



NOVA

NOVA SCHOOL OF
SCIENCE & TECHNOLOGY

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

MATILDE PEREIRA BRANCO DE LACERDA E MELO

Licenciada em Ciências de Engenharia Química e Bioquímica

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DA BIOVANILINA ATRAVÉS DA VALORIZAÇÃO DA FIBRA DE MILHO

MESTRADO EM ENGENHARIA QUÍMICA E BIOQUÍMICA

Universidade NOVA de Lisboa

dezembro, 2021

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DA BIOVANILINA ATRAVÉS DA VALORIZAÇÃO DA FIBRA DE MILHO

MATILDE PEREIRA BRANCO DE LACERDA E MELO
Licenciada em ciências de Engenharia Química e Bioquímica

Orientador: Doutora Carla Maria Carvalho Gil Brazinha de Barros Ferreira, Investigadora, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Coorientadores: Doutora Cristiana Andreia Vieira Torres, Investigadora, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Júri:

Presidente:

Arguentes: Mário Fernando José Eusébio, Professor Auxiliar,
NOVA University Lisbon

Vogais:

MESTRADO EM ENGENHARIA QUÍMICA E BIOQUÍMICA

Universidade NOVA de Lisboa
dezembro, 2021

Otimização da produção da biovanilina através da valorização da fibra de milho

Copyright © Matilde Pereira Branco de Lacerda e Melo, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade NOVA de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade NOVA de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

A todos os que se cruzaram comigo neste caminho

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar, a todos aqueles que acompanharam todo o meu percurso nestes últimos cinco anos. Todos os amigos que fiz e as memórias que agora me despeço para dar início a um novo capítulo.

Agradeço também, a esta grande escola que escolhi para me formar. Olhando para trás, não teria tomado uma decisão diferente em relação ao meu percurso. Fui muito feliz, e acima de tudo, sinto um grande orgulho em ter tido a oportunidade de ter tido os professores que tive e também a oportunidade que tive em conhecer todos os amigos que conheci, sem estes não teria sido o mesmo.

À Professora Carla Brazinha agradeço também por me ter guiado nestes últimos meses, assim como gostaria de agradecer à Professora Cristiana Torres e ao Professor João Crespo pelo tempo dispensado ao meu trabalho.

Um último agradecimento à minha família, que sempre me proporcionou tudo para que me pudesse focar nos estudos e um dia ter uma carreira, agora espero estar à altura de retribuir aquilo que me foi dado sempre como adquirido.

Neste momento, outros sonhos e desafios virão, e sinto que tudo aquilo que completei e atingi até este dia, me prepararam de forma a ultrapassar os obstáculos que se seguem.

*"Yes, we can. Yes, we did."
(Barack Obama)*

RESUMO

A vanilina representa o aroma da baunilha, sendo este um dos aromas mais apreciados globalmente. Este aroma é utilizado maioritariamente na indústria alimentar, cosmética e farmacêutica. São vários os métodos de obtenção da vanilina. No entanto, esta via de trabalho implica a produção da vanilina por bioprocessamento através da degradação do ácido ferúlico - substrato - pela *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116 - microrganismo.

Desta forma, a principal necessidade deste trabalho é a purificação do substrato – ácido ferúlico – e do produto final – vanilina.

Em relação ao ácido ferúlico, a primeira etapa - Separação do ácido ferúlico dos arabinosídeos - consistiu na realização de uma ultrafiltração numa MetCell *cross-flow*, em que os arabinosídeos apresentaram uma alta rejeição à membrana Nadir UP150, enquanto o ácido ferúlico conseguiu permear através da mesma, obtendo-se uma recuperação deste composto no permeado final global de $77\% \pm 0,05$. A segunda etapa relativamente ao ácido ferúlico foi a realização de uma extração líquido-líquido com soluções modelo (solução aquosa apenas de ácido ferúlico com concentração de 3 g/L).

Relativamente à vanilina, foram realizadas três etapas distintas para a purificação deste composto. A primeira etapa consistiu na purificação através de uma ultrafiltração com uma membrana GH, utilizando soluções modelo, cujo objetivo foi que os vanílicos e o ácido ferúlico permeassem totalmente através da membrana, de forma a reter macromoléculas existentes no caldo de fermentação. No entanto, as rejeições à vanilina e ao ácido ferúlico foram mais elevadas do que o esperado, tendo-se obtido uma percentagem de 33,96% e de 48,93%, respetivamente.

