

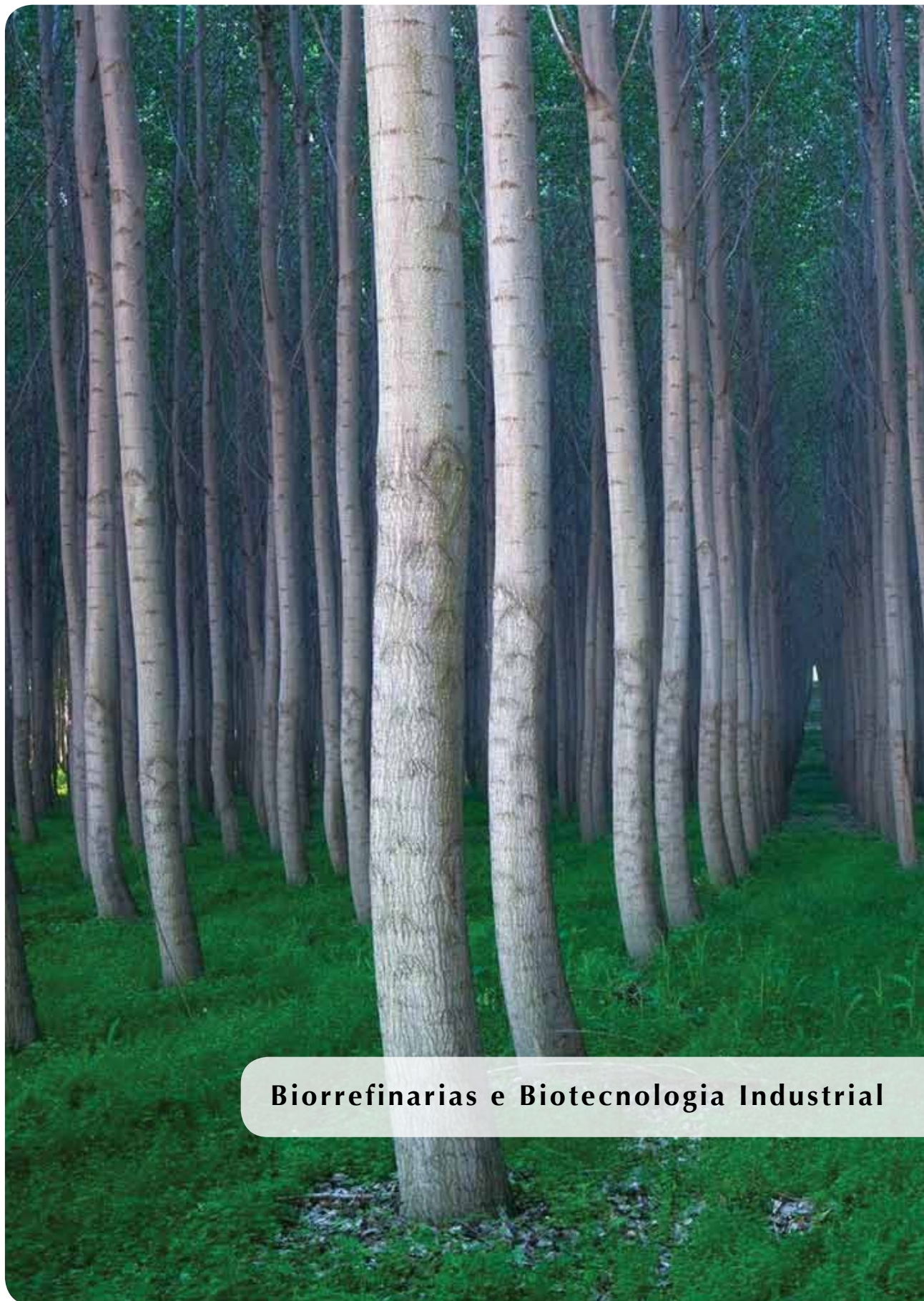
BOLETIM

spbt
sociedade
portuguesa de
biotecnologia

biotecnologia

Sociedade Portuguesa de Biotecnologia

Série 2 . Número 3 . Abril de 2013 . Publicação Quadrimestral ISSN 1645-5878



Biorrefinarias e Biotecnologia Industrial



Maximize your productivity

Introducing the only CO₂ incubator with a New Brunswick shaker inside

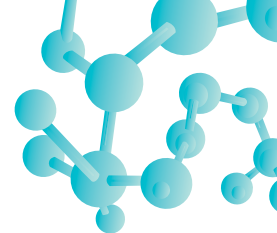
The New Brunswick S41i combines the best in laboratory shakers with advanced direct-heating CO₂ incubator technology to create the optimal environment for nonadherent cell culture applications. When it comes to better cell yield and viability as well as overall reliability, you won't find a better solution.

- > Highly stable cell culture environment for secure and reliable cell growth
- > Advanced touch screen display gives clear indication of chamber conditions
- > Sealed inner door and advanced control conserves gas, maintains accurate temperature
- > High temperature disinfection



www.eppendorf.com

eppendorf® is a registered trademark of Eppendorf AG, Hamburg, Germany. New Brunswick™ is a trademark of Eppendorf AG, Hamburg, Germany. All rights reserved, including graphics and photos. Copyright © 2012 by Eppendorf AG.



Biorrefinarias e Biotecnologia Industrial são expressões com um crescente impacto no nosso dia a dia e, como tal, a SPBT não podia deixar de publicar um Boletim centrado nestas temáticas. Com efeito, o desenvolvimento da **Biotecnologia Industrial** e a consequente implementação de **Biorrefinarias** constitui uma alternativa à utilização do petróleo na produção de produtos químicos. A utilização da biomassa como matéria-prima substituta do petróleo na produção de muitos produtos químicos permitirá a implementação de um sistema mais sustentável para a produção de produtos químicos e farmacêuticos e energia.

Naturalmente que a importância destes temas levou a que muitos investigadores em Portugal orientassem a sua atividade para as diferentes vertentes associadas ao desenvolvimento da Biotecnologia Industrial. A qualidade e a quantidade do trabalho de investigação desenvolvido exige a sua divulgação, motivo pelo qual se espera com a publicação deste boletim dar a conhecer o importante trabalho que tem vindo a ser feito pelos diferentes grupos de investigação em Portugal num tema da maior relevância para o desenvolvimento industrial sustentável.

Para concluir, gostaria de agradecer à Ligia Martins o excelente trabalho que desenvolveu e que permitiu a publicação desta edição centrada na Biotecnologia Industrial. Espero também que a publicação deste Boletim seja um desafio para que os sócios da SPBT contribuam ativamente para a publicação de outras edições em outras áreas de intervenção da Biotecnologia

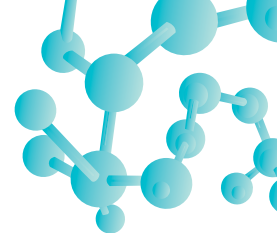
José Teixeira
(Presidente da SPBT)

Contamos com todos para uma
SPBT dinâmica e participativa



Índice

- 1 Editorial**
José A. Teixeira; Presidente da SPBT
- 3 A importância dos pré-tratamentos no conceito das biorrefinarias**
Héctor A. Ruiz, Aloja Romaní, Michele Michelin, José A. Teixeira
- 7 Métodos de fraccionamento de biomassa para as biorrefinarias**
Florabela Carvalheiro, Luís C. Duarte, Rafal Bogel-Lukasik, Patrícia Moniz
- 11 Biocatálise na despolimerização e valorização da lenhina**
Lígia O. Martins
- 13 Fibras celulósicas de alta qualidade por ozonificação catalítica promovida por enzimas**
Anatoly A. Shatalov
- 15 Pré-extracção de hemiceluloses da madeira - auto hidrólises modificadas e influência de tratamentos biológicos nas aparas de *Eucalyptus globulus* na performance da auto hidrólise**
Sara Fernandes, Alexandre Gaspar
- 17 Valorização da Biomassa, um instrumento ao desenvolvimento sustentável?**
Maria F. Duarte
- 19 Valorização integrada dos bioprodutos da indústria vitivinícola: Novas oportunidades de desenvolvimento regional**
Videira Romeu, Vera Cardoso, Francisco Peixoto
- 21 *Yarrowia lipolytica*: um fábrica celular no contexto de biorrefinaria**
Isabel Belo
- 25 Biorrefinaria de base lenhocelulósica: valorização do licor de cozimento ao sulfito ácido**
Luísa S. Serafim, Ana M.B.R. Xavier
- 29 Produção de Etanol a partir de Subproduto Cervejeiro**
Nuno G.T. Meneses, José A. Teixeira, Solange I. Mussatto
- 31 Biorrefinarias de microalgas**
Alberto Reis, Luísa Gouveia
- 33 Novos microorganismos para a produção de biohidrogénio**
Mónica Martins, Inês A. C. Pereira
- 35 Electrocatalise Microbiana: Uma plataforma versátil para processos industriais sustentáveis**
Luís F. Rosa, Sónia E. Neto, Alexandra S. Alves, Ricardo O. Louro
- 37 Polímeros derivados de fontes renováveis: materiais macromoleculares para o século XXI**
Alessandro Gandini, Talita M. Lacerda, Eliane Trovatti
- 41 Biorrefinaria de matérias-primas ricas em suberina: o reacender do interesse num biopolímero antigo**
Cristina Silva Pereira
- 45 Polihidroxialcanoatos: culturas mistas e fontes de substrato renovável como estratégias de sustentabilidade para a produção de bioplásticos**
Paulo Costa Lemos
- 49 Polímeros extracelulares de cianobactérias: características, produção e possíveis utilizações**
Sara B. Pereira, Rita Mota, Paula Tamagnini



A importância dos pré-tratamentos no conceito das biorrefinarias

Héctor A. Ruiz^{1,2}, Aloia Romaní¹, Michele Michelin^{1,3}, José A. Teixeira¹

¹ IBB - Instituto de Biotecnologia e Bioengenharia, Centro de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Campus de Gualtar, 4710-057 Braga, Portugal

² Departamento de investigação em Alimentos, Faculdade de Ciências Químicas, Universidade Autónoma de Coahuila, Av. Venustiano Carranza e J. Cárdenas s/n, 25280 Saltillo, Coahuila, México

³ Departamento de Biologia, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Av. Bandeirantes, 3900 - Monte Alegre Ribeirão Preto, 14040-901, São Paulo, Brasil

E-mail: hector_ruiz_leza@uadec.edu.mx

Resumo

Hoje em dia os pré-tratamentos precisam ser robustos, para num mesmo processo, se produzirem compostos de alto valor acrescentado e substratos para a conversão em biocombustíveis, como o etanol. Os processos hidrotérmico e organosolv reúnem as características para serem aplicados ao conceito de biorrefinaria. Neste trabalho, apresenta-se o fundamento e as aplicações dos dois pré-tratamentos.

Introdução

A procura global crescente por biocombustíveis reflecte-se no aumento da sua produção global que aumentou 17% em 2010, em relação a 2009 [1]. O grande interesse pelos biocombustíveis é a procura da independência dos combustíveis de origem fóssil. Uma alternativa para estes é a produção de bioetanol a partir de materiais lenhocelulósicos, chamados de segunda geração. No entanto, este processo ainda não é lucrativo e a sua comercialização ainda está em desenvolvimento. Isto deve-se a várias razões, tais como as diferentes políticas públicas nos vários países, mas também às dificuldades de natureza operacional inerentes ao processo. A produção mundial de bioetanol em 2012 foi de 82,567.40 milhões de litros [2]. Os biocombustíveis como o bioetanol apresentam ainda vantagens ambientais, económicas e até mesmo sociais. Perante este cenário, o bioetanol passará a constar de forma definitiva na agenda dos governos e das políticas de praticamente todos os países.

Por outro lado, nos últimos anos surgiu um conceito ou filosofia chamado biorrefinarias integradas, um conceito análogo ao das refinarias de petróleo [3]. Hoje em dia o papel das biorrefinarias centra-se na integração de processos tradicionais e modernos para a utilização de biomassa renovável na produção de energia e reagentes. Actualmente existem poucas plantas de biorrefinaria a operar em escala industrial. Inbicon, é considerada uma planta de biorrefinaria a nível de demonstração, localizada em Kalundborg, na Dinamarca. A fábrica converte 4 toneladas de palha de trigo por hora em bioetanol, além de melaço (usado principalmente em alimentos) e pellets de lenhina (utilizado na produção de calor e eletricidade) [3].

O processo geral da produção de bioetanol a partir de materiais lenhocelulósicos consiste em: 1) moagem de material, 2) pré-tratamento, 3) sacarificação enzimática e 4) bioconversão dos açúcares obtidos em bioetanol. Com base no

conceito de biorrefinaria, o pré-tratamento desempenha um papel fundamental nesta filosofia, uma vez que produz compostos de alto valor e substratos para a produção de biocombustíveis. Este trabalho concentra-se em diferentes tipos de pré-tratamentos para a produção de bioetanol e produtos de alto valor agregado a partir de materiais lenhocelulósicos, tendo em conta o conceito das biorrefinarias.

Biomassa lenhocelulósica

Os materiais lenhocelulósicos são as principais fontes de carboidratos e têm vindo a ser estudados como fonte de açúcares fermentáveis para a produção de biocombustíveis como bioetanol, biogás e biohidrogénio [4]. Estes materiais estão bastante disponíveis e são de baixo custo, podendo-se destacar, entre eles muitos resíduos agro-industriais. Ruiz et al. [3] reportaram uma listagem completa de materiais lenhocelulósicos. Dependendo da origem da matéria-prima, o material pode ser constituído por três componentes principais: celulose, hemicelulose e lenhina, principalmente. Portanto, este material é uma fonte importante para a obtenção de açúcares fermentáveis e uma alternativa para a produção de bioetanol da chamada segunda geração e outros compostos de alto valor.

Pré-tratamento: fundamentos

Nas últimas décadas houve um grande interesse na investigação no sentido de melhorar a hidrólise enzimática dos materiais lenhocelulósicos, com o intuito de tornar mais eficiente a conversão da celulose e hemicelulose em bioetanol, estando muitos estudos a ser realizados nos pré-tratamentos. Em teoria, o processo de pré-tratamento ideal no conceito de biorrefinaria deverá ser capaz de: 1) reduzir o tamanho das partículas lenhocelulósicas, 2) maximizar a recuperação de celulose, 3) obter um substrato susceptível a hidrólise enzimática, 4) evitar a formação de produtos de degradação dos

açúcares como ácido acético, furfural, hidroximetilfurfural e ácidos fenólicos (inibidores da fermentação), 5) deslenhificar e ao mesmo tempo preservar a hemicelulose, 6) recuperar os co-produtos de valor acrescentado [5]. Contudo, esta etapa de pré-tratamento aumenta o custo efectivo do processo global de conversão de materiais lenhocelulósicos, sendo uma das etapas mais dispendiosas de todo o processo. Deste modo, torna-se essencial aproveitar todos os produtos e co-produtos no processo de pré-tratamento, aplicando o conceito de biorrefinaria, o que ajudará a diminuir o impacto económico global e ambiental do processo de segunda geração.

A classificação dos pré-tratamentos está agrupado em: físicos (tratamento mecânico por trituração, moagem), físico-químicos (água líquida quente, explosão a vapor, alta energia de radiação, explosão por fibra de amónia), químicos (líquidos iónicos, peróxido de hidrogénio, ozónio, ácidos diluídos ou concentrados, bases alcalinas como hidróxido de sódio, organosolv com e sem catalisador, explosão a vapor com catalise), biológicos (fungos de degradação) e por último uma combinação dos mesmos pré-tratamentos [6]. Todavia, nenhum deles é considerado claramente superior aos restantes, já que é difícil avaliar e comparar as tecnologias dos pré-tratamentos. Cada um apresenta vantagens e desvantagens.

Pré-tratamentos promissores “autohidrólise e organosolv”

Desde há alguns anos, o nosso grupo de investigação no Centro de Engenharia Biológica da Universidade do Minho tem trabalhado com dois pré-tratamentos que atendem a filosofia de biorrefinarias: autohidrólise e organosolv.

O processo hidrotérmico (autohidrólise ou água líquida quente), é considerado um dos métodos mais promissores de pré-tratamento dos materiais lenhocelulósicos no conceito de biorrefinarias. Trata-se de um processo amigo do ambiente, que consiste na utilização de água a alta temperatura (geralmente entre 160 °C e 220 °C) e alta pressão, provocando o aumento da sua força iónica. Este método leva a uma despolimerização da hemicelulose, que é catalisada pelos iões hidrogénio gerados *in situ* pela autoionização da água e pelo ácido acético formado na reacção da mesma hemicelulose. Dependendo da severidade do processo (tempo e temperatura), o grau de polimerização da hemicelulose pode aumentar ou diminuir.

Deste processo resulta uma fase líquida, contendo principalmente hemicelulose, e uma fase sólida contendo celulose e lenhina. Além disso, diferentes quantidades de lenhina podem ser extraídas com água e em tais condições a celulose permanece praticamente intacta. O processo hidrotérmico não requer o uso de ácidos e, conseqüentemente, não há necessidade de se trabalhar com reactores altamente resistentes à corrosão, reduzindo o custo deste processo [3]. Uma abordagem comum para avaliar a intensidade do pré-tratamento hidrotérmico (autohidrólise) é o emprego do chamado factor de severidade (R_0), definido por Overend e Chornet [3]. Uma vez que R_0 depende da temperatura e do tempo, este factor pode ser usado para medir o efeito combinado de ambas as variáveis num dado tratamento.

Em seguida, são apresentados uma série de trabalhos realizados no nosso centro de investigação usando o processo de autohidrólise baseada no conceito de biorrefinaria (Fig. 1). Ruiz et al. [7] determinaram os efeitos na produção de bioe-

tanol usando como substrato a palha de trigo tratada com o processo de autohidrólise, obtendo um material muito susceptível à hidrólise enzimática e fermentação. Romaní et al. [5] estudaram a produção de bioetanol a partir da fracção celulósica de *Eucalyptus globulus* tratada por autohidrólise em regime não-isotérmico, obtendo altas conversões de glucose a etanol. Uma recente aplicação dos licores hemicelulósicos é a produção de enzimas (8). Michelin et al. [9] estudaram a produção de enzimas xilanases usando o licor (hidrolisado) hemicelulósico a partir de caroço de milho, sendo obtidos altos níveis de actividade de enzimas xilanases. Numa nova aplicação, Ruiz et al. [10] desenvolveram filmes usando a fracção hemicelulósica para reforçar as propriedades mecânicas e físicas da matriz polimérica de carreganano e da goma de alfarroba. Demonstrando a utilização desta fracção com base no conceito de biorrefinaria.

Outro pré-tratamento importante que tem atraído muito interesse é o processo de organosolv, também considerado como um processo amigo do ambiente comparado com o processo kraft e sulfito, já que estes processos têm algumas deficiências graves, tais como a poluição do ar e da água. O pré-tratamento de organosolv, é um método de deslenhificação que como o seu nome indica, usa solventes orgânicos (etanol, acetona, propanol, metanol, etilenoglicol, glicerol, ácido fórmico, ácido acético, etc.), que podem ser facilmente recuperados por destilação. Os solventes provocam a solubilização da lenhina, já que são muito mais selectivos e têm uma maior eficiência de extracção. Este processo consiste na utilização de altas temperaturas, geralmente entre 160 °C e 220 °C e de alta pressão, podendo ser operado na presença ou ausência de catalisador (hidróxido de sódio, ácidos minerais, ácido sulfúrico, ácido clorídrico, ácido fosfórico). O catalisador melhora o rendimento da deslenhificação e promove a quebra de ligações químicas da lenhina. Este pré-tratamento de organosolv, além de possuir vantagens económicas e ambientais, permite a recuperação de lenhinas por acidificação com elevada pureza e um alto grau de preservação da estrutura da lenhina. Tal como no processo hidrotérmico, existe também um parâmetro do processo para representar a temperatura e o tempo, chamado de H-factor [3].

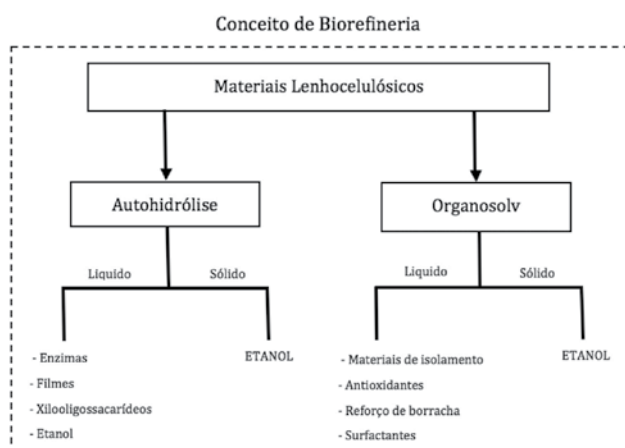


Figura 1: Esquema simplificado para os processos de autohidrólise e organosolv usando o conceito de biorrefinarias

Ruiz et al. [11] estudaram os efeitos da temperatura e tempo na extracção por acidificação de lenhina. Esta lenhina da palha de trigo foi extraída pelo processo de organosolv em meio alcalino e caracterizada por FTIR mostrando uma lenhina de alta pureza. A lenhina obtida pelo processo de

Chasing the next generation of Biofuel?

Become a pioneer with confidence using
Labfors 5 Lux & Labfors 5 BioEtOH



Our bioreactors for 2nd and 3rd generation biofuel research & development!

- Solutions for algae, plant material, solid phase & SSF cultivations
- Individual configuration for your application
- Intuitive operation and control
- Turnkey equipment usable "out of the box"
- Outstanding service and support from day 1



Labfors 5 Lux



Labfors 5 BioEtOH



Fisher Scientific

Rua Pedro Álvares Cabral, n.º24, 3.ºD

2670-391 Loures – Portugal

T +351 21 425 33 50/4, pt.fisher@thermofisher.com

We bring life to your laboratory.

INFORS HT

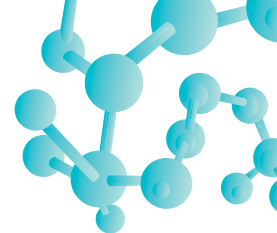
organosolv tem diversas aplicações: adesivos de madeira, compostos de moldagem, retardadores de chama, aditivos de combustível Diesel, aditivos de fabricação de papel, materiais de isolamento, surfactantes, extensores de asfalto, reforço de borracha, antioxidantes, derivados químicos da lenhina (Fig. 1). Romaní et al. [12] verificaram a susceptibilidade à hidrólise enzimática e fermentação na produção de bioetanol da celulose de *Eucalyptus globulus* obtida no processo de organosolv.

Conclusões

Neste trabalho, foram apresentados dois pré-tratamentos muito promissores para o conceito de biorrefinaria integrada, o processo hidrotérmico e organosolv. No primeiro, a hemicelulose é despolimerizada e no segundo a lenhina é solubilizada originando produtos de alto valor. Em ambos os casos também se gera um substrato para a produção de bioetanol, fechando um ciclo completo no conceito de biorrefinaria.

Referências

- [1] Biofuels Make a Comeback Despite Tough Economy. Disponível a partir de: www.worldwatch.org. Acesso [Fevereiro 9, 2013].
- [2] F.O Licht's World Ethanol and Biofuels Report.
- [3] Ruiz, H.A., Rodríguez-Jasso, R.M., Fernandes, B.D., Vicente, A.A., Teixeira, J.A. (2013) Hydrothermal processing, as an alternative for upgrading agriculture residues and marine biomass according to the biorefinery concept: A review. *Renewable Sustainable Energy Rev.* 21, 35-51.
- [4] Kaparaju, P., Serrano, M., Thomsen, A.B., Kongjan, P., Angelidaki, I. (2009) Bioethanol, biohydrogen and biogas production from wheat straw in a biorefinery concept. *Bioresour Technol.* 100, 2562-2568.
- [5] Romaní, A., Garrote, G., Alonso, J.L., Parajó, J.C. (2010) Bioethanol production from hydrothermally pretreated *Eucalyptus globulus* wood. *Bioresour Technol.* 101, 8706-8712.
- [6] Galbe, M., Zacchi, G. (2012) Pretreatment: the key to efficient utilization of lignocellulosic materials. *Biomass Bioenergy* 46, 70-78.
- [7] Ruiz, HA., Silva, DP., Ruzene, DS., Lima, LF., Vicente, AA., Teixeira, JA. (2012) Bioethanol production from hydrothermal pretreated wheat straw by a flocculating *Saccharomyces cerevisiae* strain – Effect of process conditions. *Fuel* 95, 528-536.
- [8] Michelin, M., Polizeli, MLTM., Ruzene, DS., Silva, DP., Vicente, AA., Jorge, JA., Terenzi, HF., Teixeira JA. (2012a) Xylanase and β -xylosidase production by *Aspergillus ochraceus*: New perspectives for the application of wheat straw autohydrolysis Liquor. *Appl Biochem Biotechnol.* 166, 336-347.
- [9] Michelin, M., Polizeli, MLTM., Ruzene, DS., Silva, DP., Ruiz, HA., Vicente, AA., Jorge, JA., Terenzi, HF., Teixeira JA. (2012b) Production of xylanase and β -xylosidase from autohydrolysis liquor of corn cob using two fungal strains. *Bioprocess Biosyst Eng.* 35, 1185-1192.
- [10] Ruiz, HA., Cerqueira, MA., Silva, HD., Rodríguez-Jasso, RM., Vicente, AA., Teixeira, JA. (2013) Biorefinery valorization of autohydrolysis wheat straw hemicellulose to be applied in a polymer-blend film. *Carbohydr Polym.* 92, 2154-2162.
- [11] Ruiz, HA., Ruzene, DS., Silva DP., Macieira da Silva, FF., Vicente, AA., Teixeira, JA. (2011) Development and characterization of an environmentally friendly process sequence (autohydrolysis and organosolv) for wheat straw delignification. *Appl Biochem Biotechnol.* 164, 629-641.
- [12] Romaní, A., Garrote, G., López, F., Parajó, J.C. (2011) *Eucalyptus globulus* wood fractionation by autohydrolysis and organosolv delignification. *Bioresour Technol.* 102, 5896-5904.



Métodos de fraccionamento de biomassa para as biorrefinarias

Florbela Carvalheiro, Luís C. Duarte, Rafal Bogel-Lukasik, Patrícia Moniz

Unidade de Bioenergia, LNEG-Laboratório Nacional de Energia e Geologia, I. P.
Estrada do Paço do Lumiar, 22, 1649-038 Lisboa, Portugal

E-mail: florbela.carvalheiro@lneg.pt

Resumo

O desenvolvimento de processos que permitam o fraccionamento eficiente da biomassa (tradicionalmente designados por pré-tratamentos) constitui uma parte muito significativa do esforço científico que tem sido feito para a transformação das biorrefinarias numa realidade industrial. Este artigo apresenta uma breve revisão dos processos de fraccionamento, sendo dada particular atenção a processos emergentes, discutindo também as suas possíveis vantagens e limitações.

Introdução

A biomassa vegetal é constituída por três macromoléculas principais, celulose, hemicelulose e lenhina, cuja composição química e teor relativo variam de acordo com a origem biológica do material.

Historicamente, os pré-tratamentos da biomassa foram desenvolvidos tendo como principal objectivo facilitar a subsequente hidrólise da celulose. Contudo, mais recentemente, estes têm vindo cada vez mais a ser entendidos como processos de fraccionamento que permitam a valorização integral da biomassa [1,2]. De facto, na biorrefinaria pretende-se, tanto quanto possível, maximizar o valor de cada uma dessas fracções, o que usualmente implica que tenham de ser valorizadas individualmente. Isto implica o seu fraccionamento selectivo, o que nem sempre é fácil de alcançar.

Os métodos de pré-tratamento/fraccionamento incluem processos físicos, químicos e biológicos. Embora alguns destes métodos já se encontrem bem estabelecidos, têm ainda limitações que urge resolver. Recentemente têm sido feitos alguns progressos importantes, não só na optimização desses processos mas também ao nível do desenvolvimento de outros processos alternativos e inovadores que exploram diferentes propriedades dos materiais lenhocelulósicos.

Neste trabalho apresenta-se uma revisão dos processos de pré-tratamento da biomassa sendo dada uma atenção especial aos novos métodos de pré-tratamento e discutida a sua aplicabilidade ao nível industrial.

Principais opções de pré-tratamento

As opções de pré-tratamento para o fraccionamento da biomassa podem ser classificadas em físicas, químicas, físico-químicas e biológicas (Tabela 1). Os métodos biológicos são, em geral, menos eficazes para o fraccionamento da biomassa, e não serão discutidos neste trabalho.

Pré-tratamentos físicos

Os pré-tratamentos físicos permitem aumentar o tamanho dos poros e a área superficial disponível, assim como diminuir a cristalinidade da celulose e o seu grau de polimerização. Podem ser utilizados diferentes tipos de processos físicos, alguns dos quais, como por exemplo os ultrassons e a irradiação, são frequentemente utilizados em combinação com métodos químicos. Alguns exemplos da aplicação eficaz destes métodos incluem combinações com agentes ácidos, alcalinos, peróxido de hidrogénio [3].

Pré-tratamentos químicos

Os pré-tratamentos químicos convencionais incluem principalmente os tratamentos com ácidos. São usualmente utilizadas duas abordagens: ácido concentrado/temperatura baixa e ácido diluído/temperatura elevada.

Processos ácidos: os processos que utilizam ácidos concentrados permitem a hidrólise das hemiceluloses e da celulose, enquanto que a hidrólise com ácido diluído é mais específica para as hemiceluloses, produzindo uma fracção sólida rica em celulose, adequada para uma hidrólise enzimática posterior. A hidrólise ácida requer que os ácidos sejam posteriormente reciclados/neutralizados, produzindo grandes quantidades de resíduos e conduzindo também a perdas dos hidrolisados.

De entre os restantes processos químicos destacam-se ainda:

Processos alcalinos: estes processos afectam fundamentalmente a lenhina e em menor grau as hemiceluloses. Os agentes alcalinos mais utilizados são hidróxidos (de sódio, de potássio ou de cálcio). Para além destes, os tratamentos alcalinos alternativos que utilizam amónia, por exemplo AFEX (“ammonia fibre explosion”) e ARP (“ammonia recycling process”) [4], têm também vindo a ganhar cada vez mais interesse. O AFEX, em particular, poderá ter um grande potencial uma vez que permite uma elevada digestibilidade enzimática da celulose, redução do teor de lenhina

Tabela 1 – Processos para o fraccionamento de materiais lenhocelulósicos.

Físicos	Moagem	Trituração	Ultrassons	Micro-ondas	Radiação ☐
Químicos	Processos ácidos	Processos alcalinos	Ozonólise	Líquidos iônicos	
Físico-químicos	Auto-hidrólise (“liquid hot water”)		Explosão com vapor		Fluídos Supercríticos
Biológicos	Fungos da podridão branca ou castanha				

e remoção de hemicelulose com uma formação muito baixa de produtos de degradação. Os custos deste processo têm, no entanto, impedindo a sua utilização a nível industrial.

Processos organosolv: estes processos utilizam misturas aquosas com solventes orgânicos (acetona, etanol, metanol) que podem ser utilizados em combinação com outros catalisadores, nomeadamente ácidos, conduzindo à dissolução da lenhina e à hidrólise da hemicelulose. A economia global destes processos depende da reciclagem dos solventes, embora solventes como o etanol tenham a vantagem de ser facilmente recicláveis e serem eles próprios produtos das biorrefinarias [1].

