



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

**OBTENÇÃO DE MELAÇO RICO EM
XILITOL A PARTIR DA BIOMASSA DE
MILHO**

Stephanie Irina Lopes Delgado

2015



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

**OBTENÇÃO DE MELAÇO RICO EM
XILITOL A PARTIR DA BIOMASSA DE
MILHO**

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra
para cumprimento dos requisitos necessários à
obtenção do grau de Mestre em Biodiversidade e
Biotecnologia Vegetal, 2015.

Orientador: Doutor Jorge Manuel Tavares Branco Varejão

Coorientador: Doutor Leonel Carlos Dos Reis Pereira

Stephanie Irina Lopes Delgado

2015

"O êxito da vida não se mede apenas pelas conquistas,
mas também pelas dificuldades superadas no caminho."

Abraham Lincoln

Agradecimento

Em primeiro lugar gostaria de agradecer a minha família principalmente as minhas mães que estiveram sempre presentes e apoiaram durante todo o tempo da minha especialização académica.

De seguida ao professor Jorge Varejão que sugeriu o tema para a minha dissertação, como meu orientador esteve sempre presente, um muito obrigado.

Agradeço também ao Engenheiro João Vaz Pato e ao Doutor Pedro Mendes Moreira da Escola Superior Agrária de Coimbra, pelo fornecimento das amostras de milho e a identificação da variedade.

Aos meus colegas e amigos que ao longo destes anos académicos mantiveram-se sempre fieis e presentes quando precisei.

Não deixando de acrescentar um especial agradecimento aos funcionários do Laboratório de Química da Escola Superior Agrária de Coimbra que me ajudaram durante o tempo que estive no laboratório.

Resumo

A obtenção de um melão rico em xilitol, a partir da xilose obtida da fração hemicelulose da biomassa da planta do milho foi o principal objetivo deste trabalho. O xilitol é uma substância com interesse em diferentes áreas industriais.

Diferentes partes da planta do milho (caule, folha, carolo e mistura) de duas variedades diferentes foram utilizadas. O processo envolve a extração/hidrólise com ácido diluído com e sem pré-tratamentos, seguida de purificação de diferentes contaminantes, especialmente sais minerais e hexoses e a redução final da aldose a álcool. A redução do licor rico em xilose a xilitol, foi efetuada com borohidreto de sódio.

Os métodos de extração/hidrólise utilizados foram a extração no digestor de fibras, a autoclave e a manta de aquecimento ligado ao sistema de ebulição sobe refluxo, quantificando a xilose extraída pelo HPLC e com a medição do Brix.

Os melhores resultados foram obtidos na extração de xilose no sistema de refluxo na amostra de carolo, pela junção de dois pré-tratamentos em que a amostra é deixada 24 horas de molho na solução de ácido sulfúrico a 5% com tratamento prévio em banho de ultrassons durante 40 minutos.

A presença dos inibidores de crescimento da levedura, o furfural e 2-HMF, foram analisados pela técnica de SMPE e GC-MS. A eliminação das hexoses, resultantes do processo de extração/hidrólise, foi efetuada por fermentação dos extratos com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

Palavras-chaves: Xilitol, Carolo, Xilose e HPLC.

Abstract

Obtaining a rich molasses to xylitol from xylose obtained from hemicellulose fraction of the corn plant biomass was the main objective of this work. Xylitol is a substance of interest in different industrial areas.

Different parts of the maize plant (stem, leaf, cobs and mixing) of two different varieties were used. The process involves extraction / hydrolysis with dilute acid and without pre-treatments, followed by purification of different contaminants, minerals and especially hexoses and final reduction aldose alcohol. The reduction of xylose rich liquor xylitol, was performed with sodium borohydride.

Methods of extraction / extraction hydrolysis were used in the fiber digester in the autoclave and heating mantle attached to reflux system, quantifying xylose extracted by HPLC and measuring the Brix.

The best results were obtained in the extraction of xylose in the sample reflux system cobs, the joining of two pre-treatment in which the sample is allowed 24 hour soak in 5% sulfuric acid solution prior to treatment in the ultrasonic bath for 40 minutes.

The presence of yeast growth inhibitors, furfural and 2-HMF, analyzed by SMPE technique and GC-MS. The elimination of hexoses was made by fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* extracts with yeast.

Keywords: Xylitol, Corn cob, Xylose, HPLC.

Índice

Agradecimento	v
Resumo.....	vi
Abstract	vii
Índice.....	viii
Índice de Figuras	x
Índice de Tabelas.....	xi
Índice de Gráficos	xii
Lista de Abreviaturas e Siglas.....	xiii
Enquadramento	xiv
I. Introdução.....	15
1. Valorização da Biomassa de Milho como Matéria-Prima	16
1.1 Origem e Classificação Botânica do Milho	16
1.3 Produção Mundial do Milho	18
1.4 Importância da sua Cultura em Portugal.....	19
1.5 Resíduos da Planta do Milho	21
2. Os Materiais Lenhino-Celulósicos	22
2.1 Estrutura e Constituição	22
2.1.1 Estrutura da Celulose	25
2.1.2 Estrutura da Lenhina	26
2.1.3 Estrutura da Hemicelulose	27
2.2 Fracionamento da Hemicelulose do Material Lenhino-Celulósico.....	29
2.2.1 Hidrolise Ácida	29
3. O Xilitol	31
3.1 História e Evolução	31
3.2 Estrutura e Propriedades Físico-Químicas	33
3.3 Métodos de Obtenção de Xilitol	35
3.3.1 Redução de Xilose por Via Química.....	36
3.3.2 Redução da Xilose por Via Biotecnológica	37
3.4 Fatores que Influenciam a Produção do Xilitol.....	38
3.4.1 O Furfural, o 2-HMF e o Ácido Acético.....	38
3.5 Aplicações do Xilitol.....	39
4. Objetivo.....	42

II. Materiais e Métodos	43
1. Preparação das Amostras	44
2. Extração Ácida da Hemicelulose	44
2.1 Pré-tratamento	44
2.2 Extração em “Fibertec”	45
2.3 Extração em Autoclave	45
3. Quantificação do Teor de Açúcares Totais	46
4. Neutralização e Remoção do Sulfato de Sódio Deca Hidratado	46
5. Purificação do Hidrolisado com a Remoção de Hexoses com a Levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	48
6. Redução da Xilose com Borohidreto de Sódio	49
6.1 Teste de Benedict - Açúcares Redutores	49
7. Obtenção do Melaço Rico em Xilitol	49
8. Aumento da Escala do Processo de Obtenção de Xilitol	50
8.1 Extração/hidrólise pelo Sistema de Ebulição com Ácido em Refluxo ...	50
9. Métodos Analíticos Utilizados	51
9.1 SPME - GC-MS: Determinação da Presença de Furfural e 2-HMF	51
9.2 HPLC – Quantificação da Xilose nos Hidrolisados	53
III. Resultados e Discussão	55
1. Quantificação da Xilose nos Hidrolisados – Uso de HPLC	56
2. Comparação dos Pré-tratamentos Utilizados	59
3. Comparação dos Métodos de Extração Relativamente a Percentagem Aproximada de Açúcares Totais nos Hidrolisados	61
3.1 Fibertec/Autoclave/Refluxo	61
4. Identificação e Quantificação do Furfural e o 2- Hidroximetilfurfural	66
5. Purificação dos Hidrolisados da Xilose por Remoção das Hexoses com o Crescimento da <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	68
6. Redução com Borohidreto de Xilose a Xilitol	71
7. Purificação dos Hidrolisados	72
III. Conclusão e Perspetivas Futuras	74
IV. Bibliografia	77

Índice de Figuras

Figura 1: Gráfico da distribuição da produção mundial do milho para o ano de 2014/2015.....	18
Figura 2: Áreas de cereais produzidos em Portugal (ha).	20
Figura 3: Estrutura da parede celular vegetal.....	22
Figura 4: Esquema representativo da composição e disposição dos componentes macromoleculares da parede celular da planta do milho	23
Figura 5: Estrutura da celulose.....	25
Figura 6: Percursos das unidades fenilpropano da lenhina	26
Figura 7: Pormenor da estrutura da hemicelulose.....	27
Figura 8: Produtos que poderão ser obtidos a partir da hemicelulose	28
Figura 9: Fórmula da estrutura química do xilitol.	33
Figura 10: Fluxograma de vias de obtenção do xilitol	35
Figura 11: Filtragem do hidrolisado.....	45
Figura 12: Digestão da amostra em “Fibertec”	45
Figura 13: Neutralização	46
Figura 14: Cristais de sulfato de sódio deca hidratado	47
Figura 15: Purificação do hidrolisado	48
Figura 16: Sistema de extração/hidrólise sob ebulição em refluxo.....	50
Figura 17: Método de micro extração na fase sólida (SPME)	51
Figura 18: Constituição de um sistema de HPLC, A) sistema de injeção, B) a bomba, C) a coluna de separação e D) o detetor.....	53
Figura 19: Teste de Beneditt (antes “A” e depois “B”)	72
Figura 22: Melaço rico em xilitol	73
Figura 21: Teste de Cloreto de Bário.	73
Figura 20: Teste de Fusão dos Cristais.	73

Índice de Tabelas

Tabela 1: Composição química dos componentes majoritários de alguns materiais lenhino-celulósicos.....	24
Tabela 2: Composição da fibra, carolo e palha de milho (%).....	24
Tabela 3: Comparação da eficiência da extração/hidrólise do carolo de milho com diferentes ácidos diluídos.....	30
Tabela 4: Propriedades físico-químicas do xilitol.....	34
Tabela 5: Condição de operação para análise no sistema de HPLC	54
Tabela 6: Tempos de retenção de alguns açúcares padrão.....	56
Tabela 7: Teor de xilose nos hidrolisados da biomassa de milho	58
Tabela 9: Concentração de xilose obtidas nas amostras no tratamento T1*	59
Tabela 8: Concentração de xilose obtida nas amostras sem pré-tratamento.....	59
Tabela 10: Concentração de xilose obtida nas amostras no T2*	60
Tabela 11: Teor de açúcares totais na extração/hidrólise em “Fibertec”	63
Tabela 12: Açúcares totais na extração/hidrólise em Autoclave	64
Tabela 13: Teor de açúcares totais na extração/hidrólise pelo sistema ebulição em Refluxo.....	65
Tabela 14: Quantificação relativa do furfural nos hidrolisados por SPME- GC-MS	67

Índice de Gráficos

Gráfico 1: Cromatograma de um hidrolisado mostrando a identificação da xilose (Tr = 10,51), arabinose (Tr = 12,53), manose (Tr = 14,00) e glucose (Tr = 16,33).	56
Gráfico 2: Sobreposição dos cromatogramas obtidos por SPME- GC-MS das amostras Folha 3 e Caule 9 com o padrão do furfural	66
Gráfico 3: Curva de crescimento da levedura nas amostras de Carolo 4, 2 e 1, e na Mistura 2.	68
Gráfico 4: Variação da turvação dos hidrolisados inoculados a levedura nas amostras Caule 10 e 12.	69
Gráfico 6: Sobreposição do cromatograma da amostra Mistura 2 antes (A) e depois (B) da fermentação com a levedura <i>Saccharomyces cereviceae</i> . As hexoses (Tr = 15min.) desapareceram no final do processo.....	70
Gráfico 7: Sobreposição dos cromatogramas da amostra do Caule 10 antes (A) e depois (B) da fermentação com a levedura <i>Saccharomyces cereviceae</i> . As hexoses (Tr = 15min.) não desapareceram na totalidade no final do processo.	71

Lista de Abreviaturas e Siglas

AMIS - Sistema de Informação do Mercado Agrícola

SMPE – Micro extração na fase sólida

CR – Carolo da variedade Miami 600

C – Caule da variedade Miami 600

M - Mistura da variedade Miami 600

F - Folha da variedade Miami 600

CRA – Carolo da variedade Amiúdo

FS - Sílica fundida

FDA - Food and Drug Administration

USDA - Departamento de Agricultura dos Estados Unidos

2-HMF – 2-Hidroximetilfurfural

IR – Índice de Refração

Tr – Tempo de retenção

NTU - Nephelometric Turbidity Unit

Enquadramento

Este trabalho foi realizado no laboratório de química da Escola Superior Agraria de Coimbra do Instituto Politécnico, no âmbito do projeto de tese final do Mestrado em Biotecnologia Vegetal da Universidade de Coimbra, com o tema: Obtenção de licor rico em xilitol extraído de resíduos da biomassa do milho. A obtenção de xilitol tem sido pouco estudado em Portugal por motivos de estratégias de investigação. No entanto Portugal possui elevados resíduos de biomassa vegetal a partir das quais se poderá extrair xilose e produzir xilitol que é um subproduto valioso e com diferentes utilidades. De entre estes os resíduos de produção de milho em grande quantidade poderão ser especialmente interessante.

I. Introdução

1. Valorização da Biomassa de Milho como Matéria-Prima

1.1 Origem e Classificação Botânica do Milho

A origem do milho (*Zea mays* L.) ainda hoje persiste numa enorme controvérsia no que respeita à sua verdadeira origem geográfica. Prova disso reside no facto de alguns investigadores a terem localizado no Velho Mundo (Europa e Ásia) e outros no Novo Mundo (América) (Ripado, 1994). Mas consta-se que o milho terá sido cultivado a cerca de 7 mil anos a.C. na América Central, onde a sua domesticação foi oriunda dos antigos povos civilizados da América (Asteca, Maias, Incas, etc.) que já o conheciam. A dispersão para outros locais foi resultante dos povos nómadas e dos povos que encontravam em fuga, transformaram o milho na base da sua alimentação por deter características resistentes a diversidade climática e adaptabilidade (Berger, 1962).

A domesticação do milho Expandiu para outras partes do mundo a partir do século XVI com as grandes navegações e o início do processo de colonização da América. Deve-se a Cristóvão Colombo a introdução do milho na Europa, mais propriamente em Espanha na região de Cadiz, sendo cultivada a princípio como planta ornamental e só depois de conhecido e divulgado o seu valor alimentar passou a ser cultivado em larga escala. Introduzido em Portugal no século XVI e cultivado pela primeira vez nos campos de Coimbra, graças a essa introdução foi possível a expansão por toda a Europa, assim como por outros continentes como Africa e Ásia (Ripado, 1994).

A planta do milho foi inicialmente cultivada com o objetivo de produção de semente comestível, sendo visto como um cereal primário, nobre ou principal. Hoje para além de ser utilizada para o consumo humano, e devido à intensificação da produção pecuária, é vulgar o seu uso para a alimentação animal, como cultura forrageira, forragem conservada (silagem) ou administrada em verde sendo uma das principais utilizações a nível mundial (Oliveira, 1984).

O milho é uma planta herbácea de grande desenvolvimento vegetativo (Ripado, 1994), pertencente à divisão *Magnoliophyta*, subdivisão das Angiospérmicas, classe das Liliopsidas, família das Gramíneas, tribo *Maydeae*, género *Zea* e espécie *Zea mays* L. A sua primeira descrição botânica foi realizada em França em 1536, devendo-se a J. Ruel, mas a primeira obra inteiramente consagrada ao milho pertence a PARMENTIER (França), em 1574.

O milho é uma planta anual, monocotiledónea e monoica (Oliveira, 1984), desenvolve grandes folhas alternadas e pode atingir, dependendo da espécie, de 1 a 4 metros de altura (Barros, 2014). O grão do milho é uma cariopse, ou fruto seco, que contém uma única semente dentro do involúcro do fruto. Outra característica do milho é ser uma planta que segue o caminho fotossintético C4 vegetando com temperaturas elevadas, continuando a fixação fotossintética no período de máxima insolação, obtendo desse modo, uma alta produtividade. Essa característica é comum nas plantas que se desenvolveram na região tropical semiárida, como a cana-de-açúcar, e permite, por meio de um caminho fisiológico específico, maior aproveitamento fotossintético em condições de clima quente com limitação de água. Essa propriedade proporciona ao milho em rendimento médio muito superior ao do trigo e ao do arroz, para além da produtividade, tem a capacidade de combater as ervas daninhas de forma simples poucos dias após a germinação (Magalhães et al, 2002).

Outra característica que apresenta é a capacidade de resistência que determina, de um lado, a formação de um elevado número de variedades espontâneas, e de outro permitiram uma alta capacidade de manipulação por parte do homem, o que levou à geração de um grande número de variedades selecionadas intencionalmente pelas exigências agronômicas e pelas características de sabor, consistência e propriedades nutricionais, não é por acaso que o milho foi uma das plantas mais estudadas pelos biólogos evolucionistas (Magalhães et al, 2002).

1.3 Produção Mundial do Milho

De acordo com o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) o milho é o cereal mais produzido no mundo e é a base para produção de uma centena de produtos, porém na cadeia produtiva aproximadamente 70% do milho mundial é aplicado na alimentação animal, desta forma sua procura é cada vez mais maior já que s é usado na alimentação humana, em indústrias e diferentes processos biotecnológicos (Lerayer, 2006).

Segundo o USDA a produção mundial de milho em sua totalidade atinge cerca de 38,898 milhões de toneladas no ano de 2014/2015, subdividido nos três principais Países produtores mundiais, os EUA, a China e o Brasil e os restantes Países. No gráfico da figura 1 está representada a distribuição da produção mundial do milho nos anos 2014/2015.

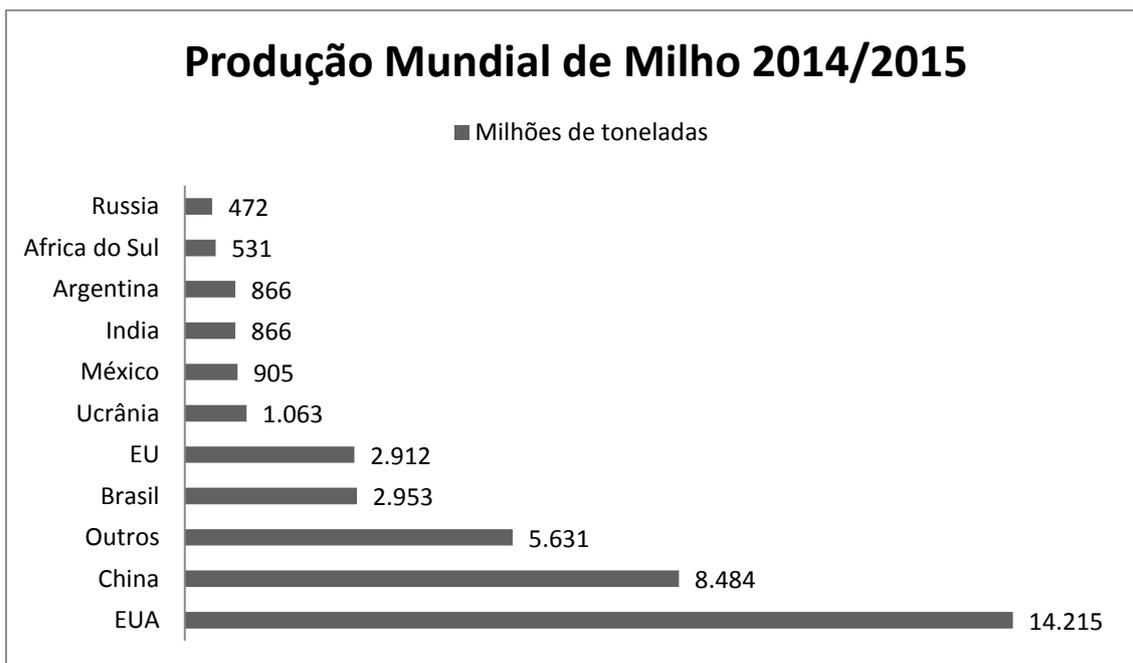


Figura 1: Gráfico da distribuição da produção mundial do milho para o ano de 2014/2015. Fonte (NCGA-world of corn 2015).

