

**UNIVERSIDADE DO ALGARVE**

Faculdade de Ciências e Tecnologia

**“Optimização da hidrólise com ácido diluído para o fraccionamento selectivo das hemiceluloses de palha de sorgo: estudo da bioconversão dos hidrolisados para produção de xilitol”**

**Ivone Maria Ruivo Torrado**

Dissertação de Mestrado em Engenharia Biológica

**2010**

**UNIVERSIDADE DO ALGARVE**

Faculdade de Ciências e Tecnologia

**“Optimização da hidrólise com ácido diluído para o fraccionamento selectivo das hemiceluloses de palha de sorgo: estudo da bioconversão dos hidrolisados para produção de xilitol”**

**Ivone Maria Ruivo Torrado**

Dissertação de Mestrado em Engenharia Biológica

**Dissertação orientada por:**

---

Orientador externo:	Doutora Florbela Carvalheiro
Orientador interno:	Professora Doutora Sara Raposo

**2010**

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

## **Resumo**

O sorgo é uma potencial cultura energética com especial interesse para os climas mediterrânicos. Quer o seu suco quer a sua fracção lenhocelulósica podem ser utilizados no âmbito das biorrefinarias. O objectivo deste trabalho consistiu na optimização da hidrólise com ácido diluído da hemicelulose do sorgo e sua posterior bioconversão a xilitol.

Dada a dificuldade de trabalhar o sorgo verde e a quantidade potencial de açúcares ainda presentes no sorgo seco foi feita uma pré-extracção aquosa (PEA) do sorgo biomassa, cujas condições foram optimizadas (100°C, 45 min, razão líquido/sólido 7 g/g). Para além disso, foram também caracterizados três tipos de sorgo verde (doce, forrageiro e biomassa) relativamente ao teor e tipo de açúcares presentes no suco e licor da PEA, anteriormente optimizada.

O material seco pré-tratado foi submetido a uma hidrólise com ácido diluído, tendo-se estudado a influência do tempo de operação e concentração de catalisador ( $H_2SO_4$ ) na hidrólise da hemicelulose, a 130°C. Os resultados foram interpretados através do factor de severidade combinado (CS), num intervalo entre 1,17-2,31. As condições óptimas correspondem a um CS de 1,98, (1,4%  $H_2SO_4$  e 75 min), tendo-se recuperado na fase líquida 80% da hemiceluloses sob a forma de pentoses livres, juntamente com baixas concentrações de inibidores.

O hidrolisado obtido nas condições optimizadas foi utilizado como meio de crescimento e, após concentração, como meio de cultura para a produção de xilitol pela levedura *Debaryomyces hansenii* CCMI 941. Como meios de inóculo foram testados o hidrolisado ácido e o licor da PEA, ambos suplementados. O último permitiu o crescimento mais rápido da levedura e a obtenção de concentrações celulares adequadas. No entanto, dado que a fase de latência no meio de produção de xilitol foi superior e, conseqüentemente a produtividade em xilitol inferior, optou-se pelo crescimento do inóculo em meio contendo hidrolisado.

A remoção de compostos inibidores foi avaliada através da destoxificação do hidrolisado com carvão activado que permitiu uma remoção significativa de furfural, compostos fenólicos e ácido acético. No entanto, os melhores resultados da produção de xilitol foram obtidos em hidrolisado não-destoxificado e correspondem a um rendimento em xilitol e produtividade volumétrica de 0,64 g.g<sup>-1</sup> e 0,56 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, respectivamente.

Estes resultados encontram-se entre os melhores descritos na literatura para hidrolisados não-destoxificados, mostrando assim as potencialidades deste material, da levedura e do processo desenvolvido.

## ***Abstract***

Sorghum is a potential energy crop particularly interesting for the Mediterranean climates. Both juice and lignocellulosic fraction can be used on biorefinery framework. The aim of this work was the study of dilute-acid hydrolysis of high-biomass sorghum hemicellulose and its bioconversion to xylitol.

Given the difficulty of working with fresh sorghum and the potential amount of sugars still present in dried sorghum, an aqueous pre-extraction (PEA) of high-biomass sorghum was optimized. The optimum conditions were at 100°C, 45 min and a liquid to solid ratio of 7 g/g. The sugars content and juice composition from the three types of fresh sorghum (high-biomass, sweet and forage) were also characterised.

Pre-extracted dried raw material was treated with dilute acid. The effect of time and catalyst (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) concentration on hemicelluloses hydrolysis at 130°C were evaluated. The combined severity factor (CS), in a range of 1.17-2.31 was used to interpret the results. The optimum hydrolysis conditions were verified at a CS value of 1.98 (1.4% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and 75 min). Under these conditions, 80% of feedstock pentose sugars were recovered in the monomeric form, together with a low content of inhibitors.

The hydrolysate obtained with the optimised conditions, after supplementation, was used as culture media for growth and, after concentration, as culture media for xylitol production by the yeast *Debaryomyces hansenii* CCMI 941. Both hemicellulosic hydrolysates and PEA liquors were used for inocula production, the later allowed a faster growth and an adequate cellular concentration. When inoculum was grown in PAE based media, xylitol production was negatively affected, so hydrolysate-based media was selected for inoculum growth.

The effect of potential inhibitors compounds in cellular growth was evaluated using the detoxification of the hydrolysate method with activated charcoal, which allowed a significant removal of furfural, phenolics and acetic acid. However, the best results for xylitol production were obtained with non-detoxified hydrolysates achieving a xylitol yield and volumetric productivity of 0.64 g.g<sup>-1</sup> and 0.56 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, respectively. The results obtained in this study were similar to ones previously reported, for non-detoxified hydrolysates, demonstrating the potential of this raw-material, yeast and process performed.

***Palavras-chave***

**Sorgo**

**Pré-extracção aquosa**

**Hidrólise com ácido diluído**

**Hidrolisados hemicelulósicos**

***Debaryomyces hansenii***

**Xilitol**

***Keywords***

**Sorghum**

**Aqueous pre-extraction**

**Dilute-acid hydrolysis**

**Hemicellulosic hydrolysates**

***Debaryomyces hansenii***

**Xylitol**

## ***Agradecimentos***

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

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

Ao Doutor José Carlos Roseiro, Ex-Director do Departamento de Biotecnologia do ex-INETI, pela oportunidade proporcionada na realização deste estágio.

À Doutora Florbela Carvalheiro, por toda a ajuda e amizade desde o primeiro dia, pela simpatia, compreensão e principalmente por tudo o que me ensinou. Obrigado!

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

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

A todos os colegas do laboratório que se tornaram amigos, Patrícia, Diana, Joana, Sandra, Tatiana, Miguel, Ima, Ana, Margarida, Cristina, Rute, Andreia, Susana, Pedro, pela simpatia, apoio prestado e pelo excelente ambiente de trabalho que proporcionaram.

À Talita, para além de colega e amiga, foi a minha mestre, foi o meu pilar nos primeiros tempos, o profissionalismo e rigor que me incutiu são das coisas mais valiosas que adquiri neste estágio. Obrigada Talita!

À Professora Sara Raposo, pela disponibilidade e compreensão demonstrada.

Aos meus pais, os grandes responsáveis por tudo. Obrigada pelos sacrifícios, dedicação, paciência e amor. Acho que valeu a pena!

Ao Ricardo, o meu grande apoio. Pelo amor, amizade, companheirismo e pela ajuda prestada nos momentos mais difíceis.

À minha irmã e cunhado, apesar de não terem estado muito presentes nesta fase, foram a minha família no início da minha vida académica.

Aos meus Sogros e toda a família, obrigada pela ajuda e confiança que sempre depositaram em mim e no meu trabalho.

Aos meus avós, tios, primos e família em geral.

Ao meu Avô Ruivo, a quem dedico este trabalho. Obrigado por não ter deixado de olhar por mim, como sempre fez.

## Índice geral

RESUMO .....	I
ABSTRACT .....	II
PALAVRAS-CHAVE .....	III
KEYWORDS .....	III
AGRADECIMENTOS.....	IV
ÍNDICE GERAL .....	V
ÍNDICE DE QUADROS .....	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IX
ABREVIATURAS.....	X
SÍMBOLOS.....	XI
ENQUADRAMENTO E OBJECTIVOS .....	XIII
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1 MATERIAIS LENHOCELULÓSIOS .....	1
1.1.1 <i>Diversidade e aplicações</i> .....	1
1.1.2 <i>Composição química</i> .....	2
1.1.2.1 Celulose.....	2
1.1.2.2 Hemiceluloses .....	3
1.1.2.3 Lenhina .....	3
1.1.2.4 Compostos de baixa massa molecular/extractivos.....	4
1.2 SORGO.....	4
1.3 FRACCIONAMENTO DE MATERIAIS LENHOCELULÓSICOS .....	6
1.3.1 <i>Hidrólise</i> .....	6
1.3.1.1 Hidrólise ácida .....	7
Hidrólise com ácidos concentrados.....	8
Hidrólise com ácidos diluídos.....	8
1.3.1.2 Métodos hidrotérmicos .....	10
Auto-hidrólise.....	11
Explosão com vapor .....	11
1.3.1.3 Métodos alcalinos .....	11
1.3.1.4 Hidrólise enzimática.....	12
1.3.2 <i>Factor de severidade</i> .....	12
1.4 MÉTODOS DE DESTOXIFICAÇÃO .....	13
1.5 XILITOL.....	14
1.5.1 <i>Propriedades e aplicações</i> .....	15
1.5.2 <i>Processos de produção de xilitol</i> .....	16

1.5.2.1	Síntese química.....	16
1.5.2.2	Produção biotecnológica.....	17
<b>1.5.1</b>	<b><i>Microrganismos produtores de xilitol.....</i></b>	<b>17</b>
1.5.1.1	A levedura <i>Debaryomyces hansenii</i> .....	18
1.5.1.2	Metabolismo da D-xilose em <i>Debaryomyces hansenii</i> .....	19
<b>1.5.2</b>	<b><i>Factores que influenciam a produção biotecnológica de xilitol.....</i></b>	<b>20</b>
1.5.2.1	Idade do inóculo.....	21
1.5.2.2	Concentração do inóculo.....	21
1.5.2.3	pH.....	21
1.5.2.4	Temperatura.....	21
1.5.2.5	Composição do meio de cultura.....	21
1.5.2.6	Disponibilidade de oxigénio.....	22
1.5.2.7	Concentração de xilose.....	22
1.5.2.8	Concentração de produto.....	23
<b>2.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>24</b>
2.1	MATÉRIAS-PRIMAS.....	24
2.1.1	<i>Preparação da matéria-prima.....</i>	24
2.1.2	<i>Caracterização química do sorgo verde.....</i>	24
2.2	HIDRÓLISE COM ÁCIDO DILUÍDO.....	25
2.3	PRODUÇÃO DE HIDROLISADO PARA OS ENSAIOS DE BIOCONVERSÃO.....	25
2.4	DESTOXIFICAÇÃO DOS HIDROLISADOS.....	26
2.4.1	<i>Correcção de pH.....</i>	26
2.4.2	<i>Tratamento com carvão activado.....</i>	26
2.4.3	<i>Concentração do hidrolisado.....</i>	26
2.5	MICROORGANISMO E CONDIÇÕES DE CULTURA.....	27
2.5.1	<i>Microrganismo.....</i>	27
2.5.2	<i>Preparação dos meios de cultura.....</i>	27
	Meios de produção de inóculo.....	27
	Meios de produção de xilitol.....	27
2.5.3	<i>Preparação do inóculo e condições de cultura.....</i>	28
2.5.4	<i>Condições de cultura.....</i>	28
2.5.1	<i>Amostragem.....</i>	28
2.5.2	<i>Controlo da pureza das culturas.....</i>	28
2.6	MÉTODOS ANALÍTICOS.....	29
2.6.1	<i>Caracterização química da matéria-prima e resíduo sólido resultante da hidrólise.....</i>	29
2.6.1.1	Determinação da humidade.....	29
2.6.1.2	Determinação do resíduo seco dos hidrolisados.....	29
2.6.1.3	Determinação dos polissacáridos (glucano, xilano, arabinano) e grupos acetilo.....	29
	Resíduo sólido.....	29
	Hidrolisado.....	30
2.6.1.4	Determinação da lenhina e cinza.....	30

2.6.1.5	Determinação de proteína total.....	30
2.6.1.6	Doseamento dos compostos fenólicos.....	30
2.6.2	<i>Determinação da concentração de biomassa celular.....</i>	<i>30</i>
2.6.3	<i>Doseamento de monossacáridos, compostos inibidores e produtos resultantes do metabolismo microbiano.....</i>	<i>31</i>
<b>3.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>33</b>
3.1	PRÉ-EXTRACÇÃO AQUOSA E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA MATÉRIA-PRIMA.....	33
3.1.1	<i>Optimização da pré-extracção aquosa.....</i>	<i>33</i>
3.1.2	<i>Estudo do tempo de pré-extracção aquosa.....</i>	<i>33</i>
3.1.3	<i>Estudo da razão líquido/sólido.....</i>	<i>35</i>
3.2	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA MATÉRIA-PRIMA.....	35
3.3	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO SORGO VERDE.....	37
3.4	ESTUDO DE CONDIÇÕES DE OPERAÇÃO PARA OBTENÇÃO DE HIDROLISADOS HEMICELULÓSICOS.....	39
3.4.1	<i>Optimização da hidrólise com ácido diluído de sorgo biomassa.....</i>	<i>40</i>
3.4.1.1	Estudo da concentração de ácido utilizada.....	40
3.4.1.2	Estudo da duração do processo.....	42
3.5	ESTUDO DA FERMETISCIBILIDADE DO HIDROLISADO ÁCIDO E DO LICOR DE PRÉ-EXTRACÇÃO AQUOSA.....	48
3.6	AVALIAÇÃO DE METODOLOGIAS DE DESTOXIFICAÇÃO NA REMOÇÃO DE COMPOSTOS INIBIDORES.....	52
3.7	AVALIAÇÃO DO EFEITO DA DESTOXIFICAÇÃO E DO MEIO DE CRESCIMENTO DO INÓCULO NA PRODUÇÃO DE XILITOL.....	54
3.7.1	<i>Inóculo produzido em licor de pré-extracção aquosa.....</i>	<i>55</i>
3.7.2	<i>Inóculo produzido em hidrolisado ácido.....</i>	<i>58</i>
	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>63</b>
	<b>PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>65</b>
	<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>66</b>
<b>4.</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>I</b>
I.	DETERMINAÇÃO DO TEOR E PERFIL DE AÇÚCARES SOLÚVEIS EM AMOSTRAS VEGETAIS.....	I
II.	MEIOS DE CULTURA.....	II
III.	SOLUÇÕES DE SUPLEMENTOS UTILIZADAS.....	III
IV.	FORMULÁRIO.....	V
V.	DETERMINAÇÃO DA PROTEÍNA TOTAL.....	XI
VI.	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS.....	XII

## Índice de Quadros

<b>Quadro 1.1</b> Condições operacionais utilizadas na hidrólise com ácido diluído de diferentes materiais lenhocelulósicos.....	9
<b>Quadro 2.1</b> Equipamento e condições de operação para as análises por HPLC.....	31
<b>Quadro 3.1</b> Rendimentos em açúcares obtidos a partir de sorgo biomassa, utilizando a pré-extracção aquosa e o método de Luff-Schoorl.....	34
<b>Quadro 3.2</b> Rendimentos e respectivas concentrações de açúcares obtidos para a pré-extracção aquosa com diferentes razões líquido/sólido (RLS) ( $\text{g.g}^{-1}$ ).....	35
<b>Quadro 3.3</b> Composição química média do sorgo biomassa após pré-extracção aquosa.....	36
<b>Quadro 3.4</b> Composição em açúcares do líquido de prensagem (suco) das diferentes variedades de sorgo (doce, biomassa e forrageiro) em estado verde.....	37
<b>Quadro 3.5</b> Composição em açúcares do licor de pré-extracção aquosa (PEA) ( $\text{g}/100\text{g}$ ) do sorgo verde e do resíduo sólido resultante da extração do suco (prensado).....	38
<b>Quadro 3.6</b> Percentagens de solubilização dos polissacáridos e composição do hidrolisado hemicelulósico obtidos para diferentes condições operacionais.....	41
<b>Quadro 3.7</b> Efeito das condições de severidade no rendimento em sólidos ( $Y_S$ ), composição polimérica e lenhina Klason obtidos após hidrólise com ácido diluído do sorgo biomassa.....	46
<b>Quadro 3.8</b> Composição do hidrolisado hemicelulósico obtido após hidrólise do sorgo com 1,4% de $\text{H}_2\text{SO}_4$ para diferentes condições de severidade.....	47
<b>Quadro 3.9</b> Parâmetros cinéticos e estequiométricos para a levedura <i>D. hansenii</i> cultivada em meio com licor de pré-extracção aquosa e hidrolisado hemicelulósico de sorgo.....	49
<b>Quadro 3.10</b> Influência dos vários tratamentos de destoxificação na remoção de compostos inibidores e monossacáridos totais presentes no hidrolisado.....	52
<b>Quadro 3.11</b> Composição dos hidrolisados ( $\text{g.L}^{-1}$ ) utilizados nos ensaios de produção de xilitol.....	54
<b>Quadro 3.12</b> Influência da destoxificação com carvão activado nos parâmetros cinéticos e estequiométricos do crescimento e produção de xilitol pela levedura <i>D. hansenii</i> utilizando inóculo crescido em licor de pré-extracção aquosa.....	57
<b>Quadro 3.13</b> Influência da destoxificação com carvão activado nos parâmetros cinéticos e estequiométricos do crescimento e produção de xilitol pela levedura <i>D. hansenii</i> utilizando inóculo crescido em hidrolisado ácido.....	60

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.1</b> Organização estrutural dos componentes macromoleculares de materiais lenhocelulósicos ....	2
<b>Figura 1.2</b> Mecanismo proposto para a cisão das ligações glicosídicas na despolimerização das hemiceluloses em meio ácido (Adaptado de Belkacemi <i>et al.</i> 1991).....	7
<b>Figura 1.3</b> Principais produtos resultantes da hidrólise de um material lenhocelulósico (Adaptado de Palmqvist, E e Hahn-Hägredal, B. 2000).....	10
<b>Figura 1.4</b> Passos iniciais do metabolismo da D-xilose em <i>Debaryomyces hansenii</i> e mecanismo bioquímico da acumulação de xilitol. (Adaptado de Carvalheiro 1997).....	20
<b>Figura 3.1</b> Rendimentos em açúcares obtidos para diferentes tempos de pré-extracção aquosa do sorgo. Sacarose (■), glucose (■), frutose (■) e açúcares totais (■).....	34
<b>Figura 3.2</b> Rendimentos em monossacáridos obtidos após hidrólise do sorgo com 1,4% de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> para diferentes condições de severidade. Xilose (■), arabinose (▲) e glucose (◆). As curvas representam linhas de tendência. ....	43
<b>Figura 3.3</b> Rendimento em compostos inibidores obtidos após hidrólise do sorgo com 1,4% de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> para diferentes condições de severidade. Ácido acético (◇), furfural (○), HMF (□) e compostos fenólicos totais (◇). As curvas representam linhas de tendência. ....	45
<b>Figura 3.4</b> Perfis de crescimento da levedura <i>D. hansenii</i> em licor resultante da pré-extracção aquosa (▲) e hidrolisado hemicelulósico (▲) de sorgo biomassa. ....	49
<b>Figura 3.5</b> Perfis de consumo de glucose (◆), sacarose (◆) e frutose (◆) da levedura <i>D. hansenii</i> em meio contendo licor de pré-extracção aquosa do sorgo.....	51
<b>Figura 3.6</b> Perfis de consumo de xilose (■), glucose (◆) e arabinose (▲) da levedura <i>D. hansenii</i> em meio contendo hidrolisado hemicelulósico do sorgo. ....	51
<b>Figura 3.7</b> Perfil de consumo de xilose (■), arabinose (▲) e glucose (◆), acumulação de xilitol (□) e arabitól (△) e de crescimento da levedura <i>D. hansenii</i> (○) em hidrolisado concentrado não-destoxificado (A) e destoxificado (B) e com inóculo crescido em licor da pré-extracção aquosa .....	55
<b>Figura 3.8</b> Perfis de consumo de xilose (■), arabinose (▲) e glucose (◆), acumulação de xilitol (□) e arabitól (△) e de crescimento da levedura <i>D. hansenii</i> (○) em hidrolisado concentrado não-destoxificado (A) e destoxificado (B) e com inóculo crescido em hidrolisado. ....	59

***Abreviaturas***

<b>CCMI</b>	Colecção de Culturas de Microrganismos Industriais do INETI
<b>CTE</b>	Cadeia transportadora de electões
<b>LNEG</b>	Laboratório Nacional de Energia e Geologia
<b>HPLC</b>	Cromatografia líquida de alta pressão (“High Pressure Liquid Chromatography”)
<b>M</b>	Micronutrientes
<b>NP</b>	Fonte de azoto e fósforo
<b>Mg</b>	Fonte de magnésio
<b>PEA</b>	Pré-extracção aquosa
<b>UB</b>	Unidade de Bioenergia
<b>XDH</b>	Xilitol-desidrogenase
<b>XR</b>	Xilose-redutase
<b>YM-glc</b>	Meio Yeast Malt-glucose
<b>YM-xyl</b>	Meio Yeast Malt-xilose
<b>V</b>	Vitaminas

## *Símbolos*

<b>A</b>	Massa de amostra seca (g)
<b>Abs</b>	Absorvância num determinado momento
<b>Abs<sub>0</sub></b>	Absorvância inicial
<b>Ac</b>	Ácido acético
<b>Ac<sub>R</sub></b>	Percentagem de ácido acético recuperada na hidrólise (g por 100 g GAc <sub>MP</sub> )
<b>Ac<sub>T</sub></b>	Percentagem de ácido acético na matéria-prima (g por 100 g matéria-prima)
<b>Ara</b>	Arabinose
<b>Ara<sub>R</sub></b>	Percentagem de arabinano solubilizada a arabinose (g por 100 g Arn <sub>MP</sub> )
<b>Ara<sub>T</sub></b>	Rendimento em arabinose (g por 100 g matéria prima)
<b>Arn</b>	Percentagem de arabinano (g por 100 g sólido)
<b>Arn<sub>MP</sub></b>	Percentagem de arabinano na matéria-prima (g por 100 g matéria-prima)
<b>Arn<sub>R</sub></b>	Percentagem de arabinano não solubilizado (g por 100 g Arn <sub>MP</sub> )
<b>Arn<sub>T</sub></b>	Percentagem de arabinano (g por 100 g matéria-prima)
<b>b</b>	Ordenada na origem, na equação da recta
<b>C</b>	Cinzas (g)
<b>Fn</b>	Concentração de compostos fenólicos (g.L <sup>-1</sup> )
<b>Fn<sub>T</sub></b>	Rendimento em compostos fenólicos (g por 100 g matéria-prima)
<b>CS</b>	Factor de severidade combinado
<b>F</b>	Factor de correcção
<b>Furf<sub>R</sub></b>	Percentagem de xilano convertido a furfural (g por 100 g Xn <sub>MP</sub> )
<b>Furf<sub>T</sub></b>	Rendimento em furfural (g por 100 g matéria-prima)
<b>GAc</b>	Percentagem de grupos acetilo (g por 100 g sólido)
<b>GAc<sub>MP</sub></b>	Percentagem de grupos acetilo na matéria-prima (g por 100 g matéria-prima)
<b>GAc<sub>R</sub></b>	Percentagem de grupos acetilo não solubilizados (g por 100 g GAc <sub>MP</sub> )
<b>GAc<sub>T</sub></b>	Rendimento em grupos acetilo (g por 100 g matéria-prima)
<b>Gn</b>	Percentagem de glucano (g por 100 g de sólido)
<b>Gn<sub>MP</sub></b>	Percentagem de glucano na matéria-prima (g por 100 g matéria-prima)
<b>Gn<sub>R</sub></b>	Percentagem de glucano não solubilizado (g por 100 g Gn <sub>MP</sub> )
<b>Gn<sub>T</sub></b>	Percentagem de glucano (g por 100 g matéria-prima)
<b>Glc</b>	Concentração de glucose (g.L <sup>-1</sup> )
<b>Glc<sub>R</sub></b>	Percentagem de glucano solubilizado a glucose (g por 100 g Gn <sub>MP</sub> )
<b>Glc<sub>T</sub></b>	Rendimento em glucose (g por 100 g matéria-prima)
<b>HMF</b>	Concentração de HMF (g.L <sup>-1</sup> )
<b>HMF<sub>R</sub></b>	Percentagem de glucano convertido a HMF (g por 100 g Gn <sub>MP</sub> )
<b>HMF<sub>T</sub></b>	Rendimento em HMF (g por 100 g matéria-prima)

---

<b>LK</b>	Percentagem de lenhina Klason (g por 100 g sólido)
<b>LK<sub>MP</sub></b>	Percentagem de lenhina Klason na matéria-prima (g por 100 g matéria-prima)
<b>LK<sub>R</sub></b>	Percentagem de lenhina Klason não solubilizada (g por 100 g LK <sub>MP</sub> )
<b>LK<sub>T</sub></b>	Rendimento em lenhina Klason (g por 100 g matéria-prima)
<b>P<sub>f</sub></b>	Concentração final de produto (g.L <sup>-1</sup> )
<b>P<sub>H</sub></b>	Massa de hidrolisado (g)
<b>P<sub>sol</sub></b>	Massa da solução (g)
<b>Q<sub>S</sub></b>	Taxa volumétrica de consumo de substrato (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )
<b>Q<sub>X</sub></b>	Produtividade celular (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )
<b>Q<sub>Xilitol</sub></b>	Produtividade em xilitol (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )
<b>R<sub>0</sub></b>	Factor de severidade
<b>RIA</b>	Peso seco do resíduo insolúvel em ácido (g)
<b>S<sub>f</sub></b>	Concentração final de substratos (g.L <sup>-1</sup> )
<b>S<sub>i</sub></b>	Concentração inicial de substratos (g.L <sup>-1</sup> )
<b>t</b>	Tempo de residência (min)
<b>T</b>	Temperatura (°C)
<b>t<sub>f</sub></b>	Valor final do intervalo de tempo considerado (h)
<b>t<sub>i</sub></b>	Valor inicial do intervalo de tempo considerado (h)
<b>X<sub>f</sub></b>	Concentração final de biomassa (g.L <sup>-1</sup> )
<b>X<sub>i</sub></b>	Concentração inicial de biomassa (g.L <sup>-1</sup> )
<b>xilitol<sub>f</sub></b>	Concentração final de xilitol (g.L <sup>-1</sup> )
<b>xilitol<sub>i</sub></b>	Concentração inicial de xilitol (g.L <sup>-1</sup> )
<b>Xilitol/Produtos</b>	Razão da concentração de xilitol/concentração de outros produtos
<b>X<sub>n</sub></b>	Percentagem de xilano (g por 100 g sólido)
<b>X<sub>nMP</sub></b>	Percentagem de xilano na matéria-prima (g por 100 g matéria-prima)
<b>X<sub>nR</sub></b>	Percentagem de xilano não solubilizado (g por 100 g X <sub>nMP</sub> )
<b>X<sub>nT</sub></b>	Percentagem de xilano (g por 100 g matéria-prima)
<b>Xyl</b>	Xilose
<b>Xyl<sub>R</sub></b>	Percentagem de xilose recuperada na hidrólise (g por 100 g X <sub>nMP</sub> )
<b>Xyl<sub>T</sub></b>	Rendimento em xilose (g por 100 g matéria-prima)
<b>Y<sub>S</sub></b>	Rendimento em sólidos (g sólido recuperado por 100 g matéria-prima)
<b>Y<sub>X/S</sub></b>	Rendimento celular (g.g <sup>-1</sup> )
<b>Y<sub>Xilitol</sub></b>	Rendimento em xilitol (g.g <sup>-1</sup> )
<b>μ<sub>máx</sub></b>	Taxa específica máxima de crescimento (h <sup>-1</sup> )
<b>ρ<sub>H</sub></b>	Massa volúmica do hidrolisado (g.L <sup>-1</sup> )

## ***Enquadramento e objectivos***

Este trabalho foi realizado na Unidade de Bioenergia (UB) do Laboratório Nacional de Energia e Geologia (LNEG) e enquadrou-se no âmbito do Projecto co-financiado “Biorefino - Demonstração da viabilidade técnica de uma biorefinaria de bioetanol a partir das biomassas de trigo e sorgo” PTDC/AGR-AAM/71533/2006 (2007-2010), financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT).

