



Escola de Ciências e Tecnologia

Departamento de Química

**VALORIZAÇÃO DA BIOMASSA LENHOCELULÓSICA:
ESTUDO DE SACARIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DE RESÍDUOS
DE BAGAÇO DE AZEITONA**

Susana Alexandra Carapinha Sengo

Dissertação apresentada na
Universidade de Évora para obtenção
do Grau de Mestre em Bioquímica

**Orientador: Professor Doutor Pedro Miguel
Lopes Lourenço**

**Co-orientadora: Professora Doutora Ana
Teresa Fialho Caeiro Caldeira Rodrigues Palma**

Évora, Abril de 2011

Universidade de Évora

Escola de Ciências e Tecnologia

Departamento de Química

**VALORIZAÇÃO DA BIOMASSA LENHOCELULÓSICA:
ESTUDO DE SACARIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DE RESÍDUOS DE
BAGAÇO DE AZEITONA**

Susana Alexandra Carapinha Sengo

Dissertação apresentada na Universidade de Évora para obtenção do Grau de Mestre
em Bioquímica

Orientador: Professor Doutor Pedro Miguel Lopes Lourenço

Co-orientadora: Professora Doutora Ana Teresa Fialho Caeiro Caldeira Rodrigues Palma

Agradecimentos

Ao meu orientador Dr. Pedro Lourenço agradeço a disponibilidade, ajuda e orientação demonstradas no decorrer do trabalho.

À minha co-orientadora Dra. Ana Teresa Caldeira agradeço toda a ajuda, disponibilidade, incentivo e apoio prestados.

À Dra. Maria Conceição Fernandes agradeço toda a ajuda, disponibilidade, paciência, incentivo e orientação manifestados ao longo de todo o trabalho, sem os quais não teria sido possível a elaboração da dissertação.

À Cátia Salvador agradeço a disponibilidade e apoio prestados no laboratório.

À Patrícia Ramos o meu muito obrigada pelo incentivo, apoio e tempo dispendidos no laboratório.

À Ângela Guerra agradeço todo o incentivo e paciência para ouvir os meus desabafos nas alturas de menor motivação.

Ao CEBAL agradeço a oportunidade que me foi dada para a realização do estágio no seu laboratório.

Aos meus pais e ao meu irmão agradeço por me terem aturado sempre em todos os momentos de desânimo, stress e mau humor.

Aos meus familiares e amigos que sempre tiveram uma palavra de incentivo.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização desta dissertação.

Este trabalho foi realizado no âmbito do Projecto RefinOlea - Valorização integrada de resíduos e sub-produtos da extracção de azeite, financiado pelo SIIDT - QREN sob o contrato 5450.

Índice geral

	Pág.
Resumo	01
Abstract	02
1. Problemática	03
2. Objectivos	03
2.1. Objectivo geral	03
2.2. Objectivos específicos	03
3. Metodologia	04
4. Revisão monográfica	05
4.1. A produção de azeite e seus resíduos em Portugal	05
4.2. O conceito da biorrefinaria	07
4.2.1. A importância do Bioetanol	09
4.2.2. Produção de bioetanol lenhocelulósico	10
4.3. Biomassa lenhocelulósica	11
4.3.1. Bagaço de azeitona extractado como biomassa lenhocelulósica	13
4.4. Pré-tratamento do material lenhocelulósico	15
4.5. Hidrólise enzimática	16
4.6. Celulases	16
4.6.1. História	17
4.6.2. Modo de acção	18
5. Materiais e métodos	21
5.1. Caracterização do consórcio enzimático das celulases	21
5.1.1. Enzima	21
5.1.2. Determinação do peso molecular	21
5.1.3. Determinação da actividade do consórcio das celulases sobre papel de filtro	23
5.1.4. Determinação da actividade da Endoglucanase sobre carboximetilcelulose	23
5.1.5. Determinação da actividade da Celobiase	23
5.2. Caracterização do material lenhocelulósico	24

5.3. Estudo do efeito da água de lavagem do resíduo do bagaço de azeitona submetido a tratamento hidrotérmico a 50% e 100% sobre a actividade enzimática das celulasas	25
5.4. Ensaios de sacarificação do resíduo de bagaço de azeitona extractado pré-tratado	26
5.5. Métodos analíticos	27
5.5.1. Determinação das concentrações de glucose, celobiose e xilose por RI-HPLC	27
5.5.2. Determinação da concentração de glúcidos redutores pelo método do DNS	27
5.6. Validação estatística dos resultados	28
6. Resultados e discussão	29
6.1. Caracterização do consórcio enzimático das celulasas	29
6.1.1. Determinação da actividade do consórcio das celulasas sobre o papel de filtro	32
6.1.2. Determinação da actividade da Endoglucanase sobre carboximetilcelulose	33
6.1.3. Determinação da actividade da Celobiase	34
6.2. Caracterização das águas de lavagem e do material lenhocelulósico	35
6.3. Estudo do efeito da água de lavagem do resíduo do bagaço de azeitona a 50% e 100% na actividade enzimática das celulasas	36
6.4. Ensaios de sacarificação do resíduo de bagaço de azeitona extractado pré-tratado	50
7. Conclusões	56
8. Referências bibliográficas	57
ANEXOS	62
A1. Curvas de calibração	62
A2. Cromatogramas	67
A3. Determinação da actividade do consórcio das celulasas sobre papel de filtro	71
A4. Determinação da actividade da Endoglucanase sobre carboximetilcelulose	72
A5. Determinação da actividade da Celobiase	72
A6. Estudo do efeito da água de lavagem do resíduo do bagaço de azeitona a 50% e 100% na actividade enzimática das celulasas	73
A7. Ensaios de sacarificação do resíduo de bagaço de azeitona extractado pré-tratado	78
A8. Tratamento estatístico	82

Índice de figuras

	Pág.
Figura 1: Esquema representativo do tratamento a que o bagaço húmido é sujeito até lhe ser extraído o óleo remanescente, obtendo-se um bagaço extractado final.	06
Figura 2: Representação do processo e dos produtos de uma Biorrefinaria de Biomassa Lenhocelulósica.	08
Figura 3: Formação da cadeia de celulose pela união de unidades de D-glucose	11
Figura 4: Álcoois precursores das unidades fenilpropanóides guaiacilo (G), siringilo (S) e <i>p</i> -hidroxifenilo (H).	12
Figura 5: Estrutura molecular da lenhina onde se pode observar as diferentes ligações entre as unidades fenilpropanóides	13
Figura 6: Estruturas químicas do hidroxitirosol (a) e da oleuropeína (b).	14
Figura 7: Degradação da estrutura amorfa da celulose em oligossacáridos de menor grau de polimerização por acção da endoglucanase.	18
Figura 8: Degradação da celulose em celobiose por acção da celobio-hidrolase.	19
Figura 9: degradação da celobiose em glucose por acção da β -glucosidade.	19
Figura 10: Degradação enzimática da celulose em glucose. CBH I actua nas extremidades reductoras; CBH II actua nas extremidades não-reductoras; EG hidrolisa as ligações internas; β G cliva o dissacárido celobiose em glucose.	20
Figura 11: Reacção dos glúcidos reductores com o ácido 3,5–dinitrosalicílico.	27
Figura 12: Gel de electroforese em condições não-desnaturantes (PAGE-Nativa) das amostras de celulase com duas diluições diferentes e dos padrões utilizados na construção da curva de calibração das proteínas.	30
Figura 13: Cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular – SEC-UV-RI-HPLC. Cromatograma no UV de amostras da celulase.	30
Figura 14: Representações gráficas de $\log(1/dil)$ em função da massa de glúcidos reductores formados pela acção do enzima celulase, para determinação da sua actividade sobre papel de filtro. Determinou-se a actividade total do enzima várias vezes ao longo do tempo. Os valores representam a média \pm desvio padrão ($n=2$).	32
Figura 15: Representação gráfica de $\log(1/dil)$ em função da massa de glucose formada pela acção do complexo da celulase, para determinação da actividade da endoglucanase sobre carboximetilcelulose. Os valores representam a média \pm desvio padrão ($n=2$).	33
Figura 16: Representação gráfica de $\log(1/dil)$ em função da massa de glucose formada pela acção do complexo da celulase, para determinação da actividade da celobiase sobre celobiose. Os valores representam a média \pm desvio padrão ($n=2$).	34
Figura 17: Representação gráfica da formação de glúcidos reductores ao longo de 72h de incubação da celulase 30 FPU/g substrato com 0, 50 e 100% de água de lavagem do resíduo. Os valores representam a média \pm desvio padrão ($n=3$; para t24 $n=2$). A quantificação foi obtida pelo método do DNS.	36
Figura 18: Representação gráfica da formação de glucose ao longo de 72h de incubação da celulase 30 FPU/g substrato com 0, 50 e 100% de água de lavagem do resíduo. Os valores representam a média \pm desvio padrão ($n=3$; para t24 $n=2$). A quantificação foi obtida por RI-HPLC.	37

- Figura 19:** Representação gráfica dos rendimentos de produção de glucose após 72h de incubação com celulase 30 FPU/g substrato, para cada concentração de água de lavagem. Os valores representam a média \pm desvio padrão (n=3). 0%, 50% e 100% referem-se às concentrações de água de lavagem. As letras diferentes representam diferenças de médias entre as amostras para $p < 0,05$. 38
- Figura 20:** Representação gráfica da concentração de glucose e glúcidos redutores após 72h de incubação com celulase 30 FPU/g substrato, para cada concentração de água de lavagem. Os valores representam a média \pm desvio padrão (n=3). 0%, 50% e 100% referem-se às concentrações de água de lavagem. As letras diferentes representam diferenças de médias entre as amostras para $p < 0,05$. 39
- Figura 21:** Representação gráfica da formação de glucose ao longo de 72h de incubação da celulase 15 FPU/g substrato com 0, 50 e 100% de água de lavagem do resíduo. Os valores representam a média \pm desvio padrão (n=3). A quantificação foi obtida por RI-HPLC. 40
- Figura 22:** Representação gráfica da formação de celobiose ao longo de 72h de incubação da celulase 15 FPU/g substrato com 0, 50 e 100% de água de lavagem do resíduo. Os valores representam a média \pm desvio padrão (n=3). A quantificação foi obtida por RI-HPLC. 40
- Figura 23:** Representação gráfica da formação de glúcidos redutores ao longo de 72h de incubação da celulase 15 FPU/g substrato com 0, 50 e 100% de água de lavagem do resíduo. Os valores representam a média \pm desvio padrão (n=3). A quantificação foi obtida pelo método do DNS. 41
- Figura 24:** Representação gráfica dos rendimentos de produção de glucose e celobiose após 72h de incubação com celulase 15 FPU/g substrato, para cada concentração de água de lavagem. Os valores representam a média \pm desvio padrão (n=3). 0%, 50% e 100% referem-se às concentrações de água de lavagem. As letras diferentes representam diferenças de médias entre as amostras para $p < 0,05$. 42
- Figura 25:** Representação gráfica da concentração glucose, glúcidos redutores e celobiose após 72h de incubação com celulase 15 FPU/g substrato, para cada concentração de água de lavagem. Os valores representam a média \pm desvio padrão (n=3). 0%, 50% e 100% referem-se às concentrações de água de lavagem. As letras diferentes representam diferenças de médias entre as amostras para $p < 0,05$. 43
- Figura 26:** Representação gráfica da formação de glucose ao longo de 72h de incubação da celulase 7,5 FPU/g substrato com 0, 50 e 100% de água de lavagem do resíduo. Os valores representam a média \pm desvio padrão (n=3). A quantificação foi obtida por RI-HPLC. 44
- Figura 27:** Representação gráfica da formação de celobiose ao longo de 72h de incubação da celulase 7,5 FPU/g substrato com 0, 50 e 100% de água de lavagem do resíduo. Os valores representam a média \pm desvio padrão (n=3). A quantificação foi obtida por RI-HPLC. 44
- Figura 28:** Representação gráfica da formação de glúcidos redutores ao longo de 72h de incubação da celulase 7,5 FPU/g substrato com 0, 50 e 100% de água de lavagem do resíduo. Os valores representam a média \pm desvio padrão (n=3). A quantificação foi obtida pelo método do DNS. 45
- Figura 29:** Representação gráfica dos rendimentos de produção de glucose e celobiose após 72h de incubação com celulase 7,5 FPU/g substrato, para cada concentração de água de lavagem. 0%, 50% e 100% referem-se às concentrações de água de lavagem. As letras diferentes representam diferenças de médias entre as amostras para $p < 0,05$. 46
- Figura 30:** Representação gráfica da concentração de glucose, glúcidos redutores e celobiose após 72h de incubação com celulase 7,5 FPU/g substrato, para cada concentração de água de lavagem. Os valores representam a média \pm desvio padrão (n=3). 0%, 50% e 100% referem-se às concentrações de água de lavagem. As letras diferentes representam diferenças de médias entre as amostras para $p < 0,05$. 47

	Pág.
Figura 31: Representação gráfica das concentrações de glucose, celobiose, xilose e glúcidos redutores ao longo de 168h de incubação do bagaço de azeitona extractado pré-tratado não lavado (BAENL) com celulase 30 FPU/g celulose. Os valores representam a média \pm desvio padrão (n=2).	51
Figura 32: Representação gráfica das concentrações de glucose, celobiose, xilose e glúcidos redutores ao longo de 168h de incubação do bagaço de azeitona extractado pré-tratado não lavado (BAENL) com celulase 15 FPU/g celulose. Os valores representam a média \pm desvio padrão (n=2).	51
Figura 33: Representação gráfica das concentrações de glucose, celobiose, xilose e glúcidos redutores ao longo de 168h de incubação do bagaço de azeitona extractado pré-tratado lavado (BAEL) com celulase 30 FPU/g celulose. Os valores representam a média \pm desvio padrão (n=2).	53
Figura 34: Representação gráfica das concentrações de glucose, celobiose, xilose e glúcidos redutores ao longo de 168h de incubação do bagaço de azeitona extractado pré-tratado lavado (BAEL) com celulase 15 FPU/g celulose. Os valores representam a média \pm desvio padrão (n=2).	53
Figura 35: Representação gráfica dos rendimentos de produção de glucose após 168h de incubação do bagaço de azeitona extractado lavado (BAEL) e não lavado (BAENL) com celulase 15 e 30 FPU/g celulose. Os valores representam a média \pm desvio padrão (n=2).	54
Figura 36: Gel da electroforese PAGE-Nativa das amostras de celulase com duas diluições diferentes e dos padrões utilizados na construção da curva de calibração das proteínas.	62
Figura 37: Representação gráfica da curva de calibração das proteínas obtida por electroforese PAGE-Nativa.	62
Figura 38: Representação gráfica da curva de calibração das proteínas obtida por SEC-UV-RI-HPLC. Os valores representam a média \pm desvio padrão (n=3).	63
Figura 39: Curva de calibração dos glúcidos redutores referente ao método de DNS. Os valores representam a média \pm desvio padrão (n=2).	64
Figura 40: Curva de calibração da glucose obtida por RI-HPLC. Os valores representam a média \pm desvio padrão (n=5).	64
Figura 41: Curva de calibração da celobiose obtida por RI-HPLC. Os valores representam a média \pm desvio padrão (n=5).	65
Figura 42: Curva de calibração da xilose obtida por RI-HPLC.	66
Figura 43: Cromatograma obtido por RI-HPLC dos padrões glucose (Tr = 10,67 minutos) e celobiose (Tr = 9,11 minutos) para a construção da curva de calibração.	67
Figura 44: Cromatograma obtido por RI-HPLC de uma amostra após 72h de incubação com 30 FPU/g substrato de celulase com 0% de água de lavagem, em que é possível observar o pico correspondente à glucose (Tr = 10,65 minutos).	67
Figura 45: Cromatograma obtido por RI-HPLC de uma amostra após 72h de incubação com 30 FPU/g substrato de celulase na presença de 100% de água de lavagem do resíduo, em que é possível observar o pico correspondente à glucose (Tr = 10,66 minutos).	68
Figura 46: Cromatograma obtido por RI-HPLC de uma amostra após 72h de incubação com 15 FPU/g substrato de celulase na presença de 0% de água de lavagem do resíduo, em que é possível observar os picos correspondentes à glucose (Tr = 10,66 minutos) e à celobiose (Tr = 9,10 minutos).	68
Figura 47: Cromatograma obtido por RI-HPLC de uma amostra após 72h de incubação com 15 FPU/g substrato de celulase na presença de 100% de água de lavagem do resíduo, em que é possível observar os picos correspondentes à glucose (Tr = 10,65 minutos) e à celobiose (Tr = 9,10 minutos).	69

Figura 48: Cromatograma obtido por RI-HPLC de uma amostra após 72h de incubação com 7,5 FPU/g substrato de celulase na presença de 0% de água de lavagem do resíduo, em que é possível observar os picos correspondentes à glucose (Tr = 10,66 minutos) e à celobiose (Tr = 9,10 minutos).

69

Figura 49: Cromatograma obtido por RI-HPLC de uma amostra após 72h de incubação com 7,5 FPU/g substrato de celulase na presença de 100% de água de lavagem do resíduo, em que é possível observar os picos correspondentes à glucose (Tr = 10,64 minutos) e à celobiose (Tr = 9,08 minutos).

70

Índice de tabelas

	Pág.
Tabela 1: Composição dos géis de concentração e resolução (volumes correspondentes a dois géis)	21
Tabela 2: Preparação dos meios de reacção da celulase correspondentes a 30 FPU/g substrato para as concentrações de água de lavagem estudadas (Br. s/ enz: Branco sem enzima; Br. s/ p filtro: Branco sem papel de filtro; Br. Ág. Lav.: Branco Água Lavagem).	25
Tabela 3: Massas moleculares do consórcio da celulase obtidos com cada técnica utilizada.	31
Tabela 4: Valores obtidos de actividade total da celulase sobre papel de filtro, expressa em FPU/mL.	33
Tabela 5: Composição da água de lavagem do bagaço pré-tratado com auto-hidrólise a 205°C.	35
Tabela 6: Composição da fracção do bagaço utilizada nos ensaios de redução da actividade do enzima celulase.	35
Tabela 7: Percentagem da redução de sacarificação obtida nos ensaios após 72h de incubação em comparação com o ensaio controlo (0% água lavagem).	48
Tabela 8: Quantidade de potencial glucose em cada tipo de biomassa após a correcção com o teor de humidade de cada amostra.	50
Tabela 9: Registo dos pesos moleculares e respectiva mobilidade (Rf) para cada proteína usada na curva de calibração da electroforese PAGE-Nativa	62
Tabela 10: Registo dos pesos moleculares e respectivos tempos de retenção para cada proteína usada na curva de calibração obtida por SEC-UV-RI-HPLC.	63
Tabela 11: Valores de absorvância registados para a construção da curva de calibração dos glúcidos redutores pelo método do DNS.	63
Tabela 12: Valores de áreas registadas por RI-HPLC para a construção da curva de calibração da glucose.	64
Tabela 13: Valores de áreas registadas por RI-HPLC para a construção da curva de calibração da celobiose.	65
Tabela 14: Valores de áreas registadas por RI-HPLC para a construção da curva de calibração da xilose.	65
Tabela 15: Diluições de celulase utilizadas e respectivas massas de glúcidos redutores obtidas na determinação da actividade do enzima sobre papel de filtro (ensaio referente a Fevereiro).	71
Tabela 16: Diluições de celulase utilizadas e respectivas massas de glúcidos redutores obtidas na determinação da actividade do enzima sobre papel de filtro (ensaio referente a Junho).	71
Tabela 17: Diluições de celulase utilizadas e respectivas massas de glúcidos redutores obtidas na determinação da actividade do enzima sobre papel de filtro (ensaio referente a Julho).	71
Tabela 18: Diluições de celulase utilizadas e respectivas massas de glucose obtidas na determinação da actividade da endoglucanase sobre carboximetilcelulose.	72
Tabela 19: Diluições de celulase utilizadas e respectivas massas de glucose obtidas na determinação da actividade da celobiase sobre celobiose.	72
Tabela 20: Valores de concentrações de glúcidos redutores obtidas ao longo do tempo de incubação com celulase 30 FPU/g substrato para cada concentração de água de lavagem	73
Tabela 21: Valores de concentrações de glucose obtidas ao longo do tempo de incubação com celulase 30 FPU/g substrato para cada concentração de água de lavagem	73
Tabela 22: Valores de concentrações de glúcidos redutores obtidas ao longo do tempo de incubação com celulase 15 FPU/g substrato para cada concentração de água de lavagem	74

	Pág.
Tabela 23: Valores de concentrações de glucose obtidas ao longo do tempo de incubação com celulase 15 FPU/g substrato para cada concentração de água de lavagem	75
Tabela 24: Valores de concentrações de celobiose obtidas ao longo do tempo de incubação com celulase 15 FPU/g substrato para cada concentração de água de lavagem	75
Tabela 25: Valores de concentrações de glúcidos redutores obtidas ao longo do tempo de incubação com celulase 7,5 FPU/g substrato para cada concentração de água de lavagem	76
Tabela 26: Valores de concentrações de glucose obtidas ao longo do tempo de incubação com celulase 7,5 FPU/g substrato para cada concentração de água de lavagem.	76
Tabela 27: Valores de concentrações de celobiose obtidas ao longo do tempo de incubação com celulase 7,5 FPU/g substrato para cada concentração de água de lavagem.	77
Tabela 28: Concentrações de glucose, celobiose, xilose e glúcidos redutores obtidas ao longo das 168h de incubação do bagaço de azeitona extractado pré-tratado não lavado com celulase 15 FPU/g celulose	78
Tabela 29: Concentrações de glucose, celobiose, xilose e glúcidos redutores obtidas ao longo das 168h de incubação do bagaço de azeitona extractado pré-tratado não lavado com celulase 30 FPU/g celulose	79
Tabela 30: Concentrações de glucose, celobiose, xilose e glúcidos redutores obtidas ao longo das 168h de incubação do bagaço de azeitona extractado pré-tratado lavado com celulase 15 FPU/g celulose.	80
Tabela 31: Concentrações de glucose, celobiose, xilose e glúcidos redutores obtidas ao longo das 168h de incubação do bagaço de azeitona extractado pré-tratado lavado com celulase 30 FPU/g celulose.	81
Tabela 32: Análise de variância para as concentrações de glucose e glúcidos redutores, para uma concentração de celulase de 30 FPU/g substrato (nível de significância de 0,05).	82
Tabela 33: Comparações múltiplas para as concentrações de glucose e glúcidos redutores após 72h de incubação com celulase 30 FPU/g substrato para as concentrações de água de lavagem testadas.	82
Tabela 34: Análise de variância para as concentrações de glucose, celobiose e glúcidos redutores, para uma concentração de celulase de 15 FPU/g substrato (nível de significância de 0,05).	83
Tabela 35: Comparações múltiplas para as concentrações de glucose, celobiose e glúcidos redutores após 72h de incubação com celulase 15 FPU/g substrato para as concentrações de água de lavagem testadas.	84
Tabela 36: Análise de variância para as concentrações de glucose, celobiose e glúcidos redutores, para uma concentração de celulase de 7,5 FPU/g substrato (nível de significância de 0,05).	85
Tabela 37: Comparações múltiplas para as concentrações de glucose, celobiose e glúcidos redutores após 72h de incubação com celulase 7,5 FPU/g substrato para as concentrações de água de lavagem testadas.	86
Tabela 38: Análise de variância para os rendimentos de produção de glucose para uma concentração de celulase de 30 FPU/g substrato (nível de significância de 0,05).	87
Tabela 39: Comparações múltiplas para os rendimentos de produção de glucose com celulase 30 FPU/g substrato para as concentrações de água de lavagem testadas.	87
Tabela 40: Análise de variância para os rendimentos de produção de glucose e celobiose, para uma concentração de celulase de 15 FPU/g substrato (nível de significância de 0,05).	88

	Pág.
Tabela 42: Análise de variância para os rendimentos de produção de glucose e celobiose, para uma concentração de celulase de 7,5 FPU/g substrato (nível de significância de 0,05).	89
Tabela 43: Comparações múltiplas para os rendimentos de produção de glucose e celobiose com celulase 15 FPU/g substrato para as concentrações de água de lavagem testadas.	89

Abreviaturas

- BAE – Bagaço de azeitona extractado
BAEL – Bagaço de azeitona extractado lavado
BAENL – Bagaço de azeitona extractado não lavado
BBL – Biorrefinaria de Biomassa Lenhocelulósica
BG – β -Glucosidase
CB – Celobiase
CBH I – Celobio-hidrolase I
CBH II – Celobio-hidrolase II
CEBAL – Centro de Biotecnologia Agrícola e Agro-Alimentar do Baixo Alentejo e Litoral
CEC – Consórcio enzimático de celulases
CMC – Carboximetilcelulose
DNS – Ácido dinitrosalicílico
EGU – Endoglucanase units
EnG – Endoglucanase
ExG – Exoglucanase
FPU – Filter paper units
GEE – Gases de efeito de estufa
HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
kDa – quilodalton
LNEG – Laboratório Nacional de Energia e Geologia
Ppm – partes por milhão
RBA – Residuo de bagaço de azeitona
RI – Índice de refração
SEC – Cromatografia de Exclusão Molecular (Size Extraction Chromatography)
UCASUL – União de Cooperativas Agrícolas da Região do Sul
UV – Ultravioleta

Resumo

O resíduo de bagaço de azeitona é um material com características lenhocelulósicas disponível na região do Alentejo que poderá ser valorizado pela produção de etanol. No presente trabalho desenvolveu-se um estudo com a finalidade de averiguar a influência de compostos fenólicos presentes no bagaço de azeitona extractado e nas águas de lavagem após pré-tratamento, no processo de sacarificação da celulose pelo complexo enzimático Celluclast 1.5L. O consórcio de enzimas foi caracterizado quanto à massa molecular dos seus constituintes e quanto às suas actividades: total sobre papel de filtro, da endoglucanase e da celobiase. Realizaram-se ensaios com diferentes concentrações de água de lavagem e de enzima e verificou-se uma redução notória na actividade do complexo da celulase na presença de 100% de água de lavagem. Os ensaios com bagaço extractado revelaram uma menor actividade da celulase na conversão de celulose em glucose, em relação aos ensaios com papel de filtro, não se verificando diferenças significativas entre o bagaço lavado e o não lavado.

Abstract**Valorization of lignocellulosic biomass: Studies of enzymatic saccharification of olive pomace residues**

The olive pomace residue is a material with lignocellulosic features available in the Alentejo region which may be enhanced by the production of ethanol. In the present work a study was developed in order to investigate the influence of the phenolic compounds present in the extracted olive pomace and the water used in their washing after pre-treatment, in the saccharification process of cellulose by the enzymatic complex Celluclast 1.5L. This consortium was characterized in terms of molecular weight of its constituents and their activities: total on filter paper, endoglucanase and cellobiase. Assays were performed with different washing water and enzyme concentrations and an evident reduction in the activity of the cellulase complex in the presence of 100% of washing water was observed. Assays conducted with extracted pomace, revealed a lower cellulase activity in cellulose to glucose conversion comparing to filter paper assays, with no significant differences between washed and unwashed pomace.