A China embora seja considerado o segundo maior produtor mundial de milho procedendo os EUA, a sua produção é menor do que o seu próprio consumo de milho, por isso, o país importa grandes quantidades de outros países produtores. Assim, a

China é grande importadora de milho, contrastando com o seu papel de exportadora no passado recente (Yagushi, 2012).

Segundo o estudo apresentado pela NCGA (National Corn Growers Association) em 2015, os maiores exportadores mundiais de milho são os Estados Unidos (38,8%), o Brasil (19,2%), a Ucrânia (14,4%) e a Argentina (10,2%). Enquanto os principais importadores mundiais são o Japão (13,4%), o México (8,5%), a Coreia do Sul (8,4%), o Egito (6,5%) e a UE (6,1%). O mercado mundial é basicamente abastecido por três países, onde a principal vantagem destes países é uma logística favorável, que pode ser decorrente da excelente estrutura de transporte (caso dos EUA) e proximidade dos portos (caso da Argentina). O Brasil, nas últimas safras, têm-se destacado como segundo maior exportador mundial de milho, porém a deficiência da estrutura de transporte até os portos tem prejudicado o país na busca de uma presença maior e mais constante no comércio internacional de milho. Deve-se ressaltar que, dado ao seu baixo custo de mercado, os custos de transporte afetam muito a remuneração da produção obtida em regiões distantes dos pontos de consumo, reduzindo o interesse no deslocamento da produção a maiores distâncias, ou em condições em que a logística de transporte é desfavorável (Duarte et al, 2011).

1.4 Importância da sua Cultura em Portugal

Já em 1960, o engenheiro agrônomo A. Lopes Ribeiro escrevia: “atendendo á superfície cultivável do País, pode bem avaliar-se a enorme importância da cultura do milho, podendo afirmar-se que Portugal é o país da Europa onde essa cultura ocupa maior área em relação ao conjunto das terras aráveis. No entanto em 1960, a produção média por hectare ainda não atingia os 900 kg.” Uma afirmação pertinente que mostra que desde a origem do milho este foi implementado em Portugal devido ao reconhecimento do seu incalculável valor, traduzido nas altas produções unitárias e nos seus diferentes usos. À semelhança do que sucede em muitos outros países, em Portugal o milho ainda constitui em diversas regiões um produto básico na alimentação humana. Todavia, no decurso das últimas décadas parece assistir-se a um progresso na sua cultura, utilizado muito na alimentação animal, na indústria de produção de etanol, indústrias alimentares, aplicações biotecnológicas (Souza, 2015).

É curioso notar que a área dedicada ao cultivo de milho em Portugal tem vindo a diminuir nos últimos 10 anos, mas a produção aumentou 17,3% (de 700 mil para 932 mil toneladas), resultante da melhoria da produtividade média nacional que, no mesmo período, passou de 5.790kg/ha para 8.321kg/ha (+44%) (ANPRONIS, 2014). Em comparação a outros cereais em Portugal o milho é o que detêm por hectare a maior percentagem. Na figura 2 mostra os diferentes cereais produzidos em Portugal e a percentagem da sua área de produção por hectare.

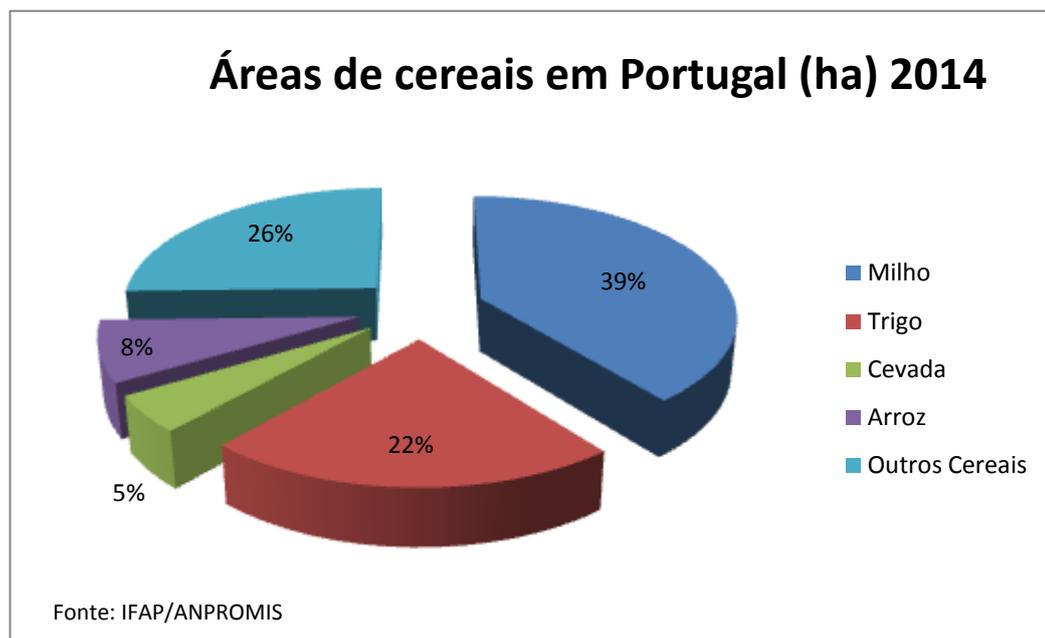


Figura2: Áreas de cereais produzidos em Portugal (ha). (ANPROMIS, 2014)

De entre os cereais o milho continua a ser o mais produzido em Portugal, atendendo as condições que o País oferece para esta cultura, como estabelecimento de novos regadios, o aproveitamento racional de muitos já existentes, a utilização de híbridos, o aumento da produção unitárias, as melhorias do ciclo de vida a cada ano, a resistência à acama e a determinadas pragas, doenças, a implementação do milho transgénico, constituem fatores que são devidamente aproveitados para a melhoria da produção (Souza, 2015).

O milho tem uma grande importância a nível económico e de subsistência para várias famílias, mesmo ainda não sendo capacitado para satisfazer a larga escala as suas

necessidades, por isso dependem de certa forma das importações. A dependência externa de milho em Portugal é conhecida e transversal à maioria dos setores da agricultura. Segundo a ANPRONIS (Associação nacional dos produtores de milho e sorgo), entre 2005 e 2012, a produção nacional apenas conseguiu, em média, satisfazer aproximadamente 29% da procura de milho o que significava que as importações rondaram em média 1,7 milhões de toneladas, enquanto a produção nacional média foi de apenas 635 mil toneladas.

Portugal nos últimos quatro anos, na zona do baixo rio Tejo aumentou a sua produção de milho de 50 mil para 200 mil toneladas, com contributo em Santarém com 17% da área dedicada ao milho, enquanto Beja, Évora e Portalegre contabilizam, ao todo, 14% de área. No restante do País a área dedicado ao milho compreende por, Braga com 13%, Porto 11%, Aveiro 8%, Açores 7%, Coimbra 6%, Beja 6%, Évora, Viana do Castelo e Portalegre de 4%, Setúbal, Castelo Branco, Viseu, Vila Real de 3%, Guarda e Lisboa de 2%, Leiria e Bragança 1% (ANPRONIS, 2014).

1.5 Resíduos da Planta do Milho

A produção de resíduos esta desde sempre associado as atividades humanas. Estas atividades devido ao desenvolvimento industrial e a intensificação da agricultura e da pecuária começaram a criar problemas de produção e acumulação excessiva de resíduos. Por outro lado as crescentes exigências quanto á defesa da qualidade do ambiente impuseram o tratamento e a eliminação desses resíduos, nomeadamente aqueles que transportam uma elevada carga orgânica. Uma gestão racional e integrada dos recursos naturais exige a implementação de estratégias não apenas de tratamento adequado dos resíduos produzidos, mas, especialmente, de reutilização, reciclagem e valorização dos mesmos como por exemplo, aplicado para a produção de etanol, biogás, combustível renovável. Os resíduos do milho surgem do produto secundário do processamento e recolha de grão. As outras fontes: o carolo, o caule, as folhas e palha, gerando uma grande quantidade de biomassa, por cada tonelada de milho colhido é produzido cerca de 2,3 toneladas de resíduos da planta (Koopmans, 1997).

2. Os Materiais Lenhino-Celulósicos

2.1 Estrutura e Constituição

A parede celular vegetal, funciona como elemento estrutural e de proteção mecânica nas plantas, são estruturas de natureza compósita, comum a todos os materiais lenhino-celulósicos. Os componentes chaves da parede celular que constituem a maioria da biomassa são a celulose e a hemicelulose e a lenhina. As fibras vegetais podem ser consideradas como compósitos de fibrilas de celulose mantidas coesas, por uma matriz do tipo resina, a lenhina e a hemicelulose. As microfibrilas de celulose e a hemicelulose formam uma matriz semicristalina, e por vezes encontra-se também a presença de substâncias pécticas. A hemicelulose é um polímero derivado de açúcares em C5, que formam uma rede ramificada. A pectina é um importante componente da lamela média, mas também encontrado na parede primária da planta (Aguiar, 2011).

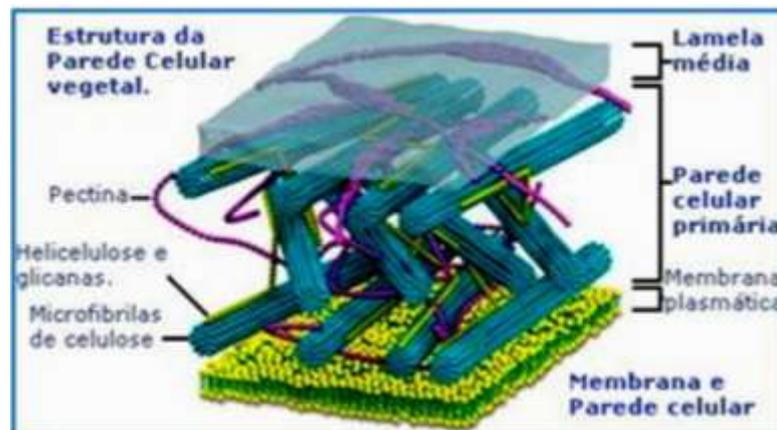


Figura 3: Estrutura da parede celular vegetal.

Fonte: (Davidson, 2005)

A hemiceluloses e a pectina são sintetizadas no Complexo de Golgi, em reações catalisadas por enzimas provenientes do retículo endoplasmático, e transportadas em vesículas que se fundem com a membrana celular, liberando o conteúdo na parede em crescimento. A orientação das microfibrilas de celulose, dentro da matriz semicristalina, é feita pelos microtúbulos, e nas células que se alongam (como em caules e raízes) elas tendem a ser orientadas perpendicularmente ao crescimento (Silva et al, 2009).

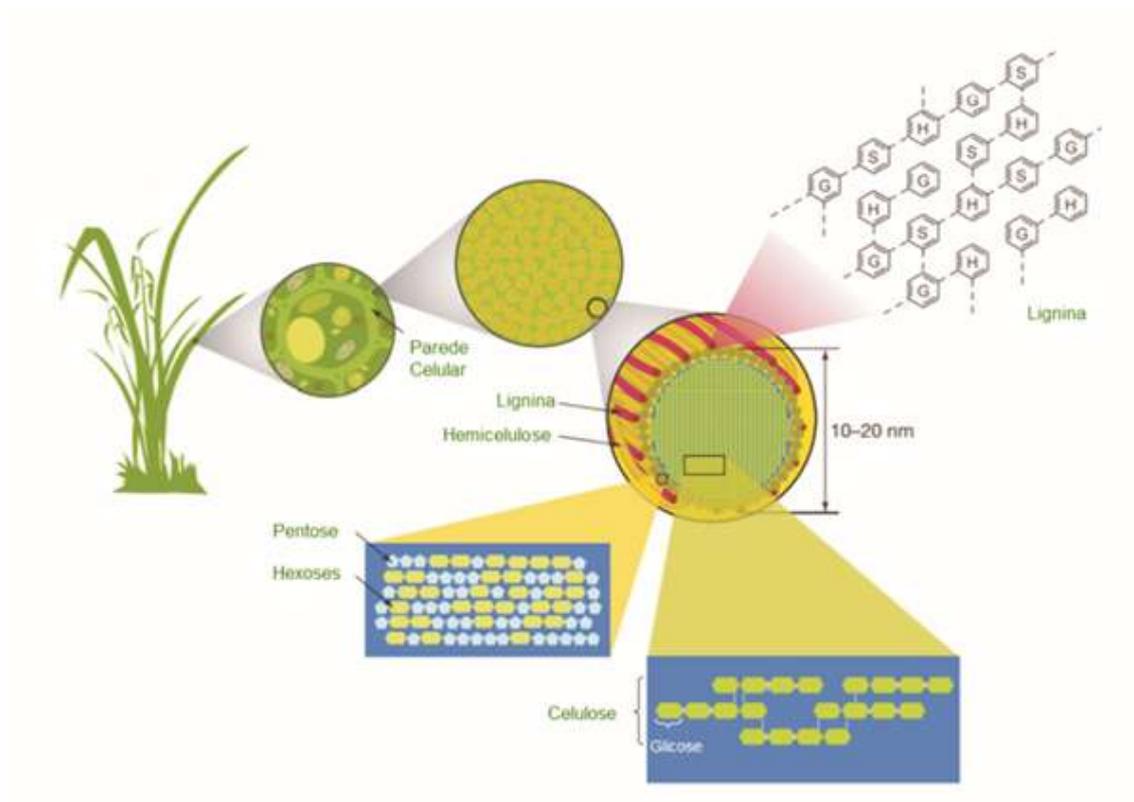


Figura 4: Esquema representativo da composição e disposição dos componentes macromoleculares da parede celular da planta do milho. Fonte (Potters, 2010).

Os diferentes tipos de biomassa de origem vegetal têm como característica em comum serem principalmente constituídos por teores aproximados de celulose entre 40-50%, hemiceluloses entre 20-35%, e lenhina entre 20-28%. Para além destes componentes são encontrados outros em pequenas quantidades como, compostos inorgânicos, pectinas, hidratos de carbono simples, terpenos, alcaloides, saponinas, polifenóis, resinas, gorduras e ceras, entre outros (Aguar, 2011).

A composição dos materiais lenhino-celulósicos varia de acordo com diferentes fatores como, a origem do material vegetal, a idade, o período do ano em que foi feita a colheita, o tipo de material vegetal, a espécie e o estágio de desenvolvimento (Aguiar, 2011). Na tabela 1 apresenta-se a composição química de diferentes tipos de biomassa, e na tabela 2, faz-se a comparação da composição química de diferentes partes da planta do milho, objeto de estudo neste trabalho.

Tabela 1: Composição química dos componentes maioritários de alguns materiais lenhino-celulósicos.

Material Lenhino-celulósico	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lenhina (%)	Referências
Farelo de cevada	23,00	32,70	24,40	Cruz et al. 2000
Carolo de milho	31,70	34,70	20,30	Cruz et al. 2000
Folha de milho	37,60	34,50	12,60	Cruz et al. 2000
Eucalyptus globulus	46,30	17,10	22,15	Cruz et al. 2000
Bagaço de cana	40,10	26,42	25,15	Neureiter et al. 2002
Palha de arroz	43,50	22,00	17,20	Mussato; Roberto. 2002
Palha de trigo	33,81	31,83	20,12	Cândido; Canilha, Silva .2002
Casca de aveia	30,51	28,63	23,09	Filipe et el. 2003
Eucalyptus grandis	40,20	15,67	26,90	Canettieri; Silva; Carvalho Jr. 2003
Palha de sorgo	34,00	44,00	20,00	Herrera et al. 2004

Fonte: (Moutta, 2009)

Tabela 2: Composição da fibra, carolo e palha de milho (%)

Componentes		Fibra de milho	Carolo de milho	Palha de milho
Amido		16,0	1,8	0,6
Celulose		14,0	33,0	30,0
Hemicelulose	Total	39,0	34,0	26,0
	Arabinose	12,0	2,4	2,7
	Xilose	18,0	28,0	19,0
	Galactose	3,3	0,8	1,0
	Manose + Ramnose	2,0	0,8	1,0
Ácido Glucurónico		3,7	1,8	2,2
Ácido Acético (ésteres)		3,2	4,3	2,4
Ácido Cumárico		0,3	1,7	0,4
Ácido Ferúlico		3,1	1,1	0,4
Proteína		10,0	1,0	4,2
Lenhina		5,7	17,0	29,0

Fonte: (Eylen et al, 2011)

2.1.1 Estrutura da Celulose

A celulose representa, em geral, a maior fração de massa seca total dos materiais lenhino-celulósicos, podendo também ser encontrada em bactérias, fungos e algas. É o polímero orgânico mais abundante na natureza e o principal constituinte da parede celular vegetal, sendo a sua produção na natureza estimada em $1,5 \times 10^{12}$ toneladas por ano (Moutta, 2009).

A celulose é um polímero linear formado pela condensação de glicose por ligações glicosídicas do tipo β -(1,4). A formação da ligação β -(1,4) requer que os resíduos glicosídicos adjacentes estejam posicionados a 180° em relação um ao outro, formando a unidade de celobiose.

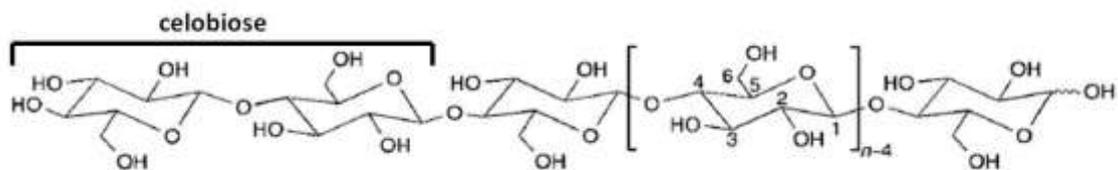


Figura 5: Estrutura da celulose. Fonte (Silva, 2013)

Esta unidade repetitiva, conhecida como celobiose, contém seis grupos hidroxila que estabelecem interações do tipo ligações de hidrogênio intra e intermolecular. Devido a essas ligações de hidrogênio há uma forte tendência de a celulose formar cristais que a tornam insolúvel em água e na maioria dos solventes orgânicos. Estas ligações de hidrogênio dificultam a livre rotação dos anéis em torno das ligações glicosídicas, resultando no endurecimento da cadeia (Silva, 2013). O caráter linear observado nas cadeias de celulose permite que cadeias adjacentes se posicionem próximas umas das outras formando estrutura amorfa. As regiões amorfas são mais acessíveis ao ataque de reagentes, enzimas ou até mesmo a absorção da água (Lengowski, 2013). O grau de polimerização da celulose de plantas varia entre 500-15.000 resíduos de D-glicose, dependendo da sua localização na parede celular primária ou secundária (Silva, 2013).

2.1.2 Estrutura da Lenhina

A Lenhina é um dos três principais constituintes dos tecidos lenhosos das plantas, nos quais entra na proporção de 20 a 28%, representando a terceira maior fração da biomassa lenhino-celulósica um dos mais abundantes compostos orgânicos da terra. A lenhina encontra-se na lâmina média e nas paredes celulares primárias e secundária dos tecidos lenhosos, co-responsável pela rigidez da parede celular devido ao seu caráter de resina amorfa que atua como um cimento entre as fibrilas de celulose. Confere também bloqueamento ao acesso a celulose proporcionado pelas ligações éteres fenólicos entre os feixes de fibras que dominam a união das unidades da lenhina. Esta propriedade é apontada como um dos principais fatores limitantes ao ataque enzimático à celulose (Meyer et al, 1973).

A sua composição varia de acordo com a origem, a sua estrutura resulta da polimerização desidrogenativa de três álcoois aromáticos (ver figura 6), com propriedades hidrofóbicas e uma estrutura tridimensional, altamente ramificada, podendo ser classificada como um polifenol, o qual é constituído por um arranjo irregular de várias unidades de fenilpropano. Contém em diferentes posições grupos hidroxilo e metoxilo como substituintes no grupo fenilo (Silva, 2009).