O presente trabalho teve quatro objectivos principais:

- Optimização da pré-extracção aquosa de açúcares solúveis da matéria-prima
- Caracterização química dos três tipos principais de sorgo (biomassa, doce e forrageiro) no estado verde no que diz respeito aos açúcares presentes no suco e no licor da pré-extracção aquosa.
- Optimização da hidrólise ácida selectiva da hemicelulose de sorgo biomassa, um subproduto agrícola, para obtenção de um hidrolisado rico em pentoses.
- Avaliação da viabilidade desse hidrolisado para a produção de polióis, em particular o xilitol, pela levedura *Debaryomyces hansenii* CCMI 941.

## **1. Introdução**

O crescimento económico para ser sustentável necessita de recursos seguros para a produção industrial. Actualmente, é ainda muito frequente o uso de matérias-primas provenientes do petróleo que, para além de não serem sustentáveis pela sua limitação, são ainda desfavoráveis do ponto de vista ambiental. Por estas razões torna-se imperativa a procura de alternativas economicamente sustentáveis e não poluentes, não só para a produção de combustíveis mas também de produtos químicos (Biopol 2008).

É neste contexto que surge o conceito de biorefinaria, uma instalação industrial que procura a utilização integral de biomassa, de forma sustentável, para a produção concomitante de biocombustíveis, energia, materiais e produtos químicos, preferencialmente de valor acrescentado (Kamm e Kamm 2007).

Apesar de serem uma realidade emergente em alguns países, a implementação deste tipo de instalações necessita ainda do desenvolvimento tecnológico que lhes permita ultrapassar as actuais limitações (Kamm e Kamm 2007).

Entre as matérias-primas possíveis de ser utilizadas numa biorefinaria, os materiais lenhocelulósicos são considerados os mais interessantes (Kamm e Kamm 2007).

### **1.1 Materiais lenhocelulósicos**

Designam-se por materiais lenhocelulósicos, os diferentes tipos de biomassa de origem vegetal que têm como característica comum serem constituídos por polissacáridos (celulose e hemicelulose) e lenhina (Fengel e Wegener 1983).

A biomassa lenhocelulósica é um dos principais recursos renováveis disponíveis e constitui uma matéria-prima de baixo custo para obtenção de biocombustíveis, materiais e produtos químicos de valor acrescentado (Boussarsar *et al.* 2009).

#### **1.1.1 Diversidade e aplicações**

Os materiais lenhocelulósicos podem ser classificados de acordo com a sua composição química, propriedades físicas, químicas e mecânicas como lenhosos, do tipo madeira e não-lenhosos (materiais herbáceos).

Quanto à sua origem, estes materiais podem ser classificados como florestais, nos quais se incluem madeiras folhosas como o eucalipto, o carvalho e a faia, madeiras resinosas, como o pinheiro e o abeto e ainda como resíduos e subprodutos agrícolas e agro-industriais, onde se incluem as palhas, carolo de milho, bagaço de cana-de-açúcar, dreche cervejeira, entre outros.

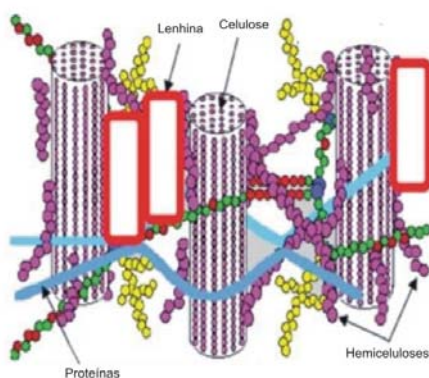
Apesar de serem biodegradáveis, estes materiais são muitas vezes, considerados “desperdícios” e podem constituir-se como um problema ambiental, devido às quantidades envolvidas. Por outro lado, estes materiais são também um recurso abundante, renovável e de baixo custo, cujas propriedades os tornam uma excelente matéria-prima para valorização biotecnológica. Essa valorização passa pelo aproveitamento dos polissacáridos e a sua transformação em açúcares fermentescíveis que podem, por exemplo, ser utilizados para produção de combustíveis líquidos, solventes, combustíveis gasosos, massa proteica para fins alimentares e metabolitos de valor acrescentado, como é o caso do xilitol, ácido aspártico, ácido glutâmico, glicerol, sorbitol e arabitol.

Existem diversas possibilidades para obtenção destes produtos, contudo a ideia fundamental para a valorização do material implica, em primeiro lugar, o seu fraccionamento, que pode ser feito por diferentes processos físicos, químicos e/ou biológicos.

### 1.1.2 Composição química

Do ponto de vista químico, os componentes dos materiais lenhocelulósicos podem ser classificados em componentes estruturais e extractivos. Dos primeiros fazem parte a celulose, hemiceluloses e lenhina, sendo que a composição química dos materiais lenhocelulósicos varia com a origem, espécie, condições de crescimento e variações biológicas e genéticas.

Nos extractivos incluem-se os compostos de baixa massa molecular e os componentes inorgânicos, presentes em pequena percentagem e que estão associados à cinza.



**Figura 1.1** Organização estrutural dos componentes macromoleculares de materiais lenhocelulósicos.

#### 1.1.2.1 Celulose

A celulose representa, em geral, a maior fracção dos materiais lenhocelulósicos (40-60%). É um homopoliósido constituído por moléculas de glucose unidas por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 com um grau de polimerização que pode variar entre 500 e 15000, formando cadeias lineares.

As moléculas de celulose estabelecem ligações inter e intra-moleculares formando uma estrutura cristalina que lhe confere elevada resistência química, sendo insolúvel na maioria dos solventes incluindo bases fortes.

### **1.1.2.2 Hemiceluloses**

As hemiceluloses são heteropolímeros constituídos por pentoses ( $\beta$ -D-xilose,  $\alpha$ -L-arabinose), hexoses ( $\beta$ -D-manose,  $\beta$ -D-glucose,  $\alpha$ -D-galactose), ácidos urónicos (ácidos  $\alpha$ -D-glucorónico,  $\alpha$ -D-4-O-metilglucurónico e  $\alpha$ -D-galacturónico) e grupos acetilo. As hemiceluloses apresentam diferenças quanto à sua estrutura e composição em função da sua origem biológica. No grupo das resinosas, a hemicelulose é essencialmente constituída por glucomanos, possuindo assim uma proporção superior de unidades de manose e glucose comparativamente às hemiceluloses das folhosas e resíduos agrícolas. O conteúdo de manose pode chegar aos 10% nas folhosas e até 5% nos resíduos agrícolas. 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 xilano. A hemicelulose dos resíduos agrícolas distingue-se por apresentar, em geral, uma maior quantidade de arabinose.

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 hidrolisados que podem 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.

### **1.1.2.3 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 (Fengel e Wegener 1983). Apresenta uma estrutura tridimensional complexa e de difícil degradação microbiana.

As suas funções biológicas são o revestimento das fibras de celulose conferindo-lhes um carácter hidrofóbico. A sua estrutura química difere também consoante seja originária de madeiras folhosas ou resinosas. As folhosas apresentam, em média, maior quantidade de polissacáridos e extractivos, enquanto que as resinosas possuem teores de lenhina mais elevados

Sendo a sua natureza química diferente da dos polissacáridos, as reacções de hidrólise ácida, enzimática ou usando meios alcalinos, afectam pouco a lenhina, sendo por isso um dos polímeros naturais mais resistentes. No entanto, a lenhina é mais sensível que os polissacáridos a reacções de oxidação ou à acção de solventes orgânicos.

#### ***1.1.2.4 Compostos de baixa massa molecular/extractivos***

Para além dos componentes estruturais da parede e de outros materiais poliméricos, estão presentes nas células vegetais muitos outros compostos, usualmente designados como acessórios ou extractivos (Fengel e Wegener 1983). Representam, em geral uma pequena fracção dos materiais lenhocelulósicos, contudo podem ter influência nas suas propriedades e afectar o seu processamento. Estes compostos podem ser divididos em orgânicos (extractivos) e inorgânicos (cinza).

Os extractivos podem ser principalmente classificados nos seguintes grupos: terpenóides, compostos fenólicos, ésteres de ácidos gordos (gorduras e ceras) e alcalóides. Dos extractivos fenólicos fazem parte compostos como os flavonóides e taninos. Nos extractos de solventes polares podem também estar presente hidratos de carbono na forma de monómeros ou polioes solúveis (Alén 2000; Fengel e Wegener 1983; Pereira *et al.* 2003).

Os compostos inorgânicos incluem elementos como o potássio, magnésio e silício (Alén 2000; Fengel e Wegener 1983). Os materiais não-lenhosos apresentam, comparativamente às madeiras, um teor mais elevado em compostos inorgânicos, principalmente de sílica (Alén 2000).

## **1.2 Sorgo**

Ao longo dos últimos anos, o etanol com origem no milho tem sido amplamente promovido como sendo a principal fonte renovável de energia de cariz agrícola, particularmente nos EUA. Contudo, estão hoje identificadas outras culturas, perenes e/ou anuais, caracterizadas pela sua elevada eficiência na conversão de energia solar em biomassa. O sorgo é uma dessas culturas (Monteiro 2007).

O sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) é uma gramínea do tipo C4 originária de África que se estendeu a outras regiões do globo, nomeadamente Ásia, Europa e Austrália, sendo uma cultura adequada para climas mediterrânicos. Caracteriza-se por ser resistente à exposição solar, pela sua capacidade de captar grandes quantidades de CO<sub>2</sub> da atmosfera e alta eficiência fotossintética. Caracteriza-se principalmente por poder crescer em solos áridos, ser tolerante à seca, produzir elevados rendimentos de biomassa e apresentar baixa necessidade de fertilizantes. Possui ainda

um elevado potencial para melhoramento genético ainda só parcialmente explorado (Rooney *et al.* 2007).

A planta pode crescer até uma altura que varia entre 120 e 400 cm, dependendo da variedade, das condições de crescimento e se a colheita é anual ou perene (Gnansounou *et al.* 2005).

Devido à sua domesticação a nível mundial, o sorgo tornou-se a quinta cultivar de cereais mais importante em termos mundiais logo a seguir ao arroz, trigo, milho e cevada (Vázquez *et al.* 2007).

Quanto às suas aplicações, o sorgo começou por ter uma aplicação essencialmente na alimentação animal, nomeadamente como pastagem, na produção de silagem e palha para ruminantes e grãos e sementes para alimentação de aves. Posteriormente, o sorgo começou a ser utilizado para produção de etanol, nomeadamente no Brasil. Sendo um material lenhocelulósico, o sorgo tem potencialidades para ser utilizado na produção de electricidade, biogás, fertilizantes, bioplásticos e outros polímeros, substitutos de pasta de papel, açúcar, bebidas, carvão, e para obtenção de produtos de valor acrescentado (Monteiro 2007).

Recentemente, nos EUA a farinha de sorgo tem sido utilizada em produtos alimentares sem glúten (Vázquez *et al.* 2007).

As variedades de sorgo actualmente mais cultivadas podem ser agrupadas em três tipos principais: sorgo forrageiro, doce e biomassa, que se distinguem pela sua composição química, características morfológicas (porte e quantidade de grãos) e aplicações.

O sorgo forrageiro, tal como o próprio nome indica, é utilizado principalmente na alimentação animal, com a produção de silagem, o corte para verde, e a pastagem directa. Uma das características principais que o distingue dos outros tipos de sorgo é a sua grande capacidade de afilhamento e potencial rebentação após cada corte (Agroquisa 2009).

O sorgo doce é o tipo de sorgo mais estudado em trabalhos de investigação. Tal como o nome indica, é o sorgo com maior teor de açúcar (sacarose, glucose e frutose), que se acumula principalmente no caule da planta, pelo que pode ter aplicações semelhantes à cana-de-açúcar, nomeadamente para extracção de açúcar e produção etanol, servindo de substituto desta espécie em zonas onde esta não pode ser produzida (Rooney *et al.* 2007). Apesar de ser originário dos trópicos, como todos os outros tipos, o sorgo doce adapta-se bem a climas temperados (Rooney *et al.* 2007).

O sorgo biomassa ou sorgo celulósico, também tem aplicações semelhantes aos anteriores, nomeadamente na alimentação animal, pastagem directa, conseguindo alcançar rendimentos de biomassa mais elevados em ambientes limitados de água (Habyarimana 2004).

Em suma, o sorgo é um recurso cuja produção é relativamente barata, renovável, tolerante a condições adversas e de fácil adaptabilidade o que o torna uma cultura potencial para produção de bioenergia e produtos de valor acrescentado.

O fraccionamento da hemicelulose do sorgo, nomeadamente utilizando processos de hidrólise para a obtenção de soluções ricas em xilose passíveis de uma bioconversão posterior, pode ser uma boa alternativa de uso deste recurso tão abundante. Esta aplicação permite assim, a valorização da fracção hemicelulósica, que pela sua natureza heterogénea e riqueza em pentoses tem uma valorização mais difícil que a celulose, contribuindo simultaneamente para a eliminação de “desperdícios” e a produção de produtos de valor acrescentado (Herrera *et al.* 2003).

### **1.3 Fraccionamento de materiais lenhocelulósicos**

Como foi referido, para a utilização e valorização dos materiais lenhocelulósicos é fundamental o seu fraccionamento, uma vez que permite a separação dos seus componentes poliméricos.

Podemos definir o fraccionamento da biomassa lenhocelulósica como um conjunto de processos físicos e/ou químicos e/ou biológicos, que conduzem a uma separação selectiva dos diferentes componentes que a constituem. A principal limitação desta estratégia reside na dificuldade de separação de um tipo de componente sem que ocorra alguma degradação na estrutura química dos restantes, pelo que a selecção criteriosa das condições operacionais é fundamental.

As diferentes propriedades físicas e químicas da celulose, hemicelulose e lenhina reduzem os métodos disponíveis para a obtenção de uma separação selectiva destes polímeros, a um número reduzido de processos. A hemicelulose é a fracção mais facilmente hidrolisável enquanto a lenhina é fracamente alterada pelo ácidos e permanece assim como resíduo sólido. Em geral, os polissacáridos são difíceis de oxidar, porém a lenhina degrada-se por métodos oxidativos.

Os polissacáridos como a celulose e as hemiceluloses podem ser hidrolisados em meio ácido, dando origem a misturas de açúcares.

Consoante o reagente utilizado, os métodos de hidrólise de polissacáridos podem ser classificados em métodos ácidos (diluídos e concentrados), métodos hidrotérmicos, métodos enzimáticos e alcalinos. Nestes últimos, é habitual falar-se em solubilização em vez de hidrólise em consequência dos mecanismos envolvidos como se verá mais adiante.

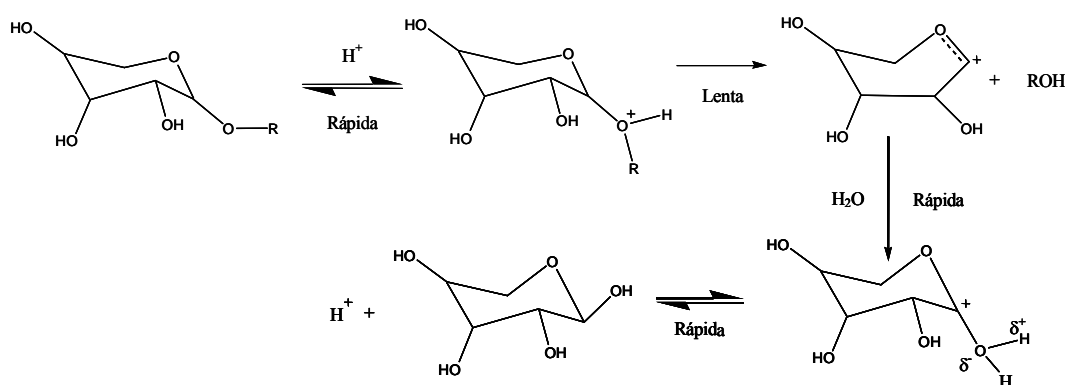
#### **1.3.1 Hidrólise**

A estrutura polimérica dos materiais lenhocelulósicos torna difícil a utilização directa dos seus componentes pela maior parte dos microrganismos. Torna-se então necessário recorrer a

tratamentos de hidrólise dos polissacáridos de forma a tornar os monossacáridos acessíveis. Em geral, o primeiro passo de fraccionamento (pré-tratamento) consiste na hidrólise selectiva das hemiceluloses. Para além de remoção das hemiceluloses permite uma maior acessibilidade para o fraccionamento dos restantes componentes, principalmente da celulose e lenhina. Estes métodos podem ser classificados em função de agente reactivo e podem apresentar alguma complexidade devido à heterogeneidade do meio reaccional, isto é, pelo facto de o substrato se encontrar na fase sólida e o catalizador na fase líquida (Herrera *et al.* 2004).

### 1.3.1.1 Hidrólise ácida

O mecanismo de hidrólise ácida envolve três passos principais: no primeiro dá-se a protonação do oxigénio da ligação glicosídica seguidamente ocorre a ruptura dessa ligação com formação de um carbocatião e no fim dá-se a regeneração do ião  $H_3O^+$ , por reacção do carbocatião com uma molécula de água, formando uma molécula final estável (Figura 1.2).



**Figura 1.2** Mecanismo proposto para a cisão das ligações glicosídicas na despolimerização das hemiceluloses em meio ácido (Adaptado de Belkacemi *et al.* 1991).

Uma vez que as hemiceluloses não possuem uma estrutura cristalina como a apresentada pela celulose são solubilizadas muito mais facilmente do que a celulose. Assim, devido a estas diferenças de características entre a celulose e a hemicelulose, é possível seleccionar as condições de operação de forma que a hidrólise seja mais selectiva. Deste modo, podem hidrolisar-se os materiais lenhocelulósicos com ácido diluído a temperaturas elevadas que solubilizam quase a totalidade das hemiceluloses ou utilizar-se ácido concentrado a temperaturas moderadas e provocar a hidrólise total da celulose e das hemiceluloses, permanecendo a lenhina como resíduo insolúvel.

As condições de operação vão depender assim dos objectivos que se pretendam.

### ***Hidrólise com ácidos concentrados***

Os ácidos concentrados podem atacar as pontes de hidrogénio existentes entre as cadeias de celulose, destruindo a sua cristalinidade. A hidrólise com ácido concentrado ocorre geralmente a temperaturas moderadas, 20-50°C. Com estas condições pretende-se reduzir as reacções de degradação que ocorrem paralelamente, permitindo a obtenção de elevados rendimentos em açúcares em tempos eventualmente curtos, dependendo da concentração de ácido e da temperatura (Goldstein 1983; Wright 1988).

Os ácidos podem permitir a despolimerização completa dos polissacáridos, obtendo-se uma fase sólida constituída essencialmente por lenhina. Os ácidos mais utilizados são o sulfúrico e o clorídrico, embora também possa ser utilizado o ácido trifluoracético (TFA). A solubilização dos polissacáridos é possível utilizando variadas concentrações, por exemplo, 72% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 41% de HCl ou 100% de TFA (Fengel e Wegener 1983). Os dois últimos ácidos apresentam a vantagem de serem relativamente fáceis de recuperar.

A recuperação do ácido é um passo essencial para a economia destes processos pelo que apesar de poderem ser aplicados com algum sucesso, os custos envolvidos nos processos que utilizam ácido concentrado têm impedido a generalização do seu uso. Além do custo associado à neutralização e recuperação do ácido, os problemas de corrosão dos equipamentos constituem outra das desvantagens (Ogier *et al.* 1999; Parisi 1989; Saska e Ozer 1995).

### ***Hidrólise com ácidos diluídos***

A hidrólise com ácido diluído, também designada pré-hidrólise ácida, é um método vulgarmente utilizado para hidrolisar as hemiceluloses a temperaturas elevadas (120-200°C) (Torget *et al.* 1991) deixando a lenhina e a maior parte da celulose na fase sólida. O ácido mais utilizado é o H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, aparentemente por ser barato e eficaz, embora também sejam utilizados HCl, HNO<sub>3</sub>, HF e H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (Mosier *et al.* 2005; Parisi 1989).

Este processo apresenta, em relação ao anterior, as vantagens de menor formação de produtos indesejáveis e menores problemas de corrosão. Contudo, os custos associados são bastante elevados pela necessidade de operar a temperaturas elevadas (Sun e Cheng 2002).

Na literatura encontram-se descritas uma grande diversidade de condições de hidrólise com ácido diluído. No Quadro 1.1 apresentam-se alguns exemplos dessas condições operacionais para diferentes tipos de matérias-primas. As diferenças entre os vários trabalhos relacionam-se com o tipo de ácido utilizado, a concentração de ácido, temperatura e a duração do processo utilizados para diferentes matérias-primas.

**Quadro 1.1** Condições operacionais utilizadas na hidrólise com ácido diluído de diferentes materiais lenhocelulósicos.

Material	Ácido	Concentração de ácido (%)	Temperatura (°C)	Duração (min)	Referências
<b>Resíduos agro industriais</b>					
Cana-de-açúcar	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4	120-140	20	(Watson <i>et al.</i> 1984)
Carolo de milho	HCl	2	100	120	(Domínguez <i>et al.</i> 1997a)
Palha de arroz	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3	140-145	20	(Roberto <i>et al.</i> 1996)
Sorgo	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	6	134	300	(Vázquez <i>et al.</i> 2007)
<b>Madeiras Folhosas</b>					
Carvalho	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,5	190	30	(Wilson <i>et al.</i> 1989)
Eucalipto	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3	100-130	60	(Parajó <i>et al.</i> 1997b)
Faia	HCl	2,5	165-240	20-40	(Prior <i>et al.</i> 1989)
<b>Madeiras Resinosas</b>					
Abeto	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,4	200	30	(Palmqvist <i>et al.</i> 1998)

A hidrólise com ácido diluído é, em geral, a principal escolha para a hidrólise selectiva das hemiceluloses a monossacáridos, uma vez que é um método rápido e eficaz. Contudo, é necessário um cuidado especial na optimização das condições operacionais usadas na hidrólise para aumentar a recuperação de monossacáridos e minimizar a formação de produtos de degradação que, para além de reduzirem os rendimentos em açúcares são potencialmente inibidores do metabolismo microbiano (Carvalheiro *et al.* 2004a).

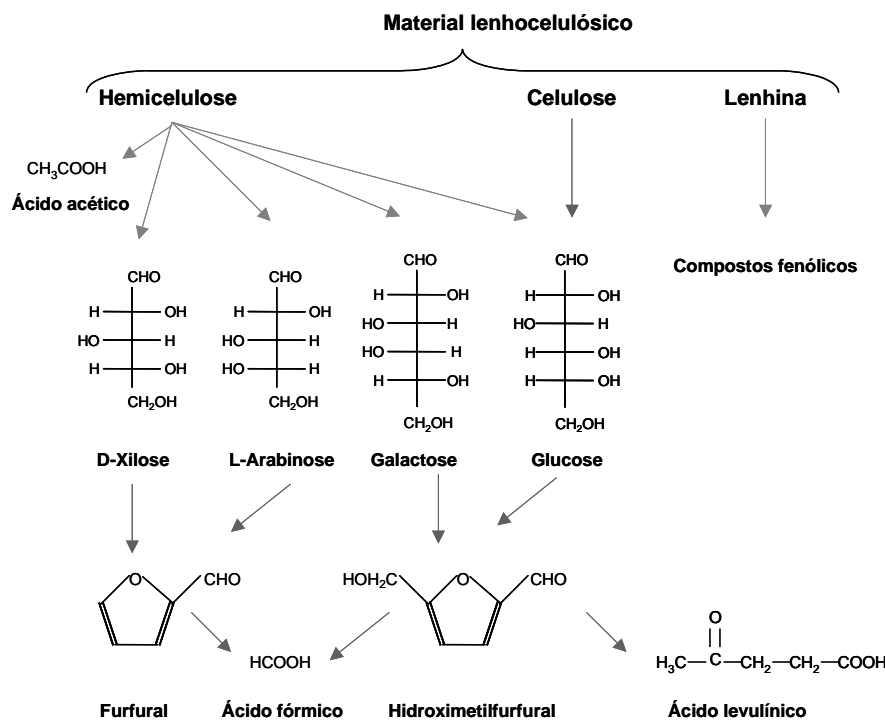
Estes compostos são usualmente divididos nos seguintes grupos: derivados do furano, ácidos alifáticos e compostos fenólicos. A natureza e quantidade de compostos inibidores dependem da matéria-prima e dos processos de hidrólise utilizados.

Os derivados do furano são compostos que resultam da degradação dos monossacáridos pelo efeito da temperatura (desidratação). O furfural resulta da degradação das pentoses e o hidroximetilfurfural (HMF) da degradação das hexoses.

Os ácidos alifáticos são compostos que podem resultar de reacções de degradação ou da hidrólise da própria hemicelulose. O ácido acético, por exemplo, provém da hidrólise dos grupos acetilo das hemiceluloses e é o ácido fraco mais abundante nos hidrolisados. Os ácidos fórmico e levulínico são, geralmente, produtos resultantes da degradação do HMF, sendo que o ácido fórmico também pode ser formado a partir dos grupos metoxilo, da hemicelulose ou da

degradação do furfural. O efeito tóxico destes compostos é função da concentração da sua forma não-dissociada, e aumenta com a diminuição do pH do meio e do pKa do respectivo ácido.

Compostos fenólicos são compostos que resultam da solubilização da lenhina e incluem ácidos, álcoois e aldeídos aromáticos e cetonas de Hibbert, sendo os mais tóxicos os de baixa massa molecular.



**Figura 1.3** Principais produtos resultantes da hidrólise de um material lenhocelulósico (Adaptado de Palmqvist, E e Hahn-Hägredal, B. 2000).

### 1.3.1.2 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 solubilização parcial ou total das mesmas. O objectivo destes métodos em geral é a solubilização das hemiceluloses, deixando a celulose mais acessível para uma posterior hidrólise (Hörmeyer *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 que nos processos que utilizam ácidos se obtêm fundamentalmente monossacáridos.

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

### ***Auto-hidrólise***

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

Neste caso, os catalisadores da hidrólise são, numa primeira fase 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 actuam como catalisadores (Garrote 2001). Uma vez que os açúcares são principalmente obtidos na forma oligomérica este poderá ser um processo preferencial para obtenção de oligossacáridos (Garrote *et al.* 2002) que são compostos potencialmente prebióticos (Moura *et al.* 2007).

Pelo facto de não ser utilizado outro reagente químico para além da água, a auto-hidrólise apresenta algumas vantagens nomeadamente problemas de corrosão reduzidos (Abatzoglou *et al.* 1992), os passos de reciclagem de ácidos ou remoção de precipitados não são necessários, simplificando assim o processo. A possibilidade de redução de custos operacionais e de capital, pela não utilização de ácidos, evidenciam as vantagens económicas dos tratamentos aquosos relativamente a outras tecnologias (Kubikova *et al.* 1996), além do impacto ambiental reduzido (Overend e Chornet 1987).

### ***Explosão com vapor***

A explosão de vapor utiliza vapor de água saturado para o aquecimento, o que permite aumentar a velocidade de transferência de calor. Uma vez decorrido o tempo de operação pretendido, o material é sujeito a uma descompressão súbita, o que provoca a vaporização da água contida nas fibras, resultando uma explosão. As forças resultantes da descompressão provocam uma desagregação da matriz lenhocelulósica, rompendo ligações inter e intra-moleculares (Carrasco 1989). Devido à descompressão ocorrem ainda modificações ultra-estruturais, nomeadamente despolimerização e degradação considerável das fibras do material (Garrote 1997).

Este método é fundamentalmente utilizado como pré-tratamento antes da hidrólise enzimática da celulose. Para a obtenção de hidrolisados hemicelulósicos tem como desvantagem o facto de se obter uma elevada degradação dos açúcares.

#### ***1.3.1.3 Métodos alcalinos***

As reacções de hidrólise de polissacáridos também podem ocorrer em meio alcalino. Os reagentes mais utilizados são o NaOH ou KOH em concentrações que variam, em geral entre os 2 e os 18%. Estes métodos utilizam condições moderadas de operação (temperatura e pressão)

em comparação com a hidrólise ácida, por exemplo. Estes processos conduzem a uma redução da cristalinidade da celulose, fazendo o aumento da superfície de contacto e a porosidade da mesma (Baudel 2006). A desvantagem deste tipo de sistema alcalino está parcialmente associada à dificuldade de recuperação das bases, de modo a garantir a necessária viabilidade económica do processo.