1. Problemática

O resíduo de bagaço de azeitona (RBA) é um material com características lenhocelulósicas disponível na região do Alentejo que poderá ser valorizado pela produção de etanol, sendo essencial, neste contexto, a sacarificação da celulose. A utilização de enzimas celulolíticos tem-se revelado bastante atractiva na sacarificação de diversos materiais lenhocelulósicos, contudo, as características químicas previsíveis do RBA, nomeadamente a sua riqueza em fenóis, tornam este material algo diferente da maioria dos materiais que estão descritos na literatura como utilizáveis para esta finalidade, especialmente palhas e madeira. Tendo isto em perspectiva, foi elaborado um plano de trabalhos para averiguar a influência da fracção não-lenhocelulósica do RBA sobre a eficiência da sacarificação enzimática.

2. Objectivos

2.1. Objectivo geral:

- ✓ Estudo da sacarificação enzimática de resíduos de bagaço de azeitona no âmbito da valorização da biomassa lenhocelulósica

2.2. Objectivos específicos:

- ✓ Caracterizar o consórcio enzimático de celulasas (CEC) comercialmente disponível e normalmente utilizado na sacarificação de materiais lenhocelulósicos;
- ✓ Determinar a actividade do CEC;
- ✓ Estudar o efeito dos compostos fenólicos presentes nas águas de lavagem do resíduo de bagaço de azeitona na actividade do CEC;
- ✓ Estudar o efeito dos compostos fenólicos presentes no resíduo de bagaço de azeitona na actividade do CEC.

3. Metodologia

O presente trabalho foi desenvolvido na sua grande maioria no CEBAL – Centro de Biotecnologia Agrícola e Agro-Alimentar do Baixo Alentejo e Litoral – e uma parte no Laboratório de Biotecnologia da Universidade de Évora. As caracterizações do material lenhocelulósico e da respectiva água de lavagem utilizados nos ensaios de sacarificação foram efectuadas no LNEG – Laboratório Nacional de Energia e Geologia.

A sacarificação da celulose presente na fracção lenhocelulósica do resíduo de bagaço de azeitona e a respectiva interferência dos compostos existentes na fracção não-lenhocelulósica, foram estudadas através de ensaios enzimáticos utilizando celulasas. As celulasas comerciais utilizadas constituem um consórcio enzimático, tendo sido efectuados, numa primeira fase deste projecto, a sua caracterização, recorrendo às técnicas electroforética (PAGE Nativa) e cromatográfica (cromatografia líquida utilizando um sistema SEC-UV-RI-HPLC) e a um estudo das actividades dos enzimas que constituem o complexo enzimático. A actividade total das celulasas foi estudada por ensaios enzimáticos utilizando papel de filtro Whatman nº 1 (celulose pura) como substrato; a actividade da endoglucanase foi estudada usando a carboximetilcelulose como substrato. Nestes ensaios foi analisada a formação de glúcidos redutores por DNS. A actividade da celobiase foi também determinada usando celobiose como substrato e quantificando a formação de glucose por UV-RI-HPLC.

Posteriormente realizou-se, utilizando a mesma metodologia, um estudo da actividade dos enzimas com o mesmo substrato, na presença da água utilizada na lavagem do resíduo sólido de bagaço de azeitona, após este ter sido submetido a tratamento hidrotérmico a 205°C, tendo-se testado duas concentrações destas águas e três de enzima. Este estudo foi também estendido ao próprio material lenhocelulósico após tratamento hidrotérmico, tendo sido testadas duas concentrações de enzima. Os resultados destes ensaios enzimáticos foram analisados por espectrometria de absorção molecular UV-Vis (DNS) e UV-RI-HPLC, por quantificação dos produtos formados.

4. Revisão monográfica

4.1. A produção de azeite e seus resíduos em Portugal

Em Portugal, a oliveira é uma das culturas que maior superfície ocupa no território nacional, estando grande parte destas árvores vocacionada para a produção de azeitona para azeite.

A oliveira adapta-se a diversos tipos de solo, mas é muito sensível às condições meteorológicas, exigindo verões longos, quentes e secos, o que leva a que a produção de azeite sofra frequentes oscilações de ano para ano. As variedades de azeitona com aptidão para azeite dominantes nos novos olivais são: na região do Alentejo a Cobrançosa e a Arbequina; e na região de Trás-os-Montes a Madural, a Verdeal Trasmontana e a Cobrançosa (Curinha, 2008).

Em 2009, segundo o Instituto Nacional de Estatística, Portugal apresentava uma superfície de olival de 375 590 hectares e uma produção de azeite de 681 850 hectolitros. A maior área destinada ao olival localiza-se na região do Alentejo, seguida de Trás-os-Montes, Beira Interior e Ribatejo e Oeste. Em particular no Alentejo, em 2008 foram produzidas 146 151 toneladas de azeitona destinadas à produção de azeite e 265 232 hectolitros de azeite. O número de lagares em laboração diminuiu substancialmente. Em 1987 existiam 1209 e na campanha de 1991/92 laboraram 1422. No período 1997-2005 assistiu-se a uma redução, passando de 1073 lagares para 616 na campanha de 2004/2005 (Diagnóstico Sectorial, Olivicultura, 2007).

Os investimentos nos lagares realizados nos últimos anos consistiram basicamente na remodelação dos seus equipamentos de recepção de azeitona, extracção e armazenagem de azeite. A implementação do processo de centrifugação em duas fases (sem adição externa de água) para a extracção do azeite reduziu substancialmente o consumo de água (Alba; 1994). Contudo, é gerado um resíduo denominado bagaço de azeitona, que é uma combinação de resíduos sólidos e líquidos de azeitona. Estes resíduos altamente poluentes contêm a polpa, um alto teor de humidade e pedaços de pele e caroço de azeitona e são uma desvantagem para o desenvolvimento e crescimento desta indústria (Ballesteros *et al*, 2002; Roig *et al*, 2005). O bagaço húmido dos sistemas de duas fases, praticamente não tem valor comercial, dadas as suas características de humidade e viscosidade que tornam difícil o seu transporte, armazenagem e secagem. Tendo em vista a sua utilização como subproduto torna-se necessário proceder a uma pré-secagem (Diagnóstico Sectorial, Olivicultura, 2007).

É nas regiões do Alentejo e Trás-os-Montes que a problemática destes bagaços húmidos se fez sentir com maior incidência dada a relevância do azeite obtido em sistemas de duas fases. No Alentejo entrou em funcionamento em 2001 uma grande unidade de secagem (propriedade da UCASUL – União de Cooperativas do Sul, CRL) que processa os bagaços húmidos produzidos na região, quer para os secar, quer para extrair óleo (o bagaço tratado é usado como combustível no processo de secagem deste sub-produto) (Diagnóstico Sectorial, Olivicultura, 2007).

Nesta unidade industrial o bagaço é descarregado em lagoas de recepção, onde fica armazenado até ser submetido a um processo de secagem em grandes secadores cilíndricos rotativos, colocados horizontalmente. Quando é atingida uma percentagem de humidade de aproximadamente 8%, o bagaço é levado até um equipamento especial em que o óleo aí contido é recuperado utilizando solventes químicos, geralmente hexano. Em seguida a mistura solvente e o óleo de bagaço é submetida a um processo de destilação, conseguindo-se a separação do óleo de bagaço do solvente hexano, podendo este último ser novamente reutilizado no processo (figura 1). Este processo de extracção origina, por sua vez, um subproduto o bagaço de azeitona extractado, que é frequentemente utilizado como combustível, devido ao seu elevado poder calorífico (Curinha, 2008).



Figura 1: Esquema representativo do tratamento a que o bagaço húmido é sujeito até lhe ser extraído o óleo remanescente, obtendo-se um bagaço extractado final.

4.2. O conceito da biorrefinaria

Utilizar a biomassa como matéria-prima para a produção de vários produtos utilizando métodos de processamento complexos, à semelhança de uma refinaria de petróleo em que os combustíveis fósseis são usados como *input*, é um conceito que, não sendo completamente novo, tem vindo a ser considerado. A biomassa é constituída por glúcidos, lenhina, proteínas e composto extractivos, como por exemplo, os fenóis. O objectivo de uma biorrefinaria é transformar esses materiais biológicos encontrados em abundância em produtos úteis, usando uma combinação de tecnologias e processos (Fernando *et al*, 2006).

Pretende-se com uma biorrefinaria a obtenção de produtos de pequeno-volume e alto-valor e de produtos de grande-volume e baixo-valor, através de uma série de operações unitárias. Estas operações são projectadas para maximizar os valorizados extraíveis, minimizando os fluxos de resíduos por conversão dos produtos intermediários de grande-volume e baixo-valor em energia. Os produtos de alto-valor aumentam a rentabilidade, enquanto os combustíveis de grande-volume ajudam a responder à procura global de energia. A energia produzida a partir de uma biorrefinaria também ajuda a reduzir o custo global. Em contraste com uma refinaria de petróleo, uma biorrefinaria usa os recursos renováveis e produz combustíveis e produtos químicos que contribuem menos para a poluição ambiental (Tyson *et al*, 2005).

Existem vários tipos de biorrefinarias, de entre elas a Biorrefinaria de Biomassa Lenhocelulósica (BBL) que, como o nome indica, utiliza como matéria-prima o material lenhocelulósico (Tyson *et al*, 2005). A BBL utiliza, entre outros, materiais vegetais fibrosos gerados a partir de resíduos municipais ou de madeira (figura 2). Inicialmente, o material vegetal é limpo e dividido nas suas três fracções principais: hemicelulose, celulose e lenhina, através da digestão química ou hidrólise enzimática. A lenhina nos materiais vegetais pode ser convertida pela acção de enzimas, como lenhinasas, peroxidases da lenhina, lacases e enzimas xilanolíticas. Os polímeros de celulose e hemicelulose são convertidos nos seus componentes glúcidos por meio de hidrólise (Figura 2).

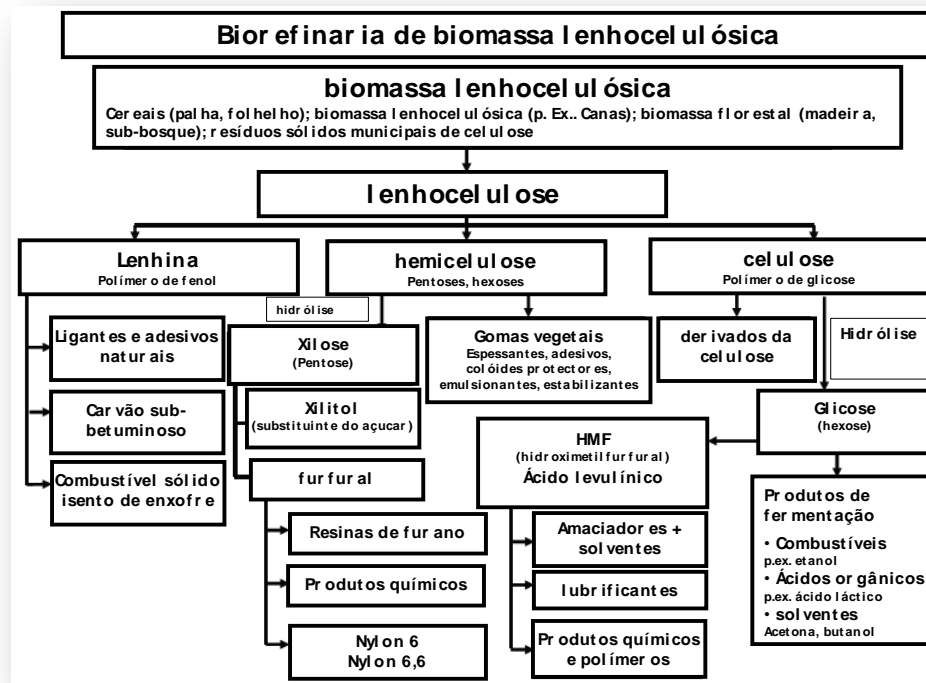
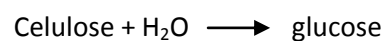
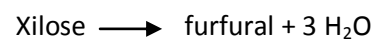
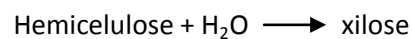


Figura 2: Representação do processo e dos produtos de uma Biorrefinaria de Biomassa Lenhocelulósica. (adaptado de Kamm *et al*, 2004)

Os seguintes processos químicos fornecem uma visão geral das transformações que ocorrem numa Biorrefinaria de Biomassa Lenhocelulósica.



A fracção de xilose da hemicelulose é importante uma vez que pode ser convertida em xilitol e em furfural, que é uma das matérias-primas para a produção de nylon 6 (Kamm *et al*, 2004). Além disso, o furfural tem muitas outras aplicações: pode ser usado na refinação de óleos para motores, como precursor de certos plásticos e como agente de limpeza em combustíveis líquidos.

A hidrólise da celulose pode ser realizada por processos enzimáticos ou químicos (Dyne *et al*, 1999) e os seus produtos, nomeadamente a glucose, podem ser convertidos em

compostos úteis, como o etanol, o ácido acético, a acetona, o butanol, o ácido succínico e outros produtos de fermentação. Ao contrário da hemicelulose e da celulose que apresentam numerosos aproveitamentos, a lenhina tem um uso limitado como adesivo ou ligante e como combustível para queima directa (Fernando *et al*, 2006).

4.2.1. A importância do Bioetanol

Durante os últimos 150 anos, as actividades humanas têm causado um aumento na emissão de vários gases de efeito estufa, por exemplo o CO₂, o que levou a mudanças no equilíbrio da atmosfera da Terra. O conteúdo de CO₂ na atmosfera aumentou de 280 ppm para 365 ppm durante este período de tempo.

O interesse na produção de substituintes de combustíveis fósseis é comum em muitos países em todo o mundo. A preocupação é reduzir a poluição e ajudar a satisfazer o protocolo de Quioto, estabelecido em 1997, limitando a emissão global de dióxido de carbono. Para assegurar a concretização dos objectivos a União Europeia estabeleceu, há já alguns anos, uma meta para 2010 de incorporação de 5,75% (em conteúdo energético) de biocombustíveis líquidos e, mais recentemente, uma incorporação obrigatória de 10% em 2020 (Avillez *et al*, 2009; Galbe *et al*, 2002).

São fundamentalmente três os objectivos que se pretendem ver atingidos na União Europeia com a utilização dos biocombustíveis líquidos como substitutos dos combustíveis convencionais (Avillez *et al*, 2009):

- a contribuição para o combate ao aquecimento global, através da redução das emissões de gases com efeitos de estufa (GEE);
- o aumento da segurança energética, através da diversificação das fontes energéticas e da redução da respectiva dependência;
- a promoção do desenvolvimento rural, através do reforço e diversificação do tecido económico e social das zonas rurais.

O Governo Português decidiu, no contexto das orientações consideradas necessárias para o cumprimento do protocolo de Quioto, uma antecipação para 2010 da taxa de incorporação de 10% em volume de biocombustíveis líquidos (Avillez *et al*, 2009).

Uma forma de reduzir os efeitos ambientais e a dependência dos combustíveis fósseis é a utilização de etanol produzido a partir de biomassa (bioetanol). Para além de uma emissão muito baixa de CO₂ para a atmosfera, a queima do bioetanol geralmente resulta na emissão de

baixos níveis de hidrocarbonetos não queimados, monóxido de carbono (CO), óxidos de azoto e compostos orgânicos voláteis (Bailey 1996; Wyman, 1996).

O etanol como combustível tem um vasto aproveitamento, no entanto, a sua maior utilização, hoje em dia, é como aditivo oxigenado de combustível (Wheals *et al* 1999). A mistura de etanol e gasolina tem várias vantagens, como o aumento do índice de octanas da mistura, o que reduz a necessidade de aditivos para aumentar a octanagem.

A nível mundial a produção de bioetanol no ano de 2010 foi de aproximadamente 52 milhões de m³ na América do Norte e Central, 27 milhões de m³ na América do Sul, em que o Brasil foi responsável pela produção de cerca de 26 milhões de m³ de bioetanol, e 4,5 milhões de m³ na União Europeia. O Brasil e os Estados Unidos são os maiores produtores de bioetanol, respectivamente, a partir de cana-de-açúcar e milho (Renewable Fuels Association).

De acordo com as estimativas disponíveis do consumo de gasolina e gasóleo em Portugal, uma incorporação de 10% em volume de biocombustíveis corresponde a cerca de 770 milhões de litros, dos quais 200 milhões de litros dizem respeito ao bioetanol necessário para substituir 10% da gasolina que se prevê vir a ser consumida em Portugal nos próximos anos (Avillez *et al*, 2009).

4.2.2. Produção de bioetanol lenhocelulósico

A produção de etanol a partir da biomassa lenhocelulósica apresenta as seguintes vantagens: potencial de reduzir em mais de 70% as emissões de CO₂, comparativamente à utilização da gasolina; a utilização de biomassa lenhocelulósica não compete em termos de uso do solo com a produção de alimentos e é sustentável do ponto de vista ambiental (Escária, 2008); a biomassa lenhocelulósica é o componente orgânico renovável mais abundante na biosfera, sendo responsável por aproximadamente 50% da biomassa em todo o mundo (Galbe *et al*, 2002); reduz significativamente o custo da matéria-prima através do uso de, por exemplo, resíduos agrícolas, florestais e outra biomassa de baixo custo (Sun *et al*, 2002).

A produção de bioetanol envolve três grandes processos, incluindo o pré-tratamento do material, a hidrólise enzimática e a fermentação. A hidrólise é geralmente catalisada por enzimas celulase, e a fermentação é realizada por leveduras ou bactérias.

Para se perceber um pouco melhor estes processos, é feita uma descrição resumida dos principais constituintes da biomassa lenhocelulósica.

4.3. Biomassa lenhocelulósica

A lenhocelulose, o principal componente da biomassa, representa cerca de metade da matéria produzida pelas plantas por fotossíntese. É composta por três tipos de polímeros - celulose, hemicelulose e lenhina - que estão fortemente entrelaçados e quimicamente ligados por forças não-covalentes e por ligações covalentes cruzadas. Uma grande variedade de fungos e bactérias podem fragmentar estas macromoléculas usando um conjunto de enzimas hidrolíticos e oxidativos (Pérez *et al*, 2002).

A celulose e a hemicelulose são macromoléculas de diferentes glúcidos, enquanto que a lenhina é um polímero aromático sintetizado a partir de precursores de fenilpropanóides. A composição e as percentagens desses polímeros variam com a espécie da planta, e na mesma planta variam com a idade, fase de crescimento e outras condições (Jeffries, 1994).

A celulose constitui cerca de 40% do peso do material lenhocelulósico. Este polímero linear é composto por moléculas de D-glucose unidas por ligações β -1, 4 glicosídicas (figura 3) formando moléculas de celobiose, que por sua vez formam longas cadeias (chamadas fibrilhas elementares), ligadas entre si por pontes de hidrogénio e forças de van der Waals. A hemicelulose e a lenhina cobrem as microfibrilhas (que são formadas por fibrilhas elementares). As microfibrilhas agrupam-se para constituir a fibra de celulose, que pode apresentar-se na forma cristalina, denominando-se celulose cristalina. No entanto, há uma pequena percentagem das cadeias não-organizadas de celulose, que formam a celulose amorfa. Nesta conformação, a celulose é mais susceptível à degradação enzimática (Béguin *et al*, 1994). A celulose aparece na natureza associada a outras substâncias da planta, o que pode afectar a sua biodegradação.

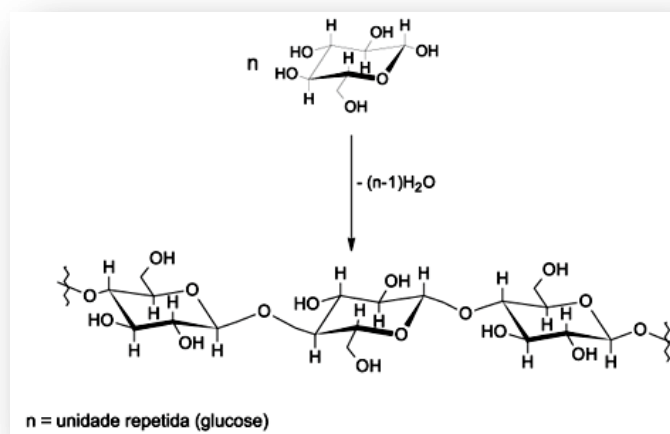


Figura 3: Formação da cadeia de celulose pela união de unidades de D-glucose. (Adaptado de Morais *et al*, 2005)

As hemiceluloses são polímeros complexos de glúcidos e correspondem a cerca de 25% do peso do material lenhocelulósico. São polissacáridos com menor massa molecular que a celulose, compostos por D-xilose, D-manose, D-galactose, D-glucose, L-arabinose, ácido 4-O-metil-glucurónico, ácido D-galacturónico e ácido D-glucurónico. Os glúcidos são unidos por ligações glicosídicas β -1, 4 e, ocasionalmente, β -1,3. A principal diferença entre estas e a celulose é que a hemicelulose possui ramificações com pequenas cadeias laterais constituídas por diferentes glúcidos, e os seus polímeros são facilmente hidrolisáveis. Não formam agregados, mesmo quando se encontram co-cristalizados com cadeias de celulose (Pérez *et al*, 2002).

A lenhina representa cerca de 20% do peso do material lenhocelulósico. Está presente na parede celular, oferecendo suporte estrutural, impermeabilidade e resistência contra os ataques microbianos e o *stress* oxidativo. Estruturalmente, a lenhina é um heteropolímero amorfo, não solúvel em água e opticamente inactivo, que consiste de unidades fenilpropanóides unidas por diferentes tipos de ligações. O polímero é sintetizado através da geração de radicais livres, que são libertados na desidrogenação mediada por peroxidases de três álcoois fenil propiónicos: álcool coniferílico (guaiacilpropanol), álcool cumarílico (*p*-hidroxifenilpropanol e álcool sinapílico (siringilpropanol) (figura 4).

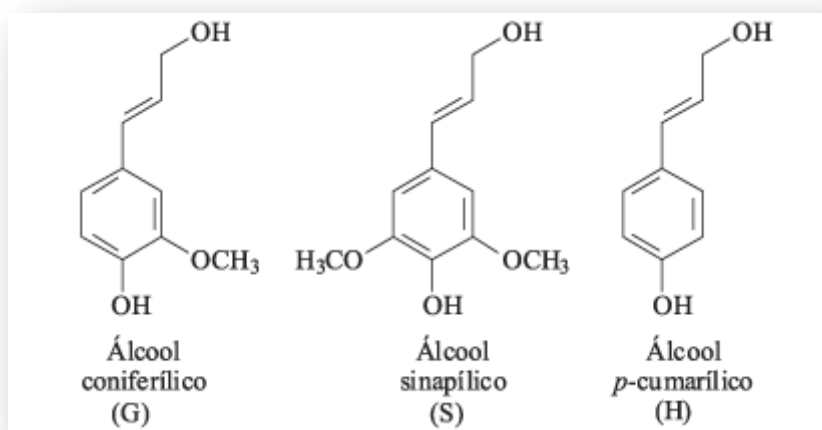


Figura 4: Álcoois precursores das unidades fenilpropanóides guaiacilo (G), siringilo (S) e *p*-hidroxifenilo (H). (Adaptado de Barbosa *et al*, 2008)

O álcool coniferílico é o componente principal das lenhinas de madeira de gimnospérmicas, enquanto os álcoois cumarílico e sinapílico são os principais constituintes da lenhina de madeiras de angiospérmicas. O resultado final desta polimerização é uma estrutura

heterogénea cujas unidades básicas estão unidas por ligações C-C e aril-éter, sendo a aril-glicerol β -aril-éter a estrutura predominante (Pérez *et al*, 2002).

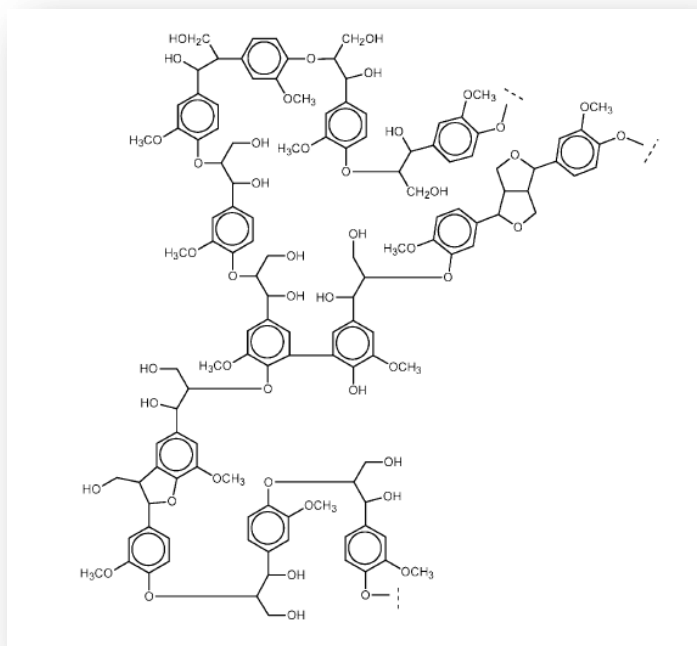


Figura 5: Estrutura molecular da lenhina onde se pode observar as diferentes ligações entre as unidades fenilpropanóides. (Adaptado de Pérez *et al*, 2002)

4.3.1. Bagaço de azeitona extractado como biomassa lenhocelulósica

O bagaço de azeitona é constituído por cerca de 20% de celulose, 35% de hemicelulose, 35% de lenhina, 10% de extractivos orgânicos, 5% de óleo e 2% de proteína, o que poderá tornar este material de baixo custo atractivo para a conversão biológica (Uzun *et al*, 2007).

As azeitonas contêm uma grande variedade de compostos fenólicos que são potentes antioxidantes e desempenham um papel importante nas propriedades químicas, organolépticas e nutricionais do azeite virgem e da azeitona de mesa. O efeito positivo do consumo da azeitona e dos produtos derivados da azeitona na saúde humana, pode ser explicado em parte pelo efeito antioxidante dos compostos fenólicos, que podem proteger o organismo contra danos oxidativos causados por agentes oxidantes (oxigénio activo, radicais livres, etc.) que estão envolvidos na etiologia de doenças crónicas como cancro e aterosclerose (Visioli *et al*, 2005). A polpa da azeitona tem uma composição fenólica característica, em que

se destacam a oleuropeína, o tirosol e o hidroxitirosol, o catecol e o metilcatecol, concentrações relativamente elevadas de flavonóides e vários pigmentos antociânicos.