Em madeira de coníferas (*softwood*), a lenhina é composta quase que exclusivamente por unidade de álcool coniferílico, apresentando pequenas quantidades de álcool *p*-coumarílico, em madeira de árvores folhosas (*hardwoods*), estão presentes polímeros derivados dos álcoois coniferílico e sinapílico, enquanto em monocotiledôneas, como a cana-de-açúcar e o milho, os três álcoois estão presentes como precursores da lenhina (Ferreira, 2009).

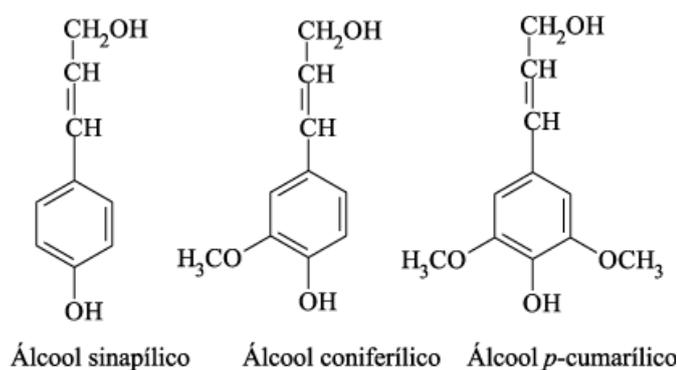


Figura 6: Precursores das unidades fenilpropano da lenhina (Ferreira, 2009).

2.1.3 Estrutura da Hemicelulose

A hemicelulose é constituída por polímeros de açúcares com cinco carbonos de baixa massa molecular, bastante hidrofílica, contém considerável grau de ramificação entre suas cadeias, com natureza altamente amorfa. Em geral representa 20-35% da biomassa da planta, a sua estrutura apresentam cadeias laterais que interagem facilmente com a celulose, dando estabilidade e flexibilidade ao conjunto. Enquanto a celulose é considerado um homopolissacarídeo composto exclusivamente por unidades de D-glicose, a hemicelulose é considerado um heteropolissacarídeo, constituída por vários monossacarídeos polimerizados, principalmente hidratos carbono de cinco carbonos (pentoses como a xilose e a arabinose), de seis carbonos em baixas concentrações (hexoses como galactose, glucose e manose). A presença de ácido glucurônico e de ácido galactorônico têm sido referenciados (Passarinho, 2014). Outros açúcares como ramnose e a fucose também podem estar presentes em pequenas quantidades (Vasconcellos, 1957).

A característica estrutural comum entre os diferentes tipos de hemicelulose está na configuração da estrutura piranosídica, com a presença de hexoses ou pentoses com ligação β -1,4 entre os monossacarídeos. Por essa razão, sua estrutura é linear, similar à da celulose. No entanto, diferentes desta, as hemiceluloses apresentam grande variedade de açúcares nas ramificações, o que impede a formação de grandes regiões cristalinas como no caso da celulose. Apesar de serem mais acessíveis ao ataque químico, as ramificações do esqueleto do polissacarídeo bloqueiam a clivagem em determinados locais, tornando a hemicelulose muito mais complexa de ser degradada enzimaticamente (Pereira Jr. et al, 2008).

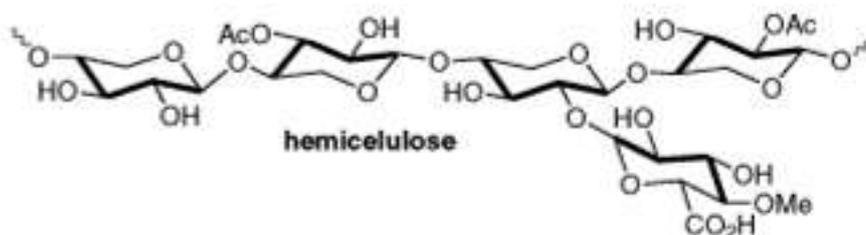


Figura 7: Pormenor da estrutura da hemicelulose

O monossacarídeo mais abundante na hemicelulose é a xilose, unidade de cinco carbonos de fórmula química $C_5H_{10}O_5$ (Passarinho, 2014). A hemicelulose rica em xilose em madeiras tanto moles como duras é denominado de xilanas. Em alguns tecidos de gramíneas e cereais a xilose pode representar até 50% (Kuhad et al, 2011). A hemicelulose de madeiras rijas e resíduos de cereais são tipicamente rica em xilano, ao passo que, de madeira macia contém hemiceluloses rica em glucomanano, outro tipo de hemiceluloses comum no grupo das plantas resinosas (Meyeret et al, 1973).

A ausência de cristalinidade e a baixa massa molar torna as hemiceluloses solúveis em meio ácido e alcalino o que possibilita a sua fácil extração e hidrólise (Vasconcellos, 1957). Um dos subprodutos derivados da hemicelulose tem sido a produção de furfural, sendo utilizados em larga escala na indústria, de entre eles sobressai a produção de xilitol (Perreira Jr., 2008). No esquema a seguir (figura 8) estão apresentados alguns produtos que podem ser obtidos a partir da hemicelulose.

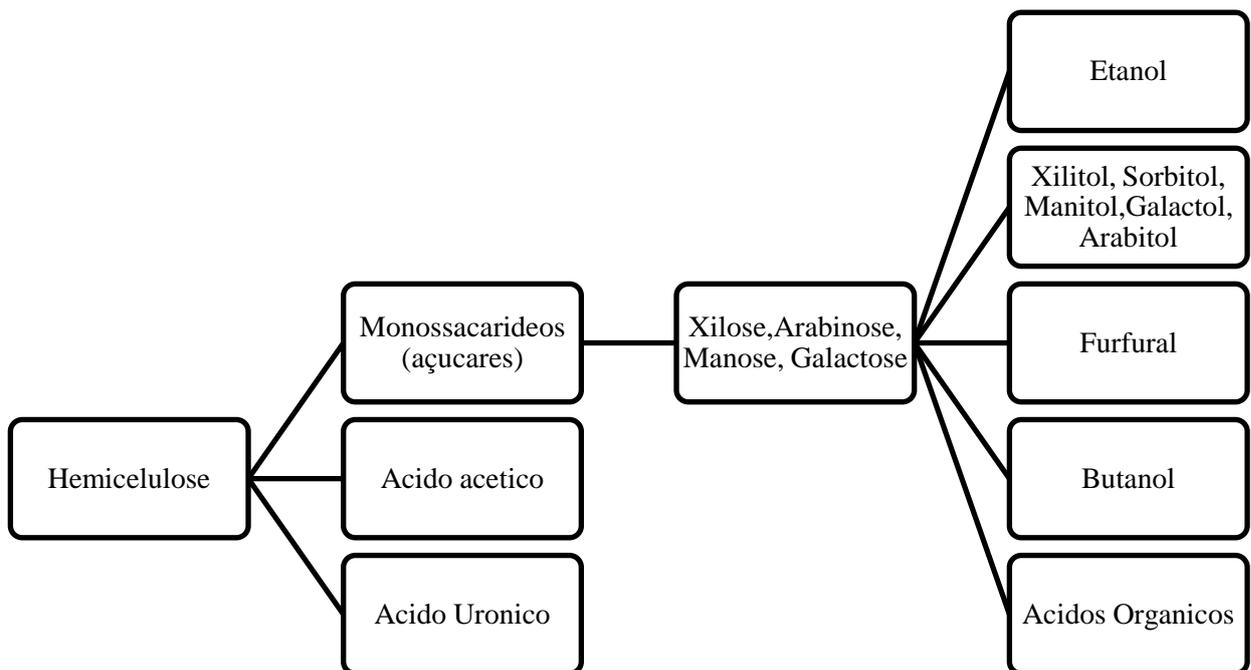


Figura 8: Produtos que poderão ser obtidos a partir da hemicelulose (Pereira Jr., 2008)

2.2 Fracionamento da Hemicelulose do Material Lenhino-Celulósico

O principal método utilizado para a remoção e hidrólise da hemicelulose tem sido a hidrólise com ácido diluído, embora nos últimos anos estudos foram realizados como o uso de enzimas.

A hidrólise enzimática é um processo de hidrólise alternativo que oferece condições operacionais suaves como temperatura e de pH. Este tem a vantagem de não produzir os inibidores resultantes da hidrólise ácida designadamente o furfural e o 2-HMF, que são substâncias conhecidas por inibir o crescimento de microrganismos. A hidrólise enzimática é geralmente realizada pela enzima xilana (enzima que hidrolisa a xilose) (Mohamad, 2015). No entanto, muitas vezes não é um processo eficiente para degradar a biomassa não tratada. Portanto, pré-tratamentos são necessários para permitir a penetração da enzima a estrutura da hemicelulose. Exemplo de pré-tratamentos é a utilização de água a altas temperaturas, processos hidrotermais de entre elas a explosão a vapor de água ou de amónia, tratamentos alcalinos que destroem parcialmente a estrutura da parede celular e levam ao aumento da eficiência da extração/hidrolise (Mohamad, 2015).

2.2.1 Hidrolise Ácida

A hidrólise é um termo aplicado a reações orgânicas e inorgânicas em que a água efetua dupla troca com outro composto envolvendo a quebra de uma molécula com ajuda de um agente acelerador, qualquer que seja o mecanismo da reação. Os mais importantes são as bases, os ácidos e as enzimas (BARCZA, 2012).

O ácido clorídrico e sulfúrico são os mais utilizados, embora existam outros ácidos que têm sido explorados. Entretanto, como a hemicelulose é amorfa, condições menos severas podem ser usadas para liberar os açúcares da hemicelulose. A utilização de ácido sulfúrico diluído é especialmente eficaz num processo endotérmico onde são extraídos os monossacarídeos constituintes da hemicelulose (Dominguez et al, 1997).

Para aumentar a superfície de contato com o ácido é conveniente usar a biomassa moída, e implementar pré-tratamentos que aumentem a acessibilidade do ácido. O

rendimento da degradação da hemicelulose pode recuperar cerca de 80-90% do máximo possível de açúcares, por outro lado, operações sem a adição de ácido limitam a recuperação dos mesmos para 65% ou menos. A utilização de baixas concentrações requer o uso de temperaturas mais elevadas (170-190°C) para a remoção/hidrólise da hemicelulose, quando maior a concentração do ácido maior a libertação de produtos contaminantes do hidrolisado como a glucose e seus produtos de degradação (como o furfural), os resíduos de lenhina, o ácido acético e os compostos fenólicos (Ogeda, 2010).

A tabela 2 apresenta a comparação da eficiência de diferentes ácidos na hidrólise de carolo do milho em diferentes condições, na proporção solido/liquido (1:4). Em um dos hidrolisados foi realizado um pré-tratamento com amónia a 10%, onde se verificou um aumento considerável na concentração de xilose obtida (Adaptado de Dominguez et al, 1997).

Tabela 3: Comparação da eficiência da extração/hidrólise do carolo de milho com diferentes ácidos diluídos.

Ácido	%	Xyl	Glc	Ara	Gal	Man	Ácido Acético	Furfural	2-HMF
HC1	1.0	70,0	7,4	5,3	-	-	8,9	-	-
HC1	1.0 [*]	71,9	6,7	5,3	-	-	0,0	-	-
HC1	2.0	75,5	8,4	5,1	-	-	8,6	-	-
HC1	3.0	71,6	10,2	5,2	-	-	8,6	-	-
HC1	4.0	68,9	11,8	5,4	-	-	8,7	-	-
HC1	5.0	61,2	12,6	5,4	-	-	8,7	-	-
H ₂ SO ₄	1.0	64,8	5,1	4,8	-	-	8,1	-	-
H ₂ SO ₄	1.5	67,6	5,0	4,7	-	-	8,0	-	-
H ₂ SO ₄	2.0	70,4	5,6	4,7	-	-	8,4	-	-
H ₂ SO ₄	1.0 ¹	28,7	5,4	3,7	0,7	0,4	2,0	0,8	0,2

Xyl=Xilose; Glc=Glucose; Ara=Arabinose; Gal=Galactose; Man=Manose; 2-HMF=2-Hidroximetilfurfural. Compostos fenólicos em quantidades vestigiais.

¹ (Cheng et al, 2009); * Tratamento com amónia a 10%.

3. O Xilitol

3.1 História e Evolução

O nome xilitol é derivado da palavra grega xylon [Inglês = madeira], relaciona-se com a palavra de xilose (açúcar de madeira) a partir do qual inicialmente o xilitol foi obtido, e que está, por sua vez derivada da estrutura particular (xileno) da madeira referindo-se aos vasos condutores de água nas plantas, como árvores de videiro ou milho, a partir da qual, da xilose pode ser obtido o xilitol (Carrera, 2014).

A história de xilitol começou no final do século 19, quando em 1891 o químico alemão, Emil Fische e seu aluno Rudolf Stahel extraíram uma substância até então desconhecida de aparas de árvores de faia, que foi chamado de "xilitol". Em 1891 Fischer publicou esta descoberta, e em 1902, Dr. Fischer recebeu o Prêmio Nobel de Química por seus vários resultados de investigação. (Mäkinen, 2000)

Paralelamente a esta descoberta, o químico francês, Bertrand ao pesquisar a fibras de trigo e de aveia, conseguiu isolar uma espécie de xarope de xilitol. Assim o xilitol foi descoberto quase simultaneamente em dois países ao longo dos 50 anos. Durante alguns anos o xilitol permaneceu praticamente despercebido pelos pesquisadores, que acreditavam que este não tinha nenhum interesse científico. Até que os pesquisadores americanos descobriram que o xilitol funcionava como um produto intermediário no metabolismo humano. Esta descoberta foi feita pelo Dr. Touster na década de 1950 em Nashville Tennessee, onde suscitou uma série de projetos de pesquisa visando a recolha de informações sobre as suas propriedades bioquímicas o que ajudou a gerar interesse mundial ao redor do xilitol (Gonçalves, 2012).

Durante a Segunda Guerra mundial na década de 1930, na Finlândia houve escassez de açúcar com isso foi necessário a procura de substitutos para outro adoçante natural, tendo sido utilizando o xilitol (Mäkinen, 2000).

Na década de 1960 os engenheiros finlandeses foram capazes de reduzir a xilose ao xilitol, descobrindo assim um processo de fabricação do mesmo comercialmente viável. Desde então, o xilitol tem sido usando em vários subprodutos vegetais por meio de um processo químico ou biotecnológico relativamente simples. Durante os anos 1960, o xilitol foi comercializado na Alemanha, Suíça, a União Soviética, Japão, Itália e

China (Carrera, 2014). Aprovado pela FDA (United States Food and Drug Administration) em 1963 como um aditivo alimentar, está atualmente aprovado para uso em alimentos, produtos farmacêuticos, produtos de saúde oral (pasta de dentes, elixir) e nutracêuticos em mais de 35 países (Mussantto, 2004).

A Finlândia implementou uma campanha nacional e foi o primeiro país a promover xilitol para reduzir a cárie dentária em crianças. Outros países europeus e asiáticos, incluindo Japão e Coreia, implementaram programas semelhantes, em que o xilitol é adicionado a pastas de dentes. Por outro lado a goma de mascar contendo xilitol representam quase 50% do mercado. O "Estudo de Turku Sugar", em 1975, representa um marco para o estudo desta "maravilha branca", o xilitol, porque os estudos a longo prazo mostraram seus benefícios a nível da saúde. O xilitol é caracterizado como um aditivo alimentar do tipo edulcorante e umectante, podendo ser empregado na quantidade necessária para obter o efeito, uma vez que este não afeta a genuidade e identidade dos alimentos (Gonçalves, 2012).

Nos anos de 2000 e 2001 o mercado de polióis atingiu um valor de vendas significativo em torno de 1,4 milhões de toneladas, alcançando um valor de 1,3 bilhões de dólares. Em 2013 o mercado do xilitol atingiu um valor de US \$ 670 milhões, e em 2020 deve chegar a 242 mil toneladas com um valor econômico acima 1 bilhão de dólares (Business Communications, 2002). O xilitol responsabilizou-se pela segunda maior parte deste mercado de pólios (cerca de 12%), perdendo apenas para o sorbitol (48%). Devido ao fato de o sorbitol já se encontrar em crescimento constante e estabelecido no mercado, estima-se que ao longo dos anos subsequentes o xilitol venha beneficiar mais ainda o mercado econômico. No mercado das pastilhas, gomas de mascar e confeitos, apresenta um consumo estimado de quase 80% em 2010, o mercado mundial de xilitol é estimado em 161.500 toneladas (Business Communications, 2002).

3.2 Estrutura e Propriedades Físico-Químicas

O xilitol é um poliol de cinco carbonos, pentahidroxiado (pentiol), é um produto intermediário do metabolismo de hidratos de carbono, encontrado em humanos e animais no sangue a concentrações de 0,03-0,06mg/100mL, também pode ser encontrado na natureza em muitas frutas e vegetais tais como alface, couve, flor, ameixas, framboesas, morangos, uvas, bananas, assim como em leveduras, e cogumelos porém, em quantidades inferiores a 0,9 g/100g (Gonçalves, 2012).

O xilitol possui a fórmula química $C_5H_{12}O_5$ (1,2,3,4,5 pentahidroxiálcool), a sua molécula possui estrutura aberta e é conhecido como polihidroxiálcool acíclico, ou pentiol, devido a presença de cinco grupos OH na molécula, e cada grupo hidroxila estar ligado a um átomo de carbono como observadas na figura 9 (Tamanini et al, 2004).

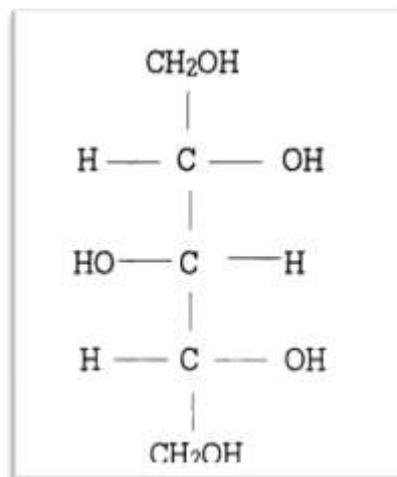


Figura 9: Fórmula da estrutura química do xilitol.

O xilitol possui propriedades físico-químicas importantes o que o coloca como um produto de elevado potencial comercial. O seu poder adoçante é similar ao da sacarose, sendo 2,4 vezes mais doce que o manitol e 2 vezes mais que o sorbitol, podendo esta propriedade variar com o pH, a concentrações de sais e temperaturas (Mussatto, 2004). Graças a sua entalpia positiva de dissolução (+34,8 cal/g), o xilitol promove um efeito refrescante, levando a sua aplicação a diversas áreas industriais (Tamanini et al, 2004).

Na tabela seguinte resumir-se-á as principais propriedades físico-químicas do xilitol.

Tabela 4: Propriedades físico-químicas do xilitol

Formula química	$C_5H_{12}O_5$
Massa molar	152,15 g/mol
Aparência	Pó branco, cristalino
Sabor	Doce
Odor	Inodoro
Poder adoçante	Igual à sacarose, superior ao sorbitol e manitol
Ponte de fusão	92 a 96 °C
Ponte de ebulição	216 °C
Solubilidade	64,2 g/100g de H ₂ O
Densidade	1,50
pH (solução aquosa a 5%)	5 a 7
Calor de dissolução (endotérmico)	+34,8 Kcal/g
Valor calórico	4,0 Kcal/g
Estabilidade	Estável a 120°C e sob condições normais de processamento de alimentos. A caramelização ocorre somente se aquecido por vários minutos a temperatura próximos do ponto de ebulição

Fonte: (Mussantto, 2004).

Depois da autorização do consumo de xilitol em 1963 pela FDA outras instituições mundiais como a FAO, EEC (Scientific Committee for food for the European Economic Community), confirmaram e apoiaram a sua utilização no consumo humano em proporções adequadas para obter o sabor desejado embora o consumo diário não deva ultrapassar os 60g porque em grandes quantidades apresenta um efeito laxante (Mussantto, 2004).

