 \quad \text{Equação 32}$$

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

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

iii. Parâmetros cinéticos e estequiométricos

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

$$\mu = \frac{\ln\left(\frac{Abs}{Abs_0}\right) - b}{t} \quad \text{Equação 33}$$

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

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

$$Q_x = \frac{X_f - X_i}{t_f - t_i} \quad \text{Equação 34}$$

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

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

$$Q_s = \frac{S_f - S_i}{t_f - t_i} \quad \text{Equação 35}$$

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

$$\% \text{ substrato consumido} = \frac{S_i - S_f}{S_i} \times 100 \quad \text{Equação 36}$$

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

$$Q_{xOH} = \frac{Xilitol_f - Xilitol_i}{t_f - t_i} \quad \text{Equação 37}$$

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

- Rendimento celular (g·g⁻¹)

$$Y_{X/S} = \frac{X_f - X_i}{S_i - S_f} \quad \text{Equação 38}$$

- Rendimento em xilitol (g·g⁻¹)

$$Y_{XOH/S} = \frac{XOH_f - XOH_i}{S_i - S_f} \quad \text{Equação 39}$$

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

- Razão XOH/Produtos

$$XOH / Pr odutos = \frac{Xilitol}{Arabitol + Glicerol + E tan ol + Xilitol} \quad \text{Equação 40}$$

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

iv.

v. Determinação do diâmetro médio das partículas

$$Dp = \frac{\sum xidi^4}{\sum xidi^3} \quad \text{Equação 41}$$

Onde,

xi - Fração de partículas retidas em cada peneiro,

di – Diâmetro médio das partículas retidas em cada peneiro.

V. Determinação da concentração de compostos fenólicos

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

Preparação das Soluções

- Solução *stock* de ácido gálico $0,6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$

Pesaram-se 0,0300 g de ácido gálico e diluiu-se em água ultra pura, perfazendo o volume a 50 mL, em balão volumétrico. A solução é estável por alguns dias a $4 \text{ }^\circ\text{C}$.

- Solução *stock* de carbonato de sódio 7,5% ($\text{p}\cdot\text{v}^{-1}$)

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

- Solução de *Folin-Cicalteu* 1/10 ($\text{v}\cdot\text{v}^{-1}$)

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

Procedimento

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

A curva de calibração foi construída da mesma forma, utilizando soluções de ácido gálico a diferentes concentrações (0; 0,06; 0,15; 0,30; 0,45; 0,54 e $0,60 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)

Cálculos

Os resultados são expressos em equivalente de ácido gálico (GAE) $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de solução da amostra por comparação com a curva de calibração de ácido gálico.