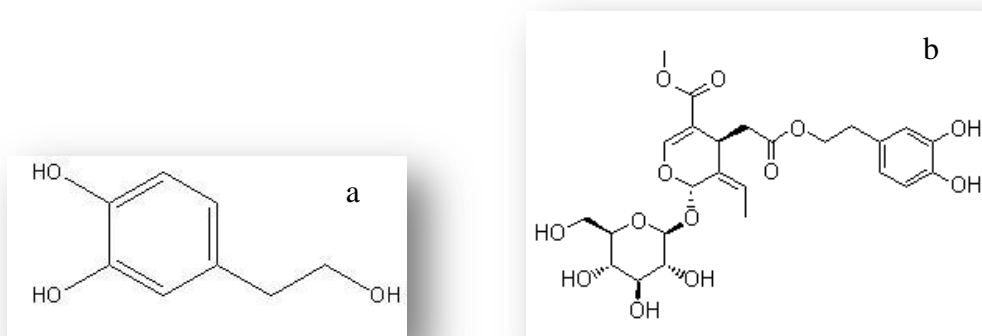


Figura 6: Estruturas químicas do hidroxitirosol (a) e da oleuropeína (b).

O hidroxitirosol é originado a partir da hidrólise da oleuropeína por acção de uma esterase durante o processo de moagem, e tem-se revelado o fenol mais interessante, devido à sua notável actividade farmacológica e antioxidante (Visioli *et al*, 2004). A oleuropeína tem sido considerada um componente valioso pelas suas propriedades antivirais, antibacterianas, antioxidantes, antifúngicas e anti-inflamatórias. Estes compostos podem ser considerados, portanto, como uma potencial fonte de antioxidantes naturais que poderiam ser utilizados na indústria alimentícia e farmacêutica (Savarese *et al*, 2007).

Embora a viabilidade de obtenção de etanol a partir de glúcidos livres fermentáveis e celulose contida no resíduo de bagaço de azeitona tenha sido demonstrada em alguns trabalhos (Ballesteros *et al*, 2001), a inibição da fermentação foi observada, provavelmente devido à presença de compostos fenólicos na polpa e sementes (Ballesteros *et al*, 2002).

O hidroxitirosol que se encontra neste resíduo é caracterizado pelas suas fortes propriedades antimicrobianas, o que poderá reduzir os rendimentos tanto da sacarificação, como da fermentação do material lenhocelulósico. Vários são os trabalhos desenvolvidos sobre a actividade antimicrobiana da oleuropeína (Furneri *et al.*, 2002), do hidroxitirosol (Bisignano *et al.*, 1999) e dos aldeídos alifáticos (Battinelli *et al.*, 2006). Assim, seria desejável a remoção destes compostos com um extraordinário efeito inibitório sobre a actividade microbiana, o que impede que a fracção celulósica da polpa de azeitona possa ser usada como substrato para a fermentação alcoólica.

4.4. Pré-tratamento do material lenhocelulósico

A finalidade do pré-tratamento é a remoção da lenhina e da hemicelulose, reduzir a cristalinidade da celulose e aumentar a porosidade dos materiais. O pré-tratamento deve obedecer aos seguintes requisitos: (1) melhorar a formação de glúcidos ou a capacidade de posteriormente serem formados glúcidos por hidrólise enzimática, (2) evitar a degradação ou a perda de glúcidos; (3) evitar a formação de subprodutos inibidores dos processos subsequentes, hidrólise e fermentação e (4) ter uma relação custo-benefício (Sun *et al*, 2002). Têm sido utilizados no pré-tratamento de materiais lenhocelulósicos processos físicos, físico-químicos, químicos e biológicos. Os pré-tratamentos físicos englobam a fragmentação mecânica; dentro dos físico-químicos tem-se a auto-hidrólise, explosão de fibra de amónia e explosão de CO₂; os químicos abrangem a ozonólise, a hidrólise ácida, a hidrólise alcalina, a deslenhificação oxidativa e o processo organosolv (Sun *et al*, 2002).

A auto-hidrólise é o método mais utilizado para pré-tratamento de materiais lenhocelulósicos (McMillan, 1994). A auto-hidrólise, normalmente, inicia-se com uma temperatura de 160-260°C durante vários segundos a alguns minutos antes de o material ser exposto à pressão atmosférica. O processo provoca a degradação da hemicelulose e a transformação da lenhina devido à alta temperatura, aumentando assim o potencial de hidrólise da celulose. Os factores que afectam o pré-tratamento de auto-hidrólise são o tempo de permanência, a temperatura, o tamanho das partículas e teor de humidade. A solubilização e hidrólise óptimas da hemicelulose podem ser alcançadas tanto pela temperatura elevada e curto tempo de permanência (270°C, 1 minuto), ou menor temperatura e maior tempo de permanência (190°C, 10 minutos) (Duff *et al*, 1996).

As vantagens do pré-tratamento de auto-hidrólise incluem a necessidade de baixo consumo de energia, quando comparado com a fragmentação mecânica e o facto de não ter custos ambientais. Os métodos mecânicos convencionais exigem 70% mais de energia que a auto-hidrólise para alcançar a redução do mesmo tamanho (Holtzaple *et al*, 1989).

As limitações deste método incluem a destruição de uma parte da fracção hemicelulósica, ruptura incompleta da matriz lenhina-glúcido e geração de compostos que podem ser inibidores do crescimento de microrganismos utilizados nos processos a jusante. Devido à formação de produtos de degradação que são inibidores do crescimento microbiano, da hidrólise enzimática e da fermentação, a biomassa pré-tratada necessita ser lavada com água para remover os materiais inibitórios, assim com a hemicelulose solúvel em água (McMillan, 1994). A lavagem com água diminui o rendimento de sacarificação global devido à

remoção de glúcidos solúveis, como os gerados pela hidrólise da hemicelulose (Sun *et al*, 2002).

4.5. Hidrólise enzimática

A hidrólise de celulose é realizada por enzimas celulase, que são altamente específicos, sendo os seus produtos normalmente glúcidos redutores, incluindo glucose (Béguin *et al*, 1994). O custo da hidrólise enzimática é baixo, quando comparado com a hidrólise ácida ou alcalina, pois a hidrólise enzimática é geralmente realizada em condições moderadas (pH 4,8 e temperatura de 45-50 °C) (Duff *et al*, 1996). Tanto bactérias como fungos podem produzir celulases para a hidrólise de materiais lenhocelulósicos. Estes microrganismos podem ser aeróbios ou anaeróbios, mesófilos ou termófilos. As bactérias pertencentes ao género *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Bacillus*, *Thermomonospora*, *Ruminococcus*, *Bacterioides*, *Erwinia*, *Acetovibrio*, *Microbispora* e *Streptomyces* têm a capacidade de produzir celulases. As *Cellulomonas fimi* e *Thermomonospora fusca* têm sido extensivamente estudadas para a produção de celulases. Apesar de muitas bactérias celulolíticas, particularmente as anaeróbias celulolíticas, como *Clostridium cellulosolvens* e *Bacterioides thermocellum* produzirem celulases com elevada actividade específica, não produzem grandes quantidades do enzima. Uma vez que os microrganismos anaeróbios têm uma taxa de crescimento muito baixa e requerem condições anaeróbicas de crescimento, a maioria das pesquisas para a produção de celulase comercial tem incidido sobre os fungos (Duff *et al*, 1996), de entre eles o mais extensivamente estudado é o género *Trichoderma*.

4.6. Celulases

Os microrganismos capazes de degradar a celulose produzem uma bateria de enzimas com diferentes especificidades, que trabalhando juntos promovem a hidrólise da celulose e são designados de celulases (Castro *et al*, 2009). Estes enzimas são biocatalisadores específicos que actuam em sinergia para a libertação de glúcidos, dos quais a glucose é a que desperta maior interesse industrial devido à possibilidade de conversão em etanol (Tolan, 2002; Lynd *et al*, 2002).

4.6.1. História

As celulasas começaram a ser estudadas durante a Segunda Guerra Mundial, quando se verificou a deterioração de fardas, bolsas e outros objectos nos acampamentos fabricados com algodão. Isto alertou os soldados das forças armadas norte-americanas instaladas nas ilhas Salomão que, juntamente com algumas organizações, como a *Quartermaster Corps*, montaram laboratórios a fim de solucionar o problema. Esta investigação incluía a detecção dos microrganismos agentes das deteriorações, os seus mecanismos de acção e métodos de controlo. O grupo de trabalho conduzido pelo Dr. Elwyn T. Reese identificou uma estirpe de um fungo filamentosos, codificada como QM6a, que foi posteriormente designada de *Trichoderma viride* e atribuída a característica de excretar os enzimas capazes de degradar a celulose. Até 1953, o Dr. Reese e o seu grupo de trabalho tinham determinado que enzimas naturais, denominados celulasas, constituem complexos de diversas moléculas com variadas capacidades na degradação do substrato. Em 1956 o Dr. Reese, aliando os seus conhecimentos aos da Dra. Mary Mandels, começou a focar as pesquisas não na prevenção da hidrólise da celulose, mas sim no melhoramento da produção dos enzimas responsáveis por essa degradação, pelo microrganismo que havia sido isolado anteriormente (Reese, 1976; Mandels *et al*, 1957).

Desde então, cada década foi marcada por significativos avanços em estudos sobre os enzimas do complexo celulolítico. O início do século XXI foi marcado por grandes investimentos na produção de celulasas, para serem aplicadas na obtenção de etanol combustível. Em 2000, o USDOE (United States Department of Energy) iniciou parcerias para acelerar o desenvolvimento tecnológico e tornar economicamente viável a produção de etanol a partir de resíduos do milho (sabugo, palha e bráctea). O Departamento assinou um acordo com o NREL (National Renewable Energy Laboratory) e com as duas empresas líderes mundiais em produção de enzimas, Novozymes e Genencor. O objectivo inicial de reduzir em 10 vezes o custo efectivo das celulasas na produção de etanol foi alcançado e em 2004 as empresas anunciavam uma redução de 12 vezes no custo dos enzimas. Também a empresa Canadiana Iogen Corporation, líder mundial na produção de etanol de celulose, recebeu um financiamento para o desenvolvimento de tecnologia de produção de etanol a partir de biomassas, desta vez, palhas de trigo, cevada e aveia e talo de milho. Em 2000, o governo do Canadá financiou a construção da então única fábrica demonstrativa de produção de bioetanol do mundo (Castro *et al*, 2009).

Os avanços na investigação sobre celulasas ocorreram em diversas áreas do conhecimento. Hoje em dia, vão sendo obtidas contribuições científicas continuamente, no

que diz respeito ao isolamento de microrganismos produtores de celulases, ao aumento da expressão de celulases por mutações genéticas, à purificação e caracterização de componentes deste complexo enzimático, ao entendimento sobre os mecanismos de ataque à celulose, à clonagem e expressão de genes, à determinação de estruturas tridimensionais das celulases e à demonstração do potencial industrial desses enzimas (Castro *et al*, 2009).

4.6.2. Modo de acção

Os enzimas do complexo celulolítico são hidrolases que quebram ligações *O*-glicosídicas e classificam-se de acordo com seu local de acção no substrato celulósico, sendo divididas em três grandes grupos: endoglucanases (EnG), que quebram as ligações internas da fibra celulósica; exoglucanases (ExG), que actuam na região externa da celulose; e β -glucosidases (BG), que hidrolisam oligossacáridos solúveis em glucose (Lynd *et al*, 2002; Tolan, 2002; Henrissat, 1991).

A endoglucanase (EC 3.2.1.4) possui como nome sistemático, segundo a IUBMB – *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* - 1,4- β -D-glucano-4-glucano-hidrolase. É o enzima do complexo celulolítico que inicia a hidrólise actuando nas regiões internas da estrutura amorfa da fibra celulósica, libertando oligossacáridos de diversos graus de polimerização e conseqüentemente novos terminais redutores. Assim, actua como redutor, quando a glucose possui um grupo hidroxilo heterosídico livre e como não-redutor, quando o grupo hidroxilo heterosídico da extremidade da molécula participa na ligação com a glucose seguinte (Kleman-Leyer *et al*, 1996; Lynd *et al*, 2002).

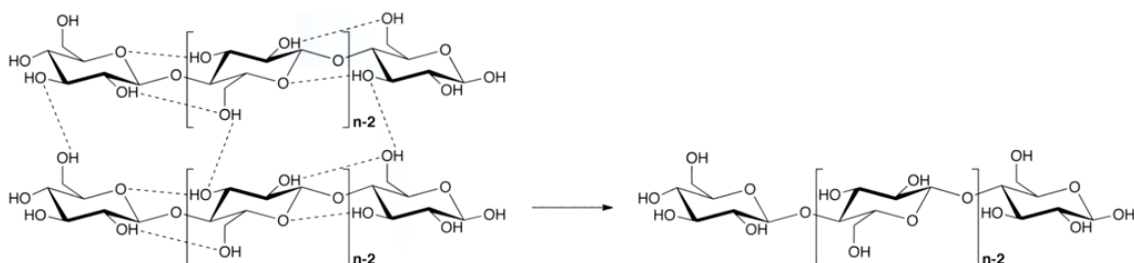


Figura 7: Degradação da estrutura amorfa da celulose em oligossacáridos de menor grau de polimerização por acção da endoglucanase.

O grupo das exoglucanases (ExG) é constituído por celobio-hidrolase (EC 3.2.1.74), cujo nome sistemático é 1,4-β-D-glucano-glucano-hidrolase e por glucano-hidrolase (EC 3.2.1.91) que tem o nome sistemático 1,4-β-D-glucano-celobio-hidrolase. Esta última é muito pouco referida, mas possui a capacidade de libertar glucose directamente a partir do polímero (Lynd *et al*, 2002).

A celobio-hidrolase (CBH), catalisa a hidrólise dos terminais não-redutores da fibra celulósica e oligossacáridos com grau de polimerização > 3 em celobiose e existem também relatos do seu ataque a terminais redutores (Kubicek, 1992). A celobio-hidrolase pode ser dividida em dois tipos: enzima do tipo I (CBH I), que hidrolisa os terminais redutores, enquanto que a do tipo II (CBH II) hidrolisa os terminais não redutores. Estes enzimas geralmente sofrem inibição pelo seu produto de hidrólise, a celobiose. A CBH participa na hidrólise primária da fibra e é responsável pela amorfogénese, que é um fenómeno ainda não esclarecido completamente, mas sabe-se, no entanto, que envolve uma ruptura física do substrato, conduzindo à desestratificação das fibras, pelo aumento das regiões intersticiais. A amorfogénese promove aumentos na taxa de hidrólise da celulose, por tornar amorfas as regiões cristalinas do polímero, deixando-o mais exposto às celulasas (Zhang *et al*, 2004).

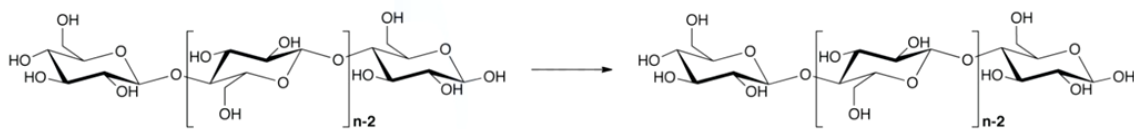


Figura 8: Degradação da celulose em celobiose por acção da celobio-hidrolase.

O terceiro e último grande grupo de enzimas do complexo celulolítico abrange a β-glucosidase (também designada celobiase) (EC 3.2.1.21). Tem a propriedade de hidrolisar celobiose e oligossacáridos solúveis (com grau de polimerização <7) em glucose (Lynd *et al*, 2002). Tal como a celobio-hidrolase, também sofre inibição pelo seu produto de hidrólise.

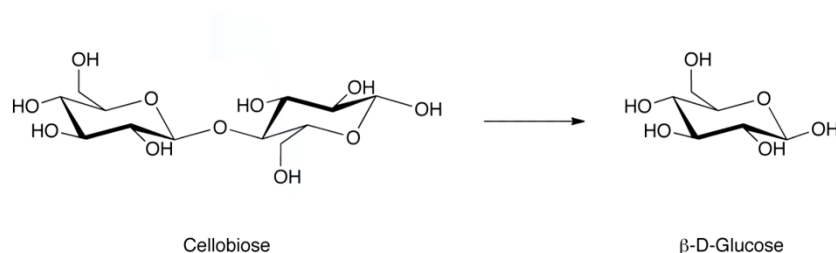


Figura 9: degradação da celobiose em glucose por acção da β-glucosidade.

Actuando em conjunto, os enzimas do complexo celulolítico apresentam um rendimento melhor do que a soma dos rendimentos individuais, este efeito é conhecido como sinergia. São conhecidas pelo menos três formas de sinergia entre as celulases (figura 10): sinergia EnG-ExG - a endoglucanase, ao actuar nas regiões amorfas da fibra, disponibiliza terminais reductores e não-reductores para a actividade da CBH I e CBH II, respectivamente; sinergia ExG-ExG - as CBH I e CBH II actuam simultaneamente na hidrólise dos terminais reductores e não-reductores libertados por acção da endoglucanase; sinergias ExG-BG e EnG-BG - como produtos de hidrólise, a celobio-hidrolase e a endoglucanase libertam celobiose e oligossacáridos, respectivamente, que são substratos para a β -glucosidase (Lynd *et al*, 2002; Bhat *et al*, 1997).

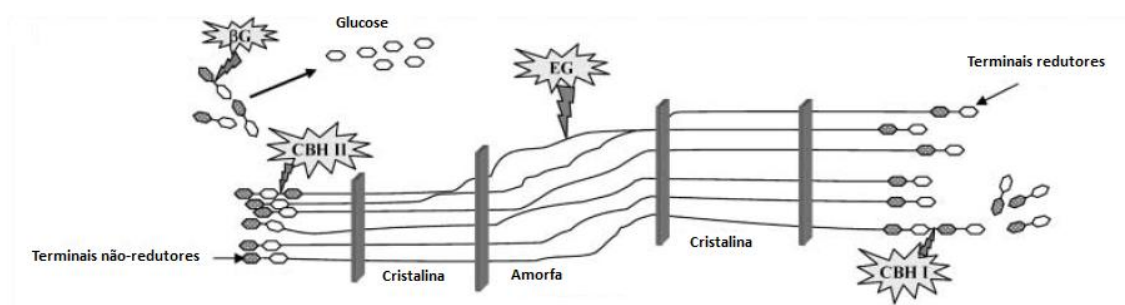


Figura 10: Degradação enzimática da celulose em glucose. CBH I actua nas extremidades reductoras; CBH II actua nas extremidades não-reductoras; EG hidrolisa as ligações internas; β G cliva o dissacárido celobiose em glucose. (Adaptado de Pérez *et al*, 2002)

5. Materiais e métodos

5.1. Caracterização do consórcio enzimático das celulases

5.1.1. Enzima

Neste estudo foi utilizada uma preparação enzimática de celulase Celluclast 1.5L *Novozymes*[®], obtida do fungo *Trichoderma reesei*.

5.1.2. Determinação da massa molecular

Electroforese em gel de poliacrilamida em condições não-desnaturantes (PAGE-Nativa)

Preparação do gel

Foi preparado o gel de resolução (7,5%) e o gel de concentração (2,5%) adicionando todos os reagentes da tabela 1, excepto o persulfato de amónio, o qual só se adicionou à mistura imediatamente antes da aplicação do gel entre as placas. Aplicou-se o gel de resolução com o auxílio de uma pipeta de Pasteur. Após a polimerização aplicou-se o gel de concentração e introduziu-se o pente. Realizou-se a electroforese usando o equipamento Bio-Rad, modelo mini-protean 3cell, série 67S/.

Tabela 1: Composição dos géis de concentração e resolução (volumes correspondentes a dois géis)

	Gel de Concentração (2,5%)	Gel de Resolução (7,5%)
Acrilamida: Bisacrilamida (30:0,8)	0,625 mL	2,500 mL
Tampão Tris HCl 1 M, pH 6,8	1,250 mL	---
Tampão Tris HCl 1,5 M, pH 8,8	---	1,250 mL
TEMED	5 µL	7 µL
H₂O dest.	2,875 mL	5,730 mL
Persulfato de amónio	0,250 mL	0,500 mL

Preparação e aplicação das amostras

Como marcadores moleculares usaram-se padrões de proteínas de massa molecular conhecida: β -galactosidase, ovalbumina, albumina, urease e tripsina (Sigma). Aplicou-se em cada poço 20 μ L de proteína (na diluição conveniente) e nos restantes poços 20 μ L de enzima celulase em duplicados de várias diluições (1:400; 1:1000; 1:1600). As diluições foram feitas em tampão de aplicação. Preparou-se a tina de electroforese com todos os procedimentos adequados e as amostras foram aplicadas com uma micropipeta.

Corrida electroforética

Aplicou-se uma diferença de potencial de 100 V até o azul de bromofenol percorrer todo o gel, aproximadamente 2h e 30 minutos. O gel foi corado com solução corante azul de comassie, durante cerca de 30 minutos e de seguida foi descorado com solução de diferenciação. As bandas foram reveladas em câmara de UV (BIO-RAD), sendo a obtenção e tratamento de imagem efectuada com um sistema de software acoplado, por intermédio do programa Quantity One 1-D Analysis (versão 4.5.1).

A curva de calibração obtida pela técnica electroforética encontra-se representada no Anexo “A1.Curvas de calibração”.

Cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular – SEC-UV-RI-HPLC

Procedeu-se à determinação da massa molecular do consórcio enzimático das celulasas por SEC-UV-RI-HPLC, utilizando como padrões as proteínas ovalbumina, albumina, urease, tripsina (Sigma). Analisaram-se também amostras do consórcio após este ser sujeito a diálise em membrana de 14 kDa.

As corridas cromatográficas foram efectuadas utilizando um equipamento LaChrome Merck Hitachi com um detector UV L-2400, operando a um comprimento de onda de 280 nm e uma bomba L2100. Foi utilizada uma coluna Shodex OHPak SB-803 HQ, operando com um fluxo de 0,6 mL/min de eluente NaCl 0,05 M.

A curva de calibração obtida pela técnica cromatográfica encontra-se representada no Anexo “A1.Curvas de calibração”.

5.1.3. Determinação da actividade do consórcio das celulasas sobre papel de filtro

(Ghose, 1987)

A IUPAC recomenda a utilização de papel de filtro Whatman nº 1 como substrato ideal para a determinação da actividade total da celulase.

A actividade das celulasas sobre papel de filtro foi determinada colocando uma tira de 1 x 6 cm papel de filtro Whatman nº 1 em 1 mL de tampão citrato 0,05M pH 4,8 e 0,5 mL do enzima Celluclast 1.5L. Foram utilizadas 4 diluições do enzima de forma a serem obtidas massas de glúcidos redutores inferior e superior a 2 mg. Os tubos foram a incubar durante 1 hora a 50 °C e logo de seguida foram colocados em gelo para parar a reacção. As amostras foram analisadas pelo método do DNS.

5.1.4. Determinação da actividade da Endoglucanase sobre carboximetilcelulose

(Ghose, 1987)

A IUPAC recomenda a utilização da carboximetilcelulose de viscosidade média (CMC) como substrato ideal para a determinação da actividade da Endoglucanase.

Colocaram-se em tubos de ensaio 0,5 mL de carboximetil celulose a 2% em tampão citrato 0,05 M pH 4,8. Foram adicionados 0,5 mL do enzima celulase Celluclast 1.5L. Utilizaram-se 5 diluições do enzima de forma a serem obtidas massas de glucose (\approx glúcidos redutores) inferior e superior a 0,5 mg. Os tubos foram colocados num banho termostaticado a 50 °C durante 30 minutos e de seguida foram colocados em gelo de modo a parar a reacção. As amostras foram analisadas pelo método do DNS.

5.1.5. Determinação da actividade da Celobiase

(adaptado de Ghose, 1987)

A IUPAC recomenda a utilização da celobiose como substrato ideal para a determinação da actividade da celobiase.

Colocaram-se em tubos de ensaio 1,0 mL do enzima celulase Celluclast 1.5L diluída em tampão citrato 0,05 M pH 4,8. Utilizaram-se 4 diluições do enzima de forma a serem obtidas massas de glucose inferior e superior a 1,0 mg. Foram adicionados 1,0 mL de celobiose 15 mM preparada em tampão citrato 0,05 M pH 4,8. Os tubos foram colocados num banho termostaticado a 50 °C durante 30 minutos e de seguida colocados em gelo de modo a parar a reacção. As amostras foram analisadas por RI-HPLC.

5.2. Caracterização do material lenhocelulósico

A biomassa lenhocelulósica estudada foi o bagaço de azeitona extractado (BAE) pré-tratado com auto-hidrólise.

Antes de o material ser submetido ao pré-tratamento, foi analisada a sua composição em glúcidos por hidrólise ácida quantitativa. Numa primeira etapa, as amostras (0,5 g) são incubadas com 5 mL de H₂SO₄ 72% durante 1 hora num banho a 30 °C. Depois é adicionada água à mistura de modo a ter-se uma concentração final de ácido de 4%, e é autoclavada durante 1 hora a 121 °C. Estas amostras foram analisadas por UV-RI-HPLC.

O bagaço de azeitona extractado foi posteriormente sujeito a auto-hidrólise (270 g de bagaço para 355 g de água, com uma velocidade de agitação de 150 rpm, realizada sob condições não-isotérmicas para alcançar uma temperatura final de 205 °C). Após a recolha do licor de hidrólise, o material foi lavado com 1 L de água. Esta é a denominada água de lavagem do resíduo utilizada nos ensaios enzimáticos, e foi também analisada a sua composição por UV-RI-HPLC.

As análises ao bagaço extractado e às águas utilizadas na sua lavagem após o pré-tratamento foram realizadas no LNEG.

5.3. Estudo do efeito da água de lavagem do resíduo do bagaço de azeitona submetido a tratamento hidrotérmico a 50% e 100% sobre a actividade enzimática das celulasas

Foram efectuados ensaios utilizando a água de lavagem do resíduo do bagaço de azeitona que sofreu pré-tratamento de auto-hidrólise a 205°C, a fim de averiguar se eventuais compostos fenólicos nela contidos afectariam a actividade das celulasas. Estes ensaios foram controlados, utilizando-se como substrato o papel de filtro Whatman nº 1, e por isso, foram mantidas as mesmas condições: a mistura de reacção foi preparada em tampão citrato 0,05M pH 4,8 de modo a ter-se 5% (m/v) do substrato papel de filtro Whatman nº 1 e uma concentração de enzima de 30, 15 ou 7,5 FPU/g substrato, de acordo com a tabela que se segue. Para as concentrações de 50 e 100% de água de lavagem, o tampão foi preparado directamente usando o volume de água de lavagem correspondente à concentração desejada. Para cada ensaio foram preparados os respectivos brancos do enzima, do papel de filtro e, quando necessário, da água de lavagem. Colocaram-se os tubos num banho a 50°C e ao longo de 72 horas de incubação foram retiradas amostras, incluindo a amostra no tempo 0, para análise pelo método do DNS e RI-HPLC.