3.3 Métodos de Obtenção de Xilitol

Para a produção de xilitol são necessárias varias etapas, a hidrólise ácida ou alcalina de materiais com altos teores de hemicelulose é a primeira etapa. A hidrólise promove a clivagem das ligações das cadeias de xilana, libertando a xilose (de Sousa, 2014). É uma etapa de grande importância, pois os rendimentos no final do processo dependem diretamente do teor da solução inicial em xilose. Após essa etapa, segue-se a purificação dos açúcares a fim de se obter a xilose o mais pura possível, de entre as impurezas remanescentes da hidrólise (como produtos de degradação) podem interferir na redução posteriores. Para essa purificação, são necessárias sucessivas etapas que poderão ter uma natureza cromatográficas ou outra, contribuem para o aumento do custo do processo (Pereira, 2007). A terceira etapa consiste na redução da xilose em xilitol, podem ser efetuadas por duas vias: a química ou a bioquímica, representadas no esquema seguinte (figura10).

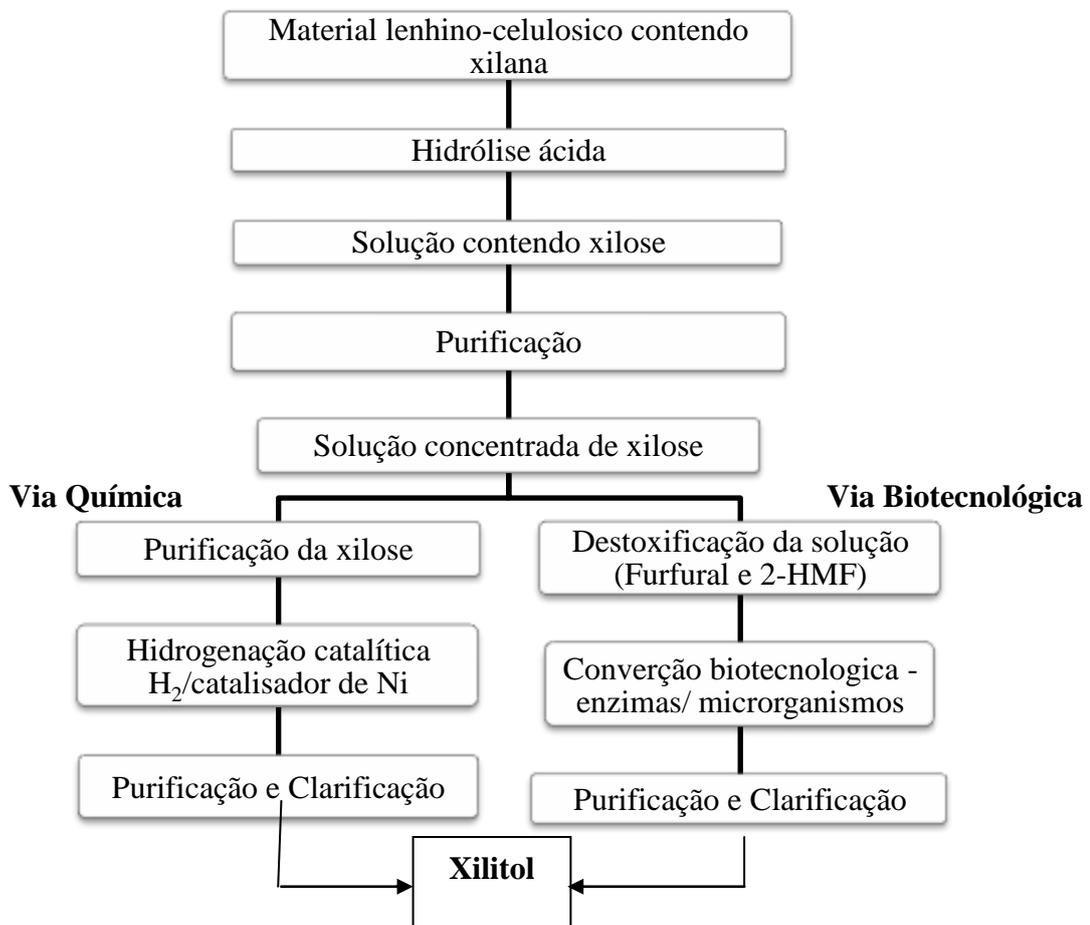


Figura 10: Fluxograma de vias de obtenção do xilitol (Mussatto, 2002)

A quarta etapa consiste em mais um processo de purificação e clarificação da solução de xilitol recorrendo a utilização de resinas de troca iónica ou carvão ativado, metodologias capazes de remover sais inorgânicos e adsorve pequenos pigmentos do hidrolisado. A ultrafiltração remove proteínas, e melhora o desempenho do funcionamento de resinas de permuta iónica. Muitas vezes a combinação destes métodos, tem sido relatado na literatura como a melhoria da purificação e clarificação do xilitol.

A última etapa de obtenção do xilitol poderá ser a cristalização mas também é vendido na forma de concentrado por evaporação a vácuo resultando num xarope. Existem vários métodos descritos por alguns autores capazes de cristalizar o hidrolisado concentrado em xilitol, quase todos utilizam cristalizadores a baixas temperaturas onde somente 50% a 60% do xilitol é recuperado (Pereira, 2007).

3.3.1 Redução de Xilose por Via Química

A produção de xilitol por via química em escala industrial teve início em 1975 onde utilizavam a madeira como biomassa, um processo alternativo a extração de xilose diretamente de suas fontes naturais (Gonçalves, 2012).

Este processo consiste na obtenção da xilose pura e posterior hidrogenação a xilitol na presença de um catalisador em reatores sob alta pressão. O catalisador mais utilizado é o Níquel de Raney, embora vários outros catalisadores de hidrogenação podem ser utilizados, tais como metais nobres (Pt, Pd, Ru). A última etapa da produção consiste na purificação e cristalização do xilitol obtido (Pereira, 2007). O rendimento do processo químico, bem como a qualidade do xilitol, são dependentes da pureza da solução inicial de xilose uma vez que a presença de impurezas interfere no processo de redução (Parajó, 1998).

Atualmente, a Danisco (indústria da DuPont Company) é um importante fornecedor global de xilitol, principalmente para a China, que produz por via química utilizando a xilose obtida a partir dos licores sulfúricos subproduto da indústria da celulose. (Albuquerque et al, 2014).

3.3.2 Redução da Xilose por Via Biotecnológica

O processo biotecnológico tornou-se possível com a descoberta de leveduras capazes de metabolizar pentoses principalmente a D-xilose, açúcar maioritário nos hidrolisados hemicelulósicos (Yuan Ping, 2013). A via biotecnológica apresenta-se como alternativa à via química de obtenção de xilitol em função do rendimento do processo químico e da capacidade de microrganismos fermentarem a xilose presente nos hidrolisados, através da metabolização da xilose com o transporte deste açúcar através da membrana celular (Branco, 2010). Uma das vantagens é a remoção de eventual contaminação de glucose que surge como subprodutos de hidrólise da celulose logo no processo inicial.

A redução da xilose pode ser realizada por leveduras, bactérias, fungos ou utilizando enzimas purificados provenientes destes microrganismos, embora a maioria dos microrganismos de interesse industrial não seja capaz de assimilar naturalmente as pentoses sendo que, de entre os vários capazes de o fazer, não apresentam potencialidade de aplicação ao nível industrial. Contudo, tanto as bactérias como os fungos apresentam baixos rendimentos e produtividades em xilitol (Yuan Ping, 2013). Alguns estudos têm sido dedicados ao desenvolvimento de estirpes manipuladas capazes de reduzir a xilose.

Dentre os microrganismos, as leveduras têm-se destacado para a produção de xilitol principalmente a *Candida guilliermondii*, *Candida subtropicalis*, *Candida tropicalis* e *Debaryomyces hansenii* as que mais se destacam. O metabolismo de xilose em leveduras inicia-se com o seu transporte através da membrana celular por diferentes mecanismos uma vez dentro da célula, a xilose é reduzida a xilitol pela enzima xilose redutase com a participação das coenzimas NADPH ou NADH (Le Wang, 2012; Branco, 2010).

A obtenção do xilitol pela via biotecnológica apresenta uma etapa adicional, denominada destoxificação. O processo de hidrólise ácida dos materiais lenhino-celulósicos usados como fontes de açúcares, ocorre a formação de alguns compostos de decomposição como o furfurolo, o ácido acético, que podem ser tóxicos para as células (R.S. Rao et al., 2006).

Como os próprios microrganismos catalisam o processo, torna-se dispensável a utilização de catalisadores, por isso, este tipo de produção poderá ser menos dispendioso. Porém acaba sendo mais moroso devido ao tempo de espera para a fermentação da levedura ou de outro microrganismo utilizado que irá fazer a bioconversão da D-xilose a xilitol. Durante este procedimento existem muitos fatores controláveis mas que podem influenciar o crescimento da levedura limitando os resultados da fermentação tais como:

- Fatores bióticos: A escolha da estirpe uma vez que, nem todos os microrganismos são capazes de converter a xilose, a idade e concentração inicial do microrganismo para a quantidade xilose extraída no hidrolisado (Mussatto, 2003);

- Fatores abióticos: Condições de operação, sendo as mais relevantes os valores de pH e temperatura e principalmente a disponibilidade em oxigênio, mas também a composição do meio de cultura, tais como a concentração de xilose e de outros monossacáridos, e a presença de inibidores (Mussatto, 2003).

3.4 Fatores que Influenciam a Produção do Xilitol

3.4.1 O Furfural, o 2-HMF e o Ácido Acético

Os métodos hoje utilizados para a extração da xilose apresentam todos fatores que afetam a sua produção, principalmente no que relaciona ao rendimento e a quantidade de contaminantes existentes na amostra final. A hidrólise pode originar contaminantes como o furfural (aldeído heterocíclico) resultante da degradação de pentoses, o 2-hidroximetilfurfural (2-HMF) devido a desidratação de hexoses, e o ácido acético proveniente da hidrólise dos grupos acetil, e produtos de degradação da lenhina (Mussatto, 2003).

No caso da redução biotecnológica a presença do furfural e do 2-HMF tem um grande efeito adverso sobre a taxa de crescimento específico do microrganismo e a formação de biomassa, de uma forma geral acaba influenciando todo o processo de fermentação. Contudo, necessita assim de muitas técnicas de purificação/desintoxicação o que diminui a produtividade. No entanto muitos estudos vêm sendo realizados no

intuito de encontrar microrganismos resistentes a estes inibidores como é o caso da *Saccharomyces cerevisiae*, e leveduras fermentadoras de xilose, *Candida shehatae* e *Pichia stipitis*, são quase completamente inibidas por concentrações de furfural superiores a 2-4 g dm⁻³ (Cuevas et al, 2014).

3.5 Aplicações do Xilitol

O aumento de estudos relacionados com o xilitol e suas propriedades permitiu que hoje, esse seja aplicado em diversas áreas com relativa importância, a sua utilização é aprovado em vários países na indústria, em produtos farmacêuticos e cosméticos, na Europa o xilitol tem sido amplamente utilizado nestes três setores há mais de 20 anos (Mussato,2004).

A nível industrial estão a incluir o xilitol na formulação de produtos, atraídas pelo seu efeito refrescante, seu poder adoçante semelhante a sacarose e sobretudo, pela sua ação anticariogênica, umectante, estabilizante, crioprotetor e redutor de ponto de congelamento. Na indústria a utilização de edulcorantes na produção de alimentos e bebidas, as indústrias levam em conta a quantidade de calorias dos adoçantes, a possibilidade de usá-los em dietas para controle e redução de peso e o grau de semelhança entre o seu sabor e o do açúcar. Com isso, o xilitol vem atraindo a atenção dos fabricantes de bebidas e alimentos. A formulação de produtos a base de xilitol é sobretudo pela sua ação anticariogênica. Inúmeros produtos já se encontram disponíveis no mercado, formulados a base de xilitol, como por exemplo: caramelos, chocolates, gomas de mascar, balas, confeitos, compotas, geleias, sobremesas, pudins, formulação de sorvetes e geleias dietéticas (Asano, 2014).

Na indústria farmacêutica, o xilitol pode ser empregado como adoçante ou excipiente na formulação de xaropes, tônicos e vitaminas. Entretanto, como seu preço é relativamente alto (custo de produção cerca de 10 vezes superior ao da sacarose ou do sorbitol) ele é normalmente utilizado em combinação com outros polióis que servem como agentes de mistura (Bonfada, 2010).

A nível da saúde o xilitol tem um grande potencial de aplicação nas áreas odontológica e médica, tendo-se mostrado um aditivo de grande eficácia por combater e auxiliar no tratamento de algumas doenças, tratamento de algumas patologias como,

diabetes, lesões parenterais e renais, otite média aguda, infecções pulmonares, osteoporose e prevenção da cárie (Mäkinen, 2000).

Prevenção da cárie: A propriedade anticariogênica é a mais significativa desse edulcorante, determinada principalmente pela ação não fermentativa de bactérias do gênero *Streptococcus*, devido a que este não é digerido por estes microrganismos, tornando inviável a sua proliferação e conseqüentemente impedindo a produção de ácidos que prejudicam o esmalte dos dentes. Com a diminuição da concentração de *Streptococcus mutans*, há uma redução dos polissacarídeos insolúveis favorecendo assim, o aumento dos polissacarídeos solúveis, de modo a tornar a placa menos aderente e com fácil remoção pela escovação habitual dos dentes (CARRERA, 2014).

Pode-se destacar resumidamente que o xilitol contribui para a saúde bucal de diferentes maneiras: Diminuindo a incidência de cáries; Estabilizando íons cálcio e fosfato na saliva levando a remineralização dentária; Estabilização das cáries já formadas; Reduz a proliferação de *S. mutans* e *Lactobacillus* na saliva; Incentivando a formação da saliva (sem elevar a produção de ácidos na placa dentária); Contenção do pH da placa e a capacidade de tamponamento da saliva, após a ingestão de sacarose (CARRERA, 2014).

Otite média aguda: A atuação do xilitol nessa patologia, é de inibir o crescimento bacteriano da *Streptococcus pneumoniae*, causador da doença e de outras enfermidades como a sinusite (Canilha, 2006).

Infeções respiratórias: A eficiência do xilitol no tratamento de doenças respiratórias é atribuída a pequena permeabilidade transepitelial desse edulcorante, o que leva a redução da concentração de sais, fazendo com que as bactérias não metabolizem e dessa forma não se propaguem. Experimentos realizados utilizando xilitol, demonstraram que as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (causadoras de doenças pulmonares) não usam xilitol para crescimento, o que faz reduzir a concentração de sais no líquido e elevar a atividade antibiótica natural dos pulmões. Com isso, pode-se dizer, que o xilitol fortalece o sistema de defesa natural dos pulmões, inibindo o estabelecimento de infecções bacterianas, como por exemplo a pneumonia (Bonfada, 2010).

Diabetes: O xilitol em contrariedade aos açúcares convencionais independe de insulina para ser digerido pelo organismo, o que leva a boa tolerância do mesmo, por pessoas portadoras de Diabetes. Dessa forma, sua concentração no sangue não sofre mudanças bruscas causadas pela sacarose e pela glicose, o que faz do xilitol um adoçante indicado para diabéticos (Canilha, 2006).

Osteoporose: A eficiência do xilitol no tratamento ou na prevenção da osteoporose foi relatada em pesquisas feitas com animais, comprovou-se que o xilitol favorece o aumento da massa óssea, preservação dos minerais nele contido e evita o enfraquecimento das propriedades biomecânicas (Mussatto, 2002).

Anemia hemolítica: O xilitol é um agente terapêutico que pode ser utilizado (dose máxima de 1 mM/L de sangue) por pessoas com deficiência de G6PDH (glicose 6-fosfato desidrogenase) é uma enzima citoplasmática de grande importância para a sobrevivência das células, uma vez que é responsável pela manutenção de um nível adequado da coenzima reduzida NADPH.), uma vez que essa enzima não é requerida para o seu metabolismo. Assim sendo, o xilitol supre a célula de NADPH₂ por meio da oxidação da L-xilulose, mantendo a integridade da membrana dos glóbulos vermelhos (Bonfada, 2010).

Processos inflamatórios: O uso do xilitol como suplemento alimentar (6 a 15% da alimentação) tem demonstrado bons resultados em relação a processos inflamatórios agudos induzidos. Embora pouco numerosas, as pesquisas referentes à aplicação do xilitol na cura ou controle de processos inflamatórios são muito promissoras, pois todas indicam que, com um baixo conteúdo de xilitol na dieta é possível obter-se resultados positivos num curto período de tratamento, sem prejudicar o funcionamento geral do organismo (Mussatto, 2002).

4. Objetivo

O presente trabalho tem como objetivo geral a tentativa de obtenção de um melão rico em xilitol a partir da extração/hidrólise da hemicelulose. A extração é feita em biomassa da planta do milho recorrendo a metodologias sustentáveis Químicas e ou Biotecnológicas.

Como objetivo específicos:

- Obtenção de hidrolisado rico em xilose a partir de diferentes partes da planta de milho e sua posterior quantificação por HPLC;
- Comparação da eficiência de extração/hidrólise em diferentes concentrações de ácido e com tempos de extração diferentes;
- Identificação de pré-tratamentos que tem efeito positivo no aumento da concentração de xilose durante o processo de extração/hidrólise;
- Verificação do teor de contaminantes como o furfural e o 2-HMF recorrendo a utilização da técnica de SPME e sua posterior análise no GS-MS;
- Ensaio de purificação do hidrolisado por via biotecnológica com a fermentação da levedura *Saccharomyces cerevisiae* para a remoção dos açúcares em C6;
- Ensaio de redução dos licores de xilose a xilitol com borohidreto de sódio;
- Otimização do processo geral e preparação do melão rico em xilitol.

II. Materiais e Métodos

1. Preparação das Amostras

A biomassa da planta do milho utilizada na primeira fase de estudos foi colhida no dia 5 de Setembro de 2014 do terreno da Escola Superior Agrária de Coimbra, da variedade Miami 600. A amostra foi dividida em quatro tabuleiros com diferentes partes da planta: o Caule (C), a Folha (F) o Carolo (CR) e uma Mistura (M) de todos.

De seguida foram colocados na estufa a 60°C durante 8h para secagem. Ao serem retirados da estufa, foram moídos no Moinho Restsch (SM 100) para obtenção de amostras com uma granulometria \leq a 2mm e mantidos em refrigeração até a sua utilização.

Numa segunda fase de estudo foi utilizada nova variedade de milho designado de Amiúdo onde os estudos foram feitos somente sobre o Carolo (CRa), parte da planta que teoricamente apresenta maiores quantidades de hemicelulose. Foram seguidos os mesmos processos de preparação da amostra conforme a variedade anteriores.

2. Extração Ácida da Hemicelulose

2.1 Pré-tratamento

Alguns pré-tratamentos foram testados nas amostras antes da extração. O primeiro pré-tratamento (T1) foi deixar a amostra de molho na própria solução ácida diluída por 24 horas antes da extração/hidrólise. O segundo pré-tratamento foi deixar as amostras também 24 horas “de molho” na própria solução ácida utilizada para a extração e depois colocar mais 40 minutos em banho de ultrassons (Restsch - UR1). Houve algumas amostras em que não foi aplicado nenhum pré-tratamento, somente foi feita a extração com o ácido sulfúrico diluído.

2.2 Extração em “Fibertec”

São pesados 5g de amostra e colocados em copos 600ml próprios para a extração no digestor de fibras, junta-se 100ml de H_2SO_4 diluído (razão solido/liquido igual a 1/20) com diferentes concentrações a 1%, 2%, 3,5 e 5% de ácido

A extração foi feita no aparelho digestor para análise de fibras (FIBERTEC - LABCONCO) sob refluxo (figura 12) a uma temperatura de 100°C durante diferentes tempos (20, 40, 60, 90 minutos), no final é feita a filtragem (figura 11) e descartado os resíduos sólidos, obtendo o hidrolisado final.