#### 1.3.1.4 Hidrólise enzimática

O processo de hidrólise enzimática é um processo utilizado para hidrolisar a fracção celulósica e/ou hemicelulósica por acção de enzimas celulolíticas e/ou xilanolíticas. Este método tem surgido sobretudo associado à produção de etanol por permitir uma conversão quase quantitativa da celulose a glucose (Capek-Ménard *et al.* 1987; Fengel e Wegener 1983). Contudo, para proceder à hidrólise da celulose é necessário um pré-tratamento do material de modo a tornar aquele componente acessível às enzimas e permita que a despolimerização ocorra em tempo útil (Wright 1988).

Uma das vantagens deste processo reside na utilização de temperaturas moderadas, em meios não corrosivos, estando implicitamente ligadas às vantagens económicas em termos de equipamento e energia. No entanto, apresenta desvantagens de produtos formados poderem inibir as enzimas, causando decréscimo da eficiência da hidrólise (Palmqvist *et al.* 2000), o custo da enzima bem como a sua recuperação no final do processo (Parisi 1989). Por outro lado, é um processo mais moroso do que por exemplo, a hidrólise ácida e necessita de um pré-tratamento prévio (Duarte *et al.* 2004).

#### 1.3.2 Factor de severidade

A composição química dos hidrolisados hemicelulósicos obtidos através de uma hidrólise com ácido da biomassa vegetal varia de acordo com uma série de factores tais como natureza da matéria-prima, concentração de ácido, temperatura utilizada no processo de hidrólise e tempo de reacção. A temperatura utilizada, por exemplo, influencia fortemente a concentração dos produtos de degradação presentes no hidrolisado (Palmqvist *et al.* 2000).

Com base na necessidade de encontrar expressões que englobassem as diferentes variáveis operacionais de forma a permitir a comparação de experiências realizadas em diferentes condições Overend e Chornet (1987) propuseram o *factor de severidade* ( $R_0$ ), desenvolvido com base no conceito de índice de severidade utilizado na indústria do petróleo e que se traduz pela seguinte expressão:

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

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

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

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

#### 1.4 Métodos de destoxificação

De modo a evitar a inibição do crescimento microbiano em hidrolisados, pode proceder-se à remoção dos compostos inibidores através de diversos métodos de destoxificação ou, por outro lado, utilizar métodos de hidrólise suaves, como por exemplo a hidrólise com ácidos diluídos em que a formação destes seja, tanto quando possível, minimizada (Palmqvist *et al.* 2000).

Os métodos de destoxificação podem agrupar-se basicamente em dois grupos, os métodos físico-químicos e os biológicos. Os métodos de destoxificação físico-químicos incluem ajuste do pH, “overliming”, evaporação, tratamento com sulfito, resinas de troca iónica, carvão activado, destilação, extracção com solventes e exclusão molecular. O ajuste do pH constitui um método químico de destoxificação que consiste em aumentar o pH ácido do hidrolisado, utilizando, por exemplo,  $\text{Ca(OH)}_2$ ,  $\text{CaO}$ ,  $\text{NaOH}$ ,  $\text{KOH}$  até valores próximos da neutralidade e adequados à actividade microbiana. Nestas condições ocorre também precipitação de compostos fenólicos, metais pesados, furfural, acetato e terpenos (Frazer e McCaskey. 1989; Lee e McCaskey 1983) e o precipitado é posteriormente removido.

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

A adsorção com carvão activado é um método de destoxificação, em que o hidrolisado pode ser tratado de duas formas: por passagem numa coluna empacotada com carvão, ou simplesmente colocado em contacto com o carvão activado num processo descontínuo. Este tratamento permite a remoção de ácido acético, compostos fenólicos (Browning 1967; Tran e Chambers 1986), HMF e furfural (Carvalho *et al.* 2004b).

Os tratamentos de destoxificação com resinas de troca iónica têm sido descritos como eficientes para a remoção de ácido acético, além de permitirem a remoção, em geral, de todos os compostos inibidores habitualmente presentes nos hidrolisados (Larsson *et al.* 1999b). As resinas

de troca aniónica permitem uma maior remoção de ácido acético relativamente às resinas de troca catiónica, além de uma redução significativa dos restantes compostos inibidores (Carvalho *et al.* 2004b).

O método de evaporação, geralmente utilizado para aumentar a concentração de açúcares no hidrolisado permite a remoção de compostos voláteis, tais como, ácido acético e furfural (Parajó *et al.* 1996b).

Outro método eficiente de remoção de inibidores é a extração com solventes orgânicos (benzeno, acetato de etilo, éter dietílico, clorofórmio e hexano) (Wilson *et al.* 1989).

Um outro método possível consiste no tratamento com sulfito em que os hidrolisados são neutralizados, geralmente com  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ , permitindo a remoção de furfural e HMF (Larsson *et al.* 1999b).

Os métodos biológicos englobam os tratamentos com enzimas ou microrganismos, como por exemplo, as enzimas peroxidase e lacase, obtidos a partir de fungos e que permitem sobretudo a remoção de compostos fenólicos de baixa massa molecular (Palmqvist *et al.* 1998).

Convém referir, que os métodos de destoxificação podem conduzir também a uma perda de açúcares, nomeadamente aqueles que utilizam carvão activado (Carvalho *et al.* 2004b; Parajó *et al.* 1996a) e resinas de troca aniónica, além de aumentarem os custos inerentes ao processo, devendo então seleccionar-se um processo de destoxificação económico e eficiente (Larsson *et al.* 1999b).

## 1.5 Xilitol

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

O xilitol é um poliól ( $\text{C}_5\text{H}_{12}\text{O}_5$ ) que se designa como xilo-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, pêras), legumes (alface, couve-flor, espinafre, chicória) (Hyvonen *et al.* 1982) e árvores (videiro) (Winkelhausen e Kuzmanova 1998).

### 1.5.1 Propriedades e aplicações

O principal interesse do xilitol, resulta do seu potencial como edulcorante alternativo, uma vez que apresenta um baixo valor calórico (4,0 kcal/g) e um poder adoçante semelhante ao da sacarose e superior ao de outros polióis.

O valor comercial do xilitol, assim como o seu mercado, que continua a crescer, advêm de um conjunto de propriedades físicas, químicas e tecnológicas vantajosas deste produto para utilização nas indústrias alimentar, cosmética e farmacêutica.

No Quadro 1.2 apresentam-se algumas das propriedades fisico-químicas do xilitol.

**Quadro 1.2** Propriedades físicas e químicas do xilitol (Adaptado de Peito, M.A. 1992)

Fórmula química	$C_5H_{10}O_5$
Massa molecular ( $g \cdot mol^{-1}$ )	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 ( $^{\circ}C$ ) a 1 atm	126,0
pH em solução aquosa ( $0,1g \cdot L^{-1}$ )	5 a 7
Densidade	1,52
Calor de dissolução ( $cal \cdot g^{-1}$ )	-34,80
Solubilidade ( $g \cdot 100 mL^{-1} H_2O$ a $20^{\circ}C$ )	168,0
Temperatura de fusão ( $^{\circ}C$ )	93,0-94,5
Energia ( $kcal \cdot g^{-1}$ )	4,0

Inicialmente o interesse pelo xilitol surgiu devido ao seu poder edulcorante. No entanto, a sua característica mais importante, e que o distingue de outros edulcorantes, relaciona-se com as suas propriedades não-acidogénicas, anticariogénicas e de promoção da remineralização dos dentes, que o tornam um agente importante em termos de saúde oral na prevenção de cárie dentária.

No que diz respeito às suas aplicações, o xilitol é actualmente utilizado na indústria alimentar em pastilhas elásticas, iogurtes, sobremesas congeladas, gelados, compotas, produtos de confeitaria, chocolates, e coberturas para bolos, na indústria farmacêutica como edulcorante ou excipiente na formulação de xaropes e preparações de vitaminas (geralmente em combinação com o manitol, sorbitol e ácido cítrico) na formulação de suplementos dietéticos (aminoácidos, vitaminas) e, principalmente, em produtos de higiene oral como pastas dentífricas e em bebidas dietéticas

(Sakakibara *et al.* 2009). Este poliól é também indicado para diabéticos, uma vez que a metabolização é independente da insulina (Sakakibara *et al.* 2009) e também no tratamento de lesões renais, prevenção de otites ou alterações no metabolismo dos lípidos (Silva 1999).

Apesar de todas estas vantagens na utilização de xilitol, o seu uso tem sido relativamente restrito, principalmente devido ao seu custo. Em 1998 o mercado mundial de xilitol era de cerca de 30.000 ton, e apresentava um crescimento anual de 20% (Llorente *et al.* 1999). Para a baixa quota de mercado do xilitol, relativamente a outros edulcorantes, contribui o seu custo de produção, comparativamente mais elevado que o sorbitol.

Em 1999, o preço de mercado do xilitol era de 3-3,6 euros/kg (Llorente *et al.* 1999). Em 2005 o preço do xilitol situava-se entre 5 e 5,7 euros/kg ([www.chemicalregister.com](http://www.chemicalregister.com); [www.emeraldforesxylitol.com](http://www.emeraldforesxylitol.com)), actualmente o preço deste poliól situa-se nos mesmos valores, que significa que o mercado do xilitol não tem crescido nos últimos 5 anos.

Note-se, no entanto, que relativamente a estes dados existe muita escassez de informação

## **1.5.2 Processos de produção de xilitol**

O xilitol pode ser obtido de várias formas: através de produção pelo método convencional que consiste na redução química da xilose presente em hidrolisados hemicelulósicos, isolamento a partir das suas fontes naturais por extracção sólido-líquido (bastante dificultada pela pouca quantidade presente nestas fontes) ou alternativamente, através da produção biotecnológica.

### **1.5.2.1 Síntese química**

Até muito recentemente, todo o xilitol produzido à escala industrial era obtido a partir da redução química da xilose (hidrogenação da xilose a xilitol na presença de um catalisador Raney-níquel) proveniente de hidrolisados hemicelulósicos, principalmente a partir de madeiras folhosas. A produção de xilitol por métodos químicos envolve os seguintes passos principais: i) hidrólise do material lenhocelulósico, ii) Purificação do hidrolisado para obter xilose, iii) hidrogenação da xilose a xilitol, iv) purificação e cristalização do produto (Hyvonen *et al.* 1982; Melaja e Hämäläinen 1977).

O passo de purificação do produto (ii), ainda que possa ou não ser realizado, é importante tendo em conta a não especificidade do catalisador da reacção, que catalisa também a redução de outros açúcares presentes nos hidrolisados, complicando e tornando mais dispendioso ainda a etapa seguinte de purificação.

### 1.5.2.2 Produção biotecnológica

Sendo o rendimento em xilitol a partir dos xilanos cerca de 50-60%, ou seja, 8-15% dos materiais lenhocelulósicos (Winkelhausen e Kuzmanova 1998), e tendo em conta os custos dos passos de purificação e separação (os mais dispendiosos) os processos de produção de xilitol que utilizam microrganismos constituem, cada vez mais, uma alternativa aos processos químicos e é sobre eles que têm incidido muitos trabalhos de investigação relacionados com a produção de xilitol desde o final da década de 80 (Nigam e Singh 1995).

A produção biotecnológica de xilitol tem sido descrita por vários grupos de investigação nos últimos anos, considerando-se que, desde a descoberta e caracterização de vários microrganismos capazes de fermentar a xilose em xilitol, as pesquisas apontam para a possibilidade de vir a ser viável este tipo de produção alternativa (Furlan *et al.* 1991; Nolleau *et al.* 1995).

A possibilidade de se utilizar meios de cultura contendo várias fontes de carbono, sem a necessidade de purificação prévia da xilose (Silva *et al.* 1994), constitui uma das grandes vantagens do processo microbiológico em relação ao processo químico, atendendo aos elevados rendimentos em xilitol obtidos com alguns microrganismos neste meio. A produção microbiológica de xilitol vem também reduzir a formação de substâncias potencialmente inibidoras (Silva *et al.* 1994), sendo o produto obtido mais adequado para utilização na indústria alimentar. Outra vantagem diz respeito ao custo dos equipamentos associados a este processo que são inferiores aos do processo químico, pelo facto de decorrer a temperaturas e pressões moderadas, sendo no entanto, mais moroso.

A síntese microbiológica de xilitol pode ser realizada por leveduras, bactérias, fungos ou utilizando enzimas purificadas provenientes destes microrganismos (Domínguez *et al.* 1999).

#### 1.5.1 Microrganismos produtores de xilitol

Embora em pequeno número, têm sido identificados bactérias, fungos e leveduras capazes de utilizar a xilose como fonte de carbono e energia. Algumas bactérias como *Corynebacterium* sp. (Yoshitak e Shimamur 1973), *Enterobacter liquefaciens* (Lee e McCaskey 1983) e *Mycobacterium smegmatis* (Sugai e Delgenes 1995) têm sido descritas como produtoras de xilitol. No entanto, devido às pequenas quantidades de xilitol produzidas (Winkelhausen e Kuzmanova 1998), não têm atraído um grande interesse de investigação.

No que diz respeito aos fungos filamentosos, para produção de xilitol, está descrita a sua produção por *Petromyces albertensis* (Bicho *et al.* 1988).

De entre os microrganismos, alvo de estudos realizados, 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 em leveduras.

A capacidade que as leveduras possuem em produzir xilitol a partir de D-xilose foi descrita primeiramente por Onishi e Suzuki (1966). As leveduras são produtoras de xilitol por excelência e destas destacam-se as pertencentes ao género *Candida*: *C. guilliermondii* (Barbosa *et al.* 1988; Roberto *et al.* 1991), *C. tropicalis* (Barbosa *et al.* 1988), *C. parapsilosis* (Furlan *et al.* 1991), *C. pelliculosa* (Kitpreechavanich *et al.* 1984), *C. boidinii* (Vandeska *et al.* 1995), *C. mogii* (Kitpreechavanich *et al.* 1984), *C. entomaea* (Saha e Bothast 1996), *C. peltata* (Saha e Bothast 1999), *C. magnoliae* (Horiuchi e Tada 2008) e a espécie *Debaryomyces hansenii* (Amaral-Collaço *et al.* 1989; Parajó *et al.* 1995) que produzem xilitol como produto principal. 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).

#### **1.5.1.1 A levedura *Debaryomyces hansenii***

*Debaryomyces hansenii* (forma anamórfica: *Candida famata*) é uma espécie das quinze do género *Debaryomyces*, caracterizada pela apresentação de reprodução vegetativa por gemulação multilateral e pela capacidade de formar ou não um pseudomicélio primitivo ou por vezes bem desenvolvido. Neste género há possibilidade de ocorrência de conjugação isogâmica ou heterogâmica formando-se um a dois esporos, esféricos ou ovais, por asco. A não assimilação de nitratos e a possibilidade de assimilação de nitritos são outras das características típicas (Barnett 2000; Kreger 1984).

A espécie *D. hansenii* é composta pelas variedades *hansenii* e *fabryii*.

O ecossistema marinho é um dos principais habitats a que esta levedura aparece associada, embora tenha também sido isolada de cana-de-açúcar (Amaral-Collaço *et al.* 1989; Peito 1992), material dermatológico (Stenderup 1992) e diversos alimentos processados.

Esta levedura tem diversas aplicações biotecnológicas, nomeadamente em produtos de salsicharia (Encinas *et al.* 2000) e queijos (Fleet 1990). Nestes é uma das espécies mais comuns, e contrariamente a outras espécies a sua prevalência não depende do tipo de queijo. Encontra-se também em estudo a sua utilização em iogurtes e é uma das espécies de leveduras mais comuns associadas a alimentos congelados (Guerzoni *et al.* 1993).

*Debaromyces hansenii*, sendo uma espécie halotolerante capaz de crescer em meios com concentrações de NaCl até 4,1 M, apresenta também potencialidades na produção de glicerol, que em conjunto com o arabitól, são os principais solutos compatíveis produzidos e acumulados como resposta da levedura ao stress osmótico (Adler e Gustafsson 1980; da Costa *et al.* 1989).

Para além das aplicações anteriores apresenta também potencialidades na produção de riboflavina (Buzzini e Rossi 1997) e principalmente xilitol (Amaral-Collação *et al.* 1989; Parajó *et al.* 1995; Sampaio *et al.* 2004). O potencial interesse desta levedura, está relacionado com o facto de para além da capacidade comprovada de utilizar a generalidade de monossacáridos presentes em hidrolisados hemicelulósicos, xilose, arabinose, glucose, galactose e manose (Tavares *et al.* 2000), consegue utilizar de forma muito eficaz a xilose como única fonte de carbono e energia, o que representa um aspecto muito importante para a bioconversão dos hidrolisados hemicelulósicos, sendo referida como uma das leveduras mais importantes para mediar a conversão daquela pentose a xilitol como produto principal.

#### **1.5.1.2 Metabolismo da D-xilose em *Debaryomyces hansenii***

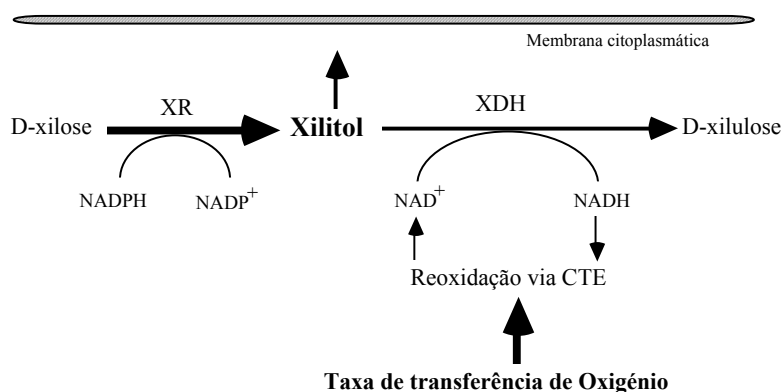
A D-xilose é uma aldopentose e representa o principal açúcar constituinte da fracção hemicelulósica de biomassa vegetal.

A conversão eficiente dos açúcares resultantes da hidrólise dos materiais lenhocelulósicos depende da forma como se efectua o transporte através da membrana plasmática, dependendo este de uma série de factores ambientais tais como o oxigénio disponível, pH, temperatura, mistura de açúcares e das concentrações de etanol e ácido acético (Spencer *et al.* 1988).

A utilização da D-xilose por microrganismos pode ser efectuada por três vias metabólicas diferentes: isomerização de D-xilose a D-xilulose, redução de D-xilose a xilitol e oxidação de D-xilose a xilano- $\gamma$ -lactona. A enzima responsável pela isomerização de D-xilose a D-xilulose é a xilose-isomerase que se encontra predominantemente em células procariotas (Jeffries 1983). A oxidação de D-xilose a xilano- $\gamma$ -lactona é efectuada, exclusivamente, por alguns géneros de bactérias tais como, por exemplo, *Pseudomonas* e *Gluconobacter*, sendo neste caso o enzima responsável a xilose-desidrogenase (DXH).

O metabolismo da D-xilose possui dois passos iniciais fundamentais para o controlo da produção de xilitol: o primeiro passo é catalisado pelo enzima xilose-redutase (XR) e origina xilitol a partir da redução da xilose, dependendo da presença de NAD(P)H. O segundo passo é catalisado pelo enzima xilitol-desidrogenase (XDH) que oxida o xilitol em xilulose e está associado à presença de NAD<sup>+</sup>. A formação destas enzimas é induzida pela própria presença de xilose, e não pela activação de formas enzimáticas pré-existentes. O oxigénio tem sido referido como factor

que regula a indução destes enzimas, sendo o seu papel a regeneração dos co-factores fortemente depende da disponibilidade daquele gás.



**Figura 1.4** Passos iniciais do metabolismo da D-xilose em *Debaryomyces hansenii* e mecanismo bioquímico da acumulação de xilitol. (Adaptado de Carvalheiro, 1997).

As leveduras que metabolizam a D-xilose podem ser incluídas em dois grupos distintos, sendo a classificação feita com base na especificidade da enzima XR em relação aos co-factores NADPH e NAD<sup>+</sup> como também nas concentrações relativas de produtos formados em diferentes condições de arejamento. As leveduras que possuem uma XR especificamente dependente do NADPH (*Cândida tropicalis*, *C. guilliermondii*) (Amaral-Collaço *et al.* 1989) e as leveduras em que a XR utiliza como co-factores quer o NADPH quer o NADH, tais como *C. shehatae*, *P. tennophilus*, *P. stipilis* (Gírio e Roseiro 1993). Sendo a XR de *D. Hansenii* classificada como exclusivamente dependente do NADPH, esta não fermenta D-xilose em anaerobiose (Carvalheiro 1997).

Em condições semi-aeróbias a taxa de oxidação de NADH é limitada, o que acoplado à impossibilidade da sua regeneração pela XR, leva a que ocorra uma acumulação intracelular de NADH. Este facto conduz à inibição da actividade de XDH, ocorrendo acumulação extracelular de xilitol (Ditzelmüller *et al.* 1984; Prior *et al.* 1989).

### 1.5.2 Factores que influenciam a produção biotecnológica de xilitol

A bioconversão de xilose a xilitol é um processo complexo, que é influenciado por diversos factores tais como a estirpe, a idade e a concentração celular, condições de cultura e o tipo de meio de cultura, assim como também temperatura, concentração de xilose e oxigénio disponível.

### **1.5.2.1 Idade do inóculo**

A idade do inóculo tem sido citada como um factor que influencia a actividade metabólica e a viabilidade das células (du Preez 1994), afectando tanto as taxas como os rendimentos da conversão.

### **1.5.2.2 Concentração do inóculo**

O aumento da concentração inicial de células tem como consequências o aumento do rendimento e produtividade em xilitol. No entanto, em meios com elevada densidade celular, a redução da disponibilidade de oxigénio pode também conduzir a diminuição dos rendimentos e produtividades sugerindo a existência de uma concentração óptima para dadas condições operacionais, por outro lado, a utilização de concentrações celulares mais elevadas em hidrolisados lenhocelulósicos, pode minimizar o efeito inibitório de alguns componentes presentes nestes substratos.

### **1.5.2.3 pH**

O pH óptimo para leveduras situa-se, geralmente entre 4 e 6. De acordo com Domínguez *et al.* (1997b) o pH óptimo para a levedura *Debaryomyces hansenii* é de 5,5. Em hidrolisados lenhocelulósicos, a influência do pH inicial na bioconversão da xilose tem sido relacionada, em geral, com a presença de ácido acético (Felipe *et al.* 1995; Ferrari *et al.* 1992).

### **1.5.2.4 Temperatura**

As leveduras em geral apresentam temperaturas óptimas para a produção de xilitol entre 24 e 45°C, sendo a mais adequada aproximadamente 30°C.

### **1.5.2.5 Composição do meio de cultura**

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

Os estudos realizados em meio quimicamente definido contendo apenas hexoses ou pentoses demonstram que a acumulação de polióis por *D. hansenii* só ocorreu nos meios contendo pentoses. A presença de hexoses, tais como a glucose ou manose, podem inibir o metabolismo da xilose por repressão e inactivação do sistema de transporte da xilose ou de enzimas catabólicas,

mas em baixas concentrações podem levar a estimulação da produção de xilitol. A adição de fontes de azoto e de outros nutrientes tem demonstrado potenciar a bioconversão de xilose em xilitol. Como exemplo de nutrientes complexos habitualmente utilizados para suplementar meios de cultura podem referir-se o extracto de levedura (Preziosi-Belloy *et al.* 2000), a água de maceração do milho, também denominada como “corn steep liquor” (CSL), casaminoácidos e extracto de farelo de arroz (Roberto *et al.* 1996).

#### **1.5.2.6 Disponibilidade de oxigénio**

O arejamento é uma variável experimental de extrema importância uma vez que a disponibilidade de oxigénio condiciona a separação do fluxo de carbono para o crescimento e para a formação de produtos, sendo esta última favorecida em condições de limitação de oxigénio (semi-aerobiose) (Roseiro *et al.* 1991; Winkelhausen e Kuzmanova 1998). No entanto, torna-se difícil definir as condições a que corresponde essa restrição de forma a assegurar o equilíbrio entre crescimento e produção de xilitol. Além disso, o controlo do oxigénio dissolvido é tecnicamente difícil de alcançar.

Assim, o fornecimento de oxigénio constitui um parâmetro chave que determina se a xilose será fermentada ou respirada. Por isso, para um processo eficaz, é extremamente importante determinar os níveis de oxigénio que proporcionam uma utilização balanceada do carbono quer para o crescimento como para a fermentação (Winkelhausen *et al.* 1998). Uma vez que, para além da taxa de arejamento, a formação de xilitol em leveduras é muito sensível à concentração de substrato, o ideal será que estes dois parâmetros sejam primeiramente tidos em consideração simultaneamente quando se optimiza a produção de xilitol, para qualquer espécie de levedura ou tipo de meio fermentativo.

#### **1.5.2.7 Concentração de xilose**

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

### 1.5.2.8 Concentração de produto

A influência de concentração de xilitol sobre os resultados de bioconversão de xilose em xilitol tem sido pouco descrita na literatura. Em leveduras, a inibição pelo xilitol produzida foi descrita para a *Candida shehatei* (Kastner *et al.* 1996) para uma concentração extracelular de xilitol de  $50 \text{ g.L}^{-1}$ , sendo a causa da inibição associada ao transporte do xilitol através da membrana. O xilitol não é um substrato preferencial para leveduras metabolizado por leveduras que fermentam xilose, embora o consumo de xilitol e etanol pela levedura *D. hansenii* tenha sido observado após o esgotamento da xilose no meio de cultura (Medeiros 2003). Além do xilitol, podem também formar-se alguns produtos secundários em pequenas quantidades, tais como o etanol, glicerol, arabitol e ribitol. O facto de que o xilitol, quando presente em elevadas concentrações, pode ser usado como fonte de carbono para o crescimento celular foi descrito por Meirinho *et al* (citado por Gírio *et al.* 1994; Parajó *et al.* 1998b)).

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

Assim, sendo o sorgo biomassa um material lenhocelulósico com potencial para originar hidrolisados ricos em pentoses, os objectivos deste trabalho passaram, em primeiro lugar, pela optimização da pré-extracção aquosa de açúcares solúveis do sorgo biomassa, seguindo-se a optimização da hidrólise ácida selectiva da hemicelulose dessa matéria-prima. O segundo constituiu na caracterização dos três principais tipos de sorgo (biomassa, doce e forrageiro) no estado verde no que diz respeito aos açúcares presentes no suco e no licor da pré-extracção aquosa. Por fim, para avaliar a viabilidade do hidrolisado para produção de xilitol, testou-se a levedura *Debaryomyces hansenii* na produção desse poliól.

## ***2. Materiais e métodos***

### **2.1 Matérias-primas**

A principal matéria-prima utilizada neste trabalho foi sorgo biomassa (variedade H133), colhida em Setembro de 2008 e disponibilizada pela Estação Nacional de Melhoramento Plantas (Elvas, Portugal). Contudo, também foi utilizado sorgo no estado verde, das variedades doce, forrageiro e biomassa, também fornecido pela Estação Nacional de Melhoramento Plantas (Elvas, Portugal).

#### **2.1.1 Preparação da matéria-prima**

Antes da sua utilização, o sorgo biomassa (variedade H133) foi seco numa estufa a 40°C (Cassel, Portugal), de modo a obter um teor de humidade da ordem de 10%. Em seguida, foi moído (partículas <6 mm) num moinho (Fritsh Industriestr, Alemanha) e sujeito a uma pré-extracção aquosa de forma a remover os açúcares solúveis. Essa extracção foi realizada em autoclave (Uniclave, Portugal) utilizando razões líquido/sólido (RLS) de 7 e 10 (g/g), 100°C e fazendo variar o tempo de pré-extracção entre 30 e 60 min. Após arrefecimento, as fracções sólida e líquida foram separadas por prensagem. Os licores obtidos foram armazenados a 4°C até posterior utilização e os sólidos secos numa estufa (Memmert UL-40, Alemanha) a 40°C, homogeneizados e caracterizados quimicamente (ponto 2.6.1).

De forma a avaliar a eficiência da pré-extracção aquosa foi igualmente efectuada a extracção dos açúcares solúveis pelo método de Luff-Shoorl modificado (Anexo I).