Processos com ozono: o ozono é um oxidante muito poderoso pelo que o tratamento com ozono é eficaz para a deslenhificação e também para a despolimerização parcial das hemiceluloses. O processo é geralmente realizado à temperatura ambiente não dando origem à formação de compostos inibidores. Tem também a vantagem de aumentar o rendimento da hidrólise enzimática sem deixar resíduos no material tratado. A principal desvantagem são as grandes quantidades de ozono necessárias.

Novos processos químicos

Processos com (super)ácidos sólidos (SSA): os SSA podem ser definidos como ácidos mais fortes que ácido sulfúrico concentrado (superácidos de Brønsted), ou ácidos mais fortes que o cloreto de alumínio (superácidos de Lewis). Embora o uso destes ácidos tenha sido proposto pela primeira vez nos anos 80 para a hidrólise de oligo- e polissacáridos [5], só recentemente surgiu um interesse renovado pela sua utilização.

São exemplos de SSA, o ácido nióbio ($\text{Nb}_2\text{O}_5 \cdot n\text{H}_2\text{O}$), H-mordenite (zeólito), Nafion NR50, Amberlyst-15, carvão ativado sulfonado, e carvão amorfo com grupos SO_3H , COOH e OH e outros materiais como a bentonite e o caulino. As vantagens dos SSA residem na possibilidade de utilizar temperaturas moderadas e volumes de água reduzidos, além de que apresentam poucos problemas de corrosão, segurança e geração de resíduos/subprodutos. Além disso, os catalisadores sólidos podem ser separados com facilidade sem perda de actividade e com baixo consumo de energia.

A celulose e hemicelulose podem ser hidrolisadas (a mono- e oligossacáridos) com uma recuperação da lenhina de cerca de 100% [6]. O uso de SSA em combinação com líquidos iónicos poderá ser de grande interesse para explorar possíveis sinergias. Uma vez que existe já uma tradição de utilização industrial noutras áreas, a possibilidade de utilização destes catalisadores nas biorrefinarias parece ser muito promissora, em particular, o uso de SSA, em combinação com os processos de auto-hidrólise (ver abaixo).

Processos com sais inorgânicos: os sais inorgânicos podem ser considerados como ácidos de Brønsted. O aumento da taxa de hidrólise das hemiceluloses e da celulose durante o processamento da biomassa em meio ácido [7] embora possam também ser utilizados isoladamente [8]. Os sais mais usados para o fraccionamento da biomassa são o FeCl_3 , FeSO_4 , $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$, $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, AlCl_3 , e MgSO_4 . Em geral, o efeito catalisador diminui com a diminuição do potencial de ionização ($\text{Fe}^{3+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{K}^+$). O principal efeito deste tratamento é a solubilização parcial da lenhina e hidrólise da hemicelulose com uma recuperação de pentoses elevada, enquanto que a celulose não é praticamente degradada [8, 9]. Este método tem algumas vantagens específicas, nomeadamente as elevadas taxas de reacção e induz menor corrosão do que os processos ácidos. Os sais são também mais fáceis de reciclar e, devido ao pH mais suave, a neutralização pode até mesmo ser evitada.

Processos com líquidos iónicos (ILs): os ILs constituem solventes alternativos para o fraccionamento da biomassa. Tratam-se de sais com ponto de fusão $<100^\circ\text{C}$, elevada estabilidade térmica e elevado poder dissolvente. Uma das vantagens da utilização de ILs é a possibilidade de dissolução completa e selectiva de madeira na sua forma nativa, o que tem aberto novas possibilidades para processar, fraccionar e derivatizar a biomassa lenhocelulósica. Os trabalhos pioneiros de Rogers e colaboradores [10] demonstram que alguns ILs à base de imidazole podem dissolver até 25% da celulose. Os principais trabalhos têm-se centrado na utilização de ILs à base de cloreto, embora exista também um grande interesse no desenvolvimento de novos ILs, com baixa viscosidade e temperatura e ponto de fusão mais baixo [11, 12]. Embora tenha sido demonstrada a eficácia dos ILs na dissolução da celulose, o estudo da solubilidade das hemiceluloses e da lenhina em ILs, só muito raramente tem sido referida. No entanto, para o fraccionamento da biomassa existem duas abordagens possíveis. Uma delas consiste na dissolução completa seguida de precipitação selectiva e a segunda pode ser a dissolução selectiva de um ou mais dos componentes tal como já descrito para a lenhina e (hemi) celulose [13,14]

Processos físico-químicos

Os processos físico-químicos incluem principalmente os processos hidrotérmicos, tais como a *auto-hidrólise* ("liquid hot water", LHW) e a *explosão com vapor*. Estes métodos baseiam-se na utilização de água, vapor, ou ambos, e calor para o tratamento da biomassa. Nestas condições ocorre hidrólise dos grupos acetilo das hemiceluloses, com solubilização parcial ou total das mesmas. A auto-hidrólise utiliza água líquida comprimida (pressão acima do ponto de saturação) enquanto que na explosão com vapor a biomassa é tratada com vapor de água saturado a elevada pressão sendo

Tabela 2 – Comparação de alguns processos para o fraccionamento de materiais lenhocelulósicos.

	Ácidos			Alcalinos		Hidrotérmicos		Organosolv	Líquidos iónicos	Fluidos supercríticos
	Diluído	Concentrado	Ácidos sólidos	Hidróxidos	AFEX	Auto-hidrólise	Explosão com vapor			
Temperatura	↑	↓/0	0	↓/0	0	↑	↑	↓/0/↑	↓/0	0/↑
Remoção da hemicelulose	↑	↑	EE	0	↓	↑	↑	↓/0	↑	↑
Recuperação da hemicelulose	↑	0	EE	0	↓	↑	0	↓	↑	EE
Remoção da celulose	↓	↑	EE	↓	↓	↓	↓	↓	↓/0/↑	↓
Digestibilidade enzimática	↑	N.A.	EE	↑	↑↑	↑	↑↑	0	↑	EE
Remoção da lenhina	↓	↓	↓↓	↑	↓	↓	↓	↑↑	↑	↑
Formação de inibidores	↓/0	↓/↑	↓	↓	N.A.	↓	↓/0	↓	↓	↓/0
Corrosão de equipamentos	0	↑	↓	↑	↑	↓	↓	0	↓	↓
Energia necessária	↑	↓	↓/0	↓	↑	↑	↑	↓/0/↑	0	↑
Recuperação dos catalisadores	Difícil	Necessário	Fácil	Fácil	Necessário	N.A.	N.A.	Necessário	Necessário	N.A./Necessário
Formação de resíduos	↑	↓	N.A.	↓	N.A.	↓	↓	↓	N.A.	N.A.
Implementado à escala piloto	Sim	Sim	Não	Sim/Não	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Sim

↑, elevado; ↓, baixo; 0, moderado; EE, em estudo; N.A., não aplicável

depois a pressão reduzida rapidamente o que faz com que o material sofra uma descompressão súbita e explosão. No tratamento de explosão com vapor é também frequente a impregnação da biomassa com diversos catalisadores, como por exemplo, o H_2SO_4 , SO_2 , CO_2 ou agentes alcalinos nomeadamente com amónia resultando no processo AFEX já referido anteriormente.

A auto-hidrólise e a explosão com vapor permitem uma hidrólise relativamente elevada da hemicelulose podendo, em particular no caso da auto-hidrólise, obter-se uma recuperação elevada de hemicelulose com uma baixa formação de inibidores enquanto que a celulose e lenhina não são praticamente degradadas (particularmente no caso da auto-hidrólise) [15, 16] podendo ser utilizadas noutros processos. A explosão com vapor permite aumentar significativamente a digestibilidade enzimática. Nestes processos, por apresentarem um pH moderado, os problemas de corrosão são muito reduzidos e os passos de reciclagem dos ácidos e dos precipitados poderão não ser necessário, reduzindo os custos.

Novos processos físico-químicos

Fluidos supercríticos (scFs): os scFs são gases acima da sua temperatura e pressão críticas. Os mais utilizados são o dióxido de carbono e a água. As propriedades dos scFs, nomeadamente os coeficientes de partição e a solubilidade, são facilmente ajustáveis, ou seja, pequenas alterações na temperatura ou pressão perto do ponto crítico podem resultar em alterações da solubilidade até cerca de 100 vezes, simplificando a separação. O pré-tratamento de biomassa lenhocelulósica com scFs, principalmente com scH_2O ou scCO_2 , é ainda pouco referido [17,18]. No entanto, como a água em condições sub- ou supercríticas se comporta de forma bastante diferente da água à pressão e temperatura normais, pode esperar-se que os tratamentos com scH_2O sejam mais eficientes além de que a hidrólise com água (auto-hidrólise) é facilitada pelo facto de a água desenvolver características

ácidas a temperaturas elevadas. Assim, estes tratamentos poderão permitir a separação completa da hemicelulose e um aumento significativo da digestibilidade enzimática da celulose [19]. A utilização de CO_2 supercrítico pode também permitir o aumento da hidrólise de celulose [18] que quando combinado com o uso de ácidos orgânicos poderá permitir ainda o aumento do rendimento do processo, sendo assim evitado o uso de ácidos minerais e reduzida a corrosão. O uso de CO_2 permite também, em geral, reduzir a temperatura do processo e a formação de produtos de degradação permitindo assim a obtenção de rendimentos elevados. Além disso, o uso de CO_2 facilita também a separação de produtos.

Conclusões

Tal como se pode inferir da discussão anterior, não existe um método único que possa satisfazer todos os requisitos para o fraccionamento da biomassa de forma eficiente. Como tal, é previsível que no futuro venha a ocorrer um aumento do estudo de métodos combinados/sequenciais que tenham como alvo diferentes fracções separadas. Neste cenário, a utilização de processos suaves e ambientalmente sustentáveis tendo como objectivo a recuperação da hemicelulose e a separação de lenhina de elevada qualidade poderá ser vantajosa. Além disso, os processos inovadores nomeadamente aqueles baseados no uso de líquidos iónicos, por exemplo, poderão ser eficazes, porque poderão permitir incorporar os dois objectivos num único processo.

Agradecimentos

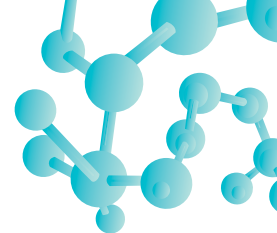
Os autores agradecem aos projectos “Products from lignocellulose” (EIB 10.013, ERA-Industrial Biotechnology) e “SSAD” (FCT, PTDC/AGR-ALI/122261/2010). Patrícia Moniz agradece à FCT (Bolsa de Doutoramento SFRH/BD/48421/2008).

Referências

- [1] Carvalho, F, Duarte, LC, Gírio, FM (2008) Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments. *J. Sci. Ind. Res.* 67, 849-864.
- [2] Gírio, FM, Fonseca, C, Carvalho, F, Duarte, LC, Marques, S, Bogel-Lukasik, R (2010) Hydrolysis of hemicelluloses for fuel ethanol: a review. *Biores. Technol.* 101, 4775-4800.
- [3] Taherzadeh, M., Karimi, K (2008) Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. *Int. J. Mol. Sci.* 9, 1621-1651.
- [4] Wyman, CE, Dale, B, Elander, R, Holtzapple, M, Ladisch, M, Lee, YY (2005) Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. *Biores. Technol.* 96, 1959-1966.
- [5] Hahn-Hägerdal B, Skoog K, Mattiason B (1984) Solid superacids for hydrolyzing oligosaccharides and polysaccharides. *An. NY Acad. Sci.* 434, 161-163.
- [6] Suganuma S, Nakajima K, Kitano M, Yamaguchi D, Kato H, Hayashi S, Michikazu (2008) Hydrolysis of cellulose by amorphous carbon bearing SO₃H, COOH, and OH groups. *J. Am. Chem. Soc.* 130, 12787-12793.
- [7] Nguyen QA, Tucker MP (2002) Dilute acid/metal salt hydrolysis of lignocellulosics. U.S. Patent US6423145B1.
- [8] Liu CG, Wyman CE (2006) The enhancement of xylose monomer and xylotriose degradation by inorganic salts in aqueous solutions at 180°C. *Carbohydr. Res.* 341, 2550-2556.
- [9] Marcotullio G, Krisanti E, Giuntoli J, de Jong W (2011) Selective production of hemicellulose-derived carbohydrates from wheat straw using dilute HCl or FeCl₃ solutions under mild conditions. X-ray and thermogravimetric analysis of the solid residues. *Biores. Technol.* 102, 5917-5923.
- [10] Swatloski RP, Spear SK, Holbrey JD, Rogers RD (2002). Dissolution of cellulose with ionic liquids. *J. Am. Chem. Soc.* 124, 4974-4975.
- [11] Conceição, LJA, Bogel-Lukasik, E, Bogel-Lukasik, R (2012) A new outlook on solubility of carbohydrates and sugar alcohols in ionic liquids. *RSC Advances* 2, 1846-1855
- [12] Zakrzewska, ME, Bogel-Lukasik, E, Bogel-Lukasik, R (2010) Solubility of carbohydrates in ionic liquids. *Energ Fuel* 24, 737-745
- [13] Lee SH, Doherty TV, Linhardt RJ, Dordick JS (2009) Ionic liquid-mediated selective extraction of lignin from wood leading to enhanced enzymatic cellulose hydrolysis. *Biotechnol. Bioeng.* 102, 1368-1376.
- [14] Sievers C., Valenzuela-Olarte M.B., Marzalletti T., Musin D., Agrawal P.K., Jones C.W. (2009). Ionic-liquid-phase hydrolysis of pine wood. *Ind. Eng. Chem. Res.* 48,1277-1286.
- [15] Carvalho, F, Esteves, MP, Parajó, JC, Pereira, H, Gírio, FM (2004) Production of oligosaccharides by autohydrolysis of brewery's spent grain. *Biores. Technol.* 91, 93-100.
- [16] Carvalho, F, Silva-Fernandes, T, Duarte, LC, Gírio, FM (2009) Wheat straw autohydrolysis: process optimization and products characterization. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 153, 84-93.
- [17] Miyafuji H, Nakata T, Ehara K, Saka S (2005) Fermentability of water-soluble portion to ethanol obtained by supercritical water treatment of lignocellulosics. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 121,963-971.
- [18] Kim KH, Hong J (2001) Supercritical CO₂ pretreatment of lignocellulose enhances enzymatic cellulose hydrolysis. *Biores. Technol.* 77, 139-144.
- [19] van Walsum, GP e Shi, H (2004) Carbonic acid enhancement of hydrolysis in aqueous pretreatment of corn stover. *Biores. Technol.* 93, 217-226.



Visite o nosso site
www.spbt.pt



Biocatálise na despolimerização e valorização da lenhina

Lígia O. Martins

Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Universidade Nova de Lisboa,

Av da República, 2780-157 Oeiras, Portugal. Tel: +351 214469534. E-mail: lmartins@itqb.unl.pt. Website: <http://met.itqb.unl.pt/>

O aumento crescente nos preços do petróleo relançou o interesse na utilização de matérias-primas mais baratas, disponíveis e renováveis para a produção de compostos químicos, energia e combustíveis. Assim, as biorrefinarias – onde a matéria-prima é a biomassa vegetal – surgem como uma alternativa às tradicionais refinarias, com a vantagem adicional de permitirem processos sustentáveis, já que há um balanço entre o dióxido de carbono fixado pelas plantas durante a fotossíntese e o libertado na utilização industrial da biomassa.

No entanto, para serem economicamente viáveis, as futuras biorrefinarias devem separar e degradar eficientemente os constituintes de biomassa vegetal vascular – a celulose, a hemicelulose e a lenhina – da mesma forma que as refinarias de petróleo separam as suas frações. O passo limitante na exploração industrial da biomassa vegetal é a grande resistência da lenhina à degradação biológica e química.

A resistência da lenhina à degradação resulta da sua composição e estrutura heterogêneas, as características que fazem com que este polímero, desempenhe eficientemente a sua função fisiológica – dar às plantas rigidez, impermeabilidade e proteção contra ataques biológicos e mecânicos, i.e. proteger fisicamente a celulose e a hemicelulose da hidrólise enzimática. A lenhina é composta por diferentes unidades fenólicas e não fenólicas que formam uma matrix tridimensional, irregular e insolúvel, interligada por uma grande variedade de ligações éter e carbono-carbono (Figura 1A), onde se encontram imersas a celulose e a hemicelulose (Figura 1B).

São poucos os microrganismos que conseguem degradar a lenhina, ao contrário do que acontece com outros polímeros biológicos abundantes (como por exemplo, a própria celulose ou o amido), e fazem-no através de mecanismos também estes pouco comuns – extracelulares, aeróbios, não-específicos e não-hidrolíticos [1]. Os microrganismos mais bem conhecidos são os chamados fungos da podridão branca. Estes fungos, do filo dos Basidiomycota, excretam uma gama alargada de enzimas oxidativas como as lacases, várias peroxidases (de lenhina, de manganésio e versáteis) e algumas outras enzimas (por exemplo, oxidases de glioxal, aril-alcool ou piranose-2), ditas de auxiliares, que actuam sinergisticamente no processo de degradação de lenhina [1, 2].

Os mecanismos biológicos de degradação da lenhina são ainda mal entendidos mas pensa-se que sejam do tipo “combustivo”, i.e., através de uma ação catalizada por enzimas, oxidativa e não-específica, que resulta posteriormente numa

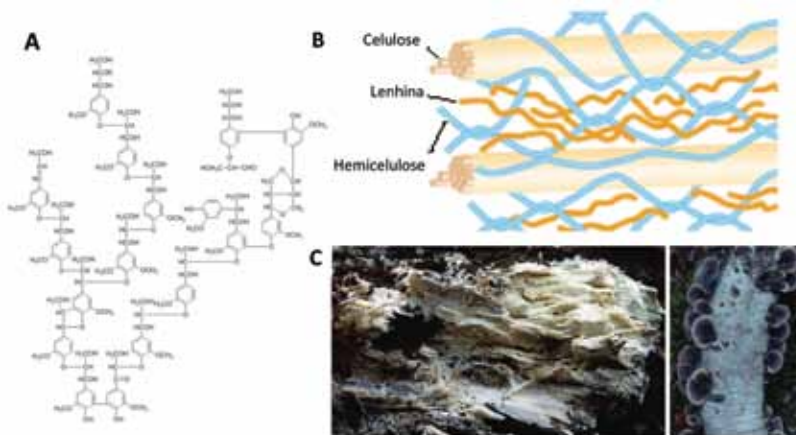


Figura 1 – (A) Estrutura da lenhina, (B) Estrutura de material lenhinocelulósico, (C) Branqueamento de material lenhinocelulósico por fungos da podridão branca.

degradação independente de actividade enzimática [3]. Por exemplo, o peróxido de hidrogénio, produzido enzimaticamente por oxidases extracelulares, oxida unidades de lenhina, em reações catalizadas pelas peroxidases. A formação de radicais catiónicos, gera uma variedade de reações oxidativas não enzimáticas que se propagam e levam à degradação da lenhina. Já as lacases, com um potencial redox inferior às peroxidases, não oxidam directamente unidades não fenólicas de lenhina, mas oxidam unidades fenólicas, resultando na formação de radicais livres difusíveis que podem atuar não enzimaticamente sobre outras unidades da lenhina, resolvendo ainda, o problema de acesso das enzimas lenhinolíticas a um polímero grande e complexo como a lenhina [1].

O branqueamento da biomassa vegetal vascular pelos fungos da podridão branca, que decorre das reações oxidativas sobre a lenhina (Figura 1C) inspirou a utilização de enzimas lenhinolíticas na indústria da pasta de papel. A utilização destas enzimas permite a remoção de lenhina com retenção da estrutura fibrosa, constituída essencialmente por celulose, sem adição de químicos oxidativos, em condições amenas de pressão, pH e temperatura. Esta aplicação da biocatálise permite substituir potencialmente os processos tradicionais de branqueamento industrial, realizados com auxílio de químicos mais ou menos agressivos, como o oxigénio, peróxido de hidrogénio, ozono ou mesmo o dióxido de cloro, no que é considerado um dos passos, senão o passo, mais poluente de todo o processo de produção da pasta de papel.

A biocatálise representa ainda uma ferramenta única para a valorização da lenhina. Geralmente, a lenhina, e em parte também a hemicelulose, são considerados bio-resíduos pelas indústrias lenhinocelulósicas, sendo queimados para fornecimento de energia para as fábricas. No entanto, a lenhina

sendo o polímero aromático mais abundante na natureza, é uma fonte potencial de vários compostos químicos como surfactantes, resinas, adesivos, bio-plásticos e polímeros [4].

O laboratório de Tecnologia Microbiana e Enzimática do ITQB-UNL tem-se dedicado ao estudo de enzimas lenhino-líticas, nomeadamente lacases e, mais recentemente, peroxidases bacterianas. Trabalhar com bactérias tem algumas vantagens no estudo e na aplicação destas enzimas: facilidade de clonagem, produção de enzimas heterólogas, a níveis geralmente elevados, e ausência de glicosilação pós tradução, o que facilita a sua manipulação e aplicação. Por outro lado, a engenharia enzimática muitas vezes é necessária, para tornar as enzimas mais activas e robustas, e dispõe de mais ferramentas em procariotas do que em eucariotas.

As lacases são, entre as enzimas lenhino-líticas, as que apresentam uma maior diversidade de substratos, compostos fenólicos, polifenóis, aminas aromáticas, tióis, corantes sintéticos, entre outros, requerendo apenas oxigénio como co-substrato. Vários estudos permitiram-nos elucidar aspectos fundamentais das propriedades destas enzimas utilizando como sistema modelo a enzima CotA-laccase de *Bacillus subtilis*. Por exemplo, por mutagenese substituímos resíduos considerados chave, perto dos centros catalíticos de cobre, e estudámos, a modulação do potencial redox das enzimas [5], os mecanismos de incorporação de cobre [6], a estabilidade termodinâmica [5] e ainda o mecanismo catalítico de redução de oxigénio a água [7 e refs incluídas]. A identificação e estudo de lacases de microrganismos hipertermófilos mostrou pela primeira vez, enzimas com uma elevada especificidade para a oxidação de metais e uma estabilidade intrínseca elevada, portanto, com potencial para exploração em aplicações biotecnológicas [8 e refs incluídas].

Numa perspectiva mais aplicada, estudámos a utilização das lacases na degradação e detoxificação de corantes sintéticos, poluentes que persistem no ambiente [9 e refs incluídas] e na degradação de unidades não fenólicas de lenhina, recorrendo a sistemas de lacases na presença de mediadores de natureza fenólica [10]. Neste último estudo, realizado comparando enzimas com origem e propriedades distintas, concluímos que a natureza química e as propriedades das moléculas mediadoras são mais importantes do que as enzimas utilizadas. Verificámos que a degradação das unidades não fenólicas da lenhina depende exclusivamente da reactividade e, principalmente, da estabilidade dos produtos enzimáticos (radicais fenólicos) resultantes da oxidação dos mediadores utilizados [10].

Recentemente, identificámos e caracterizámos duas novas peroxidases hémicas bacterianas, pertencentes a uma nova família de peroxidases, as *Dye-decolourising peroxidases* (DyP-type) [11]. Estas peroxidases têm uma sequência primária, estrutura e aparentemente mecanismos catalíticos, diferentes de todas as outras peroxidases descritas até à data [12]. São enzimas que apresentam uma grande variedade de substratos, incluindo compostos com potenciais redox elevados (superiores a 0.6 V), o que sugere que possam substituir as peroxidases fúngicas lenhino-líticas em processos biotecnológicos. Isto é importante, uma vez que até à data, não existem peroxidases lenhino-líticas comerciais (ao contrário do que acontece com as lacases), dadas as dificuldades encontradas na produção destas enzimas fúngicas em quantidades consideradas necessárias aplicações industriais. O objectivo do nosso trabalho é assim, identificar mecanismos biológicos de degradação de lenhina, ao nível micro-

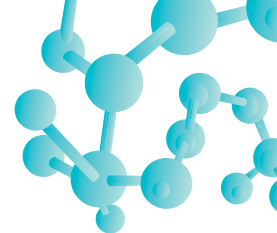
biano e enzimático, aprofundar o conhecimento do modo de ação das enzimas lenhino-líticas e por fim melhorar as suas propriedades por técnicas de engenharia de proteínas. A exploração das ferramentas biológicas é essencial ao estabelecimento em plenitude do conceito de biorrefinaria: formação de bioprodutos ou formas alternativas de energia, através da degradação e transformação biológica de matérias primas renováveis. Por outro lado, esta investigação permitirá o desenvolvimento de processos selectivos e controlados de despolimerização da lenhina com impacto em diversas indústrias nomeadamente alimentar, química, farmacêutica e de cosméticos e também na bioremediação de efluentes industriais.

Agradecimentos

Agradeço a todos os estudantes e colaboradores que contribuíram para os estudos mencionados. Agradeço à Ana Sanchez do Gabinete de Comunicação do ITQB a revisão do texto. Estes trabalhos foram suportados financeiramente pela União Europeia, através dos projetos SOPHIED (FP6-NMP2-CT-2004-505899) e BIORENEW (FP6-2004-NMP-NI-4/026456) e pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (POCI/BIO/57083/2004, PTDC/BIO/72108/2006, PTDC/AGR-CFL/103840/2008, PEst-OE/EQB/LA0004/2011).

Referências

- [1] Ruiz-Duenas FJ, Martinez AT (2009) Microbial degradation of lignin: how a bulky recalcitrant polymer is efficiently recycled in nature and how we can take advantage of this. *Microb Biotechnol* 2:164-177
- [2] Wong DW (2009) Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. *Appl Biochem Biotechnol* 157:174-209
- [3] Kirk, TK, Farrell, RL (1987) Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin. *Ann. Rev Microbiol* 41: 465-505
- [4] Calvo-Flores, FG, Dobado, JA (2010) Lignin as renewable material. *ChemSusChem* 3: 1227-1235
- [5] Durão, P, Bento, I, Fernandes, AT, Melo, EP, Lindley, PF and Martins, LO (2006) Perturbations of the T1 copper site in the CotA-laccase from *Bacillus subtilis*: structural, biochemical, enzymatic and stability studies. *J Biol Inorg Chem* 11:514-26.
- [6] Durão, P, Chen, Z, Fernandes, AT, Hildebrandt, P, Murgida, DH, Todorovic, S, Pereira, MM, Melo, EP and Martins, LO (2008) Copper incorporation into recombinant CotA-laccase from *Bacillus subtilis* - Characterization of fully Cu-loaded enzymes. *J Biol Inorg Chem* 13:183-9
- [7] Brissos, V, Chen, Z, and Martins, LO (2012) The kinetic role of carboxylate residues in the proximity of the trinuclear centre in the O₂ reactivity of CotA-laccase. *Dalton Trans.* 41, 6247-6255
- [8] Fernandes, AT, Damas, J, Soares, CM, Todorovic, S, Huber, R, Pogni, R and Martins, LO. 2010. The multicopper oxidase from the archaeon *Pyrobaculum aerophilum* shows nitrous oxide reductase activity. *FEBS J* 277:3176-3179
- [9] Mendes, S, Farinha, A, Ramos, CG, Leitão, JH, Viegas, CA and Martins, LO. 2011. Synergistic action of azoreductase and laccase leads to maximal decolourisation and detoxification of model dye-containing wastewaters. *Bioresour Technol.* 102: 9852-9859.
- [10] Rosado, T, Bernardo, P, Koci, K, Coelho, AV, Robalo, MP, Martins, LO (2012) Methyl syringate: an efficient phenolic mediator for bacterial and fungal laccases. *Bioresour. Technol.* 124:371-378
- [11] Santos, A, Mendes, S, Brissos, V, Martins, LO (2013) Characterization of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas putida* dye decolourising peroxidases: towards biotechnological applications. Submitted.
- [12] Sugano Y (2009) DyP-type peroxidases comprise a novel heme peroxidase family. *Cell Mol Life Sci* 66:1387-1403



Fibras celulósicas de alta qualidade por ozonificação catalítica promovida por enzimas

Anatoly A. Shatalov

Centro de Estudos Florestais, Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, Tapada da Ajuda, 1349-017, Lisboa, Portugal

E-mail: anatoly@isa.utl.pt

A biorrefinaria multiproduto com o fraccionamento e utilização completo dos principais componentes químicos da biomassa lenhocelulósica é visto agora como a única forma viável de garantir a sustentabilidade da futura bioeconomia [1]. A celulose é o maior constituinte da biomassa lenhocelulósica, representando 35-50% do material de parede celular. A celulose isolada pode ser usada como uma valiosa fonte de fibras, como alternativa para produção de bioetanol. Para isolamento de fibras celulósicas, a lenhina deve ser removida selectivamente. O desenvolvimento de métodos eficazes e ecologicamente limpos de deslenhificação é, portanto, um desafio de grande interesse prático e importância. Neste caso, a utilização de reagentes à base de oxigénio totalmente livres de cloro (TCF) está sendo considerado como uma perspectiva mais potencial para a produção de fibras de alta qualidade.

De todos os oxidantes usados na deslenhificação (branqueamento) das pastas celulósicas cruas (como *kraft*), o ozono é o reagente mais poderoso e eficaz. Apesar da reactividade extremamente elevada, uma baixa selectividade do ozono, devido a reacções não desejadas com hidratos de carbono, restringe a capacidade de deslenhificação por ozono e limita sua comercialização. O melhoramento da selectividade da ozonificação ainda precisa ser resolvido. A mudança nas propriedades *red-ox* de sistema de deslenhificação com ozono através da aplicação de catalisadores específicos de oxidação, tal como polioxometalatos (POM), pode ser uma forma viável de aumentar a selectividade de ozonificação.

Um novo método de preparação de fibras celulósicas de elevada qualidade foi desenvolvido recentemente no ISA/UTL [2-7]. O tratamento das pastas celulósicas por ozono em meios com solventes orgânicos na presença de catalisadores POM foi encontrado como uma técnica extremamen-

te eficaz e selectiva de deslenhificação (branqueamento) e substancialmente superior a outras técnicas convencionais. Particularmente, os (Mo-V-P)-heteropolianiões (HPA) da série $[PMo_{(12-n)}V_nO_{40}]^{(3+n)-}$ foram muito eficazes para ozonificação das pastas comerciais *kraft* de eucalipto (*E. globulus*) em soluções de acetona e álcool etílico. A rápida re-oxidação (recuperação) do HPA por ozono durante a deslenhificação abre a possibilidade de aplicar o conceito de branqueamento por POM/O₃ totalmente livre de efluente (TEF), com recirculação da solução de modo "close-loop", minimizando perdas de catalisador e solvente com os fluxos líquidos de processo.

Para aumentar a eficácia catalítica da HPA, o pré-tratamento enzimático das pastas cruas com as enzimas específicas (xilanases) foi realizado antes da ozonificação. A função principal de xilanases em branqueamento de pasta é melhorar a permeabilidade da fibra por meio de hidrólise limitada da rede de xilana. No caso do processo HPA/O₃, as xilanases aumentam a acessibilidade dos sítios reactivos de lenhina em paredes celulares da fibra para grandes moléculas de HPA, reforçando assim o efeito de deslenhificação. O melhoramento significativo na eficácia da ozonificação e selectividade foi observado após tratamento com xilanases. Apesar do aumento substancial da deslenhificação (cerca de 40%), o aumento de viscosidade das pastas também foi detectado, o que indicou a preservação dos polissacáridos durante ozonificação.