Figura 12: Digestão da amostra em “Fibertec”



Figura 11: Filtragem do hidrolisado

2.3 Extração em Autoclave

A extração em autoclave foi utilizada como método para a comparação dos resultados da extração/hidrólise feita no “Fibertec”. Foi utilizado uma amostra de cada variedade de milho, aplicando as condições de tratamentos das amostras em que foram obtidos os melhores resultados na extração com o “Fibertec”. De igual forma foram colocados 5g de amostra para 100 mL de ácido sulfúrico diluído a 1%, 2% e 5% durante 40 minutos a temperatura de 121°C na autoclave (Autester 437-G). Ao total foram feitas a extração em 12 amostras, sendo três exemplares para cada amostras da Mistura, do Carolo (Miami 600) e do Carolo (Amiúdo), a concentrações de 1%, 2% e 5%. Para o restante foram feitas só duas amostras do Caule (C) para as concentrações de 2% e 1% e

para a Folha (F) uma única amostra a concentração de 2% porque não havia quantidade suficiente de amostras para ambas.

3. Quantificação do Teor de Açúcares Totais

Depois da obtenção do hidrolisado é feita a medição do índice de refração no refratômetro (Abbe, Kyowa Optical co.LTD). Um instrumento simples que pode ser usado para medir concentrações de sólidos dissolvidos em soluções aquosas, consumindo apenas umas poucas gotas da solução. É feita a medição e retirado o número do índice de refração (IR) em todos os hidrolisados obtidos da extração/hidrólise antes de serem neutralizados. Também é feita a medição do IR da solução de ácido sulfúrico diluído utilizado para a extração que posteriormente será necessário para os cálculos finais.

Depois de feito a medição do IR, este é convertido o valor em % Brix (já tabelado) que representa a quantidade de sólidos dissolvidos totais (açúcares totais + percentagem de ácido) no hidrolisado.

4. Neutralização e Remoção do Sulfato de Sódio Deca Hidratado

A neutralização é um procedimento importante uma vez que a extração é feita com ácido sulfúrico diluído. É utilizado o carbonato de sódio para neutralizar as amostras, por adição de pequenas quantidades na solução até que esta pare de borbulhar CO_2 .



Figura 13: Neutralização

As amostras depois de serem neutralizadas são congeladas a -20°C como um processo de conservação e também como uma etapa importante para a remoção de parte do sulfato de sódio deca hidratado formado na reação de neutralização com o carbonato de sódio. Ao retirar do congelador este é colocado no frigorífico para descongelar e no fundo do frasco aparece os cristais do sulfato de sódio (figura 14) resultantes da reação. É removido a parte líquida do nosso hidrolisado e descartado os cristais.



Figura 14: Cristais de sulfato de sódio deca hidratado

Para verificar a presença do sulfato resultante da neutralização, é realizado o teste com Cloreto de Bário.

Retira-se uma pequena quantidade do hidrolisado e nele são juntados 1 a 2 gotas da solução de Cloreto de Bário (preparado com 1g de BaCl_2 em 10 ml H_2O), se houver a formação de um precipitado branco é indicador da presença do sulfato devido a baixa solubilidade de BaSO_4 .

5. Purificação do Hidrolisado com a Remoção de Hexoses com a Levedura *Saccharomyces cereviciae*

Como amostras testes foram preparados duplicados dos hidrolisados, de exemplares dos tratamentos para diferentes partes da biomassa de milho, diluído na proporção de $\frac{1}{2}$ para um total de 100 ml com posterior inoculação com a levedura. Antes da inoculação a levedura *Saccharomyces cereviciae* é ativado em 30ml de água a 30°C durante 30 minutos. Para cada amostra é feito um controlo (negativo), onde não é feita a inoculação com a levedura como ilustra a figura (16) seguinte.



Figura 15: Purificação do hidrolisado

O pH é ajustado a aproximadamente 2,8, de modo de inibir o crescimento bacteriano já que não são usadas condições sépticas, e as amostras são colocadas na estufa (Heraeus UT 5050 EK) durante 7 dias a uma temperatura de 30°C. No decorrer dos dias é avaliada a turvação em Turvidímetro (Orbeco-Hellige, modelo 965-10) de forma a evidenciar a sua adaptação e eventual crescimento. O processo é também acompanhado por HPLC.

São também preparados ensaios com o 2-hidroximetilfurfural e a levedura para comprovar que impede o seu crescimento.

O meio de cultura é o próprio hidrolisado porque contem outros açúcares como a glucose, manose, que funcionam como fonte de carbono para o crescimento da levedura acabando por retirar-los do estrato resultando como uma forma de purificação.

6. Redução da Xilose com Borohidreto de Sódio

O procedimento para a redução da xilose a xilitol foi testado segundo o trabalho realizado por Abdel-akher (1951), onde verifica a capacidade de redução do borohidreto de sódio nos hidratos de carbono. No estudo realizado, para 1g de glucose em 20 ml de água, é colocado de 0,1 a 0,15g de borohidreto dissolvido em 10 ml de H₂O.

No caso das nossas amostras a quantidade de borohidreto foi calculada proporcionalmente com base na concentração molar aproximada de xilose existente no hidrolisado. A redução é feita durante uma noite ($\cong 12h$), colocada sobe agitação magnética e isolado do contacto com o ar, uma vez que a xilose é de fácil conversão em contanto com o oxigénio a ácido xilónico.

6.1 Teste de Benedict - Açúcares Redutores

O teste de Benedict é realizado no fim do ensaio de redução com borohidreto de sódio para confirmar a redução dos açúcares presentes no hidrolisado. Num copo é colocado água a ferver e dentro é colocado um tubo com 20 mL do reagente de benedict, juntamente com o reagente são adicionados 1-2 gotas do hidrolisado reduzido de uma determinada amostra, deixa-se ferver por 5 minutos. Se a solução mantiver a cor azulada do reagente de Benedict significa que no hidrolisado esta presente somente açúcares não redutores. No caso de a solução mudar de cor para laranja cor tijolo ainda existem açúcares redutores. O teste deve ser feito antes e depois da redução com o borohidreto.

7. Obtenção do Melaço Rico em Xilitol

Com o objetivo de minimizar os compostos inorgânicos do processo (sulfato, carbonato, borohidreto, etc...). A amostra é tratada com resina de troca iónica, colocada numa coluna de resina com 14cm de comprimento e 2,0 cm diâmetro. É feita a medição da condutividade elétrica e do Brix antes e depois da amostra passar pela coluna. O nível de purificação das amostras no final do tratamento com a resina é avaliado com a diminuição significativa da condutividade ate próximo de zero. Após a desmineralização com a resina, o extrato aquoso é colocado no evaporador rotativo (Heidolph VV1) sob alto vaco até retirar toda a água obtendo o melaço rico em xilitol.

8. Aumento da Escala do Processo de Obtenção de Xilitol

8.1 Extração/Hidrólise pelo Sistema de Ebulição com Ácido em Refluxo

Para o aumento da concentração de xilose foi utilizado uma manta de aquecimento ligado a um condensador de refluxo (figura 16), evitando assim a evaporação da água. As proporções de extração aumentaram em relação aos outros métodos, passando a 1/10 e 1/5 razão sólido/líquidos. O teste só foi feito nas amostras de carolo nas duas variedades diferentes e em todos foram aplicados os pré-tratamentos estudados.

No primeiro teste foram colocados 20g de carolo para 200ml de ácido a 5% durante tempos diferentes (90, 150 e 210 minutos).

No segundo teste foram colocados 20g de carolo para 100ml ácido a 5% durante tempos diferentes (150 e 210 minutos).



Figura 16: Sistema de extração/hidrólise sob ebulição em refluxo

9. Métodos Analíticos Utilizados

9.1 SPME - GC-MS: Determinação da Presença de Furfural e 2-HMF

SPME é método de micro extração e pré-concentração de analitos que ocorrem numa escala reduzida, utilizando um dispositivo básico de SPME que consiste de um bastão de fibra de sílica fundida (FS) de 100 mm de diâmetro, com 10 mm de uma extremidade recoberto com um filme fino de um polímero (e.g., polidimetilsiloxano = PDMS, poliacrilato = PA ou Carbowax = Cwx) ou de um sólido adsorvente (e.g., carvão ativo microparticulado = Carboxen). (Valente et al, 2000).

Para realizar a técnica será necessário a utilização de um frasco pequeno em que nele é colocado cerca de 5-10ml da amostra a temperatura ambiente e depois é selado para que o frasco fique isolado do meio que o rodeia. A seguir a fibra de extração SPME é introduzido no frasco ate entrar em contacto com o líquido do hidrolisado conforme mostra a figura17. A fibra é deixada em contacto com o hidrolisado cerca de 40 minutos e este procedimento é repetido para todas as amostras.



Figura 17: Método de micro extração na fase sólida (SPME)

Para realizar o processo de identificação a fibra SPME é retirada da amostra e inserida no injetor da cromatografia gasosa (GC-MS: Varian Staturn 2100 T) onde os analitos são termicamente dissolvidos sob fluxo do gás de arraste e carregados para a coluna. É utilizada uma coluna capilar (FactorFourTM, Cp 9035) de VF – 5ms; 15m, 0,15 mm; 0,15 µm de espessura da fase estacionária. A temperatura depois de ajustada, é feita a injeção da fibra e inicia o programa escolhido, a aquisição de dados deve durar por aproximadamente 30 minutos. No final é feita a identificação se existente do furfural.

Para realizar a quantificação e identificação da presença do furfural, um padrão conhecido (2-metilhidroxifurfural) deverá ser injetado no equipamento, e o tempo de retenção do padrão e sua área serão comparados com os da amostra e utilizados para o cálculo da concentração.

A Cromatografia Gasosa (GC) permitira analisar os diversos compostos da amostra, o seu principal mecanismo de separação baseia na partição dos componentes de uma amostra entre a fase móvel gasosa e a fase estacionária. É um método rápido, fácil de aplicar, com alto poder de resolução e alta sensibilidade (Ewing,1972). A fase móvel utilizada é composta por um gás inerte de arraste que depende do tipo de detetor que é utilizado e dos componentes a determinar, no nosso caso o gás de arraste utilizado foi o hélio (He). A corrente de gás é passada através da coluna de enchimento, onde os componentes da amostra se deslocam a velocidades que são influenciadas pelo grau de interação de cada componente com a fase estacionária não volátil. As substâncias com a maior interação com a fase estacionária são retidas numa extensão maior e, consequentemente, separar daqueles com menor interação (Douglas, 2012).

9.2 HPLC – Quantificação da Xilose nos hidrolisados

Um sistema de HPLC é composto por diferentes componentes que permite a identificação e quantificação dos compostos que estão numa amostra reduzindo os custos e o tempo. É constituído por quatro componentes principais: A bomba, um sistema de injeção, uma coluna de separação e um detetor como estão representados na figura 18.



Figura 18: Constituição de um sistema de HPLC, **A)** sistema de injeção, **B)** a bomba, **C)** a coluna de separação e **D)** o detetor.

Para quantificar e identificar a presença da xilose nos hidrolisados foi necessário a utilização do HPLC (Bomba: Jasco Pu-980 e Detetor: Jasco 830-RI) em todas as amostras depois de decorrer o processo de extração. As condições de operação estão na tabela 5 e para todas a amostras antes de fazer a injeção, estas devem se tratadas:

- Fazendo uma neutralização para pH de solução alcalina com a adição de carbonato de sódio (Na_2CO_3) assegurando que a solução não esteja ácida para não danificar a coluna;

- Depois fazer uma diluição da amostra de 1/5 para um total de 1000 μ L, uma vez que não é necessário grandes quantidades para a injeção;
- Por último fazer uma ultrafiltração para proteger a coluna das impurezas, de forma a melhorar a precisão, a exatidão da coluna, a sensibilidade, o limite de deteção e aumentar a especificidade nos resultados.

O sistema de HPLC é ligado a um software responsável pela aquisição e a conversão dos dados.

Tabela 5: Condição de operação para análise no sistema de HPLC

Coluna	NH ₂ sílica 5 μ m (4,6x250 mm)
Fase móvel	Acetonitrilo 80/20 (v/v)
Caudal	1mL/m
Volume de injeção	20 μ l
Tempo de retenção	20minutos

O processo de identificação dos compostos de uma amostra é feito através dos padrões disponibilizados comercialmente. Os componentes do padrão é eluído nas mesmas condições que a amostra em estudo. Os resultados são observados em forma de picos num determinado tempo, chamado tempo de retenção (Tr) e dependendo da concentração analisada os picos apresentaram uma área que é proporcional a quantidade do componente existente na amostra analisada. No nosso caso o padrão utilizado foi a xilose pura, que foi preparado em 100mg para 5mL de água e injetado nas mesmas condições de operação no HPLC.

III. Resultados e Discussão

1. Quantificação da Xilose nos Hidrolisados – Uso de HPLC

A interpretação dos cromatogramas permitiu a quantificação da xilose nos hidrolisados. Como era de esperar nos hidrolisados também aparecem outros açúcares resultantes da hidrólise ácida da hemicelulose e parcialmente da celulose (gráfico 1) como a glucose, arabinose, manose e ramnose. A identificação de cada um deles foi efetuada recorrendo a substâncias padrão quantitativas, os tempos de retenção desses açúcares, estão apresentados na tabela 6.

Tabela 6: Tempos de retenção de alguns açúcares padrão.

Açúcares	Intervalo observado no tempo de retenção (Tr)
Xilose	9,50 – 10,45
Ramnose	8,04 – 8,08
Arabinose	11,06 – 12,97
Glucose	15,28 – 16,40
Manose	13,37 – 14,06

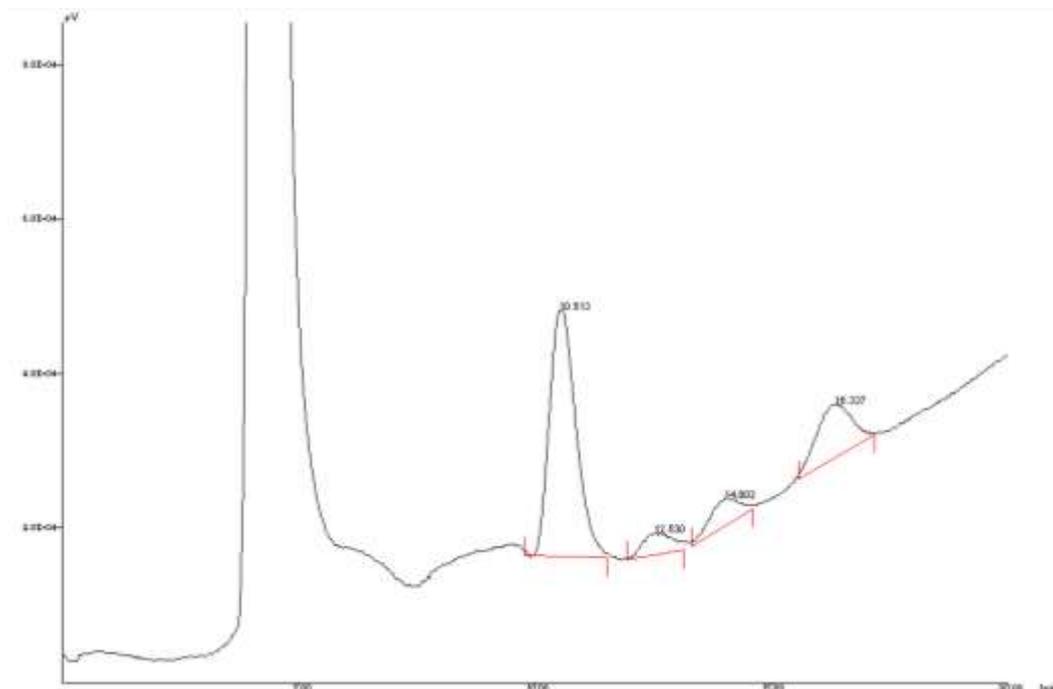


Gráfico 1: Cromatograma de um hidrolisado mostrando a identificação da xilose (Tr = 10,51), arabinose (Tr = 12,53), manose (Tr = 14,00) e glucose (Tr = 16,33).

Os dados da concentração de xilose determinados em HPLC para todas as amostras estão apresentados na tabela 7. Indicam-se também as condições de extração/hidrólise utilizadas e os pré-tratamentos. Para a quantificação através de HPLC manteve-se as mesmas condições experimentais como a diluição e a quantidade de biomassa. O volume final no caso do uso do “Fibertec” é medido no final do processo, devido a perdas inerentes ao próprio processo.

Dos quatro exemplares da biomassa (Carolo, Caule, Folha e Mistura) o Carolo (CR) foi o que resultou maiores valores de xilose independentemente do pré-tratamento utilizado e da percentagem de ácido. Exemplos são as amostras Carolo 6 e Carolo 7 com valores de 13,94 e 16,50 % de xilose respectivamente, confirmando os resultados da literatura. A folha de milho também obteve valores consideráveis de xilose nos exemplares Folha 4 e Folha 5 de valores 10,04 e 14,42 respectivamente. Segundo a pesquisa de Moutta (2009) as partes da planta do milho que continham maiores concentrações de hemicelulose seriam o carolo e a folha. Em relação ao Caule (C), entre todas as amostras testadas este foi a parte da planta do milho que resultou em menores teor de xilose como por exemplo na amostra Caule 3 com o menor teor de xilose (0,81) e máximo obtido para a extração/hidrólise nesta parte da planta foi de 5,78 na amostra do Caule 17. A expectativa para os valores da concentração de xilose nas amostras da Mistura de todas as partes da planta eram elevadas uma vez que nela estaria a junção de todas as partes da biomassa do milho sem ter a necessidade de separar as amostras, mas os resultados obtidos não foram muito interessantes, como por exemplos as amostras da Mistura 2 e 3 com teores de 4,40 e 7,48 respectivamente.

Também à medida que se foi aumentando a concentração de ácido e o tempo de extração, foram obtidos maiores concentrações de xilose. No entanto a partir de concentrações de ácido muito elevadas aumenta o teor de açúcares totais no hidrolisado tornando o método mais dispendioso e exige mais etapas de purificação. Por isso o máximo de ácido utilizado ao longo do trabalho foi de 5%.

Tabela 7: Teor de xilose nos hidrolisados da biomassa de milho

Amostra	Condições				Volume ¹ total (mL)	[xilose] ² (mg/ml)	%xilose ³
	Ácido %	Pré- tratament o	Tempo (min)	Peso biomassa			
Caule 2	1,0	-	40	5,0	90	0,674	1,21
Caule 3	1,0	-	40	5,0	90	0,450	0,81
Caule 4	1,0	-	50	5,0	87,5	1,365	2,39
Caule 5	1,0	-	60	5,0	85	1,176	2,00
Caule 6	1,0	-	90	5,0	75	1,659	2,49
Caule 7	2,0	-	40	5,0	90	3,711	6,68
Caule 8	2,0	-	60	5,0	85	2,502	4,25
Caule 9	2,0	-	20	5,0	95	0,837	1,59
Caule 10	2,0	T1	40	5,0	90	3,276	5,90
Caule 11	2,0	T2	40	5,0	90	3,276	5,90
Caule 12	2,0	T2	40	5,0	90	2,115	3,81
Caule 13	2,0	T2	90	5,0	75	1,955	2,93
Caule 14	2,0	T2	90	5,0	75	3,810	5,72
Caule 15	2,0	T2	20	5,0	95	0,867	1,65
Caule 16	3,0	T1	40	5,0	90	2,360	4,25
Caule 17	5,0	T2	60	5,0	85	3,401	5,78
Mistura 1	1,0	-	40	5,0	90	0,564	1,02
Mistura 2	2,0	T1	40	5,0	90	2,443	4,40
Mistura 3	2,0	T2	40	5,0	90	4,156	7,48
Mistura 4	5,0	T2	90	5,0	75	6,088	9,13
Carolo 1	1,0	-	40	5,0	90	2,919	5,25
Carolo 2	2,0	T2	40	5,0	90	8,452	15,21
Carolo 3	2,0	T2	40	5,0	90	8,113	14,60
Carolo 4	2,0	T2	90	5,0	75	11,026	16,54
Carolo 5	3,0	T1	60	5,0	85	8,046	13,68
Carolo 6	2,0	T2	90	5,0	75	9,293	13,94
Carolo 7	5,0	T2	90	5,0	75	10,999	16,50
Folha 1	1,0	-	40	5,0	90	0,923	1,66
Folha 2	2,0	-	90	5,0	75	4,467	6,70
Folha 3	2,0	T1	40	5,0	90	4,327	7,79
Folha 4	2,0	T2	40	5,0	90	5,578	10,04
Folha 5	5,0	T2	90	5,0	75	9,612	14,42

¹Volume total do meio de extração/hidrólise. ²Concentração de xilose determinado por HPLC. ³ Percentagem de xilose relativamente ao peso da biomassa utilizada na extração/hidrólise. T1- tratamento com 24 horas “de molho”, T2- tratamento com 24 horas “de molho” seguida de 40 minutos em banho de ultrassons.