Os licores obtidos por ambos os métodos de extracção foram analisados por HPLC (ponto 2.6.1.8).

#### **2.1.2 Caracterização química do sorgo verde**

O sorgo verde, dos tipos biomassa, doce e forrageiro, foi colhido em Setembro de 2009 e disponibilizado pela Estação Nacional de Melhoramento Plantas (Elvas, Portugal).

Antes da sua utilização, o material foi triturado num triturador (Vicking GE 355, Áustria) seguido de prensagem (Sotel, Portugal). Foi determinada a composição em açúcares do suco por HPLC (ponto 2.6.1.8) e avaliado o rendimento.

Os diferentes tipos de sorgo verde, bem como as amostras prensadas, foram também sujeitos a uma pré-extracção aquosa de forma a remover os açúcares solúveis. Essa extracção foi realizada

em autoclave (Uniclave, Portugal) utilizando uma RLS de 7 (g/g), 100°C e tempo de pré-tratamento de 45 min. Após arrefecimento, as fracções sólida e líquida foram separadas por prensagem e o licor analisado por HPLC (ponto 2.6.1.8).

## 2.2 Hidrólise com ácido diluído

O material pré-tratado foi hidrolisado em autoclave, em frascos Schott (Alemanha) de 1000 mL de capacidade, fechados com tampas Schott GL45 (temperatura máxima admissível 200°C).

Foram testadas diferentes concentrações de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, entre 1,2 e 3% (p/p). A RLS foi sempre de 7 g/g, e a temperatura de 130°C. O tempo de hidrólise variou entre 10 e 180 min. Os resultados são interpretados com base no factor de severidade combinado, *CS* (Eq. IV.3).

De forma a minimizar diferenças entre os diversos ensaios, os frascos foram colocados no autoclave só após este ter atingido os 50 °C, registando-se em seguida a evolução da temperatura entre os 100 e os 130°C (9 min). Atingido o tempo de hidrólise pré-definido, desligou-se o aquecimento e abriu-se imediatamente o arejo do autoclave de modo a que a temperatura baixasse até aos 120°C, registando-se o tempo de arrefecimento (13 min). Em seguida abriu-se o esgoto para que a temperatura baixasse rapidamente. Após arrefecimento dos frascos, a ocorrência de possíveis perdas foi avaliada através da sua pesagem. A mistura obtida foi prensada como descrito anteriormente e a fracção líquida (hidrolisado) foi caracterizada quanto ao pH, composição química e percentagem de sólidos, tal como descrito em 2.6.1.

Os resíduos sólidos foram lavados com água desmineralizada, secos a 50°C em estufa durante 3 dias e pesados após terem permanecido 2 dias à temperatura ambiente. Foi usada uma amostra representativa de cada ensaio para a determinação da humidade. A quantidade de amostra restante foi moída num moinho de facas (IKA, Alemanha) a partículas inferiores a 0,5 mm e caracterizadas quimicamente, conforme descrito em 2.6.1.

Todos os ensaios de hidrólise foram realizados, pelo menos, em duplicado.

## 2.3 Produção de hidrolisado para os ensaios de bioconversão

A produção de hidrolisado para os ensaios de bioconversão foi realizada nas condições optimizadas (1,4% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (p/p), 130 °C, RLS=7 g/g e 75 min de tratamento), tendo sido realizados vários ensaios de modo a obter o volume de hidrolisado necessário. No final de cada tratamento o conteúdo de cada frasco de hidrólise foi prensado e os diversos hidrolisados foram misturados de modo a obter um lote uniforme e armazenados a 4°C.

## **2.4 Destoxificação dos hidrolisados**

### **2.4.1 Correção de pH**

O pH dos hidrolisados foi acertado até 5,5 pela adição de um agente alcalino, tendo-se testado  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , KOH e NaOH, todos na forma sólida. O NaOH foi o agente escolhido uma vez que a adição de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  e KOH deram origem a precipitados muito significativos após a suplementação do meio de cultura o que impediria a sua eficaz utilização. A adição progressiva de pequenas quantidades do agente alcalino foi acompanhada por agitação magnética e leituras constantes de pH (Crison micropH 2002, Espanha). Após acerto de pH, o hidrolisado foi filtrado utilizando filtros Whatman n.º 1 (filtração rápida) e n.º 41 (filtração lenta).

### **2.4.2 Tratamento com carvão activado**

Utilizou-se carvão activado granulado, c.a. 2,5 mm (Merck, Alemanha) o qual foi previamente lavado com água e recolhido por filtração com papel de filtro Whatman n.º 1. Após secagem à temperatura ambiente durante 1 dia, foi equilibrado com HCl 0,4 M durante 1 h, filtrado, lavado novamente com água e seco à temperatura ambiente durante 48 h.

O carvão tratado foi misturado com o hidrolisado (pH previamente acertado a 2,5 através da adição de NaOH sólido), numa proporção de 10% (p/v), e colocado sob agitação magnética durante 1 h à temperatura ambiente. No final, o hidrolisado foi recolhido por filtração (filtros Whatman n.º 1). Após o tratamento, o pH do hidrolisado foi acertado para 5,5 através da adição de NaOH sólido.

### **2.4.3 Concentração do hidrolisado**

De modo a aumentar a concentração em xilose, bem como a remover alguns compostos inibidores voláteis, tais como o furfural e o ácido acético, os hidrolisados sujeitos ou não a uma destoxificação prévia com carvão activado e com o pH acertado a 5,5, foram concentrados (2 vezes, em massa) sob vácuo num evaporador (Büchi, Suíça), com a capacidade de evaporar separadamente quatro amostras, com um volume útil individual de 100 mL. As condições de operação utilizadas foram: 70°C na placa superior e 100°C na placa inferior, de modo a obter-se uma temperatura no hidrolisado de aproximadamente 70°C, agitação de 175 rpm e 200 mbar de pressão, controlada automaticamente por uma bomba de pressão (Büchi B-721, Suíça).

## 2.5 Microrganismo e condições de cultura

### 2.5.1 Microrganismo

O microrganismo utilizado foi a levedura *Debaryomyces hansenii*, depositada na Colecção de Culturas de Microrganismos Industriais do INETI (CCMI) com o número 941. Após revitalização da estirpe liofilizada, a cultura foi mantida em placas de Petri contendo meio “Yeast Malt glucose” (YM-glc) (Anexo II), incubada a 30 °C durante 48 h numa incubadora vertical (Sanyo MIR 252, Japão) e posteriormente conservada no frio a 4°C durante, no máximo três semanas, sendo posteriormente repicada.

### 2.5.2 Preparação dos meios de cultura

#### *Meios de produção de inóculo*

Nos ensaios de avaliação do crescimento celular (produção de inóculos) foram utilizados licores da pré-extracção aquosa e hidrolisados obtidos nas condições optimizadas, cujo pH foi previamente acertado a 5,5.

Os hidrolisados foram esterilizados por filtração com filtros de membrana com diâmetro de poro de 0,22 µm (Gelman Sciences, EUA). Devido à impossibilidade de esterilizar os licores de pré-tratamento por filtração, estes foram esterilizados em autoclave a 121°C durante 15 min.

Após a esterilização, procedeu-se à adição, em condições assépticas, dos restantes nutrientes: 2 mL de uma solução de sais, 0,8 mL de solução de vitaminas, 4 mL de uma solução de azoto e fósforo e 1 mL de uma solução de magnésio, (Anexo III), para 72,2 mL de hidrolisado ou licor da pré-extracção aquosa e um volume final de 80 mL de meio de cultura.

#### *Meios de produção de xilitol*

Nos ensaios de produção de xilitol foi utilizado hidrolisado concentrado sujeito ou não a uma destoxificação prévia com carvão activado. Numa primeira fase todos os hidrolisados foram esterilizados por filtração (0,22 µm). No entanto, devido às dificuldades da filtração dos hidrolisados destoxificados (aparentemente pelo aumento da viscosidade do meio), numa fase seguinte, a esterilização dos hidrolisados não-destoxificados foi feita por filtração e a dos destoxificados por autoclavagem (121°C, 15 min).

Utilizou-se um volume total de 60 mL de meio de cultura, contendo 54,15 mL de hidrolisado destoxificado ou não-destoxificado, sendo os suplementados (solução de sais, vitaminas, azoto e fósforo e magnésio) adicionados nas mesmas proporções que nos ensaios de crescimento celular.

### 2.5.3 Preparação do inóculo e condições de cultura

A partir de colónias de *D. hansenii* incubadas em placas de Petri (meio YM-glc) com 48 h prepararam-se rampas com meio “Yeast Malt xylose” (YM-xy) (Anexo II) que foram incubadas a 30 °C durante 38 h numa incubadora (Sanyo MIR 252, Japão). Cada balão de Erlenmeyer de 1000 mL com anteparas, contendo 80 mL de meio de cultura foi inoculado com uma rampa por arrastamento da cultura com o respectivo meio. Os balões de inóculo foram incubados a 30 °C com agitação orbital de 150 rpm numa incubadora Infors Unitron HT (Suíça). Depois de 18 h de crescimento, o conteúdo dos balões foi misturado, de forma a obter um inóculo homogéneo.

### 2.5.4 Condições de cultura

Após de 18 h de crescimento, para cada tipo de meio, o conteúdo dos balões foi misturado, de forma a obter um inóculo homogéneo. Foram recolhidos 30 mL de inóculo para tubos Falcon estéreis e centrifugados durante 15 min e 8000 G, numa centrífuga (Sigma 2K15, EUA). A biomassa foi ressuspendida nos diferentes meios de produção, de modo a que cada balão Erlenmeyer tivesse uma concentração inicial de biomassa de aproximadamente 4 g.L<sup>-1</sup>. Os ensaios foram realizados em duplicado, em balões Erlenmeyer de 500 mL (volume final de 60 mL) e incubados nas mesmas condições dos inóculos.

### 2.5.1 Amostragem

No decorrer dos crescimentos foram retiradas periodicamente amostras para avaliação do crescimento celular, quantificação de substratos e produtos na suspensão celular. De modo a minimizar as alterações das condições de cultivo, nomeadamente na razão volume de líquido/volume total, o volume da amostra foi o mais reduzido possível (3 mL). Exceptuam-se os casos das amostras utilizadas para determinação de concentração de biomassa (2.6.1.7).

### 2.5.2 Controlo da pureza das culturas

No início e final das fermentações foram retiradas amostras para avaliação da micromorfologia da cultura a uma ampliação de 1000x e no fim do ensaio foram plaqueados 0,2 mL de cada amostra em meio YM-glc.

## 2.6 Métodos analíticos

### 2.6.1 Caracterização química da matéria-prima e resíduo sólido resultante da hidrólise

#### 2.6.1.1 Determinação da humidade

A humidade da matéria-prima e resíduos sólidos foi determinada pesando-se aproximadamente 1 g de amostra em caixas de níquel, previamente secas a 100°C durante 16 h e taradas numa balança analítica (Mettler HK160, Suíça), colocando-se a amostra a secar nas mesmas condições na estufa. Após a secagem as caixas contendo as amostras foram arrefecidas em exsiccador, durante aproximadamente 1 h. Este procedimento foi repetido sempre que necessário, sendo realizado, pelo menos, em duplicado.

#### 2.6.1.2 Determinação do resíduo seco dos hidrolisados

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

#### 2.6.1.3 Determinação dos polissacáridos (glucano, xilano, arabinano) e grupos acetilo

##### *Resíduo sólido*

Para a determinação dos polissacáridos, lenhina e grupos acetilo, as amostras foram sujeitas a uma hidrólise ácida quantitativa, de acordo com o método descrito por Browning (Amaral-Collaço *et al.* 1989; Browning 1967). A 0,5 g de amostra foram adicionados 5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 72% (p/p), e a mistura incubada a 30±1°C num banho termostaticado (Mettler, Alemanha), durante 1 h, com agitação ocasional com uma vareta de vidro. Em seguida, todo o conteúdo do tubo de ensaio foi transferido para frascos Schott de 250 mL através do arrastamento com água desmineralizada, numa quantidade suficiente para se obter uma concentração de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> de 4% (p/p). Esta mistura foi autoclavada a 121°C durante 1 h, após o que se desligou o aquecimento e abriu imediatamente o esgoto do autoclave de modo a que a temperatura baixasse rapidamente. Depois do arrefecimento dos frascos, confirmou-se a ocorrência de possíveis perdas através de pesagens do conjunto. A mistura foi filtrada por filtros de placa porosa (Schott) de porosidade 3 previamente tarados a 575±25°C numa mufla (Heraeus D-6450, Alemanha) durante 5 h.

Os componentes da fracção líquida foram analisados por HPLC (2.6.1.8). As concentrações de glucose, xilose, arabinose e ácido acético permitem calcular as percentagens dos respectivos polímeros e grupos acetilo, conforme descrito no Anexo IV.2.

### ***Hidrolisado***

De forma a avaliar a presença de açúcares na forma oligomérica nos hidrolisados utilizou-se uma alíquota de hidrolisado e procedeu-se a uma pós-hidrólise com ácido sulfúrico diluído (4% p/p) a 120°C durante 60 min. Os pós-hidrolisados foram caracterizados quimicamente, utilizando os mesmos métodos que para os hidrolisados.

#### ***2.6.1.4 Determinação da lenhina e cinza***

O filtrado referido no ponto anterior foi lavado com água (50 mL), e o cadinho com a amostra foi seco durante 16 h a 100°C. O resíduo seco é considerado lenhina de Klason, após correcção da cinza (determinadas por incineração das amostras numa mufla a 575±25°C durante 5 h.

#### ***2.6.1.5 Determinação de proteína total***

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

#### ***2.6.1.6 Doseamento dos compostos fenólicos***

Os compostos fenólicos presentes no hidrolisado foram doseados com uma solução de Folin-Ciocalteu baseado no descrito em (Singleton *et al.* 1999; Singleton e Rossi 1965) utilizando como padrão o ácido gálico. O princípio deste método baseia-se na capacidade dos compostos fenólicos para reduzir o reagente de Folin-Ciocalteu, sob condições alcalinas, alterando a cor de amarelo a azul.

O procedimento encontra-se descrito no Anexo VI.

### **2.6.2 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 (Genesys 6 Termo Electron Corporation, USA). Para valores de absorvância superiores a 0,8 foram realizadas diluições, de modo a obter leituras dentro da gama de linearidade 0,2-0,8. Todas as diluições foram efectuadas, pelo menos, em duplicado.

A concentração de biomassa foi também obtida através da quantificação da concentração de biomassa seca da cultura em amostras seleccionadas. Foram filtrados, sob vácuo, 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 desionizada, 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 electrónica (Mettler HK 160, Suíça). Este procedimento foi realizado, pelo menos, em duplicado.

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

O doseamento de monossacáridos, compostos inibidores (excepto compostos fenólicos) e produtos derivados do metabolismo microbiano, foi feito por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC). Todas as amostras foram previamente filtradas através de filtros Millipore<sup>(R)</sup> com um diâmetro de poro de 0,45 µm.

A D-glucose, D-xilose, L-arabinose, ácido acético, glicerol, etanol, HMF e furfural foram analisados utilizando uma coluna Aminex HPX-87H (Bio-Rad, EUA). Para o HMF e furfural foi utilizado um detector de UV/VIS regulado para 280 nm, e para os restantes compostos um detector de IR.

Nas amostras resultantes da pré-extracção aquosa, extracção pelo método de Luff-Schoorl e na caracterização química do sorgo verde as concentrações de sacarose, glucose e frutose foram analisadas numa coluna Sugar-Pak I (Waters Chromatography, EUA). Nas amostras dos crescimentos, devido à sobreposição parcial dos picos de L-arabinose, arabitol e xilitol estas foram também analisados numa coluna Sugar-Pak I.

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

As condições de operação dos sistemas associados a cada coluna estão resumidas no Quadro 2.1.

**Quadro 2.1** Equipamento e condições de operação para as análises por HPLC

<b>Designação</b>	<b>HPX-87H</b>	<b>Sugar-Pak I</b>
<b>Coluna</b>		
<b>Sistema</b>	LCModule I Plus(Waters, EUA)	Merck Hitachi (Alemanha)
<b>Dimensões da coluna</b>	7,8 × 300 mm	6,5 × 300 mm
<b>Detector de IR</b>	L 2410	L-7490
<b>Detector UV</b>	L 486	-
<b>Bomba</b>	600E	L-7100
<b>Forno de colunas</b>	CHM	L-7350
<b>Injector</b>	L-715	L-7200
<b>“Software”</b>	Millenium <sup>32</sup> Versão 3,20LC (Waters, EUA)	Chromeleon™ (Dionex, EUA)
<b>Fase móvel</b>	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 5,0 mM	Ca-EDTA 50 mg.L <sup>-1</sup>
<b>Caudal</b>	0,4 mL.min <sup>-1</sup> (Caracterização da matéria-prima e resíduos sólidos)	0,5 mL.min <sup>-1</sup>
	0,6 mL.min <sup>-1</sup> (outros)	
<b>Temp. da coluna</b>	50°C	90°C
<b>Temp. do detector de IR</b>	45°C	35°C
<b>Comp. onda UV</b>	280 nm	-
<b>Volume de amostra</b>	20 µl (0,4 mL.min <sup>-1</sup> ) ou 5 µl (0,6 mL.min <sup>-1</sup> )	20 µl

### ***3. Resultados e Discussão***

#### **3.1 Pré-extracção aquosa e caracterização química da matéria-prima**

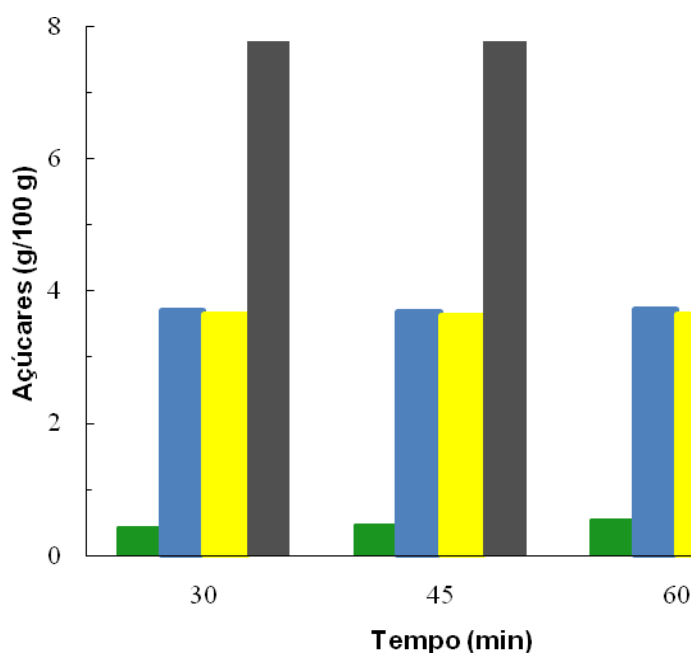
A caracterização química do sorgo biomassa foi feita após uma pré-extracção aquosa (PEA), optimizada de modo a permitir remover a quase totalidade dos açúcares livres presentes neste tipo de material lenhocelulósico. Esta pré-extracção torna-se necessária antes da caracterização química, uma vez que interfere na quantificação do teor de polissacáridos da matéria-prima. Além disso, a remoção destes açúcares livres permitirá, em princípio, a redução da quantidade de produtos de degradação formados durante o pré-tratamento, i.e., a hidrólise com ácido diluído conducente à obtenção dos hidrolisados hemicelulósicos.

##### **3.1.1 Optimização da pré-extracção aquosa**

Para a optimização da PEA foram, em primeiro lugar testados diferentes tempos de tratamento isotérmico e posteriormente avaliado o efeito da razão líquido/sólido (RLS). De forma a avaliar a eficiência da PEA os resultados obtidos foram comparados com os mesmos obtidos após uma extracção pelo método de Luff-Schoorl, método habitualmente utilizado para a extracção total de açúcares livres na biomassa vegetal.

##### **3.1.2 Estudo do tempo de pré-extracção aquosa**

Para optimização do tempo de PEA para a RLS de 10 (g/g), foram estudados os tempos de 30, 45 e 60 min. Os resultados referentes aos rendimentos obtidos para os diferentes açúcares (expressos em base seca) estão apresentados na Figura 3.1.



**Figura 3.1** Rendimentos em açúcares obtidos para diferentes tempos de pré-extracção aquosa do sorgo. glucose (■), Sacarose (■), frutose (■) e açúcares totais (■)

Nestes ensaios, os tempos de 45 e 60 min permitiram uma extracção de açúcares totais ligeiramente superior ao tempo de 30 min. A quantidade total de açúcares máxima extraída, 8,58 g.L<sup>-1</sup>, foi obtida para um tempo de extracção de 60 min a 100°C, correspondendo a um rendimento de 7,93 g açúcares/100 g sorgo. Os principais açúcares extraídos foram a sacarose e frutose encontrando-se a glucose presente em menores concentrações, sendo a razão Glc: Sac:Fru de 10:69:67. A comparação dos resultados dos três tempos de extracção levou à escolha do tempo de 45 min de tratamento como o mais adequado para a extracção pretendida, uma vez que este tempo de extracção permitiu uma extracção tão eficiente como o de 60 min, num menor espaço de tempo.

Para avaliação da eficácia de extracção, procedeu-se também à extracção de açúcares pelo método de Luff-Schoorl. No Quadro 3.1 apresentam-se os resultados comparativos obtidos pelos dois métodos de extracção.

**Quadro 3.1** Rendimentos em açúcares obtidos a partir de sorgo biomassa, utilizando a pré-extracção aquosa e o método de Luff-Schoorl.

	Açúcares (g/100 g)			
	Glucose	Sacarose	Frutose	Total
<b>Etanol<sup>a</sup></b>	0,52	3,36	3,22	7,11
<b>PEA<sup>b</sup></b>	0,46	3,69	3,64	7,79

<sup>a</sup> Método de Luff-Schoorl; <sup>b</sup> RLS=10; 45 min; 100°C

Os resultados obtidos para os rendimentos em açúcares totais são da mesma ordem de grandeza, respectivamente 7,11 e 7,79 (g/100 g) para a extração com etanol e PEA, o que sugere que as condições escolhidas para PEA, permitem uma extração eficaz dos açúcares.

### 3.1.3 Estudo da razão líquido/sólido

Uma vez que a eficiência de extração se mostrou satisfatória, e tendo-se obtido aproximadamente 8 g.L<sup>-1</sup> de açúcares totais no xarope, optou-se por testar uma RLS inferior de maneira a aumentar as concentrações de açúcares.

No Quadro 3.2 são apresentados os resultados obtidos utilizando para o tempo de pré-extração de 45 min e para a RLS de 10 e 7 (g/g).

**Quadro 3.2** Rendimentos e respectivas concentrações de açúcares obtidos para a pré-extração aquosa com diferentes razões líquido/sólido (RLS) (g/g)

RLS	Sacarose		Glucose		Frutose		Total	
	g/100g	g.L <sup>-1</sup>	g/100g	g.L <sup>-1</sup>	g/100g	g.L <sup>-1</sup>	g/100g	g.L <sup>-1</sup>
<b>10</b>	3,69	<b>3,97</b>	0,46	<b>0,50</b>	3,64	<b>3,92</b>	7,79	8,38
<b>7</b>	4,42	<b>5,81</b>	0,47	<b>0,62</b>	4,38	<b>5,75</b>	9,27	12,18

Para a RLS 7 (g/g) foi obtida uma maior concentração de açúcares totais, correspondendo a um rendimento de 9,27 g açúcares/100 g sorgo. Com esta RLS a razão Sac:Glc:Fru foi de 10:94:92. Estes resultados levaram à escolha da RLS de 7 (g/g) para a pré-extração aquosa, uma vez que permite a obtenção de licores mais ricos em açúcar e com um rendimento ligeiramente superior ao obtido para a RLS de 10 (g/g).

Assim, para a preparação da matéria-prima a ser utilizada nos tratamentos de hidrólise com ácido diluído foi realizada uma PEA durante 45 min, a 100°C e a uma RLS de 7 (g/g).

## 3.2 Caracterização química da matéria-prima

A composição química dos materiais lenhocelulósicos, varia consoante a sua origem. As diferenças residem essencialmente na proporção relativa dos três componentes maioritários, celulose, hemicelulose e lenhina e, em particular, na composição das hemiceluloses. A natureza do material lenhocelulósico influencia a possibilidade do seu aproveitamento como matéria-prima para a bioconversão da D-xilose em xilitol, deste modo é de extrema importância uma caracterização química adequada da matéria-prima a utilizar para obtenção do hidrolisado hemicelulósico.

A caracterização química do sorgo biomassa foi feita após a pré-extracção aquosa (PEA) referida anteriormente. A PEA justificou-se pelo facto dos açúcares solúveis ainda presentes na matéria-prima poderem interferir na determinação da composição dos polissacáridos.

No Quadro 3.3 é apresentada a composição química média da matéria-prima após o referido pré-tratamento. Os resultados são apresentados como percentagem, em base seca.

**Quadro 3.3** Composição química média do sorgo biomassa após pré-extracção aquosa.

<b>Componentes</b>	<b>%</b>
Glucano	41,65
Hemicelulose	27,92
Xilano	22,42
Arabinano	2,69
Grupos acetilo	2,81
Lenhina Klason	19,83
Cinza	6,98
Proteína	2,62
Outros (por diferença)	1,01

A composição do sorgo depende da variedade, do tipo de cultura, bem como das condições da mesma. O sorgo doce é a variedade de sorgo mais utilizada sendo fundamentalmente a fracção dos açúcares solúveis a mais explorada.

No Quadro 3.3 são apresentados os resultados da composição química do sorgo biomassa, após PEA, utilizado neste trabalho. Trata-se de uma matéria-prima rica em polissacáridos, contendo 70% (p/p) de polissacáridos totais, dos quais 2/3 são celulose, calculada com base no teor de glucano. Os valores encontrados são até superiores a outros já referidos para este material (Herrera *et al.* 2004; Téllez-Luis *et al.* 2002a; Téllez-Luis *et al.* 2002b; Vázquez *et al.* 2007), que apresenta elevados teores de celulose. O teor de hemicelulose, especificamente os de xilose, arabinose e grupos acetilo, são também relativamente elevados. À excepção do arabinano, todos os componentes da hemicelulose apresentaram teores superiores em comparação com outros trabalhos publicados (Herrera *et al.* 2004; Téllez-Luis *et al.* 2002b; Vázquez *et al.* 2007).

No que diz respeito à lenhina Klason ocorrem algumas diferenças. Relativamente aos valores da literatura, o valor obtido pode considerar-se relativamente baixo, quando comparado com outros previamente descritos (Herrera *et al.* 2004; Téllez-Luis *et al.* 2002b; Vázquez *et al.* 2007), o que

é uma vantagem quando se pretende uma valorização do material através de bioconversão dos açúcares.

Em suma, a composição química determinada para o sorgo biomassa é concordante com a composição química anteriormente descrita para este material e possui uma composição favorável para a obtenção de hidrolisados ricos em pentoses como se pretende, uma vez que é relativamente rica em arabinoxilano, que constitui a fração mais susceptível de ser hidrolisada por um tratamento com ácido diluído.

### 3.3 Caracterização química do sorgo verde

No decorrer do trabalho experimental, ocorreu um corte de sorgo verde dos tipos biomassa, doce e forrageiro. Uma vez que sorgo utilizado neste trabalho já se encontrava seco e convenientemente armazenado, considerou-se importante avaliar a composição química do sorgo verde, por forma a prespectivar potenciais utilizações do sorgo neste estado. Após recepção, sujeitaram-se as amostras dos diferentes tipos de sorgo a uma prensagem de forma a remover o suco. Foi determinada a composição em açúcares do suco e avaliado o rendimento da prensagem.

Na recepção as amostras apresentavam humidades de 65,2, 77,3 e 58,4 %, respectivamente para o sorgo doce, biomassa e forrageiro. No Quadro 3.4 são apresentadas as concentrações de açúcares (sacarose, glucose e frutose) presentes no suco de cada um dos três tipos de sorgo. Os rendimentos de prensagem ( $\text{g}_{\text{suco}}/100 \text{ g}_{\text{sorgo verde}}$ ) foram de 42,5 para o sorgo doce, 30,5 para o sorgo biomassa e 58,5 para o sorgo forrageiro. Em termos de açúcares totais, o suco obtido das diferentes variedades de sorgo apresentou as seguintes concentrações, em  $\text{g.L}^{-1}$ , 124, 75,6 e 35,5 para o sorgo doce, biomassa e forrageiro, respectivamente.