Tabela 2: Preparação dos meios de reacção da celulase correspondentes a 30 FPU/g substrato para as concentrações de água de lavagem estudadas (Br. s/ enz: Branco sem enzima; Br. s/ p filtro: Branco sem papel de filtro; Br. Água Lav.: Branco Água Lavagem).

% Água lavagem		Vol. Enzima (μ L)	Vol. tampão citrato 0,05M pH 4,8 / (mL)	Vol. Água de lavagem (mL)	m papel filtro (g)
0	0 (x3)	902	24,098	-	1,25
	Br. s/ enz	-	13,0	-	0,65
	Br. s/ p filtro	470	12,530	-	-
50	50 (x3)	902	-	24,098	1,25
	Br. s/ enz	-	-	13,0	0,65
	Br. s/ p filtro	470	-	12,530	-
	Br. Água Lav.	-	-	13,0	-
100	100 (x3)	902	-	24,098	1,25
	Br. s/ enz	-	-	13,0	0,65
	Br. s/ p filtro	470	-	12,530	-
	Br. Água Lav.	-	-	13,0	-

5.4. Ensaios de sacarificação do resíduo de bagaço de azeitona extractado pré-tratado

Estes ensaios foram realizados nas mesmas condições que os anteriores, isto é, em tampão citrato 0,05 M pH 4,8 e utilizando a quantidade de bagaço que permitisse ter-se uma concentração de celulose de 5% (m/v) num volume total de 2 mL. Foram testadas duas amostras de bagaço: bagaço de azeitona pré-tratado não lavado (BAENL) e bagaço de azeitona pré-tratado lavado (BAEL); e duas concentrações de enzima, 15 e 30 FPU/g celulose. O BAEL foi sujeito a cinco lavagens e de seguida foi prensado para serem pesadas as amostras. Foram determinados os graus de humidade aos dois tipos de bagaço estudados.

As amostras foram preparadas em tubos falcon de 15 mL, de modo a cada tubo corresponder a um ponto do ensaio e manter constantes as razões e condições experimentais ao longo do tempo. Assim, de acordo com a caracterização da biomassa estudada e tomando como existente 20% de celulose no bagaço, pesaram-se 0,5 g de cada amostra (BAENL e BAEL) para um volume de 2 mL de tampão citrato 0,05 M pH 4,8. Para cada ponto do ensaio foram preparados os respectivos brancos do enzima e do substrato. Os tubos foram autoclavados a 121 °C, 1 atm durante 15 minutos, e posteriormente, em meio estéril, foi adicionada a quantidade de enzima correspondente a cada concentração desejada, após ter sido esterilizada por filtração (tamanho do poro de 20 µm). Colocaram-se os tubos a incubar a 50 °C e 130 rpm num agitador orbital TEQ, modelo OSFT-LS, de modo a manter os sólidos em suspensão durante todo o período do ensaio, 168 horas. Retiraram-se as amostras no tempo de incubação pretendido e colocaram-se em gelo. De seguida ferveram-se a 100 °C durante 5 minutos para desnaturar o enzima e parar a reacção e centrifugaram-se a 10000 rpm durante 5 minutos. As amostras foram analisadas pelo método de DNS e UV-RI-HPLC.

5.5. Métodos analíticos

5.5.1. Determinação das concentrações de glucose, celobiose e xilose por RI-HPLC

As corridas cromatográficas foram efectuadas utilizando um equipamento LaChrome Merck Hitachi com um software D HSM-7000 e com um módulo de interface L7000, um amostrador automático L7200, um detector RI L7490, forno de coluna L7350 e uma bomba L7100. Foram utilizadas duas colunas: a coluna de troca iónica Aminex HP- 87H (7,8 mm x 300 mm) da Bio-Rad (E.U.A.) a 50º C com um fluxo de 0,6 mL/min e a coluna de troca catiónica Shodex Sugar pré-coluna e coluna, SH-G (6 mmx50 mm) e 21 SH-1011 (8,0 mm x 300 mm), respectivamente, Showa Denko (Japão), operadas a 60º C com um fluxo de 0,7 mL/min. Em ambos os casos, foi utilizada uma solução 5,0 mM de ácido sulfúrico como fase móvel. As amostras e eluentes foram pré-filtrados com filtros Pall com um tamanho do poro de 0,45 µm.

5.5.2. Determinação da concentração de glúcidos redutores pelo método do DNS (Miller, G. L.; 1959)

O método do DNS consiste na redução do ácido 3,5-dinitrosalicílico a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico ao mesmo tempo que o grupo aldeído do glúcido é oxidado a grupo carboxílico, com o desenvolvimento de uma coloração avermelhada, lida no espectrofotómetro a 540nm (Ghose, 1987).

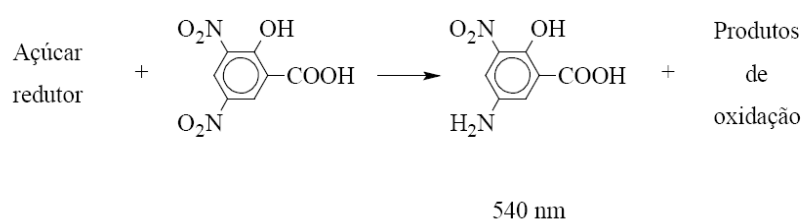


Figura 11: Reacção dos glúcidos redutores com o ácido 3,5–dinitrosalicílico.

O reagente DNS foi preparado dissolvendo 10g de ácido 3,5–dinitrosalicílico em 500 mL de água destilada; de seguida adicionaram-se 200 mL de NaOH 2M e 300 g de tartarato de sódio e potássio (sal de Rochelle). Adicionaram-se 700 mL de água destilada e guardou-se a solução preparada a 4b°C (antes de utilizar a solução era mantida à temperatura ambiente).

A concentração de glúcidos redutores foi determinada colocando em tubos de ensaio 0,5 mL de amostra, adicionando-se de seguida 3 mL de reagente DNS. Os tubos foram

colocados em banho de água fervente durante 5 minutos e de seguida foram colocados em banho de água gelada para parar a reacção. Adicionaram-se 16 mL de água destilada e após 15 a 20 minutos de repouso, as absorvâncias foram lidas a 540nm num espectrofotómetro Heλios, da Thermo Scientific. Para a construção da curva de calibração usou-se a glucose como padrão.

5.6. Validação estatística dos resultados

Na validação estatística dos resultados enzimáticos utilizou-se o programa SPSS para Windows, versão 16, *Copyright ©, Microsoft Corporation*. Consideraram-se as concentrações de produtos formados como variáveis dependentes e as concentrações testadas para os diferentes compostos como variáveis independentes. As diferenças encontradas nos níveis de actividade do enzima, para todas as concentrações de compostos testadas, foram estudadas recorrendo ao teste de análise de variância (ANOVA). A homogeneidade das variâncias foi confirmada pelo teste de Levene e a comparação múltipla das médias foi realizada com o teste de Tukey para um nível de significância de 5%.

6. Resultados e discussão

6.1. Caracterização do consórcio enzimático das celulases

Para determinação das massas moleculares dos enzimas constituintes do complexo da celulase recorreu-se a duas técnicas, electroforética e cromatográfica. A primeira, PAGE Nativa, é uma técnica não-desnaturante em que as proteínas são mantidas na sua conformação nativa. Contudo, não é uma técnica rigorosa na determinação de massas moleculares, uma vez que a migração das proteínas depende não só do seu tamanho e massa molecular mas também de outros factores como a forma e o seu ponto isoeléctrico, tendo sido utilizada com o propósito de separar os enzimas, avaliar o nível de pureza e determinar o número de bandas existentes. Pela figura 12 pode observar-se a existência de uma banda intensa de massa molecular intermédia a dois dos padrões utilizados.

A cromatografia de exclusão molecular, por sua vez, é já uma técnica que permite obter massas moleculares mais precisas que a electroforese utilizada. Foram analisadas duas amostras de celulase, uma apenas sujeita a diluição, cujo cromatograma está a laranja na figura 13 e outra amostra sujeita a diálise numa membrana de 14 kDa, respeitante ao cromatograma a azul escuro na figura 13. Comparando os dois cromatogramas, conclui-se que a amostra de enzima contém outros péptidos/glúcidos de massa molecular inferior a 14 kDa, uma vez que foram removidos pela diálise. Estes resultados podem ser explicados pelo facto do enzima não se encontrar purificado, mas sim contido no meio de cultura do microrganismo que o produz, como é informado pela *Novozymes*[®], fabricante da Celluclast 1.5L. Assim, o pico que está identificado a vermelho diz respeito aos enzimas que formam o complexo da celulase. Segundo Kubicek (1992), os três grupos principais de enzimas que constituem a celulase produzida por *Trichoderma reesei*, isto é as endoglucanases, exoglucanases e celobiase, possuem massas moleculares de aproximadamente 50 a 60 kDa. Os resultados obtidos por cromatografia de exclusão molecular assemelham-se a estes valores referidos na bibliografia (tabela 3). Também no gel da electroforese se pode observar uma banda mais forte, cuja massa molecular corresponde aproximadamente ao dobro da massa obtida por cromatografia, o que sugere que os enzimas se apresentem na forma de dímeros na sua conformação nativa.

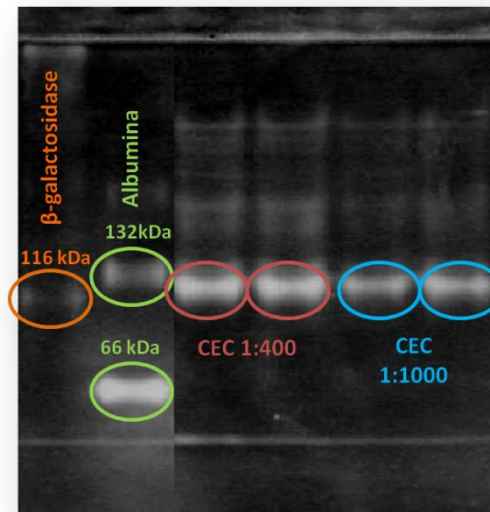


Figura 12: Gel de electroforese em condições não-desnaturantes (PAGE-Nativa) das amostras de celulase com duas diluições diferentes e dos padrões utilizados na construção da curva de calibração das proteínas.

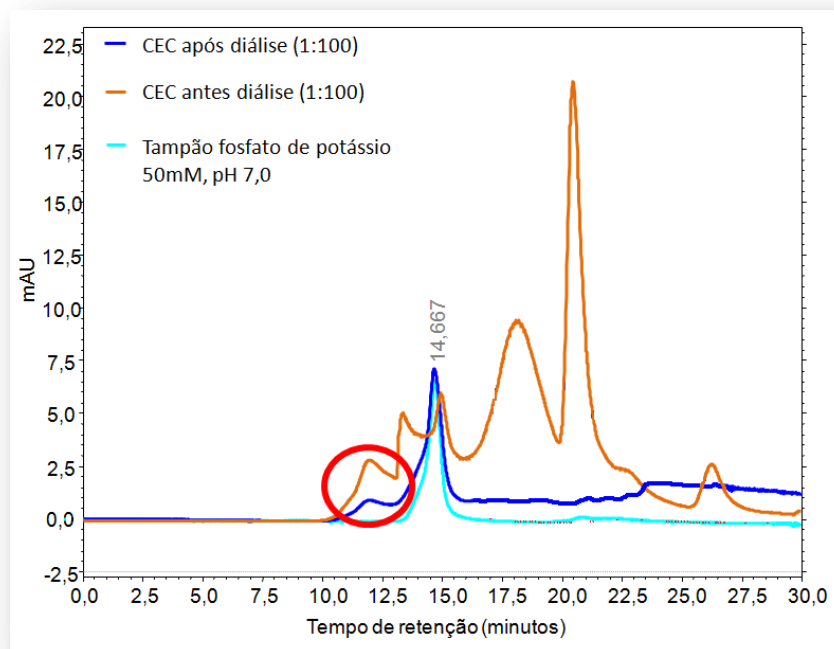


Figura 13: Cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular – SEC-UV-RI-HPLC. Cromatograma no UV de amostras da celulase: — tampão fosfato de potássio 50mM, pH 7,0; — amostra celulase antes diálise (1:100); — amostra celulase após diálise (1:1000). O círculo a vermelho indica o pico correspondente ao enzima celulase.

Tabela 3: Massas moleculares do consórcio da celulase obtidos com cada técnica utilizada.

	PAGE-Nativa	SEC-UV-RI-HPLC
Massa molecular (Da)	119023	51445

6.1.1. Determinação da actividade do consórcio das celulases sobre o papel de filtro

Segundo o método descrito por Ghose (1987), a actividade da celulase sobre papel de filtro deve ser obtida utilizando várias diluições do enzima, sendo necessário que exista uma diluição que produza uma quantidade próxima dos 2 mg de glúcidos redutores formados durante os 60 minutos de incubação do ensaio. As linearizações utilizadas para determinar a actividade total do complexo enzimático estão representadas na figura 14. A actividade foi então obtida de acordo com a fórmula (1), em que uma unidade FPU de actividade enzimática é definida pela quantidade de glúcido redutor equivalente a glucose em mM/min produzido por 1mL de solução enzimática. Este parâmetro foi determinado em diversos momentos do trabalho, de modo a garantir que o enzima mantinha a mesma actividade ao longo do tempo, não se tendo verificado diferenças significativas nas várias determinações (tabela 6). Obtiveram-se valores entre 42 e 47 FPU/mL, para uma actividade declarada de 700 EGU/g, valores esses que se encontram um pouco abaixo comparativamente ao encontrado na literatura, 73 FPU/mL para o mesmo enzima com actividade de 778 EGU/g (Bélafi-Bakó *et al*, 2006). Uma unidade de actividade da endoglucanase – EGU- corresponde à formação de 1 nmol de glúcido redutor por minuto.

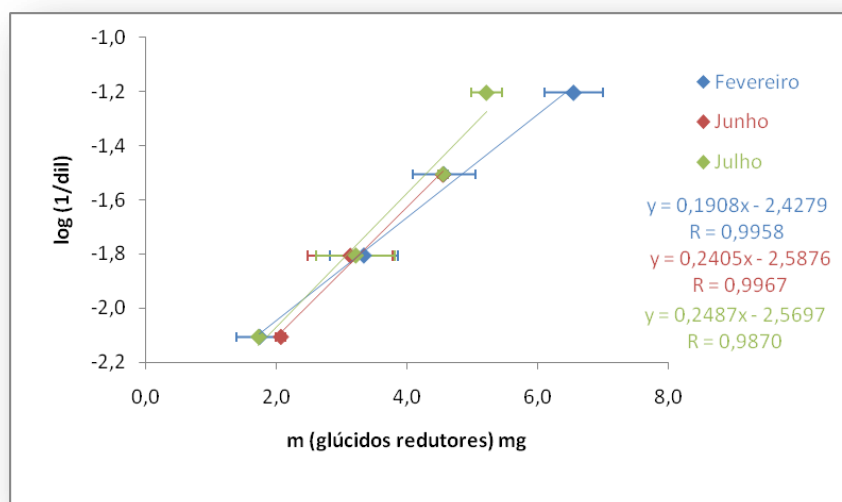


Figura 14: Representações gráficas de $\log(1/dil)$ em função da massa de glúcidos redutores formados pela acção do enzima celulase, para determinação da sua actividade sobre papel de filtro. Determinou-se a actividade total do enzima várias vezes ao longo do tempo. Os valores representam a média \pm desvio padrão ($n=2$).

$$FPU = \frac{0,37}{[\text{enzima}]_{\text{que liberta 2mg glúcidos redutores}}} \text{ (units mL}^{-1}\text{)} \quad (1)$$

Tabela 4: Valores obtidos de actividade total da celulase sobre papel de filtro, expressa em FPU/mL.

	Fevereiro	Junho	Julho
Actividades (FPU/mL)	41,57	47,44	43,68

6.1.2. Determinação da actividade da Endoglucanase sobre carboximetilcelulose

Na figura 15 está representada a linearização utilizada para determinar a actividade da endoglucanase constituinte do complexo enzimático da celulase.

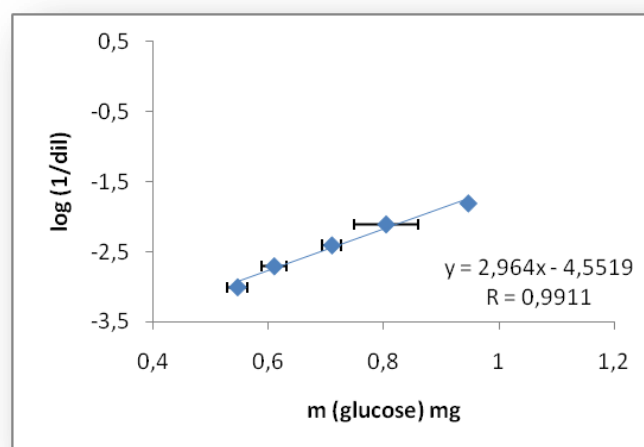


Figura 15: Representação gráfica de log (1/dil) em função da massa de glucose formada pela acção do complexo da celulase, para determinação da actividade da endoglucanase sobre carboximetilcelulose. Os valores representam a média \pm desvio padrão (n=2).

$$CMC = \frac{0,185}{[\text{enzima}]_{\text{que liberta 0,5mg glucose}}} \text{ (units mL}^{-1}\text{)} \quad (2)$$

A actividade do complexo enzimático sobre carboximetilcelulose é específica da endoglucanase. Segundo o método de Ghose (1987), deverão ser usadas diluições do enzima que permitam a produção aproximada de 0,5 mg de glúcidos redutores durante os 30min de incubação. De acordo com a fórmula (2) obteve-se uma actividade de **217,39 CMC/mL** para a endoglucanase.

6.1.3. Determinação da actividade da Celobiase

Na figura 16 está representada a linearização utilizada na determinação da actividade da celobiase constituinte do complexo enzimático da celulase.

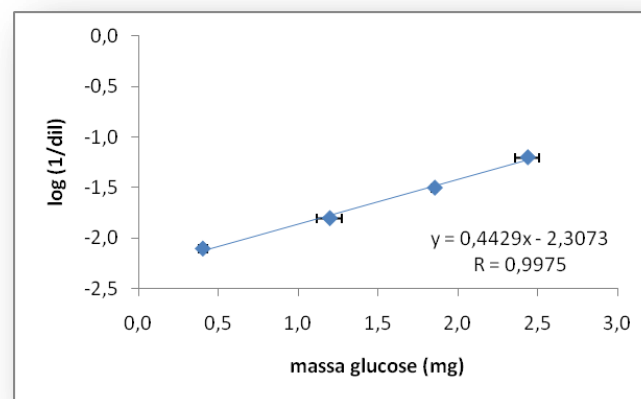


Figura 16: Representação gráfica de log (1/dil) em função da massa de glucose formada pela acção do complexo da celulase, para determinação da actividade da celobiase sobre celobiose. Os valores representam a média \pm desvio padrão (n=2).

$$CB = \frac{0,0926}{[\text{enzima}] \text{ que liberta } 1\text{mg glucose}} \text{ (units mL}^{-1}\text{)} \quad (3)$$

A actividade da celobiase foi determinada também segundo o método de Ghose (1987), em que é necessário usar-se diluições de celulase que produzam aproximadamente 1 mg de glúcidos redutores durante os 30 minutos de incubação do ensaio. Através da fórmula (3) a actividade de celobiase determinada foi de **6,76 CB/mL**.

6.2. Caracterização das águas de lavagem e do material lenhocelulósico

Na tabela seguinte está registada a composição da água de lavagem do bagaço após o pré-tratamento com auto-hidrólise, utilizada nos ensaios de redução da actividade do enzima celulase.

Tabela 5: Composição da água de lavagem do bagaço pré-tratado com auto-hidrólise a 205°C.

Fenóis totais	2,416	(g eq. ácido gálico/L)
Glucose	0,46	g/l
Xilose	0,37	g/l
Arabinose	0,15	g/l
Ácido Fórmico	0,05	g/l
Ácido Acético	0,28	g/l
Hidroximetilfurfural	0,09	g/l
Furfural	0,07	g/l

Na tabela 6 está registada a composição do bagaço (BAE) utilizado nos ensaios com material pré-tratado, tomando-se a glucose como seu constituinte sob a forma de celulose. Os fenóis estão contidos, entre outros compostos, nos extractivos, que correspondem a cerca de 20% do material lenhocelulósico.

Tabela 6: Composição da fracção do bagaço utilizada nos ensaios de redução da actividade do enzima celulase.

Composição %				
	1	2	Valor médio	erro rel. (%)
Glucose	20,35	19,89	20,12	1,17
Xilose	19,94	20,39	20,17	1,12
Arabinose	1,40	1,17	1,28	10,01
Acetilo	1,62	1,69	1,65	1,03
Lenhina de Klason	34,40	35,37	34,88	0,69
Humidade	0,09	0,09	0,09	0,00
Extractivos			21,80	(diferença)

6.3. Estudo do efeito da água de lavagem do resíduo do bagaço de azeitona a 50% e 100% na actividade enzimática das celulases

Efectuou-se um estudo utilizando as águas de lavagem do bagaço de azeitona extractado a fim de averiguar se nelas existiram compostos que afectassem a actividade do complexo enzimático da celulase na sacarificação da celulose em glucose. Para tal, foram feitos ensaios controlados em que se utilizou como substrato o papel de filtro Whatman nº 1. As águas utilizadas foram respectivas à lavagem de bagaço pré-tratado com auto-hidrólise a 205°C. Foram testadas três concentrações de celulase: 30, 15 e 7,5 FPU por g substrato e duas de água de lavagem, 50 e 100%, tendo sido feito um ensaio controlo apenas em tampão citrato 0,05M pH4,8 (ensaio referente a 0%). A conversão da celulose pelo enzima foi seguida durante 72h de incubação e analisou-se a formação de glúcidos redutores, glucose e celobiose. Da composição das águas de lavagem fazem parte uma significativa quantidade de fenóis e também em menor concentração hidroximetilfurfural e furfural (tabela 5), os quais poderão ser responsáveis pela redução tanto do processo de sacarificação da celulose, como da fermentação da glucose a etanol.

Nas figuras 17 e 18 estão apresentadas as variações de glúcidos redutores e de glucose pela medição por RI-HPLC e método dos glúcidos redutores, respectivamente, para os ensaios/estudos realizados com 30 FPU/g substrato.

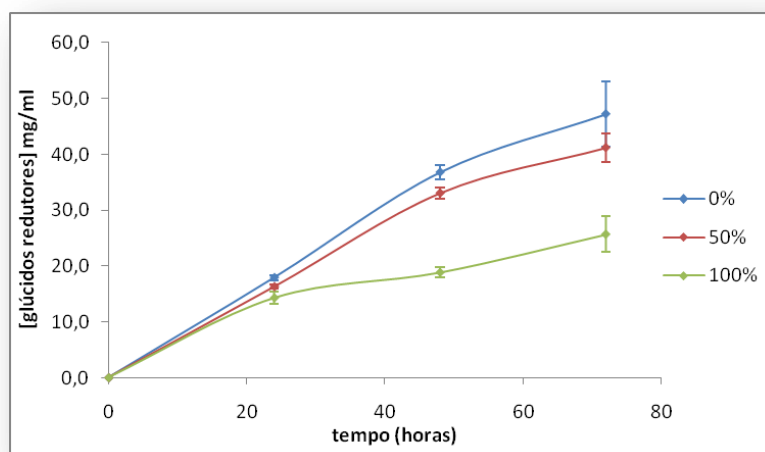


Figura 17: Representação gráfica da formação de glúcidos redutores ao longo de 72h de incubação da celulase 30 FPU/g substrato com 0, 50 e 100% de água de lavagem do resíduo. Os valores representam a média \pm desvio padrão ($n=3$; para $t24$ $n=2$). A quantificação foi obtida pelo método do DNS.

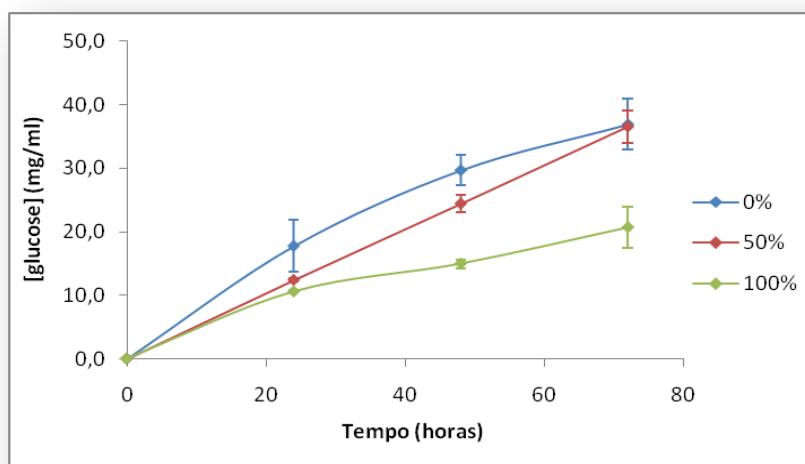


Figura 18: Representação gráfica da formação de glucose ao longo de 72h de incubação da celulase 30 FPU/g substrato com 0, 50 e 100% de água de lavagem do resíduo. Os valores representam a média \pm desvio padrão ($n=3$; para t_{24} $n=2$). A quantificação foi obtida por RI-HPLC.

Como se pode observar nas figuras 17 e 18, obteve-se em geral uma diminuição da actividade do enzima celulase a 30FPU/g substrato em relação ao ensaio controlo, onde são obtidas 37 mg/mL de glucose e 47 mg/mL de glúcidos redutores, sendo mais notória na presença de 100%, para as duas quantificações, 21 mg/mL de glucose e 26 mg/mL glúcidos redutores. A quantidade de glucose obtida com 50% de água de lavagem, 37 mg/mL, semelhante à obtida na ausência de água de lavagem após 72h de incubação.

Os rendimentos da sacarificação enzimática foram obtidos assumindo que um rendimento de 100% seria equivalente a 50 mg/mL de glucose produzida, correspondente à massa de celulose contida nos 50 mg/mL de papel de filtro utilizado nos ensaios. Os valores calculados para cada caso estão representados na figura 19.

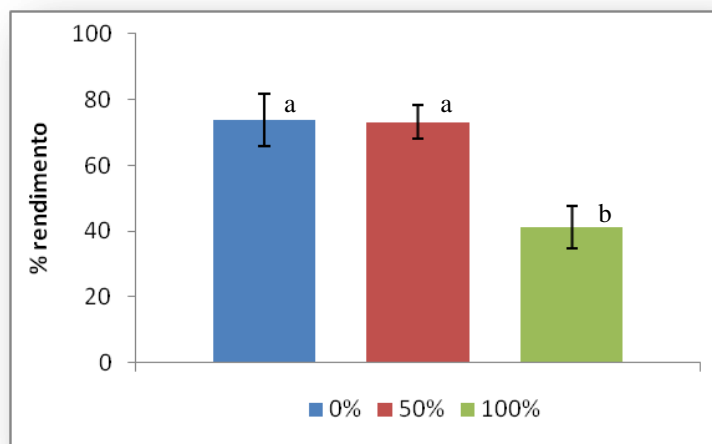


Figura 19: Representação gráfica dos rendimentos de produção de glucose após 72h de incubação com celulase 30 FPU/g substrato, para cada concentração de água de lavagem. Os valores representam a média \pm desvio padrão (n=3). 0%, 50% e 100% referem-se às concentrações de água de lavagem. As letras diferentes representam diferenças de médias entre as amostras para $p < 0,05$.