2. Comparação dos Pré-tratamentos Utilizados

As amostras foram agrupadas de acordo com os tratamentos utilizados e comparadas com as amostras não tratadas apresentadas na tabela 8. O tratamento **T1**, onde as amostras foram colocadas 24 horas “de molho” na própria solução ácida diluída antes da extração/hidrólise, foi o primeiro pré-tratamento testado. Os valores do teor de xilose para cada amostra estão apresentados na tabela 9. Com a comparação das tabelas podemos verificar que houve diferença para os resultados da concentração de xilose nas amostras que não foram tratadas antes da extração/hidrólise em comparação com as amostras que foram pré tratadas, principalmente nas amostras do Caule, da Mistura e da Folha o valor da concentração de xilose aumentou. O carolo foi a única amostra que não teve muita diferença com este pré-tratamento (T1) não sendo possível comparar os resultados. A percentagem de ácido não interferiu nos resultados obtidos com esse pré-tratamento e nem alterou os resultados para cada parte da planta do milho utilizado mesmo quando o tempo de extração utilizado foi aumentado, mantendo o Carolo sempre com os melhores resultados.

Tabela 9: Concentração de xilose obtida nas amostras sem pré-tratamento.

Biomassa	% Ácido	Tempo	[xilose] % ¹
Caule 2	1,0	40	1,21
Caule 3	1,0	40	0,81
Caule 4	1,0	50	2,39
Caule 5	1,0	60	2,00
Caule 6	1,0	90	2,49
Mistura 1	1,0	40	1,02
Carolo 1	1,0	40	5,25
Folha 1	1,0	40	1,66
Caule 7	2,0	40	6,68
Caule 8	2,0	60	4,25
Caule 9	2,0	20	1,59
Caule 13	2,0	90	2,93
Folha 2	2,0	90	6,70
Carolo 2	2,0	40	15,21

¹ Percentagem de xilose relativamente a biomassa utilizada.

Tabela 8: Concentração de xilose obtidas nas amostras no tratamento T1*.

Biomassa	% Ácido	Tempo	Xilose% ¹
Caule 10	2,0	40	5,90
Mistura 2	2,0	40	4,40
Folha 3	2,0	40	7,79
Caule 16	3,5	40	4,25
Carolo 5	3,5	60	13,68

¹ Percentagem de xilose relativamente a biomassa utilizada

* T1- as amostras são colocadas 24 horas “de molho”.

No tratamento T2 as amostras foram colocadas 24 horas “de molho” e 40 minutos em banho de ultrasson. Os resultados estão agrupados na tabela 10 com a referência das amostras testadas e o seu respectivo valor da concentração de xilose. Os resultados obtidos foram melhores quando comparados com as amostras que foram tratadas com o tratamento T1 e com as que não foram pré tratadas (tabelas 8 e 9), a concentração de xilose aumentou.

A extração/hidrólise com ácido a 5% foi onde se obteve os melhores resultados independentemente da parte da planta do milho utilizada. Houve uma pequena variação quanto ao tempo de extração, mas a medida que o tempo de extração foi aumentado os valores da concentração de xilose obtidos eram maiores mesmo quando a percentagem de ácido utilizado fosse a 2% ou 5%.

Tabela 10: Concentração de xilose obtida nas amostras no T2*

Biomassa	% Ácido	Tempo	Xilose % ¹
Caule 11	2,0	40	5,9
Caule 12	2,0	40	3,81
Caule 14	2,0	90	5,72
Caule 15	2,0	20	1,65
Mistura 3	2,0	40	7,48
Folha 4	2,0	40	10,04
Carolo 3	2,0	40	14,6
Carolo 4	2,0	90	16,54
Carolo 6	2,0	90	13,94
Caule 17	5,0	60	5,78
Mistura 4	5,0	90	9,13
Folha 5	5,0	90	14,42
Carolo 7	5,0	90	16,50

¹percentagem de xilose relativamente a biomassa utilizada

*T2 – com tratamento adicional de 40 min. Em banho de ultrassons.

Comparado os pré-tratamentos utilizados o tratamento T2 foi o melhor, temos o exemplo da amostra Folha 2 que não foi pré tratada e a sua concentração de xilose foi de 6,70%, enquanto na amostra Folha 3 foi aplicada o tratamento T1, esta teve uma concentração de xilose maior (7,79 %) para um tempo de extração de 40 minutos. Já na

amostra Folha 2 foram necessários 90 minutos para conseguir extrair uma concentração de xilose ainda menor que a amostra Folha 3, onde só foram necessários 40 minutos. Contudo na amostra Folha 4 onde foi aplicado o tratamento T2 os resultados foram ainda melhores, aumentando a percentagem de xilose para 10,04%. Em todas as amostras, independente da parte planta do milho utilizada, o tratamento T2 foi o que obteve melhores concentrações de xilose nos hidrolisados. No pior dos casos, a variação dos valores do teor de xilose quando aplicado os pré-tratamentos pode ser pequena em comparação as amostras não tratadas, mas nunca inexistente ou menor, o que sugere que a aplicação dos pré-tratamentos serviu para ajudar na extração/hidrólise da hemicelulose na biomassa da variedade de milho Miami 600 utilizado.

3. Comparação dos Métodos de Extração Relativamente a Percentagem Aproximada de Açúcares Totais nos Hidrolisados

3.1 Fibertec/Autoclave/Refluxo

A comparação dos métodos de extração/hidrólise utilizados é feita através do valor de Brix, de onde é possível determinar aproximadamente o teor em açúcares totais presentes no hidrolisado.

Uma vez que a extração/hidrólise ácida nas condições utilizadas só consegue extrair maioritariamente a hemicelulose e partes vestigiais de celulose e lenhina, o açúcar maioritário hidrolisado é a xilose. O teor açúcar total obtido será aproximada à xilose existente nos hidrolisados, com isso quanto maior a percentagem dos açúcares totais maior é a eficiência do método de extração.

A extração/hidrólise no “Fibertec” foi o primeiro método testado, por isso tem um maior número de amostras representadas na tabela 11 onde se encontra a descrição do peso da amostra, o tempo de extração, e a percentagem de ácido. O método resulta em teores diferentes de açúcares totais, dependendo da percentagem de ácido e o tempo de extração utilizado, onde a 5% de ácido e 90 minutos foram os melhores resultados obtidos. Quando se aumenta o tempo de extração o valor de Brix aumentava o que aparentemente representava um aumento do valor dos açúcares totais no hidrolisado.

Um problema no método de extração/hidrólise no “Fibertec”, foi a limitação na quantidade de amostra em relação a proporção sólido/líquido, uma vez que não se poderia utilizar quantidades elevadas de amostra para um volume reduzido de líquido por perdas por evaporação. O máximo utilizado foi uma proporção 1/20 (sólido/líquido) limitando a obtenção de um hidrolisado muito concentrado em açúcares.

Em relação aos valores obtidos nas duas variedades de milho, só podem ser comparados os dados do Carolo da variedade Miami 600 (CR) com os dados do Carolo da variedade Amiúdo (CRa). A partir da amostra Carolo 3, estão as amostras que passaram pelos pré-tratamentos testados com melhores resultados, logo só podem ser comparadas essas amostras uma vez que na variedade de Carolo Amiúdo todos as extrações/hidrólise passaram pelos pré-tratamentos anteriormente testados.

Em relação as variedades de milho, os valores da percentagem de açúcares totais aproximados não se distanciam muito nas mesmas condições de extração/hidrólise, como é o caso das amostras do Carolo 3 e o Carolo Amiúdo 6 quando utilizados 2% de ácido e com 40 minutos de tempo de extração 2,70 % e 2,70 % respetivamente. Também as amostras onde foram utilizados 2% de ácido e 90 minutos de extração/hidrólise Carolo 4 e 6 (3,75% e 3,00% respetivamente), Carolo Amiúdo 1 e 3 (3,00% e 3,75% respetivamente), os valores da percentagem de açúcares totais foram semelhantes. Enquanto os resultados para a percentagem de açúcares totais na extração/hidrólise com ácido a 5% não foram semelhantes nas variedades de milho. Mas de um modo geral o carolo da variedade Amiúdo obteve melhores resultados comparando as amostras do Carolo 7 e 8 (3,75% e 4,50% respetivamente), e do Carolo Amiúdo 2 e 5 (6,00% e 9,00% respetivamente).

Tabela 11: Teor de açúcares totais na extração/hidrólise em “Fibertec” para a biomassa de milho das variedades Miami 600 e Amíúdo.

Amostra	Peso (g)	Tempo (min)	Ácido %	BRIX ¹ total %	% Açúcares totais ² aproximado
Caule 10	5	40	2,0	4	1,80
Caule 11	5	40	2,0	5	2,70
Caule 13	5	90	2,0	5	2,25
Caule 14	5	90	2,0	5	2,25
Caule 15	5	20	2,0	8	5,70
Caule 16	5	40	3,5	6	2,70
Caule 17	5	60	5,0	9	3,40
Caule 18	5	60	5,0	12	5,95
Folha 1	5	40	2,0	4	1,80
Folha 2	5	90	2,0	7	3,75
Folha 3	5	40	2,0	6	3,60
Folha 4	5	40	2,0	6	3,60
Folha 5	5	90	5,0	17	9,00
Mistura 2	5	40	2,0	4	1,80
Mistura 3	5	40	2,0	6	3,60
Mistura 4	5	90	5,0	12	5,25
Mistura 5	5	90	5,0	12	5,25
Carolo 1	5	40	2,0	4	1,80
Carolo 3	5	40	2,0	5	2,70
Carolo 4	5	90	2,0	7	3,75
Carolo 5	5	60	3,5	8	4,25
Carolo 6	5	90	2,0	6	3,00
Carolo 7	5	90	5,0	10	3,75
Carolo 8	5	90	5,0	11	4,50
Carolo 1*	5	90	2,0	6	3,00
Carolo 2*	5	90	5,0	13	6,00
Carolo 3*	5	90	2,0	7	3,75
Carolo 4*	5	40	5,0	10	4,50
Carolo 5*	5	90	5,0	17	9,00
Carolo 6*	5	40	2,0	5	2,70
Carolo 7*	10	90	5,0	10	4,38
Carolo 9*	10	150	5,0	10	3,98
Carolo 13*	10	90	5,0	9	3,02

*Carolo da variedade Amíúdo. ¹Brix medido nos hidrolisados. ²Calculo dos açúcares aproximados existente nos hidrolisados.

Na extração/hidrólise utilizando a autoclave, os dados da medição de Brix foram lançados na tabela 12. Nestes ensaios apenas se fez variar a concentração de ácido utilizado, para cada exemplar das diferentes partes da planta do milho testadas. No caule foram utilizadas concentrações de ácido a 1% e 2 % para as amostras _ACaule 1 e _ACaule 2 respetivamente, nos restantes exemplares também foi testada a extração com 5% de ácido sulfúrico já que nos tratamentos anteriores foi o que obteve melhores resultados. Na maioria dos trabalhos pesquisados na literatura onde utilizavam as condições de extração para o carolo em autoclave, os resultados encontrados foram somente para

extrações com o uso de ácidos a 1% e 2% e não com ácido a 5%, que no nosso caso foi o que apresentou os melhores resultados. Entretanto não se pode comparar os valores com esses trabalhos uma vez que a técnica de quantificação é diferente e a razão solido/líquido também. A escolha da razão de extração sólido/líquido utilizado para a autoclave foi partindo do princípio que estes valores no final teriam de ser comparáveis com o outro método de extração antes utilizado (“Fibertec”).

Comparando a obtenção da xilose das diferentes partes da planta, o Carolo apresentou os melhores resultados independente da variedade, os valores são concisos em todas as percentagens de ácidos utilizados. A Folha mostrou ser a segunda com os melhores resultados no teor de açúcares totais conforme o esperado, já que na quantificação da xilose em HPLC esta foi a segunda com maiores concentrações de xilose. Mas neste caso só foi possível a utilização de ácido sulfúrico a 2%, por isso não podemos fazer a comparação com outras concentrações de ácido devido a falta de amostra desta mesma variedade de milho inicialmente em estudo.

Tabela 12: Açúcares totais na extração/hidrólise em Autoclave

Amostra	Peso (g)	Volume (mL)	Ácido %	Brix total % ¹	% Açúcares totais aproximado ²
A Caule 1	5,0	100	1,0	2	1,0
A Caule 2	5,0	100	2,0	4	2,0
A Folha1	5,0	100	2,0	5	3,0
A Mistura 1	5,0	100	1,0	3	2,0
A Mistura 2	5,0	100	2,0	4	2,0
A Mistura 3	5,0	100	5,0	8	3,0
A Carolo 1	5,0	100	1,0	4	3,0
A Carolo 2	5,0	100	2,0	5	3,0
A Carolo 3	5,0	100	5,0	9	4,0
A Carolo 1*	5,0	100	1,0	4	3,0
A Carolo 2*	5,0	100	2,0	5	3,0
A Carolo 3*	5,0	100	5,0	9	4,0

*Carolo da variedade Amiúdo. ¹Brix total medido nos hidrolisados. ²% Aproximado de açúcares totais no hidrolisado.

O último método de extração/hidrólise utilizado foi o sistema de ebulição em solução ácida sob refluxo, as condições inicialmente usadas nas amostras eram em proporção de 1/10 (solido/liquido) nas amostras do Carolo Amiúdo 8, 10 e 11 e nas amostras do Carolo 9 e 10. Os resultados foram de acordo com o cálculo do Brix teórico, partindo do princípio que a quantidade de hemicelulose possível de extrair seria cerca de 35%. No entanto como o objetivo final era aumentar a concentração de hemicelulose nos hidrolisados colocando uma maior quantidade de amostra para um

volume reduzido de ácido, a extração passou a ser feita na proporção de 1/5 (sólido/líquido) nas amostras de Carolo Amiúdo 12, 14, 15 e 16, onde se obteve os melhores resultados de açúcares totais aproximado.

O método de extração/hidrólise utilizado foi realizado somente nas amostras de Carolo para as duas variedades de milho em estudo, na tabela 13 encontra-se as referências para as amostras testadas e suas condições de extração/hidrólise.

Tabela 13: Teor de açúcares totais na extração/hidrólise pelo sistema ebulição em Refluxo.

Amostra	Peso (g)	Tempo (min.)	Volume (mL)	Ácido %	Brix % ¹	% Açúcares totais aproximado ²
Carolo 8*	20	90	200	5	10	5,00
Carolo 10*	20	150	200	5	10	5,00
Carolo 11*	20	90	200	5	10	5,00
Carolo 12*	20	150	100	5	14	9,00
Carolo 14*	20	150	100	5	13	8,00
Carolo 15*	20	150	100	5	13	8,00
Carolo 16*	20	210	100	5	14	9,00
Carolo 9	5	90	100	5	8	3,00
Carolo 10	20	150	200	5	10	5,00

*Carolo da variedade Amiúdo.¹Brix total medido nos hidrolisados. ² % Aproximado de açúcares totais no hidrolisado.

Com a diminuição do volume do ácido diluído utilizado na extração os valor do teor de açúcar total aumentou, como era esperado. Foram avaliados as diferenças no tempo de extração para 90, 150 e 210 minutos, mas a diferença relativamente ao teor de açúcares totais é quase inexistente, variando no máximo em 1% para o teor de açúcares aproximado no hidrolisado. Em alguns casos nem houve variação quando o tempo era aumentado, talvez porque o máximo da hemicelulose já teria sido extraído ou também porque só se aumentava o tempo de extração e a temperatura se mantinha.

Avaliando de uma forma geral os três métodos utilizados o melhor foi a extração/hidrólise em ácido sob refluxo, não só por ter obtido valores de percentagem de açúcares mais elevados mas também por solucionar o problema de aumento da concentração nos hidrolisados. No método com a “Fibertec” os valores variam muito mesmo quando se trata da mesma amostra com as mesmas condições se extração/hidrólise. A autoclave foi o método pouco explorado por falta de condições laboratoriais, mas os valores não estão muito distantes dos outros métodos. Um fator importante mencionar é que as amostras testadas na autoclave não passaram pelos pré-

tratamentos estudados anteriormente, como o banho de ultrassons e colocar “de molho”, o que sugere a diferença nos resultados, mas perante os outros métodos este é o único que poderia ser aplicado a nível industrial.

4. Identificação e Quantificação do Furfural e o 2-Hidroximetilfurfural

A presença de furfural nos hidrolisados foi quantificada pela análise em SPME - GS-MS através do cromatograma padrão de 2-HMF onde é feita a comparação dos resultados dos cromatogramas das amostras.

Para identificar a presença do furfural nas amostras foi feita a sobreposição dos cromatogramas com o cromatograma do 2-HMF padrão conforme se representa no gráfico 2. Para identificar o tempo de retenção em cada amostra e verificar a presença ou não das bandas correspondentes pela existência do íon molecular FW 126,1, quando existente é feita a quantificação da respetiva área. Com os valores foi possível construir a tabela 14 para todas as amostras analisadas em SPME - GC-MS.

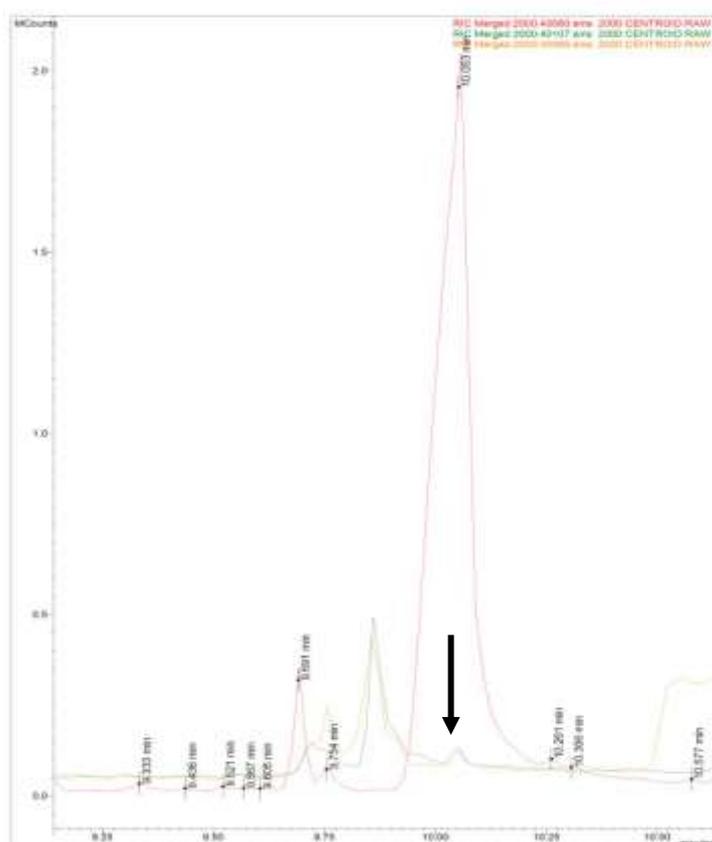


Gráfico 2: Sobreposição dos cromatogramas obtidos por SPME- GC-MS das amostras Folha 3 e Caule 9 com o padrão do furfural

No gráfico 2 foi feita a sobreposição dos cromatogramas do 2-HMF padrão e das amostras Folha 3 e Caule 9 cuja extração/hidrólise foi feita no “Fibertec” nas condições descritas na tabela 14. O maior pico é do 2-HMF (padrão) e na sobreposição com os outros cromatogramas os picos coincidem (onde se encontra a seta) embora esses sejam em quantidades muito pequenas. O cromatograma de cor verde corresponde a amostra Folha 3 e o cromatograma de cor laranja corresponde a amostra Caule 9.