A alta eficácia do processo POM/O₃ assistido com enzimas permitiu desenvolver novas tecnologias sustentáveis de branqueamento para alcançar os níveis de qualidade das fibras exigidos pelo mercado. A figura abaixo mostra que as fibras celulósicas de alta pureza tendo muito baixo teor de lignina

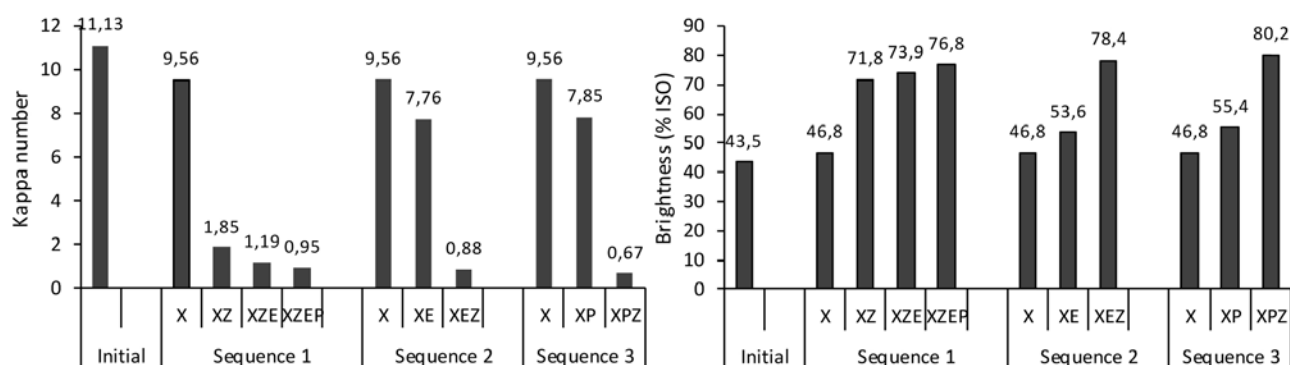


Figura 1 – Branqueamento TCF de pasta comercial *kraft* de eucalipto (*E. globulus*) com estágios integrados de tratamento enzimático (X) e ozonificação catalítica (Z) em combinação com extracção alcalina (E) e branqueamento com peróxido de hidrogénio (P).

residual e alto grau de brancura podem ser facilmente produzidas a partir de pastas comerciais usando sequências simplificadas de bio-branqueamento TCF compostas por apenas 3 estágios, e sem pré-deslenhificação com oxigénio, normalmente utilizado na indústria.

Agradecimentos

Projecto PTDC/AGR-CFL/103840/2008 (FCT, Portugal).

Referências

- [1] Kamm, B., Kamm, M., 2007. Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology 105, 175–204.
- [2] Shatalov A.A., Pereira H. 2009. Chemical Engineering Journal 155(1-2): 380-387.
- [3] Shatalov A.A., Pereira H. 2010. Bioresource Technology 101(12): 4616-4621.
- [4] Shatalov A.A., Pereira H., 2010. Bioresource Technology 101(23): 9330-9334.
- [5] Shatalov A.A., Pereira H., 2011. Proc. 16th ISWFPC, Tianjin, China.
- [6] Shatalov A.A., 2012. Chapter 10. In: M. Ghang and B. Ramel, Eds., Focus on catalysis research: New developments. N. Sci. Publ., INC., New York, pp. 261-280.
- [7] Shatalov A.A., 2013. In: Rajat Sethi, Ed., Ozone and Ozone Depletion: Sources, Environmental Impact and Health. N. Sci. Publ., INC., New York, pp. 197-218.

C O N G R E S S O S

ICBET 2013 - 3rd International Conference on Biomedical Engineering and Technology
19- 20 May 2013, Copenhagen, Denmark | <http://www.icbet.org/>

ICFEB 2013 - 4th International Conference on Food Engineering and Biotechnology
19- 20 May 2013, Copenhagen, Denmark | <http://www.icbet.org/>

asm2013 - 113th General Meeting
18 - 21 May 2013, Denver, Colorado, USA | <http://gm.asm.org/>

World Biotechnology Congress 2013
3-6 June 2013, Boston, USA | <http://www.worldbiotechcongress.com/>

IPC2013 - International Scientific Conference on Probiotics and Prebiotics
11-13 June 2013, Kosice, Slovakia | <http://www.probiotic-conference.net/Conference>

36th ECFS Conference
12-15 June 2013, Lisbon, Portugal | <http://www.ecfs.eu/lisbon2013>

EBSA - 9th European Biophysics Congress
13-17 July 2013, Lisbon, Portugal | <http://www.ebsa2013.org/>

FEMS 2013 - 5th Congress of European Microbiologists
21-25 July 2013, Leipzig, Germany | <http://www2.kenes.com/fems2013/pages/home.aspx>

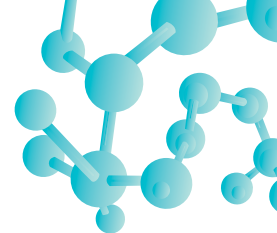
Affinity 2013
26 – 29 June 2013, Vienna, Austria | <http://events.dechema.de/affinity2013.html>

BioH₂ 2013
4 - 7 August, 2013, Montréal, Canada | <http://bioh2.org/>

ICME 13 - Second International Conference on Advanced Materials, Energy and Environments Conference
8 - 9 August 2013, Yokohama, Japan | <http://thinfilmtchno.net/index.php/icmee-13>

Thermophiles 2013 - 12th International Meeting at the University of Regensburg
08-13 September 2013, Regensburg, Germany | <http://www.thermophiles2013.de/>

BioMicroWorld2013 - V International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology
2 - 4 October 2013, Madrid, Spain | <http://www.biomicroworld2013.org/>



Pré-extracção de hemiceluloses da madeira - auto hidrólises modificadas e influência de tratamentos biológicos nas aparas de *Eucalyptus globulus* na performance da auto hidrólise

Sara Fernandes, Alexandre Gaspar

RAIZ – Instituto da Floresta e do Papel, Quinta de S. Francisco, Apartado 15, 3801-501 Eixo, Aveiro

E-mail: alexandre.gaspar@portucelsoporcel.com

Extracção em condições de auto hidrólise modificadas

Ao aplicar o conceito de Biorrefinaria na Indústria de Pasta e Papel surge a possibilidade de produzir bio etanol, a partir da fermentação de hemiceluloses, extraídas da madeira de *Eucalyptus globulus*, antes do cozimento *Kraft* (produção de pasta de celulose). Cerca de 20% da composição da madeira são hemiceluloses, após o cozimento cerca de 10% seguem com a pasta para a produção de papel, os restantes seguem com o licor negro (rico em lenhina) para queima na caldeira de recuperação, onde é produzida energia para a fábrica (fábricas de pasta são auto-suficientes) e regenerados os químicos para reutilização num novo ciclo de produção de pasta. Neste estudo pretendeu-se remover, antes do cozimento, a fração de hemiceluloses que é queimada na caldeira, mantendo a qualidade das aparas para produção de pasta.

O trabalho desenvolvido procurou avaliar dois métodos químicos, que tornem real esta possibilidade, sem afetar as propriedades da madeira e consequentemente as da pasta. As hipóteses avaliadas foram a auto hidrólise sequencial e auto hidrólise com licor verde (um subproduto reciclado no processo *Kraft*).

A metodologia experimental foi semelhante em ambos os métodos tendo sido estudado o impacto dos pré-tratamentos nos rendimentos de extração global (perda de massa das aparas), rendimento de extração de hemiceluloses (hemicelulose recuperada) e no rendimento do cozimento *Kraft*. Após cada extração, o extrato obtido foi analisado quimicamente e a madeira remanescente submetida ao cozimento.

Na auto-hidrólise sequencial foram utilizados 6 níveis de extrações, com condições menos severas. Em cada nível foi tratada madeira “fresca” com o extrato obtido no nível anterior, à excepção do nível 1, onde foi utilizada água ultrapura. Todas as extrações foram executadas em digestores rotativos, com 200g de madeira, a 150°C durante 80 minutos, com uma razão líquido/madeira de 4 l/kg, uma temperatura inicial de 40°C e uma taxa de aquecimento de 1,5°C/ min. Após 6 níveis, o rendimento de extração global equivalente obtido foi cerca de 6,9 % m/ m_{base madeira}. No que diz respeito ao cozimento *Kraft*, estas condições não apresentaram diferenças significativas no rendimento, quando comparado com o obtido para a referência (cozimento de aparas sem pré-tratamento). A análise química do extrato, feita para cada nível, mostrou que há uma extração/ formação preferencial de ou-

tros componentes em detrimento das hemiceluloses (Figura 1). Após 6 níveis, apenas 1,9 % m/m_{base madeira} são hemiceluloses. Os outros componentes são, maioritariamente, furfural, lenhina e ácido fórmico. Este facto limita a viabilidade deste processo para a produção de etanol.

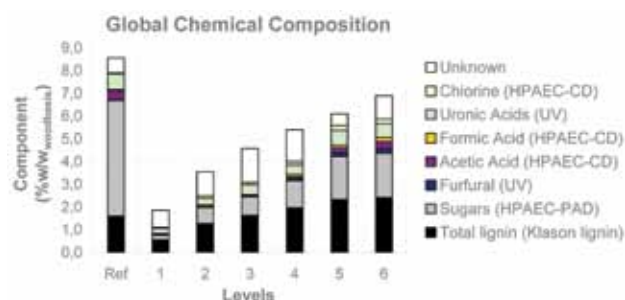


Figura 1 – Caraterização dos extratos em cada sequência (auto-hidrólise sequencial).

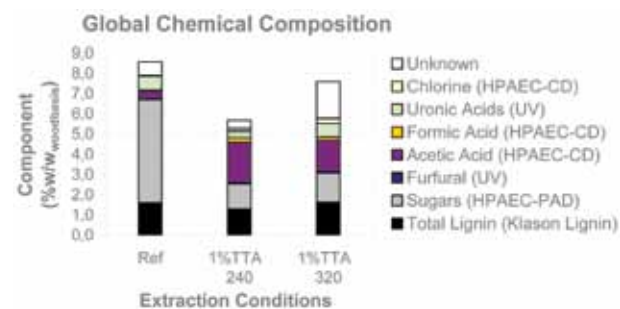


Figura 2 – Caraterização dos extratos (auto hidrólise com licor verde).

No caso da auto-hidrólise com licor verde, foram testadas diversas condições de extração, sendo a carga de licor verde % TTA (Total titratable Alkali, base Na₂O) o parâmetro mais importante. As cargas de licor verde variaram entre os 0,25 e 3% TTA, para diferentes condições de extração (tempo e temperatura). Os resultados obtidos mostram que a carga de licor verde ótima é de 1% TTA, ou seja, este é o valor que permite um melhor balanço entre os resultados obtidos para o cozimento e o rendimento de extração de hemiceluloses. Para esta carga foram então estudadas 2 condições de extração diferentes, manteve-se a mesma temperatura (150°C) mas variou-se o tempo de extração (240 e 320 minutos), tendo-se obtido os respetivos rendimentos de extração, 5,7 e 7,6% m/m_{base madeira}. Contudo, e apesar dos bons resultados

obtidos para o cozimento (idênticos à referência), o baixo rendimento de extração de hemiceluloses (1,2 e 1,4% $m/m_{\text{base madeira}}$ - Figura 2) limita a viabilidade do processo para a produção de etanol.

Influência de tratamentos biológicos nas aparas na performance da auto-hidrólise

Em estudos anteriores, foi demonstrado que a auto hidrólise, em condições menos severas, é um método eficiente para extrair material da madeira de *E. globulus*, antes do cozimento *Kraft*, sem afetar rendimentos de cozimento e características da pasta. Contudo estas condições têm um aspecto negativo: a baixa remoção de hemiceluloses. Com o intuito de melhorar este facto, procurou-se avaliar o impacto que os pré-tratamentos biológicos das aparas teriam na melhoria da extração de hemiceluloses. Num dos tratamentos biológicos recorreu-se a enzimas e num outro a fungos. Todos os resultados obtidos por estes métodos foram comparados com os obtidos para a madeira sem qualquer tratamento e nas mesmas condições (referência).

Foi realizado um estudo para determinar preliminarmente as condições ótimas de um conjunto de enzimas, usando um desenho experimental (full factorial) com 2 variáveis (T e pH) e 3 níveis. A variável dependente selecionada foi a atividade da enzima, determinada a partir do ensaio Acid Birchwood Xylanase (ABX) Activity (Accellerase XY, Xylanase 2XP, Cellic HTec2).

No pré-tratamento enzimático, foram efetuadas algumas experiências em aparas de madeira. As aparas foram submetidas a uma impregnação com vácuo usando diferentes enzimas comerciais. Seguiu-se uma incubação, a 70°C durante, 2, 6, 10, 15 e 30 dias. Após estes tratamentos seguiram-se extrações, (auto hidrólise), testando-se duas temperaturas de extração, 80°C e 150°C. Os resultados, a nível de quantidade de hemicelulose extraída, foram semelhantes aos obtidos com a madeira sem tratamento biológico, sugerindo que este tratamento não teria facilitado a extração pretendida.

De forma a eliminar a possível influência da acessibilidade aos poros da madeira, foram executadas diversas experiências de tratamentos enzimáticos, em serrim de *E. globulus*, usando um desenho experimental de otimização (Box-Behnken), com 3 variáveis (razão líquido/ madeira, tempo de tratamento e carga enzimática). O serrim pré-tratado foi lavado e extraído a 150°C, com água ultrapura. Os resultados obtidos para o rendimento de extração foram comparados com os obtidos com serrim não tratado e revelaram, mais uma vez, que não existem diferenças significativas entre a madeira pré-tratada enzimaticamente e a de referência.

Nas condições de pré-tratamento fúngico, as aparas foram impregnadas com CSL (corn steep liquor - 0,5%) ou água destilada, sendo posteriormente esterilizadas, pulverizadas com mycelium do fungo *Ceriporiopsis subvermispota* e incubadas a 27°C. O estudo deste pré-tratamento foi efetuado com base num desenho experimental (full factorial), com 2 variáveis contínuas (carga de fungo e tempo de inoculação) e 2 variáveis discretas (arejamento forçado e impregnação com CSL). Depois de pré-tratadas, as aparas foram lavadas, para remoção do mycelium superficial, secas ao ar e armazenadas. De forma a avaliar o nível de despolimerização dos componentes da madeira, induzida pelo fungo durante a fermentação em estado sólido (apodrecimento da madeira), as aparas foram submetidas a uma extração em condições de

auto hidrólise. Os resultados foram comparados com os obtidos para a madeira de referência. O extrato líquido obtido foi analisado quimicamente e as aparas foram submetidas ao cozimento *Kraft*. Uma maior carga inicial de fungo, impregnação com CSL e condições de arejamento forçado são condições vantajosas à redução da necessidade de tempo de ação do fungo sobre a madeira. Relativamente aos resultados obtidos, alcançaram-se extrações entre 10 – 14% $m/m_{\text{base madeira}}$ (com 8 a 12% $m/m_{\text{base madeira}}$ de açúcares, essencialmente hemicelulose - Figura 3). O pré-tratamento com este fungo aumentou significativamente a quantidade de hemicelulose extraída com uma auto hidrólise, no entanto o rendimento de pasta de celulose obtido, com as aparas tratadas, reduziu-se entre 2 a 3%, face à referência.

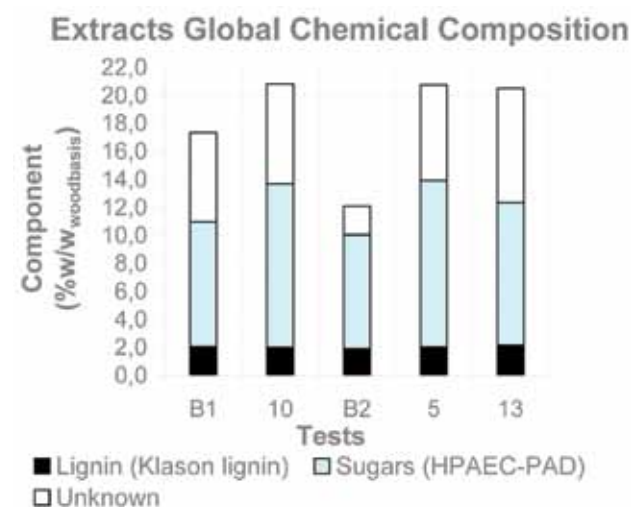
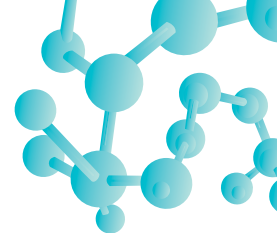


Figura 3 – Rendimentos do processo de auto-hidrólise, após pré-tratamento com fungos.

Referências

- Haiming Li, Abrar Saeed, et al., (2010) Hemicellulose Removal from Hardwood Chips in the Pre-Hydrolysis Step of the Kraft-Based Dissolving Pulp Production Process, *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 30: 48–60
- Jie Luo, Joseph m. Genco, et al., Extraction of hardwood biomass using dilute alkali, *TAPPI Journal*, Vol 11, nº 06, June 2012
- Sung-Hoon Yoon, Mehmet Tunc, et al., Near neutral pre-extraction of hemiceluloses and subsequent kraft pulping of southern mixed hardwoods, *TAPPI journal*, January 2011
- Li Kang, David Webster, et al. (2011) Ethanol Production from the Mixture of Hemicellulose Pre hydrolysate and Paper Sludge, *BioPro Expo & Marketplace / Atlanta, GA / March 14-16*
- Waleed Wafa Al-Dajani and Ulrike W. Tschirner (2010) Pre-extraction of hemiceluloses and subsequent ASA and ASAM pulping: Comparison of auto hydrolysis and alkaline extraction, *Holzforschung*, Vol. 64, pp. 411–416
- Moritz Leschinsky, Herbert Sixta, et al., Detailed mass balance of the auto hydrolyses of *eucalyptus globulus* at 170 °C, *BioResources* 4(2), 687–703, 2009
- Florbela Carvalheiro, Luís C. Duarte and Francisco M Gírio, Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments, *Journal of Scientific & Industrial Research*, Vol. 67, November 2008, pp.849-864
- Arthur J. Stipanovic, Thomas E. Amidon, et al. (2007) Opportunities for Hardwood Hemicellulose in Biodegradable Polymer Blends, "Materials, Chemicals and Energy from Forest Biomass", ACS Symposium Series 954, D.S. Argyropoulos, Ed., Washington, DC, 107-120
- Thomas E. Amidon, Shijie Liu, (2009) Water-based woody biorefinery, *Biotechnology Advances*



Valorização da Biomassa, um instrumento ao desenvolvimento sustentável?

Maria F. Duarte

Centro de Biotecnologia Agrícola e Agro-Alimentar do Alentejo (CEBAL)/Instituto Politécnico de Beja (IPBeja) 7801-908 Beja, Portugal, CICECO, Universidade de Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal

E-mail: fatima.duarte@cebal.pt

Na última década tem-se assistido a um interesse renovado pela procura de novas soluções que permitam um desenvolvimento socioeconómico sustentável. Em larga medida esse modelo de desenvolvimento terá de assentar predominantemente na utilização de recursos renováveis, como fontes de matérias-primas, produtos químicos, materiais, energias e combustíveis, em detrimento de recursos finitos como os recursos fósseis, que se aproximam da exaustão no espaço de algumas décadas. No entanto, a biomassa vegetal é inquestionavelmente a matéria-prima de base neste novo paradigma e cuja transformação será levada a cabo nas designadas “Biorrefinarias”. Este conceito abre obviamente grandes horizontes para as áreas em que as principais atividades económicas rodam em torno dos sectores agroflorestais, como seja o caso do Alentejo, que contribui significativamente para a produção agroflorestal nacional, representando cerca de 14%, em termos de valor económico (INE, 2000). Entre as contribuições mais relevantes da região encontram-se o azeite (49% da produção nacional), as plantas industriais (93% da produção nacional), os cereais (51% da produção nacional) e as plantas forrageiras (35% da produção nacional) (Census, 2009). Em relação ao sector florestal, o montado de azinho e de sobreiro ocupam aproximadamente 1 milhão de hectares no Alentejo, representando a exportação de cortiça 1/3 do total de exportações (APCOR, 2005), tendo atingido, em 2001, 894 milhões de euros (DGRF). Para além dos produtos e do valor já atualmente gerados, estas atividades agroflorestais geram em quantidades significativas resíduos e subprodutos que, para além da sua valorização energética, poderão ser convertidos em produtos de elevado valor acrescentado.

Este cenário evidencia claramente que o desenvolvimento sustentável da região do Alentejo poderá ter por base a exploração e valorização integrada de matérias-primas, resíduos e subprodutos, com vista à extração e recuperação eficiente de compostos de valor acrescentado, sem alterar significativamente a cadeia de valor já existente, constituindo uma oportunidade de rentabilização económica dos recursos endógenos. O desenvolvimento de atividades de I&DT, que promovam uma atitude empreendedora e a criação de capital científico, tecnológico e humano nestas áreas poderá vir a desempenhar um papel vital no desenvolvimento sustentável do Alentejo.

O CEBAL

Foi com esta perspetiva que foi criado em Beja, o Centro de Biotecnologia Agrícola e Agro-Alimentar do Alentejo (CEBAL), cuja atividade pretende gerar conhecimento e competências que possam servir de âncora a projetos de ID&T e

funcionar como mediador na prospeção de tecnologia com aplicação industrial, promovendo a criação de riqueza quer a nível regional quer nacional. De uma forma multidisciplinar e transversal às várias equipas, o CEBAL tem como objetivo o desenvolvimento e implementação de novas estratégias de valorização integrada da biomassa lenho-celulósica, incluindo o seu melhoramento, desenvolvimento de novas tecnologias de processamento, e novas funcionalidades, criando soluções e produtos de alto valor acrescentado (compostos antioxidantes, bioativos, óleos essenciais, açúcares e biocombustíveis). O CEBAL tem apostado no estudo da valorização da biomassa proveniente de diferentes espécies como o sobreiro [1] e a azinheira, o cardo [2], a esteva [3], o figo da índia, bem como subprodutos e resíduos industriais, como seja o caso do bagaço de azeitona [4-6], a casca do eucalipto [7], e resíduos da produção frutícola. O CEBAL disponibiliza um conhecimento integrado que abarca:

- i) Extração, identificação e caracterização de compostos fitoterapêuticos (com elevada atividade biológica) para a melhoria da saúde humana, com vista ao tratamento de diferentes patologias, incluindo o cancro;
- ii) Separação seletiva de compostos bioativos e/ou de valor acrescentado, presentes em resíduos e subprodutos agroindustriais utilizando a tecnologia de membranas, com vista a uma potenciação da atividade biológica desejada;
- iii) Aplicação/utilização de compostos bioativos naturais, extraídos de resíduos industriais, como estratégia para o aumento do período de vida de produtos agroalimentares;
- iv) Pesquisa de mecanismos moleculares relacionados com processos de desenvolvimento vegetal, identificação de novos genes e desenvolvimento de ferramentas biotecnológicas para a identificação/produção de novas variedades com características de interesse agronómico;
- v) Caracterização do potencial de produção de bio-etanol para diferentes tipos de resíduos industriais (florestais e agroalimentares).

3 Projetos, 3 abordagens integradas à valorização de matérias-primas da região

BioEcos – Valorização integrada de Biomassa (ALENT-09-0140-FEDER-000705 (QREN))

Este projeto incide sobre a biomassa vegetal como fonte produtora de energia, na vertente de valorização. O objetivo central do projeto consiste no desenvolvimento de metodologias que permitam avaliar o potencial de diferentes tipos de biomassa provenientes de culturas energéticas ou resíduos

agro-florestais como geradores de produtos de alto valor acrescentado (compostos anti-oxidantes, bioativos, óleos essenciais, açúcares, entre outros). Será determinado o potencial energético da biomassa em termos caloríficos após a extração destes compostos com alto valor. Este estudo está a ser realizado usando como espécies modelo a esteva (*Cistus ladanifer*) e o cardo (*Cynara cardunculus*) [2] (Figura 1).



Figura 1 – Esteva (*Cistus ladanifer*) (esquerda) e cardo (*Cynara cardunculus*) (direita).

RefinOlea- Valorização integrada de resíduos da extração de azeite (FCOMP-01-0202-FEDER-005450)

O bagaço de azeitona (Figura 2) após a extração é constituído por um material maioritariamente lenho celulósico, com potencial para ser integrado numa cadeia de valorização dentro do conceito de biorrefinaria. Paralelamente, este material poderá incluir outros componentes de valor acrescentado que importará identificar.



Figura 2- Bagaço de azeitona extractado.

O presente projeto pretende avaliar possibilidades de valorização da biomassa disponível na unidade industrial da UCA-SUL (União de Cooperativas Agrícolas do Sul) e estudar a sua implementação de forma técnica- e economicamente viável. Pretende-se, numa fase inicial, fazer a caracterização química da biomassa, tendo em vista o seu processamento de uma forma rentável, assim como, a identificação e recuperação de componentes minoritários, com potencial biológico, e de elevado valor acrescentado [4-5]. Permitindo o desenvolvimento de novos processos [6] que visem a valorização do material disponível, tendo a produção de etanol como processo central e estruturante.

UnValBio- Unidade de Valorização de Matérias-primas e Resíduos de Origem Biológica (ALENT-07-0262-FEDER-001860)

A UnValBiol, enquadrada na Rede de Infraestruturas Científicas e Tecnológicas de Beja, no âmbito do Sistema Regional de Transferência de Tecnologia (SRTT) pretende promover a criação de um ambiente propício à inovação e à transferência de conhecimento vocacionado para o mercado, no domínio da valorização da biomassa vegetal. A criação da UnValBio visa a congregação e disponibilização do conhecimento gerado, colocando ao dispor do tecido empresarial estratégias de valorização de diferentes tipos de biomassa. Esta unidade pretende posicionar-se como uma estrutura orgânica capaz de globalmente caracterizar, conhecer e valorizar matérias-primas e/ou resíduos de origem biológica, potenciando aplicações de elevado valor acrescentado, estruturando sempre que possível a transferência de tecnologia aplicada. A UnValBio contribuirá para aumento da competitividade empresarial regional por via da integração

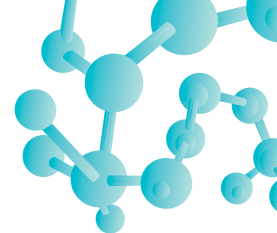
tecnológica e da inovação e criação de valor acrescentado nas atividades agrícolas tradicionais. As atividades de I&DT a desenvolver pela UnValBiol serão focadas na obtenção e caracterização das frações valorizáveis, com a avaliação do seu potencial biológico/terapêutico para a saúde humana, e suplementação de dietas animais. As frações não valorizáveis serão exploradas para o seu potencial de produção de biocombustíveis/energia.

Agradecimentos

Este trabalho foi desenvolvido por toda a equipa CEBAL, com suporte financeiro dos vários projetos em curso, com especial ênfase para o BIOECOS (ALENT-09-0140-FEDER-000705), o RefinOlea (FCOMP-01-0202-FEDER-005450), UnValBio (ALENT-07-0262-FEDER-001860), agradecendo ao COMPETE (Programa Operacional de Factores de Competitividade), QREN (Quadro de Referência Estratégica Nacional, Portugal 2007-2013) e ADI (Agência de Inovação). Agradeço também o financiamento do Laboratório Associado CICECO (Pest-C/CTM/LA0011/2011).

Referências

- [1] Almeida T, Menéndez E, Capote T, Ribeiro T, Santos C, Gonçalves S. 2013. Molecular characterization of *Quercus suber* MYB1, a transcription factor up-regulated in cork tissues. *Journal of Plant Physiology* (170)172– 178.
- [2] Velez Z, Campinho MA, Guerra AR, Garcia L, Ramos P, Guerreiro O, Felício L, Schmitt F, Duarte M. 2012. Biological Characterization of *Cynara cardunculus* L. Methanolic Extracts: Antioxidant, Anti-proliferative, Anti-migratory and Anti-angiogenic Activities. *Agriculture* 2(4), 472-492.
- [3] Jerónimo E, Alfaia CM, Alves SP, Dentinho MTP, Prates JAM, Vasta V, Santos-Silva J, Bessa RJB. 2012. Effect of dietary grape seed extract and *Cistus ladanifer* L. in combination with vegetable oil supplementation on oxidative stability of lamb meat. *Meat Science* (92)841-847.
- [4] Ramos P, Santos SAO, Guerra AR, Guerreiro O, Felício L, Jerónimo E, Silvestre AJD, Neto CP, Duarte M. 2013. Valorisation of olive mill residues: antioxidant and breast cancer antiproliferative activities of hydroxytyrosol-rich extracts derived from olive oil by-products. *Industrial Crops and Products*. DOI: 10.1016/j.indcrop.2013.02.020.
- [5] Gomes FP, Silva N, Trovatti E, Sera LS, Duarte M, Silvestre AJD, Freire CSR. Production of Bacterial Cellulose by *Gluconacetobacter sacchari* using dry olive mill residue. *Bioenergy and Biomass* (in press).
- [6] Brás T, Fernandes MC, Santos JLC, Neves LA. 2013. Investigation of the recovery by nanofiltration of bioethanol resulting from olive bagasse fermentation, *Desalination and Water Treatment* (in press).
- [7] Mota I, Pinto PCR, Novo C, Sousa G, Guerreiro O, Guerra AR, Duarte MF, Rodrigues AE. 2012. Extraction of polyphenolic compounds from *Eucalyptus globulus* bark: process optimization and screening for biological activity. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 51(20)6991-7000.



Valorização integrada dos bioprodutos da indústria vitivinícola: novas oportunidades de desenvolvimento regional

Videira Romeu¹, Vera Cardoso¹, Francisco Peixoto²

Departamento de Química¹CECAV e ²CITAB, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

E-mail: fpeixoto@utad.pt

O sector agroindustrial produz uma grande quantidade de resíduos e subprodutos, essencialmente biomassa, que carece de aproveitamento racional pelo que a implementação de processos e sistemas capazes de promover a sua valorização, reduzindo o seu impacto ambiental, é um desafio científico, tecnológico e social premente. Por exemplo, a indústria vitivinícola, um dos sectores com maior relevância económica em Portugal e na União Europeia, líder de mercado com 60% da produção mundial de vinho, gera entre 25 e 31 Kg de subprodutos por cada 100 litros de vinho que produz. Apesar destes subprodutos não serem geralmente perigosos, o facto de serem gerados em grandes quantidades num curto período do ano (sazonalidade) dificulta a sua gestão podendo constituir focos de poluição capazes de promover o desequilíbrio ambiental nos ecossistemas envolventes [1]. A relevância desta problemática pode ser ilustrada considerando regiões onde a cultura intensiva da vinha e a produção de vinho constituiu o principal referencial económico, social e paisagístico como a região do Douro. A região do Douro produz anualmente entre 160 a 210 mil toneladas de uvas, utilizadas localmente na produção vinícola, disponibilizando, entre 15 de Setembro e 30 de Outubro, milhares de toneladas de subprodutos, principalmente bagaço (Figura 1).