Assim, após as 72h de reacção, os rendimentos são muito semelhantes a 0 e 50% (74% e 73% respectivamente), mas não a 100% de água de lavagem (rendimento de 41%) onde é possível observar-se um decréscimo evidente no rendimento da produção de glucose (figura 19).

Na figura 20 estão representadas as quantidades de glucose e glúcidos redutores formados após 72 horas de incubação com celulase 30FPU/g substrato.

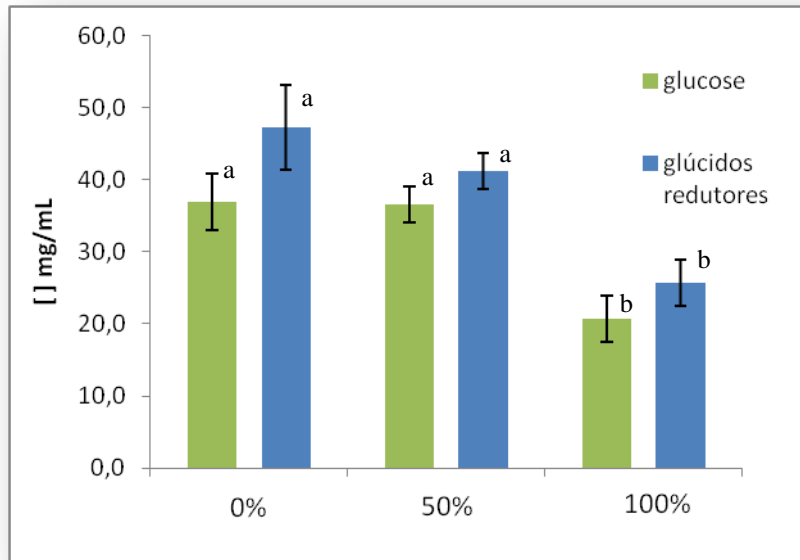


Figura 20: Representação gráfica da concentração de glucose e glúcidos redutores após 72h de incubação com celulase 30 FPU/g substrato, para cada concentração de água de lavagem. Os valores representam a média \pm desvio padrão (n=3). 0%, 50% e 100% referem-se às concentrações de água de lavagem. As letras diferentes representam diferenças de médias entre as amostras para $p < 0,05$.

Analisando estatisticamente estas relações, pode verificar-se que apenas existe uma diferença significativa na concentração de glucose e glúcidos redutores obtidos após as 72h para o ensaio com 100%, para um nível de significância de 95% (figura 20).

Nas figuras 21, 22, e 23 estão representadas as variações de concentração de glucose e celobiose quantificadas por RI-HPLC e glúcidos redutores quantificados pelo método do DNS, para os ensaios realizados com 15 FPU/g substrato.

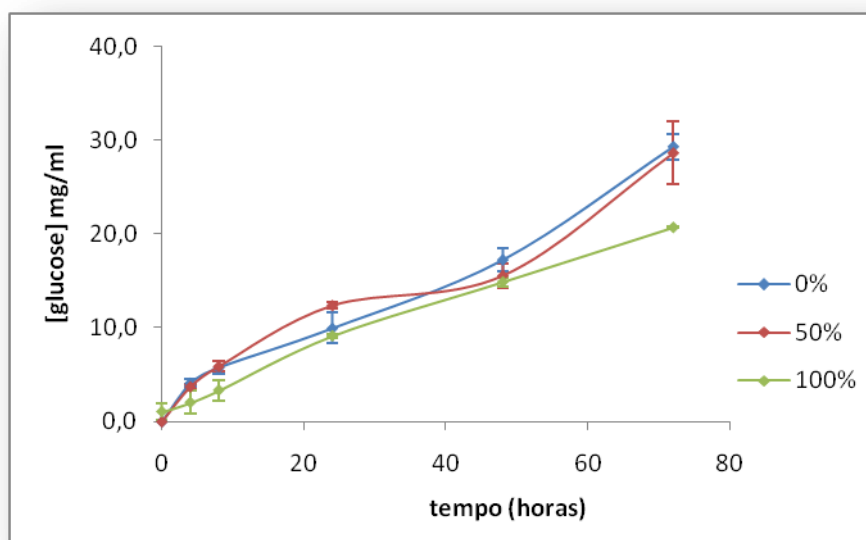


Figura 21: Representação gráfica da formação de glucose ao longo de 72h de incubação da celulase 15 FPU/g substrato com 0, 50 e 100% de água de lavagem do resíduo. Os valores representam a média \pm desvio padrão ($n=3$). A quantificação foi obtida por RI-HPLC.

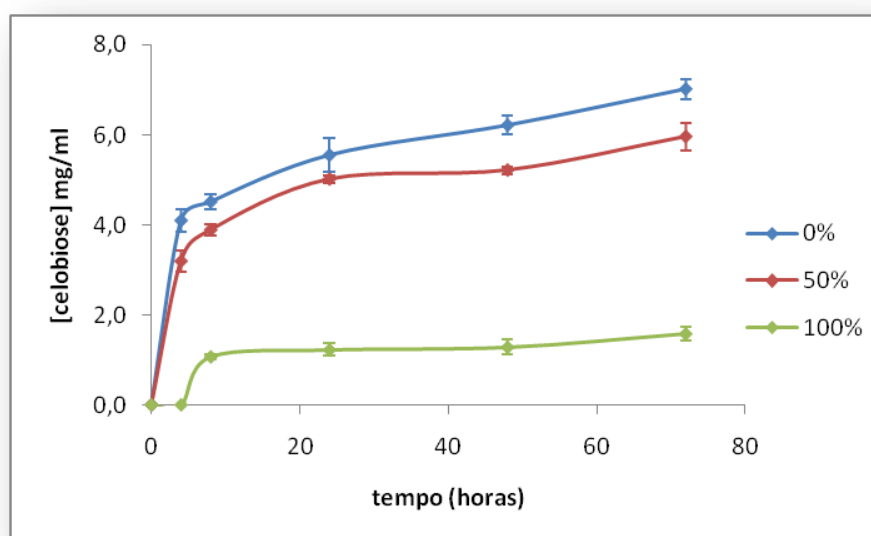


Figura 22: Representação gráfica da formação de celobiose ao longo de 72h de incubação da celulase 15 FPU/g substrato com 0, 50 e 100% de água de lavagem do resíduo. Os valores representam a média \pm desvio padrão ($n=3$). A quantificação foi obtida por RI-HPLC.

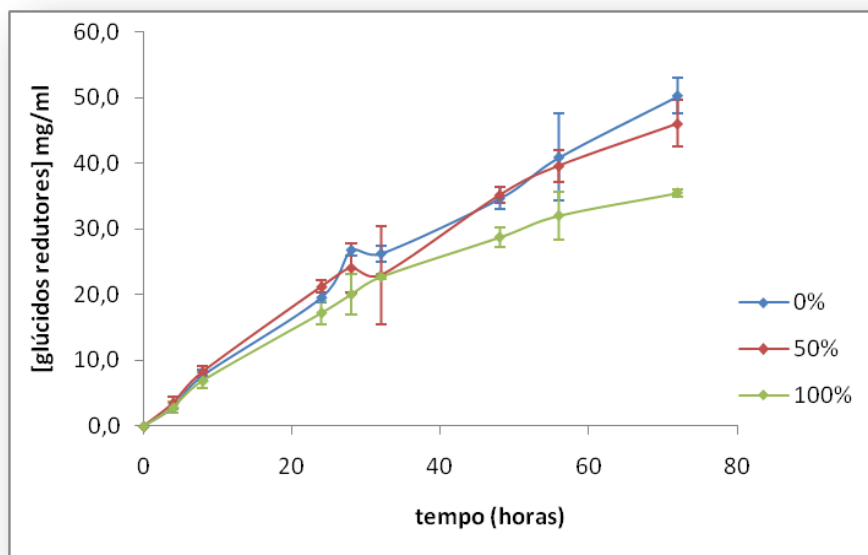


Figura 23: Representação gráfica da formação de glúcidos redutores ao longo de 72h de incubação da celulase 15 FPU/g substrato com 0, 50 e 100% de água de lavagem do resíduo. Os valores representam a média \pm desvio padrão (n=3). A quantificação foi obtida pelo método do DNS.

Analisando os gráficos das figuras 21, 22 e 23 verifica-se uma diminuição geral na produção de glucose, celobiose e glúcidos redutores, em comparação com ensaio controlo correspondente a 0% de água de lavagem (onde se obtêm 29 mg/mL, 7 mg/mL e 50 mg/mL respectivamente) para uma concentração de celulase de 15FPU/g substrato. Esta redução é mais notória na presença de 100% de água de lavagem, tendo-se obtido 21mg/mL de glucose e 36 mg/mL de glúcidos redutores. Em relação à produção de celobiose existe uma forte diminuição de produção para 100% de água de lavagem, 2 mg/mL. Como acontece com o ensaio de 30 FPU/g substrato, a concentração de glucose formada com 50% é muito semelhante à que se forma na ausência de água de lavagem, 29 mg/mL em ambos os casos.

De forma semelhante ao ponto anterior referente ao ensaio com 30 FPU/g substrato, foram também calculados os rendimentos de produção de glucose após 72h de incubação com celulase 15FPU/g substrato. Os rendimentos de produção de celobiose foram calculados assumindo que um rendimento de 100% na sacarificação corresponderia a 25 mg/mL, metade da concentração esperada de glucose. Os valores obtidos no caso da glucose e celobiose encontram-se representados na figura 24.

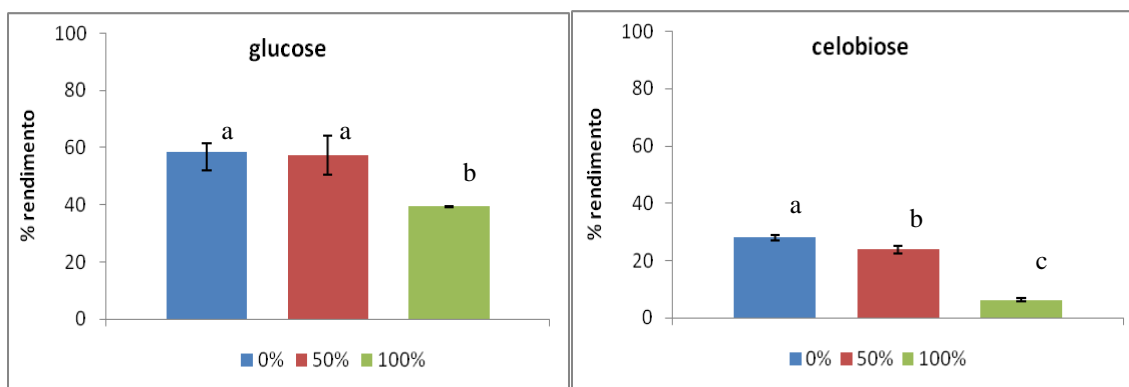


Figura 24: Representação gráfica dos rendimentos de produção de glucose e celobiose após 72h de incubação com celulase 15 FPU/g substrato, para cada concentração de água de lavagem. Os valores representam a média \pm desvio padrão (n=3). 0%, 50% e 100% referem-se às concentrações de água de lavagem. As letras diferentes representam diferenças de médias entre as amostras para $p < 0,05$.

Os rendimentos tanto de glucose como celobiose são apenas afectados na presença de 100% de água de lavagem (39% e 6%, respectivamente) não se verificando, portanto, uma diferença relevante com 50% de água de lavagem, em que se obteve um rendimento de produção de glucose de 57% e de celobiose de 24%, em relação ao ensaio controlo, com um rendimento de produção de glucose de 59% e de celobiose de 28% (figura 24).

Na figura que se segue estão representadas as concentrações de glucose, glúcidos redutores e celobiose obtidas após 72h de incubação com celulase 15 FPU/g substrato.

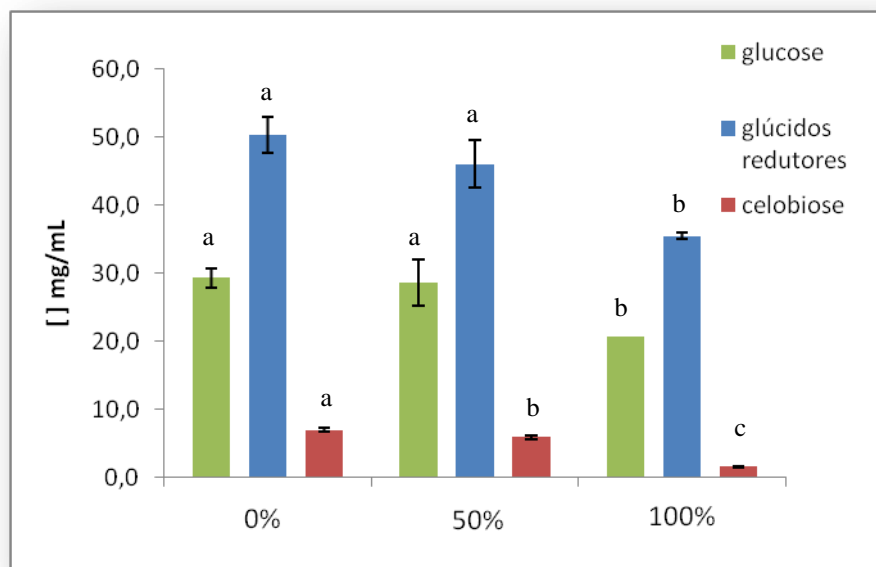


Figura 25: Representação gráfica da concentração glucose, glúcidos redutores e celobiose após 72h de incubação com celulase 15 FPU/g substrato, para cada concentração de água de lavagem. Os valores representam a média \pm desvio padrão (n=3). 0%, 50% e 100% referem-se às concentrações de água de lavagem. As letras diferentes representam diferenças de médias entre as amostras para $p < 0,05$.

No caso da produção de glucose e glúcidos redutores, esta análise foi confirmada estatisticamente, podendo observar-se na figura 25 que não existem diferenças significativas nas quantidades obtidas entre o ensaio controlo e o ensaio a 50%, a um nível de significância de 95%. Relativamente à celobiose, constata-se que na presença de 50% de água de lavagem existe já uma diferença em relação ao ensaio controlo após as 72h de incubação, muito mais notória no ensaio com 100% de água de lavagem.

Nas figuras 26, 27 e 28, estão representadas as variações de concentrações de glucose e celobiose, quantificadas por RI-HPLC e glúcidos redutores quantificados pelo método do DNS, para os ensaios realizados com 7,5 FPU/g substrato de celulase.

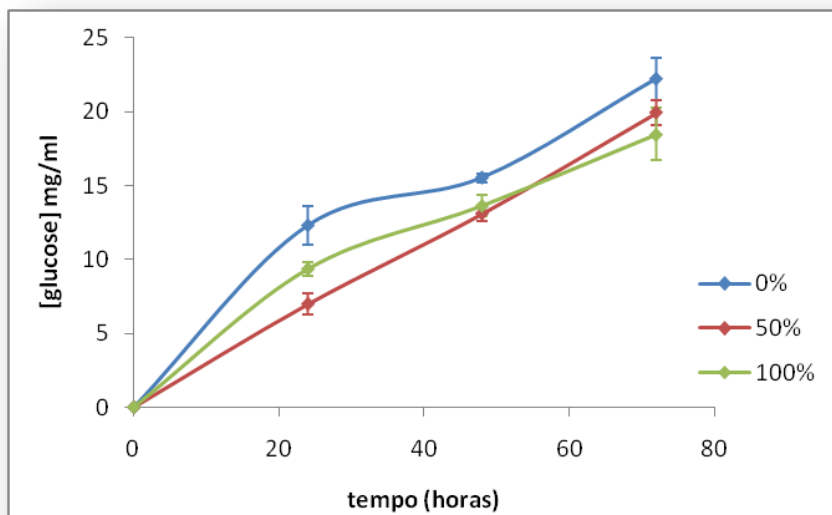


Figura 26: Representação gráfica da formação de glucose ao longo de 72h de incubação da celulase 7,5 FPU/g substrato com 0, 50 e 100% de água de lavagem do resíduo. Os valores representam a média \pm desvio padrão (n=3). A quantificação foi obtida por RI-HPLC.

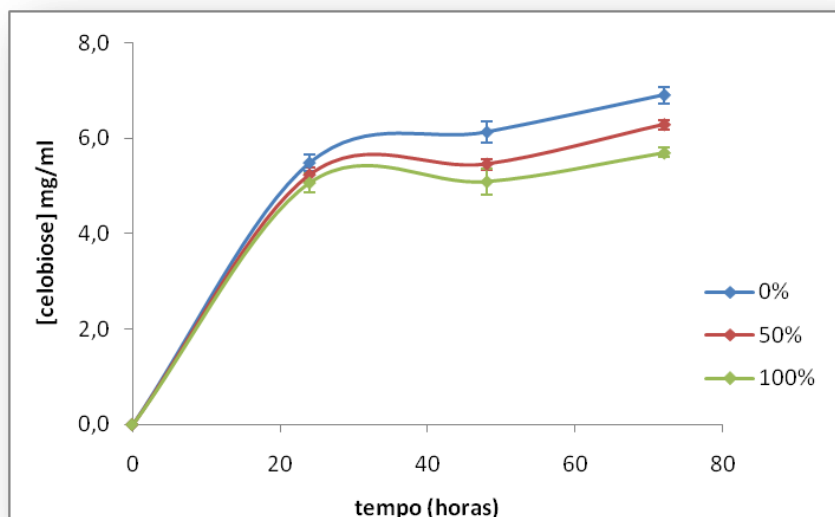


Figura 27: Representação gráfica da formação de celobiose ao longo de 72h de incubação da celulase 7,5 FPU/g substrato com 0, 50 e 100% de água de lavagem do resíduo. Os valores representam a média \pm desvio padrão (n=3). A quantificação foi obtida por RI-HPLC.

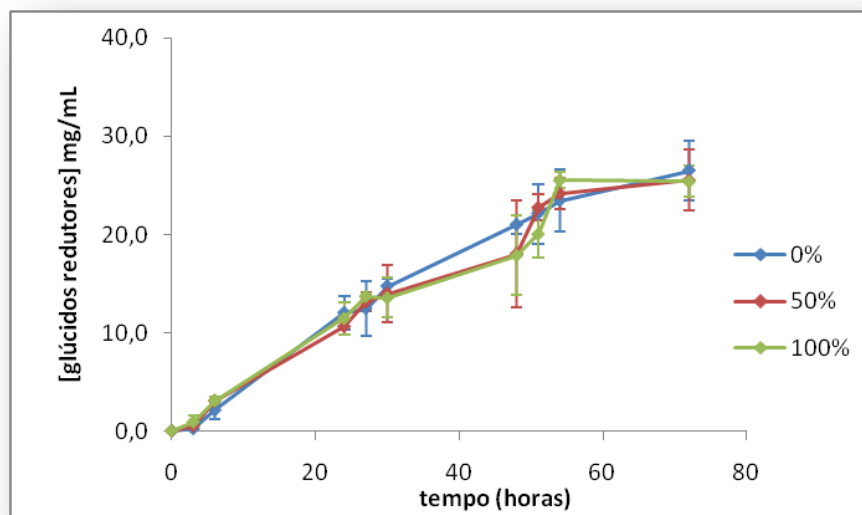


Figura 28: Representação gráfica da formação de glúcidos redutores ao longo de 72h de incubação da celulase 7,5 FPU/g substrato com 0, 50 e 100% de água de lavagem do resíduo. Os valores representam a média \pm desvio padrão ($n=3$). A quantificação foi obtida pelo método do DNS.

Pelas figuras 26, 27 e 28 é possível observar-se que não existe uma diminuição evidente na sacarificação quer para 50% (20 mg/mL de glucose, 26 mg/mL de glúcidos redutores e 6 mg/mL de celobiose) ou 100% (18 mg/mL de glucose, 25 mg/mL de glúcidos redutores e 6 mg/mL de celobiose) quando comparada com a sacarificação com 0% de água de lavagem (22 mg/mL de glucose, 27 mg/mL de glúcidos redutores e 7 mg/mL de celobiose), sendo esta apenas mais visível no caso da produção de celobiose. Verifica-se que existe um período de tempo de incubação em que a quantidade de glucose produzida com 100% de água de lavagem é ligeiramente superior à produzida com 50%.

Tal como nos pontos anteriores, referentes aos ensaios com 30 e 15 FPU/g substrato, calcularam-se os rendimentos de produção de glucose e celobiose, que se encontram representados nos gráficos da figura 29.

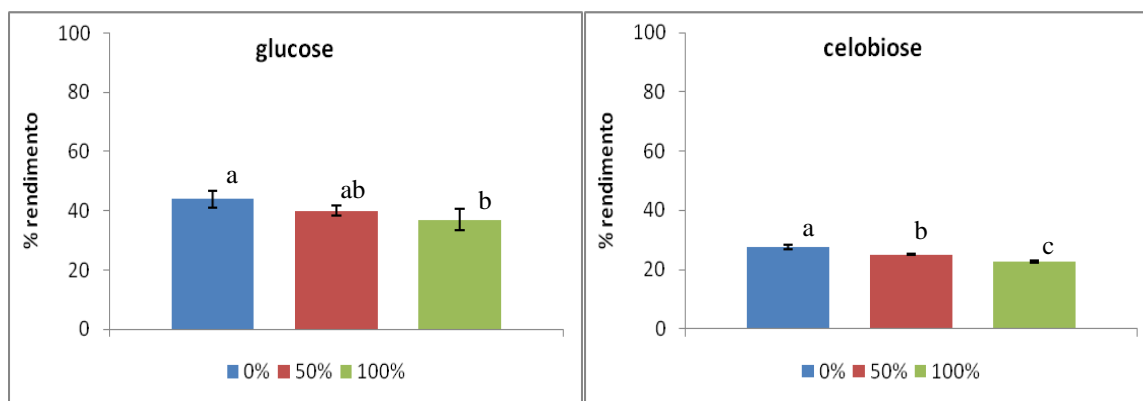


Figura 29: Representação gráfica dos rendimentos de produção de glucose e celobiose após 72h de incubação com celulase 7,5 FPU/g substrato, para cada concentração de água de lavagem. 0%, 50% e 100% referem-se às concentrações de água de lavagem. As letras diferentes representam diferenças de médias entre as amostras para $p < 0,05$.

Os rendimentos da produção de glucose e celobiose são, por isso, muito semelhantes entre os ensaios, como mostram os gráficos da figura 29, tendo-se obtido rendimentos de glucose de 44% e celobiose 28% no ensaio controlo, rendimentos de glucose de 40% e celobiose 25% a 50% de água de lavagem e rendimentos de 37% de glucose e 23% de celobiose no caso de 100% de água de lavagem.

Na figura 30 estão registadas as concentrações de glúcidos redutores, glucose e celobiose obtidas após 72h de incubação com celulase 7,5FPU/g substrato.

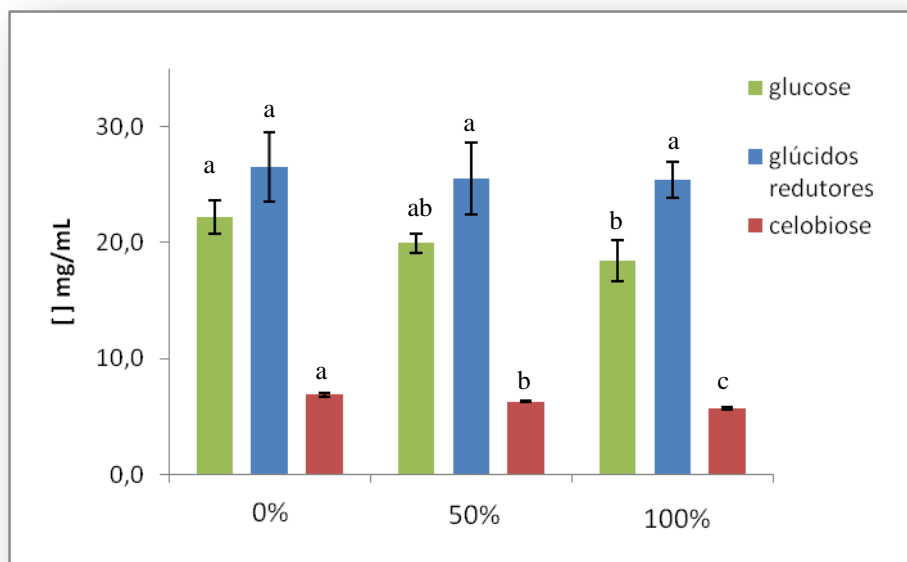


Figura 30: Representação gráfica da concentração de glucose, glúcidos redutores e celobiose após 72h de incubação com celulase 7,5 FPU/g substrato, para cada concentração de água de lavagem. Os valores representam a média \pm desvio padrão ($n=3$). 0%, 50% e 100% referem-se às concentrações de água de lavagem. As letras diferentes representam diferenças de médias entre as amostras para $p < 0,05$.

A análise estatística revela que apenas a produção de glúcidos redutores se mantém semelhante em qualquer das concentrações de água de lavagem, para um nível de confiança de 95% (figura 30). No caso da glucose não existem diferenças de concentração obtida após 72 h de incubação entre o ensaio controlo e o ensaio a 50%, nem entre este último e o ensaio a 100%, só se verificando uma diminuição significativa entre o controlo e 100% de água de lavagem. No gráfico da figura 30 observa-se que a concentração de celobiose produzida durante o ensaio apresenta diferenças significativas entre as duas concentrações de água de lavagem e entre estas e o ensaio controlo.

Analisando os resultados de um modo geral, no ensaio controlo (0% de água de lavagem) é evidente uma maior produção de glúcidos redutores nas concentrações mais altas de enzima, não sendo esta tão notória no caso da glucose e não se verificando de todo quando se trata de celobiose.

O mesmo acontece no ensaio a 50% de água de lavagem, em que é notada uma maior diferença na produção de glúcidos redutores para as concentrações de enzima mais elevadas, em relação à glucose e celobiose.