Tabela 14: Quantificação relativa do furfural nos hidrolisados por SPME- GC-MS

Ref. Amostra	Condições de Extração/hidrólise		Tempo de Retenção (Tr)	Área 2-HMF
	% Ácido	Tempo (min.)		
2-HMF ¹	--	--	10,053	10000000,161
Caule 10	2,0	40	10,002	399014
Carolo 2	2,0	40	9,952	62040
Carolo 3	2,0	40	9,970	178000
Caule 4	1,0	50	9,985	240929
Mistura 2	2,0	40	9,967	88607
Folha 1	1,0	40	-	-
Caule 6	1,0	90	10,060	76677
Carolo 1	1,0	90	-	-
Caule 9	2,0	20	10,056	233552
Mistura 1	1,0	40	-	-
Caule 5	1,0	60	9,889	929016
Caule14	2,0	90	9,970	832134
Mistura 3	2,0	40	10,045	431567
Folha 3	2,0	40	10,048	146056
Caule 12	2,0	40	9,997	631350
Carolo 4	2,0	90	9,995	244379

¹ Padrão do 2-HMF

- Não encontrado ou em quantidades vestigiais.

A presença do furfural depende do tratamento utilizado, entretanto a percentagem de ácido e a utilização de altas temperaturas, é de certa forma crucial para a formação do furfural em elevadas quantidades. Nas extrações com ácido a 1% não se identificou o furfural, já em concentrações de 2% foi possível em algumas amostras identificar o furfural mas em pequenas quantidades. A quantidade reduzida do furfural é sinal de condições suaves na extração/hidrólise ou seja, não se atingem temperaturas elevadas ou porque as percentagens de ácidos utilizados não foram muito elevados.

5. Purificação dos Hidrolisados da Xilose por Remoção das Hexoses com o Crescimento da *Saccharomyces cerevisiae*

A avaliação do crescimento da levedura foi feita através da medição da turvação, desde o primeiro dia da inoculação (dia 0) até cerca de 6-7 dias de fermentação. O potencial de crescimento da levedura nos hidrolisados, foi verificado com o aumento do valor da turvação expresso em NTU. O crescimento da levedura no hidrolisado só poderia resultar devido a presença das hexoses e dos sais minerais existentes no hidrolisado, levando remoção dos mesmos do extrato. Os melhores resultados do crescimento da levedura foram nas amostras Carolo 1, 2 e 4 e Mistura 2, estão representados no gráfico 3 com os valores da turvação para cada dia em que foi feita a medição.

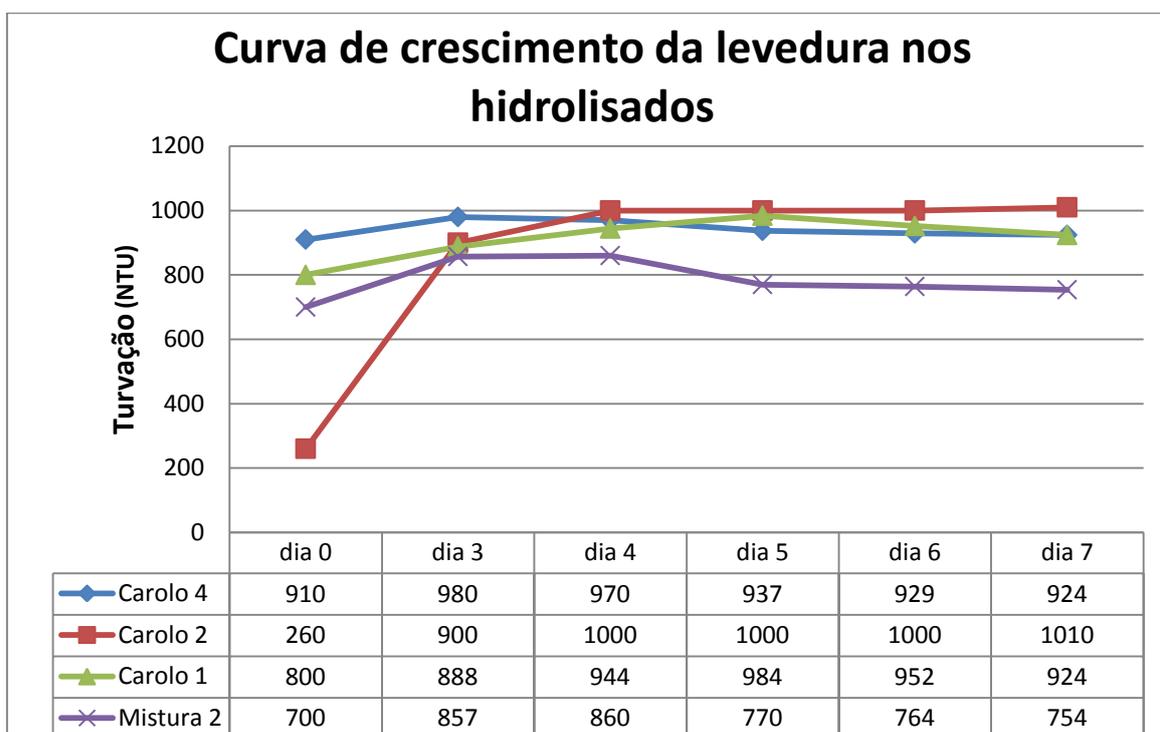


Gráfico 3: Curva de crescimento da levedura nas amostras de Carolo 4, 2 e 1, e na Mistura 2.

A avaliação do crescimento da levedura no hidrolisado varia de amostra para amostra porque a composição dos hidrolisados são diferentes. No início da medição da turvação (dia 0), cada amostra apresentava um valor diferente de turvação por isso a grande diferença no valor inicial da turvação ao longo da curva de crescimento. Nas amostras do carolo 4, 2 e 1, e mistura 2, os valores de turvação foram aumentando

formando uma curva de crescimento a cada dia de medição. Somente no sétimo dia que a turvação diminui ou manteve, talvez devido ao esgotamento dos nutrientes, mas nunca diminui para além do valor da turvação inicial (dia da inoculação da levedura, dia 0). Já nas amostras em que a fermentação não foi bem sucedida isso não aconteceu. Não houve curva de crescimento e os valores da turvação (NTU) variavam muito. Portanto nem todos os resultados de fermentação da levedura nos hidrolisados foram positivos, como é o caso das amostras Caule 10 e 12 apresentados no gráfico 4.

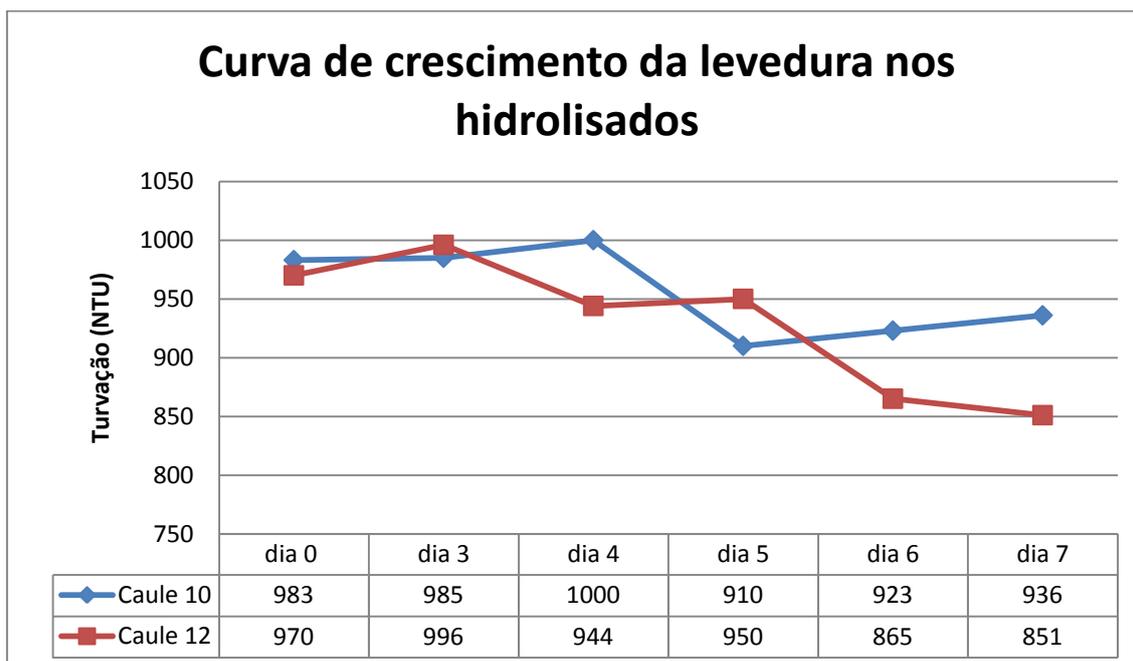


Gráfico 4: Variação da turvação dos hidrolisados inoculados a levedura nas amostras Caule 10 e 12.

Na amostra Caule 10 quase não houve crescimento, nos primeiros dias houve um pico de crescimento mas a partir do quinto dia o valor da turvação começou a diminuir. Na amostra Caule 12 o crescimento da levedura foi instável, o valor da turvação também começou a diminuir logo a partir do quinto dia de medição. A princípio o valor da turvação no sétimo dia não poderia ser inferior a medição feita no primeiro dia da inoculação da levedura (dia 0) o que sugere a presença de inibidores, alguma contaminação durante a fermentação ou falta de nutrientes. Logo não se sabe se nestas amostras houve ou não crescimento da levedura.

Após a fermentação as amostras foram analisadas no HPLC, para confirmar a ideia inicial de que a levedura se alimentaria das hexoses do hidrolisado, deixando as pentoses, desta forma purificado, tornando a solução predominantemente rica em xilose.

Os resultados da amostra mistura 2 podem ser observados no gráfico 6, em que o cromatograma “A” (cor azul) representa a cromatografia antes da fermentação onde estão presentes os açúcares em C5 e C6 e o cromatograma “B” (cor preta) depois da fermentação com a levedura onde já não estão presentes os açúcares em C6 (zona com o círculo), demonstrando a eficiência da remoção dos açúcares em C6 pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* nos hidrolisados.

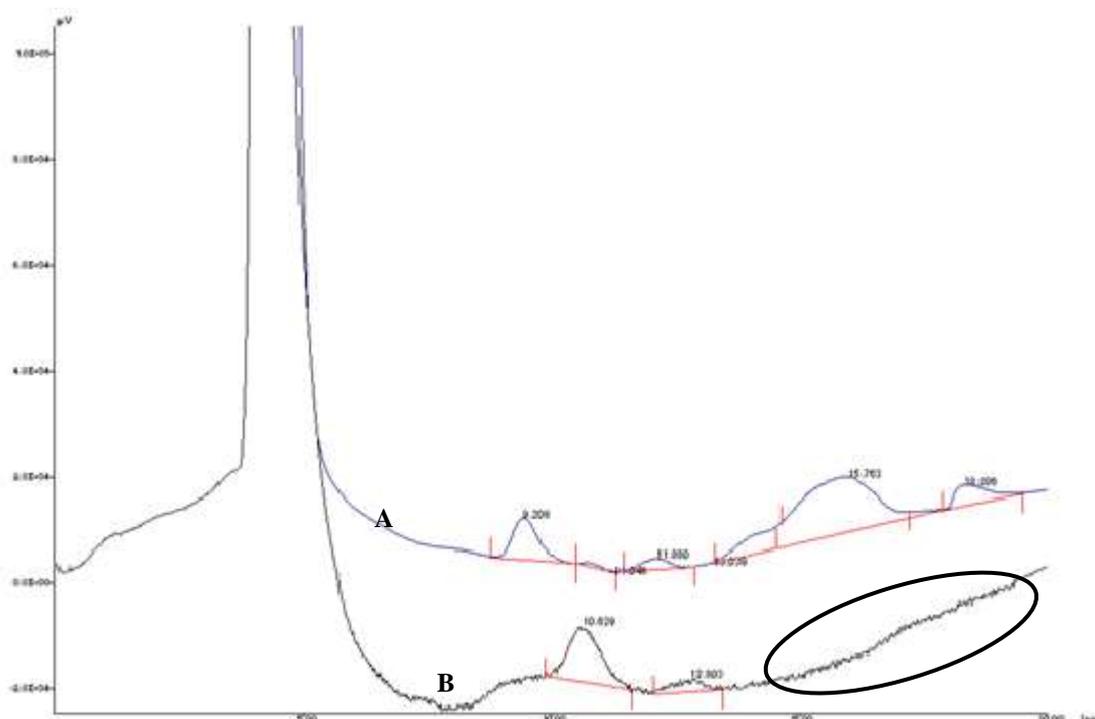


Gráfico 5: Sobreposição do cromatograma da amostra Mistura 2 antes (A) e depois (B) da fermentação com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. As hexoses (Tr = 15min.) desapareceram no final do processo.

A maioria dos resultados obtidos nos tratamentos com a levedura, levaram a purificação dos hidrolisados, mesmo naqueles em que a presença do furfural foi identificada, comprova a sua presença em quantidades vestigiais. Em alguns casos o tratamento não foi muito eficiente, como é o caso da amostra do Caule 10 onde a cromatografia antes da fermentação “A” apresentava pentoses e hexoses depois da fermentação algumas hexoses permaneceram no hidrolisado “B”, deveriam ter sido metabolizados pela *Saccharomyces cerevisiae*. Os resultados podem ser confirmados no gráfico 7 de sobreposição dos cromatogramas antes e depois da fermentação. A zona marcada com o círculo é o local onde deveria ser diferentes apos a fermentação. O facto de a levedura não ter consumido esses açúcares nessa amostra pode ser por não ter

havido condições ótimas de crescimento, como por exemplo a presença de inibidores de crescimento como o 2-HMF (que nesta amostra foi cerca de 399014 de área analisada no SPME- GC-MS, encontra-se na tabela 14). Também no gráfico 4 a curva de crescimento da amostra do Caule 10, teve muitas variações no valor da turvação e não se sabe se houve crescimento da levedura.

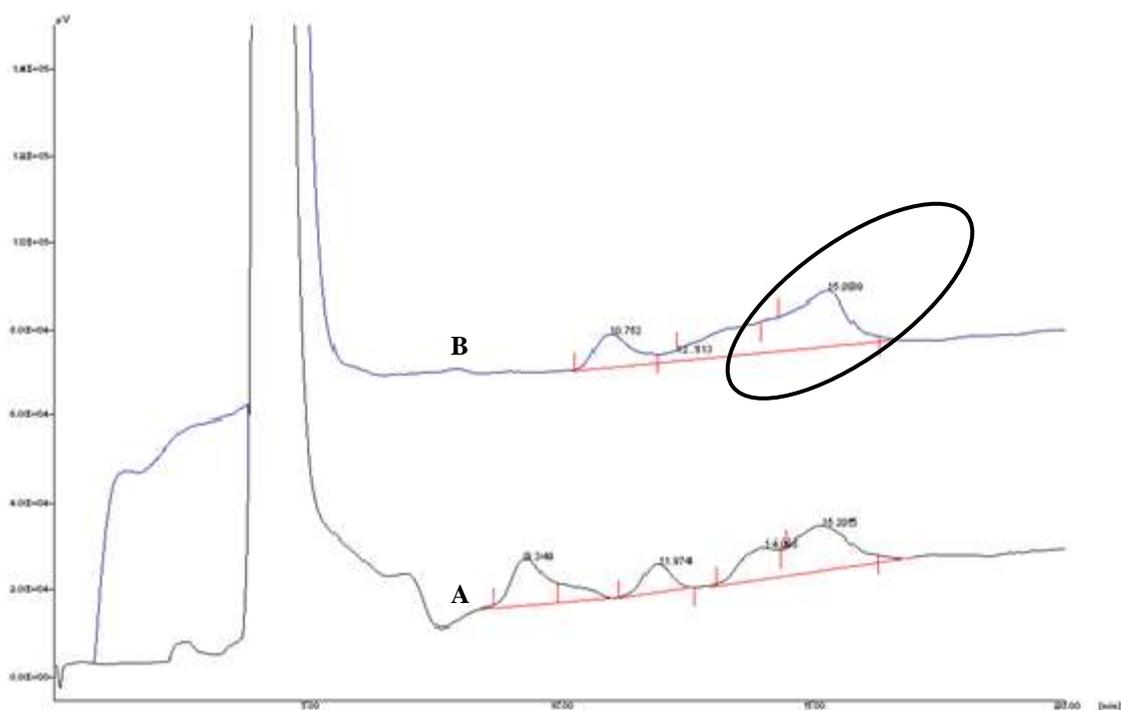


Gráfico 6: Sobreposição dos cromatogramas da amostra do Caule 10 antes (A) e depois (B) da fermentação com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. As hexoses (Tr = 15min.) não desapareceram na totalidade no final do processo.

6. Redução com Borohidreto de Xilose a Xilitol

A etapa final de conversão da xilose a xilitol foi feita com Borohidreto de sódio. Os ensaios preliminares de redução com diferentes açúcares demonstraram que soluções de C5 (pentoses) têm maior facilidade em ser reduzidos com a utilização do borohidreto de sódio em relação aos C6 (hexoses).

Um modo muito simples de verificar a totalidade da redução é fazer o teste de Beneditt antes da redução, onde o resultado é positivo, e a solução muda de cor azul para laranja tijolo (A) e depois da redução onde o teste é negativo se tiver havido a redução completa dos açúcares, ou seja o reagente de Beneditt mantem a cor azul (B) representados na figura19.

A redução com o borohidreto de sódio de um modo geral resultou para as amostras em que foi feita a redução. A medida em que a concentração da xilose nos hidrolisados fosse maior, era necessários de uma grande quantidade de borohidreto para efetuar a redução o que contaminaria mais o hidrolisado, tornando o método dispendioso devido as várias etapas de purificação.



Figura 19: Teste de Beneditt (antes “A” e depois “B”)

7. Purificação dos Hidrolisados

Ao realizar a neutralização do ácido utilizado na extração/hidrólise com o carbonato de sódio há a formação do sulfato de sódio, uma das formas para confirmar a presença do sulfato é a realização do teste com o cloreto de bário onde ocorreu a formação de um precipitado branco no caso de ser positivo a presença do sulfato. Os testes realizados nas amostras dos hidrolisados foi positiva a presença do sulfato como aparece na figura 20.

A técnica utilizada para retirar o sulfato foi o armazenamento a baixas temperaturas e depois o arrefecimento no frigorífico, há a formação dos cristais de sódio deca hidratado Para afirmar que os cristais formados são o sulfato de sódio, foi feito a verificação do ponto de fusão do sulfato numa estufa a uma temperatura inicial de 30°C e posteriormente a 50°C. Os cristais derreteram (figura 21) logo nos primeiros 20 minutos uma vez que a temperatura do ponto de fusão do sulfato de sódio deca hidratado é de 32,5°C. Durante o aumento da temperatura e do tempo na estufa formaram saís de sulfato e sódio.



Figura 20: Teste de Cloreto de Bário.



Figura 21: Teste de Fusão dos Cristais.

No estudo na etapa final usa-se o borohidreto de sódio que acaba também por contaminar o hidrolisado com íons resultantes da reação de redução. Para a remoção destes íons do hidrolisado é utilizado a resina de troca iônica de leito misto.