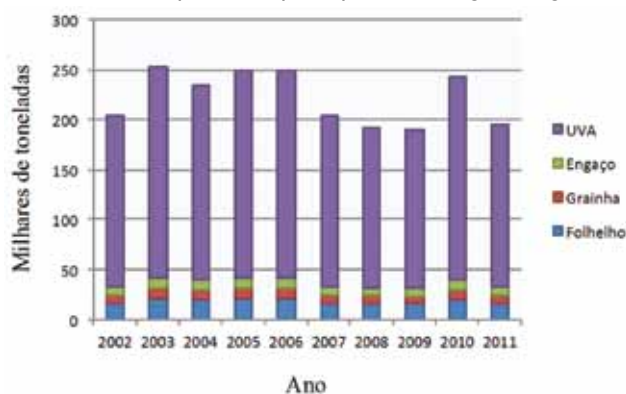


Figura 1- Produção média anual de uvas na região demarcada do Douro (RDD) e respectivo folhelho, grainha e engaço originado. A estimativa da quantidade de folhelho foi realizada considerando que 20% da uva após o processo de vinificação fica na forma de bagaço. (dados fornecidos pela Associação para o Desenvolvimento da Viticultura Duriense – ADVID).

O bagaço, nome genérico dado ao principal resíduo gerado no processo de vinificação, é tipicamente uma mistura heterogénea composta por 50% de peles de uva e restos de polpa (folhelho), 25% sementes (grainhas) e 25% de caules (engaço). Do ponto de vista químico, este subproduto é rico em álcoois, ácidos, aldeídos, ésteres, pectinas, polifenóis, minerais, açúcares e fibras [2, 3], apresentando por isso um elevado potencial de valorização. No entanto, a sua composição química complexa e variável, associada não só à diversidade

de espécies de videiras usadas para a produção da uva como também às condições geoclimáticas da região onde são cultivadas, tem dificultado a concepção e o *design* de sistemas padrão para sua valorização. Dado que o elevado teor em polifenóis inibe o metabolismo e a proliferação de leveduras [4], apenas uma parte do bagaço de uva é tradicionalmente utilizado em processos de fermentação para obtenção de extractos ricos em etanol, os quais, de acordo com a sua pureza e o teor alcoólico, são depois utilizados para produzir solventes, combustíveis ou aguardentes víquicas. Na região do Douro, a produção de aguardente vínica reveste-se de especial relevância dado que é um ingrediente fundamental na produção do vinho do Porto. As outras aplicações tradicionais deste resíduo, incluindo a sua utilização parcial como alimento para animais ou como adubo após compostagem, são, do ponto de vista económico, pouco consistentes e representam perigos e contrariedades principalmente associadas ao elevado nível de taninos e à sua fraca digestibilidade por mamíferos. Por exemplo, as actividades alelopáticas dos compostos fenólicos (taninos) que inibem a germinação de sementes conferem ao “composto” produzido por digestão aeróbia do bagaço da uva impactos ecológicos adversos. Portanto na região do Douro, tal como em muitas outras regiões produtoras de vinho, sobram enormes quantidades de resíduos, constituídos por folhelho, engaço e sementes que requerem valorização para promover a sustentabilidade económica e ambiental do sector e da região.

Na última década, o elevado preço do petróleo e as restrições legislativas, que em termos ambientais são cada vez mais exigentes quanto à gestão e tratamento dos resíduos das agro-indústrias, têm impulsionado o interesse da comunidade científica e industrial pelo estudo destes resíduos. Os esforços têm sido concentrados principalmente ao nível da caracterização química e no desenvolvimento de processos químicos e biotecnológicos susceptíveis de promover o seu aproveitamento e valorização. Inúmeras publicações mostram que uma grande variedade de produtos de valor acrescentado, incluindo etanol, ácidos orgânicos, óleos, pigmentos e fibras dietéticas, pode ser obtida por tratamento dos componentes do bagaço de uva usando processos químicos e/ou biotecnológicos [5,6]. Adicionalmente, o baixo conteúdo em lenhina destes resíduos facilita a hidrólise da celulose e hemicelulose, permitindo a disponibilização de substratos metabólicos capazes de sustentar a produção biotecnológica de microrganismos (bactérias, leveduras e fungos) que sintetizam produtos de valor acrescentado, incluindo enzimas [7]. Portanto, integrar os vários processos químicos e biotecnológicos estabelecidos à escala laboratorial em unidades capazes de viabilizar economicamente o aproveitamento completo do bagaço da uva, sem impactos ambientais sig-

nificativos, é o grande desafio que a comunidade científica e tecnológica atualmente enfrenta.

Tendo em atenção que os três principais componentes do bagaço da uva correspondem a entidades biológicas distintas que podem ser adicionadas por processos físicos é importante considerar a composição química média de cada um deles, para que se possa conceber um processo integrado que maximize a valorização do resíduo. As grainhas ou sementes são constituídas por uma estrutura externa rica em celulose (30% da massa total) que protege o embrião no seu interior e que contém entre 15 a 20% de óleos com elevada concentração de lípidos polinsaturados (e.g. ácido linoleico). Adicionalmente, os níveis de taninos condensados impregnados na celulose e/ou dispersos no interior também é significativo, podendo atingir 10% da massa da grainha. O engaço é essencialmente um material lenho-celulósico contendo cerca de 15% de taninos. O folhelo, que representa cerca de 50% da massa fresca do engaço da uva, é essencialmente constituído por polissacarídeos estruturais (celulose e hemicelulose), proteínas, taninos, açúcares (principalmente glicose e frutose), lípidos (ácidos gordos, ceras) e minerais, como mostra a Tabela 1 [8].

Tabela 1 – Composição físico-química do folhelo

Parâmetros	Composição (%)
Humidade	<13
Celulose	20,8
Hemicelulose	12,5
Proteínas	18,8
Taninos	13,8
Açúcares	12,3
Compostos alifáticos	14
Matéria mineral	7,8

O conceito de biorrefinaria [9], que no Brasil já permite a conversão com elevada rentabilidade económica dos resíduos da cana do açúcar em biocombustíveis e outros produtos, poderá constituir uma excelente base para a concepção de uma solução integrada para a valorização do bagaço da uva, dinamizando novas oportunidades de negócio relacionadas não só com a produção de bioetanol como de outros produtos químicos de valor acrescentado. De um modo geral, as biorrefinarias são concebidas considerando três plataformas autónomas mas interligadas, nomeadamente, a plataforma química, biotecnológica e térmica. Dado que a sazonalidade dos resíduos do bagaço da uva e as suas características químicas, e.g. o baixo conteúdo de material lenhocelulósico, dificilmente permitirão prever, por si só, a sustentabilidade de uma plataforma térmica, apenas iremos considerar alguns aspectos referentes às outras duas plataformas. Por exemplo, a plataforma química deverá contemplar um processo para a extracção do óleo das sementes da uva, permitindo recuperar cerca de 15 a 20% do seu peso em óleos que devido ao seu elevado conteúdo em ácido linoleico poderá ser valorizado em produtos dietéticos/alimentares.

O elevado conteúdo em taninos presente no engaço, folhelo e no resíduo das sementes após a extracção dos óleos deverá ser também extraído na plataforma química por um sistema aquoso. Os taninos poderão ser valorizados como corantes naturais, antioxidantes e na preparação de adesivos para substituir as actuais resinas de ureia/formaldeído e fenol/formaldeído, após a sua separação dos açúcares solúveis por centrifugação diferencial. Os açúcares solúveis e os extractos sólidos obtidos, ricos em celulose e hemiceluloses passarão para plataforma biotecnológica (figura 2). As hemiceluloses (pectinas e glucomanas) e outros açúcares solúveis em

água, são facilmente utilizados na produção de etanol para biocombustíveis. Com este propósito têm sido desenvolvidas novas estirpes de microrganismos capazes de utilizar o maior número possível de açúcares como fonte de carbono. Estes açúcares podem também ser transformados em ácido láctico, ácido cítrico, ácido succínico entre outros ácidos orgânicos e utilizados com interesse pela indústria química. Dado que a levedura *S. cerevisiae*, amplamente utilizada na indústria, não metaboliza eficientemente substratos celulósicos a sua utilização obriga a um pré-tratamento do resíduo para degradação do material celulósico, utilizando fungos filamentosos. Este processo representa ainda um desafio para que possa ser utilizado em larga escala na produção de biomassa e de bio-combustíveis. No entanto, a eficiência deste processo pode ser aumentada realizando a conversão microbiana dos materiais celulósicos e a fermentação da glucose num único passo, conhecido por sacarização e fermentação simultâneas (figura 2) ou; alternativamente, a sua utilização na produção de celulose bacteriana [10], com numerosas aplicações na área dos biomateriais [11].

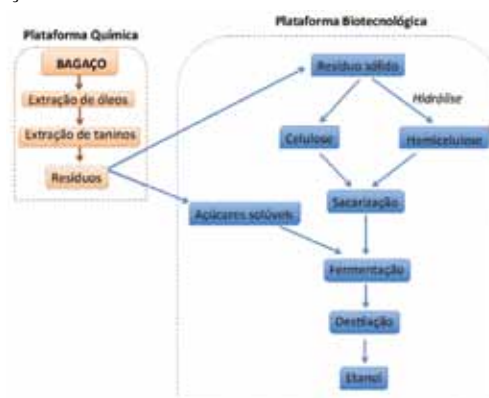
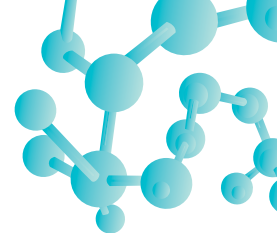


Figura 2- Plataformas Química e Biotecnológica integradas para valorização de resíduos vitivinícolas.

Referências

- [1] Spigno G., Pizzorno T., De Faveri & D.M. (2008) Cellulose and hemicelluloses recovery from grape stalks. *Bioresour. Technol.* 99, 4329–4337.
- [2] Ruberto G., Renda A., Amico V. & Tringali C. (2008) Volatile components of grape pomaces from different cultivars of Sicilian *Vitis vinifera* L. *Bioresour. Technol.* 99, pp. 260–268.
- [3] Pinelo M., Arnous A. & Meyer A.S. (2006) Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. *Trends Food Sci. Tech.* 17, pp. 579–590.
- [4] Liu H.M., Guo J.H., Liu P., Cheng Y.J., Wang B.Q., Long C.A. & Deng B.X. (2010) Inhibitory activity of tea polyphenol and *Candida ernobii* against *Diplodia natalensis* infections. *J. Appl. Microbiol.* 108, pp. 1066–1072.
- [5] Braga F.G., Silva F.A.L. & Alves A. (2002) Recovery of Winery By-products in the Douro Demarcated Region: Production of Calcium Tartarate and Grape Pigments. *Am. J. Enol. Vític.* 53, pp. 41–45.
- [6] Bustamante M.A., Moral R., Paredes C., Pérez-Espinosa A., Moreno-Caselles J. & Pérez-Murcia M.D. (2008) Agrochemical characterisation of the solid by-products and residues from the winery and distillery industry. *Waste Manag.* 28, pp. 372–380.
- [7] Díaz A.B., de Ory I., Caro I. & Blandino A. (2012) Enhance hydrolytic enzymes production by *Aspergillus awamori* on supplemented grape pomace. *Food Bioprod. Process.* 90, pp.72–78.
- [8] Mendes J.A.S., Prozil S.O., Evtuguin D.V. & Lopes L.P.C. (2013) Towards comprehensive utilization of winemaking residues: Characterization of grape skins from red grape pomaces of variety Touriga Nacional. *Ind. Crop. Prod.* 43, pp. 25–32.
- [9] Octave S. & Thomas D. (2009) Biorefinery: Toward an industrial metabolism. *Biochimie* 91, pp. 659–664.
- [10] Carreira P., Mendes J.A.S., Trovatti E., Serafim L.S., Freire C.S.R., Silvestre A.J.D. & Neto C.P. (2011) Utilization of residues from agro-forest industries in the production of high value bacterial cellulose. *Bioresour. Technol.* 102, pp. 7354–7360.
- [11] Legge R.L. (1990) Microbial cellulose as a specialty chemical. *Biotechnol. Adv.* 8, pp. 303–319.



Yarrowia lipolytica: um fábrica celular no contexto de biorrefinaria

Isabel Belo

IBB – Instituto de Biotecnologia e Bioengenharia, Centro de Engenharia Biológica da Universidade do Minho, Campus de Gualtar, 4710-057 Braga, Portugal, tel: +351253604413; Fax: +351253604429

E-mail: ibelo@deb.uminho.pt

Sumário

Yarrowia lipolytica é uma das leveduras “não-convencionais” mais amplamente estudadas. É um microrganismo estritamente aeróbio, não patogénico para humanos e de estatuto GRAS. Esta espécie apresenta uma vasta gama de possíveis fontes de carbono, tais como: açúcares, álcoois, ácidos orgânicos e substratos hidrofóbicos, como triglicéridos, ácidos gordos ou alcanos. Além disso, é capaz de produzir metabolitos importantes e possui uma intensa actividade secretora, o que justifica o seu enorme interesse industrial no âmbito do conceito de biorrefinaria. De entre os vários produtos que podem ser obtidos pela utilização deste biocatalisador incluem-se enzimas, ácidos orgânicos, aromas, biosurfactantes, lípidos microbianos, etc. Este trabalho apresenta uma visão geral resumida das características da espécie *Yarrowia lipolytica* e suas principais aplicações biotecnológicas.

Características da levedura *Y. lipolytica*

Sendo uma levedura, *Y. lipolytica* é um microrganismo eucariótico, do reino Fungi, pertencente à classe dos Ascomycetes, subclasse Hemiascomycetes. Foi originalmente classificada como *Candida lipolytica*, uma vez que não foi descrito nenhum estado sexual, e depois reclassificada como *Endomycopsis lipolytica*, *Saccharomycopsis lipolytica* e, finalmente, *Y. lipolytica*, sendo a única espécie inicial do género *Yarrowia* [1]. *Y. lipolytica* é uma espécie que apresenta dimorfismo, ou seja, consegue alternar, reversivelmente, entre duas formas morfológicas distintas, células ovais típicas de leveduras ou hifas [2]. Acredita-se que o dimorfismo funciona como um mecanismo de defesa celular contra condições adversas, tais como temperatura e alterações nutricionais.

Estirpes de *Y. lipolytica* são frequentemente associadas a substratos proteicos ou hidrofóbicos, tais como alcanos ou lípidos [3], podendo ser comumente isoladas de produtos lácteos, tais como queijos, ou contaminante de vários alimentos refrigerados comerciais (iogurte e salsichas), bem como do solo, água de esgoto e outros ambientes poluídos.

Substratos utilizados

Substratos hidrofóbicos

A capacidade de utilização de substratos hidrofóbicos (SH) por *Y. lipolytica* está reportada há décadas, mas muitos aspetos do metabolismo de SH não estão totalmente descritos [1]. Um dos mecanismos de adaptação que esta levedura possui para poder utilizar SH, como alcanos, ácidos gordos e triglicéridos, consiste na produção de emulsificantes e lípases extracelulares, que permitem a solubilização dos substratos insolúveis em água, facilitando o acesso da célula aos SH. Liposan® é um dos biosurfactantes inicialmente descritos produzidos por *Y. lipolytica*. Os surfactantes são importantes na estabilização das emulsões bem como na distribuição de tamanhos de gotas dos SH. O contacto entre as células e o

substrato pode incluir a adesão de células a grandes gotas de SH ou a adesão de pequenas gotas à superfície das células, sendo determinante para o metabolismo de cada tipo de SH [4].

Outros substratos

Y. lipolytica é capaz de degradar várias hexoses, como glucose, frutose e manose. No entanto, as membranas celulares não são livremente permeáveis a toda a variedade de açúcares. O transporte é o primeiro passo no metabolismo dos hidratos de carbono, exceto nos casos em que um di- ou tri-sacárido é hidrolisado extracelularmente.

Nas culturas de *Y. lipolytica* podem ser utilizadas elevadas concentrações de glucose dado não afetarem a taxa respiratória celular. No entanto a presença de glucose pode exercer repressão na utilização de outros substratos, como por exemplo ácidos orgânicos.

Y. lipolytica é capaz de utilizar ácido acético, láctico, propiónico, málico, succínico, cítrico e oleico como única fonte de carbono e energia.



Figura 1- Potencialidades de aplicação biotecnológica da espécie *Yarrowia lipolytica*.

Outros compostos orgânicos que a levedura consegue metabolizar são álcoois como o etanol e glicerol, sendo que para valores acima dos 3% o etanol torna-se inibitório para as células, ao contrário do glicerol que pode ser metabolizado em concentrações elevadas no meio de cultura [5].

Aplicações biotecnológicas

Y. lipolytica é capaz de crescer eficientemente em diversos substratos de baixo custo, incluindo SH, como gorduras e óleos vegetais, cujos metabolitos de degradação confluem no muito eficiente ciclo de Krebs que esta espécie possui [1]. Dependendo de factores nutricionais e de condições ambientais de crescimento, podem ser obtidos diferentes metabolitos de grande interesse industrial (Fig.1).

Enzimas

Lipases constituem um dos grupos de produtos mais importantes excretados por *Y. lipolytica*. A produção de lipases pode ocorrer em meios suplementados com hidratos de carbono mas a presença de um indutor lipídico (ex. azeite e outros óleos), é essencial a uma maior produção das enzimas. Quantidades significativas de lipases foram obtidas em meios com ricinoleato de metilo [6] e em meios de efluentes líquidos de lagares de azeite [7]. Neste caso, a levedura revelou um potencial bastante promissor para o tratamento e valorização deste subproduto agro-industrial, mostrando-se bastante resistente aos contaminantes (ex: compostos fenólicos) presentes no efluente e podendo ainda crescer em meios com elevado teor de carga orgânica.

Como acontece para outros metabolitos deste microrganismo aeróbio, a disponibilidade de oxigénio no meio afeta a produção de lipases. Este bioprocessos tem sido alvo de estudos de optimização com vista às estratégias de oxigenação, utilizando compostos inertes transportadores de oxigénio, como os PFCs [5], bem como aumentando a pressão total de ar no bioreator [8].

A espécie *Y. lipolytica* produz naturalmente e com elevado rendimento, dependendo, naturalmente de condições específicas do meio, várias outras enzimas, como por exemplo proteases e RNases.

Ácidos orgânicos

Dependendo de factores nutricionais utilizados para limitação do crescimento de *Y. lipolytica*, diferentes compostos intermediários do ciclo de Krebs podem acumular no meio [5]. O crescimento da levedura *Y. lipolytica* em condições de limitação de azoto e em excesso de carbono leva à secreção de ácido cítrico e de ácido isocítrico. A razão entre a quantidade de ácido cítrico e isocítrico produzidos depende do substrato usado, sendo maior para substratos como glucose, glicerol e etanol do que para SH. A limitação de tiamina a valores baixos de pH causa, principalmente, a secreção dos ácidos α -cetoglutarico e pirúvico em algumas estirpes de *Y. lipolytica*.

A produção de ácido cítrico por *Y. lipolytica* a partir de glicerol apresenta elevados rendimentos e concentrações finais de ácido (acima de 60 g/L). Neste processo, a levedura apresenta a vantagem de poder utilizar o glicerol bruto, proveniente da produção do biodiesel, que é um substrato abundante e de baixo custo.

“Single-cell-oil”

Sendo uma levedura oleaginosa, *Y. lipolytica* é capaz de armazenar lípidos (corpos lipídicos) no interior da célula, até cerca de 70% da sua biomassa. Os lípidos microbianos, designados de SCO do inglês “Single-cell-oil”, têm sido considerados uma alternativa interessante à gordura de origem de animal ou a óleos de algumas plantas, aproximando-se destes últimos em termos da composição em ácidos gordos [1].

A espécie *Y. lipolytica* apresenta a vantagem de produzir SCO a partir de substratos de baixo custo como glicerol bruto proveniente da produção de biodiesel, resíduos de gordura animal rica em estearina e óleos vegetais (ex. de milho).

Aromas

As lactonas são moléculas que possuem um ciclo carbonado que comporta um átomo de oxigénio. Esta estrutura resulta da esterificação intramolecular (ou ciclização) de um ácido hidroxilado. As lactonas são muito interessantes na indústria alimentar devido ao seu aroma frutado.

A γ -decalactona ($C_{10}H_{18}O_2$), composto de aroma a pêssego, é a lactona principal que é produzida por *Y. lipolytica*, a partir da biotransformação do ácido ricinoleico, podendo a levedura usar como substrato além do ácido, os seus ésteres de metilo, ou ainda óleo de rícino [1]. Esta capacidade da levedura utilizar o óleo e ésteres está ligada à capacidade da levedura de produzir lipases e esterases [9]. O ácido ricinoleico é degradado por quatro ciclos sucessivos da β -oxidação peroxissomal em ácido-4-hidroxi-decanoico que lactoniza em condições ácidas, originando γ -decalactona (Fig.2).

A produção desta lactona por *Y. lipolytica* tem sido alvo de estudos de optimização que têm em consideração a selecção das condições ambientais [6] e do modo de operação [10].

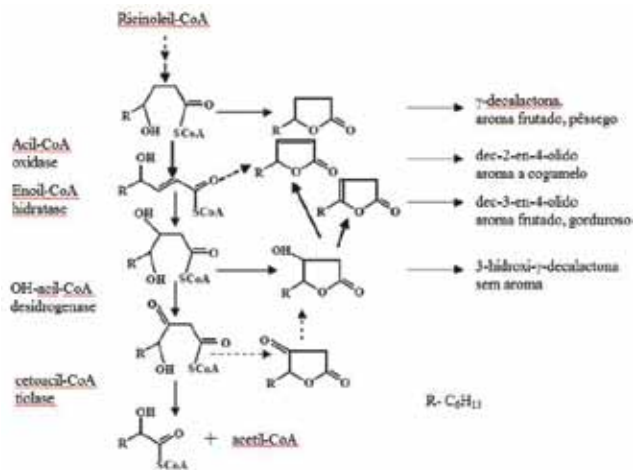


Figura 2- Representação dos quatro ciclos sucessivos da β -oxidação peroxissomal, com indicação das enzimas envolvidas e das lactonas que se podem formar, bem como as suas características aromáticas (adaptado de [1]).

Conclusões

Foram abordadas algumas aplicações biotecnológicas da levedura *Y. lipolytica*, sendo que muitas outras já exploradas ficaram certamente por referir. É de salientar a importância desta levedura na utilização de substratos hidrofóbicos nas várias aplicações referidas e ainda em biorremediação, principalmente de produtos petrolíferos. Refira-se ainda, uma das

mais antigas aplicações reportadas desta célula, como a produção de proteína microbiana (SCP) a partir de n-parafinas.

Além disso, a disponibilidade actual de ferramentas genéticas sofisticadas e a análise completa do genoma de *Y. lipolytica*, fez com que esta levedura se tornasse num sistema versátil e seguro para a expressão e eficiente secreção de proteínas heterólogas de grande interesse industrial.

Referências

- [1] Thevenieau, F, Nicaud, J-M, Gaillardin, C (2009) Applications of the Non-Conventional Yeast *Yarrowia lipolytica*, in: T. Satyanarayana, G. Kunze (eds.), *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications*, 589, Springer Science and Business Media B.V.
- [2] Kawasse, F M; Amaral, P F, Rocha-Leão, M H M, Amaral, A L, Ferreira, E C, Coelho, M A Z, (2003) Morphological analysis of *Yarrowia lipolytica* under stress conditions through image processing, *Bioprocess Biosyst. Eng.*, 25: 371 – 375.
- [3] Fickers P, Benetti PH, Waché Y, Marty A, Mauersberger S, Smit MS, Nicaud JM. (2005) Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications. *FEMS Yeast Research* 5:527-543.
- [4] Gomes, N, Waché, Y, Teixeira, J A, Belo, I (2011) Oil-in-water emulsions characterization by laser granulometry and impact on γ -decalactone production in *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol. Lett.* 33:1601–1606.
- [5] Coelho, M A Z, Amaral, P F F, Belo, I (2010). *Yarrowia lipolytica*: an industrial workhorse. In: *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, (Méndez-Vilas, A., Ed.), Formatex, Badajoz, 2, 930-940.
- [6] Gomes, N., Teixeira, J A, Belo, I (2010) The use of methyl ricinoleate in lactones production by *Yarrowia lipolytica*: aspects of bioprocess operation that influence the overall performance. *Biocatalysis and Biotransformation* 28 (4), 227-234.
- [7] Gonçalves, C, Lopes, M, Ferreira, J P, Belo, I (2009) Biological treatment of olive mill wastewater by non-conventional yeasts. *Bioresource Technology* 100(15): 3759-3763.
- [8] Lopes, M, Gomes, N, Gonçalves, C, Coelho, M A Z, Mota, M, Belo, I (2008) *Yarrowia lipolytica* lipase production enhanced by increased air pressure. *Lett. Appl. Microbiol.* 46:2, 255-260.
- [9] Braga, A, Gomes, N, Belo (2012). Lipase Induction in *Yarrowia lipolytica* for Castor Oil Hydrolysis and Its Effect on γ -Decalactone Production. *J Am Oil Chem Soc* 89(6), 1041-1047.
- [10] Gomes, N, Teixeira, J A; Belo, I (2012) Fed-batch versus batch cultures of *Yarrowia lipolytica* for gamma-decalactone production from methyl ricinoleate. *Biotechnol. Lett.* 34: 649-654.



Experience the quintessence

Milli-Q® Integral system
pure and ultrapure water at your fingertips.

- Dual POD (point-of-delivery) concept saves space and increases convenience.
- Lower running costs and water waste with exclusive Elux® technology.

Experience More www.millipore.com/ultrapure



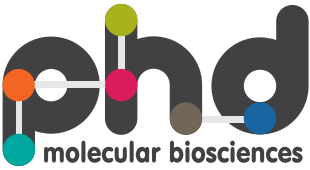
Merck Millipore is a division of 

studentships available

applications 2013

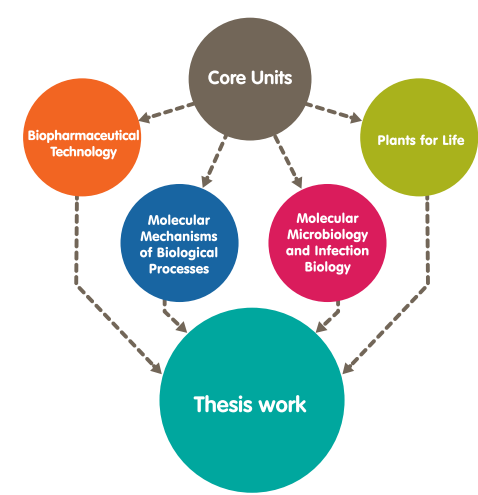
20th May to 23rd June


PhD Program



30 ECTS coursework + 210 ECTS research

www.itqb.unl.pt/phdMolBioS





Biorrefinaria de base lenhocelulósica: valorização do licor de cozimento ao sulfito ácido

Luísa S. Serafim, Ana M.B.R. Xavier

Departamento de Química, CICECO, Universidade de Aveiro, Campus Universitário de Santiago, P-3810-193 Aveiro, Portugal

E-mail: luisa.serafim@ua.pt, abx@ua.pt

Introdução

Atualmente existe uma necessidade urgente em reduzir a dependência de combustíveis fósseis, como o petróleo, o gás natural ou o carvão, de modo a reduzir as emissões gasosas responsáveis pelas alterações climáticas. Nos últimos anos a procura de fontes de matérias-primas alternativas para a obtenção de combustíveis, de químicos e materiais tem-se intensificado. Entre as várias hipóteses, a biomassa de origem vegetal, que não se destina à alimentação humana ou animal, tem-se posicionado como uma das principais candidatas a fonte de matérias-primas, para transformação pela indústria química; este é o caso dos resíduos ou subprodutos industriais resultantes do processamento de biomassa lenhocelulósica [1]. As indústrias alimentares e de pastas de papel geram várias toneladas de resíduos ou subprodutos resultantes do processamento deste tipo de biomassa vegetal. Uma biorrefinaria, conceito que derivou das tradicionais refinarias de petróleo, define-se como um complexo que integra várias unidades transformadoras de biomassa por via química ou biológica para a obtenção de diferentes produtos que in-

cluem químicos, combustíveis ou materiais [2]. A biomassa lenhocelulósica é uma matéria-prima complexa rica em hidratos de carbono, que no âmbito de uma biorrefinaria pode originar produtos de valor acrescentado¹.

As tecnologias utilizadas numa biorrefinaria podem ser classificadas como extrativas, bioquímicas ou termoquímicas e a sua integração deve resultar num processo sequencial que praticamente não gere resíduos, ou que converta todos os que são gerados [2]. A integração dos três tipos de processos numa biorrefinaria deve contribuir para o aumento da especificidade, produtividade, flexibilidade e eficiência do processo.

Neste trabalho propõem-se a utilização de um subproduto da indústria papelreira, o licor de cozimento ao sulfito ácido, HSSL, como substrato para diversos processos biológicos que se pretendem integrar futuramente de acordo com o conceito de biorrefinaria (Figura 1). O processamento bioquímico dos açúcares presentes no HSSL é conhecido, tendo já sido publicados estudos descrevendo a produção de bioetanol e de proteína microbiana. Os processos descritos neste trabalho, além de bioetanol e proteína microbiana, permitem ainda a obtenção de biopolímeros como polihidroxialcanoatos ou celulose bacteriana e ácidos orgânicos voláteis.

Licor do Cozimento ao Sulfito Ácido (HSSL)

O licor ao sulfito ácido (HSSL) é um subproduto das indústrias de pastas de papel que realizam o processamento ao sulfito ácido. É produzido diariamente em grande escala, é evaporado, e depois queimado para geração de energia e recuperação de químicos. O objetivo principal do processo de cozimento ao sulfito ácido é remover a lenhina e hemiceluloses da madeira de modo a manter a integridade das fibras de celulose. As 6 a 12h de processamento a 135-145 °C e pH (1-2) com $\text{SO}_2/\text{MgHSO}_3$ aquoso são responsáveis pela hidrólise das hemiceluloses, que se libertam para a fase aquosa que constitui este licor rico em monossacarídeos. Em comparação com outros materiais lenhocelulósicos este licor tem a grande vantagem de conter os polissacarídeos já hidrolisados sendo suscetíveis de ser diretamente metabolizados por microrganismos. O HSSL pode ser um substrato adequado para a produção de bioetanol, bem como de outros produtos de base biológica. A integração destes bioprocessos, na planta fabril da indústria de pastas, poderá aumentar a sustentabilidade e rentabilidade desta indústria, uma vez permitirá produzir outros produtos de valor acrescentado. O HSSL apresenta cerca de 80 g/L de lenhossulfonatos, derivados da lenhina e 50 g/L de monossacarídeos dos quais cerca de 25 g/L são de xilose [3] (Tabela 1).