**Quadro 3.4** Composição em açúcares do líquido de prensagem (suco) das diferentes variedades de sorgo (doce, biomassa e forrageiro) em estado verde

	Composição do suco ( $\text{g.L}^{-1}$ )		
	Sorgo doce	Sorgo biomassa (H133)	Sorgo forrageiro
<b>Sacarose</b>	89,3 (10,3)	56,8 (7,3)	10,6 (1,5)
<b>Glucose</b>	19,5 (2,2)	11,6 (1,5)	14,0 (1,9)
<b>Frutose</b>	15,1 (1,7)	7,2 (0,9)	10,9 (1,5)
<b>Açúcares totais</b>	<b>124,0 (14,3)</b>	<b>75,6 (9,7)</b>	<b>35,5 (4,9)</b>

\*Os valores entre parêntesis referem-se ao rendimento em açúcares, expresso em base seca

Estes resultados correspondem ao esperado uma vez que o sorgo doce se caracteriza por apresentar teores de açúcares elevados (Herrera *et al.* 2004; Téllez-Luis *et al.* 2002b; Vázquez *et al.* 2007). Um aspecto particular do sorgo do tipo biomassa e forrageiro é que apresentam também quantidades apreciáveis de açúcar no suco, principalmente o sorgo biomassa. Este aspecto sugere que tanto quanto possível deverá ser feita uma extracção prévia do suco da matéria-prima, provavelmente no campo, pois assim o rendimento em açúcares, contando com os que estão presentes no suco e no sólido resultante da extracção, poderá ser muito elevado.

Com o objectivo de quantificar e caracterizar ainda os açúcares livres presentes no sorgo prensado e os totais no sorgo não-prensado (sorgo verde), procedeu-se a uma PEA nas condições previamente optimizadas (100°C, 45 min, RLS de 7 g/g<sub>sorgo seco</sub>).

No Quadro 3.5 estão apresentados os resultados da PEA das diferentes variedades de sorgo no estado verde e do sorgo verde previamente prensado.

**Quadro 3.5** Composição em açúcares do licor de pré-extracção aquosa (PEA) (g/100g) do sorgo verde e do resíduo sólido resultante da extração do suco (prensado).

	Composição do licor de pré-extracção aquosa (g.L <sup>-1</sup> )					
	Sorgo Doce		Sorgo Biomassa		Sorgo Forrageiro	
	Verde	Prensado	Verde	Prensado	Verde	Prensado
<b>Sacarose</b>	22,5 (5,8)	4,7 (1,8)	12,0 (3,5)	10,5 (4,1)	3,5 (0,6)	3,9 (1,2)
<b>Glucose</b>	7,0 (1,8)	1,9 (0,7)	3,8 (1,1)	3,5 (1,3)	3,2 (0,5)	2,8 (0,8)
<b>Frutose</b>	5,3 (1,4)	1,6 (0,6)	3,0 (0,9)	2,7 (1,1)	6,9 (1,1)	2,5 (0,8)
<b>Açúcares totais</b>	34,8 (9,0)	8,2 (3,2)	18,8 (5,4)	16,7 (6,5)	13,7 (2,2)	9,2 (2,8)

\*Os valores entre parêntesis referem-se ao rendimento em açúcares, expresso em base seca

Pela análise do Quadro 3.5 pode-se constatar que, tal como aconteceu no ensaio de extracção do suco, o sorgo doce foi o que apresentou maior quantidade de açúcares, contendo cerca de 22,5 e 7 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e glucose, respectivamente. O sorgo forrageiro foi a variedade de onde se extraiu maior quantidade de frutose, aproximadamente 7 g.L<sup>-1</sup>. Relativamente aos açúcares totais, o sorgo doce foi o que apresentou maiores rendimentos, apresentando, para o estado verde, um rendimento na ordem das 9 g/100 g de sorgo. Para este tipo de sorgo, a quantidade (e rendimento) em açúcares obtidos foi muito superior no estado verde, o que sugere uma prensagem bastante eficiente deste tipo de material. Os rendimentos em açúcares totais mais elevados para o sorgo no estado prensado foram obtidos para o sorgo biomassa, de onde se conseguiu extrair cerca de 6,5 g de açúcares totais/100g sorgo.

Como seria de esperar, as concentrações de açúcar obtidas após a pré-extracção aquosa do sorgo prensado foram inferiores às concentrações de açúcares obtidas sem prensagem prévia, ainda assim não desprezáveis.

De forma a avaliar o efeito da secagem do sorgo nos açúcares livres presentes no sorgo, os resultados da pré-extracção aquosa dos diferentes tipos de sorgo verde, foram comparados com os resultados obtidos na condição otimizada da PEA do sorgo biomassa utilizado neste trabalho.

Comparando os resultados obtidos de PEA para o sorgo verde com os resultados obtido na PEA do sorgo utilizado neste trabalho (Quadro 3.2) na RLS de 7 (g/g <sub>sorgo seco</sub>) pode verificar-se, tal como seria de esperar, que o sorgo contém (em g/100 g) mais açúcares livres na sua composição quando se encontra no estado verde, nomeadamente cerca de mais 37% de sacarose e 12% de glucose e menos 46% de frutose do que o sorgo seco. Os resultados comparados referem-se apenas ao sorgo biomassa, o utilizado no decorrer deste trabalho.

Relativamente ao sorgo verde previamente prensado, ou seja, desprovido de suco, não existiu termo de comparação, uma vez que o sorgo no estado seco armazenado no laboratório, não havia sido previamente prensado, antes do armazenamento.

Estes resultados sugerem que o material em estado seco apesar de não apresentar uma elevada quantidade de açúcares livres apresenta, potencialmente, maior quantidade de polissacáridos na sua composição, sendo uma vantagem a utilização do sorgo neste estado para obtenção de hidrolisados ricos em pentoses.

### **3.4 Estudo de condições de operação para obtenção de hidrolisados hemicelulósicos**

A composição química dos hidrolisados hemicelulósicos varia de acordo com a matéria-prima utilizada, o tipo e a concentração de catalisador, bem como a temperatura e duração do processo. No decurso do processo hidrolítico, além dos açúcares resultantes do fraccionamento dos polissacáridos são também formados alguns compostos resultantes da degradação dos monossacáridos, da degradação parcial da lenhina e da hidrólise da hemicelulose (ácido acético). Assim, as diversas condições operacionais que influenciam o processo devem ser controladas e, se possível, optimizadas de modo a maximizar as concentrações de açúcares e minimizar a formação de produtos da degradação que limitam a utilização dos hidrolisados como meio de cultura (Winkelhausen e Kuzmanova 1998).

### 3.4.1 Optimização da hidrólise com ácido diluído de sorgo biomassa

Algumas das condições operacionais adoptadas para a optimização da hidrólise com ácido diluído, nomeadamente o tipo de ácido e temperatura foram já optimizadas noutros trabalhos prévios e correspondem ao rendimento máximo obtido para este tipo de processo para uma matéria-prima semelhante. A razão líquido-sólido escolhida, corresponde ao valor mínimo para a qual a biomassa está completamente imersa no líquido.

Deste modo, as condições operacionais adoptadas para optimização da hidrólise com ácido diluído do sorgo biomassa foram a temperatura de 130°C, uma razão líquido/sólido de 7 g/g, fazendo-se variar o tempo de operação e a concentração de ácido utilizada. A severidade dos tratamentos de hidrólise foi quantificada utilizando o factor de severidade combinado (CS), que permite comparar resultados de ensaios realizados em diferentes condições de temperatura, tempo ou concentração de catalisador. Neste âmbito, ensaiaram-se diversas condições em que se variou, em primeiro lugar, a concentração de ácido e posteriormente a duração do tratamento.

#### 3.4.1.1 Estudo da concentração de ácido utilizada

A optimização do processo de hidrólise envolveu um estudo preliminar cujo objectivo principal foi a definição da concentração de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a utilizar nos ensaios, uma vez que se pretendia manter este factor num valor constante e tão baixo quanto possível, durante a optimização. As percentagens de ácido utilizadas foram 1,2%, 1,5% e 3% (p/p). Estes valores foram escolhidos tendo por base as condições óptimas identificadas em ensaios anteriores realizados neste laboratório com outros materiais (Carvalho *et al.* 2004a). Assim foram testadas as seguintes condições: 1,2% e 150 min, 1,5% e 150 min e 3% e 15 min. A concentração de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> escolhida 1,4%, foi um valor intermédio entre 1,2% e 1,5%, e teve por base a obtenção de uma concentração de H<sup>+</sup> de 150 mM<sup>1</sup>, já definida para outros ácidos como sendo eficaz (resultados não-publicados).

Para a escolha das melhores condições operacionais para a produção de hidrolisados hemicelulósicos, é imprescindível a escolha criteriosa da concentração de ácido a utilizar. Tal como já foi referido anteriormente, a hidrólise com ácido diluído é um método eficaz contudo, concentrações de ácido muito elevadas podem levar à formação de compostos de degradação que, para além de diminuírem os rendimentos de polissacáridos, são inibidores do crescimento microbiano. Por outro lado, quanto mais elevada a concentração de ácido maiores as quantidades

---

<sup>1</sup> Valor calculado considerando a primeira dissociação do ácido sulfúrico completa e uma constante de equilíbrio de  $1,02 \times 10^{-2}$  mmol para a dissociação do segundo H<sup>+</sup>.

necessárias de agente neutralizante. Estes aspectos têm também contribuição importante para a economia do processo. Assim, nesta fase do trabalho experimental seleccionaram-se algumas concentrações de ácido, para proceder à selecção de uma concentração para trabalho futuro. No Quadro 3.6 são apresentados os resultados para a solubilização dos polissacáridos e composição da fase líquida obtidos para diferentes condições de severidade (CS).

**Quadro 3.6** Percentagens de solubilização dos polissacáridos e composição do hidrolisado hemicelulósico obtidos para diferentes condições operacionais.

	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (%)		
	1,2	1,5	3
Tempo (min)	150 (2,03) <sup>a</sup>	150 (2,19) <sup>a</sup>	15 (2,24) <sup>a</sup>
<b>% Solubilização</b>			
Xilano	96,59	97,64	93,86
Arabinano	99,71	99,89	99,61
Glucano	0,00	0,00	3,48
<b>Composição fase líquida (g.L<sup>-1</sup>)</b>			
Glucose	4,28	4,56	3,05
Xilose	28,38	27,92	25,78
Arabinose	3,87	3,87	3,65
Ácido acético	5,87	5,98	6,61
HMF	0,18	0,14	0,13
Furfural	1,34	2,11	2,92

<sup>a</sup> os valores apresentados entre parêntesis referem-se aos valores do factor de severidade combinado (CS). HMF-hidroximetilfurfural.

Pela análise do Quadro 3.6 pode observar-se que a xilose e arabinose apresentam concentrações máximas para o valor de CS de 2,03. Os rendimentos máximos de pentoses obtidos foram de 18,18 g/100 g de sorgo para a xilose e 2,51 g/100 g para a arabinose. Nestas condições, praticamente todo o xilano e arabinano presente na matéria-prima foram hidrolisados. Será de notar que a condição de severidade onde a maior parte das hemiceluloses foi solubilizada foi relativamente suave (CS 2,03), o que está de acordo com trabalhos anteriores em que as melhores recuperações de açúcares hemicelulósicos foram obtidas para severidades relativamente baixas (Fernandes *et al.* 2009). Para além disso, também os rendimentos em pentoses obtidos com a optimização da concentração de ácido utilizada comparam

favoravelmente com trabalhos anteriores de hidrólises de ácido diluído em processos descontínuos (Carvalho *et al.* 2005; Sepulveda-Huerta *et al.* 2006; Téllez-Luis *et al.* 2002a; Téllez-Luis *et al.* 2002b).

O rendimento em glucose também é afectado pela severidade do tratamento. A concentração mais elevada de glucose obtida ( $4,56 \text{ g.L}^{-1}$ ) corresponde a um rendimento de  $2,97 \text{ g}/100 \text{ g}$  de sorgo inicial. Os resultados obtidos são concordantes com trabalhos anteriores (Herrera *et al.* 2003; Sepulveda-Huerta *et al.* 2006; Téllez-Luis *et al.* 2002a; Téllez-Luis *et al.* 2002b)

Uma vez que o hidrolisado obtido será utilizado como meio de cultura, foi prestada atenção especial aos compostos tóxicos obtidos, tais como, ácido acético e compostos fenólicos (dados não apresentados) gerados a partir da hidrólise dos componentes lenhocelulósicos e furfural e HMF (hidroximetilfurfural) gerados a partir reacções de degradação. As concentrações de todos os compostos inibidores quantificados aumentam com a severidade do tratamento com a excepção do HMF que decresceu ligeiramente. Nas condições de maior severidade (2,24), as concentrações obtidas, em  $\text{g.L}^{-1}$ , de compostos inibidores foram: ácido acético 6,61, HMF 0,13 e 2,92 de furfural, tendo-se obtido neste tratamento  $32,5 \text{ g.L}^{-1}$  de açúcares totais.

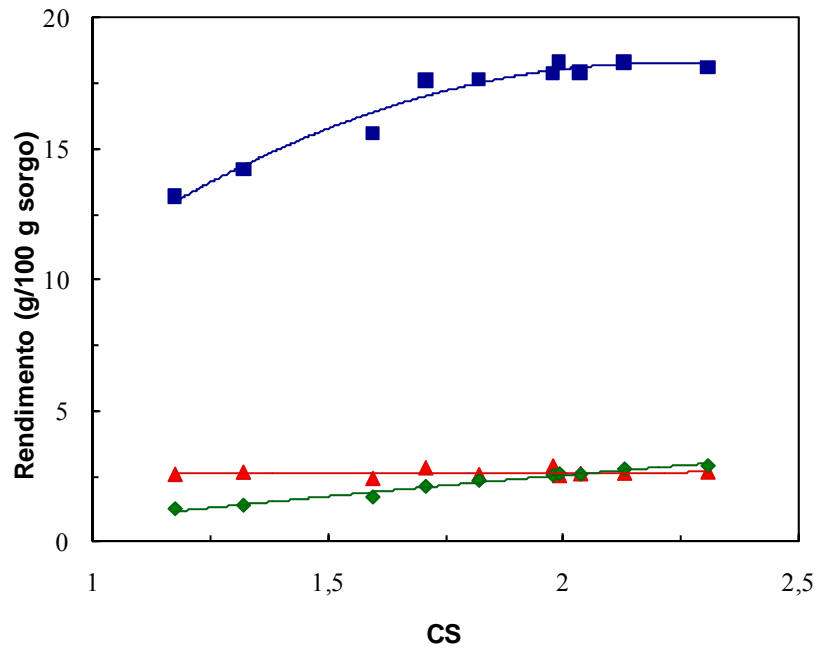
A análise destes resultados leva a concluir que, em comparação com outro tipo de material, por exemplo a dreche cervejeira, em que foi usado o mesmo ácido na concentração de 3%, os resultados obtidos são satisfatórios, uma vez que a hidrólise de dreche em condições de severidade de 3,06 apresentou  $2,3 \text{ g.L}^{-1}$  de furfural e  $0,26 \text{ g.L}^{-1}$  de HMF.

Tal como apresentado no Quadro 3.6, para além da concentração, também o tempos de tratamento influenciam os rendimentos da reacção. Então, uma vez seleccionada a concentração de ácido a utilizar, torna-se pertinente otimizar a duração do tratamento.

#### **3.4.1.2 Estudo da duração do processo**

Para proceder à optimização do tempo de hidrólise, para a RLS de  $7 \text{ g/g}$  e para concentração de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  de 1,4% previamente optimizada fez-se variar aquele parâmetro entre 10 e 180 min, correspondente a uma variação de factor de severidade combinado (CS) entre 1,17 e 2,31.

A Figura 3.2 mostra a variação dos rendimentos em monossacáridos obtida na hidrólise de sorgo em função do CS.



**Figura 3.2** Rendimentos em monossacáridos obtidos após hidrólise do sorgo com 1,4% de  $H_2SO_4$  para diferentes condições de severidade. Xilose (■), arabinose (▲) e glucose (◆). As curvas representam linhas de tendência.

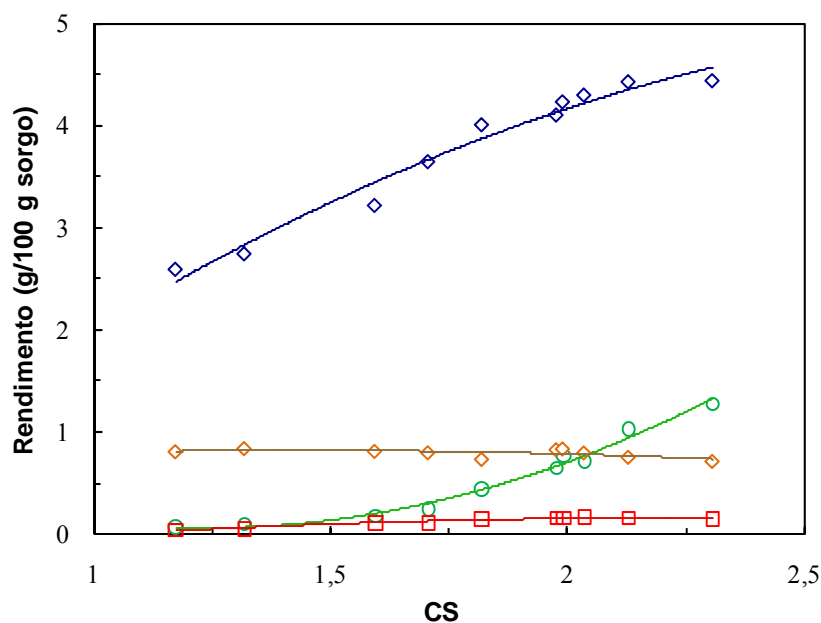
Tal como esperado, as pentoses são os componentes maioritários, demonstrando a selectividade deste tratamento para as hemiceluloses. A partir da Figura 3.2 pode observar-se que a xilose apresenta um rendimento máximo para um CS de 1,99. A recuperação de arabinose aumenta pouco com o aumento da severidade, ainda que o valor mais elevado tenha sido obtido para o CS=1,98. Assim, uma vez que o rendimento em xilose obtido para CS=1,99 é apenas ligeiramente superior ao obtido para CS=1,98, considerou-se então que a recuperação máxima de pentoses foi obtida para um CS de 1,98, o qual corresponde a uma duração do período isotérmico de 75 min. Nestas condições, os rendimentos máximos de pentoses obtidos foram de 17,9 g xilose/100 g sorgo e 2,9 g arabinose/100 g de sorgo. Nestas condições, 80% do xilano presente na matéria-prima foi recuperado sob a forma de xilose e 91% do arabinano sob a forma de arabinose. Será de notar que maior parte da hemicelulose foi solubilizada em condições suaves (CS=1,98), o que está de acordo com trabalhos anteriores para materiais agrícolas/agro-industriais em que as melhores recuperações de açúcares hemicelulósicos foram obtidas para severidades relativamente baixas (Gamez *et al.* 2004; Herrera *et al.* 2004; Herrera *et al.* 2003; Sepulveda-Huerta *et al.* 2006; Téllez-Luis *et al.* 2002a; Téllez-Luis *et al.* 2002b; Vázquez *et al.* 2007). Para condições mais severas de tratamento, observou-se uma diminuição da recuperação de pentoses devido a reacções de degradação. Os elevados rendimentos em pentoses obtidos, comparam favoravelmente com os trabalhos anteriores de hidrólises com ácido

diluído em processos descontínuos. Comparando as concentrações de xilose ( $28,18 \text{ g.L}^{-1}$ ) e arabinose ( $4,42 \text{ g.L}^{-1}$ ) obtidas por hidrólise do sorgo com ácido diluído com as concentrações destas pentoses obtidas a partir de outros materiais lenhocelulósicos pode concluir-se que apesar de existirem matérias-primas e condições apreciáveis que permitem obter hidrolisados com concentrações de xilose superiores às obtidas neste trabalho, nomeadamente bagaço de cana-de-açúcar e carolo de milho (Cruz et al. 2001; van Zyl et al. 1988), estas são favoráveis quando comparadas com a maioria dos hidrolisados provenientes de materiais com a mesma origem, resíduos agrícolas e agro-industriais. (Pessoa et al. 1996; Roberto et al. 1994; Rodrigues et al. 1999; Rodrigues et al. 1998).

No que diz respeito aos resultados obtidos com o mesmo tipo de material, o sorgo, todos os resultados conhecidos publicados até ao momento, mostraram concentrações de xilose e arabinose inferiores às obtidas neste trabalho (Herrera et al. 2004; Herrera et al. 2003; Téllez-Luis et al. 2002a; Téllez-Luis et al. 2002b; Vázquez et al. 2007).

Relativamente à glucose, o seu rendimento aumenta com a severidade do tratamento até um valor de *CS* de 1,99, valor a partir do qual ocorre uma ligeira diminuição. A concentração mais elevada de glucose obtida ( $4,07 \text{ g.L}^{-1}$ ) corresponde a um rendimento de  $2,6 \text{ g/100 g}$  de sorgo, o que representa uma solubilização de glucano de apenas 1,8%, demonstrando assim a selectividade deste método de fraccionamento para a hidrólise da hemicelulose. Estes resultados são concordantes com a bibliografia, no que diz respeito a este tipo de tratamento com este material (Herrera et al. 2004; Herrera et al. 2003; Téllez-Luis et al. 2002a; Téllez-Luis et al. 2002b; Vázquez et al. 2007) e com outros resíduos lenhocelulósicos (van Zyl et al. 1988).

Uma vez que o hidrolisado obtido será utilizado como meio de cultura, foi dada atenção especial aos compostos tóxicos obtidos, tais como, ácido acético e compostos fenólicos gerados a partir da hidrólise dos componentes lenhocelulósicos, respectivamente da hemicelulose e da lenhina e furfural e HMF, gerados a partir de reacções de degradação dos monossacáridos. As concentrações de todos os compostos inibidores quantificados aumentam com a severidade do tratamento, com excepção dos compostos fenólicos que atingem uma concentração máxima para um CS de 1,59, a partir da qual decresce muito ligeiramente (Figura 3.3). As percentagens máximas de furfural e HMF foram de 1,3 g/100 g e 0,17 g/100 g de sorgo, respectivamente. Contudo, é de notar que nas condições de maior recuperação de pentoses (CS=1,98), as concentrações de ambos os derivados de furanos foram relativamente baixas, correspondendo a 0,65 g/100 g de sorgo para o furfural e 0,16 g/100 g de sorgo para o HMF que correspondem a 2,92 g/100 g em termos de xilano inicial para o furfural e 0,38 g/100 g de glucano inicial para o HMF.



**Figura 3.3** Rendimento em compostos inibidores obtidos após hidrólise do sorgo com 1,4% de  $H_2SO_4$  para diferentes condições de severidade. Ácido acético (◇), furfural (○), HMF (□) e compostos fenólicos totais (◇). As curvas representam linhas de tendência.

O rendimento máximo de compostos fenólicos totais foi de 0,99 g/100 g sorgo, obtido para CS=1,98.

Estes resultados são bastante favoráveis em comparação com outros referentes a hidrólise de outros resíduos agro-industriais, nos quais se obtiveram recuperações superiores de compostos inibidores, mesmo para menores concentrações de  $H_2SO_4$  (Fernandes *et al.* 2009).

Uma vez que a hidrólise de materiais lenhocelulósicos com ácido diluído consiste num processo hidrolítico que conduz essencialmente à solubilização de componentes hemicelulósicos, as alterações obtidas dos rendimentos em sólido (quantificado pela perda de massa) são úteis para monitorizar a evolução dos tratamentos. No Quadro 3.7 está apresentada a composição em polissacáridos, grupos acetilo e lenhina Klason dos resíduos sólidos obtidos assim como o correspondente rendimento em sólidos em função da severidade do tratamento de hidrólise.

**Quadro 3.7** Efeito das condições de severidade no rendimento em sólidos ( $Y_s$ ), composição polimérica e lenhina Klason obtidos após hidrólise com ácido diluído do sorgo biomassa

%	Factor de severidade combinado (CS)									
	1,17	1,32	1,59	1,71	1,82	1,98	1,99	2,04	2,13	2,31
$Y_s^a$	73,9	73,0	69,0	69,9	67,3	66,4	66,3	66,8	66,0	64,8
Xilano <sup>b</sup>	11,5	10,9	9,3	8,1	7,4	6,3	5,3	5,4	4,5	3,6
Arabinano <sup>b</sup>	0,22	0,17	0,35	0,14	0,52	0,45	0,34	0,36	0,38	0,29
Glucano <sup>b</sup>	51,6	53,2	55,5	56,3	58,0	58,6	59,2	59,1	59,6	60,6
Grupos acetilo <sup>b</sup>	0,74	0,74	0,53	0,19	0,13	0,10	0,02	0,07	0,00	0,00
Lenhina Klason <sup>b</sup>	26,1	26,5	27,5	27,8	28,9	29,0	29,5	28,8	29,0	29,6

<sup>a</sup>(g/100g matéria-prima); <sup>b</sup> (g/100g sólidos processados)

A quantidade de xilano solubilizado aumentou com a severidade, atingindo os 88,9% para as condições mais severas (CS=2,31), o que corresponde a uma percentagem de xilano nos resíduos sólidos processados de 3.6%. No caso do arabinano, a quantidade que solubilizou não variou muito com a severidade do tratamento, tendo ainda vestígios (0,29%) nas condições mais severas.

O glucano não foi significativamente afectado pelo tratamento hidrolítico, nas condições mais severas ocorreu uma solubilização máxima de 4,2%, o que indica que a celulose não é significativamente afectada pelo tratamento efectuado. Torget *et al* (1996) também verificaram que no caso de madeira de choupo ocorria uma baixa solubilização de glucano para valores de severidade combinada relativamente baixos.

Nas condições utilizadas no processo de hidrólise, não seria de esperar que ocorresse uma solubilização, pelo menos significativa, da lenhina. Em todos os ensaios realizados, a percentagem de lenhina Klason nos resíduos sólidos manteve-se praticamente inalterada com a variação da severidade do tratamento, apresentando recuperações que variam entre 95,9% a 101,7%. Este valor elevado de recuperação pode dever-se, provavelmente, à ocorrência de reacções de condensação da lenhina com açúcares e/ou produtos da degradação dos açúcares,

tais como o furfural resultando em produtos da reacção insolúveis, causando um aumento aparente no rendimento da lenhina Klason. Para além disso, uma vez que o procedimento utilizado para a quantificação da lenhina Klason permite estimar directamente todos os componentes que são insolúveis em  $H_2SO_4$ , no caso dos materiais com um teor proteico apreciável, parte da proteína do material poderá eventualmente contribuir para aqueles valores (Torget *et al.* 1996).

No Quadro 3.8 encontra-se apresentada a composição do hidrolisado de sorgo biomassa obtido nas hidrólises ácidas diluídas, utilizando-se diferentes tempos de tratamento.

**Quadro 3.8** Composição do hidrolisado hemicelulósico obtido após hidrólise do sorgo com 1,4% de  $H_2SO_4$  para diferentes condições de severidade.

	Tempo (min)									
	10	20	30	45	60	75	90	120	150	180
	(1,17)	(1,32)	(1,59)	(1,71)	(1,82)	<b>(1,98)</b>	(1,99)	(2,04)	(2,13)	(2,31)
<b>pH</b>	1,13	1,15	0,93	0,98	0,96	<b>0,92</b>	0,87	0,98	0,98	0,91
<b>Composição (g.L<sup>-1</sup>)</b>										
<b>Glucose</b>	1,93	2,14	2,62	3,26	3,61	<b>3,92</b>	4,07	3,98	4,30	4,48
<b>Xilose</b>	20,46	22,06	24,03	27,20	27,18	<b>28,18</b>	29,06	27,70	28,18	27,90
<b>Arabinose</b>	4,02	4,14	4,2	4,38	4,40	<b>4,42</b>	4,15	4,03	4,06	4,12
<b>Ácido Acético</b>	3,75	3,96	4,30	4,62	5,00	<b>5,14</b>	5,19	6,14	6,31	6,32
<b>HMF</b>	0,05	0,06	0,12	0,12	0,16	<b>0,17</b>	0,18	0,18	0,17	0,16
<b>Furfural</b>	0,11	0,15	0,28	0,38	0,69	<b>0,90</b>	1,18	1,32	1,59	1,96
<b>Fenólicos</b>	1,10	1,16	1,12	0,79	1,00	<b>1,38</b>	1,14	1,09	1,03	0,97

Os valores apresentados entre parêntesis referem-se aos valores do factor de severidade combinado (CS).