A avaliação da eficácia da desmineralização dos hidrolisados pela resina foi feita pela medição da condutividade antes e depois da solução de xilitol passar pela coluna de resina. As perdas durante este processo são avaliadas com a medição de Brix nas amostras. A primeira amostra passada na coluna de resina de troca iônica foi o Carolo 3 (CR3) depois de reduzir os açúcares, este apresentava a condutividade de 34,8mS/cm, e depois de passar pela coluna de resina a condutividade reduziu para 965 μ S/cm. Assim depois das amostras passarem pela resina de troca iônica, a sua condutividade diminui de forma considerável eliminando os minerais presentes e deixando uma solução de xilitol bastante pura. Por evaporação a vaco obtém-se então o melaço rico em xilitol apresentado na figura 22 seguinte.



Figura 22: Melaço rico em xilitol

III. Conclusão e Perspetivas Futuras

O objetivo do trabalho, a obtenção de um melação rico em xilitol, foi conseguido com sucesso perante as condições disponíveis, com processos de obtenção otimizados. O melhor rendimento obtido foi de 16,5 % relativamente a extração/hidrólise da xilose na biomassa do milho da amostra do Carolo7 em condições de extração/hidrólise com ácido sulfúrico a 5% durante 90 minutos na proporção de 1/20 (sólido/líquido). A concentração de xilose foi quantificada em HPLC.

O segundo melhor resultado relativamente as diferentes partes da biomassa da planta do milho, foi nas amostras da Folha (Folha 5) com 14,42 % de xilose relativamente as 5g gramas de biomassa utilizado. As amostras do Caule foram as mais testadas, em todos os tratamentos e métodos de extração/hidrólise, mas em contrapartida foi a amostra em que se obteve menores teores de xilose nos hidrolisados, enquanto para as amostras da Mistura esperava-se melhores resultados.

Não obtivemos bons resultados para o teor de xilose com ácido sulfúrico a 1% talvez devido aos métodos de extração/hidrólise utilizados, entretanto na identificação do furfural nas amostras tratadas com ácido a 1% não se verificou a presença deste inibidor, o que é muito importante quando a via de redução pretendida é a biológica.

Segundo alguns valores de Brix obtidos o processo de extração/hidrólise conseguiu extrair quantidades aproximadas do máximo teórico possível de 35% da hemicelulose presente na biomassa das amostras, designadamente do Carolo perante a utilização de pré-tratamentos. Os valores obtidos não estão a quem de resultados de pesquisas de outros autores. A pesquisa de novos pré-tratamentos que facilitassem a hidrólise das ligações da hemicelulose em diferentes biomassas seria de interessante estudo.

O processo de purificação dos hidrolisados com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi muito satisfatório embora para projetos futuros, a melhoria das condições de fermentação da levedura no hidrolisado seria interessante, de forma a obter resultados de purificação ainda melhores. O processo de desmineralização utilizando o carvão ativado também poderia ser testado comparado a sua eficiência em relação a resina de troca iónica ou mesmo a junção das duas metodologias para melhorar a purificação dos hidrolisados.

O processo de redução que inicialmente estava para ser testado ao longo do trabalho seria a hidrogenação catalítica com o Níquel Raney, processo de redução química utilizado maioritariamente nas empresas de produção de xilitol. Mas por impossibilidade de obtenção do reagente não foi possível. O processo de redução da xilose a xilitol através da utilização do borohidreto de sódio é muito eficaz na redução de C5 mas acaba por contaminar as soluções com produtos da decomposição do BH_4^- Na^+ .

Uma das dificuldades encontradas foi no processo final de evaporação a vacuo, onde o melaço obtido estava muito contaminado com sais resultantes das etapas anteriores de neutralização e redução. Sugerindo então que fosse necessário varias etapas de purificação com a resina de troca iónica.

No caso de expandir a técnica de extração da hemicelulose para o aumento da escala de produção, seria interessante a reavaliação do método em autoclave otimizada para escala industrial. Perspetiva de estudos de redução da xilose pela via biológica, com o estudo de um microrganismo capaz de purificar o hidrolisado metabolizando as hexoses como fonte de ATP (energia), e reduzir a xilose para xilitol com rendimentos superiores aos 65% descritos nos estudos recentes na literatura. Uma vez que a produção do xilitol vem da “reciclagem” de biomassa da planta do milho ou de outras plantas, com elevado nível de produção pelo mundo todo, a otimização de todo o seu processo de obtenção de forma a obter um grande rendimento, seria muito lucrativo para o mercado graças a sua vasta área de aplicação.

O mercado para o licor rico em xilitol é grande uma vez que depois este sofre processos de transformação, mas também seria interessante estudos de cristalização do produto obtendo o xilitol cristalizado que poderia ser substituto da sacarose em condições moderadas.

IV. Bibliografia

ABDEL-AKHER, M.; HAMILTON J. K.; SMITH F. – **The Reduction of Sugars with Sodium Borohydride**. J. Am. Chem. Soc. Outubro de 1951.

AGUIAR, ANDRÉ; FERRAZ, ANDRÉ - **Mecanismos envolvidos na biodegradação de materiais lignocelulósicos e aplicações tecnológicas correlatas**. Departamento de Biotecnologia, Química. Nova vol.32 no.3 São Paulo 2009. ISSN 0100-4042 http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422009000300010 Em linha [Consulta 3 Abril 2015].

ALBUQUERQUE LIMA DE, TIAGO; DA SILVA JR, IVANILDO JOSÉ; MACEDO RIBEIRO DE, GORETE; ROCHA PONTE VALDEREZ, MARIA - **Biotechnological production of xylitol from lignocellulosic wastes: A review**. Process Biochemistry 1779–1789 ScienceDirect 2014.

ANPRONIS - **Caracterização do setor do milho**. CONSULAI; Lisboa, Março de 2014 <http://www.anpromis.pt/images/relatorios/cmilho.pdf> in linha [Consulta 19 de junho 2015].

ASANO SHIBAHARA, CLAUDIA TAKAKO – **Importância do uso de xilitol para as indústrias alimentícias e farmacêuticas**. Universidade de São Paulo escola de engenharia de lorena. 2014 <http://sistemas.eel.usp.br/bibliotecas/monografias/2014/MBI14003.pdf> Em linha [Consulta 23 Abril 2015].

BARBOSA DE SOUSA, JAYNE CARLOS; SERRA AARÃO, ANTÔNIO – **Ultrason(I): influência do ultra-son na química**. Unidade de química fina, Lorena – SP 1992 http://quimicanova.s bq.org.br/imagebank/pdf/Vol15No4_302_v15_n4_%286%29.pdf Em linha [Consulta 31 Março 2015].

BARCZA VILLELA, MARCOS – **Hidrólise: processos Unitários Orgânicos**. EEL-USP, 2012 <http://www.dequi.eel.usp.br/~barcza/Hidrolise.pdf> Em linha [Consulta 14 Maio 2015].

BARGHINI, ALESSANDRO – **O milho na América do sul Pré-Colombiana: uma História Natural**; Antropologia nº61, Pesquisas 2004; ISSN: 0553-8467.

BARROS C. JOSÉ F.; CALADO JOSÉ G. - **A Cultura do Milho**. Departamento de Fitotecnia, Évora 2014.

BERGER, JOSEPH – **Maize Production and the Manuring of Maize**. Centre D'Étude de L'Azote, Geneva 1962.

BONFADA HERNANDEZ, ANDRESSA ZARDIN; LORA, JULIANA - **Xilitol: uma abordagem no uso em alimentos**. 2010 <http://www.bib.unesc.net/biblioteca/sumario/00004F/00004F01.pdf> Em linha [Consulta 23 Abril 2015].

BRANCO DE FREITAS, RICARDO – **Produção enzimática de xilitol utilizando sistema de regeneração de coenzima como alternativa às vias química e microbiológica de obtenção**. Escola de Engenharia de Lorena, SP 2010.

BUSINESS COMMUNICATIONS COMPANY INC. - **The global market for polyols.** Maio, 2014 <http://www.giiresearch.com/report/inde302454-xylitol-global-market-overview.html> Em linha [Consulta 13 Maio 2015].

CANILHA, LARISSA – **Produção de xilitol no hidrolisado hemicelulósicos de palha de trigo.** Escola de engenharia de Lorena. 2006 <http://www.bib.unesc.net/biblioteca/sumario/00004F/00004F01.pdf> Em linha [Consulta 23 Abril 2015].

CARRERA BURNEO, SAMANTA MARÍA - **Efecto del xilitol en chicles para equilibrar el ph salival en niños de 7 a 10 años.** Facultad de Ciencias de la Salud, UDLA. 2014.

CHENG, K.K.; ZHANG, J.A.; LING, H.Z.; PING, W.X.; HUANG, W.; GE, J.P.; XU, J.M. **Optimization of pH and acetic acid concentration for bioconversion of hemicellulose from corncobs to xylitol by Candida tropicalis.** Biochem. Eng. J. 2009.

COLLINS H. CAROL – **Pilares da Cromatografia: I. Michael Tswett e o “nascimento” da Cromatografia.** Scientia Chromatographica v1,n1 Campinas, 2009 <http://www.scientiachromatographica.com/files/v1n1/v1n1a1.pdf> Em linha [Consulta 30 Abril 2015]

CUEVAS, MANUEL; QUEROA MATEO, SOLEDAD; HODAIFA, GASSAN; LÓPEZ MOYA, ALBERTO J.; SÁNCHEZ, SEBASTIAN - **Furfural removal from liquid effluents by adsorption onto commercial activated carbon in a batch heterogeneous reactor.** ScienceDirect, 2014.

DAVIDSON W., MICHAEL – **Plant Cell Wall.** Molecular Expressions. Janeiro, 2005. Em linha [consulta 20 Maio 2015] <http://micro.magnet.fsu.edu/cells/plants/cellwall.html>

DE SOUSA CRESPO, ANA MARTA – **A importância do xilitol na Prevenção da Cárie Dentária.** Universidade Fernando Pessoa. Porto 2014

DEGANI G. ANA LUIZA; CASS B. QUEZIA; VIEIRA C. PAULO – **Cromatografia: Um breve ensaio.** Atualidades em Química. Maio 1998. <http://qnesc.sbq.org.br/online/qnesc07/atual.pdf> Em linha [Consulta 30 Abril 2015]

DOMINGUEZ, J.M.; CAO, N.; GONG, C.S.; TSAO, G.T. **Dilute acid hemicellulosic hydrolysates from corn cobs for xylitol production by yeast.** Bioresource Technol. 1997.

DOUGLAS, FREDERIC - **GC / MS Análise.** Scientific Testimony, an Online Journal 2012. <http://www.scientific.org/tutorials/articles/gcms.html> Em linha [Consulta 30 Abril 2015].

DUARTE OLIVEIRA DE, JASON; GARCIA, JOÃO CARLOS; MIRANDA, RUBENS AUGUSTO DE - **Cultivo do Milho, Economia da Produção.** EMBRAPA Milho e Sorgo Sistema de Produção, 1. ISSN 1679-012X Versão Eletrônica - 7ª edição Set./2011.

EWING, GALEN WOOD – **Métodos instrumentais de análise química, volume II**. Editora Edgard Blucher LTDA. São Paulo, 1972.

EYLEN VAN, DAVID; DONGEN VAN, FEMKE; KABEL MIRJAM; BONT DE, JAN - **Corn fiber, cobs and stover: Enzyme-aided saccharification and co-fermentation after dilute acid pretreatment**. Bioresource Technology 5995-6004 Elsevier, 2011.

FERREIRA, VITOR FRANCISCO; DA ROCHA, DAVID RODRIGUES; DA SILVA FERNANDO DE CARVALHO - **Potencialidades e oportunidades na química da sacarose e outros açúcares**. Quím. Nova vol.32 no.3 São Paulo 2009, ISSN 0100-4042 http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422009000300007 Em linha [Consulta 9 Abril 2015].

GONÇALVES BORGES DE SOUSA, ELANY - **Aspetos gerais do xilitol e sua aplicação na saúde humana**. Universidade Federal do Piauí, 2012.

KOOPMANS, AUKE; KOPPEJAN, JAAP - **Agricultural and forest residues: generation, utilization and availability**. Wood energy conservation specialists regional wood energy development programme in Asia, FAO. Malaysia, Janeiro 1997 <http://www.fao.org/docrep/006/AD576E/ad576e00.pdf> in linha [Consulta 12 Maio 2015].

KREMER DE OLIVEIRA, TATIANA - **Resinas de Troca Iônica**. Kurita Nov/2007 http://www.kurita.com.br/adm/download/Resinas_de_Troca_Ionica.pdf Em linha [Consulta 24 Abril 2015].

KUHAD, CHANDER RAMESH; GUPTA, RISHI; KHASA PAL, YOGENDER; SINGH, AJAY; ZHANG, PERCIVAL Y.-H. - **Bioethanol production from pentose sugars: Current status and future prospects**. Renewable and Sustainable Energy Reviews 4950– 4962. SciVerse, ScienceDirect 2011.

LE WANG, DAPENG WUB, PINGWAH TANG, XIAOGUANG FAN, QIPENG YUAN - **Xylitol production from corncob hydrolysate using polyurethane foam with immobilized Candida tropicalis**. ScienceDirect Carbohydrate Polymers 90 (2012) 1106– 1113.

LENGOWSKI, CRISTINA ELAINE; MUNIZ BOLZON DE, GRACIELA INES; NISGOSKI, SILVANA; MAGALHÃES ESTEVES, LUIZ WASGHINGTON - **Avaliação de métodos de obtenção de celulose com diferentes graus de cristalinidade**. Scientia Forestalis, v. 41, n. 98, p. 185-194, jun. 2013 <http://www.ipef.br/publicacoes/scientia/nr98/cap04.pdf> Em linha [Consulta 19 junho 2015].

LERAYER, ALDA; VILLAR, ANTONIO CELSO; MARQUES, DÉBORA; ET AL - **Guia do milho: Tecnologia do campo á mesa**. CIB, Julho 2006 http://www.cib.org.br/pdf/guia_do_milho_CIB.pdf Em linha [Consulta 08 Maio 2015].

LOCHMULLER, CHARLES H. - **Chemical Instrumentation: A Systematic Approach to Instrumental analysis, Second Edition**. Addison-Wesley Publishing Company. 1973 ISBN 0-201-07301-3.

MAGALHÃES, ISABEL; ANDRADE, SERAFIM; LOPES, JOÃO – **Experimentação Realizada na Cultura do Milho no Baixo Mondego**; Direção regional de Agricultura da Beira Litoral. Coimbra 2000 ISSN: 087-301 X.

MAGALHÃES, PAULO CÉSAR; DURÃES M., FREDERICO O. ; CARNEIRO PORTILHO, NEWTON; PAIVA, EDILSON - **Fisiologia do Milho**. Embrapa, Sete Lagoas dezembro 2002. ISSN 1679-1150.

MÄKINEN, KAUKO K. - **History, Safety, and Dental Properties of Xylitol**. Institute of Dentistry, University of Turku; Finland, 2000.

MARTINES UTRERA, MARCO ANTONIO; DAVOLOS, MARIAN ROSALY; JÚNIOR JAFELICCI MIGUEL - **O efeito do ultrassom em reações químicas**. Instituto de Química - Universidade Estadual Paulista – UNESP; ISSN 0100-4042 Quím. Nova vol.23 n.2 São Paulo Mar./Apr. 2000. - http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422000000200017 Em linha [Consulta 28 Março 2015].

MEYER BERNARD S.; ANDERSON DONALD B.; BOHNING RICHARD H.;FRATIANNE DOUGLAS G. - **Introdução Á Fisiologia Vegetal**. Fundação Calouste Gulbenkian, 2ª edição, Lisboa 1973. Pg. 342-359

Mohamad, N. L.; Kamal Mustapa, S. M.; Mokhtar M. N. - **Xylitol Biological Production: A Review of Recent Studies**. Food Reviews International, 2015 <http://dx.doi.org/10.1080/87559129.2014.961077> Em linha [Consulta 12 julho 2015].

MOUTTA, OLIVEIRA RONDINELE – **Hidrólise ácida de palha da cana-de-açúcar para obtenção de hidrolizado hemicelulósicos visando a utilização em processos de produção de bioetanol**. SP 2009

MUKHIN,M.L.;BRAZHNIKOV V.V.- **Gas Chromatography and space Research**. SenceDirect, Dezembro 1971.

MUSSATTO, SOLANGE INES; ROBERTO CONCEIÇÃO, DRA. INÊS - **Una Gran Alternativa en el Mercado de Edulcorantes**. Departamento de Biotecnologia. Faculdade de Engenharia Química de Lorena. São Paulo, 2004.

MUSSATTO, SOLANGE INES; ROBERTO CONCEIÇÃO, DRA. INÊS - **Xilitol: edulcorante com efeitos benéficos para a saúde humana**. Rev. Bras. Cienc. Farm. vol.38 no.4 São Paulo Oct./Dec. 2002; ISSN 1516-9332 http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1516-93322002000400003&script=sci_arttext Em linha [Consulta 23 Abril 2015].

NCGA - **World of corn**. 2015

<http://www.ncga.com/upload/files/documents/pdf/publications/WOC-2015.pdf> [Consulta 19 de junho 2015].

OGEDA, THAIS LUCY; PETRI, DENISE F. S. - **Hidrólise Enzimática de Biomassa**. Quím. Nova vol.33 no.7 São Paulo 2010. ISSN 0100-4042 http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422010000700023 Em linha [Consulta 14 Maio 2015]

OLIVEIRA VAZ, J.M. – **O Milho**. Clássica Editora, Lisboa 1984.

PACHECO, S.; BORGUINI, R. G.; SANTIAGO, M. C. P. A.; NASCIMENTO, L. S. M.; GODOY, R. L. O.- **História da Cromatografia Líquida**. Rev. Virtual Quim., 2015. ISSN 1984-6835.

PAROJÓ, J. C.; DOMINGUEZ, H.; DOMINGUEZ, J. M.- **Biotechnological production of xylitol. Part 1" interest of xylitol and fundamentals of its biosynthesis**. Bioresource Technology, 1998.

PEREIRA AFF; SILVA TC; CALDANA ML; MACHADO MAAM; BUZALAF MAR - **Literature Review: Use of Xylitol for Prevention of Acute Otitis Media**. Int. Arch. Otorhinolaryngol. 2009;13(1):87-92
http://www.arquivosdeorl.org.br/conteudo/acervo_port.asp?id=594 Em linha [Consulta 23 Abril 2015].

PEREIRA JR., NEI; MARIA COUTO, ANTONIETA PEIXOTO G. ; SANTA ANNA, LÍDIA MARIA MELO - **biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production within the context of biorefinery**. Series on biotechnology, 1st. edition Rio de Janeiro, 2008. <http://www.ladebio.org.br/download/series-em-biotecnologia-vol-ii-lignocellulosic-biomass.pdf> Em linha [Consulta 8 Abril 2015].

POMBEIRO O. LATOURRTE, ARMANDO J.- **Técnicas e operações unitárias em química Laboratorial**. Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa, 1980.

POTTERS, GEERT; PH.D.; GOETHEM VAN, DAVINA; M.SC.; SCHUTTE, FRANCES, - **Promising Biofuel Resources: Lignocellulose and Algae**. Nature Education, (Scitable) 2010. <http://www.nature.com/scitable/topicpage/promising-biofuel-resources-lignocellulose-and-algae-14255919> Em linha [Consulta 23 Abril 2015].

R. SREENIVAS RAO , CH. PAVANA JYOTHI , R.S. PRAKASHAM ,P.N. SARMA , L. VENKATESWAR RAO - **Xylitol production from corn fiber and sugarcane bagasse hydrolysates by Candida tropicalis**. ScienceDirect, Bioresource Technology 97 (2006) 1974–1978.

RIPADO BENTO, MÁRIO F.- **O milho Variedades, Cultura, Produção**; publicações Europa-América LDA 1994. ISBN 972-1-037206.

ROMERO GARCÍA AIDA SUSANA - **Instituto de biotecnologia, unam cromatografia. 2012** <http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/Cromatografia.pdf> Em linha [Consulta 30 Abril 2015].