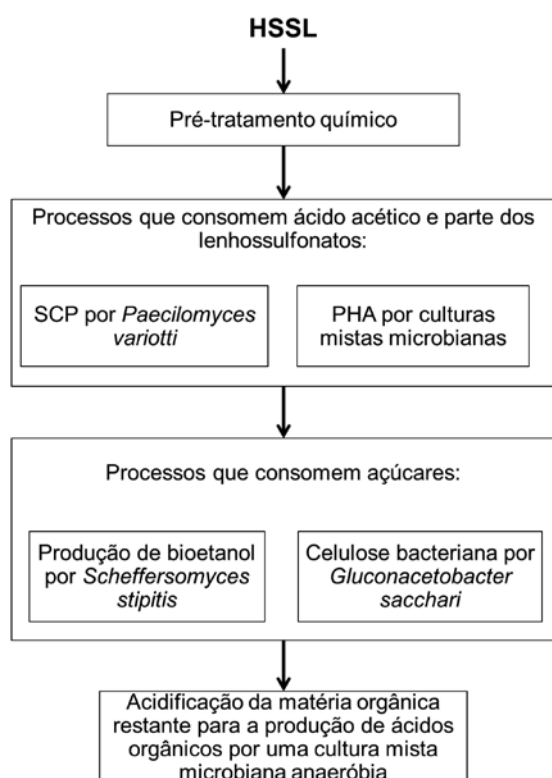


Figura 1- Esquema proposto para uma biorrefinaria de base lenhocelulósica que utiliza HSSL como substrato

Tabela 1- Composição do HSSL de *Eucalyptus globulus*

Componente	Concentração (g.L ⁻¹)	Monossacarídeos	Concentração (g.L ⁻¹)
Lenhosulfonatos	78,2 ± 0,6	D-xilose	24,6 ± 0,5
Ácido acético	8,2 ± 0,3	D-manose	8,5 ± 0,9
Furfural	Vestígios	L-arabinose	7,8 ± 0,3
Cinzas	15,1 ± 0,2	D-galactose	4,5 ± 0,1
Açúcares Redutores	42,8 ± 0,4	D-glucose	2,3 ± 0,1
		L-ramnose	1,6 ± 0,3
pH	3,40 ± 0,05	L-fucose	0,4 ± 0,3

Processamento bioquímico do HSSL

O bioprocessamento das pentoses a nível industrial é um desafio técnico, uma vez que o seu metabolismo é mais difícil que o das hexoses, que são vastamente exploradas a nível industrial. *Scheffersomyces stipitis* é a levedura mais eficiente na conversão de pentoses a etanol. No entanto, esta levedura é altamente sensível aos inibidores existentes no HSSL a saber, os ácidos fórmico e acético, furfural, ácido levulínico e fenólicos de baixo peso molecular. A utilização de HSSL como matéria-prima para a produção de bioprodutos implica um pré-tratamento, para remoção de inibidores. Ao fazer a separação dos açúcares com resinas de permuta iónica conseguiu-se a conversão a bioetanol com uma elevada eficiência de 94% [3]. Contudo este tipo de separação em coluna não é facilmente aplicável a nível industrial e implicaria grandes custos de processo. Estudou-se também a desintoxicação do HSSL com o fungo filamentosos *Paecilomyces variotii* que consegue metabolizar este tipo de compostos. Otimizou-se este tipo de tratamento tendo-se realizado posteriormente a fermentação de *S. stipitis* com sucesso [4].

Proteína microbiana

A biomassa de *P. variotii* pode ser utilizada para a produção de proteína microbiana (SCP) para nutrição animal ou eventualmente humana. Na Suécia e Finlândia os subprodutos de indústrias de pastas com base em madeira de resinosas, e não de folhosas (como o é o caso da madeira de eucalipto), já foram usados como substratos para a produção industrial de SCP aprovada para nutrição humana [5]. Porém a fermentação de HSSL, por *P. variotii*, a fim de produzir SCP recentemente foi estudada. A biomassa produzida apresentou um teor de proteína elevado (82,8%), com uma baixa concentração de DNA (1,1%), mostrando o verdadeiro potencial para a alimentação animal e, eventualmente, para a nutrição humana. Assim, a indústria de pastas poderá integrar a produção de bioetanol após a produção SCP e melhorar a sustentabilidade da indústria de pastas [1].

Bioetanol

Dentro dos possíveis bioprodutos a partir do HSSL o bioetanol é o biocombustível que poderá ser produzido para ser utilizado puro, como um combustível “verde”, ou misturado com a gasolina [3].

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é incapaz de utilizar a xilose como única fonte de carbono e incapaz de converter a etanol de forma eficiente, apesar de possuir os genes que permitem a utilização da xilose. De facto estes são expres-

sos em níveis baixos, resultando numa taxa de produção de etanol, a partir de xilose, 10 vezes inferior à verificada para a glucose. As hexoses são metabolizadas diretamente através da glicólise mas a metabolização das pentoses é iniciada pela via das pentoses fosfato antes da entrada na glicólise.

Das várias leveduras testadas para converter a xilose, *S. stipitis* foi a que mostrou melhor potencial para aplicação industrial, devido aos elevados rendimentos obtidos [1, 3]. A produção de bioetanol partindo de HSSL tratado com resinas de permuta iónica foi de facto muito promissora [3] e recentemente foi estudada partindo de HSSL desintoxicado com *P. variotii* [4]. A otimização da sua produção, está a ser estudada pela otimização do arejamento do reator, de modo a que, por um lado a levedura possa crescer realizando o metabolismo de crescimento aeróbio, mas que por outro lado, possa desenvolver o metabolismo anaeróbio de fermentação alcoólica proporcionando elevadas taxas de conversão.

Biopolímeros

Sendo rico em açúcares e em ácido acético o HSSL pode servir como substrato para microrganismos produtores de biopolímeros, como os polihidroxialcanoatos (PHAs) e a celulose bacteriana [1, 6, 7].

Os PHAs são polímeros biodegradáveis que, devido às suas propriedades físico-químicas podem substituir os plásticos convencionais em aplicações como embalagens, dispositivos médicos e outro material descartável. Utilizando HSSL como substrato num reator descontínuo sequencial em condições de alimentação transiente selecionou-se uma cultura mista microbiana capaz de acumular polihidroxibutirato até 67.6% do seu peso seco, utilizando o ácido acético e alguns dos lenhosulfonatos presentes [7]. Os microrganismos não utilizaram a xilose e glucose presentes no HSSL nem para a produção de polímero nem para crescimento, podendo estes açúcares ser utilizados num posterior processo biológico, como por exemplo a produção de bioetanol por *S. stipitis* [7].

Os açúcares presentes no HSSL também podem ser utilizados como substrato para a produção de celulose bacteriana (BC) por *Gluconacetobacter sacchari*. A celulose bacteriana é produzida de forma extracelular por alguns géneros de bactérias e além da sua estrutura micro- e nanofibrilar, é vantajosa em relação à celulose vegetal visto não ter associada hemicelulose e lenhina. Verificou-se que *G. sacchari* produzia 0,29 g/L de BC com uma conversão de açúcares de 28%. Este resultado embora relativamente baixo quando comparado com outros substratos foi considerado promissor e a sua otimização encontra-se em estudo [6].

Ácidos orgânicos voláteis

Sousa (2011) verificou a potencialidade do HSSL poder servir de substrato para o processo de acidificação. Este processo é um dos passos intermédios que compõem a digestão anaeróbia que permite converter material orgânico em metano e dióxido de carbono na ausência de oxigénio. A acidificação produz ácidos orgânicos voláteis como o acético, o propiônico e o láctico. Estes ácidos podem ser utilizados como substratos por exemplo para a produção de PHAs. Nos ensaios efetuados verificou-se a produção de ácidos acético, propiônico e butírico quando se testou HSSL como substrato a) sem qualquer pré-tratamento, b) após o pré-tratamento químico e c) efluente da produção de bioetanol por *S. stipitis*, a partir de HSSL pré-tratado quimicamente e biologicamente por *P. variotti*. Em qualquer dos casos, os açúcares e os lenhossulfonatos presentes foram convertidos nos ácidos referidos [8].

Agradecimentos

As autoras agradecem aos fundos do FEDER através do Programa Operacional Fatores de Competitividade – COMPETE da FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia através do projeto PEST-C/CTM/LA/0011/2011. As autoras agradecem ao Professor Dmitry V. Evtuguin pelo apoio científico e técnico e ainda à CAIMA, Indústria de Celulose S.A., Constância, Portugal” pelo HSSL.

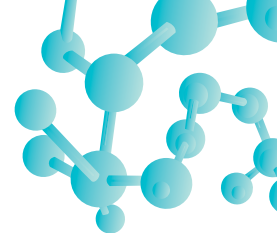
Referências

- [1] Fernandes, D. L. A., S. R. Pereira, L. S. Serafim, D. Evtuguin and A. Xavier (2011). Second Generation Bioethanol from Lignocellulosics: Processing of Hardwood Sulphite Spent Liquor. Bioethanol. M. A. P. Lima, Intech.
- [2] Clark, J. H., R. Luque and A. S. Matharu (2012) “Green Chemistry, Bio-fuels, and Biorefinery.” Annual Review of Chemical and Biomol. Eng. 3: 183-207.
- [3] Xavier, A. M. R. B., M. F. Correia, S. R. Pereira and D. V. Evtuguin (2010). “Second-generation bioethanol from eucalypt sulphite spent liquor.” Bioresource Technol. 101(8): 2755-2761.
- [4] Pereira, S. R., Š. Ivanuša, D. V. Evtuguin, L. S. Serafim and A. M. R. B. Xavier (2012). “Biological treatment of eucalypt spent sulphite liquors: A way to boost the production of second generation bioethanol.” Bioresource Technol. 103(1): 131-135.
- [5] Pereira, S. R., L. S. Serafim and A. M. R. B. Xavier (2013). “Production of Single Cell Protein from Eucalypt Sulphite Spent Liquor by *Paecilomyces variotii*.” Biochem. Eng. J. (Submitted).
- [6] Carreira, P., J. A. S. Mendes, E. Trovatti, L. S. Serafim, C. S. R. Freire, A. J. D. Silvestre and C. P. Neto (2011). “Utilization of residues from agro-forest industries in the production of high value bacterial cellulose.” Bioresource Technol. 102(15): 7354-7360.
- [7] Queirós, D. C. (2012). Produção de PHA como forma de valorização de resíduos industriais. Mestrado, Departamento de Química: Universidade de Aveiro.
- [8] Sousa, F. L. C. d. (2011). Valorização de subprodutos industriais através da produção de AOVs. Mestrado, Departamento de Química: Universidade de Aveiro.



spbt
sociedade
portuguesa de
biotecnologia

Actualize as suas quotas em
www.spbt.pt



Produção de etanol a partir de subproduto cervejeiro

Nuno G.T. Meneses, José A. Teixeira, Solange I. Mussatto

Instituto de Biotecnologia e Bioengenharia (IBB), Centro de Engenharia Biológica, Universidade do Minho.
Campus Gualtar, 4710-057, Braga, Portugal.

E-mail: solange@deb.uminho.pt; solangemussatto@hotmail.com

Resumo

O processo de fabricação de cerveja inevitavelmente envolve a geração de diversos resíduos e subprodutos. O mais comum dos subprodutos é o *dresh*, o qual é gerado a partir da principal matéria-prima usada para a elaboração da cerveja, o malte de cevada. O *dresh* é gerado em grandes quantidades ao longo do ano, mas seu uso ainda é limitado, sendo basicamente vendido para fazendeiros locais para ser utilizado como alimento para o gado, ou simplesmente é descartado na natureza. Tendo em conta a quantidade considerável em que este subproduto é continuamente gerado, e considerando que se trata de um material rico em açúcares, o nosso grupo de pesquisa investigou a possibilidade de reutilizar o *dresh* como matéria-prima para a produção de etanol de segunda geração. A possibilidade de produzir etanol combustível a partir de *dresh* foi confirmada e esta aplicação pode ser considerada uma alternativa de interesse para a valorização deste subproduto industrial.

Introdução

A indústria cervejeira gera quantidades relativamente grandes de subprodutos e resíduos, sendo que grande parte destes provém de produtos agrícolas, pelo que podem ser facilmente reciclados e reutilizados, tornando a indústria cervejeira mais amiga do ambiente [1]. O principal destes subprodutos é o *dresh*, oriundo principalmente dos grãos de malte de cevada após a etapa de elaboração do mosto cervejeiro, e constituído de restos de casca e polpa dos grãos de cevada [2]. Face à necessidade de se encontrar alternativas ao petróleo, a produção de combustíveis a partir de resíduos agroindustriais como o *dresh* pode ser um mercado interessante a explorar num futuro próximo.

Tendo em conta os incentivos recentes à produção de combustíveis alternativos aos que tem origem no petróleo [3], e às quantidades consideráveis com que o *dresh*, uma matéria-prima rica em açúcares [4], é continuamente gerado, o nosso grupo de pesquisa investigou a possibilidade de reutilizar o *dresh* como matéria-prima para a produção de etanol de segunda geração.

Tecnologia

A produção de etanol foi avaliada utilizando o *dresh* na sua forma original, ou seja, tal como obtido (A), e também o

dresh previamente submetido a processos de pré-tratamento por auto hidrólise (121°C; 1 atm) durante 10 (B) ou 90 minutos (C). Em seguida, as três matérias-primas (A, B e C) foram submetidas a um processo de hidrólise com ácido sulfúrico diluído para extrair os açúcares presentes na sua composição química. Estas reações foram realizadas em reatores de aço inoxidável a uma temperatura de 163°C, durante 45 minutos. A Tabela 1 apresenta a composição de açúcares nos hidrolisados obtidos a partir das matérias-primas tratadas de três formas diferentes.

Perante as elevadas concentrações de pentoses (xilose e arabinose) presentes nos hidrolisados, optou-se por utilizar a levedura *Pichia stipitis* para realizar a fermentação para produção de etanol, dada a elevada capacidade desta levedura para fermentar ambos açúcares do tipo hexoses e pentoses a etanol [5]. As fermentações foram realizadas em frascos de 250 mL contendo 100 mL de meio de fermentação, inoculado com uma concentração celular inicial de 1 g/L, à 30°C, 200 rpm, durante 30 h.

A maior produção de etanol ocorreu a partir do hidrolisado obtido do *dresh* A (não tratado por auto hidrólise) (Tabela 2). Este ensaio também apresentou os maiores valores de fator de rendimento ($Y_{P/S}$) e eficiência em etanol (ζ_P). De facto, a produção de etanol neste meio de fermentação ocorreu com bastante sucesso, correspondendo a uma eficiência de

Tabela 1 - Composição de açúcares nos hidrolisados produzidos a partir das três amostras de *dresh* utilizadas como matéria-prima para a produção de etanol.

Hidrolisado	Glucose (g/L)	Xilose (g/L)	Galactose (g/L)	Arabinose (g/L)
<i>Dresh</i> A	7,1	8,3	1,0	4,3
<i>Dresh</i> B	3,4	9,2	1,7	5,4
<i>Dresh</i> C	6,8	12,0	1,3	5,3

Tabela 2 - Valores dos parâmetros fermentativos das fermentações dos hidrolisados de *dresh* obtidos por hidrólise ácida, pela levedura *Pichia stipitis*.

Parâmetros fermentativos	Etanol (g/L)	Açúcares consumidos (g/L)	Açúcares residuais (g/L)	$Y_{P/S}$ (g/g)	Q_p (g/L.h)	η_p (%)
<i>Dresh A</i>	6,2	13,9	6,3	0,4	0,2	86,3
<i>Dresh B</i>	4,6	12,0	7,5	0,4	0,2	74,5
<i>Dresh C</i>	2,8	8,4	8,6	0,3	0,1	66,7

processo de 86%. Estes valores podem ainda ser melhorados através de estudos que otimizem as condições de fermentação para maximizar o desempenho da levedura. Outra alternativa seria avaliar o desempenho de alguma outra espécie de levedura que fosse também capaz de consumir e converter arabinose a etanol, uma vez que este açúcar encontra-se presente em quantidades consideráveis nos hidrolisados produzidos a partir de *dresh* (Tabela 1).

É importante realçar que para além do elevado rendimento em etanol obtido neste ensaio, destaca-se a não necessidade de realização de pré-tratamento da matéria-prima para utilização neste processo, o que representa uma importante vantagem em termos económicos. Muito provavelmente, o pré-tratamento removeu do *dresh* alguns componentes que poderiam ser de interesse para a levedura durante a fermentação, desfavorecendo a produção de etanol.

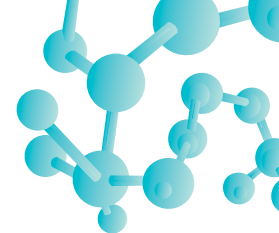
Conclusões

Este estudo demonstrou que o *dresh* constitui uma matéria-prima de grande potencial para uso na produção de etanol. Tal facto vem de encontro com as necessidades atuais de se encontrar matérias-primas de baixo custo para a produção de etanol de segunda geração. Para além disso, a produção

de etanol a partir deste subproduto industrial é também de interesse para a própria indústria cervejeira pois representaria a valorização deste subproduto que é gerado em grandes quantidades. Outra importante vantagem da utilização do *dresh* para a produção de etanol seria em termos ambientais, pois evitaria o descarte deste material na natureza.

Referências

- [1] Mussatto SI, Dragone G, Roberto IC (2006) Brewer's spent grain: generation, characteristics and potential applications. J. Cereal Sci. 43, 1-14.
- [2] Mussatto SI (2009) Biotechnological potential of brewing industry by-products. In: Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation. 1 ed. Netherlands, Springer, v.1, pp. 313-326.
- [3] Mussatto SI, Dragone G, Guimarães PMR, Silva JPA, Carneiro LM, Roberto IC, Vicente A, Domingues L, Teixeira JT (2010) Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. Biotechnol. Adv. 28, 817-830.
- [4] Mussatto SI, Roberto IC (2006) Chemical characterization and liberation of pentose sugars from brewer's spent grain. J. Chem. Technol. Biotechnol. 81, 268-274.
- [5] Silva JPA, Mussatto SI, Roberto IC, Teixeira JA (2012). Fermentation medium and oxygen transfer conditions that maximize the xylose conversion to ethanol by *Pichia stipitis*. Renewable Energy 37, 259-265.



Biorrefinarias de microalgas

Alberto Reis, Luísa Gouveia

Laboratório Nacional de Energia e Geologia, I.P., Unidade de Bioenergia,
Estrada do Paço do Lumiar 22, 1649-038 Lisboa, Portugal

E-mail: luisa.gouveia@lneg.pt ; alberto.reis@lneg.pt

As microalgas autotróficas são organismos fotossintéticos, que graças à sua “maquinaria fotossintética” são capazes de transformar a energia luminosa em energia química com a produção de compostos orgânicos.

Os propósitos económicos de produção de biomassa microalgal têm-se alterado ao longo das últimas décadas: após a fase inicial de produção de SCP (*single cell protein*) para alimentar um mundo carente de alimentos e posteriormente como suplemento de alimentação humana, pretendeu-se a obtenção de compostos de química fina, “alimentos dietéticos”, bem como compostos terapêuticos, em aquacultura e recentemente o seu uso como vetor energético. Podem ser usadas para “nutracêuticos” ou “alimentos funcionais” (ex. carotenóides, antioxidantes, ácidos gordos poli-insaturados, polissacáridos, vitaminas, fitoesteróis, minerais ou outros aditivos alimentares); cosméticos; biomateriais; moléculas bioativas com aplicações em agricultura e medicina humana e veterinária e de processos; tratamento de esgotos; bio-sorção de metais pesados; biofertilização e acondicionador de solos para a agricultura; biomassa algal para alimentação animal e humana; algas fixadoras de CO₂ para obviar o problemático efeito de estufa e para bioenergia.

A grande vantagem das microalgas é não competirem com as culturas alimentares uma vez que não necessitam de terrenos aráveis (podem usar terrenos marginais tais como desertos e salinas), não necessitam de água potável (podem usar águas

salobra, salgada, residual e efluentes vários), o seu crescimento é mais rápido, têm maior produtividade de biomassa, maior mitigação de CO₂ (podem ser usadas fontes poluentes, ex. cimenteiras, estações termo-eléctricas), melhor manipulação das culturas, a colheita não é sazonal, possibilidade de obtenção de créditos de carbono e possibilidade de co-aproveitamento de todos os metabolitos.

Apesar do enorme potencial das microalgas como fonte energética, a sua utilização para este fim não é ainda economicamente viável, dado o relativo elevado custo de produção (para muitos autores na ordem de 5000 €/ton), bem afastado do máximo desejável para a obtenção de biocombustíveis (700 €/ton). Daí a necessidade de extrair, fraccionar e valorizar todos os compostos de elevado valor acrescentado numa perspectiva integrada, usando o conceito de biorrefinaria. Até hoje, a biotecnologia microalgal propunha processos mono-produto ou mono-aplicação, desprezando ou ignorando a(s) fracção(ões) e/ou serviços remanescente(s).

As biorrefinarias baseadas em microalgas podem assim incluir uma vasta gama de produtos e indústrias relacionadas e enormes benefícios para a sociedade [1] (Figura 1). Para tal os métodos de colheita de biomassa, ruptura celular e extracção de metabolitos deverão ser eficientes sem serem de tal maneira agressivos que possam degradar alguma das fracções a serem aproveitadas.

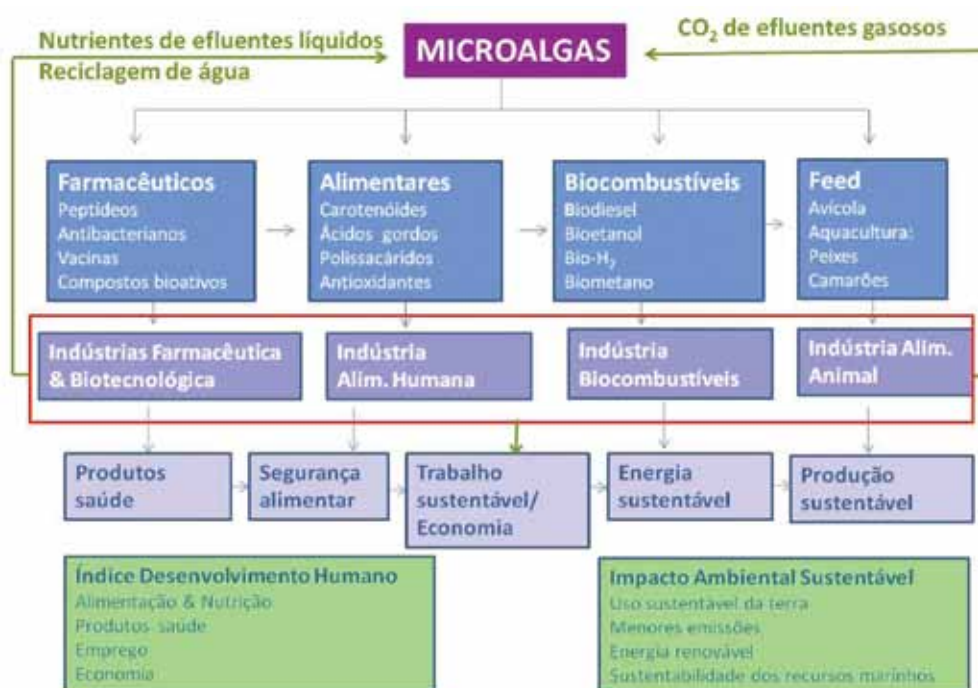


Figura 1- Exemplo de uma refinaria de microalgas, as indústrias relacionadas e os benefícios para a sociedade (adaptado de Subhadra, 2010).

Já foram publicados muitos trabalhos de revisão de Biorrefinarias de microalgas que incluem a produção de biocombustíveis e co-produtos (ex. [2-5]). As aplicações que têm sido revistas incluem a produção de biodiesel, bioetanol, biogás e biohidrogénio e co-produtos tais como ácidos gordos polinsaturados omega-3, fertilizantes, plásticos, proteínas recombinantes e pigmentos (ex. luteína e astaxantina).

Como exemplo, refere-se a biorrefinaria descrita por [6]), baseada na microalga marinha *Nannochloropsis* sp. onde foi efetuada a extração por solventes supercríticos de pigmentos (para alimentação animal/humana), óleos (para biodiesel) e a partir dos resíduos de biomassa após as extrações foi efetuada uma fermentação com a produção de biohidrogénio.

A Unidade de Bioenergia do LNEG tem desenvolvido investigação na área das biorrefinarias de microalgas fruto da experiência acumulada de várias décadas de I & D em diversos produtos de origem microalgal atrás referidos. Como exemplos de linhas de investigação em curso nesta área surgem dois projectos nacionais e várias publicações.

O Projecto FCT "Microalgas-Matéria prima sustentável para a produção de biocombustíveis (biodiesel, bioetanol, bio-H₂ e biogás)"(PTDC/PTDC/AAC-AMB/100354/2008) (Figura 2) (<http://www.lneg.pt/iedt/projectos/392/>) refere-se a uma Biorrefinaria de Microalgas autotrófica onde são extraídos os óleos (para Biodiesel) e/ou os açúcares (para Bioetanol) e dos resíduos da biomassa obtém-se Bio-Hidrogénio (por fermentação anaeróbia) e/ou Biogás (por digestão anaeróbia). A biomassa residual pode ainda ser usada como fertilizante, para alimentação animal e/ou irrigação de solos.

O Projecto FCT "SIMBIOALGA - Nova abordagem simbiótica para a produção integrada e verdadeiramente sustentável de microalgas dirigida para uma plataforma de biorrefinaria" (FCOMP-01-0124-FEDER-013935) (Figura 3) (<http://www.lneg.pt/iedt/projectos/393/>) tem como principal objetivo o desenvolvimento dum sistema fechado, sustentável, eco-

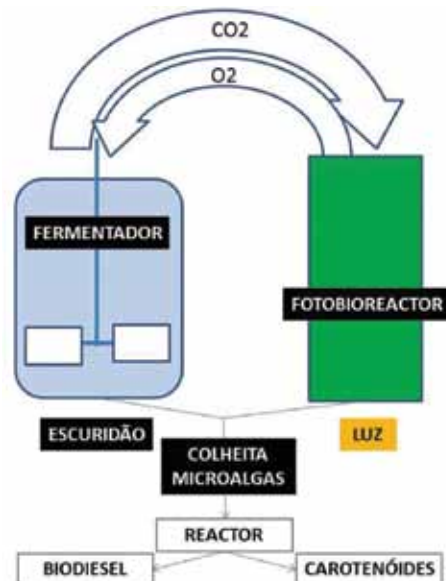


Figura 3- Conceito do projeto FCT SIMBIOALGA - Nova abordagem simbiótica para a produção integrada e verdadeiramente sustentável de microalgas dirigida para uma plataforma de biorrefinaria (FCOMP-01-0124-FEDER-013935) <http://www.lneg.pt/iedt/projectos/393/>

nomicamente viável e de fácil ampliação de escala para a produção microbiana de óleo para biodiesel a partir de microalgas auto e heterotróficas utilizando uma abordagem simbiótica inovadora: interligação dos gases de saída e entrada de um fotobioreactor fechado e de um fermentador, com fornecimento de CO₂ limpo e estéril necessário para a fotossíntese em fotobioreactor a partir da respiração de culturas de elevada densidade celular em fermentadores e o oxigénio necessário para a fermentação aeróbia em fermentadores a partir de fotobioreactores. O sistema simbiótico assegura benefícios mútuos e a sua produtividade foi significativamente superior à soma das produtividades dos sistemas em separado com diminuição dos custos de produção de biomassa e biocombustíveis [7].

Referências

- [1] Subhadra BG (2010) Sustainability of algal biofuel production using integrated renewable energy park (IREP) and algal biorefinery approach. *Energy Policy* 38: 5892–90.
- [2] Subhadra BG, Grinson-George (2011) Algal biorefinery based industry: an approach to address fuel and food insecurity for a carbon-smart world. *J Sci Food Agric* 91: 2–13.
- [3] Mussnug JH, Klassen V, Schlüter A, Kruse O (2010) Microalgae as substrates for fermentative biogas production in a combined biorefinery concept. *Journal of Biotechnology* 150: 51–56.
- [4] Brennan L, Owende P (2010) Biofuels from microalgae - A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products, *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14: 557–577.
- [5] Koller M, Salerno A, Tuffner P, Koinigg M, Böchzelt H, Schober S, Pieber S, Schnitzer H, Mittelbach M, Brauneget G (2012) Characteristics and potential of micro algal cultivation strategies: a review. *Journal of Cleaner Production*. doi.org/10.1016/j.jclepro.2012.07.044.
- [6] Nobre B, Villalobos BF, Barragán BE, Oliveira AC, Batista AP, Marques PASS, Sovotó H, Palavra AF, Gouveia L (2012) Extraction of microalgal oils and pigments and biohydrogen production from biomass leftover. *Bioresource Technology*, 135:128-136. Special Issue: Biorefinery
- [7] Santos CA, Ferreira ME, Lopes da Silva, T, Gouveia L, Novais JM, Reis A (2011) A symbiotic gas exchange between bioreactors enhances microalgal biomass and lipid productivities: taking advantage of complementary nutritional modes. *J Ind Microbiol Biotechnol* 38: 909–917.

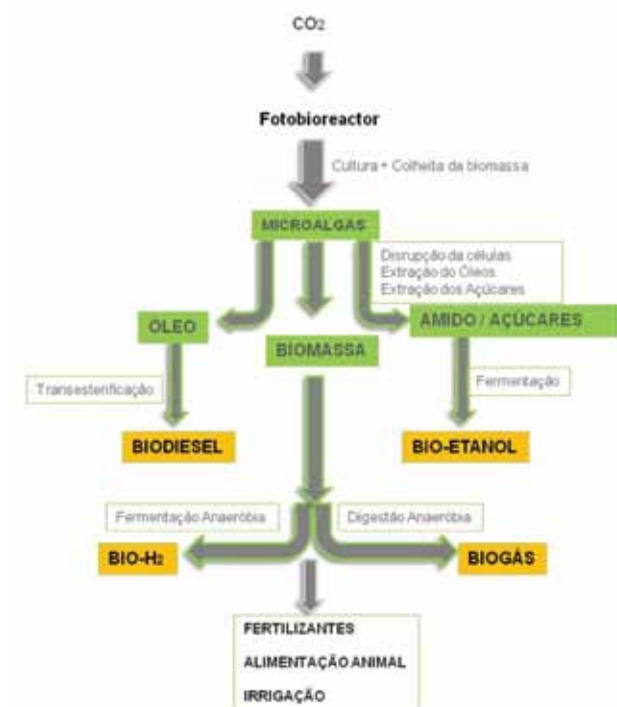
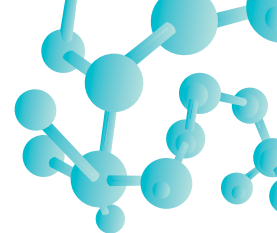


Figura 2- Conceito do projeto FCT "Microalgas- matéria prima sustentável para a produção de biocombustíveis (biodiesel, bioetanol, bio-H₂ e biogás)"(PTDC/PTDC/AAC-AMB/100354/2008) <http://www.lneg.pt/iedt/projectos/392/>



Novos microorganismos para a produção de biohidrogénio

Mónica Martins, Inês A. C. Pereira

Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Universidade Nova de Lisboa, Oeiras, Portugal

E-mail: ipereira@itqb.unl.pt

O hidrogénio é muitas vezes considerado o combustível do futuro, uma vez que não é poluente, não contribui para o efeito de estufa, e tem o maior teor de energia por unidade de peso de qualquer combustível conhecido. No entanto, o hidrogénio tem de ser produzido utilizando outro tipo de energia, logo é mais correcto considerá-lo como um “veículo” ou “transportador” de energia. Apesar das suas propriedades atractivas, a utilização do hidrogénio é dificultada por vários problemas técnicos e económicos associados à sua produção, transporte e armazenamento. Actualmente, cerca de 90% do hidrogénio comercial é produzido a partir de combustíveis fósseis, em processos de utilização intensiva de energia, que não são sustentáveis ou benignos para o ambiente. Assim, o desenvolvimento de um sistema sustentável de produção de hidrogénio é da maior importância.