Tal como descrito no Quadro 3.8, o aumento da severidade dos tratamentos, nomeadamente do tempo de reacção é um facto de extrema importância para a optimização da hidrólise com ácido diluído. No que diz respeito à glucose, é o monossacárido menos influenciado pela hidrólise ácida, sofre um pequeno aumento com o aumento da severidade, atingindo um máximo num CS de 2,31 (4,48 g.L<sup>-1</sup>). Relativamente à xilose, é o monossacárido para o qual se obtêm melhores rendimentos mais elevados, apresentando concentrações acima dos 20 g.L<sup>-1</sup> em todas as condições de severidade. A concentração máxima de xilose (29,06 g.L<sup>-1</sup>) foi observada para um CS de 1,99 que corresponde ao tempo de operação isotérmico de 90 min.

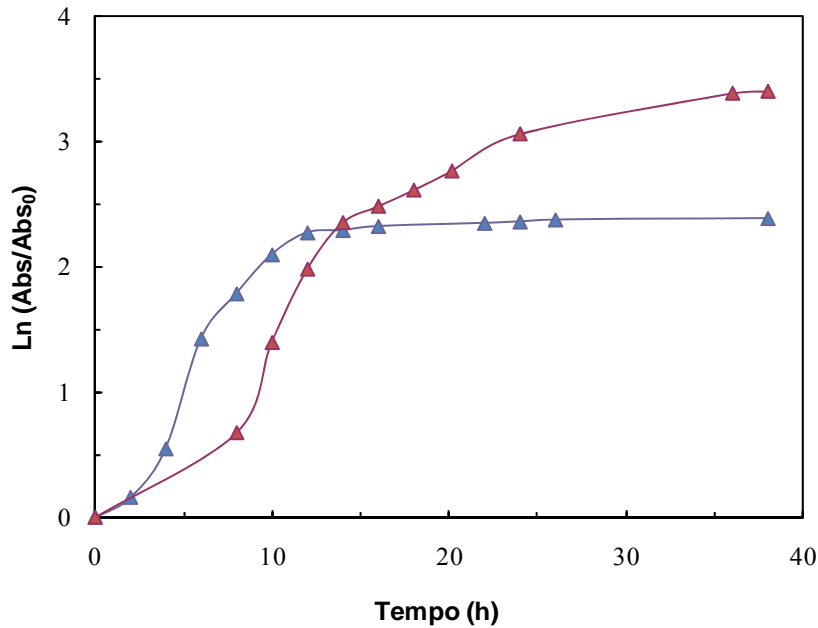
Para além das concentrações de açúcares no hidrolisado, a presença de inibidores é um factor a ter em consideração no processo de optimização de hidrólise.

Pela análise do conjunto dos resultados apresentados pode concluir-se que o tratamento de hidrólise do sorgo biomassa com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1,4% (p/p) a  $130^\circ\text{C}$  durante 75 min (CS 1,98) permitiu: i) a obtenção de um hidrolisado rico em pentoses com cerca de  $36,51 \text{ g.L}^{-1}$  de monossacáridos contendo glucose, xilose e arabinose numa razão 10:72:11 ii) o aproveitamento da quase totalidade dos componentes presentes na matéria-prima, cujas fracções não hidrolisadas (essencialmente celulose e lenhina) poderiam ser utilizadas posteriormente para diferentes aplicações; iii) a obtenção de hidrolisados com baixas concentrações de produtos potencialmente inibidores do crescimento microbiano tais como furfural, HMF, ácido acético e compostos fenólicos totais.

Deste modo foram estas as condições seleccionadas para a produção de hidrolisado a ser utilizado como meio de crescimento da levedura *Debaryomyces hansenii* CCMI 941.

### **3.5 Estudo da fermentiscibilidade do hidrolisado ácido e do licor de pré-extracção aquosa**

A pré-extracção aquosa (PEA) efectuada no início deste trabalho, teve como principal objectivo remover os açúcares livres presentes no sorgo, uma vez que, durante a hidrólise ácida, a sua presença daria origem à potencial formação de compostos inibidores, nomeadamente hidroximetilfurfural (HMF). Tendo em conta que os licores da PEA apresentaram quantidades apreciáveis de açúcares (Quadro 3.2) tornou-se pertinente o estudo da sua fermentiscibilidade, isto é, foi avaliada a possibilidade de utilização do licor de PEA, depois de suplementado, como meio para o crescimento dos inóculos. Para tal, efectuou-se um ensaio de comparação dos perfis de crescimento e de consumo de açúcares da levedura *Debaryomyces hansenii* CCMI 941 em meio contendo licor de PEA e hidrolisado hemicelulósico obtido nas condições de hidrólise ácida optimizadas, ambos suplementados com vitaminas, microelementos e fontes de azoto, fósforo e magnésio, tal como descrito no Anexo III. Os respectivos perfis estão apresentados nas Figuras 3.4 e 3.5.



**Figura 3.4** Perfis de crescimento da levedura *D. hansenii* em licor resultante da pré-extracção aquosa (▲) e hidrolisado hemicelulósico (▲) de sorgo biomassa.

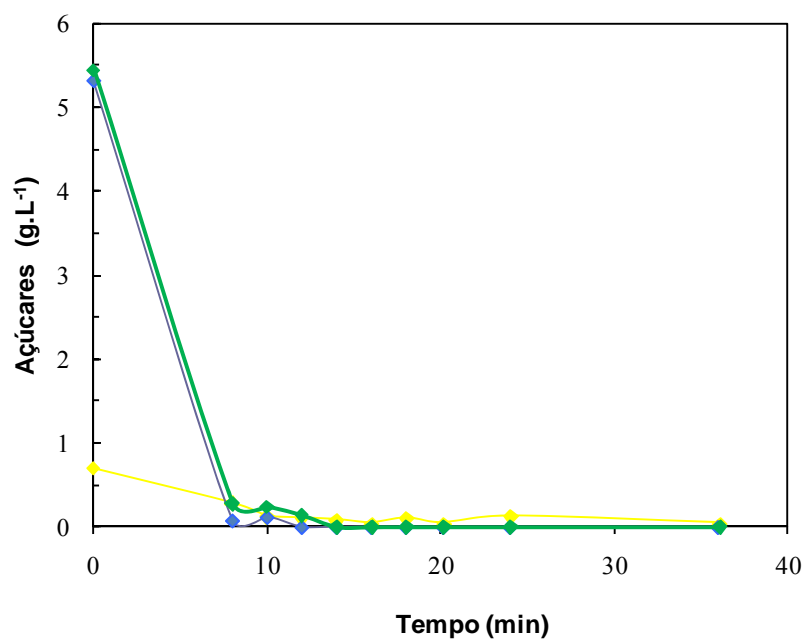
Comparando os perfis de crescimento da levedura nestes dois tipos de meio observam-se algumas diferenças. No licor da PEA a fase de latência é inferior à observada no hidrolisado enquanto a densidade óptica final deste último é significativamente mais elevada, indicando um crescimento mais acentuado. Estas e outras diferenças podem também ser analisadas em pormenor no Quadro 3.9, nomeadamente a fase de latência da levedura crescida em hidrolisado é cerca de 4 vezes superior à fase de latência crescida em licor da PEA, o que poderá dever-se à presença de compostos inibidores no meio contendo hidrolisado, ou ainda a uma menor disponibilidade de açúcares facilmente fermentescíveis como a glucose e frutose, que leva ao aumento da fase de adaptação da levedura a este meio. Este aspecto também pode estar relacionado com o facto do enzima XR e XDH, responsáveis pela conversão da xilose a xilitol serem enzimas indutivos, cuja actividade depende da presença de xilose (Girio *et al* 2000).

**Quadro 3.9** Parâmetros cinéticos e estequiométricos para a levedura *D. hansenii* cultivada em meio com licor de pré-extração aquosa e hidrolisado hemicelulósico de sorgo.

	$\lambda$ (h)	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	$Q_x$ (g.L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	Consumo (%)					$Y_{X/S}$ (g.g <sup>-1</sup> )
				Glc	Xyl	Ara	Sac	Fru	
<b>Licor PEA</b>	1,29	0,26	0,42	100	a	a	80	100	0,82
<b>Hidrolisado</b>	5,27	0,28	0,44	100	99	100	a	a	0,73

$\lambda$ -fase de latência;  $\mu$ - taxa específica de crescimento;  $Q_x$ - produtividade celular;  $Y_{X/S}$ - rendimento em biomassa (calculado com base nos açúcares consumidos); Glc- glucose; Xyl- xilose; Ara- arabinose; Sac- sacarose; Fru- frutose;  $Q_x$ , e  $Y_{X/S}$  e % de consumo de açúcares foram calculados para as 24 e 38 h de crescimento, para o licor de PEA e hidrolisado, respectivamente; a-não contém.

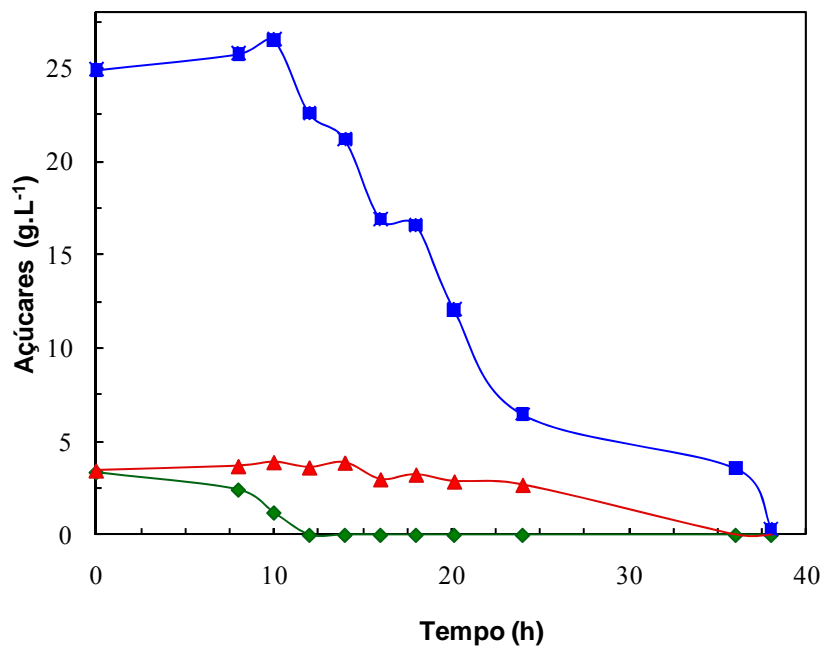
As produtividades celulares foram semelhantes em ambos os meios mas o rendimento em biomassa foi superior no licor da PEA. Quaisquer dos valores obtidos, calculados com base no consumo dos açúcares quantificados por HPLC, foram superiores aos valores habitualmente descritos na literatura para esta levedura em meio quimicamente definido (0,53-0,58 g.g<sup>-1</sup>) (Nobre *et al.* 2002), ainda que rendimentos em biomassa da ordem dos 0.7 g.g<sup>-1</sup> tenham já sido obtidos em hidrolisados (Carvalho *et al.* 2006). As taxas específicas de crescimento foram semelhantes mas ligeiramente superiores no meio contendo hidrolisado (Quadro 3.9), sendo os valores concordantes com os encontrados na literatura para esta levedura (Carvalho *et al.* 2006).



**Figura 3.5** Perfis de consumo de glucose (◆), sacarose (◆) e frutose (◆) da levedura *D. hansenii* em meio contendo licor de pré-extracção aquosa do sorgo.

A Figura 3.5 mostra os perfis de assimilação dos açúcares presentes no licor de PEA, onde se pode observar um consumo rápido e simultâneo da glucose e frutose nas primeiras 8 h de crescimento.

Relativamente ao crescimento de *D. hansenii* em meio contendo hidrolisado hemicelulósico, os perfis de consumo de açúcares estão apresentados na Figura 3.6



**Figura 3.6** Perfis de consumo de xilose (■), glucose (◆) e arabinose (▲) da levedura *D. hansenii* em meio contendo hidrolisado hemicelulósico do sorgo.

O perfil de assimilação de açúcares, no caso do hidrolisado caracteriza-se pelo consumo preferencial da glucose, seguindo-se os outros açúcares (Figura 3.6). No caso do hidrolisado, uma vez que a concentração de açúcares presente é superior, o tempo necessário para o consumo total de açúcares foi também superior, mas por outro lado permitiu obter concentrações de biomassa mais elevada, no máximo 17,68 g.L<sup>-1</sup>.

Para além da biomassa, não foi detectada a acumulação significativa de produtos metabólicos, excepto quantidades relativamente baixas de arabitol e xilitol mas apenas no crescimento em hidrolisado, 4,6 e 0,46 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente

Os resultados obtidos mostram que ambos os meios (licor da PEA e hidrolisado hemicelulósico) são adequados para o crescimento desta levedura uma vez que permitiram um crescimento rápido e eficiente.

### 3.6 Avaliação de metodologias de destoxificação na remoção de compostos inibidores

No sentido de reduzir a inibição do crescimento microbiano em hidrolisados, existem várias abordagens possíveis para minimizar 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), promover a adaptação dos microrganismos aos hidrolisados, desenvolver estirpes capazes de resistir aos inibidores ou convertê-los em produtos que não interferem no metabolismo.

Em geral, o processo de destoxificação, quer pela inevitabilidade na sua formação, quer pela selectividade na remoção de inibidores, é o processo mais utilizado.

O hidrolisado do sorgo biomassa obtido na condição otimizada (75 min, 1,4% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 130°C, correspondente a um CS de 1,98) foi submetido a diferentes tratamentos de destoxificação, nomeadamente a correcção de pH para 5,5 (pH de cultivo) e adsorção em carvão activado. Ambos os tratamentos foram seguidos de um passo de concentração por evaporação (duas vezes, em massa) que para além de permitir aumentar a concentração de monossacáridos, pode também ser utilizado como método de destoxificação tendo em conta a volatilidade de alguns inibidores presentes. As percentagens dos compostos inibidores e de monossacáridos totais que permaneceram no hidrolisado após cada tratamento estão apresentadas no Quadro 3.10.

**Quadro 3.10** Influência dos vários tratamentos de destoxificação na remoção de compostos inibidores e monossacáridos totais presentes no hidrolisado.

Método	Composição do hidrolisado <sup>a</sup>						
	Glc	Xyl	Ara	Ácido acético	HMF	Furfural	Fenólicos
Nenhum <sup>b</sup>	100	100	100	100	100	100	100
pH 5,5	94	95	93	92	91	83	83
pH 5,5, concentrado	90	90	86	45	6	0	74
Carvão activado	93	81	87	86	7	0	7
Carvão activado, concentrado	71	69	84	54	1	0	8

<sup>a</sup> Os resultados estão apresentados sob a forma de percentagem dos compostos que permanecem nos hidrolisados após os tratamentos

<sup>b</sup> Os valores encontrados na amostra não-tratada são considerados como correspondendo a 100%

A concentração de ácido acético foi moderadamente afectada pelo tratamento com carvão activado e em menor extensão pelo ajuste de pH. Das metodologias aplicadas, a que teve maior

impacto na remoção deste ácido alifático foi a concentração do hidrolisado por evaporação. Outros autores também verificaram a remoção destes compostos usando este método de destoxificação (Lopes 2001; Wilson *et al.* 1989). O método menos eficaz na remoção de ácido acético, e restantes compostos inibidores, como se pode verificar no Quadro 3.10, foi a correção de pH para 5,5, resultados concordantes com a bibliografia (Amartey e Jeffries 1994; Frazer e McCaskey. 1989; Lopes 2001; van Zyl *et al.* 1988). Na realidade, o principal objectivo deste método é corrigir o pH do meio para valores adequados à actividade microbiana, não proporcionando uma remoção eficaz de inibidores.

A partir do Quadro 3.10 pode observar-se que o tratamento com carvão activado reduziu consideravelmente as concentrações dos derivados de furanos. A concentração de HMF do hidrolisado (pH 5,5) e furfural foi reduzida 93% e 100%, respectivamente, utilizando este método. A eficiência do carvão activado para remoção deste tipo de inibidores foi também observada por outros autores (Latif e Rajoka 2001; Lopes 2001; Miyafuji *et al.* 2003). A concentração também se revelou muito eficiente na remoção dos derivados de furanos, removendo cerca de 94% de HMF e 100% de furfural. Sendo o furfural um composto volátil, pode facilmente ser removido por evaporação à temperatura utilizada. Outros autores descreveram também percentagens de remoção de furfural elevadas usando o método de concentração (Larsson *et al.* 1999a; Lopes 2001; Parajó *et al.* 1998a).

Para além dos inibidores já referidos, foi também avaliada a remoção de compostos fenólicos. Todos os métodos de destoxificação aplicados, permitiram alguma remoção de compostos fenólicos, destacando-se o método com carvão activado, como método mais eficaz, levando à remoção de 67% dos fenólicos do hidrolisado. Estes resultados estão de acordo com outros trabalhos já publicados, onde se conseguiram percentagens de remoção de compostos fenólicos de 58% (Carvalho *et al.* 2005).

Para além dos efeitos benéficos da utilização de métodos de destoxificação em hidrolisados, é importante salientar ainda os efeitos negativos, nomeadamente a perda de açúcares, que estes métodos por vezes acarretam. Como se pode observar no Quadro 3.10, todos os métodos utilizados levaram de alguma forma a perdas de açúcares nos hidrolisados. O acerto de pH foi o método que menos influenciou a concentração de açúcares totais, provocando apenas uma diminuição de 5-7%, o que poderá considerar-se aceitável. A concentração por evaporação e o tratamento com carvão activado conduziram a perdas de açúcares totais da ordem de 10% e 19%, respectivamente. Quando o hidrolisado destoxificado com carvão foi sujeito a um processo de concentração, verificou-se ainda uma perda adicional de açúcares (da ordem dos 30%). A ocorrência de perdas de açúcares aquando da destoxificação com carvão activado foi já

observada para outros hidrolisados (Carvalho *et al.* 2005) ainda que os valores aqui obtidos sejam superiores.

### 3.7 Avaliação do efeito da destoxificação e do meio de crescimento do inóculo na produção de xilitol

Tal como referido anteriormente, a pré-extracção aquosa (PEA) do sorgo deu origem a um licor com uma concentração de açúcares relativamente elevada que permitiu um crescimento rápido e eficiente da levedura *Debaryomyces hansenii* CCMII 941. Como tal, nos ensaios de produção de xilitol foi estudada a utilização de inóculos crescidos naquele licor, bem como em hidrolisados obtidos nas condições de recuperação máxima de pentoses, ambos suplementados com vitaminas, microelementos e fontes de azoto, fósforo e magnésio (Anexo III).

Nestes ensaios de produção de xilitol foi também avaliado o efeito da destoxificação com carvão activado e/ou concentração do hidrolisado na produção de xilitol, visto que a produção microbológica de xilitol é favorecida para concentrações de xilose elevadas. Apresenta-se no Quadro 3.11 a composição dos hidrolisados utilizados para a formulação dos meios de cultura.

**Quadro 3.11** Composição dos hidrolisados ( $\text{g.L}^{-1}$ ) utilizados nos ensaios de produção de xilitol.

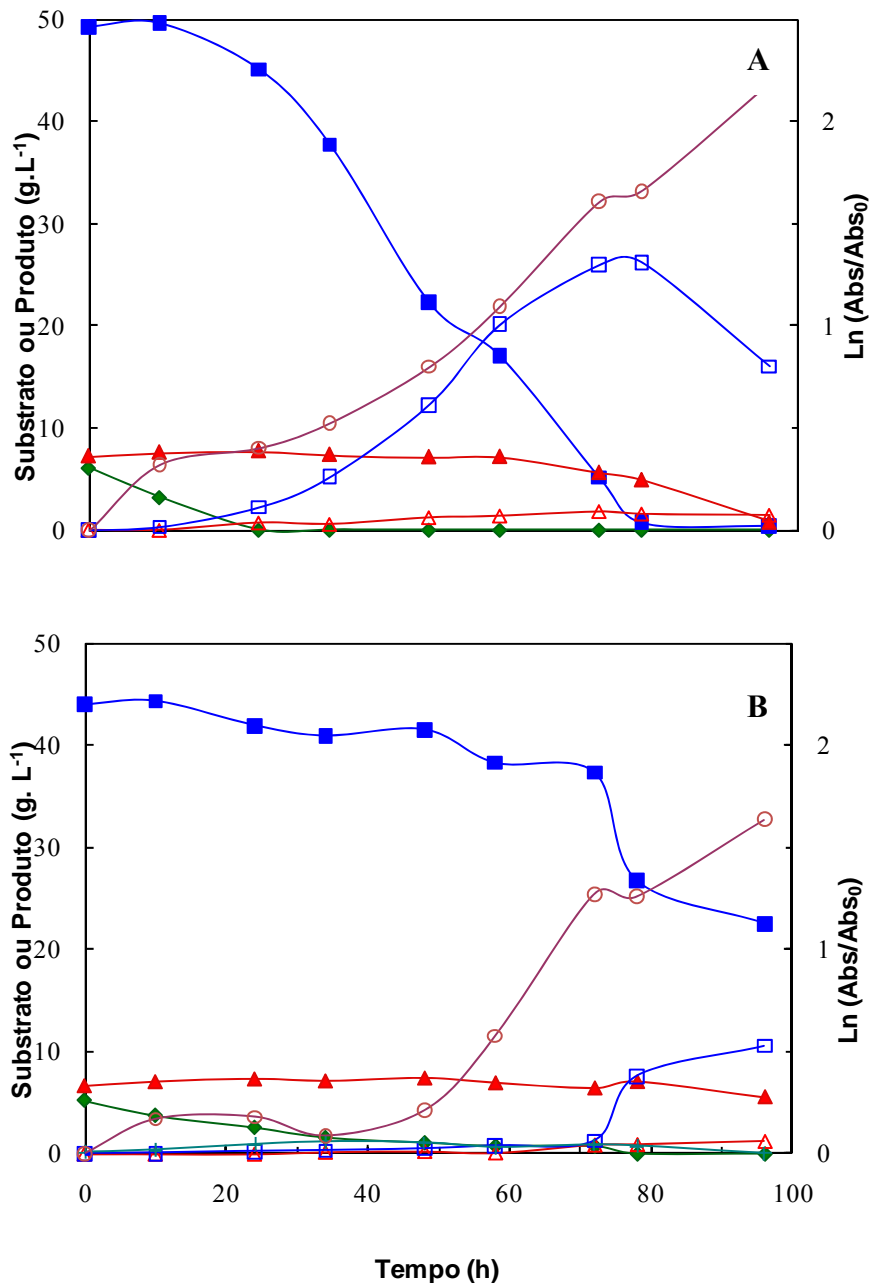
	Concentrado	Destoxificado e Concentrado
Glucose	6,78±0,04	6,22±0,56
Xilose	49,61±1,21	44,04±0,53
Arabinose	7,37±0,14	7,65±0,11
Ácido Acético	4,17±0,77	5,20±0,14
HMF	0,02±0,00	0,00±0,00
Furfural	0,00±0,00	0,00±0,00
Fenólicos	2,14±0,00	0,25±0,00

Estes hidrolisados, concentrados duas vezes (em massa) caracterizam-se por apresentar uma concentração de xilose próxima de  $50 \text{ g.L}^{-1}$ , sendo as diferenças relativas aos compostos potencialmente inibidores decorrentes dos procedimentos de destoxificação utilizados e já discutidos anteriormente (3.6). Consistente com os resultados apresentados no Quadro 3.10, a concentração de ácido acético é ligeiramente superior no hidrolisado destoxificado. Apesar de não existir uma evidência analítica, sugere-se que este facto possa estar relacionado com uma alteração da viscosidade do hidrolisado, visível após destoxificação com carvão activado. Tendo-se obtido um hidrolisado praticamente incolor após o tratamento com carvão activado, indicador de uma boa destoxificação (comprovada pelas análises químicas, Quadro 3.10), observou-se a

formação de uma “goma” que terá eventualmente afectado a taxa de evaporação do ácido acético.

### 3.7.1 Inóculo produzido em licor de pré-extracção aquosa

A Figura 3.8 e o Quadro 3.12 mostram o efeito da destoxificação na produção de xilitol, no caso em que o inóculo foi crescido em licor de PEA



**Figura 3.7** Perfil de consumo de xilose (■), arabinose (▲) e glucose (◆), acumulação de xilitol (□) e arabitol (△) e de crescimento da levedura *D. hansenii* (○) em hidrolisado concentrado não-destoxificado (A) e destoxificado (B) e com inóculo crescido em licor da pré-extracção aquosa

Para ambos os hidrolisados observou-se uma fase de latência relativamente longa, ainda que para o hidrolisado não-destoxificado e, contrariamente ao que à partida seria de esperar, a fase de latência tenha sido cerca de metade do tempo da observada para o hidrolisado destoxificado (48 h) (Figura 3.7). A existência de fases de latência relativamente longas pode sugerir, por um lado a “dificuldade” de adaptação da levedura ao hidrolisado, uma vez que tinha sido previamente crescida no licor da pré-extracção aquosa, que para além de potencialmente não conter compostos inibidores, contém glucose, sacarose e frutose, açúcares que (à excepção da glucose) não estão presentes nos hidrolisados. Por esta razão a levedura poderá necessitar de um período de adaptação até utilizar eficazmente açúcares como a xilose. Por outro lado, nas condições estudadas neste trabalho, os compostos potencialmente inibidores como o ácido acético, furfural e HMF foram assimilados em simultâneo (dados não apresentados). No hidrolisado destoxificado, o HMF foi consumido ao fim 24 h, enquanto que no não-destoxificado esse consumo, bem como o de furfural, ocorreu nas primeiras 10 h de cultivo.

Em ambos os casos, a glucose e a xilose foram praticamente consumidas em simultâneo, sendo que no caso dos hidrolisados não-destoxificados a glucose foi consumida nas primeiras 24 h. Ao contrário do que acontece para outras leveduras como *Candida guilliermondii* (Canilha *et al.* 2005), *D. hansenii* não apresenta consumo diáuxico de glucose e xilose, ainda que neste ensaio se tenha notado um ligeiro aumento da velocidade de consumo de xilose após a exaustão da glucose. O mesmo padrão relativamente à velocidade de consumo, foi observado para a xilose e arabinose no hidrolisado não-destoxificado (Figura 3.8). Após 72 h, o consumo de arabinose no hidrolisado não-destoxificado foi de 22%, enquanto que no hidrolisado destoxificado foi de apenas 3%. Ainda que este açúcar tenha continuado o seu consumo, obteve-se após 96 h, um consumo máximo de 88% e 16%, para os hidrolisados não destoxificados e destoxificados, respectivamente.

No Quadro 3.12 são apresentados os parâmetros cinéticos e estequiométricos do crescimento e produção de xilitol por *D. hansenii* CCMI 941 nos hidrolisados referidos anteriormente.

**Quadro 3.12** Influência da destoxificação com carvão activado nos parâmetros cinéticos e estequiométricos do crescimento e produção de xilitol pela levedura *D. hansenii* utilizando inóculo crescido em licor de pré-extracção aquosa.

	$Q_X$ (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	$Q_{Xilose}$ (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	$[Xilitol]_{máx}$ (g.L <sup>-1</sup> )	$Q_{Xilitol}$ (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	$Y_{Xilitol}$ (g.g <sup>-1</sup> )	$[Xilitol]/$ [Produtos]
Destoxificado	0,11	0,22	10,57	0,11	0,49	0,87
Não-Destoxificado	0,18	0,61	25,95	0,36	0,59	0,93

$Q_X$ - 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 (g<sub>xilitol</sub>/g<sub>xilose</sub>);  $[Xilitol]/[Produtos]$ - razão de concentração de xilitol/concentração total de produtos. Todos os parâmetros foram calculados às 72 h e 96 h para o não-destoxificado e destoxificado, respectivamente.

A taxa de consumo de xilose apresentou o valor mais baixo no caso dos hidrolisados destoxificados, o qual está também associado a um menor crescimento e uma menor produção de xilitol.