Fazendo os cálculos de um rendimento total de conversão da celulose, isto é, somando os rendimentos de produção de glucose e celobiose, obtém-se um rendimento de 87% e 72% no ensaio controlo para 15 e 7,5 FPU/g substrato, respectivamente. Nos ensaios realizados com 50% de água de lavagem, obtém-se um rendimento de 81% e 65% para 15 e 7,5 FPU/g substrato; para 100% de água de lavagem estes valores descem para 45% e 60%, respectivamente. Assim, conclui-se que após as 72h de incubação com a celulase, independentemente da concentração de enzima utilizada, existe ainda uma quantidade significativa de celulose por converter, sendo esta maior no caso de 7,5 FPU/g substrato. Também a existência de celobiose por converter sugere que a actividade da celobiase constituinte do complexo enzimático não é suficiente para conseguir hidrolisar toda a celobiose produzida pelos outros dois grupos de enzima, endo- e exoglucanases. Uma forma de contornar este problema e assim aumentar os rendimentos de conversão da celulose em glucose, seria adicionar além da Celluclast outras preparações enzimáticas comerciais, como fizeram Santos e colaboradores (2010) na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar, em que foi adicionada uma preparação de celobiase da Novozymes.

Na tabela 7 estão registadas as reduções de sacarificação relativas à produção de glucose para os ensaios a 50% e 100% de água de lavagem, quando comparados com o ensaio controlo (0% de água de lavagem).

Tabela 7: Percentagem da redução de sacarificação obtida nos ensaios após 72h de incubação em comparação com o ensaio controlo (0% água lavagem).

[celulase] (FPU/g substrato)	50% água lavagem			100% água lavagem		
	Glúc.	Glucose	Celobiose	Glúc.	Glucose	Celobiose
	redutores (%)	(%)	(%)	redutores (%)	(%)	(%)
30	2	1	-	39	44	-
15	8	2	15	29	29	77
7,5	4	10	9	4	17	17

No ensaio a 100% existe maior redução na actividade do enzima, porque as concentrações de glucose não diferem entre si quando se comparam as diferentes concentrações de enzima.

Fazendo uma comparação geral entre os três ensaios, em termos de redução na sacarificação, obteve-se uma maior diminuição na actividade da celulase na presença de 100% de água de lavagem, relativamente ao ensaio controlo, para as três concentrações de enzima testadas. Das concentrações de celulase testadas, pode observar-se que existe uma menor interferência dos compostos das águas de lavagem quando se utilizam 7,5 FPU/g substrato, embora com esta quantidade de enzima se obtenham concentrações de glúcidos redutores e glucose mais baixas, independentemente da presença ou não de água de lavagem.

6.4. Ensaios de sacarificação do resíduo de bagaço de azeitona extractado pré-tratado

O estudo da influência dos compostos fenólicos no processo de sacarificação da celulose foi estendido ao bagaço de azeitona extractado pré-tratado lavado e não lavado. Mantiveram-se as mesmas condições iniciais de substrato e testaram-se duas concentrações de enzima. A sacarificação foi seguida ao longo de 168h e quantificaram-se os glúcidos redutores, glucose, celobiose e xilose formados.

Tendo em conta que os ensaios foram realizados com a mesma quantidade de bagaço inicial, e uma vez que o bagaço sujeito a lavagem apresentou um grau de humidade superior ao não lavado, a celulose disponível para conversão nos ensaios era necessariamente diferente para cada amostra de bagaço utilizado. Assim, de acordo com o teor de humidade, e tendo em conta a composição do material, os valores de glucose máxima esperada, ou seja, que seriam obtidos numa conversão com rendimento de 100%, estão registadas na tabela seguinte.

Tabela 8: Quantidade de potencial glucose em cada tipo de biomassa após a correcção com o teor de humidade de cada amostra.

Tipo de biomassa	[Glucose] Máxima. (mg/mL)
BAENL	40,37
BAEL	35,24

Nas figuras seguintes, 31 e 32, estão representadas as variações de concentração de glucose, celobiose, glúcidos redutores e xilose ao longo das 168h de incubação com as duas concentrações de enzima, 15 e 30 FPU/g celulose, para o BAENL.

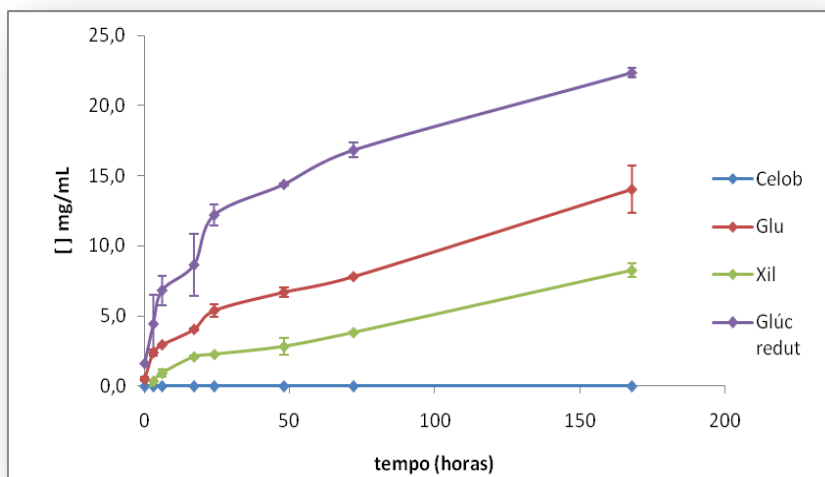


Figura 31: Representação gráfica das concentrações de glucose, celobiose, xilose e glúcidos redutores ao longo de 168h de incubação do bagaço de azeitona extractado pré-tratado não lavado (BAENL) com celulase 30 FPU/g celulose. Os valores representam a média \pm desvio padrão (n=2).

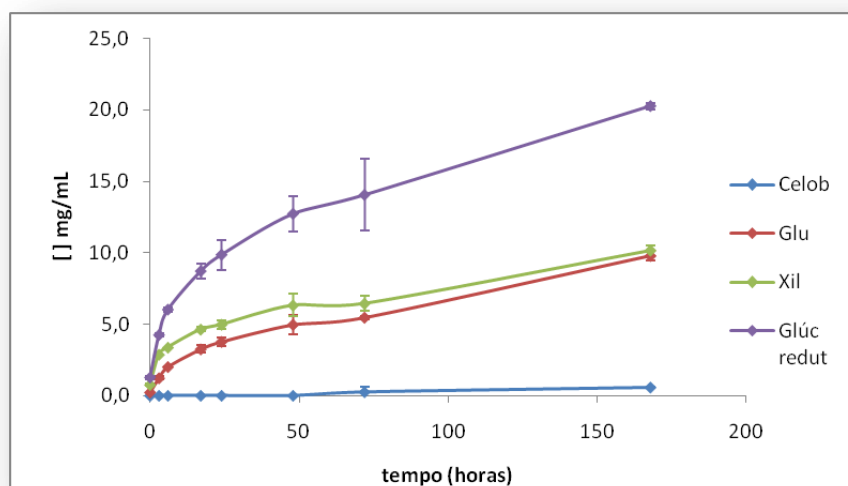


Figura 32: Representação gráfica das concentrações de glucose, celobiose, xilose e glúcidos redutores ao longo de 168h de incubação do bagaço de azeitona extractado pré-tratado não lavado (BAENL) com celulase 15 FPU/g celulose. Os valores representam a média \pm desvio padrão (n=2).

Pelos gráficos das figuras 31 e 32 observa-se que os valores quantificados pelo método do DNS são superiores a qualquer outro glúcido, uma vez que este método quantifica todos os glúcidos redutores presentes na amostra, glucose, xilose e celobiose, verificando-se que os valores correspondem à soma dos glúcidos quantificados isoladamente por RI-HPLC. A produção de glucose é superior com uma concentração de enzima de 30FPU/g celulose, 14 mg/mL, em comparação com a produção com 15 FPU/g celulose, 10 mg/mL. A produção de glúcidos redutores é também ligeiramente superior com a concentração mais elevada de enzima, 22 mg/mL, em relação à concentração de 15 FPU/g celulose, 20 mg/mL, no entanto esta diferença é menor entre as duas concentrações de enzima do que a correspondente à glucose, o que significa que a redução de produção de glucose é compensada com a produção de outros glúcidos, neste caso, xilose e celobiose.

Em relação à celobiose, são registados valores muito baixos, inferiores a 1 mg/mL para 15 FPU/g celulose, ou até inexistentes, como se verifica para a concentração mais alta de enzima ao longo do ensaio, o que poderá significar que esta está continuamente a ser convertida em glucose pela celobiase.

A xilose quantificada ao longo dos ensaios, 10 mg/mL com 15 FPU/g celulose e 8 mg/mL com 30 FPU/g celulose, é indicadora da possibilidade da intensidade das condições de pré-tratamento não ter sido suficiente para solubilizar a totalidade dos glúcidos hemicelulósicos presentes na biomassa e do consórcio enzimático utilizado estar a libertar esta pentose através da actividade xilanásica.

Nas figuras 33 e 34 estão representadas as variações de glucose, celobiose, glúcidos reductores e xilose formados ao longo das 168h de incubação do BAEL com 15 e 30 FPU/g celulose. As condições iniciais de ensaio foram as mesmas que o ensaio do BAENL, apenas diferindo no facto deste material ter sido sujeito a lavagem após o pré-tratamento.

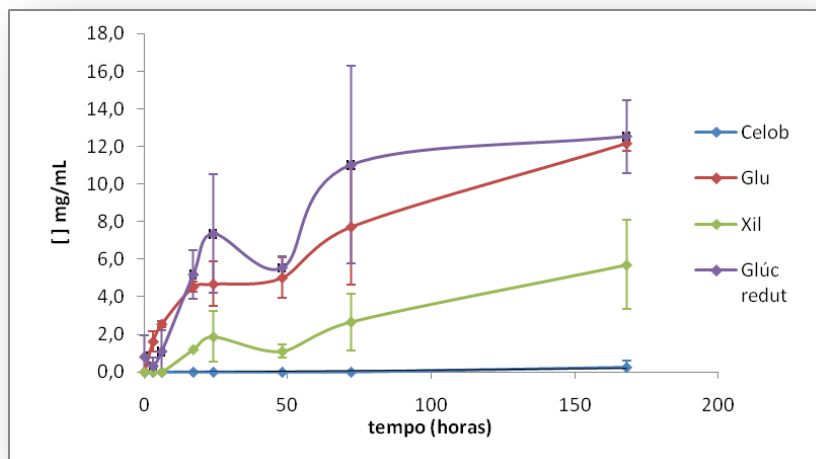


Figura 33: Representação gráfica das concentrações de glucose, celobiose, xilose e glúcidos reductores ao longo de 168h de incubação do bagaço de azeitona extractado pré-tratado lavado (BAEL) com celulase 30 FPU/g celulose. Os valores representam a média \pm desvio padrão (n=2).

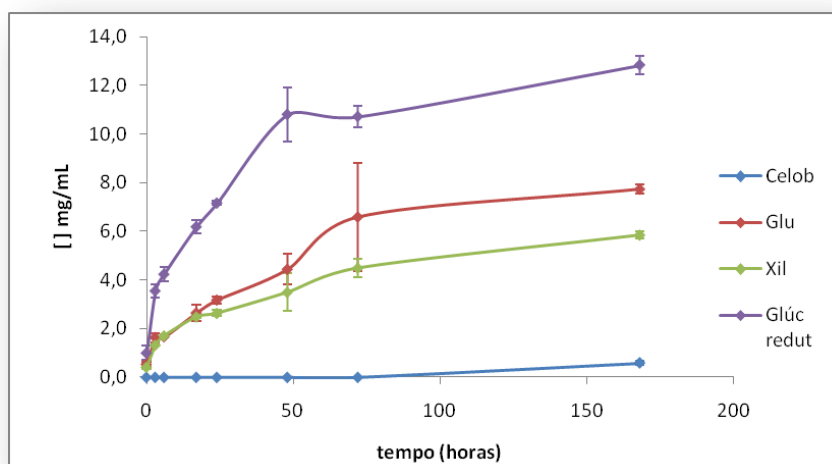


Figura 34: Representação gráfica das concentrações de glucose, celobiose, xilose e glúcidos reductores ao longo de 168h de incubação do bagaço de azeitona extractado pré-tratado lavado (BAEL) com celulase 15 FPU/g celulose. Os valores representam a média \pm desvio padrão (n=2).

Observando a figura 33, a quantidade de glúcidos redutores formada com uma concentração de enzima de 30 FPU/g celulose é muito próxima do valor de glucose, 13 mg/mL e 12 mg/mL, respectivamente. Para 15 FPU/g celulose estes valores apresentam alguma diferença entre si, 8mg/mL de glucose e 13 mg/mL de glúcidos redutores. Como acontece com o material não lavado, registam-se maiores quantidades de glucose com a concentração mais elevada de enzima, 30FPU/g celulose. No ensaio realizado a 15 FPU/g celulose a concentração de glucose mantém-se constante a partir das 72h de incubação. As concentrações de celobiose formadas são inferiores a 1 mg/mL, para as duas concentrações enzimáticas. Para 15 FPU/g celulose obteve-se uma concentração de xilose semelhante à de glucose, 6 mg/mL e 8 mg/mL, respectivamente.

De acordo com os valores de glucose máxima esperada para cada ensaio, registados na tabela 8, calcularam-se os rendimentos de sacarificação apresentados na figura 35, onde são comparados os valores obtidos com os dois materiais, lavado e não lavado, incubados com 15 e 30 FPU/g celulose.

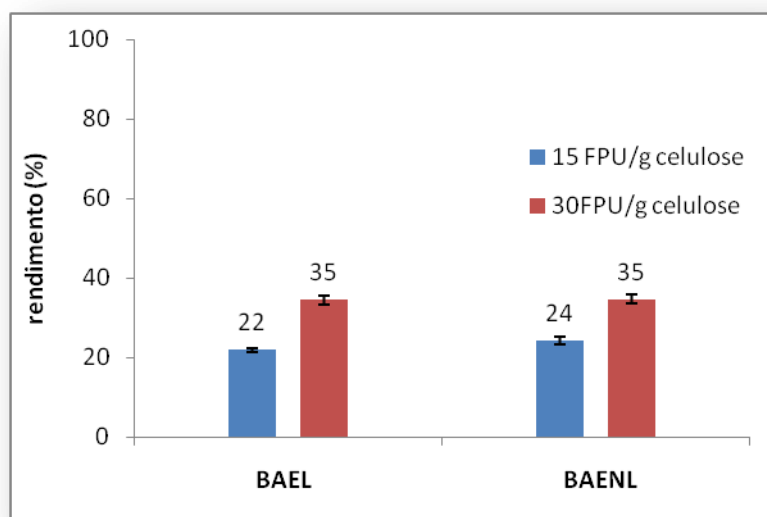


Figura 35: Representação gráfica dos rendimentos de produção de glucose após 168h de incubação do bagaço de azeitona extractado lavado (BAEL) e não lavado (BAENL) com celulase 15 e 30 FPU/g celulose. Os valores representam a média \pm desvio padrão (n=2).

Pode observar-se que para os dois tipos de bagaço os rendimentos são muito semelhantes registando-se valores de 22% e 24% de conversão da celulose com 15 FPU/g celulose no BAEL e BAENL respectivamente; e 35% nos dois tipos de bagaço com 30FPU/g celulose. Esta proximidade dos valores pode significar que o processo de lavagem não foi suficiente para remover quaisquer compostos fenólicos que influenciassem a actividade do enzima na sacarificação da celulose. Pode também significar que apesar dos estudos em condições controladas (ensaios de redução de sacarificação na presença de água de lavagem) revelarem que há uma diminuição da actividade do complexo Celluclast na presença de fenóis, com o material lenhocelulósico em si (BAE pré-tratado) tal diferença não se faz notar, pelo que na prática, para os ensaios com o BAE não é importante a lavagem do material.

Os rendimentos obtidos na sacarificação do bagaço extractado são baixos quando comparados com os estudos realizados por Ballesteros *et al* (2001) na sacarificação de polpa de azeitona que não sofreu qualquer pré-tratamento: 38% para 15 FPU/g substrato e 46% para 30 FPU/g substrato. Os mesmos autores obtiveram rendimentos de sacarificação de 40% e 55% em caroço de azeitona pré-tratado com explosão de vapor (10% (m/v) de substrato) para 15 e 30 FPU/g celulose, respectivamente.

Para se ter uma ideia da redução de sacarificação do bagaço extractado, pode fazer-se uma comparação com o ensaio controlo realizado sobre papel de filtro Whatman nº 1 (correspondente a 0% de água de lavagem), onde se atingem, após 72h de incubação, rendimentos de 75% e 60% na presença de 30 e 15 FPU/g substrato, respectivamente. Nos ensaios com o bagaço não lavado, após as 72h obtém-se rendimentos de 14% e 19% e para o bagaço lavado rendimentos de 19% e 22% para 15 e 30 FPU/g celulose, respectivamente. A redução na sacarificação da celulose pode dever-se tanto aos fenóis existentes no material, que se libertaram durante as experiências, facto que não sucedeu nos ensaios controlados, como também à disponibilidade da celulose ser superior num substrato como o papel de filtro, quando comparado com um substrato como o resíduo de bagaço, onde o tamanho da fracção do material e a presença de lenhina podem dificultar o acesso dos enzimas ao local de ataque e influenciar o processo de hidrólise enzimática.

7. Conclusões

- ✓ Os enzimas constituintes da Celluclast 1.5L, endoglucanase, exoglucanase e celobiase, apresentam massas moleculares de cerca de 50kDa;
- ✓ O Consórcio enzimático Celluclast 1.5L foi caracterizado como tendo uma actividade entre 42 e 47 FPU/g mL; 217 CMC/mL para a endoglucanase; e 7CB/mL para a celobiase;
- ✓ As águas utilizadas na lavagem do resíduo de bagaço de azeitona pré-tratado apresentam uma quantidade significativa de fenóis (cerca de 2g eq. ácido gálico/L) que influenciam a actividade da Celluclast 1.5L em ensaios controlados usando papel de filtro Whatman nº 1 como substrato;
- ✓ Esta redução na actividade do enzima, mais notória com 100% de água de lavagem, é indicativa de que seria necessário um passo de lavagem do material lenhocelulósico após o pré-tratamento;
- ✓ Com o bagaço extractado obtiveram-se rendimentos de sacarificação muito baixos em relação a ensaios controlo do enzima sobre papel de filtro, que podem ser devidos à presença de fenóis e à menor disponibilidade da celulose no material lenhocelulósico;
- ✓ O processo de sacarificação não foi alterado pela lavagem do bagaço após sofrer auto-hidrólise.

8.Referências bibliográficas

Alba, J. (1994); Nuevas tecnologías para la obtención del aceite de oliva; *Fruticultura Professional*. 62, 85–95

Avillez, F., Jorge, MN., Montes, D., Brandão, AP., Campilho, P.; (2009); Sustentabilidade da Produção de Bioetanol em Portugal; AGROGES Sociedade de Estudos e Projectos

Bailey BK; (1996); Performance of ethanol as a transportation fuel. In: Wyman CE (ed) Handbook on bioethanol: production and utilization. Taylor & Francis, Bristol, Pa. pp 37–60

Ballesteros, I., Oliva, J. M., Sáez, F., and Ballesteros, M. (2001); Ethanol production from lignocellulosic by-products of olive oil extraction; *Appl. Biochem. Biotechnol.* 91–93, 237–252.

Ballesteros, I.; Oliva, JM; Negro, MJ; Manzanares, P.; Ballesteros, M.; (2002); Ethanol Production from Olive Oil Extraction Residue Pretreated with Hot Water; *Appl. Biochem. Biotechnol*; Vols. 98–100, pp 717-732

Barbosa, LCA; Maltha, CRA; Silva, VL; Colodette, JL; (2008); Determinação da relação siringila/guaiacila da lignina em madeiras de eucalipto por pirólise acoplada à cromatografia gasosa e espectrometria; *Quím. Nova*; Vol. 31, No. 8, 2035-2041

Battinelli, L.; Daniele, C.; Cristiani, M.; Bisignano, G.; Saija, A. & Mazzanti, G. (2006). In vitro antifungal and anti-elastase activity of some aliphatic aldehydes from *Olea europaea* L. fruit. *Phytomedicine*, 13, 558-563.

Béguin, P., Aubert, J.-P., (1994), The biological degradation of cellulose; *FEMS Microbiol. Rev.* 13, 25–58

Bélafi-Bakó, K., Koutinas, A., Nemestóthy, N., Gubicza, L., Webb, C.; (2006); Continuous enzymatic cellulose hydrolysis in a tubular membrane reactor; *Enzyme and Microbial Technology*; 38, 155-161;

Bhat, M. K.; Bhat, S.; (1997); Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications; *Biotechnol. Adv.*, 15, 583.

Bisignano, G.; Tomaino, A.; Lo Cascio, R.; Crisafi, G.; Uccelle, N. & Saija, A. (1999). On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 51, 971-974.

Castro, AM; Pereira, N.; (2009); Produção, propriedades e aplicação de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais; *Quím. Nova*; publicado na web em 25/11/09

Curinha, JVCM; (2008); Adição de produtos químicos e ensaios de electrocoagulação e electro-oxidação para o (pré) tratamento das águas residuais provenientes dos lagares de produção de azeite; Dissertação apresentada na FCT/UNL para obtenção do Grau de Mestre

Diagnóstico Sectorial – Olivicultura; (2007); Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas; Gab. Planeamento e Políticas

Duff, S.J.B., Murray, W.D., (1996); Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: a review; *Bioresour. Technol*; 55, 1–33

Dyne, D. L. V.; Blase, M. G.; Clements, L. D.; (1999); A strategy for returning agriculture and rural America to long-term full employment using biomass refineries. In *Perspectives on New Crops and New Uses*; Janick, J., Ed.; ASHS Press: Alexandria, VA

Escária, S.C.; (2008); Análise do impacto potencial das exigências da sustentabilidade na difusão dos biocombustíveis; Departamento de Prospectiva e Planeamento e Relações Internacionais; *da Sphera*.

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

Furneri, P. M.; Marino, A.; Saija, A.; Uccella, N. & Bisignano, G. (2002). In vitro antimycoplasmal activity of oleuropein. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 20, 293-296.

Galbe, M., Zacchi, G.; (2002); A review of the production of ethanol from softwood; *Appl Microbiol Biotechnol*; 59:618–628

Ghose, T.K.; (1987); Measurement of cellulase activities; *Pure and Applied Chemistry*; Vol. 59, No.2, pp 257-268;

Henrissat, B. A.; (1991); A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities; *Biochem. J.*, 280, 309

Holtzapple, M.T., Humphrey, A.E., Taylor, J.D., (1989); Energy requirements for the size reduction of poplar and aspen wood. *Biotechnol. Bioeng.* 33, 207–210.

Jeffries, TW; (1994); Biodegradation of lignin and hemicelluloses, In: Ratledge C (ed.) *Biochemistry of microbial degradation*. Kluwer, Dordrecht, pp 233–277

Kamm, B.; Kamm; M.; (2004); Principles of biorefinery. *Appl. Microbiol. Biotechnol*; 64, 137-145

Kleman-Leyer, K. M.; Siika-Aho, M.; Teeri, T. T.; Kirk, T. K.; (1996); The Cellulases Endoglucanase I and Cellobiohydrolase II of *Trichoderma reesei* Act Synergistically To Solubilize Native Cotton Cellulose but Not To Decrease Its Molecular Size; *App. Environ. Microbiol.*, 62, 2883

Kubicek, C. P.; (1992); The Cellulase Proteins of *Trichoderma reesei*: Structure, Multiplicity, Mode of Action and Regulation of Formation; *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*; Vol. 45; pp 1-27

Lynd, L. R.; Weimer, P. J.; van Zyl, W. H.; Pretorius, I. S.; (2002); Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology; *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 66, 506

Mandels, M.; Reese, E. T.; (1957); Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon sources and metals; *J. Bacteriol.*, 73, 269.

McMillan, J.D., (1994); Pretreatment of lignocellulosic biomass. In: Himmel, M.E., Baker, J.O., Overend, R.P. (Eds.), *Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production*. American Chemical Society, Washington, DC, pp. 292–324.

Morais, SAL; Nascimento, EA; Melo, DC; (2005); Análise da madeira de *Pinus oocarpa* parte i – estudo dos constituintes macromoleculares e extractivos voláteis; *R. Árvore, Viçosa-MG*, v.29, n.3, p.461-470

National Renewable Energy Laboratory. Conceptual biorefinery. Disponível em <http://www.nrel.gov/biomass/biorefinery.html> (August 1, 2005).

Pérez, J.; Muñoz-Dorado, J.; Rubia, T.; Martínez, J.; (2002); Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicelluloses and lignin: an overview; *Int Microbiol*; 5: 53–63

Reese, E. T.; (1976); History of the cellulase program at the U.S. army Natick Development Center; *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, 6, 9.

Renewable Fuels Association; disponível em <http://www.ethanolrfa.org/pages/statistics#E>; acessado em 4 de Abril de 2011

Roig A., Cayuela M.L., Sánchez-Monedero M.A.; (2006); An overview on olive mill wastes and their valorisation methods; *Waste Management*; 26 960–969

Santos, JRA; Souto-Maior, AM; Gouveia, ER; Martín, C; (2010); Comparação entre processos em SHF e em SSF de bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae*; *Quim. Nova*, Vol. 33, No. 4, 904-908;

Savarese, M; De Marco, E; Sacchi, R; (2007); Characterization of phenolic extracts from olives (*Olea europaea* cv. *Pisciottana*) by electrospray ionization mass spectrometry; *Food Chemistry* 105; 761–770

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

Tolan, J. S.; (2002); logen's process for producing ethanol from cellulosic biomass; *Clean Technol. Environ. Policy*, 3, 339

Tyson, K. S.; Bozell, J.; Wallace, R.; Petersen, E.; Moens, L.; Biomass oil analysis: research needs and recommendations. NREL Technical Report. Disponível em <http://www.eere.energy.gov/biomass/pdfs/34796.pdf> (August 1, 2005)

Uzun, B. B.; Pütün, A. E.; Pütün, E.; (2007); Composition of products obtained via fast pyrolysis of olive-oil residue: Effect of pyrolysis temperature; *J. Anal. Appl. Pyrolysis*; 79; 147–153

Visioli F, Caruso D, Grande S, Bosisio R, Villa M, Galli G, Sirtori C, Galli C. (2005) Virgin Olive Oil Study (VOLOS): vasoprotective potential of extra virgin olive oil in mildly dyslipidemic patients. *European Journal of Nutrition* 44, 121-127

Wheals AE, Basso LC, Alves DMG, Amorim HV; (1999); Fuel ethanol after 25 years; *Trends Biotechnol*; 17:482–487

Wyman CE; (1996); Ethanol production from lignocellulosic biomass: overview. In: Wyman CE (ed) Handbook on bioethanol: production and utilization; Taylor & Francis, Bristol, Pa. pp 1–18

Zhang, Y. H. P.; Lynd, L. R.; (2004); Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Non-complexed cellulase systems; *Biotechnol. Bioeng.*, 88, 797

ANEXOS

A1. Curvas de calibração

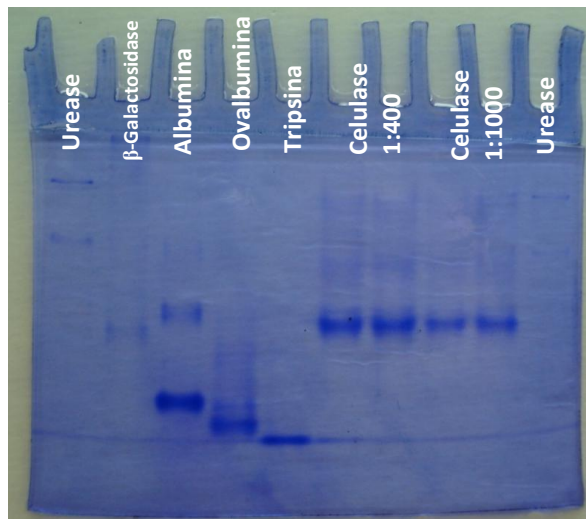


Figura 36: Gel da electroforese PAGE-Nativa das amostras de celulase com duas diluições diferentes e dos padrões utilizados na construção da curva de calibração das proteínas.