A produção biológica de hidrogénio por microorganismos é uma alternativa muito interessante, uma vez que requer um baixo investimento de energia, e é sustentável se forem utilizados resíduos ou substratos renováveis [1]. Os microorganismos podem produzir hidrogénio em dois tipos de processos: fotossintéticos ou fermentativos. Os processos fotossintéticos, realizados por microalgas ou cianobactérias, têm sido o foco da maioria dos estudos sobre produção biológica de hidrogénio. No entanto, têm importantes factores limitantes, como o requisito de energia luminosa, a sensibilidade ao oxigénio e a baixa eficiência. Mais recentemente, os processos fermentativos têm sido foco de maior interesse, devido a taxas de produção de hidrogénio superiores, à versatilidade dos substratos utilizados e à concepção simples dos bioreactores envolvidos [2, 3]. Os processos fermentativos, com base em bactérias anaeróbicas e normalmente utilizando substratos ricos em carboidratos, têm também um maior potencial para atingir aplicações práticas, e são tecnicamente mais simples e mais estáveis.

No entanto, ainda não foi desenvolvido um processo que seja economicamente viável, devido ao facto de os microorganismos fermentativos não estarem desenhados para produzir hidrogénio, uma vez que isto representa uma perda de energia para a célula, e as suas vias metabólicas terem antes evoluído no sentido de otimizar a utilização de energia e a taxa de crescimento. Isto reflecte-se num baixo rendimento de produção de hidrogénio por mole de substrato devido à co-produção de produtos secundários tais como ácidos carboxílicos e álcoois. Recentemente, foram desenvolvidos processos de duas etapas para aumentar a recuperação de energia em processos fermentativos [4]. Nestes sistemas, os produtos secundários produzidos na primeira fase da fermentação são usados como substratos numa segunda fase, que pode ser:

i) uma foto-fermentação, ou uma célula electrolítica mi-

crobiana, para produzir novamente hidrogénio,

ii) uma célula de combustível microbiana para produzir electricidade ou

iii) um processo de digestão anaeróbia, usando bactérias metanogénicas, para produzir metano.

No nosso laboratório (Bacterial Energy Metabolism Lab; <http://www.itqb.unl.pt/research/biological-chemistry/bacterial-energy-metabolism>) temos investigado o uso de um novo grupo de bactérias para a segunda fase de digestão anaeróbia: bactérias redutoras de sulfato (BRS). As BRS são microorganismos presentes em diversos habitats anaeróbios nomeadamente sedimentos, aquíferos e solos [5]. Estes organismos são particularmente abundantes em sedimentos marinhos, devido à elevada concentração de sulfato na água do mar (28 mM), onde são responsáveis por cerca de 50% da remineralização de carbono. As BRS têm importantes aplicações biotecnológicas, nomeadamente no tratamento de águas residuais, e biorremediação de metais pesados e radioactivos e poluentes orgânicos [5, 6]. No entanto, a produção de hidrogénio por este grupo de bactérias tem sido pouco explorada, devido ao facto de elas serem normalmente consideradas, não como produtoras, mas sim como consumidoras de hidrogénio.

Em ambientes anaeróbios, o hidrogénio, de origem geológica ou formado biologicamente por organismos fermentativos, é uma fonte comum de energia, sendo consumido rapidamente *in situ* por comunidades bacterianas que reduzem sulfato, nitrato e Fe^{3+} , ou por organismos metanogénicos ou bactérias sintróficas. Se houver sulfato disponível, as BRS vão sobrepor-se aos outros organismos, devido a uma maior capacidade para a oxidação de H_2 , resultante de um nível muito elevado de hidrogenases, as enzimas responsáveis pela produção/consumo de H_2 . No entanto as BRS são metabolicamente versáteis, e na ausência de sulfato crescem fermentativamente com produção de hidrogénio, desde que a pressão parcial deste seja mantida baixa, através do consumo por outros microorganismos, resultando num crescimento sintrófico [7]. Dado que as hidrogenases são enzimas reversíveis, a sua elevada actividade nas BRS pode também ser explorada para a produção biológica de H_2 , na ausência de sulfato. Num bioreactor, é possível manter uma pressão parcial de hidrogénio baixa por borbulhamento de gás, ou outros métodos, tornando possível crescer BRS fermentativamente.

As hidrogenases de BRS foram das primeiras proteínas desta família a serem caracterizadas, e muitos estudos importantes de estrutura-função têm sido realizados com enzimas de *Desulfovibrio* spp., as espécies mais estudadas de BRS [8]. Algumas destas enzimas apresentam propriedades particu-



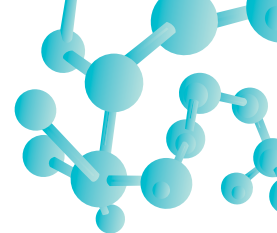
Figura 1- Biorreator anaeróbio para produção de hidrogénio por BRS; a- bioreactor, b-torre de controle, c-sensor para monitorização contínua de H_2 .

larmente interessantes, como é o caso da hidrogenase de [NiFeSe], que tem uma actividade de produção de hidrogénio muito elevada, e alguma tolerância ao oxigénio [9, 10], e tem sido já estudada em bioelectrodos para a produção/consumo de H_2 [11]. No entanto, poucos trabalhos têm dirigido a sua atenção para a produção de H_2 por estas bactérias, tendo os mais recentes focado na sua utilização como biocátodo de células electrolíticas microbianas para a produção de H_2 [12, 13].

Em estudos recentes, em batch ou bioreactor (Fig.1), pudemos confirmar uma elevada produção biológica de H_2 por algumas espécies de BRS, tendo-se obtido valores de produção superiores aos reportados para bactérias fototróficas e muitas das bactérias fermentativas (Martins 2013, em preparação). Estes resultados preliminares demonstram o potencial de hidrogénio, incentivando a exploração de novos processos biotecnológicos baseados nesta inovadora aplicação das BRS.

Referências

- [1] Levin DB, Pitt L, Love M. 2004. Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. *International Journal of Hydrogen Energy* 29(2):173-185.
- [2] Hallenbeck PC, Ghosh D. 2009. Advances in fermentative biohydrogen production: the way forward? *Trends in Biotechnology* 27(5):287-297.
- [3] Nath K, Das D. 2004. Improvement of fermentative hydrogen production: various approaches. *Applied Microbiology and Biotechnology* 65(5):520-529.
- [4] Hallenbeck PC, Abo-Hashesh M, Ghosh D. 2012. Strategies for improving biological hydrogen production. *Bioresource Technology* 110:1-9.
- [5] Muyzer G, Stams AJ. 2008. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nat Rev Microbiol* 6(6):441-54.
- [6] Martins M, Santos ES, Faleiro ML, Chaves S, Tenreiro R, Barros RJ, Barreiros A, Costa MC. 2011. Performance and bacterial community shifts during bioremediation of acid mine drainage from two Portuguese mines. *International Biodeterioration & Biodegradation* 65(7):972-981.
- [7] Stams AJM, Plugge CM. 2009. Electron transfer in syntrophic communities of anaerobic bacteria and archaea. *Nature Reviews Microbiology* 7(8):568-577.
- [8] Vignais PM, Billoud B. 2007. Occurrence, classification, and biological function of hydrogenases: An overview. *Chemical Reviews* 107(10):4206-4272.
- [9] Marques MC, Coelho R, De Lacey AL, Pereira IA, Matias PM. 2010. The three-dimensional structure of [NiFeSe] hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough: a hydrogenase without a bridging ligand in the active site in its oxidised, "as-isolated" state. *J Mol Biol* 396(4):893-907.
- [10] Valente FMA, Oliveira ASF, Gnadt N, Pacheco I, Coelho AV, Xavier AV, Teixeira M, Soares CM, Pereira IAC. 2005. Hydrogenases in *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough: structural and physiologic characterisation of the membrane-bound [NiFeSe] hydrogenase. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 10(6):667-682.
- [11] Gutierrez-Sanchez C, Olea D, Marques M, Fernandez VM, Pereira IA, Velez M, De Lacey AL. 2011. Oriented immobilization of a membrane-bound hydrogenase onto an electrode for direct electron transfer. *Langmuir* 27(10):6449-57.
- [12] Aulenta F, Catapano L, Snip L, Villano M, Majone M. 2012. Linking bacterial metabolism to graphite cathodes: electrochemical insights into the $H(2)$ -producing capability of *Desulfovibrio* sp. *Chemosphere* 5(6): 1080-5.
- [13] Croese E, Pereira MA, Euverink GJW, Stams AJM, Geelhoed JS. 2011. Analysis of the microbial community of the biocathode of a hydrogen-producing microbial electrolysis cell. *Applied Microbiology and Biotechnology* 92(5):1083-1093.



Electrocatalise microbiana: uma plataforma versátil para processos industriais sustentáveis

Luis F. Rosa, Sónia E. Neto, Alexandra S. Alves, Ricardo O. Louro

Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Universidade Nova de Lisboa.

tel: +351 21 446 9309. Fax: +351 21 441 1277

E-mail: louro@itqb.unl.pt

A capacidade de alguns microorganismos para gerar corrente eléctrica a partir do seu metabolismo é conhecida há mais de um século [1]. Ao longo da última década a comunidade científica tomou consciência do seu vasto potencial de aplicação biotecnológica para o desenvolvimento de processos industriais de reduzida pegada ecológica [2]. A partir de diversas configurações e combinações de sistemas electroquímicos e microorganismos, este metabolismo microbiano é a base de uma nova plataforma produtiva extremamente versátil e configurável, por exemplo, para produção sustentável de energia, síntese química, dessalinização de água do mar ou bioremediação de ambientes contaminados com metais pesados [3].

A característica chave dos microorganismos adequados para estas aplicações é a capacidade de permutar electrões do seu metabolismo energético com substratos sólidos existentes no meio ambiente que os rodeia. Esta capacidade requer uma organização impar das vias metabólicas de modo a estabelecer o necessário contacto eléctrico à superfície das células [4].

Um sólido que recebe ou liberta electrões funciona como eléctrodo, e os primeiros sistemas bio-electroquímicos microbianos orientavam-se para a produção sustentável de energia eléctrica [5]. As baterias de combustível microbianas (Figura 1) foram optimizadas para a produção de corrente, utilizando como substrato águas residuais domésticas ou de processamento industrial agro-alimentar, e como catalisador para a produção de energia as comunidades de microorganismos presentes naturalmente nestes resíduos. Apesar do sucesso obtido pelos diversos sistemas de escala laboratorial e alguns sistemas de escala piloto [6], as baixas densidades de corrente obtidas com este tipo de sistemas demonstram que a electricidade produzida não tem um valor comercial suficientemente elevado para que esta aplicação seja econo-

micamente viável utilizando a tecnologia actual [3].

Mais recentemente, as baterias de combustível microbianas foram modificadas com a substituição da membrana que separa o compartimento do ânodo do compartimento do cátodo por duas membranas, uma selectiva para aniões do lado do ânodo e outra selectiva para catiões do lado do cátodo [7]. Água do mar colocada entre estas duas membranas durante a operação da bateria perde os aniões para o compartimento do ânodo e os catiões para o compartimento do cátodo ocorrendo dessalinização concomitantemente com produção de corrente eléctrica.

Paralelamente ao desenvolvimento das baterias de combustível microbianas, foram também desenvolvidas células microbianas de electrólise [8]. Nestas, o objectivo é a produção de compostos orgânicos ou inorgânicos, a partir de biomassa ou outras matérias-primas classificadas como resíduos. Para isso, ao invés de se extrair energia eléctrica, aproveita-se o metabolismo microbiano para obter produtos de elevado valor acrescentado, fornecendo uma fracção da energia necessária para a obtenção do mesmo produto de forma clássica. Inicialmente estes sistemas foram criados com o objectivo de produzir hidrogénio molecular.

As oportunidades e desafios que se apresentam para estas tecnologias de base microbiana podem ser divididas em duas linhas:

1. Aplicações que envolvem o processamento de grandes quantidades de substrato como o tratamento de águas residuais para produção de electricidade, hidrogénio ou dessalinização de água do mar, requerem desenvolvimentos ao nível do design, electrotecnia e engenharia de materiais. Os sistemas bioelectroquímicos são susceptíveis a alterações nas proporções e distâncias entre os eléctrodos,

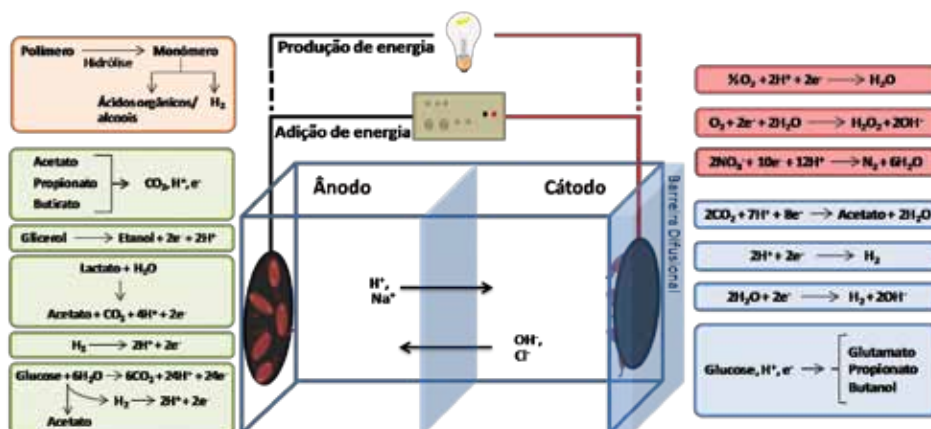


Figura 1- Visão geral das reacções anódicas e catódicas possíveis num sistema bio-electroquímico microbiano de compartimentos separados por membrana selectiva para aniões ou catiões. As reacções nos eléctrodos podem ser originadas por células em suspensão, por biofilmes em contacto com os eléctrodos ou de forma puramente electroquímica. As reacções coloridas a laranja não são espontâneas e carecem de alimentação de energia externa. As reacções a verde podem produzir corrente, as reacções a azul podem ocorrer espontaneamente ou ser aceleradas pela adição extra de energia. As razões estequiométricas apresentadas não consideram a produção de biomassa e de produtos secundários. Adaptado de [3].

que influenciam a resistência ao fluxo de electrões e difusão de iões, levando à alteração do desempenho com as alterações de escala e configuração dos reactores [3]. Os biofilmes electrogénicos colonizam os eléctrodos e colmatam membranas, e o seu crescimento depende das propriedades dos materiais utilizados. Deste modo, o desenvolvimento de novos materiais adequados para a construção de eléctrodos e membranas, com boas relações de custo/área superficial e biocompatibilidade com os microorganismos de interesse, e com os produtos químicos produzidos é essencial [9]. Outro desafio encontra-se ao nível da optimização das reacções com o oxigénio atmosférico no cátodo. O desenvolvimento de catalisadores de menor custo, com eficiência mais elevada e prolongada no tempo, e de materiais que sirvam como barreira difusiva à transferência de oxigénio para os ânodos é fundamental para o sucesso destes sistemas.

2. Aplicações que envolvem a produção de compostos de elevado valor acrescentado sustentados no processamento de substratos em escalas mais modestas, requerem desenvolvimentos ao nível da microbiologia e engenharia metabólica, para identificar e apurar estirpes que produzam compostos de interesse em quantidade e qualidade adequadas, minimizando passos subsequentes de purificação [3]. Do ponto de vista do conhecimento do metabolismo microbiano o foco do esforço de investigação bioquímica/microbiológica tem-se orientado para o estudo de bactérias Gram-negativas de ambientes ribeirinhos ou marinhos. *Shewanella* e *Geobacter* são os géneros bacterianos mais estudados [4]. Só recentemente foram identificadas bactérias Gram-positivas com capacidade de trocar eficientemente electrões com eléctrodos, estando o conhecimento das bases moleculares para este tipo de actividade num estado muito mais incipiente [10]. Surpreendentemente, embora o relato original de produção de corrente fosse derivado de estudos com leveduras, as bases moleculares deste processo em eucariontes permanecem ainda por explorar.

À data são conhecidas três estratégias para promover a troca de electrões entre as células e os eléctrodos (Figura 2): transferência directa de electrões usando enzimas redox na superfície externa das células; produção de estruturas filamentosas condutoras que emergem da superfície das células; ou mediadores redox solúveis segregados para o meio exterior. As comunidades bacterianas simbióticas que normalmente populam os eléctrodos dos sistemas bioelectroquímicos tiram partido desta pluralidade de estratégias adoptadas individualmente, resultando na potenciação da produção

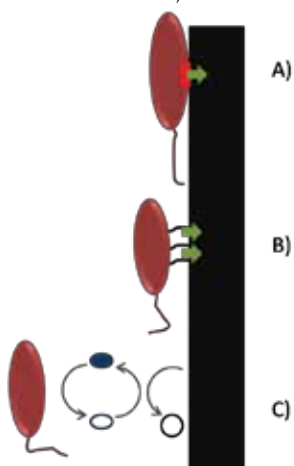


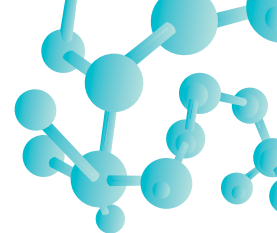
Figura 2- Estratégias de transferência de electrões com substratos insolúveis. A) Proteínas redox residentes na superfície externa da célula (vermelha) contactam com o substrato extracelular, permitindo a troca de electrões B) estruturas filamentosas condutoras formam uma ponte entre a célula e o substrato, catalisando a transferência de electrões; C) moléculas pequenas e solúveis, transportam electrões (oval azul), entre a célula e o substrato que pode permanecer distante da célula. O transportador pode ser reduzido no interior ou no exterior da célula. Na figura o substrato sólido (eléctrodo) está representado como um rectângulo preto. Adaptado de [12].

energética da comunidade. O conhecimento detalhado destes mecanismos individuais é essencial para incrementar a biocompatibilidade, design e selecção de materiais novos para a construção de eléctrodos com desempenho optimizado. O trabalho desenvolvido por nós foca-se no estudo detalhado das várias proteínas envolvidas no processo de transferência electrónica destes microorganismos [11], e no papel que desempenham no contacto eléctrico com eléctrodos em culturas puras, utilizando condições de crescimento definidas. O conhecimento das capacidades individuais de cada microorganismo ajudará à compreensão em detalhe do efeito simbiótico das culturas mistas, e também das diferentes respostas que cada microorganismo específico poderá exhibir face a um determinado substrato metabólico, tipo de material ou estrutura tridimensional de eléctrodo.

Concluindo, as tecnologias baseadas na electrocatálise microbiana apresentam um vasto leque de desafios e oportunidades de investigação e desenvolvimento em diversas áreas de conhecimento. As vantagens desta abordagem tecnológica são evidentes no contexto do fecho do ciclo de vida dos materiais: os substratos de biomassa actualmente considerados resíduos que carecem de tratamento, podem ser convertidos em corrente eléctrica ou em serviços ou produtos de alto valor acrescentado. A gradual integração destes processos no tecido produtivo tem o potencial de alterar o paradigma de desenvolvimento para uma trajectória com menor impacto ecológico.

Referências

- [1] Potter, M.C., *Electrical effects accompanying the decomposition of organic compounds*. Proceedings of the Royal Society of London Series B-Containing Papers of a Biological Character, 1911. 84(571): p. 260-276.
- [2] Schroder, U., *Discover the possibilities: microbial bioelectrochemical systems and the revival of a 100-year-old discovery*. Journal of Solid State Electrochemistry, 2011. 15(7-8): p. 1481-1486.
- [3] Logan, B.E. and K. Rabaey, *Conversion of Wastes into Bioelectricity and Chemicals by Using Microbial Electrochemical Technologies*. Science, 2012. 337(6095): p. 686-690.
- [4] Alves, A.S., B.M. Fonseca, and R.O. Louro, *Sludge oomph: harnessing the power of sediment microbiota*, in *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, A.M. Vilas, Editor. 2010, Formatex Research Center. p. 64-73.
- [5] Logan, B.E., et al., *Microbial fuel cells: methodology and technology*. Environ Sci Technol, 2006. 40(17): p. 5181-92.
- [6] Logan, B.E. and J.M. Regan, *Microbial fuel cells—challenges and applications*. Environ Sci Technol, 2006. 40(17): p. 5172-80.
- [7] Logan, B.E. and M. Elimelech, *Membrane-based processes for sustainable power generation using water*. Nature, 2012. 488(7411): p. 313-9.
- [8] Logan, B.E., et al., *Microbial electrolysis cells for high yield hydrogen gas production from organic matter*. Environ Sci Technol, 2008. 42(23): p. 8630-40.
- [9] Schroder, U., *Editorial: Microbial Fuel Cells and Microbial Electrochemistry: Into the Next Century!* ChemSusChem, 2012. 5(6): p. 959-961.
- [10] Carlson, H.K., et al., *Surface multiheme c-type cytochromes from *Thermincola potens* and implications for respiratory metal reduction by Gram-positive bacteria*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. 109(5): p. 1702-7.
- [11] Fonseca, B.M., et al., *Mind the gap: cytochrome interactions reveal electron pathways across the periplasm of *Shewanella oneidensis* MR-1*. Biochemical Journal, 2013. 449: p. 101-108.
- [12] Gralnick, J.A. and D.K. Newman, *Extracellular respiration*. Molecular Microbiology, 2007. 65(1): p. 1-11.



Polímeros derivados de fontes renováveis: materiais macromoleculares para o século XXI

Alessandro Gandini, Talita M. Lacerda, Eliane Trovatti

Instituto de Química e Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 13566-590, São Carlos, SP, Brazil.

E-mail: agandini@iqsc.usp.br

Introdução

A perspectiva de diminuição dos recursos fósseis aliada ao aumento nos custos da sua extração tem estimulado o interesse em alternativas renováveis e sustentáveis que possam substituir o petróleo como fonte de produtos químicos, materiais e energia. O crescente desenvolvimento de polímeros derivados de fontes renováveis é um forte indicativo da necessidade de gerar materiais cujos precursores sejam altamente disponíveis e igualmente distribuídos nas diferentes regiões do planeta. Os recursos renováveis são fontes perfeitamente aptas a suprir monômeros e polímeros (Figura 1) para a produção de materiais com propriedades comparáveis a materiais derivados de fontes fósseis, mais sustentáveis e menos agressivos ao meio ambiente. Neste contexto, o termo “polímeros derivados de fontes renováveis” refere-se a qualquer material macromolecular produzido a partir de compostos naturais, constantemente renovados pela energia solar. É importante salientar que um material proveniente de fonte renovável não é necessariamente biodegradável. É o caso do polietileno “verde” da empresa brasileira Braskem [1], desenvolvido a partir da desidratação do etanol da cana-de-açúcar, estruturalmente idêntico àquele proveniente de recursos fósseis, ambos bem conhecidos pela sua não-biodegradabilidade.

Este texto, que é uma breve análise do estado da arte destes materiais, procura fornecer uma visão crítica da situação de desenvolvimento em que se encontram alguns materiais específicos, em termos do seu interesse, atual grau de avanço e perspectivas de desenvolvimento a curto e médio prazos.

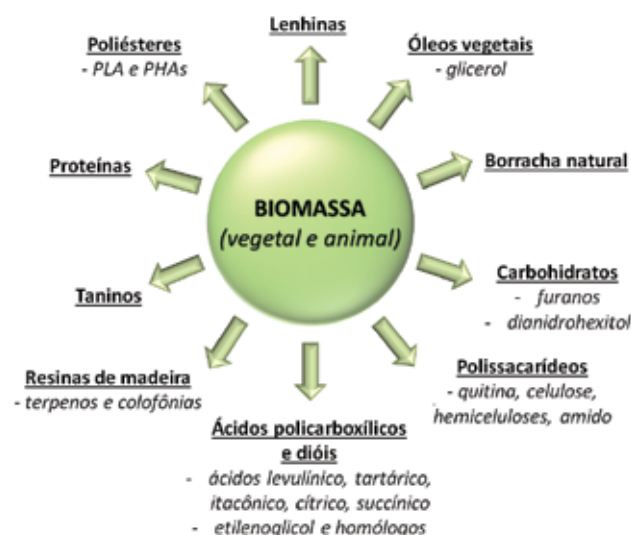


Figura 1- Monômeros e polímeros naturais derivados de fontes renováveis.

Assim, algumas comparações relacionadas com o progresso de uma seleção modesta, mas representativa, de polímeros derivados de recursos renováveis com diferentes histórias, serão sucintamente discutidas. Muitos desses polímeros, não de menor importância, não foram abordados neste texto, mas podem ser encontrados na literatura específica [2].

Poliésteres termoplásticos

O poli ácido láctico (PLA), primeiro polímero biodegradável de origem renovável produzido em larga escala, é um poliéster alifático obtido pela polimerização do ácido láctico, o mais abundante ácido carboxílico encontrado na natureza. Industrialmente o ácido láctico pode ser produzido por síntese química ou por via fermentativa. Estes processos diferem entre si principalmente quanto aos produtos gerados, uma mistura racêmica (D e L) por via química e uma forma isomérica preferencial por via fermentativa. O PLA é um plástico rígido, transparente, solúvel em solventes orgânicos comuns, biodegradável e biocompatível, com temperatura de processamento em torno de 185-190°C e módulo de *Young* entre 1 a 4 GPa, propriedades que permitem seu uso na substituição de alguns polímeros derivados do petróleo, como o polipropileno, o poliestireno e o PET [3].

A degradação do PLA é uma das principais características que o diferencia de outros plásticos. Esta propriedade deve-se à hidrólise da ligação éster, sem a necessidade de uma enzima específica, um fator que favorece a sua aplicação na área médica.

Apesar de ser produzido em maior proporção por rotas biotecnológicas, o transporte e o processamento da matéria-prima consomem muita energia, portanto, quanto aos propósitos ambientais, a grande vantagem deste polímero está relacionada à baixa acumulação de resíduos sólidos e à diminuição da emissão de gases.

As primeiras aplicações do PLA eram limitadas às áreas médica e farmacêutica devido à baixa disponibilidade e ao alto custo. Os avanços na separação do ácido láctico, técnicas de polimerização e uso de fontes de nutrientes alternativas para fermentação, tornaram-no um produto com preço acessível e competitivo (em torno de 0,8\$/Kg), abrindo novas perspectivas de mercado que apontam para o desenvolvimento de embalagens como uma das suas principais aplicações, em substituição aos polímeros convencionais.

Uma trajetória bastante diferente é a dos polihidroxialcanoatos (PHAs) [4], poliésteres bacterianos biodegradáveis inicialmente produzidos com a finalidade de substituição de materiais derivados de recursos fósseis, como as poliolefinas, mas que não alcançaram até ao presente momento

uma substancial produção industrial. O maior obstáculo à viabilidade de produção e comercialização dos PHAs é econômico. O alto custo de produção e o baixo rendimento levam a um produto final que não possui preços competitivos aos seus similares derivados do petróleo. Além disso, não apresentam qualquer propriedade superior que justificaria sua competitividade, excepto a biodegradabilidade.

Polissacarídeos

A celulose é um homopolímero linear no qual as macromoléculas de glicose estão dispostas entre si na forma de feixes (microfibrilas) que se juntam para formar fibras maiores, de estrutura altamente organizada. A celulose constitui o elemento básico estrutural da madeira e das plantas, nas quais as fibras associam-se à lenhina e hemiceluloses, organizando-se na forma do clássico compósito natural responsável pelas propriedades mecânicas das estruturas vegetais. É um polímero de grande importância na história da humanidade e no desenvolvimento da sociedade, pelas suas múltiplas aplicações.

Muitos derivados de celulose (ésteres e éteres de celulose) foram desenvolvidos através da sua modificação química e constituíram os primeiros polímeros termoplásticos na história do desenvolvimento dos polímeros sintéticos, ainda largamente utilizados hoje em aplicações de rotina nas indústrias de alimentos, embalagens, medicamentos, e no desenvolvimento de produtos de alta tecnologia [2, 5].

Inovações promissoras relativas à celulose são materiais baseados em suas manifestações de dimensão nanométrica, as nanofibras e os nanocristais [6]. As nanofibras são geradas pelo desmembramento da estrutura original da celulose e os nanocristais correspondem à sua porção cristalina, obtida pela destruição das regiões amorfas do polímero. Ambos são já produzidos em escala piloto [7], com tendência à expansão, para aplicações como reforço de matrizes poliméricas, filmes transparentes impermeáveis a gases, nanopapéis de alta resistência, substratos para filmes condutores e OLEDs, entre outras [6].

A celulose de origem bacteriana é uma fonte alternativa de nanocelulose produzida por microrganismos como elemento de protecção, na forma de uma membrana hidratada de alta pureza (livre de lignina e hemiceluloses). A celulose bacteriana tem produção estabelecida no setor alimentício no sudeste asiático e encontra um mercado crescente na área médica, como substituto temporário da pele, com outras aplicações em pleno desenvolvimento [7].

Em geral, os materiais baseados em celulose apresentam carácter biodegradável e biocompatível, baixa densidade, grande disponibilidade, baixo custo e correspondem frequentemente a materiais insubstituíveis devido à sua ampla gama de aplicações e propriedades únicas.

O amido é outro polissacarídeo de origem vegetal formado por moléculas de glicose, porém, formando macromoléculas lineares e ramificadas, o que o faz uma fonte apropriada para a obtenção de materiais termoplásticos. Sua abundância, carácter renovável e baixo custo aumentam suas perspectivas de mercado, principalmente na área de embalagens e produtos descartáveis [8]. Neste contexto, destacam-se os produtos baseados em misturas com outros polímeros naturais degradáveis, de grande aceitação e já estabelecidos no mercado. Outros importantes materiais são as misturas de

amido termoplástico com polímeros derivados do petróleo, usadas para substituição de embalagens baseadas unicamente em recursos fósseis, como os sacos plásticos usados em supermercado. O desenvolvimento de outros materiais baseados em amido não interferirá com a sua utilização fundamental como alimento devido à sua enorme disponibilidade global.

Óleos vegetais

Os óleos vegetais são importantes matérias-primas para a produção de polímeros, pois os ácidos gordos que os constituem possuem grande potencial para substituir matérias que atualmente são provenientes da indústria petroquímica [2, 9]. Correspondem a triglicerídeos, cuja estrutura e composição variam de acordo com a fonte da qual o óleo é extraído. As principais características que determinam as propriedades físico-químicas destes óleos são a estereoquímica das duplas ligações, o grau de insaturação e o comprimento das cadeias dos ácidos gordos.