Em ambos os ensaios o xilitol foi o principal produto metabólico obtido, atingindo a concentração máxima de 25,95 g.L<sup>-1</sup> ao fim de 72 h de cultivo (hidrolisado não-destoxificado), correspondente a uma produtividade volumétrica de 0.36 g/l.h. Para além do xilitol observou-se também a formação de outros co-produtos tais como arabitol, etanol, glicerol mas apenas em baixas concentrações, no máximo 1,90 g.L<sup>-1</sup>, 1,20 g.L<sup>-1</sup> e 0.25 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente.

Na fase final observou-se um ligeiro consumo de xilitol, facto que foi já anteriormente descrito para esta levedura e está associado à presença de baixas concentrações de xilose, em geral, menor que 10 g.L<sup>-1</sup> (Carvalho *et al.* 2005).

O facto da produtividade em xilitol mais elevada ter sido obtida em hidrolisado não-destoxificado, mostra que, ao contrário do esperado, a destoxificação afecta negativamente a produção de xilitol. Aparentemente este resultado pode estar relacionado com uma alteração da viscosidade do hidrolisado, visível após destoxificação com carvão activado. Tendo-se obtido um hidrolisado praticamente incolor após o tratamento com carvão activado, indicador de uma boa destoxificação (comprovada pelas análises químicas, Quadro 3.10), observou-se a formação de uma “goma” que terá provavelmente dificultado o crescimento microbiano e a correspondente produção de xilitol.

A razão entre as concentrações de xilitol obtidas e o total dos restantes produtos extracelulares é um parâmetro importante para a etapa de optimização da produção de xilitol, uma vez que interessa que as condições operacionais sejam aquelas que favoreçam a produção de xilitol em detrimento de outros co-produtos ou do crescimento celular. O ensaio que apresentou o maior

valor para aquela razão (0,93) corresponde à utilização de meio não-destoxificado, apresentando também o rendimento (0,59 g.g<sup>-1</sup>) e produtividade em xilitol mais elevados. Parajó *et al* (1997b) obtiveram para *D. hansenii* NRRL Y-7426 um rendimento em xilitol de 0,69 g.g<sup>-1</sup>, utilizando hidrolisados de madeira de eucalipto (concentração inicial de xilose de 43 g.L<sup>-1</sup>) mas vários sujeitos a tratamentos de destoxificação sequenciais (“overliming”, tratamento com sulfito, extracção com éter dietílico e adsorção com carvão activado).

O facto do rendimento e produtividade em xilitol mais elevados terem sido obtidos em hidrolisados não-destoxificado, representa uma grande vantagem uma vez que a não utilização de qualquer método de destoxificação leva a uma redução significativa dos custos do processo. Este aspecto, em geral pouco habitual para a maioria dos microrganismos tinha sido observado para a levedura utilizada no presente trabalho em hidrolisados hemicelulósicos de dreche cervejeira (Carvalho *et al.* 2005)

### 3.7.2 Inóculo produzido em hidrolisado ácido

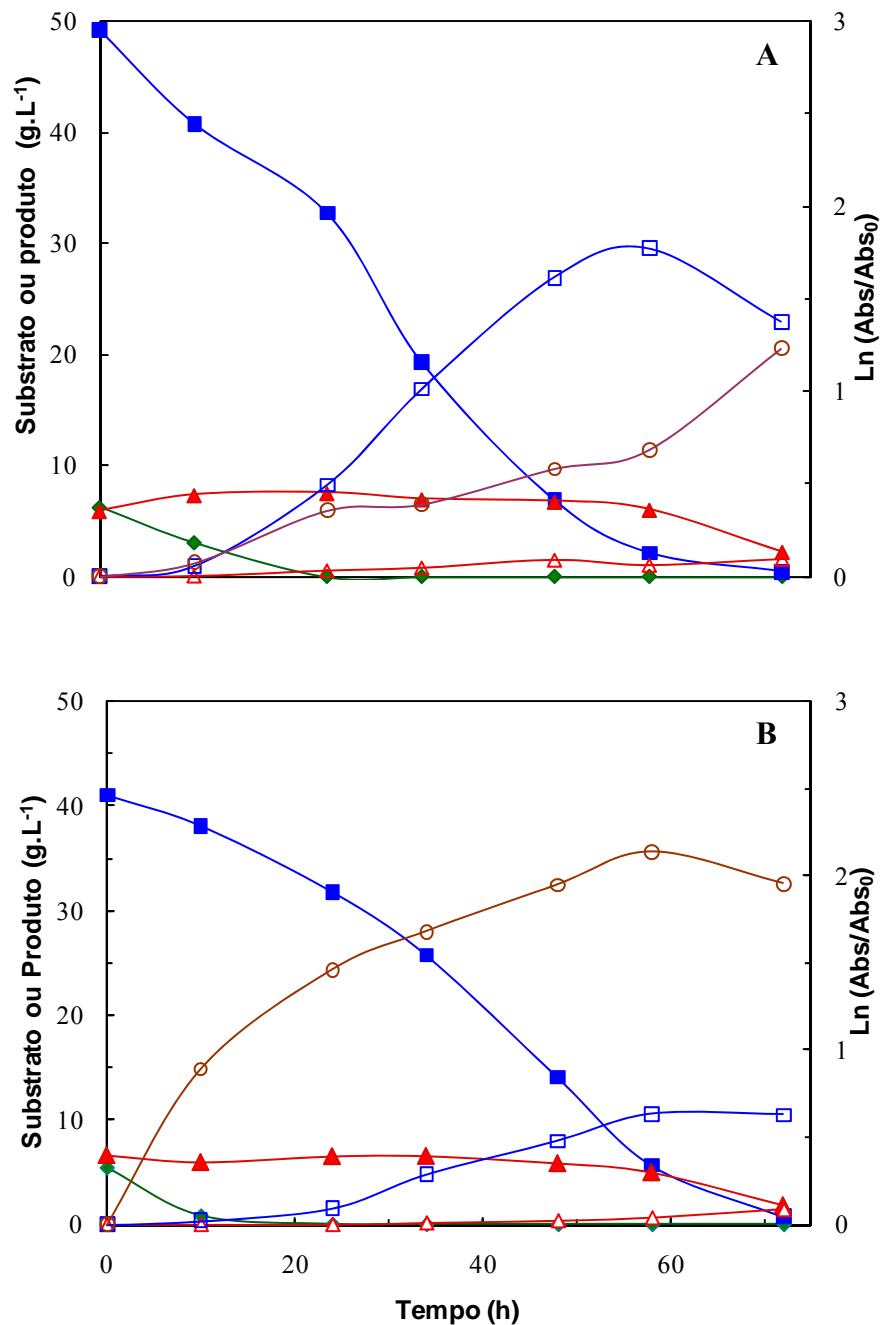
Apesar do rendimento em xilitol obtido em hidrolisado não-destoxificado ser já um valor semelhante ao máximo descrito para esta levedura (Carvalho *et al.* 2007), a produtividade volumétrica correspondente é ainda relativamente baixa. Por esta razão, e por forma a tentar reduzir a fase de latência e assim aumentar as produtividades, foi estudada a produção de xilitol utilizando inóculos crescidos em hidrolisados hemicelulósicos obtidos nas condições previamente optimizadas.

Neste ensaio, tal como no anterior (3.7.1) foi também avaliado o efeito da destoxificação do hidrolisado com carvão activado na produção de xilitol. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 3.8 e Quadro 3.13.

Ao contrário do que aconteceu no ensaio de produção de xilitol anterior, neste ensaio as fases de latência foram mais curtas, praticamente não existindo no meio destoxificado (Figura 3.8). Estes resultados corroboram os anteriormente observados (Figura 3.7) em que poderá ter havido uma certa “dificuldade” de adaptação da levedura, previamente crescida no licor de pré-extracção aquosa e que poderão estar relacionadas, tal como já referido, com a indução das enzimas envolvidos na conversão da xilose a xilitol (Gírio *et al.* 2000).

Uma vez que no presente ensaio foi utilizado hidrolisado ácido para o crescimento do inóculo, que apesar de conter compostos potencialmente inibidores, contém o mesmo tipo de açúcares (glucose, xilose e arabinose) que o hidrolisado concentrado (meio de produção de xilitol), é provável que neste caso a levedura não tenha necessitado de um período de adaptação ao meio e, logo, apresente um crescimento mais eficiente. Por outro lado, nas condições estudadas neste

trabalho, os compostos potencialmente inibidores como o ácido acético, furfural e HMF foram assimilados em simultâneo, tendo em ambos os casos (meio destoxificado e não-destoxificado), o consumo de HMF e furfural ocorrido nas primeiras 10 h de cultivo (dados não apresentados).



**Figura 3.8** Perfis de consumo de xilose (■), arabinose (▲) e glucose (◆), acumulação de xilitol (□) e arabitól (△) e de crescimento da levedura *D. hansenii* (○) em hidrolisado concentrado não-destoxificado (A) e destoxificado (B) e com inóculo crescido em hidrolisado.

Tanto no hidrolisado destoxificado como não-destoxificado, a glucose e a xilose foram praticamente consumidas em simultâneo, sendo a glucose consumida nas primeiras 24 h. Em ambos os hidrolisados, a xilose foi consumida na sua totalidade ao fim de 72 h ainda que a sua

taxa de consumo tenha sido mais baixa no caso dos hidrolisados destoxificados. Relativamente à arabinose, o seu consumo máximo foi de 62% e 73%, nos hidrolisados não-destoxificado e destoxificado, respectivamente. A taxa de consumo de xilose apresentou o valor mais baixo no caso dos hidrolisados destoxificados,

No Quadro 3.13 são apresentados os parâmetros cinéticos e estequiométricos do crescimento e produção de xilitol por *D. hansenii* CCMI 941 nos hidrolisados referidos anteriormente.

**Quadro 3.13** Influência da destoxificação com carvão activado nos parâmetros cinéticos e estequiométricos do crescimento e produção de xilitol pela levedura *D. hansenii* utilizando inóculo crescido em hidrolisado ácido.

	$Q_x$ (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	$Q_{Xilose}$ (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	$[Xilitol]_{máx}$ (g.L <sup>-1</sup> )	$Q_{Xilitol}$ (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	$Y_{Xilitol}$ (g.g <sup>-1</sup> )	$[Xilitol]/$ [produtos]
Destoxificado	0,20	0,56	10,50	0,18	0,30	0,93
Não-Destoxificado	0,16	0,81	29,53	0,56	0,64	0,96

$Q_x$ - 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 ( $g_{xilitol}/g_{xilose}$ );  $[xilitol]/ [produtos]$ - razão concentração de xilitol/ concentração total de produtos

À excepção de  $Q_x$  e de  $Q_{Xilose}$  que foram calculados no final do ensaio (72 h), todos os parâmetros foram calculados às 58 h (máximo da produção de xilitol).

Em ambos os ensaios o xilitol foi o principal produto metabólico obtido, atingindo a concentração máxima de 29,53 g.L<sup>-1</sup> ao fim de 58 h de cultivo (hidrolisado não-destoxificado), correspondente a uma produtividade volumétrica de 0.56 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>. O facto da produtividade em xilitol mais elevada ter sido obtida em hidrolisado não-destoxificado, confirma o resultado anterior que mostra que neste caso a destoxificação afectou negativamente a produção de xilitol. Na fase final observou-se um ligeiro consumo de xilitol, que deverá estar associado ao esgotamento da xilose. A tendência para esta levedura consumir xilitol quando as concentrações de xilose descem abaixo de um determinado valor, havia já sido anteriormente observada (Carvalho *et al.* 2005).

Para além do xilitol observou-se também a formação de outros co-produtos tais como arabitól, etanol e glicerol mas apenas em baixas concentrações, no máximo 1,60 g.L<sup>-1</sup>, 1,98 g.L<sup>-1</sup>e 0.21 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente

A razão entre as concentrações de xilitol obtidas e o total dos restantes produtos extracelulares é um parâmetro importante para a etapa de optimização da produção de xilitol, uma vez que interessa que as condições operacionais sejam aquelas que favoreçam a produção de xilitol em detrimento do crescimento celular ou de outros co-produtos. O ensaio que apresentou o maior valor para aquela razão (0,96) corresponde à utilização de meio não-destoxificado, apresentando

também um rendimento e produtividade em xilitol mais elevados ( $0,64 \text{ g.g}^{-1}$  e  $0,56 \text{ g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$ ) e ainda um crescimento celular mais baixo.

Os resultados obtidos mostram que nestas condições a produção de xilitol por *D. hansenii* é altamente favorecida. Tal como aconteceu no ensaio anterior (3.7.1) os rendimentos e produtividades obtidos utilizando hidrolisado não-destoxificado podem, nalguns casos, ser semelhantes aos valores descritos na literatura para outros hidrolisados hemicelulósicos mas, em geral, depois de tratamentos de destoxificação.

O facto do rendimento e produtividade em xilitol mais elevados terem sido obtidos em hidrolisados não-destoxificados, representa uma grande vantagem uma vez que a eliminação da etapa de destoxificação leva a uma redução significativa dos custos do processo. No caso da produção de etanol, por exemplo, a etapa de destoxificação representa 22% do total dos custos de produção (Von Sivers *et al.* 1994). Este facto, em geral pouco habitual para a maioria dos microrganismos tinha já sido observado para a levedura *D. hansenii* CCMI 941 em hidrolisados hemicelulósicos de dreche cervejeira (Carvalho *et al.* 2005).

Comparando os resultados obtidos com a literatura, pode afirmar-se que em termos de produtividade e rendimento em xilitol, os resultados obtidos nestes dois ensaios de produção de xilitol são muito satisfatórios. Utilizando o sistema de balões agitados, existem resultados publicados utilizando leveduras tais como, *C. guilliermondii* e *D. hansenii* NRRL Y-7426 com diferentes tipos de materiais lenhocelulósicos, nomeadamente palha de arroz e eucalipto, cujos resultados são semelhantes aos obtidos neste trabalho (Parajó *et al.*, 1997b; Roberto *et al.* 1994) ainda que nesses trabalhos tenham sido utilizadas metodologias de destoxificação dos hidrolisados, antes da bioconversão.

Pela análise dos resultados conclui-se que o rendimento e produtividade em xilitol mais elevados foram obtidos em meio não-destoxificado, encontrando-se estes entre os melhores já descritos para produção de xilitol em descontínuo (em balões agitados) com hidrolisados hemicelulósicos não-destoxificados (Mussato e Roberto 2008).

Relativamente à levedura utilizada, é importante referir que neste trabalho, se obtiveram rendimentos e produtividades em xilitol superiores aos anteriormente descritos para *D. hansenii* CCMI 941 em hidrolisados hemicelulósicos de dreche cervejeira não-destoxificados (Carvalho *et al.* 2006; Carvalho *et al.* 2007).

Os resultados globais deste trabalho mostram que a produção de xilitol, através da bioconversão de hidrolisados de sorgo utilizando a levedura *D. hansenii* CCMI 941, comparam favoravelmente com todos os trabalhos já publicados utilizando esta matéria-prima (Sepúlveda-

Huerta *et al.* 2006; Sene *et al.* 2009), mostrando assim as potencialidades deste material, da levedura e do processo desenvolvido

## *Considerações finais*

O sorgo biomassa (variedade H133) possui na sua composição açúcares livres, cuja extracção foi otimizada, utilizando um método aquoso. As condições otimizadas (100°C durante 45 min e RLS 7) permitiram obter um licor com 12,18 g.L<sup>-1</sup> de açúcares totais (sacarose, glucose e frutose). Para além disso, o sorgo biomassa possui uma composição favorável para a obtenção de hidrolisados ricos em pentoses, uma vez que é relativamente rica em xilano e arabinano, que constituem a fracção mais susceptível de ser hidrolisada por um processo com ácido diluído.

A caracterização dos três principais tipos de sorgo (doce, biomassa e forrageiro) dos quais se retirou o suco e se efectuou uma pré-extracção aquosa revelou a potencialidade do suco do sorgo em estado verde, bem como do licor de pré-extracção aquosa.

As condições de hidrólise otimizadas utilizando como catalisador H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,4% (p/p) (130°C durante 75 min) são traduzidas por um baixo valor de CS (1,98) e permitem obter um hidrolisado com 36,51 g.L<sup>-1</sup> de monossacáridos contendo glucose, xilose e arabinose, com uma recuperação quase total da hemicelulose. Estes resultados demonstram que mediante uma cuidadosa optimização das condições operacionais é possível fraccionar selectivamente a hemicelulose com uma recuperação elevada de monossacáridos sem afectar praticamente a celulose, o que constitui uma vantagem tendo em conta a possível utilização dos resíduos sólidos noutros processos envolvendo a biocobversão da glucose.

Simultaneamente são formados alguns compostos potencialmente inibidores do metabolismo microbiano, nomeadamente ácidos alifáticos, derivados de furano e compostos fenólicos, embora em baixas concentrações quando comparados com outros hidrolisados de natureza semelhante. Foram testados alguns métodos de destoxificação, nomeadamente acerto de pH a 5,5, tratamento com carvão activado e concentração por evaporação, onde o tratamento com carvão activado se revelou o melhor na remoção de compostos inibidores, cerca de 50% do ácido acético presente e acima de 90% de derivados de furanos. Devido à presença significativa de açúcares no licor de pré-extracção aquosa, foi feito um ensaio onde se testou a produção de xilitol, utilizando inóculo produzido em licor de pré-extracção aquosa e inóculo produzido em hidrolisado ácido. Os resultados obtidos revelaram que a produção de xilitol utilizando inóculo produzido em licor de pré-tratamento, não é viável, a levedura *Debaryomyces hansenii* revelou dificuldades na mudança de meio, que se observou pela baixa produtividade celular nestas condições e pelo baixo rendimento em xilitol. O ensaio em que se utilizou inóculo produzido em hidrolisado, no que diz respeito ao rendimento e produtividade, os resultados mostraram-se bastante satisfatórios.

Em termos de resultados globais deste trabalho pode concluir-se que na produção de xilitol, através da bioconversão de hidrolisados de sorgo utilizando a levedura *D. hansenii* CCMI 941, estes comparam favoravelmente com todos os trabalhos já publicados utilizando hidrolisados desta matéria-prima e mesmo com outros hidrolisados mostrando assim as potencialidades deste material, da levedura e do processo desenvolvido.

## *Perspectivas futuras*

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

- Optimizar a concentração de suplementos para a produção de biomassa e de xilitol.
- Avaliar as potencialidades do suco do sorgo verde, nomeadamente em crescimento microbiano.
- Avaliar a hidrólise com ácido diluído em sorgo verde prensado e não prensado.
- Avaliar o comportamento do inóculo para o processo de “scale-up”, através de crescimentos sucessivos em descontínuo.

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

Avaliar o efeito dos inibidores pela adição selectiva de compostos inibidores ao hidrolisado destoxificado ou meio definido com uma composição análoga, e observar o reaparecimento da inibição

## ***Bibliografia***

Abatzoglou N, Chornet E, Belkacemi K, Overend RP (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

Adler L, Gustafsson L (1980) Polyhydric alcohol production and intracellular amino acid pool in relation to halotolerance of the yeast *Debaryomyces hansenii*. *Archives of Microbiology* 124:123-130

Agroquisa, [www.agroquisa.com](http://www.agroquisa.com), Novembro 2009

Alén R (2000) Structure and chemical composition of wood. *Forest Products Chemistry*:12-57

Amaral-Collaco MT, Gírio FM, Peito MA, Coughlan MP (1989) Utilization of the hemicellulosic fraction of agro-industrial residues by yeasts. In: *Enzyme systems for lignocellulosic degradation*. Elsevier Applied Science, London, pp 221-230

Amartey S, Jeffries TW (1994) Comparison of corn steep liquor with other nutrients in the fermentation of D-xylose by *Pichia stipitis* CBS 6054. *Biotechnology Letters* 16:211-214

Barbosa MFS, Medeiros MB, Mancilha IM, Schneider H, Lee H (1988) Screening of yeasts for production of xylitol from D-xylose and some factors which affect xylitol yield in *Candida guilliermondii*. *Journal of Industrial Microbiology* 3:241-251

Barnett JA (2000) A history of research on yeasts 2: Louis Pasteur and his contemporaries, 1850-1880. *Yeast* 16:755-771

Baudel (2006) Pré-tratamento e hidrólise In: III workshop Tecnológico: Hidrólise para produção de ethanol, São Paulo, Brasil

Belkacemi K, Abatzoglou N, Overend RP, Chornet E (1991) Phenomenological kinetics of complex systems - mechanistic considerations in the solubilization of hemicelluloses following aqueous steam treatments. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 30:2416-2425

Bicho P, P R, Conningham J, Lee H (1988) Induction of xylose reductase and xylitol dehydrogenase activities in *Pachysolen tannophilus* and *Pichia stitis* on mixed sugar. *Applied Environment Microbiology* 54:50-54

- Biopol (2008) Description of the general biorefinery concept Research Institute Biopol, Germany
- Boussarsar H, Rogé B, Mathlouthi M (2009) Optimization of sugar bagasse conversion by hydrothermal treatment for the recovery of xylose. *Biosource Biothechnology*
- Browning BL (1967) *Methods of wood chemistry*. Interscience, New York
- Buzzini P, Rossi J (1997) Riboflavin production by yeasts as an alternative approach for the utilization of agro-industrial residues. *Agro Food Industry Hi-Tech* 8:30-32
- Canilha L, Carvalho W, Silva JBA (2005) Influence of medium composition on xylitol bioproduction from wheat straw hemicellulosic hydrolysate. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 21:1087-1093
- Capek-Ménard E, Preiss B, Bouchard J, Chornet E, Jaulin L, Overend RP (1987) Enzymatic hydrolysis of a *Populus deltoides* substrate from a thermomechanical treatment of medium consistency slurries. *Canadian Journal of Chemical Engineering* 65:689-692
- Carrasco F (1989) Fundamentos del fraccionamiento de la biomassa *Afinidad* 46:425-429
- Carvalho F (1997) Tecnologia da produção de leveduras com aplicação na indústria alimentar: Optimização dos processos e acumulação de xilitol por *Debaryomyces hansenii* e de trealose por *Saccharomyces cerevisiae*. Tese de Mestrado. Universidade Técnica de Lisboa.
- Carvalho F, Duarte LC, Lopes S, Parajó JC, Pereira H, Gírio FM (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 LC, Lopes S, Parajó JC, Pereira H, Gírio FM (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 LC, Medeiros R, Gírio FM (2004a) Optimization of brewery's spent grain dilute-acid hydrolysis for the production of pentose-rich culture media. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 113-116:1059-1072

- Carvalho F, Duarte LC, Medeiros R, Gírio FM (2007) Xylitol production by *Debaryomyces hansenii* in brewery spent grain dilute-acid hydrolysate: effect of supplementation. *Biotechnology Letters* 29:1887-1891
- Carvalho F, Esteves MP, Parajó JC, Pereira H, Gírio FM (2004b) Production of oligosaccharides by autohydrolysis of brewery's spent grain. *Bioresource Technology* 91:93-100
- Carvalho W, Santos JC, Canilha L, Silva SS, Perego P, Converti A (2005) Xylitol production from sugarcane bagasse hydrolysate - Metabolic behaviour of *Candida guilliermondii* cells entrapped in Ca-alginate. *Biochemical Engineering Journal* 25:25-31
- Chum HL, Johnson DK, Black SK, Overend RP (1990) Pretreatment catalyst effects and the combined severity parameter. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 24-25:1-14
- Converti A, Domínguez JM, Perego P, da Silva SS, Zilli M (2000) Wood hydrolysis and hydrolysate detoxification for subsequent xylitol production. *Chemical Engineering & Technology* 23:1013-1020
- Cruz JM, Domínguez JM, Domínguez H, Parajó JC (2001) Antioxidant and antimicrobial effects of extracts from hydrolysates of lignocellulosic materials. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49:2459-2464
- da Costa MS, Nobre MF, Duarte JC, Williams RAD (1989) Polyol accumulation in yeasts in response to water stress. In: *Microbiology of extreme environments and its potential for biotechnology*. Elsevier Applied Science, London, pp 310-327
- de Carvalho W, Canilha L, Mussatto SI, Dragone G, Morales MLV, Solenzal AIN (2004) Detoxification of sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate with ion-exchange resins for xylitol production by calcium alginate-entrapped cells. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 79:863-868
- Ditzelmüller G, Kubicek CP, Währer W, Röhr M (1984) Xylitol dehydrogenase from *Pachysolen tannophilus* FEMS Microbiology Letters 25:195-198
- Domínguez JM, Cao NJ, Gong CS, Tsao GT (1997a) Dilute acid hemicellulose hydrolysates from corn cobs for xylitol production by yeast. *Bioresource Technology* 61:85-90

- Domínguez JM, Cruz JM, Roca E, Domínguez H, Parajó JC (1999) Xylitol production from wood hydrolyzates by entrapped *Debaryomyces hansenii* and *Candida guilliermondii* cells. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 81:119-130
- Domínguez JM, Gong CS, Tsao GT (1996) Pretreatment of sugar cane bagasse hemicellulose hydrolysate for xylitol production by yeast. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 57-58:49-56
- Domínguez JM, Gong CS, Tsao GT (1997b) Production of xylitol from D-xylose by *Debaryomyces hansenii* *Applied Biochemistry and Biotechnology* 63-65:117-127
- du Preez JC (1994) Process parameters and environmental factors affecting D-xylose fermentation by yeasts. *Enzyme and Microbial Technology* 16:944-956
- Duarte L, Carvalheiro F, Lopes S, Marques S, Parajó JC, FM G (2004) Comparison of two posthydrolysis processes of brewery's spent grain autohydrolysis liquor to produce a pentose-containing culture medium. *Applied Biochemistry Biotechnology* 113-116: 1041-1048
- Encinas JP, Lopez-Diaz TM, Garcia-Lopez ML, Otero A, Moreno B (2000) Yeast populations on Spanish fermented sausages. *Meat Science* 54:203-208
- Felipe MGA, Vieira DC, Vitolo M, Silva SS, Roberto IC, Mancilha IM (1995) Effect of acetic acid on xylose fermentation to xylitol by *Candida guilliermondii*. *Journal of Basic Microbiology* 35:171-177
- Fengel D, Wegener G (1983) *Wood: Chemistry, ultrastructure, reactions*. Walter de Gruyter & Co, Berlin
- Fernandes T, Duarte LC, Carvalheiro F, Gírio FM (2009) Simplex optimization and mathematical modeling of wheat straw dilute acid hydrolysis. 31<sup>th</sup> Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals. New Orleans, Louisiana, EUA.
- Ferrari MD, Neirotti E, Alborno C, Saucedo E (1992) Ethanol production from Eucalyptus wood hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. *Biotechnology and Bioengineering* 40:753-759
- Fleet GH (1990) Yeasts in dairy products. *Journal of Applied Bacteriology* 68:199-211

- Frazer FR, McCaskey TA (1989) Wood hydrolyzate treatments for improved fermentation of wood sugars to 2,3-butanediol. *Biomass* 18:31-42
- Furlan SA, Bouilloud P, Strehaiano P, Riba JP (1991) Study of xylitol formation from xylose under oxygen limiting conditions. *Biotechnology Letters* 13:203-206
- Gamez S, Ramirez JA, Garrote G, Vázquez MV (2004) Manufacture of fermentable sugar solutions from sugar cane bagasse hydrolyzed with phosphoric acid at atmospheric pressure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52:4172-4177
- Garrote G (1997) Métodos hidrotérmicos de processamiento de materiales lignocelulósicos. Relatório de estágio de licenciatura. Universidade de Vigo, Espanha.
- Garrote G (2001) Estudio del processamiento hidrotérmico de materiales lignocelulósicos. Tese de Doutoramento. Universidade de Vigo, Espanha.
- Garrote G, Domínguez H, Parajó JC (2002) Autohydrolysis of corncob: study of non-isothermal operation for xylooligosaccharide production. *Journal of Food Engineering* 52:211-218
- Gírio FM, Roseiro JC (1993) Metabolismo da xilose e produção de xilitol por leveduras. *Boletim Biotecnologia* 45:13-17
- Gírio FM, Roseiro JC, Sá-Machado P, Duarte-Reis AR, Amaral-Collaço MT (1994) Effect of oxygen transfer rate on levels of key enzymes of xylose metabolism in *Debaryomyces hansenii* *Enzyme and Microbial Technology* 16:1074-1078
- Gírio FM, Amaro C, Azinheira H, Pelica F, Amaral-Collaço MT (2000) Polyols production during single and mixed substrate fermentation in *Debaryomyces hansenii* *Bioresource Technology* 71:245-251
- Gnansounou E, Dauriat A, Wyman CE (2005) Refining sweet sorghum to ethanol and sugar: economic trade-offs in the context of North China. *Bioresource Technology* 96:985-1002
- Goldstein IS (1983) Acid processes for cellulose hydrolysis and their mechanisms In: Wood and agricultural residues. Academic Press Inc., New York, pp 315 -328
- Guerzoni ME, Lanciotti R, Marchetti R (1993) Survey of the physiological properties of the most frequent yeasts associated with commercial chilled foods. *International Journal of Food Microbiology* 17:329-341