Tabela 9: Registo das massas moleculares e respectiva mobilidade (Rf) para cada proteína usada na curva de calibração da electroforese PAGE-Nativa

Proteína	Massa molecular (Da)	log (Massa molecular)	Mobilidade (Rf)
Urease	480000	5,681	0,177
β-galactosidase	116000	5,064	0,645
Albumina	66000	4,820	0,871
Ovalbumina	45000	4,653	0,952
Tripsina	20000	4,301	1,000

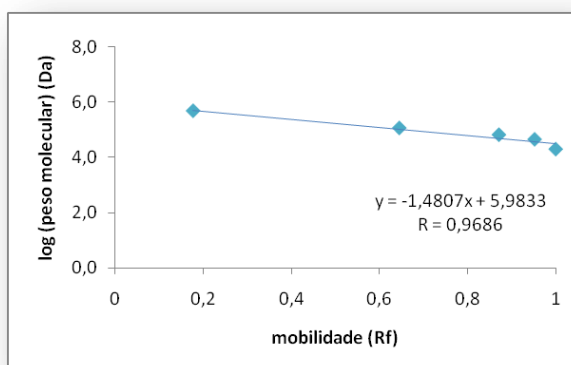


Figura 37: Representação gráfica da curva de calibração das proteínas obtida por electroforese PAGE-Nativa.

Tabela 10: Registo das massas moleculares e respectivos tempos de retenção para cada proteína usada na curva de calibração obtida por SEC-UV-RI-HPLC.

Proteína	Massa molecular (Da)	log (Massa molecular)	Tempo retenção (minutos)			Média
Tripsina	20000	4,301	12,795	12,795	12,799	12,796 ± 0,002309
Ovalbumina	45000	4,653	11,820	11,862	11,820	11,834 ± 0,024249
Albumina	66000	4,820	11,587	11,603	11,597	11,596 ± 0,008083
Urease	480000	5,681	9,960	9,900	9,913	9,924 ± 0,031565

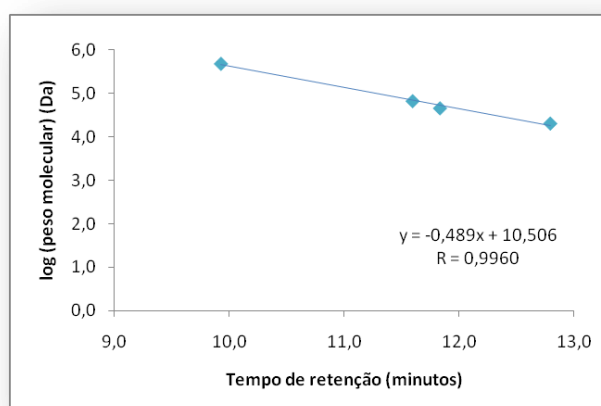


Figura 38: Representação gráfica da curva de calibração das proteínas obtida por SEC-UV-RI-HPLC. Os valores representam a média ± desvio padrão (n=3).

Tabela 11: Valores de absorvância registados para a construção da curva de calibração dos glúcidos redutores pelo método do DNS.

[Glúcidos redutores] mg/mL	Abs _{540nm}		Média
0,0	0,000	-0,001	-0,0005 ± 0,000707
1,0	0,361	0,343	0,352 ± 0,012728
2,0	0,775	0,741	0,758 ± 0,024042
4,0	1,559	1,547	1,553 ± 0,008485
8,0	2,820	2,806	2,813 ± 0,009899

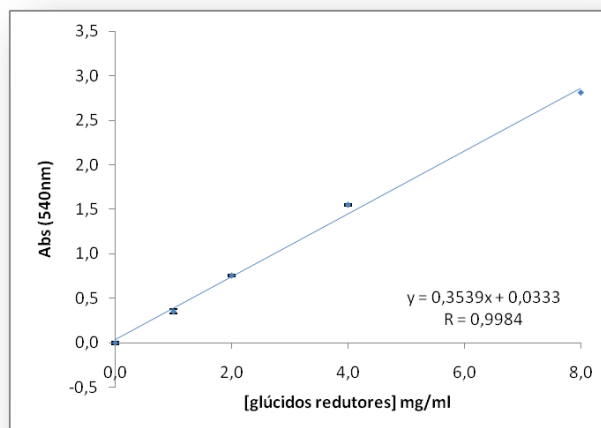


Figura 39: Curva de calibração dos glúcidos redutores referente ao método de DNS. Os valores representam a média \pm desvio padrão (n=2).

Tabela 12: Valores de áreas registadas por RI-HPLC para a construção da curva de calibração da glucose.

[Glucose] mg/mL	Área pico					Média
0,0	0	0	0	0	0	0
1,0	639078	485853	488483	491680	491257	519270,2 \pm 59940,68
2,5	1538240	1406229	1243972	1402594	1418481	1401903 \pm 93620,51
5,0	2631615	2542980	2575760	2551648	2555699	2571540 \pm 31903,34
15,0	7386826	7188048	7237912	7220207	7260521	7258703 \pm 68301,02

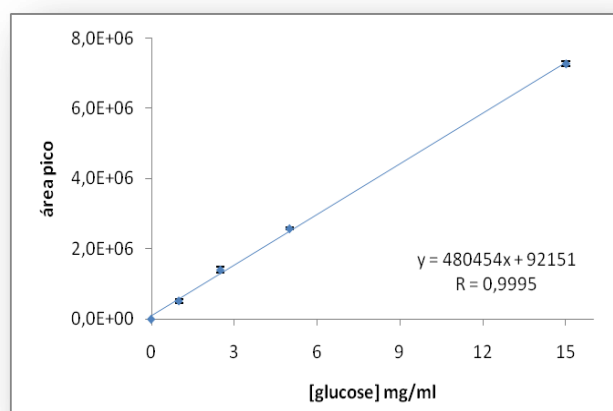


Figura 40: Curva de calibração da glucose obtida por RI-HPLC. Os valores representam a média \pm desvio padrão (n=5).

Tabela 13: Valores de áreas registadas por RI-HPLC para a construção da curva de calibração da celobiose.

[Celobiose] mg/mL	Área pico					Média
0,0	0	0	0	0	0	0
1,0	473385	477268	475625	480628	481310	477643,2 ± 3342,926
2,5	1573745	1532199	1106335	1530386	1543040	1457141 ± 196874,7
5,0	2854580	2811230	2847420	2804593	2808741	2825313 ± 23704,2
15,0	7635088	7521780	7531367	7547293	7587535	7564613 ± 46722,82

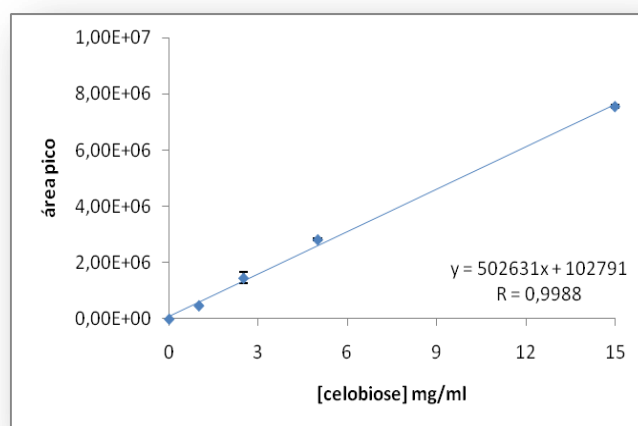


Figura 41: Curva de calibração da celobiose obtida por RI-HPLC. Os valores representam a média ± desvio padrão (n=5).

Tabela 14: Valores de áreas registadas por RI-HPLC para a construção da curva de calibração da xilose.

[Xilose] mg/mL	Área pico
0	245511
0,5	458885
1	1093290
2,5	2309050
5	3406006
7,5	245511

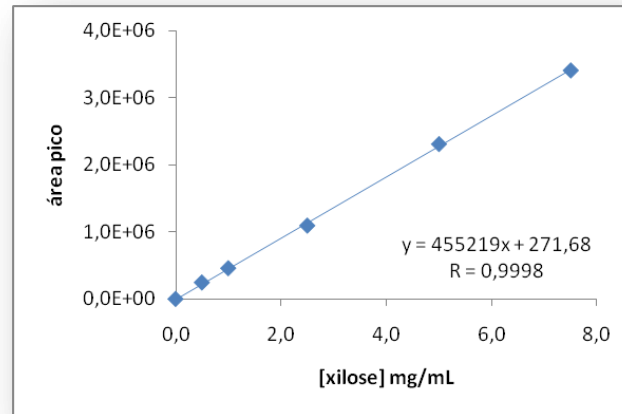


Figura 42: Curva de calibração da xilose obtida por RI-HPLC.

A2.Cromatogramas

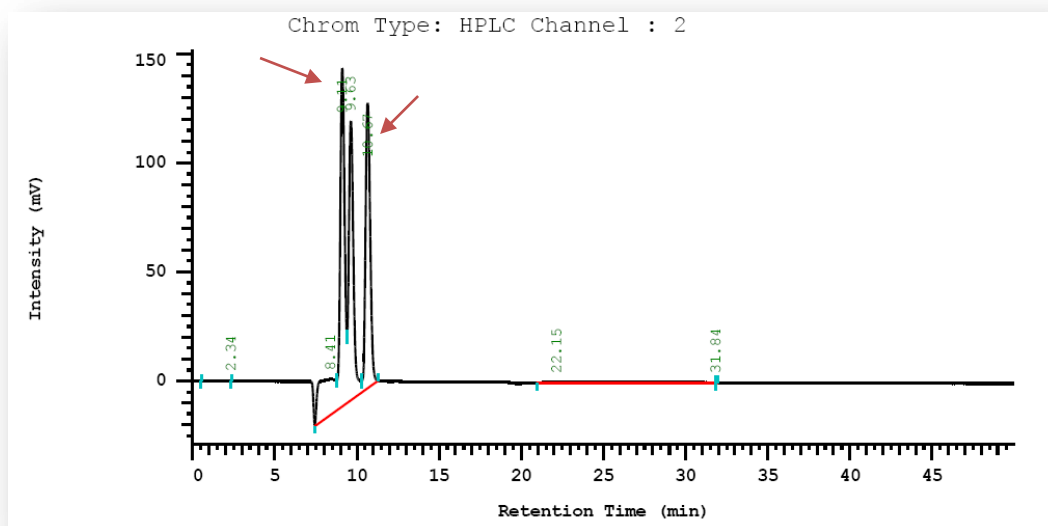


Figura 43: Cromatograma obtido por RI-HPLC dos padrões glucose (Tr = 10,67 minutos) e celobiose (Tr = 9,11 minutos) para a construção da curva de calibração.

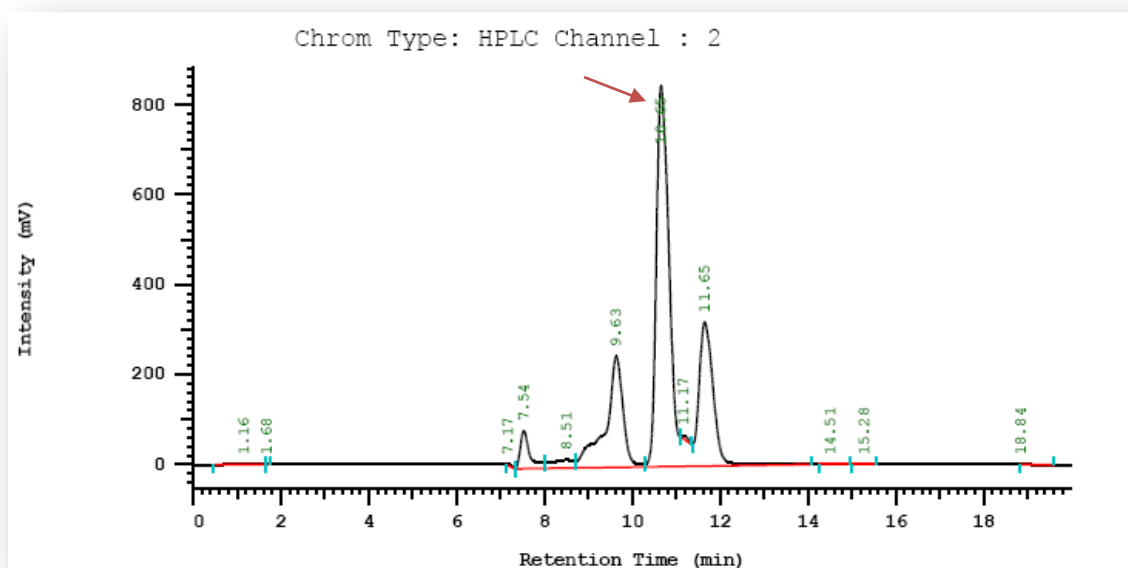


Figura 44: Cromatograma obtido por RI-HPLC de uma amostra após 72h de incubação com 30 FPU/g substrato de celulase com 0% de água de lavagem, em que é possível observar o pico correspondente à glucose (Tr = 10,65 minutos).

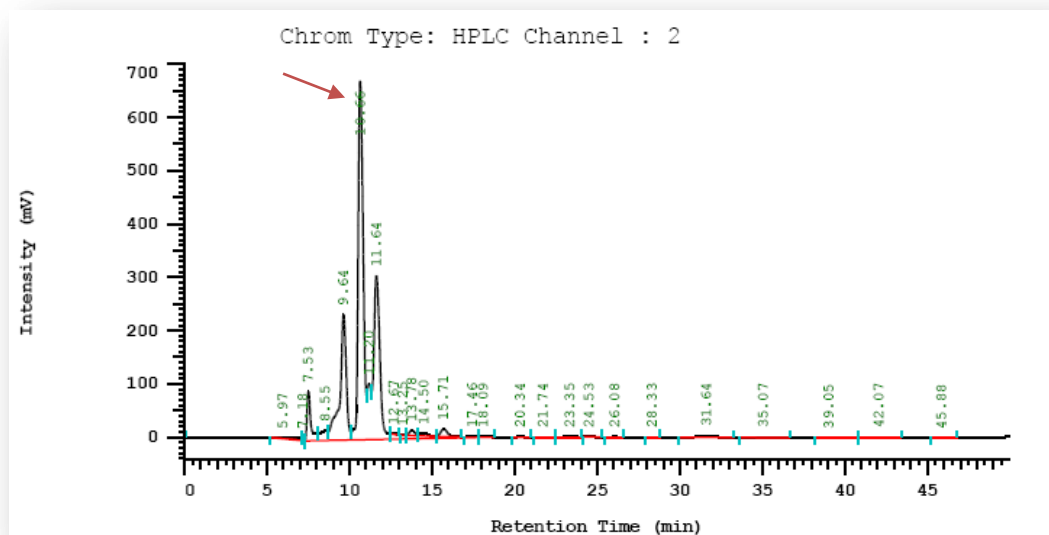


Figura 45: Cromatograma obtido por RI-HPLC de uma amostra após 72h de incubação com 30 FPU/g substrato de celulase na presença de 100% de água de lavagem do resíduo, em que é possível observar o pico correspondente à glucose (Tr = 10,66 minutos).

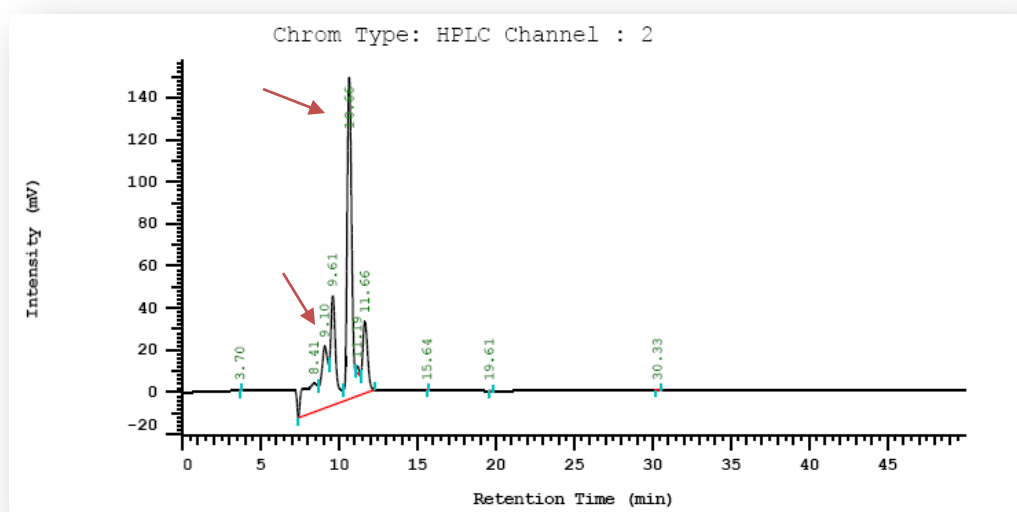


Figura 46: Cromatograma obtido por RI-HPLC de uma amostra após 72h de incubação com 15 FPU/g substrato de celulase na presença de 0% de água de lavagem do resíduo, em que é possível observar os picos correspondentes à glucose (Tr = 10,66 minutos) e à celobiose (Tr = 9,10 minutos).

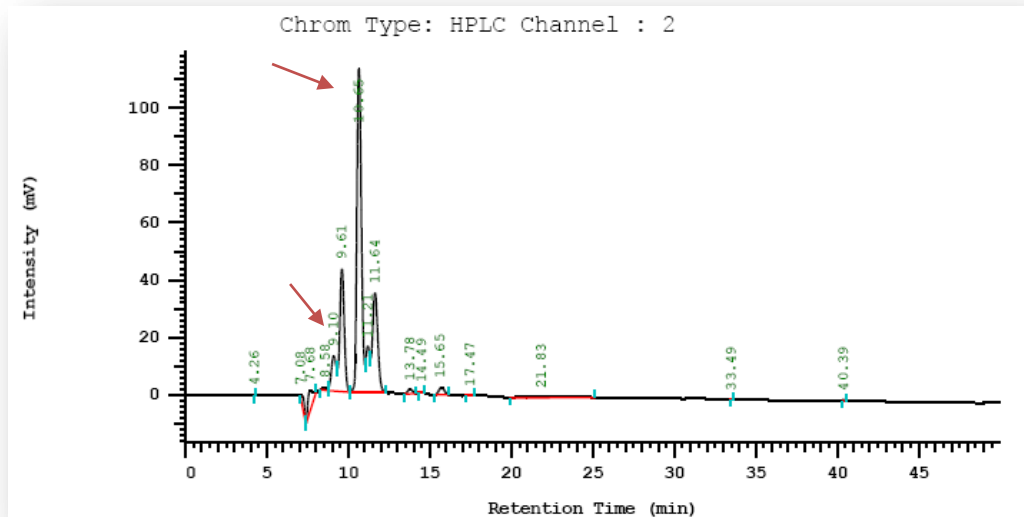


Figura 47: Cromatograma obtido por RI-HPLC de uma amostra após 72h de incubação com 15 FPU/g substrato de celulase na presença de 100% de água de lavagem do resíduo, em que é possível observar os picos correspondentes à glucose (Tr = 10,65 minutos) e à celobiose (Tr = 9,10 minutos).

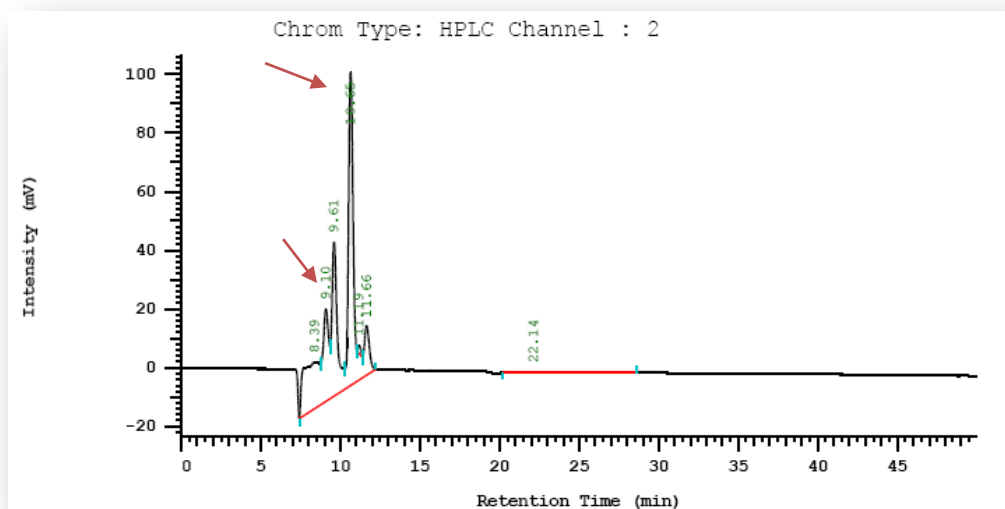


Figura 48: Cromatograma obtido por RI-HPLC de uma amostra após 72h de incubação com 7,5 FPU/g substrato de celulase na presença de 0% de água de lavagem do resíduo, em que é possível observar os picos correspondentes à glucose (Tr = 10,66 minutos) e à celobiose (Tr = 9,10 minutos).

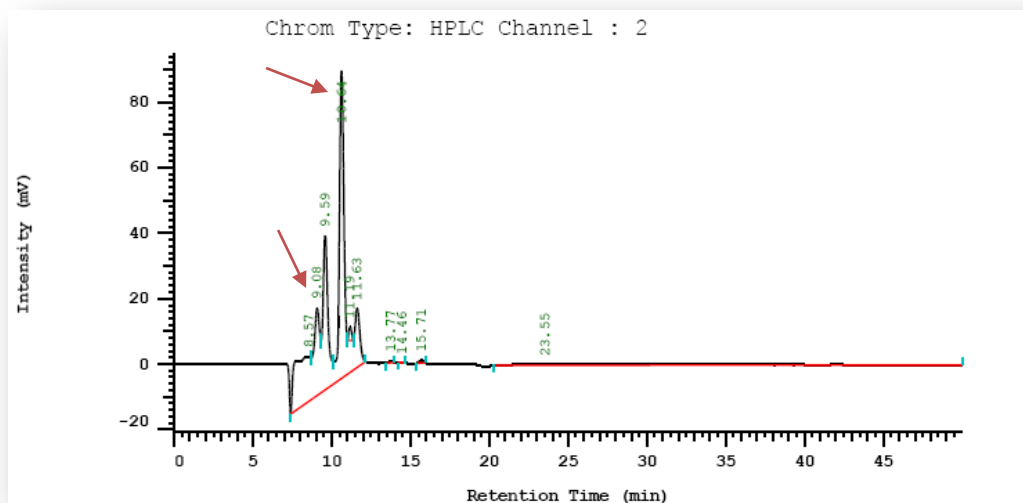


Figura 49: Cromatograma obtido por RI-HPLC de uma amostra após 72h de incubação com 7,5 FPU/g substrato de celulase na presença de 100% de água de lavagem do resíduo, em que é possível observar os picos correspondentes à glucose (Tr = 10,64 minutos) e à celobiose (Tr = 9,08 minutos).

A3. Determinação da actividade do consórcio das celulases sobre papel de filtro

Tabela 15: Diluições de celulase utilizadas e respectivas massas de glúcidos redutores obtidas na determinação da actividade do enzima sobre papel de filtro (ensaio referente a Fevereiro).

Diluição celulase	log (1/dil)	m (glúcidos redutores) mg		Média massas (mg)
1:16	- 1,20412	6,235	6,861	6,548 ± 0,4431
1:32	- 1,50515	4,222	4,900	4,561 ± 0,4795
1:64	- 1,80618	2,969	3,707	3,338 ± 0,5220
1:128	- 2,10721	1,990	1,492	1,741 ± 0,3520

Tabela 16: Diluições de celulase utilizadas e respectivas massas de glúcidos redutores obtidas na determinação da actividade do enzima sobre papel de filtro (ensaio referente a Junho).

Diluição celulase	log (1/dil)	m (glúcidos redutores) mg		Média massas (mg)
1:32	- 1,50515	4,587	4,514	4,550 ± 0,0516
1:64	- 1,80618	3,592	2,671	3,131 ± 0,6516
1:128	- 2,10721	2,014	2,114	2,064 ± 0,0710

Tabela 17: Diluições de celulase utilizadas e respectivas massas de glúcidos redutores obtidas na determinação da actividade do enzima sobre papel de filtro (ensaio referente a Julho).

Diluição celulase	log (1/dil)	m (glúcidos redutores) mg		Média massas (mg)
1:16	- 1,20412	5,043	5,380	5,212 ± 0,2387
1:32	- 1,50515	4,605	4,495	4,550 ± 0,0774
1:64	- 1,80618	2,789	3,638	3,214 ± 0,6000
1:128	- 2,10721	1,749	1,703	1,726 ± 0,0323

A4. Determinação da actividade da Endoglucanase sobre carboximetilcelulose

Tabela 18: Diluições de celulase utilizadas e respectivas massas de glucose obtidas na determinação da actividade da endoglucanase sobre carboximetilcelulose.

Diluição celulase	log (1/dil)	m (glucose) mg		Média massas (mg)
1:64	- 1,80618	-	0,947	0,947
1:128	- 2,10721	0,843674	0,765	0,804 ± 0,0559
1:256	- 2,40824	0,722019	0,698	0,710 ± 0,0172
1:512	- 2,70927	0,594282	0,625	0,609 ± 0,0215
1:1024	- 3,0103	0,557786	0,533	0,546 ± 0,0172

A5. Determinação da actividade da Celobiase

Tabela 19: Diluições de celulase utilizadas e respectivas massas de glucose obtidas na determinação da actividade da celobiase sobre celobiose.