A utilização de óleos vegetais passa a ser muito interessante dentro do contexto de sua modificação química, com o objetivo principal de melhorar sua reatividade para posterior aplicação em reações de polimerização. Os triglicerídeos possuem dois sítios ativos estratégicos para modificações químicas, sendo (i) as funções ésteres, que podem ser facilmente hidrolisadas ou transesterificadas e (ii) as insaturações presentes ao longo das cadeias alifáticas, além da presença ocasional de grupos reactivos como OH e epóxidos.

As reações envolvendo as funções ésteres geralmente produzem as unidades de ácidos gordos com um sítio ativo terminal, além da possibilidade de interromper a reação de modo que um ou dois grupos OH sejam gerados. Este processo é semelhante àquele associado à produção de biodiesel, mas focado na síntese de estruturas originais que são adequadas à subsequentes reações de polimerização. As insaturações permitem uma maior gama de possibilidades de modificação química, como por exemplo, oxidação a oxiranos (epoxidação) e formação de hidroxilas, que podem ser usadas como tal ou convertidas em outros sítios reativos. Neste contexto, os estudos mais avançados em pesquisa e desenvolvimento estão relacionados à preparação de polióis para a produção de poliuretanas, substituindo os sistemas baseados em monómeros fósseis atualmente empregados. Estes polióis, derivados do óleo de soja, são comercializados pela Cargill com o nome de BiOH, e são uma forte evidência de que o uso de óleos vegetais como fonte de polímeros originais tende a aumentar progressivamente nos próximos anos, tanto em termos de quantidade, como de variedade de novos macromonómeros [10].

Polímeros furânicos

Entre o imenso conjunto de monómeros e polímeros derivados de fontes renováveis, os derivados de furanos ocupam uma posição única, principalmente porque sua exploração para a síntese de materiais macromoleculares pode ser planejada estrategicamente de uma maneira que simula a abordagem adotada e desenvolvida pelas indústrias de petróleo, carvão e gás natural com os mesmos propósitos. Este potencial os diferencia, por exemplo, do caso da polimerização de terpenos, ou da modificação química dos polissacarídeos, uma vez que, apesar de indiscutivelmente interessantes, estes exemplos são limitados pela estrutura específica da família

**iBET****Instituto de Biologia
Experimental e Tecnológica**

UNIDADE DE SERVIÇOS ANALÍTICOS

Apoiada numa experiência de mais de vinte anos, contando com equipas altamente qualificadas a operar sob um sistema de gestão da qualidade regulamentado, a nossa Unidade de Serviços Analíticos oferece um conjunto de serviços de excelência de apoio à Indústria e à Investigação, nas áreas da Farmacêutica, Biofarmacêutica, Agro-alimentar e Química.

Qualidade e Segurança Alimentar

- Caracterização de matérias primas e produto final
- Determinação de autenticidade e origem
- Preparação de bases de dados
- Desenvolvimento de métodos não convencionais
- Caracterização de produtos naturais
- Análise sensorial

Controlo de Qualidade de Fármacos e Biofármacos

- Contaminação química, microbiológica ou viral
- Análise e libertação de lotes de medicamentos de acordo com as GMP
- Métodos de caracterização de biomoléculas (e.g. MS, GC/GC-MS, HPLC/UPLC...)
- Ensaio realizados em culturas de células

Análise de Bancos de Células e Vírus

- Ensaio de Identidade
- Detecção de contaminantes virais e Micoplasmas

Soluções para Produtos e Processos

- Desenvolvimento, optimização e validação de métodos analíticos: químicos, biológicos, de biologia molecular e de ensaios celulares
- Apoio ao desenvolvimento de novos produtos
- Despiste de problemas em fábrica
- Apoio na implementação de sistemas da qualidade

Contactos:

iBET, Apartado 12
2781-901 Oeiras Portugal
Tel: +351 21 21 442 11 73
FAX: +351 21 442 11 61
www.ibet.pt

Teresa Crespo, tcrespo@ibet.pt
António Ferreira, antoniof@ibet.pt

de monómeros (terpenos, açúcares, óleos vegetais, etc.) e de polímeros (celulose, quitina, amido, etc.).

A estratégia de pesquisa relacionada com polímeros furânicos está fundamentada em dois derivados, furfural (F) e hidroximetilfurfural (HMF), que constituem moléculas de partida obtidas diretamente de carboidratos, das quais dois conjuntos de monómeros são sintetizados, ou seja, aqueles adequados a polimerizações e copolimerizações em cadeia, e aqueles associados com mecanismos de policondensação. Poliésteres, poliamidas, poliuretanas e outros polímeros relevantes vem sendo preparados e caracterizados usando estes monômeros, e possuem aplicações bastante promissoras [2]. A aplicação dos derivados de furano no contexto de síntese de macromoléculas pode se estender também à elaboração de materiais em que as unidades aromáticas (provenientes de recursos fósseis) sejam substituídas por unidades furânicas (provenientes de recursos renováveis), preservando características como propriedades mecânicas, temperaturas de fusão e transição vítrea, altos índices de cristalinidade e estabilidade térmica [2].

Outra característica do anel furânico que o torna particularmente interessante é seu caráter diênico pronunciado, o que permite sua aplicação em reações de Diels-Alder (DA) com dienófilos, como derivados de maleimida. Estas reações são bastante úteis pela sua reversibilidade em função da temperatura, que permite que os adutos sejam revertidos nos seus precursores por um simples aumento da temperatura (reação de retro-DA). No caso específico da combinação furano-maleimida, a formação do aduto é favorecida até cerca de 60°C, enquanto a reação inversa predomina a partir de 100°C. A combinação desta característica da reação de DA com a química de compostos furânicos vem possibilitando a preparação de materiais macromoleculares funcionais provenientes de fontes renováveis, e com aplicações promissoras como auto-reparação e reciclabilidade [2].

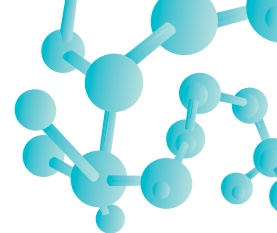
Em linhas gerais, a síntese de monómeros e polímeros a partir de recursos renováveis já se encontra, em muitos casos, em plena produção industrial, e desenvolvimentos nesta área oferecem oportunidades promissoras e permitem aperfeiçoar as possíveis aplicações a que se destinam.

Agradecimentos

Alessandro Gandini agradece à CAPES pelo convite como Professor visitante (PVE-6303102). Talita M. Lacerda agradece à Fapesp pela bolsa de Pós-doutoramento (2012/00124-9), Eliane Trovatti agradece à Fapesp pela bolsa de Pós-Doutoramento (2012/05184-0).

Referências

- [1] <http://www.braskem.com.br/plasticoverde/Produto.html>
- [2] M. N. Belgacem, A. Gandini (Eds.), (2008) *Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources*, Elsevier, Amsterdam. A. Gandini (2011) The irruption of polymers from renewable resources on the scene of macromolecular science and technology. *Green Chem.* 13, pp. 1061-1083.
- [3] Auras, L.-T. Lim, S. E. M. Selke, H. Tsuji (eds.) (2011) *Poly(lactic acid): Synthesis, Structures, Properties, Processing, and Applications*, Wiley, New York. L. T. Sin, A. R. Rahmat, W. A. W. A. Rahman (2012) *Poly(lactic Acid)*, Elsevier, Amsterdam.
- [4] K. Sudesh, H. Abe (2010) *Practical Guide to Microbial Polyhydroxyalkanoates*, Smithers Rapra, Akron.
- [5] D. Klemm, B. Heublein, H. P. Fink, A. Bohn (2005) Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material. *Angew. Chem. Int. Edit.* 44, pp. 3358-3393.
- [6] D. Klemm, F. Kramer, S. Moritz, T. Lindstrom, M. Ankerfors, D. Gray, A. Dorris (2011) Nanocelluloses: A New Family of Nature-Based Materials. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 50, pp. 5438-5466. I. Siró, D. Plackett (2010) Microfibrillated cellulose and new nanocomposite materials: a review. *Cellulose* 17, pp. 459-494. Y. Habibi, L. A. Lucia, O. J. Rojas (2010) Cellulose nanocrystals: chemistry, self-assembly, and applications. *Chem. Rev.* 110, pp. 3479-3500.
- [7] E. Trovatti (2013) The future of bacterial cellulose and other microbial polysaccharides. *J. Renew. Mater.* 1, pp. 28-41.
- [8] J. F. Carvalho (2008) Starch: Major Sources, Properties and Applications as Thermoplastic Materials, in *Polymers and Composites from Renewable Resources* (M. N. Belgacem, A. Gandini, eds., 1st edition) pp. 321-342, Elsevier, Amsterdam. A. J. F. Carvalho (2011) Starch as source of polymeric materials in *Biopolymers, Biomedical and Environmental Applications* (S. Kalia, L. Avérous, eds.) Scrivener Publishing LLC, Salem, Mass.
- [9] M. A. R. Meier, J. O. Metzger, U. S. Schubert (2007) Plant oil renewable resources as green alternatives in polymer science. *Chem. Soc. Rev.* 36, pp. 1788-1802.
- [10] O. Türlünç, M. A. R. Meier (2013) The thiol-ene (click) reaction for the synthesis of plant-oil derived polymers. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 115, pp. 41-54.



Biorrefinaria de matérias-primas ricas em suberina: o reacender do interesse num biopolímero antigo

Cristina Silva Pereira

Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Universidade Nova de Lisboa,
Av. da República, 2780-157, Oeiras, Portugal - Tel.: +351211157786

E-mail: spereira@itqb.unl.pt . Website: <http://aem.itqb.unl.pt/>

Testemunhamos hoje, século XXI, a renovação de interesse na utilização de matérias-primas de fontes renováveis para gerar diversos produtos de utilidade tecnológica com inerente valor acrescentado (vz. materiais, componentes químicos, combustíveis e energia) [1]. Esta ideia conflui com perfeição na definição de biorrefinaria, ainda que inúmeras vezes esta definição seja estrangulada à produção de biodiesel a partir de resíduos lignocelulósicos. A biorrefinaria actual reúne, num sentido real e lato, diferentes processos de conversão de biomassa, seriados de modo que o produto de um se torne a matéria-prima do seguinte, idealmente retirando de uma matéria-prima todos os produtos de valor acrescentado viáveis. Um dos maiores desafios actuais da biorrefinaria é desenvolver metodologias que visem a desconstrução, e a utilização subsequente, dos monómeros que constituem o biopolímero lenhina. É impossível dissociar a biorrefinaria dos biopolímeros, uma vez que os últimos são os constituintes maioritários das matérias-primas disponíveis e, nalguns casos, *per se* o produto de valor acrescentado a extrair.

A comunidade científica é hoje em dia espectadora (e também interveniente) de uma revolução no melhoramento dos processos de biorrefinaria, estimulada pela necessidade inadiável do desenvolvimento global sustentável. No cenário europeu, por exemplo, a directiva-quadro relativa aos resíduos (2006/12/CE) torna prioritária a valorização e a reutilização de resíduos biológicos.

A suberina (*vide infra*, Fig.1 A) é um poliéster alifático-aromático ubíquo no reino das plantas e particularmente abundante na cortiça de *Quercus suber* L. (30-50% do peso) e na casca de *Betula pendula* (40-50% do peso) [2, 3]. Este biopolímero hidrofóbico actua como uma barreira protectora entre a planta e o ambiente. O domínio alifático da suberina é composto essencialmente por unidades C_{16} - C_{26} de ácidos alifáticos, ω -hidroxiácidos (alguns dos quais com dióis vici-

nais ou funcionalidades epóxi no meio da cadeia) e ácidos α,ω -dicarboxílicos. Uma característica exímia é a abundância em ω -hidroxiácidos, relativamente raros na natureza.

O domínio aromático, que partilha algumas semelhanças com a lenhina, é maioritariamente composto por unidades de ácidos hidroxicinâmicos, com quantidades residuais de álcoois *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico. São ligações do tipo éster, que envolvem unidades de glicerol e grupos hidroxilo e carboxilo, que unem os diferentes monómeros da suberina. A suberina, nomeadamente os seus constituintes alifáticos, têm atraído a atenção da comunidade científica como monómeros para a síntese de novos polímeros, por exemplo polióis líquidos e poliésteres alifáticos [3]. De igual modo, as propriedades biológicas da suberina, que potencialmente incluem propriedades antimicrobianas e anti-inflamatórias, têm sido investigadas. A suberina, extraída de forma convencional de cortiça, é já objecto de exploração comercial em produtos cosméticos para tratamento facial (Suberlift™, Ashland).

A importância do biopolímero suberina é consensual na comunidade científica. Contudo, na minha opinião, em particular quando idealizo o conceito de biorrefinaria, os resíduos das matérias-primas ricas em suberina ainda escondem valor tecnológico inexplorado. A importância global destes resíduos é notória, a título de exemplo as indústrias que exploram a casca da bétula (papel) e a cortiça (rolhas de cortiça) produzem anualmente toneladas de resíduos, na sua maioria queimados para produzir energia (3.4% e 23% do peso total da produção, respectivamente). É indispensável referir que cerca de metade da produção mundial de cortiça (~300000 toneladas anuais) é transformada por indústrias portuguesas. Estes resíduos contêm também lenhina, polissacarídeos e compostos extractáveis (20%, 20% e 15% para cortiça e 15%, 15% e 35% para casca de bétula, respectivamente) [3].

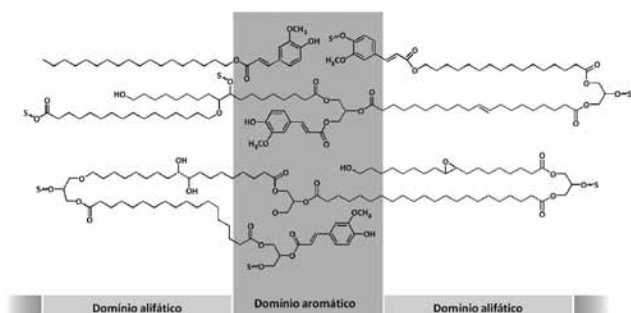
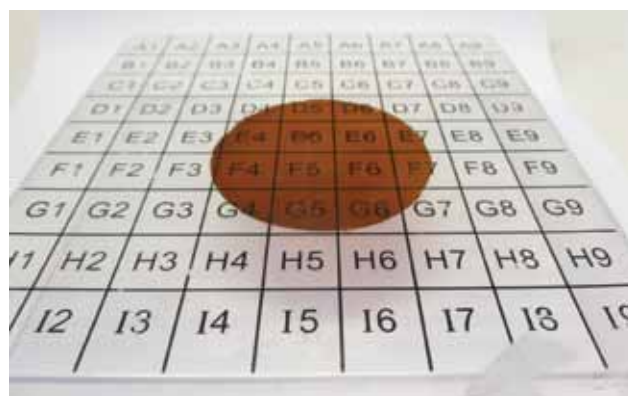


Figura 1- Representação esquemática da estrutura da suberina (esquerda). Película semitransparente de suberina produzida após a sua extracção de cortiça com hexanoato de colínio (direita).



Apesar dos extractáveis conterem compostos de reconhecido valor farmacêutico, por exemplo β -sitosterol, friedelina, betulina e ácido betulínico, ainda não foi possível isolar cada composto de forma eficaz e sustentável.

No meu grupo de investigação pretendemos produzir conhecimento fundamental que suporte o desenvolvimento de metodologias sustentáveis para a valorização de resíduos ricos em suberina. Temos por alvo não só o biopolímero suberina, mas também alguns dos compostos extractáveis com potencial farmacológico. Centrando, por agora, a nossa atenção na suberina, a sua extracção convencional envolve, em geral, processos químicos agressivos que quebram ligações éster (por exemplo, metanólise ou hidrólise alcalina) e que resultam na despolimerização eficiente e excessiva do polímero [3].

A possibilidade de extrair suberina de matérias-primas adequadas, em condições suaves e sustentáveis, estimulará a implementação de plataformas de biorrefinaria que visem diversificar as aplicações deste recurso renovável. Em 2010, publicámos, uma metodologia que, pela primeira vez, permite a extracção eficiente (e selectiva!) de suberina de cortiça por um processo limpo [4]. Esta metodologia de extracção quebra ligações éster (semelhante ao processo convencional), mas preserva parte da estrutura macro-molecular da suberina nativa, *i.e.* com elevado grau de polimerização e reticulação (distinto do método convencional) [5, 6].

Este processo foi estabelecido por recurso a líquidos iónicos (*vide infra*) da família dos alcanóatos de colínio desenhados para serem simultaneamente biocompatíveis e biodegradáveis [7], num processo que assegura também a sua reciclabilidade e reusabilidade [5]. Os líquidos iónicos (sais líquidos abaixo de 100°C) são uma classe emergente de solventes verdes que possuem características particulares (*e.g.* não voláteis) [8]. A importância crescente destes sais no contexto tecnológico e industrial, deve-se à excelente capacidade como solvente e à possibilidade, quase ilimitada, de desenhar as propriedades em função de requisitos específicos [9]. Um dos exemplos mais notórios é a dissolução *e/ou* o processamento da celulose com líquidos iónicos da família dos imidazóis. O elevado custo, a persistência ambiental e a toxicidade desta família de líquidos iónicos condiciona parcialmente a sua implementação em processos industriais [10].

No meu grupo de investigação abordámos a toxicidade dos líquidos iónicos usando como organismos modelo, pela primeira vez, os fungos filamentosos [7, 10-12]. Esta estratégia permite inferir sobre o potencial impacto destes sais no ambiente, incluindo a sua persistência e recalcitrância. Ao mesmo tempo, queremos ir para além da exploração destes solventes na área da química onde tradicionalmente são considerados como agentes de extracção/dissolução ou catalisadores. Os nossos resultados demonstram o potencial destes sais para manipular a expressão de genes em culturas de fungos, em particular para controlar a diferenciação morfológica no ciclo de vida ou estimular a biossíntese de compostos raros [11, 13].

O processo de extracção de suberina com líquidos iónicos, apesar de apresentar ainda alguns desafios para a sua industrialização (*e.g.* elevada viscosidade do alcanóato de colínio), é ambientalmente sustentável e apresenta especificidades impossíveis de reproduzir por recurso a agentes químicos diferentes dos líquidos iónicos (dados não publicados). O desafio actual é resolver o processo de catálise

mediado pelo líquido iónico durante a extracção da suberina de diferentes matérias-primas. Dados recentes, demonstram que o hexanoato de colínio promove a quebra sequencial de triglicéridos, com concomitante libertação de glicerol, e não modifica nem a lenhina, nem os polissacarídeos.

A suberina extraída com hexanoato de colínio apresenta ao nível monomérico (ressalvando pequenas diferenças) a mesma composição que a suberina extraída por métodos convencionais [5, 6]. O comportamento térmico da suberina extraída e da matéria-prima revelam-se comparáveis [5, 6]. São certamente as diferenças em termos da organização macromolecular do biopolímero suberina aquando do seu isolamento com o líquido iónico, em comparação com a do método convencional, que tornam exequível, pela primeira vez, produzir com este extracto películas (Fig.1B). Os materiais obtidos, semitransparentes e moderadamente hidrofóbicos, estão a ser amplamente caracterizados ao nível das suas propriedades físico-químicas, mecânicas e morfológicas. Estamos também empenhados em compreender as suas propriedades antimicrobianas por recurso às técnicas, de proteómica e transcriptómica, entre outras. Os dados obtidos até à presente data, contribuem para a identificação da maquinaria enzimática utilizada por fungos filamentosos para degradar parcialmente a suberina. Um dos propósitos deste estudo é seleccionar enzimas de elevado valor tecnológico tendo em vista o melhoramento direccionado das funcionalidades biológicas dos materiais derivados de suberina.

Voltando ao traçado ideal da biorrefinaria, um dos objectivos presentes é integrar com o processo de extracção de suberina, o isolamento prévio de alguns dos compostos extractáveis por recurso à tecnologia de microondas. Dados preliminares demonstram que a combinação das duas tecnologias extractivas, líquidos iónicos e microondas, permite a valorização máxima dos resíduos de matérias-primas ricas em suberina. Os nossos resultados demonstram, desde já, a versatilidade das metodologias desenvolvidas, aplicáveis a quaisquer matérias-primas ricas em biopoliésteres. Não restam dúvidas, que num futuro breve, várias aplicações para esta classe de biopolímeros serão investigadas, nomeadamente o desenvolvimento de materiais hidrofóbicos com propriedades antimicrobianas. Por fim, a caracterização química do biopolímero obtido, onde o grau de polimerização e reticulação está em parte preservado, pode também contribuir para resolver a estrutura da suberina *in situ*, ainda em discussão.

Agradecimentos

Estes trabalhos foram parcialmente suportados por uma bolsa do EEA Mecanismo Financeiro (Projecto PT015) e pela Fundação para a Ciência e Tecnologia através das bolsas PEst-OE/EQB/LA0004/2011 e PTDC/QUI-QUI/120982/2010. Agradeço aos alunos, técnicos e colaboradores que contribuíram directamente para os estudos mencionados, em particular à Helga Garcia e ao Rui Ferreira.

Referências

- [1] Kamm B, Gruber PR, Kamm M (2006) Biorefineries – Industrial Processes and Products. Status Quo and Future Directions. Weinheim, Germany: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- [2] Gandini A. (2011). The irruption of polymers from renewable resources on the scene of macromolecular science and technology. Green Chem. 13:1061-83.
- [3] Gandini A, Pascoal C, Silvestre AJD (2006) Suberin: A promising renewable resource for novel macromolecular materials. Prog Polym Sci. 31:878-92.
- [4] Garcia H, Ferreira R, Petkovic M, Ferguson JL, Leitão MC, Gunaratne HQN, Seddon KR, Rebelo LPN, Pereira CS (2010) Dissolution of cork biopolymers in biocompatible ionic liquids. Green Chem. 12:367-9.
- [5] Ferreira R, Garcia H, Sousa AF, Petkovic M, Lamosa P, Freire CSR, Silvestre AJD, Rebelo LPN, Pereira CS (2012) Suberin isolation from cork using ionic liquids: characterisation of ensuing products. New J Chem. 36:2014-24.
- [6] Ferreira R, Garcia H, Sousa AF, Freire CSR, Silvestre AJD, Rebelo LPN, Pereira CS (2012) Isolation of suberin from birch outer bark and cork using ionic liquids: a new source of macromonomers. Ind Crop Products. In press
- [7] Petkovic M, Ferguson JL, Gunaratne HQN, Ferreira R, Leitão MC, Seddon KR, Rebelo LPN, Pereira CS (2010) Novel biocompatible cholinium-based ionic liquids - toxicity and biodegradability. Green Chem. 12:643-9
- [8] Stark A, Seddon KR (2007) Ionic Liquids. In: Seidel A, editor. Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology. 5 ed. Hoboken, New Jersey, USA: JohnWiley & Sons Inc. p. 836-920.
- [9] Plechkova NV, Seddon KR (2008) Applications of ionic liquids in the chemical industry. Chemical Society Reviews. 37:123-50.
- [10] Petkovic M, Seddon KR, Rebelo LPN, Pereira CS (2011) Ionic Liquids: A Pathway to Environmental Acceptability. Chemical Society Reviews. 40:1383-403.
- [11] Petkovic M, Pereira CS (2012) Pioneering biological processes in the presence of ionic liquids: the potential of filamentous fungi. In: Plechkova NV, Seddon KR, editors. Ionic Liquids UnCOLled: Critical Expert Overviews: John Wiley & Sons, Inc., p. 283-304.
- [12] Petkovic M, Ferguson JL, Bohn A, Trindade J, Martins I, Carvalho MB, Leitão MC, Rodrigues C, Garcia H, Ferreira R, Seddon KR, Rebelo LPN, Silva Pereira C. (2009) Exploring fungal activity in the presence of ionic liquids. Green Chem. 11:889-94.
- [13] Martins I, Hartmann DO, Alves PC, Planchon S, Renaut J, Leitão MC, Rebelo LPN, Pereira CS (2013) Proteomic alterations induced by ionic liquids in *Aspergillus nidulans* and *Neurospora crassa* Submitted.



NZYTech is a R&D company aiming to keep a reputation in the fields:

- Molecular Biology,
- Complex Carbohydrate Enzymology
- Food and Feed Analysis

One of the R&D projects NZYTech is involved is the **VENOMICS FP7 Project**:

As a leader of molecular biology task, it is involved in the synthesis and cloning of the 10,000 genes required for the production of the peptide bank



Molecular Biology

CAZymes

Analytical Products

www.nzytech.com



Polihidroxicanoatos: culturas mistas e fontes de substrato renovável como estratégias de sustentabilidade para a produção de bioplásticos

Paulo Costa Lemos

REQUIMTE, Departamento de Química, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa
2829-516 Caparica PORTUGAL

E-mail: paulo.lemos@fct.unl.pt

A indústria petroquímica nas suas refinarias tem como objetivo principal a produção de combustíveis, maximizando a sua rentabilidade através da valorização de produtos secundários de menor volume, produzindo entre outros plásticos e produtos químicos. Uma abordagem semelhante pode ser usada no conceito de biorrefinaria, visando o aproveitamento integral da biomassa e a optimização da relação custo-eficácia dos produtos finais. A produção de bioplásticos encaixa nesta estratégia usando como substrato vários fluxos de resíduos/efluentes ricos em carbono de origem industrial, agrícola ou doméstica.

Mercado

O mercado mundial dos plásticos é dominado largamente pelos produtos de origem petroquímica. Actualmente a cota de mercado dos bioplásticos é inferior a 1%. A capacidade de produção mundial destes bioplásticos deverá quintuplicar entre os anos de 2011 e 2016, dos actuais 1.2 milhões de toneladas para 5.8 milhões de toneladas. Em termos de bioplásticos podemos encontrar essencialmente três tipos: os de origem petroquímica biodegradáveis, os de origem biológica não biodegradáveis e por último os de origem biológica biodegradáveis. Na primeira categoria encontram-se o PBAT (polibutileno adipato co-tereftalato), o PBS (polibutileno succinato) e o PCL (polycaprolactona). O maior crescimento de mercado dos bioplásticos nos próximos cinco anos far-se-á no segundo grupo que incluem o Bio-PE (bio-polietileno) e o Bio-PP (bio-polipropileno) baseados em álcoois produzidos por via biológica, etanol e propanol respectivamente, e polimerizados por síntese química. A importância dos bioplásticos biodegradáveis aumentará, cerca de dois terços a sua cota actual, tendo como principais contribuintes o PLA (ácido polilático) para 290 mil toneladas (+60%) e o PHA (polihidroxicanoato) para 142 mil toneladas (+700%). [1]

Polihidroxicanoatos

Os polihidroxicanoatos são os candidatos mais promissores para a substituição dos produtos petroquímicos na formulação de plásticos. Estes polímeros são os únicos cujos monómeros são produzidos e simultaneamente polimerizados por via biológica. Em termos biológicos os PHA são biopolímeros sintetizados por bactérias como reservas intracelulares de energia, carbono e equivalentes reductores, desempenhando um importante papel no metabolismo bacteriano. A sua produção está presente nos domínios *Eubacteria* e *Archae*, em cerca de 75 espécies diferentes de bactérias Gram⁻ e Gram⁺

(300 organismos). As propriedades físicas deste poliésteres lineares tornam-nos uma fonte atractiva para a produção de elastómeros ou termoplásticos biodegradáveis, sendo também biocompatíveis, piezoelectricos e cem por cento resistentes a água. As suas diferentes formulações têm características semelhantes às presentes em plásticos sintéticos, como as do polipropileno e do polietileno. São conhecidos cerca de 150 monómeros diferentes na constituição destes polímeros, divididos em dois grandes grupos: os de cadeia curta (scl-PHA) e os de cadeia média (mcl-PHA). No primeiro grupo incluem-se monómeros com 3 a 5 carbonos na cadeia principal, sendo os mais representativos o 3-hidroxi butirato (3-HB) e o 3-hidroxi valerato (3-HV), ao passo que no segundo grupo podemos encontrar monómeros com seis a dezasseis carbonos, entre os quais o 3-hidroxi hexanoato (3-HH) o 3-hidroxi octanoato (3-HO) e 3-hidroxi decanoato (3-HD). Os monómeros produzidos são enantioméricamente puros (R).

A gama de aplicações destes polímeros é muito diversificada: desde aplicações mais finas como as relativas a área médica e de cultura de células (pontos cirúrgicos, grampos, zaragatoas, gaze cirúrgica, substitutos de osso e placas ósseas, válvulas cardíacas temporárias); material quiral para aplicação nas indústrias química, farmacêutica e médica; transportadores de libertação controlada de drogas, medicamentos, herbicidas e fertilizantes; material de embalagem (garrafas, filmes, sacos); material descartável (lâminas de barbear, utensílios de cozinha, fraldas, higiene feminina); adesivos, cobertura e aglutinantes para materiais cerâmicos e metálicos; ainda papel fotográfico e cartões de crédito. [2]

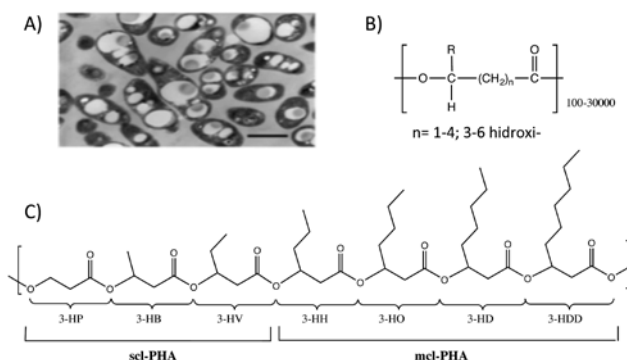


Figura 1- Inclusão intracelular de grânulos de PHA (A); Fórmula geral dos monómeros (B); E exemplo de monómeros de scl e mcl-PHA (C).

Produção

A produção industrial destes polímeros utiliza culturas puras ou geneticamente manipuladas em conjunção com substratos quimicamente definidos (glucose, sacarose, ác. acético, ác. láctico) envolvendo apertadas condições de esterilidade e de controlo do processo. Entre estes organismos podemos encontrar *Cupriavidus necator* ou *Alcaligenes latus* na sua forma nativa ou geneticamente manipulada. O conteúdo intracelular deste polímero na biomassa bacteriana pode atingir 90% do seu peso seco. Os custos de produção associados a esta estratégia têm sido o principal factor determinante para a reduzida disseminação destes polímeros. Os PHA produzidos por esta via são cerca de três a cinco vezes mais dispendiosos do que os plásticos obtidos por via petroquímica (3-5 €), sendo possível encontrar valores reportados na literatura de 1,5 € [3]. O substrato e a extracção/purificação são os principais factores de custo de produção de PHA, onde o primeiro pode chegar a 40% dos custos totais.

O uso de fontes renováveis de carbono, como resíduos orgânicos ou subprodutos industriais, em conjunção com a utilização de culturas microbianas mistas (MMC) pode reduzir significativamente o preço final dos PHA. A utilização de MMC facilita o uso de substratos complexos, uma vez que a população microbiana pode adaptar-se continuamente a alterações no substrato. A selecção de microorganismos ocorre em função da sua elevada capacidade de armazenamento de PHA, o que é uma vantagem competitiva, sendo também o resultado da pressão selectiva imposta pelas condições operacionais. Consequentemente, não há necessidade de condições de esterilidade, o que contribui para a redução do preço final de PHA.