- Habyarimana DLMDNCLE (2004) Performances of biomass sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) under different water regimes in Mediterranean region. *Industrial Crops and Products* 20:23-28
- Herrera A, Téllez-Luis SJ, González-Cabriaes JJ, Ramírez JA, Vázquez M (2004) Effect of the hydrochloric acid concentration on the hydrolysis of sorghum straw at atmospheric pressure. *Journal of Food Engineering* 63:103-109
- Herrera A, Téllez-Luis SJ, Ramírez JA, Vázquez M (2003) Production of xylose from sorghum straw using hydrochloric acid. *Journal of Cereal Science* 37:267-274
- Horiuchi ji, Tada K (2008) Bioprocess development for microbial xylitol production from agricultural wastes. *Journal of Biothechnology* 136S:460-495
- Hörmeyer HF, W. Schwald, and GB, Bobleter O (1988) Hydrothermolysis of birch wood as pretreatment for enzymatic scaccharification. *PhysiCS and Technology of Wood* 42:95-98
- Hyvonen L, Koivistoinen P, Voirol F (1982) Food tecnological evaluation of xylitol. *Advances in Food Research*, New York 27
- Jeffries TW (1983) Utilization of xylose by bacteria, yeasts, and fungi. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 27:1-32
- Kamm B, Kamm M. (2007) Biorefineries - Multi product processes. *White Biotechnology*, 105, 175-204.
- Kastner JR, Roberts RS, Jones WJ (1996) Effect of pH on cell viability and product yields in D-xylose fermentations by *Candida shehatae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 45:224-228
- Kitpreechavanich V, Hayashi M, Nishio N, Nagai S (1984) Conversion of D-Xilose into xylitol by xylose reductase from *Candida pelliculosa* coupled with the oxidoreductase system of methanogen strain HU. *Biothechnology letters* 6:651-656
- Kreger Rij JNJW (1984) *The yeasts, the taxonomic study*. Elsevier Science Publishers B.V, Amesterdam
- Kubikova J, Zemann A, Krkoska P, Bobleter O (1996) Hydrothermal pretreatment of wheat straw for the production of pulp and paper. *Tappi Journal* 79:163-169

- Larsson S, Palmqvist E, Hahn-Hägerdal B, Tengborg C, Stenberg K, Zacchi G, Nilvebrant N. O, (1999a) The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. *Enzyme and Microbial Technology* 24:151-159
- Larsson S, Reimann A, Nilvebrant NO, Jönsson LJ (1999b) Comparison of different methods for the detoxification of lignocellulose hydrolyzates of spruce. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 77-9:91-103
- Latif F, Rajoka MI (2001) Production of ethanol and xylitol from corn cobs by yeasts. *Bioresource Technology* 77:57-63
- Lee Y, McCaskey T (1983) Hemicelulosic hydrolysis treatments and fermentation of resulting pentoses to ethanol. *Tappi J* 66:102-107
- Llorente A, Vallier P, Villaronga J. M, Garcia P, Ramirez J, Salas M, Moreno M. J, Sanahuja J,(1999) Development of xylo-oligosaccharides and xylitol for use in pharmaceutical and food industries. Relatório do 1º ano do Projecto FAIR CT 98-3811
- Lopes S (2001) Optimização do meio de cultivo para a produção de polióis pela levedura *Debaryomyces hansenni* em hidrolisado hemicelulósico. Relatório de Estágio. Universidade Lusófona de Humanidade e Tecnologias, Lisboa.
- Medeiros RC (2003) Desenvolvimento e optimização de um meio de cultivo para a produção de polióis por *Debaryomyces hansenii* CCMI 941. Relatório de estágio. Faculdade de Engenharia e Recursos Naturais. Universidade do Algarve, Faro.
- Melaja AJ, Hämäläinen L (1977) Process for making xylitol. In, Estados Unidos da América
- Miyafuji H, Danner H, Neureiter M, Thomasser C, Bvochora J, Szolar O (2003) Detoxification of wood hydrolysates with wood charcoal for increasing the fermentability of hydrolysates. *Enzyme and Microbial Technology* 32:396-400
- Monteiro JST (2007) Seminário: Valorização industrial do sorgo sacarino. Escola Superior Agrária, Évora
- Mosier N, Wyman C. E, Dale B, Elander R, Lee Y. Y, Holtzapple M, Ladisch M, (2005) Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology* 96:673-686

- Moura P, Barata R, Carvalheiro F, Gírio FM, Loureiro-Dias MC, Esteves MP (2007) In vitro fermentation of xylo-oligosaccharides from corn cobs autohydrolysis by *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* strains. *Lwt-Food Science and Technology* 40:963-972
- Mussato SI, Roberto, IC (2008) Establishment of the optimum initial xylose concentration and nutritional supplementation of brewer's spent grain hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii* *Process Biochemistry* 43:540-546
- Nigam P, Singh D (1995) Processes for fermentative production of xylitol - A sugar substitute. *Process Biochemistry* 30:117-124
- Nobre A, Duarte LC, Roseiro JC, Gírio FM (2002) A physiological and enzymatic study of *Debaryomyces hansenii* growth on xylose- and oxygen-limited chemostats. *Applied Microbiology and Biotechnology* 59:509-516
- Nolleau V, Preziosi-Belloy L, Navarro JM (1995) The reduction of xylose to xylitol by *Candida guilliermondii* and *Candida parapsilosis* : Incidence of Oxygen and pH. *Biotechnology Letters* 17:417-422
- Onishi, H.,T. Suzuki (1966). The production of xylitol, L-arabinitol and ribitol by yeasts. *Agricultural and Biological Chemistry*. (Tokyo) 30:1139-1144.
- Ogier JC, Ballerini D, Leygue JP, Rigal L, Pourquoi J (1999) Ethanol production from lignocellulosic biomass. *Oil & Gas Science and Technology-Revue de l' Institut Francais du Petrole* 54:67-94
- Overend RP, Chornet E (1987) Fractionation of lignocellulose by steam-aqueous pretreatments. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series A-Mathematical Physical and Engineering Sciences* A321:523-536
- Palmqvist E, Galbe M, Hahn-Hägerdal B (1998) The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of soft wood. *Enzyme Microbial Technology* 24:151-159
- Palmqvist E, Hahn-Hägerdal B (2000) Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: Inhibition and detoxification. *Bioresource Technology* 74:17-24
- Parajó JC, Domínguez H, Domínguez JM (1995) Production of xylitol from raw wood hydrolysates by *Debaryomyces hansenii* NRRL Y-7426. *Bioprocess Engineering* 13:125-131

- Parajó JC, Domínguez H, Domínguez JM (1996a) Charcoal adsorption of wood hydrolysates for improving their fermentability: Influence of the operational conditions. *Bioresource Technology* 57:179-185
- Parajó JC, Domínguez H, Domínguez JM (1996b) Production of xylitol from concentrated wood hydrolysates by *Debaryomyces hansenii*: Effect of the initial cell concentration. *Biotechnology Letters* 18:593-598
- Parajó JC, Domínguez H, Domínguez JM (1997a) Improved xylitol production with *Debaryomyces hansenii* Y-7426 from raw or detoxified wood hydrolysates. *Enzyme and Microbial Technology* 21:18-24
- Parajó JC, Domínguez H, Domínguez JM (1997b) Xylitol production from *Eucalyptus* wood hydrolysates extracted with organic solvents. *Process Biochemistry* 32:599-604
- Parajó JC, Domínguez H, Domínguez JM (1998a) Biotechnological production of xylitol. Part 1: Interest of xylitol and fundamentals of its biosynthesis. *Bioresource Technology* 65:191-201
- Parajó JC, Domínguez H, Domínguez JM (1998b) Biotechnological production of xylitol. Part 2: Operation in culture media made with commercial sugars. *Bioresource Technology* 65:203-212
- Parisi F (1989) Advances in lignocellulose hydrolysis and the utilization of the hydrolysates. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 38:53-87
- Peito MA (1992) Isolamento, selecção e Caracterização de leveduras que utilizam a D-xilose. Tese de Mestrado. Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa.
- Pereira H, Graça J, Rodrigues JC, Barnett JR, Jeronimidis G (2003) Wood chemistry in relation to quality. In: *Wood quality and its biological basis*. Blackwell Publishing, Oxford
- Pessoa A, Jr., Mancilha IM, Sato S (1996) Cultivation of *Candida tropicalis* in sugar cane hemicellulosic hydrolyzate for microbial protein production. *Journal of Biotechnology* 51:83-88
- Preziosi-Belloy L, Nolleau V, Navarro JM (2000) Xylitol production from aspenwood hemicellulose hydrolysate by *Candida guilliermondii* *Biotechnology Letters* 22:239-243
- Prior BA, Kilian SG, du Preez JC (1989) Fermentation of D-xylose by the yeasts *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*: Prospects and problems. *Process Biochemistry* 24:21-32

- Roberto IC, Felipe MGA, Lacis LS, Silva SS, Mancilha IM (1991) Utilization of sugar-cane bagasse hemicellulosic hydrolyzate by *Candida guilliermondii* for xylitol production. *Bioresource Technology* 36:271-275
- Roberto IC, Mancilha IM, Souza CA, Felipe MGA, Sato S, Castro HF (1994) Evaluation of rice straw hemicellulose hydrolysate in the production of xylitol by *Candida guilliermondii*. *Biotechnology Letters* 16:1211-1216
- Roberto IC, Sato S, de Mancilha IM (1996) Effect of inoculum level of xylitol production from rice straw hemicellulose hydrolysate by *Candida guilliermondii*. *Journal of Industrial Microbiology* 16:348-350
- Rodrigues DCGA, Silva SS, Felipe MGA (1999) Fed-batch culture of *Candida guilliermon* FTI 20037 for xylitol production from sugar cane bagasse hydrolysate. *Letters in Applied Microbiology* 29:359-363
- Rodrigues DCGA, Silva SS, Prata AMR, Felipe MGA (1998) Biotechnological production of xylitol from agroindustrial residues - Evaluation of bioprocesses. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 70-72:869-875
- Rooney WL, Blumenthal J, Mullet BE (2007) Designing sorghum as a dedicated bioenergy feedstock. *Biofuels Bioproduction e Biorefining* 1:147-157
- Roseiro JC, Peito MA, Gírio FM, Amaral-Collação MT (1991) The effects of the oxygen transfer coefficient and substrate concentration on the xylose fermentation by *Debaryomyces hansenii*. *Archives of Microbiology* 156:484-490
- Saha BC, Bothast RJ (1996) Production of L-arabitol from L-arabinose by *Candida entomaea* and *Pichia guilliermondii*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 45:299-306
- Saha BC, Bothast RJ (1999) Production of xylitol by *Candida peltata*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 22:633-636
- Sakakibara Y, Saha BC, Tayles P (2009) Microbial production of xylitol from L-arabinose by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 107:506-511

- Sampaio FC, Torre P, Passos FM, Perego P, Passos FJ, Converti A (2004) Xylose metabolism in *Debaryomyces hansenii* UFV-170. Effect of the specific oxygen uptake rate. *Biotechnology Progress* 20:1641-1650
- Saska M, Ozer E (1995) Aqueous extraction of sugarcane bagasse hemicellulose and production of xylose syrup. *Biotechnology and Bioengineering* 45:517-523
- Sene L, Arruda P V, Oliveira S M, Felipe M D G A (2009) Evaluation of sorghum straw hemicellulosic hydrolysate for xylitol production. 14<sup>th</sup> European Congress on Biotechnology Poster 2.6.092, Barcelona, Espanha
- Sepúlveda-Huerta E, Téllez-Luis SJ, Bocanegra-García V, Ramírez JA, Vázquez M (2006) Production of detoxified sorghum straw hydrolysates for fermentative purposes. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86:2579-2586
- Silva C (1999) Planejamento e otimização de parâmetros no processo fermentativo de obtenção de xilitol empregando o hidrolisado hemicelulósico de pelha de arroz. Tese de Mestrado. Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Brasil.
- Silva SS, Mancilha IM, Queiroz MA, Felipe MGA, Roberto IC, Vitolo M (1994) Xylitol formation by *Candida guilliermondii* in media containing different nitrogen sources. *Journal of Basic Microbiology* 34:205-208
- Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Oxidants and Antioxidants, Pt A.* 299:152-178.
- Singleton VL, Rossi JAJ (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16:144-158
- Spencer JF, Spencer DM, Campbell I, Duffs JH (1988) Yeast genetics. In: *Yeast a practical approach*. IRL Press Limited, Oxford, pp 65-106
- Stenderup J (1992) *Debaryomyces hansenii*: pathogen or commensal. In: *Actas do ISY 8th International Commission of Yeasts*, Atlanta, p 220

- Sugai JK, Delgenes JP (1995) Catabolite repression of induction of aldose reductase activity and utilization of mixed hemicellulosic sugars in *Candida guilliermondii*. *Current Microbiology* 31:239-244
- Sun Y, Cheng J (2002) Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology* 83:1-11
- Tavares JM, Duarte LC, Amaral-Collaço MT, Gírio FM (2000) The influence of hexoses addition on the fermentation of D-xylose in *Debaryomyces hansenii* under continuous cultivation. *Enzyme and Microbial Technology* 26:743-747
- Téllez-Luis SJ, Ramírez JA, Vázquez M (2002a) Mathematical modelling of hemicellulosic sugar production from sorghum straw. *Journal of Food Engineering* 52:285-291
- Téllez-Luis SJ, Ramírez JA, Vázquez M (2002b) Modelling of the hydrolysis of sorghum straw at atmospheric pressure. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 82:505-512
- Torget R, Hatzis C, Hayward TK, Hsu TA, Philippidis GP (1996) Optimization of reverse-flow, two-temperature, dilute-acid pretreatment to enhance biomass conversion to ethanol. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 57-8:85-101
- Torget R, Walter P, Himmel M, Grohmann K (1991) Dilute-acid pretreatment of corn residues and short-rotation woody crops. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 28-29:75-86
- Tran AV, Chambers RP (1986) Ethanol fermentation of red oak acid prehydrolysate by the yeast *Pichia stipitis* CBS 5776. *Enzyme and Microbial Technology* 8:439-444
- van Zyl C, Prior BA, du Preez JC (1988) Production of ethanol from sugar cane bagasse hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 17:357-370
- Vandeska E, Kuzmanov S, Jeffries TW (1995) Xylitol formation and key enzyme activities in *Candida boidinii* under different oxygen transfer rates. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 80:513-516
- Vázquez M, Oliva M, Téllez-Luis SJ, Ramírez JA (2007) Hydrolysis of sorghum straw using phosphoric acid: evaluation of furfural production. *Bioresource Technology* 98:3053-3060

Von S M, Zacchi G, Olsson L, Hahn-Hägerdal B (1994) Cost analysis of ethanol production from willow using recombinant *Echerichia coli*. *Biothecnology Process* 10:555-560

Watson NE, Prior BA, Lategan PM, Lussi M (1984) Factors in acid treated bagasse inhibiting ethanol production from D-xylose by *Pachysolen tannophilus*. *Enzyme and Microbial Technology* 6:451-456

Wilson JJ, Deschatelets L, Nishikawa NK (1989) Comparative fermentability of enzymatic and acid hydrolysates of steam-pretreated aspenwood hemicellulose by *Pichia stipitis* CBS 5776. *Applied Microbiology and Biotechnology* 31:592-596

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

Wright JD (1988) Ethanol from biomass by enzymatic hydrolysis. *Chemical Engineering Progress* 84:8:62-74

Yoshitak J, Shimamur M (1973) Production of polyalcohol by *Corynebacterium sp.*- Xylitol production. *Agricultural Biological Chemistry* 37:2251-2259

## **4. Anexos**

### **I. Determinação do teor e perfil de açúcares solúveis em amostras vegetais**

O presente protocolo, permite a determinação dos teores de açúcares solúveis (reduzidos e totais) em materiais de origem vegetal. Baseia-se no procedimento de extracção quantitativa dos açúcares pelo método de Luff-Schoorl, seguido da determinação analítica dos açúcares por HPLC.

#### **Reagentes**

##### ***Solução de álcool etílico a 40% (v/v)***

Medir 833,3 cm<sup>3</sup> de álcool etílico a 96% e perfazer a 2 l em balão volumétrico

#### **Protocolo experimental**

Devem efectuar-se, pelo menos, duas determinações paralelas.

##### ***A. Preparação das amostras***

As amostras são moídas a pó num moinho de café de forma a obter uma amostra homogénea. Se necessário poderá fazer-se uma (nova) moagem num moinho mais eficaz, de forma a obter uma amostra com uma granulometria inferior a 0,5 mm.

##### ***B. Protocolo de extracção***

- i. Pesam-se, com a precisão de +/- 0,1 mg, 5 g da amostra e introduzem-se num balão volumétrico de 250 cm<sup>3</sup>.
- ii. Juntam-se 200 cm<sup>3</sup> de solução de álcool etílico 40% (v/v) e agita-se durante pelo menos 2,5 h preferencialmente numa incubadora orbital a 150 rpm e 30 °C
- iii. Completa-se o volume com a solução de álcool etílico 40% (v/v).
- iv. Homogeneiza-se e filtra-se por papel de filtro Whatman n.º 1 ou equivalente, previamente tarado, para um gobblet.
- v. Utilizar o filtro com o retentado para determinação da massa residual seca.
- vi. Utilizam-se 200 cm<sup>3</sup> de filtrado (25°C) e evapora-se até cerca de metade do volume, para eliminar o álcool etílico.
- vii. Transfere-se quantitativamente, com o auxílio de água quente, para um balão volumétrico de 200 cm<sup>3</sup>, arrefece-se e completa-se o volume com água.
- viii. Homogeneiza-se e filtra-se por filtro de 0,45 µm. Utiliza-se esta solução para a determinação dos açúcares por HPLC.

## Cálculos

$$\text{Teor de açúcar X livre} = \frac{[X] \cdot V_{ext}}{1000 \cdot \left( M \cdot \frac{H}{100} \right)} \cdot \frac{V_{Tevap}}{V_{filtrado}} \cdot 100 \text{ (g/100 g de material seco)}$$

Onde,

[X] - Concentração do açúcar X (g.L<sup>-1</sup>) obtida da análise de HPLC

V<sub>ext</sub> - Volume total da extracção, tipicamente 250 cm<sup>3</sup>

V<sub>Tevap</sub> - Volume total após evaporação, tipicamente 200 cm<sup>3</sup>

V<sub>filtrado</sub> - Volume de filtrado utilizado para o processo de evaporação, tipicamente 200 cm<sup>3</sup>

M - Massa de material utilizado para a extracção, tipicamente 5

H - Massa seca do material

## II. Meios de cultura

### Meio Yeast Malt-glucose (YM-glc)

**Quadro 4.1** Composição do meio YM-glc

Nutriente	Conc. (g.L <sup>-1</sup> )	Marca comercial
Extracto de levedura	3,0	Oxoid
Extracto de malte	3,0	Oxoid
Peptona	5,0	Difco
Glucose	10,0	Oxoid
Agar	20,0	Merck

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

### Meio Yeast Malt-xylose (YM-xyl)

**Quadro 4.2** Composição do meio YM-xyl.

Nutriente	Conc. (g.L <sup>-1</sup> )	Fornecedor
Extracto de levedura	3,0	Oxoid
Extracto de malte	3,0	Oxoid
Peptona	5,0	Difco
Xilose	20,0	Merck
Agar	20,0	Merck

O meio foi preparado do mesmo modo que YM-glc sendo, após arrefecimento até 50-55°C, distribuído assepticamente em tubos de ensaio estéreis (6 mL/tubo) e deixado a solidificar inclinado, à temperatura ambiente. As rampas e os frascos de meio “stock” foram armazenados a 4°C.

### III. Soluções de suplementos utilizadas

#### Soluções de nutrientes

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

#### Solução de sais

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

**Quadro 4.3** Composição da solução de sais 40 vezes concentrada.

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

#### Procedimento:

Dissolver o EDTA e adicionar o Zinco em pelo menos 800 mL de água. Acertar o pH a 5,5-6,0. Adicionar os restantes compostos pela ordem indicada mantendo o pH sempre nesse intervalo. Caso seja necessário corrija o pH mesmo antes da dissolução completa do reagente que está a adicionar. A maior descida de pH ocorre com o Fe. Colocar o volume a cerca de 1200 mL. Separar em alíquotas de 250 mL em balões de 500 mL. Ao longo da preparação a solução vai

alterando a cor, inicialmente é incolor, cor-de-rosa ténue e após a adição de cobalto, azulada após adição do cobre, amarelada, após adição do Fe.

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

### Solução NP

A fonte de Azoto, Potássio e Fósforo foi preparada numa solução 25 vezes concentrada e o pH acertado a 5,5 com NaOH 5M. Esta solução foi autoclavada separadamente da solução de sais minerais de modo a evitar reacções a altas temperaturas que poderiam diminuir a quantidade dos diferentes elementos disponíveis para o crescimento da levedura, nomeadamente por reacções com o ião fosfato. Esta solução apresenta a seguinte composição:

**Quadro 4.4** Composição da solução de NP 25 vezes concentrada

Nutriente	Fórmula	Conc. (g.L <sup>-1</sup> )	Fornecedor	Conc.final (g.L <sup>-1</sup> )
Sulfato de amónio	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	235,95	Pronalab	9,438
Dihidrogenofosfato de potássio	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	66,50	JT Baker	2,660

### Solução Mg

A fonte de magnésio foi preparada numa solução 25 vezes concentrada e o pH acertado a 5,5 com NaOH 5M. Esta solução foi esterilizada em autoclave a 120°C durante 15 minutos.

**Quadro 4.5** Composição da solução de Mg 25 vezes concentrada

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

### Solução de vitaminas e cálcio

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

**Quadro 4.6** Composição da solução de vitaminas e cálcio 100 vezes concentrada.

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

**Procedimento:**

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.

**IV. Formulário****A. Factor de severidade combinado**

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

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

Onde,

-T é a temperatura (°C)

-t é o tempo (min)

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

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

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

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

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

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

pH – valor do pH do hidrolisado medido experimentalmente.

### **B. Caracterização química da matéria-prima e resíduos sólidos**

As concentrações de glucose, xilose, arabinose e ácido acético nos licores resultantes da hidrólise ácida quantitativa da matéria-prima e resíduo sólido foram utilizados para o cálculo das percentagens de glucano, xilano, arabinano e grupos acetilo, respectivamente (Eq. IV.4- IV.7). O resíduo insolúvel em ácido, após correcção das cinzas, permitiu o cálculo da lenhina Klason (Eq. IV.8)

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

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

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

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

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

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

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

### C. Cálculo de rendimentos

O rendimento de cada um dos polímeros<sup>2</sup>, expresso como a percentagem que permanece no resíduo sólido relativamente à respectiva percentagem na matéria-prima, após hidrólise ácida foi calculada de acordo com as Eq.IV.9-IV.13.

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

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

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

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

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

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

---

<sup>2</sup> O termo polímero está a ser utilizado para designar os polissacáridos, lenhina e grupos acetilo, embora estes últimos não sejam na realidade polímeros, uma vez que do ponto de vista estrutural façam parte da hemicelulose. A designação de “polímero” para o conjunto de componentes referidos foi adoptada por uma questão de simplicidade.

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

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

A percentagem de cada um dos polímeros solubilizada a monómeros e de monómeros convertida em produtos de degradação, foi calculada de acordo com as Eq.IV.14-IV.19, onde (162/180), (132/150), (60/61), (132/96) e (162/126,1) são factores estequiométricos para a conversão da glucose, xilose e arabinose, ácido acético, furfural e HMF para glucano, xilano e arabinano, grupos acetilo, xilano e glucano, respectivamente.

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

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

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

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

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

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

-  $Glc_R$ ,  $Xyl_R$ ,  $Ara_R$ ,  $Ac_R$ ,  $Furf_R$ ,  $HMF_R$ , 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).

-  $\rho_H$  é a massa volúmica do hidrolisado ( $g \cdot L^{-1}$ ).

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

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

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

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

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

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

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

As percentagens de glucose, xilose, arabinose, ácidos acético, fórmico e levulínico, furfural, HMF e compostos fenólicos relativamente ao total de amostra inicial foram calculadas de acordo com as Eq.IV.25-IV.33.

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

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

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

$$Ac_T = \frac{Ac_R \cdot Ac_{MP}}{100} \quad (\text{Eq.IV.28})$$

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

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

$$CFn_T = \frac{CFn \cdot P_H}{\rho_H \cdot A} \cdot 100 \quad (\text{Eq.IV.31})$$

- Glc<sub>T</sub>, Xyl<sub>T</sub>, Ara<sub>T</sub>, Ac<sub>T</sub>, Furf<sub>T</sub>, HMF<sub>T</sub> e CFn<sub>T</sub> são as percentagens de glucose, xilose, arabinose, ácido acético, furfural, HMF e compostos fenólicos (g por 100 g de matéria-prima).

- CFn é a concentração de compostos fenólicos presentes no hidrolisado (g.L<sup>-1</sup>).

#### **D. Parâmetros cinéticos e estequiométricos**

- Taxa específica de crescimento (h<sup>-1</sup>)

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

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

- Produtividade celular (g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>)

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

X<sub>i</sub> e X<sub>f</sub> são as concentrações iniciais e finais de biomassa, respectivamente (g.L<sup>-1</sup>).

- Taxa volumétrica de consumo de substrato (g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>)

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

- S<sub>i</sub> e S<sub>f</sub> são as concentrações iniciais e finais de substrato, respectivamente (g.L<sup>-1</sup>). Substrato: xilose e/ou glucose e/ou arabinose.

- % Substrato consumido

$$\% \text{ substrato consumido} = \frac{(S_i - S_f)}{S_i} \times 100 \quad (\text{Eq.IV.35})$$

- Taxa volumétrica de formação de xilitol (g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>)

$$Q_{XOH} = \frac{\text{Xilitol}_f - \text{Xilitol}_i}{t_f - t_i} \quad (\text{Eq.IV.36})$$

Xilitol<sub>i</sub> e xilitol<sub>f</sub> são as concentrações iniciais e finais de xilitol, respectivamente (g.L<sup>-1</sup>).

- Rendimento celular (g.g<sup>-1</sup>)

$$Y_{X/S} = \frac{X_f - X_i}{S_i - S_f} \quad (\text{Eq.IV.37})$$

- Rendimento em xilitol (g.g<sup>-1</sup>)

$$Y_{XOH/S} = \frac{XOH_f - XOH_i}{S_i - S_f} \quad (\text{Eq.IV.38})$$

S<sub>i</sub> e S<sub>f</sub>, XOH<sub>i</sub> e XOH<sub>f</sub> representam as concentrações iniciais e finais (g.L<sup>-1</sup>) de xilose e de xilitol, respectivamente.

- Razão XOH/Produtos

$$\text{XOH/Produtos} = \frac{\text{Xilitol}}{\text{Arabitol} + \text{Glicerol} + \text{Etanol} + \text{Xilitol}} \quad (\text{Eq.IV.39})$$

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

## V. Determinação da proteína total

A proteína total foi determinada de acordo com o método de Kjeldahl (1975). As amostras a analisar foram pesadas directamente 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<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado (96% p/p), 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 extracção 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.

**Quadro 4.7** Reagentes utilizados na determinação da proteína total.

	Sulfato de cobre	3 g
	Óxido de titânio	3 g
Mistura catalisadora	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 <sup>a</sup>	

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

## Expressão dos resultados

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

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

Onde,

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

V<sub>0</sub>- volume da solução de HCl 0,1 N gasto na titulação do ensaio em branco (mL)

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

## VI. Determinação da concentração de compostos fenólicos

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

### Preparação das Soluções

#### Solução stock de ácido gálico 0,6 g.L<sup>-1</sup>

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 °C.

#### Solução stock de carbonato de sódio 7,5% (p/v)

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

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

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

### Procedimento:

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

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

### Cálculos

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