Diluição celulase	log (1/dil)	m (glucose) mg		Média massas (mg)
1:16	- 1,20412	2,383	2,489	2,436 ± 0,074881
1:32	- 1,50515	1,865	1,842	1,853 ± 0,015943
1:64	- 1,80618	1,251	1,141	1,196 ± 0,077523
1:128	- 2,10721	0,382	0,419	0,401 ± 0,026381

A6. Estudo do efeito da água de lavagem do resíduo do bagaço de azeitona a 50% e 100% na actividade enzimática das celulases

30 FPU/g substrato

Tabela 20: Valores de concentrações de glúcidos redutores obtidas ao longo do tempo de incubação com celulase 30 FPU/g substrato para cada concentração de água de lavagem

[Glú. redutores] mg/mL	Água de lavagem											
	0%				50%				100%			
Tempo (h)				Média				Média				Média
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
24	18,274	-	17,624	17,949 ± 0,4596	15,880	16,530	16,474	16,295 ± 0,3600	13,083	15,146	14,750	14,326 ± 1,0947
48	35,490	37,044	37,836	36,790 ± 1,1932	32,721	32,297	34,134	33,051 ± 0,9617	19,158	19,667	17,830	18,885 ± 0,9483
72	40,802	52,388	48,432	47,207 ± 5,8889	41,565	38,514	43,459	41,179 ± 2,4950	22,068	28,031	27,042	25,713 ± 3,1952

Tabela 21: Valores de concentrações de glucose obtidas ao longo do tempo de incubação com celulase 30 FPU/g substrato para cada concentração de água de lavagem

[Glucose] mg/mL	Água de lavagem											
	0%				50%				100%			
Tempo (h)				Média				Média				Média
0	0,000	0,036	0,002	0,013 ± 0,0204	0,000	0,000	0,000	0,000	0,088	0,008	0,124	0,073 ± 0,0593
24	20,641		14,934	17,787 ± 4,0352	12,570	12,129	12,413	12,413 ± 0,2235	10,504	10,849	10,489	10,614 ± 0,2038
48	27,058	31,741	30,331	29,710 ± 2,4022	26,996	25,222	24,425	24,425 ± 1,3164	15,427	15,349	14,214	14,997 ± 0,6789
72	32,961	40,875	36,973	36,936 ± 3,9576	35,094	31,617	36,551	36,551 ± 2,5353	17,012	22,969	22,034	20,671 ± 3,2037

15 FPU/g substrato

Tabela 22: Valores de concentrações de glúcidos redutores obtidas ao longo do tempo de incubação com celulase 15 FPU/g substrato para cada concentração de água de lavagem

[Glú. redutores] mg/mL	Água de lavagem																	
	0%			Média			50%			Média			100%			Média		
Tempo (h)																		
0	0,000	0,000	0,000	0,000			0,000	0,000	0,000	0,000			0,000	0,000	0,000	0,000		
4	3,806	2,252	2,591	2,883 ± 0,8172			4,315	2,422	3,891	3,542 ± 0,9935			2,713	2,034	3,871	2,873 ± 0,9287		
8	8,158	6,688	8,271	7,706 ± 0,8828			8,675	7,318	8,873	8,289 ± 0,8460			6,640	5,934	8,251	6,942 ± 1,1876		
24	20,478	19,065	19,376	19,639 ± 0,7424			21,786	20,260	21,786	21,277 ± 0,8810			15,287	18,056	18,452	17,265 ± 1,7243		
28	25,705	27,344	27,542	26,864 ± 1,0082			20,514	23,962	27,974	24,150 ± 3,7334			21,984	16,558	21,701	20,081 ± 3,0540		
32	26,722	27,259	24,942	26,308 ± 1,2128			22,379	15,880	30,715	22,991 ± 7,4363			22,634	22,492	23,114	22,747 ± 0,3259		
48	34,888	36,273	32,939	34,700 ± 1,6751			36,281	34,021	35,292	35,198 ± 1,1332			30,461	27,381	28,454	28,765 ± 1,5633		
56	40,059	34,888	47,943	40,964 ± 6,5741			41,707	36,988	40,294	39,663 ± 2,4219			35,151	28,002	33,004	32,052 ± 3,6682		
72	50,486	47,576	52,916	50,326 ± 2,6738			48,395	47,802	42,009	46,069 ± 3,5282			35,038	35,377	36,084	35,500 ± 0,5334		

Tabela 23: Valores de concentrações de glucose obtidas ao longo do tempo de incubação com celulase 15 FPU/g substrato para cada concentração de água de lavagem

[Glucose] mg/mL	Água de lavagem											
	0%				50%				100%			
Tempo (h)				Média				Média				Média
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,514	0,000	1,562	1,025 ± 0,8884
4	4,449	3,613	4,230	4,097 ± 0,4339	3,952	3,379	3,848	3,726 ± 0,3054	0,907	3,302	1,833	2,014 ± 1,2078
8	6,551	5,508	5,190	5,749 ± 0,7116	6,440	5,277	5,932	5,883 ± 0,5834	2,175	4,432	3,348	3,318 ± 1,1288
24	11,695	8,401	9,724	9,940 ± 1,6574	12,707	12,168	12,289	12,388 ± 0,2826	9,234	9,229	8,930	9,131 ± 0,1740
48	18,709	16,677	16,322	17,236 ± 1,2880	15,327	14,402	16,978	15,569 ± 1,3053	14,480	15,397	14,800	14,893 ± 0,4654
72	29,401	27,877	30,601	29,293 ± 1,3653	24,847	29,835	31,243	28,642 ± 3,3610	20,628	20,707	20,754	20,696 ± 0,0634

Tabela 24: Valores de concentrações de celobiose obtidas ao longo do tempo de incubação com celulase 15 FPU/g substrato para cada concentração de água de lavagem

[Celobiose] mg/mL	Água de lavagem											
	0%				50%				100%			
Tempo (h)				Média				Média				Média
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
4	4,135	3,826	4,320	4,093 ± 0,2494	3,428	2,960	3,186	3,191 ± 0,2341	0,000	0,000	0,000	0,000
8	4,691	4,402	4,439	4,511 ± 0,1573	3,944	3,734	3,984	3,887 ± 0,1341	1,110	-	1,047	1,078 ± 0,0450
24	5,840	5,127	5,671	5,546 ± 0,3725	4,935	5,096	5,016	5,016 ± 0,0805	1,337	1,285	1,076	1,233 ± 0,1377
48	6,433	6,030	6,168	6,210 ± 0,2047	5,119	5,286	5,242	5,216 ± 0,0861	1,221	1,478	1,176	1,292 ± 0,1631
72	7,063	6,764	7,210	7,012 ± 0,2272	5,674	6,263	5,940	5,959 ± 0,2949	1,535	1,772	1,470	1,592 ± 0,1591

7,5 FPU/g substrato

Tabela 25: Valores de concentrações de glúcidos redutores obtidas ao longo do tempo de incubação com celulase 7,5 FPU/g substrato para cada concentração de água de lavagem.

[Glú. redutores] mg/mL	Água de lavagem																						
	0%				Média				50%				Média				100%				Média		
Tempo (h)				Média				Média				Média				Média				Média			
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000			
3	0,712	0,000	0,000	0,237 ± 0,4109	0,347	0,286	0,955	0,529 ± 0,3700	1,746	0,408	0,590	0,914 ± 0,7257											
6	3,145	1,259	1,989	2,131 ± 0,9508	2,536	3,327	3,266	3,043 ± 0,4400	3,528	2,981	2,798	3,102 ± 0,3799											
24	12,391	10,201	13,485	12,026 ± 1,6725	10,444	11,539	9,897	10,627 ± 0,8362	10,706	13,321	10,401	11,476 ± 1,6051											
27	9,897	12,147	15,371	12,472 ± 2,7516	12,208	14,094	13,120	13,141 ± 0,9430	13,972	13,790	13,425	13,729 ± 0,2787											
30	15,432	13,911	14,884	14,742 ± 0,7702	13,911	16,953	11,113	13,992 ± 2,9206	11,253	14,903	14,538	13,564 ± 2,0101											
48	20,176	20,724	22,123	21,008 ± 1,0038	18,473	23,218	12,391	18,027 ± 5,4274	19,282	21,107	13,321	17,903 ± 4,0719											
51	22,914	24,678	18,777	22,123 ± 3,0286	23,461	23,522	21,210	22,731 ± 1,3173	17,518	20,377	22,324	20,073 ± 2,4171											
54	27,050	20,967	22,366	23,461 ± 3,1857	24,009	25,773	22,731	24,171 ± 1,5272	25,122	25,122	26,460	25,568 ± 0,7726											
72	24,799	29,970	24,738	26,502 ± 3,0028	27,172	27,415	21,940	25,509 ± 3,0928	23,644	26,685	25,955	25,428 ± 1,5877											

Tabela 26: Valores de concentrações de glucose obtidas ao longo do tempo de incubação com celulase 7,5 FPU/g substrato para cada concentração de água de lavagem.

[Glucose] mg/mL	Água de lavagem																						
	0%				Média				50%				Média				100%				Média		
Tempo (h)				Média				Média				Média				Média				Média			
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000			
24	12,753	10,802	13,365	12,307 ± 1,3386	6,580	7,803	6,579	6,987 ± 0,7066	9,604	9,663	8,858	9,375 ± 0,4488											
48	15,396	15,344	15,865	15,535 ± 0,2868	13,070	13,596	12,650	13,105 ± 0,4743	14,389	12,984	13,587	13,653 ± 0,7049											
72	23,615	22,291	20,741	22,216 ± 1,4385	19,126	20,788	19,898	19,938 ± 0,8314	19,302	19,684	16,442	18,476 ± 1,7718											

Tabela 27: Valores de concentrações de celbiose obtidas ao longo do tempo de incubação com celulase 7,5 FPU/g substrato para cada concentração de água de lavagem.

[Celbiose] mg/mL	Água de lavagem											
	0%			Média	50%			Média	100%			Média
Tempo (h)												
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
24	5,642	5,285	5,530	5,486 ± 0,1826	5,121	5,400	5,177	5,233 ± 0,1478	5,256	5,107	4,864	5,076 ± 0,1981
48	6,073	6,369	5,949	6,130 ± 0,2158	5,468	5,557	5,345	5,456 ± 0,1068	5,338	4,809	5,147	5,098 ± 0,2679
72	6,964	7,038	6,713	6,905 ± 0,1702	6,183	6,355	6,308	6,282 ± 0,0889	5,747	5,768	5,591	5,702 ± 0,0967

A7. Ensaio de sacarificação do resíduo de bagaço de azeitona extractado pré-tratado

Bagaço não lavado

Tabela 28: Concentrações de glucose, celobiose, xilose e glúcidos redutores obtidas ao longo das 168h de incubação do bagaço de azeitona extractado pré-tratado não lavado com celulase 15 FPU/g celulose.

[] mg/mL	Celobiose			Glucose			Xilose			Glúcidos redutores		
tempo (horas)	média			média			média			média		
0	0,000	0,000	0,000	0,227	0,262	0,245 ± 0,0245	0,834	0,728	0,781 ± 0,075	1,357	1,185	1,271 ± 0,1214
3	0,000	0,000	0,000	1,174	1,305	1,240 ± 0,0925	2,880	2,900	2,890 ± 0,0145	4,160	4,332	4,246 ± 0,1214
6	0,000	0,000	0,000	2,002	2,044	2,023 ± 0,0299	3,397	3,366	3,381 ± 0,0222	6,106	5,934	6,020 ± 0,1214
17	0,000	0,000	0,000	3,063	3,449	3,255 ± 0,2728	4,532	4,744	4,638 ± 0,1499	8,337	9,081	8,709 ± 0,5260
24	0,000	0,000	0,000	3,583	3,975	3,779 ± 0,2773	5,177	4,781	4,979 ± 0,2796	10,603	9,116	9,859 ± 1,0519
48	0,000	0,000	0,000	5,4543	4,477	4,966 ± 0,6911	6,878	5,767	6,323 ± 0,7854	13,579	11,861	12,720 ± 1,2146
72	0,000	0,505	0,2539 ± 0,3574	5,4023	5,530	5,466 ± 0,0901	6,067	6,821	6,444 ± 0,5329	12,261	15,824	14,042 ± 2,5188
168	0,632	0,536	0,584 ± 0,0675	9,526	10,028	9,777 ± 0,3552	10,428	9,870	10,149 ± 0,3947	20,108	20,394	20,251 ± 0,2023

Tabela 29: Concentrações de glucose, celobiose, xilose e glúcidos redutores obtidas ao longo das 168h de incubação do bagaço de azeitona extractado pré-tratado não lavado com celulase 30 FPU/g celulose.

[] mg/mL	Celobiose			Glucose			Xilose			Glúcidos redutores		
tempo (horas)	média			média			média			média		
0	0,000	0,000	0,000	0,421	0,565	0,493 ± 0,1016	0,000	0,000	0,000	1,586	1,586	1,586
3	0,000	0,000	0,000	2,376	2,420	2,398 ± 0,0308	0,530	0,193	0,361 ± 0,2380	2,925	5,911	4,418 ± 2,1120
6	0,000	0,000	0,000	3,133	2,764	2,949 ± 0,2605	0,939	0,913	0,926 ± 0,0182	6,072	7,559	6,815 ± 1,0519
17	0,000	0,000	0,000	4,123	3,984	4,054 ± 0,0984	2,040	2,149	2,095 ± 0,0770	7,056	10,203	8,629 ± 2,2253
24	0,000	0,000	0,000	5,398	5,384	5,391 ± 0,0094	2,601	1,939	2,270 ± 0,4678	12,709	11,679	12,194 ± 0,7283
48	0,000	0,000	0,000	7,113	6,279	6,696 ± 0,5893	2,595	3,058	2,827 ± 0,3271	14,437	14,322	14,380 ± 0,0809
72	0,000	0,000	0,000	7,791	7,823	7,807 ± 0,0224	3,868	3,779	3,823 ± 0,0633	17,195	16,451	16,823 ± 0,5260
168	0,000	0,000	0,000	14,354	13,685	14,020 ± 0,4733	7,066	9,433	8,250 ± 1,6737	22,127	22,569	22,348 ± 0,3124

Bagaco lavado

Tabela 30: Concentrações de glucose, celobiose, xilose e glúcidos redutores obtidas ao longo das 168h de incubação do bagaço de azeitona extractado pré-tratado lavado com celulase 15 FPU/g celulose.

[] mg/mL	Celobiose			Glucose			Xilose			Glúcidos redutores		
tempo (horas)	média			média			média			média		
0	0,000	0,000	0,000	0,463	0,593	0,528 ± 0,0917	0,372	0,466	0,419 ± 0,0664	1,220	0,800	1,010 ± 0,2968
3	0,000	0,000	0,000	1,763	1,494	1,629 ± 0,1902	1,352	1,305	1,328 ± 0,0330	3,755	3,361	3,558 ± 0,2783
6	0,000	0,000	0,000	1,637	1,679	1,658 ± 0,0301	1,668	1,748	1,708 ± 0,0563	4,031	4,451	4,241 ± 0,2968
17	0,000	0,000	0,000	2,871	2,416	2,643 ± 0,3223	2,525	2,457	2,491 ± 0,0480	6,383	5,989	6,186 ± 0,2783
24	0,000	0,000	0,000	3,067	3,272	3,170 ± 0,1448	2,545	2,727	2,636 ± 0,1285	7,096	7,227	7,162 ± 0,0928
48	0,000	0,000	0,000	3,986	4,888	4,437 ± 0,6377	2,967	4,036	3,501 ± 0,7556	11,581	10,020	10,800 ± 1,1038
72	0,000	0,000	0,000	5,011	8,160	6,586 ± 2,2266	4,232	4,767	4,500 ± 0,3780	10,413	11,016	10,715 ± 0,4263
168	0,632	0,536	0,584 ± 0,0675	7,590	7,866	7,728 ± 0,1955	5,969	5,747	5,858 ± 0,1569	12,563	13,097	12,830 ± 0,3778

Tabela 31: Concentrações de glucose, celobiose, xilose e glúcidos redutores obtidas ao longo das 168h de incubação do bagaço de azeitona extractado pré-tratado lavado com celulase 30 FPU/g celulose.

[] mg/mL		Celobiose			Glucose			Xilose			Glúcidos redutores		
tempo (horas)			média			média			média			média	
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,611	0,805 ± 1,1389	
3	0,000	0,000	0,000	1,237	2,000	1,619 ± 0,5399	0,000	0,000	0,000	0,000	0,625	0,312 ± 0,4419	
6	0,000	0,000	0,000	2,655	2,445	2,550 ± 0,1483	0,000	0,000	0,000	1,872	0,295	1,083 ± 1,1155	
17	0,000	0,000	0,000	4,360	4,708	4,534 ± 0,2462	1,197	1,208	1,202 ± 0,0077	4,254	6,093	5,174 ± 1,3005	
24	0,000	0,000	0,000	3,852	5,516	4,684 ± 1,1766	0,921	2,836	1,878 ± 1,3542	5,109	9,572	7,341 ± 3,1558	
48	0,000	0,000	0,000	4,239	5,801	5,020 ± 1,1045	0,850	1,361	1,106 ± 0,3613	5,121	5,963	5,542 ± 0,5953	
72	0,000	0,000	0,000	9,908	5,547	7,727 ± 3,0838	3,740	1,606	2,673 ± 1,5091	14,728	7,290	11,009 ± 5,2597	
168	0,000	0,505	0,253 ± 0,3574	12,457	11,890	12,173 ± 0,4013	4,026	7,385	5,706 ± 2,3757	13,906	11,133	12,519 ± 1,9610	

A8.Tratamento estatístico

Tabela 32: Análise de variância para as concentrações de glucose e glúcidos redutores, para uma concentração de celulase de 30 FPU/g substrato (nível de significância de 0,05).

		Soma dos quadrados	df	Média dos quadrados	F	Sig.
Glucose	Entre grupos	459,912	2	229,956	21,322	0,002
	Dentro grupos	64,709	6	10,785		
	Total	524,620	8			
Celobiose	Entre grupos	737,514	2	368,757	21,644	0,002
	Dentro grupos	102,226	6	17,038		
	Total	839,740	8			

Tabela 33: Comparações múltiplas para as concentrações de glucose e glúcidos redutores após 72h de incubação com celulase 30 FPU/g substrato para as concentrações de água de lavagem testadas.

Variável dependente	(I) % ág. lavagem	(J) % ág. lavagem	Diferença entre médias (I-J)	Erro padrão	Sig.
Glucose	0	50	2,515633	2,681389	0,638
		100	16,264800(*)	2,681389	0,002
	50	0	-2,515633	2,681389	0,638
		100	13,749167(*)	2,681389	0,005
	100	0	-16,264800(*)	2,681389	0,002
		50	-13,749167(*)	2,681389	0,005
Glúcidos redutores	0	50	6,028100	3,370228	0,251
		100	21,493867(*)	3,370228	0,002
	50	0	-6,028100	3,370228	0,251
		100	15,465767(*)	3,370228	0,009
	100	0	-21,493867(*)	3,370228	0,002
		50	-15,465767(*)	3,370228	0,009

* a diferença entre medias é significativa a um nível de 0,05.

Tabela 34: Análise de variância para as concentrações de glucose, celobiose e glúcidos redutores, para uma concentração de celulase de 15 FPU/g substrato (nível de significância de 0,05).

		Soma dos quadrados	df	Média dos quadrados	F	Sig.
Glucose	Entre grupos	137,454	2	68,727	15,662	0,004
	Dentro grupos	26,329	6	4,388		
	Total	163,782	8			
Celobiose	Entre grupos	49,555	2	24,777	453,560	0,000
	Dentro grupos	0,328	6	0,055		
	Total	49,883	8			
Glúcidos redutores	Entre grupos	349,645	2	174,823	26,379	0,001
	Dentro grupos	39,764	6	6,627		
	Total	389,409	8			

Tabela 35: Comparações múltiplas para as concentrações de glucose, celobiose e glúcidos redutores após 72h de incubação com celulase 15 FPU/g substrato para as concentrações de água de lavagem testadas.

Variável dependente	(I) % ág. lavagem	(J) % ág. lavagem	Diferença entre médias (I-J)	Erro padrão	Sig.
Glucose	0	50	0,651500	1,710379	0,924
		100	8,596700(*)	1,710379	0,006
	50	0	-0,651500	1,710379	0,924
		100	7,945200(*)	1,710379	00,00
	100	0	-8,596700(*)	1,710379	0,006
		50	-7,945200(*)	1,710379	0,008
Celobiose	0	50	1,053467(*)	0,190838	0,004
		100	5,420100(*)	0,190838	0,000
	50	0	-1,053467(*)	0,190838	0,004
		100	4,366633(*)	0,190838	0,000
	100	0	-5,420100(*)	0,190838	0,000
		50	-4,366633(*)	0,190838	0,000
Glúcidos redutores	0	50	4,257367	2,101949	0,187
		100	14,826267(*)	2,101949	0,001
	50	0	-4,257367	2,101949	0,187
		100	10,568900(*)	2,101949	0,006
	100	0	-14,826267(*)	2,101949	0,001
		50	-10,568900(*)	2,101949	0,006

* a diferença entre medias é significativa a um nível de 0,05.

Tabela 36: Análise de variância para as concentrações de glucose, celobiose e glúcidos redutores, para uma concentração de celulase de 7,5 FPU/g substrato (nível de significância de 0,05).

		Soma dos quadrados	df	Média dos quadrados	F	Sig.
Glucose	Entre grupos	21,308	2	10,654	5,417	0,045
	Dentro grupos	11,800	6	1,967		
	Total	33,108	8			
Celobiose	Entre grupos	2,173	2	1,087	70,510	0,000
	Dentro grupos	0,092	6	0,015		
	Total	2,266	8			
Glúcidos redutores	Entre grupos	2,148	2	1,074	0,153	0,862
	Dentro grupos	42,206	6	7,034		
	Total	44,355	8			

Tabela 37: Comparações múltiplas para as concentrações de glucose, celobiose e glúcidos redutores após 72h de incubação com celulase 7,5 FPU/g substrato para as concentrações de água de lavagem testadas.

Variável dependente	(I) % ág. lavagem	(J) % ág. lavagem	Diferença entre médias (I-J)	Erro padrão	Sig.
Glucose	0	50	2,278033	1,145054	0,196
		100	3,739400(*)	1,145054	0,039
	50	0	-2,278033	1,145054	0,196
		100	1,461367	1,145054	0,457
	100	0	-3,739400(*)	1,145054	0,039
		50	-1,461367	1,145054	0,457
Celobiose	0	50	0,623500(*)	0,101357	0,002
		100	1,203367(*)	0,101357	0,000
	50	0	-0,623500(*)	0,101357	0,002
		100	0,579867(*)	0,101357	0,003
	100	0	-1,203367(*)	0,101357	0,000
		50	-0,579867(*)	0,101357	0,003
Glúcidos redutores	0	50	0,993533	2,165544	0,892
		100	1,074600	2,165544	0,876
	50	0	-0,993533	2,165544	0,892
		100	0,081067	2,165544	0,999
	100	0	-1,074600	2,165544	0,876
		50	-0,081067	2,165544	0,999

* a diferença entre medias é significativa a um nível de 0,05.

Tabela 38: Análise de variância para os rendimentos de produção de glucose para uma concentração de celulase de 30 FPU/g substrato (nível de significância de 0,05).

		Soma dos quadrados	df	Média dos quadrados	F	Sig.
Glucose	Entre grupos	1839,692	2	919,846	21,322	0,002
	Dentro grupos	258,838	6	43,140		
	Total	2098,530	8			

Tabela 39: Comparações múltiplas para os rendimentos de produção de glucose com celulase 30 FPU/g substrato para as concentrações de água de lavagem testadas.

Variável dependente	(I) % ág. Lavagem	(J) % ág. lavagem	Diferença entre médias (I-J)	Erro padrão	Sig.
Glucose	0	50	5,031333	5,362817	0,638
		100	32,530000*	5,362817	0,002
	50	0	-5,031333	5,362817	0,638
		100	27,498667*	5,362817	0,005
	100	0	-32,530000*	5,362817	0,002
		50	-27,498667*	5,362817	0,005

* a diferença entre medias é significativa a um nível de 0,05.

Tabela 40: Análise de variância para os rendimentos de produção de glucose e celobiose, para uma concentração de celulase de 15 FPU/g substrato (nível de significância de 0,05).

		Soma dos quadrados	df	Média dos quadrados	F	Sig.
Glucose	Entre grupos	549,824	2	274,912	15,664	0,004
	Dentro grupos	105,300	6	17,550		
	Total	655,124	8			
Celobiose	Entre grupos	792,850	2	396,425	453,449	0,000
	Dentro grupos	5,245	6	0,874		
	Total	798,096	8			

Tabela 41: Comparações múltiplas para os rendimentos de produção de glucose e celobiose com celulase 15 FPU/g substrato para as concentrações de água de lavagem testadas.

Variável dependente	(I) % ág. lavagem	(J) % ág. lavagem	Diferença entre médias (I-J)	Erro padrão	Sig.
Glucose	0	50	1,303333	3,420527	0,924
		100	17,193667*	3,420527	0,006
	50	0	-1,303333	3,420527	0,924
		100	15,890333*	3,420527	0,008
	100	0	-17,193667*	3,420527	0,006
		50	-15,890333*	3,420527	0,008
Celobiose	0	50	4,213667*	0,763433	0,004
		100	21,680000*	0,763433	0,000
	50	0	-4,213667*	0,763433	0,004
		100	17,466333*	0,763433	0,000
	100	0	-21,680000*	0,763433	0,000
		50	-17,466333*	0,763433	0,000

* a diferença entre medias é significativa a um nível de 0,05.

Tabela 42: Análise de variância para os rendimentos de produção de glucose e celobiose, para uma concentração de celulase de 7,5 FPU/g substrato (nível de significância de 0,05).

		Soma dos quadrados	df	Média dos quadrados	F	Sig.
Glucose	Entre grupos	85,237	2	42,618	5,416	0,045
	Dentro grupos	47,210	6	7,868		
	Total	132,446	8			
Celobiose	Entre grupos	34,768	2	17,384	70,469	0,000
	Dentro grupos	1,480	6	0,247		
	Total	36,248	8			

Tabela 43: Comparações múltiplas para os rendimentos de produção de glucose e celobiose com celulase 15 FPU/g substrato para as concentrações de água de lavagem testadas.

Variável dependente	(I) % ág. lavagem	(J) % ág. lavagem	Diferença entre médias (I-J)	Erro padrão	Sig.
Glucose	0	50	4,556000	2,290318	0,196
		100	7,479000*	2,290318	0,039
	50	0	-4,556000	2,290318	0,196
		100	2,923000	2,290318	0,457
	100	0	-7,479000*	2,290318	0,039
		50	-2,923000	2,290318	0,457
Celobiose	0	50	2,494000*	0,405532	0,002
		100	4,813333*	0,405532	0,000
	50	0	-2,494000*	0,405532	0,002
		100	2,319333*	0,405532	0,003
	100	0	-4,813333*	0,405532	0,000
		50	-2,3193333*	0,405532	0,003

* a diferença entre medias é significativa a um nível de 0,05.