A produção de PHA por MMC ocorre quando as condições de crescimento bacteriano são desfavoráveis, como as que resultam da ausência periódica de um nutriente essencial (N, Mg, P) ou quando as MMC estão sujeitos à presença transitente da fonte de carbono resultante da alternância de períodos curtos de disponibilidade de carbono com longos períodos de ausência de carbono (fome/fartura ou ADF). Uma outra situação resulta da alternância de condições anaeróbicas/aeróbicas (AN/AE), estando o carbono disponível na primeira fase, mas desacoplado do crescimento, que ocorre preferencialmente na segunda fase.

O processo de produção ocorre geralmente em duas fases [4]. Num primeiro período existe o enriquecimento das culturas microbianas melhor adaptadas para as condições experimentais aplicadas a um reactor de selecção, que pode ser operado de modo contínuo, numa série de dois fermentadores, ou em modo descontínuo sequencial (SBR) onde se aplicam as condições de ADF ou AN/AE. Parâmetros como o pH, tempo de residência de lamas, a duração entre a fase de fome/fartura e carga orgânica diária, são fundamentais para uma boa optimização da cultura. Uma vez estabelecida a capacidade acumuladora das MMC, em geral nesta fase com um conteúdo celular até 9%, a biomassa aqui obtida será utilizada num processo descontínuo de produção, em que será adicionada a mesma fonte de carbono em excesso em geral com limitação de crescimento. Esta alimentação pode ser feita de modo contínuo ou pulsado, até se atingir a capacidade de saturação da biomassa. A produção de PHAs por MMC utiliza preferencialmente como fonte de carbono ácidos orgânicos voláteis (AOV's) de cadeia curta (acetato, propionato, butirato, valerato, ...). Em substratos mais com-

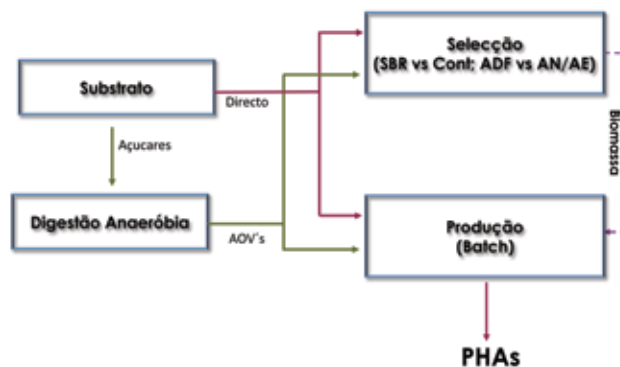


Figura 2- Processo de produção de PHA por culturas mistas em duas (linha vermelha) ou três (linha verde) fases.

plexos ou contendo açúcares é em geral efectuado um passo pré-fermentativo anaeróbico, de forma a ocorrer hidrólise deste substratos, e a maximizar a produção de AOV's. Neste caso estaremos em face de um processo de produção em três fases em que o efluente do reactor anaeróbico poderá ser alimentado directamente ao reactor de selecção ou de produção.

Esta estratégia têm sido aplicada com sucesso para a produção de PHA a partir de MMC utilizando substratos simples (acetato, propionato, butirato, ácido glutâmico valerato, lactato, ...) assim como substratos reais complexos (resíduos agro-industriais e subprodutos: amido, óleos vegetais, xarope de plátano, xarope de milho, peptona de peixe, extracto de carne, casaminoácidos, melações de cana de açúcar, soro de leite, hidrolisado de feijão de soja, resíduos da indústria alimentar (óleo de sésamo, gelados, soja); efluentes/subprodutos industriais: azeite, cana-de-açúcar, indústria de papel, destilaria, indústria cervejeira, suinicultura, águas residuais domésticas, sementes de algodão, xilose, glicerol da produção de biodiesel, poliestireno) [5]. Para a utilização de MMC com substrato simples, neste caso acetato, o maior teor intracelular obtido foi de 89% (p/p) ao passo que utilizando substratos complexos foi de 77% (p/p) utilizando como substrato melação de cana de açúcar fermentado [6, 7]. Estes valores são semelhante aos obtidos para a produção por parte de culturas puras.

A possibilidade de "desenho à medida" das propriedades do PHA e por consequência das suas aplicações, está comprovada para a utilização de MMC [7, 8]. As propriedades dos PHA produzidos pelos MMC seguem a mesma tendência do verificado para PHA obtido por culturas puras. A alimentação de diferentes substratos carbonados leva à produção de diferentes monómeros originando os respectivos hidroxialcanoatos. No caso das MMC a manipulação do substrato também pode afetar a composição microbiana do sistema, em particular para os sistemas de selecção de culturas. No entanto as propriedades de PHA produzidos por essas diferentes populações não apresentaram diferenças significativas, exceto aqueles relacionados com as composições monoméricas [9]. A estabilidade da composição de polímero é um aspecto importante da produção de PHA por MMC visto que os fluxos de resíduos/subprodutos passíveis de utilização como substrato são muitas vezes sensíveis a variações sazonais e de processo.

Processos Termoquímicos

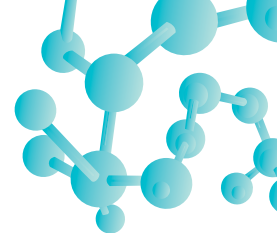
A combinação de processos termoquímicos de conversão de biomassa, como a pirólise, a gasificação e o processa-

mento hidrotérmico, com processos biológicos para utilização das diferentes correntes de substrato geradas encontra-se largamente inexplorada. Estes processos permitem produzir e originar diferentes perfis de compostos carbonados por manipulação das condições de operação, relativos às suas correntes líquidas, gasosas e sólidas. A sua aplicação na produção de PHA, numa estratégia integrada de biorrefinaria com vista à valorização dos seus fluxos, está a dar os seus primeiros passos. Na literatura apenas estão disponíveis três artigos sobre a produção de PHA com os produtos de processo termoquímicos. Em 2006, Ward et al. efetuou a pirólise de poliestireno (PS), um plástico de origem petroquímica, com vista a obter um óleo rico no seu monómero constituinte, o estireno (82%) [10]. Este óleo foi utilizado por *Pseudomonas putida* CA-3 para a produção de um polímero constituído por monómeros com 6, 8, e 10 átomos de carbono (36%, g/g). Kenny et al. (2008) utilizaram a fracção sólida obtida após pirólise de politereftalato de etileno (PET) para gerar tereftalato, o substrato que foi alimentado a *Pseudomonas sp.* a fim de produzir um polímero de PHA contendo monómeros com 8, 10, e 12 átomos de carbono, até um máximo de 27% de PHA na biomassa celular [11]. Com MMC apenas uma referência está disponível, Moita & Lemos (2012). Nesse trabalho foi demonstrada a possibilidade de seleccionar MMC, utilizando bio-óleo derivado de pirólise rápida de camas de galinha, com capacidade de acumulação de PHA. O conteúdo em PHA atingiu 9,2% no reactor de selecção, um valor semelhante ao obtido com outros substratos e MMC. No entanto, a capacidade de acumulação máxima da cultura seleccionada não foi ainda [12].

Uma vez que as reservas globais de petróleo são finitas, existe a necessidade de encontrar novas fontes de materiais duráveis. As crescentes preocupações com as alterações climáticas, o controlo das emissões de CO₂ e a sustentabilidade de recursos e processos levou à procura por materiais renováveis e amigos do ambiente. Os materiais renováveis produzidos a partir de microorganismos podem fornecer uma fonte sustentável alternativa para produtos químicos derivados do petróleo, entre os quais se incluem os polímeros. A utilização de resíduos e sub-produtos com baixo valor comercial ou sem utilização directa ajuda a mitigar os custos dos processos biotecnológicos de produção destes mesmos polímeros. A valorização de resíduos contribui ainda para a maximização da eficiência de conversão de biomassa “sensu lato” prevista na estratégia para uma biorrefinaria eficaz.

Referências

- [1] European Bioplastics. <http://en.european-bioplastics.org/>
- [2] Philip, S., T. Keshavarz, I. Roy (2007). Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications. J. Chem. Tech. Biotech. 82, 233–247.
- [3] Chanprateep, S. (2010). Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. J. Biosc. Bioeng. 110 (6), 621–632.
- [4] Serafim, L. S., P. C. Lemos, M. G. E. Albuquerque, M.A. M. Reis (2008). Strategies for PHA production by mixed cultures and renewable waste materials. Appl. Microbiol. Biotechnol. 81, 615–628.
- [5] Akaraonye, E., Keshavarz, T., I. Roy (2010). Production of polyhydroxyalkanoates: the future green materials of choice. J. Chem. Technol. Biotechnol. 85:732–743
- [6] Johnson, K., Y. Jiang, R. Kleerebezem, G. Muyzer, M. C. M. van Loosdrecht (2009). Enrichment of a mixed bacterial culture with a high polyhydroxyalkanoate storage capacity. Biomacromol. 10, 670–676.
- [7] Albuquerque, M.G.E., V. Martino, E. Pollet, L. Avérous, M.A.M. Reis (2011). Mixed culture polyhydroxyalkanoate (PHA) production from volatile fatty acid (VFA)-rich streams: Effect of substrate composition and feeding regime on PHA productivity, composition and properties. J. Biotech. 151, 66–76.
- [8] Ivanova, G., L. S. Serafim, P. C. Lemos, A. M. Ramos, M. A. M. Reis, E. J. Cabrita (2009). Influence of feeding strategies of mixed microbial cultures on the chemical composition and microstructure of copolyesters P(3HB-co-3HV) analyzed by NMR and statistical analysis. Magn. Reson. Chem. 47, 497–504.
- [9] Laycock, B., P. Halley, S. Pratt, A. Werker, P. Lant (2013). The chemomechanical properties of microbial polyhydroxyalkanoates. Progress in Polymer Science, 38, 536–583.
- [10] Ward, P. G., M. Goff, M. Donner, W. Kaminsky, K. E. O'Connor (2006). A two step chemo-biotechnological conversion of polystyrene to a biodegradable thermoplastic. Environ. Sci. Technol. 40, 2433–2437.
- [11] Kenny S. T., J. N. Runic, W. Kaminsky, T. Woods, R. P. Babu, C. M. Keely, W. Blau, K. E. O'Connor (2008). Up-cycling of PET (Polyethylene Terephthalate) to the biodegradable plastic PHA (Polyhydroxyalkanoate). Environ. Sci. Technol. 42, 7696–7701.
- [12] R. Moita, P.C. Lemos (2012). Biopolymers production from mixed cultures and pyrolysis by-products. J. Biotech. 157, 578–583.



Polímeros extracelulares de cianobactérias: características, produção e possíveis utilizações

Sara B. Pereira¹, Rita Mota^{1,2}, Paula Tamagnini^{1,2}

¹IBMC - Instituto de Biologia Molecular e Celular, Universidade do Porto, Rua do Campo Alegre 823, 4150-180 Porto, Portugal.

²Faculdade de Ciências, Departamento de Biologia, Universidade do Porto, Rua do Campo Alegre, Edifício FC4, 4169-007 Porto, Portugal.

E-mail: sarap@ibmc.up.pt

Introdução

Apesar de muitas bactérias terem a capacidade de produzir substâncias poliméricas extracelulares (EPS - *extracellular polymeric substances*), os polímeros produzidos por cianobactérias possuem características particulares que os tornam atrativos para aplicações biotecnológicas. Estas possíveis aplicações vão desde a sua utilização como agentes espessantes e emulsificantes nas indústrias alimentar, têxtil, de cosméticos e de tintas, a antivirais e imunoestimuladores na indústria farmacêutica [1]. Vários estudos demonstraram também que os EPS de cianobactérias são muito eficazes na biorremediação de metais pesados de águas contaminadas [2], podendo vir a constituir uma alternativa viável aos métodos físico-químicos utilizados correntemente [3]. O uso destes biopolímeros apresenta como vantagens o baixo custo, o uso de recursos naturais e renováveis, a elevada eficácia no tratamento de águas contaminadas com vários metais, a rápida cinética de remoção do metal, a elevada seletividade e a possibilidade de regeneração do biossorbente e recuperação do metal [4]. Tendo em vista a utilização industrial dos EPS de cianobactérias, torna-se imperativo o estudo das suas vias biossintéticas, a caracterização detalhada do polímero e a identificação dos fatores que regulam a sua produção e exporte.

Cianobactérias

As cianobactérias são um grupo grande e diversificado de microrganismos que desempenham papéis primordiais nos ciclos do carbono (como produtores primários) e do azoto (devido à sua capacidade de fixar o azoto atmosférico, principalmente em ambientes aquáticos). As formas mais antigas destes organismos remontam ao Pré-Câmbrico, tendo tido origem há cerca de 3.500 milhões de anos. Devido à sua longa história evolutiva e aos requisitos nutricionais simples (podem crescer em meios minerais utilizando ar como fonte de carbono e azoto, água como fonte de eletrões e poder redutor e luz como fonte de energia) as cianobactérias foram prosperando ao longo do tempo, estando atualmente presentes em habitats muito diversificados como águas doces e salgadas, solos e ambientes extremos (por ex. nascentes termais, zonas polares e desertos). Algumas estirpes podem, ainda, formar simbioses com diferentes organismos como protistas, plantas, fungos e esponjas, fornecendo compostos azotados e/ou carbonados ao hospedeiro. A par da sua diversidade ecológica, as cianobactérias apresentam também uma considerável variedade morfológica, incluindo formas unicelulares, coloniais e filamentosas, podendo estas últimas diferenciar células estruturalmente modificadas e funcionalmente especializadas como os heterocistos - células especializadas na fixação do azoto [5].

Substâncias poliméricas extracelulares (EPS) produzidas por cianobactérias

Várias estirpes de cianobactérias produzem EPS, que servem de barreira entre a célula e o ambiente, podendo desempenhar diferentes funções de acordo com a estirpe e as condições a que se encontra exposta. Estes polímeros, maioritariamente constituídos por polissacarídeos, podem permanecer associados à superfície da célula, sendo designados por bainhas, cápsulas ou mucilagens. A bainha é geralmente uma camada densa, com propriedades mecânicas estáveis, que rodeia as células ou grupos de células e é visível em microscopia ótica sem utilização de corantes (Figura 1). A cápsula consiste numa camada gelatinosa de contornos definidos, também intimamente associada à superfície celular, e que é visível em microscopia ótica com utilização de coloração negativa (por ex. tinta da china). O termo mucilagem é utilizado para definir o material mais laxo, sem estrutura bem-definida, disperso à volta das células. Os EPS podem ainda ser libertados para o meio, sendo designados por RPS (*released polysaccharides*) [1].

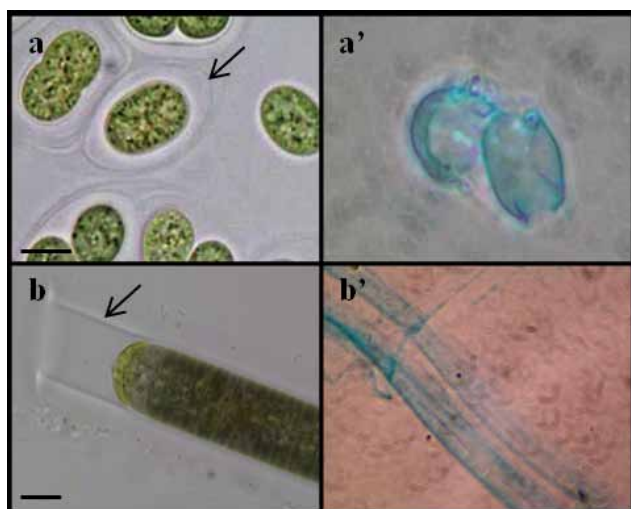


Figura 1- Imagens de microscopia ótica de uma cianobactéria unicelular (a) *Gloeotheca* sp. PCC 6909 e de uma cianobactéria filamentosas (b) *Lyngbya majuscula* CCAP 1446/4, e das respetivas bainhas isoladas e coradas com Azul de Alcian (a' e b'). Seta: bainha, barra: 5 µm.

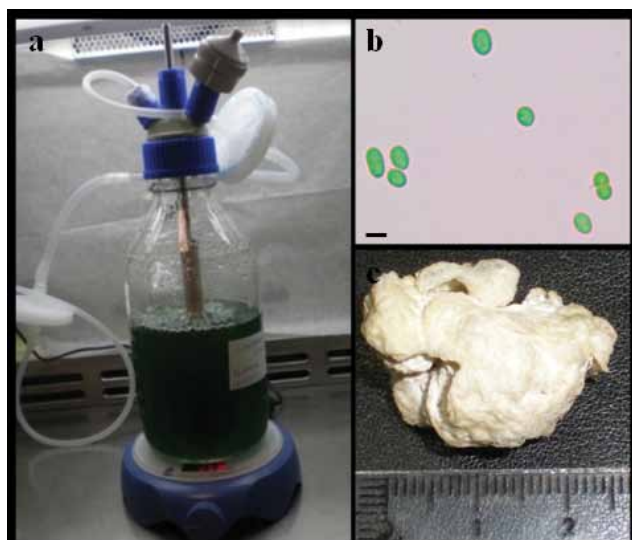


Figura 2- Cultura da cianobactéria unicelular *Cyanothece* sp. CCY 0110 num bioreactor de 1 L (a) e imagem de microscopia ótica da mesma estirpe (b), barra: 5 μ m. Substâncias poliméricas extracelulares de *Cyanothece* sp. CCY 0110 isoladas e liofilizadas (c).

Como referido anteriormente, os EPS produzidos por cianobactérias têm características que os diferenciam dos polímeros produzidos por outros microrganismos:

- (i) contêm geralmente dois ácidos urónicos diferentes (ácido glucurónico e galacturónico), que lhes conferem um forte carácter aniónico,
- (ii) possuem grupos sulfato, raros em EPS de outras bactérias, que aumentam a carga negativa e contribuem para as suas propriedades farmacológicas,
- (iii) são constituídos por um número mais elevado de monossacarídeos diferentes, o que aumenta o número de conformações possíveis do polímero, e
- (iv) possuem um elevado grau de hidrofobicidade devido à presença de grupos acetilo com ligações éster, de desoxiaçúcares e de frações peptídicas [1, 6].

Mecanismos de produção de EPS em cianobactérias

Apesar da cultura de cianobactérias ser fácil e pouco dispendiosa e dos seus polímeros terem características vantajosas, as aplicações biotecnológicas encontram-se ainda limitadas pela falta de conhecimentos acerca das vias biossintéticas e de exporte dos EPS, não permitindo o controlo e a otimização desejados do processo.

Estudos realizados com outras bactérias revelaram que, independentemente do polímero produzido, o processo biossintético é relativamente conservado, iniciando-se com a conversão de monossacarídeos em nucleótidos de açúcar no citoplasma, e acabando com a presença de um polímero complexo no exterior da parede celular [7]. Este processo envolve, geralmente, três grupos de proteínas, nomeadamente as enzimas envolvidas na biossíntese dos nucleótidos de açúcar, as glicosil-transferases, que transferem os nucleótidos de açúcar para recetores específicos localizados na membrana plasmática, e as proteínas envolvidas na montagem e exportação dos EPS. As proteínas pertencentes aos dois primeiros grupos são específicas para um determinado organismo, enquanto as envolvidas nos últimos passos de

produção de EPS, nomeadamente na sua montagem e exportação, parecem ser conservadas. A maioria dos EPS bacterianos é produzida por um de três processos: o dependente da proteína Wzy, o dependente de um transportador ABC, ou o dependente de uma sintase [7, 8]. Os processos dependentes da proteína Wzy e do transportador ABC começam com a transferência de nucleótidos de açúcar para um aceitador lipídico localizado na membrana celular. No processo dependente da proteína Wzy os açúcares formam unidades repetitivas que vão sendo transferidas para o periplasma onde são polimerizadas pela Wzy. No processo dependente do transportador ABC, o polímero é inteiramente polimerizado no citoplasma, sendo posteriormente transferido para a face periplasmática da membrana pelo transportador ABC. Em ambos os processos, a exportação dos EPS do periplasma para o exterior da célula é mediado por membros das famílias de proteínas PCP (*polysaccharide copolymerase*) e OPX (*outer membrane polysaccharide export*). No processo dependente da sintase, na montagem e exportação dos EPS intervém uma glicosil-transferase, denominada sintase, que transfere os nucleótidos de açúcar, atuando como polimerase e como proteína transportadora [9].

De forma a melhor compreender os últimos passos da produção de EPS em cianobactérias, o grupo de investigação *Bioengineering and Synthetic Microbiology* do IBMC – Instituto de Biologia Molecular e Celular, Universidade do Porto, efetuou uma análise *in silico* de genomas disponíveis de cianobactérias. Os resultados obtidos revelaram que os genes cujos produtos estão envolvidos na montagem e exportação dos EPS se encontram dispersos nos genomas de cianobactérias, isolados ou em pequenos grupos, e a presença de genes que codificam proteínas envolvidas na via dependente da proteína Wzy sugere que as cianobactérias utilizam esta via [1, 7]. Utilizando toda a informação disponível, foi possível propor um modelo para os últimos passos da produção de EPS em cianobactérias [1] e reconstruir a história filogenética dos genes que codificam as proteínas PCP e OPX, pondo em evidência os principais acontecimentos evolutivos da maquinaria de produção de EPS nas cianobactérias: transferências horizontais de genes e inúmeras perdas e duplicações intra-genómicas que podem ser correlacionadas com a morfologia das estirpes [8].

Fatores que influenciam a produção de EPS em cianobactérias

Para a implementação e/ou otimização de sistemas de produção de EPS de cianobactérias é necessário, não só desvendar os mecanismos envolvidos na produção do polímero, mas também identificar os parâmetros que os regulam e, consequentemente, influenciam a quantidade e qualidade dos EPS produzidos. Com esse intuito, recorreu-se a uma abordagem multidisciplinar para elucidar os efeitos de diferentes condições fisiológicas/ambientais na produção de EPS pela cianobactéria *Cyanothece* sp. CCY 0110 (Figura 2). Os resultados obtidos revelaram que esta estirpe marinha e unicelular é muito eficiente na produção de EPS, libertando cerca de 75% dos hidratos de carbono produzidos para o meio de cultura (atingindo 1,8 g de EPS por L⁻¹ de cultura). Este estudo mostrou ainda que a quantidade de EPS está diretamente relacionada com o número de células existentes na cultura, e não com a quantidade produzida por cada uma das células, obtendo-se valores de produtividade superiores em condições que estimulam o crescimento celular. Verifi-

cou-se, também, que a luz é um fator essencial, uma vez que intensidades luminosas mais elevadas estimulam de forma significativa o crescimento aumentando, consequentemente, a quantidade de EPS produzidos. Estudos de difração de raios X, análises termogravimétricas, estudos de calorimetria diferencial de varrimento, cromatografia de troca iônica e espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier, revelaram que polímero produzido por *Cyanothece* sp. CCY 0110 é composto por 9 monossacarídeos diferentes (incluindo 2 ácidos urônicos, 2 pentoses e 2 desoxiaçúcares), possui grupos sulfato e ligações peptídicas, sendo um polímero de natureza amorfa e com elevada estabilidade térmica. Estes resultados põem em evidência o enorme potencial da cianobactéria *Cyanothece* sp. CCY 0110 e/ou dos seus RPS para aplicações biotecnológicas e industriais [10].

Situação atual e perspectivas futuras

Nos últimos anos tem-se assistido a um crescente interesse da comunidade científica nos EPS produzidos por microrganismos, e nos das cianobactérias em particular, devido às características peculiares destes polímeros e às potenciais aplicações. O acréscimo de informação acerca dos mecanismos de produção e dos fatores que os regulam, vai permitir o controlo e otimização de protótipos laboratoriais e, posteriormente, a implementação de sistemas industriais baseados em EPS.

Agradecimentos

Este trabalho é financiado por Fundos FEDER através do Programa Operacional Fatores de Competitividade - COMPETE e por Fundos Nacionais através da FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia no âmbito dos projetos FCOMP-01-0124-FEDER-022718 (PEst-C/SAU/LA0002/2011), e FCOMP-01-0124-FEDER-009697 (PTDC/EBB-EBI/099662/2008) e bolsas SFRH/BPD/72400/2010 e SFRH/BD/84914/2012.

Referências

- [1] Pereira, S, Zille, A, Micheletti, E, Moradas-Ferreira, P, De Philippis, R e Tamagnini, P (2009) Complexity of cyanobacterial exopolysaccharides: composition, structures, inducing factors and genes putatively involved in their biosynthesis and assembly. *FEMS Microbiol. Rev.* 33: 917-941.
- [2] De Philippis, R, Colica, G e Micheletti, E (2011) Exopolysaccharide-producing cyanobacteria in heavy metal removal from water: molecular basis and practical applicability of the biosorption process. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 92: 697-708.
- [3] Kurniawan, TA, Chan, GYS, Lo, W-H e Babel, S (2006) Physico-chemical treatment techniques for wastewater laden with heavy metals. *Chem. Eng. J.* 118: 83-98.
- [4] Lesmana, SO, Febriana, N, Soetaredjo, FE, Sunarso, J e Ismadji, S (2009) Studies on potential applications of biomass for the separation of heavy metals from water and wastewater. *Biochem. Eng. J.* 44: 19-41.
- [5] Castenholz, RW (2001) Phylum BX. Cyanobacteria. General characteristics of the cyanobacteria, pp. 474-487, In Boone, DR e Garrity, GM (eds.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Springer, New York, USA.
- [6] Ruiz-Ruiz, C, Srivastava, GK, Carranza, D, Mata, JA, Llamas, I, Santamaría, M, Quesada E e Molina, IJ (2011) An exopolysaccharide produced by the novel halophilic bacterium *Halomonas stenophila* strain B100 selectively induces apoptosis in human T leukaemia cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89: 345-355.
- [7] Whitfield, C e Larue, K (2008) Stop and go: Regulation of chain length in the biosynthesis of bacterial polysaccharides. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15: 121-123.
- [8] Pereira, SB, Mota, R, Santos, CL, De Philippis, R e Tamagnini, P (2013) Assembly and export of extracellular polymeric substances (EPS) in cyanobacteria: a phylogenomic approach, pp. 235-279, In Chauvat, F e Cassier-Chauvat, C (eds.), *Advances in Botanical Research: Genomics of Cyanobacteria*. Elsevier Limited, Oxford, UK.
- [9] Cuthbertson, L, Kos, V, e Whitfield, C (2010) ABC transporters involved in export of cell surface glycoconjugates. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74, 341-362.
- [10] Mota, R, Guimarães, R, Büttel, Zs, Rossi, F, Colica, G, Silva, C J, Santos, C, Gales, L, Zille, A, De Philippis, R, Pereira, S B e Tamagnini, P (2013) Production and characterization of extracellular carbohydrate polymer from *Cyanothece* sp. CCY 0110. *Carb. Polymers* 92: 1408-1415.

MICROBIOTEC'13

December 6 - 8, 2013 | Universidade de Aveiro | Aveiro, Portugal



The meeting includes interdisciplinary sessions across eight thematic areas:

Industrial and Food Microbiology and Biotechnology | Environmental Microbiology and Biotechnology
Health Microbiology and Biotechnology | Molecular Microbiology and Microbial Physiology | Bioprocess Engineering
Cellular Microbiology and Pathogenesis | Genomics and Systems Biology | Emergent Technologies

The city of Aveiro: <http://www.aveiro.eu/>

Congress registration fees: (including lunch, coffee breaks, congress dinner and documentation)

Students (undergraduate, graduate, and PhD students): 150 € or 120 € if until 15th September

Regular participants: Members of SPBT and SPM: 350 € or 200 € if until 15th September
Others: 400 € or 300 € if until 15th September

Accompanying persons (a program will be available): 70 € (including 3 lunches, 5 coffee breaks and the congress dinner)

Congress Secretariat: E-mail: microbiotec13@ua.pt

Chaimen: António Correia & Manuel A. Coimbra



Inscreva-se na Sociedade em
www.spbt.pt

Ficha Técnica

Boletim da Sociedade Portuguesa de Biotecnologia
Publicação Quadrimestral . Série 2 - Número 3
Abril 2013

Propriedade

Sociedade Portuguesa de Biotecnologia

Direcção

Presidente - José António Teixeira
Vice-Presidente - Maria Raquel Aires Barros
Secretário Geral - Eugénio Campos Ferreira
Tesoureiro - Manuel Coimbra da Silva
Vogal - Timothy Alun Hogg

Editores

José António Teixeira
Maria Raquel Aires Barros
Lígia O. Martins
Jorge H. Leitão

Paginação e Design

Dossier Comunicação e Imagem

Execução gráfica

Dossier Comunicação e Imagem
Tiragem - 1000 exemplares
Depósito Legal - 187836/02
ISSN - 1645-5878

Sócios Colectivos da SPBT

Amersham Bioscience Europe GmbH
Instituto Piaget

FIPA – Federação das Indústrias Portuguesas Agro-Alimentares
APIM – Associação Portuguesa da Indústria de Moagem e Massas
PROENOL – Indústria Biotecnológica, Lda.
PACI – Material Científico e Industrial, S.A.
VWR International – Material de Laboratório, S.A.
Laboratórios BIAL – Portela & Companhia, S.A.
INETI – Instituto de Engenharia e Tecnologia Industrial
CIPAN – Companhia Produtora de Antibióticos, S.A.
IZASA Portugal Distribuições Técnicas, Lda.
PIONEER HI-BRED Sementes de Portugal, S.A.
Escola Superior de Biotecnologia
RAR – Refinarias de Açúcar Reunidas, S.A.
Bayer Cropscience (Portugal) – Produtos para a Agricultura, Lda.
IBET – Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica





YOUPLATEIT!

SECUENCIACIÓN LOW-COST
DE ADN EN PLACA
DE 96 POCILLOS

249 Por sólo
€/placa

www.stabvida.com



1 YOUPLATEIT

Cliente envía en cada pocillo Primer + ADN mezclados

ADN: 800 ng (plásmido)
o 10 ng por cada 100 pb
de productos PCR
+ Primer: 10 pmoles



2 ENVIO GRATUITO PARA LABORATORIO DE STAB VIDA (24H POR SEUR)

3 24-48 H: STAB VIDA

Añade big dye, ejecuta la reacción de secuenciación y hace Run en el secuenciador. El resultado se envía al cliente por internet y correo electrónico. Sin el derecho a repetir.



YOUPLATEIT!

GENÉTICA PARA PROFESIONALES

NEXT-GEN EM PORTUGAL COM A STAB VIDA

QUALIDADE CERTIFICADA ISO 9001



WWW.STABVIDA.COM



- TEMPO DE TRANSPORTE DAS AMOSTRAS REDUZIDO!
- FÁCIL COMUNICAÇÃO
- POSSIBILIDADE DE "LEARNING-BY-DOING" NO NOSSO LABORATÓRIO

FAZEMOS ORÇAMENTO À MEDIDA.
WWW.STABVIDA.COM | INFO@STABVIDA.COM

COMPRE O QUE É NOSSO!



STAB
vida

Your easy genetics laboratory
Lisboa . Porto . Madrid . São Paulo . Milano