A segunda etapa contou com a concentração da vanilina por osmose inversa utilizando duas membranas distintas – SW 30 e BW 30 – o objetivo foi avaliar qual destas membranas apresenta uma maior rejeição à vanilina, e se simultaneamente alguma destas membranas era capaz de permear o ácido ferúlico. Este processo de osmose inversa foi realizado com soluções modelo, mas também com solução real (caldo de fermentação). Para o processamento da solução real os resultados de rejeição à vanilina foram bastante mais satisfatórios do que para a solução modelo. Com a solução modelo a rejeição à vanilina foi de $67\% \pm 0,03$ para a membrana SW 30 e de $66\% \pm 0,03$ para a BW 30, ao passo que a rejeição obtida para a SW 30 com solução real foi de 99,73%.

No entanto, estas duas primeiras etapas, que utilizaram membranas, tiveram percentagens altas de adsorção de vanilina e ácido ferúlico por parte das diferentes membranas.

A terceira, e última etapa, de purificação da vanilina consistiu numa extração líquido-líquido, com soluções modelo de vanilina com uma concentração de 5 g/L. Para este processo foram utilizados quatro solventes distintos. Esta etapa teve como finalidade observar se algum destes solventes era seletivo para a vanilina.

Adicionalmente, foi também realizada uma diálise de forma a observar se seria possível a redução da cor acastanhada do caldo de fermentação. E por último, realizaram-se testes rápidos do bioprocessamento com o ácido ferúlico obtido pela extração líquido-líquido de solução real.

Palavras-chave: Vanilina, Ácido ferúlico, Ultrafiltração, Osmose inversa, Extração líquido-líquido

ABSTRACT

Vanillin represents the vanilla flavoring and is one of the most appreciated flavorings globally. This aroma is mainly used in food, cosmetic and pharmaceutical industries. There are several methods of obtaining vanillin. However, this works route involves the production of vanillin by bioprocess through the degradation of ferulic acid - substrate - by *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116. - microorganism.

Thu this work had as a main objective the purification of the substrate and the final product. Therefore, this work had as main objective the purification of the substrate and the final product - vanillin.

Regarding ferulic acid, the first step - Separation of ferulic acid from arabinoxylans - consisted in performing an ultrafiltration in a MetCell crossflow, in which the arabinoxylans showed high rejection to the Nadir UP150 membrane, while ferulic acid was able to permeate through it, obtaining a recovery of this compound in the overall final permeate of $77\% \pm 0,05$. The second purification step was to perform a liquid-liquid extraction with model solutions (aqueous solution of ferulic acid with a concentration of 3 g/ L).

Regarding vanillin, three different steps were performed to purify this compound. The first step consisted of purification through ultrafiltration with a GH membrane, using model solutions, the aim of which was that the vanillic compounds and ferulic acid permeated completely through the membrane, retaining existing macromolecules in the fermentation broth. However, the rejections to vanillin and ferulic acid were higher than expected, obtaining a percentage of 33,96% and 48,93%, respectively.

The second step involved the concentration of vanillin by reverse osmosis using two different membranes – SW 30 and BW 30 – the goal was to evaluate which of these membranes presents higher rejection of vanillin, and if simultaneously any of these membranes was able to permeate ferulic acid. This reverse osmosis process was performed with model solutions, but also with real solution (fermentation broth). For the processing, of the real solution the vanillin rejection results were much more satisfactory than for the model solution. With the model solution the vanillin rejection was $67\% \pm 0,03$ for the SW 30 membrane and $66\% \pm 0,03$ for the BW 30 membrane, while the rejection with the real solution obtained for the SW 30 membrane was 99,73%.

However, these first two stages, which used membranes, had high percentages of adsorption of vanillin and ferulic acid by the different membranes.

The third, and last step of vanillin purification consisted of a liquid-liquid extraction, with model vanillin solutions at a concentration of 5 g/ L. Four different solvents were used for this process. The purpose of this step was to observe if any of these solvents was selective for vanillin.

Additionally, a dialysis was also performed to observe it if would be possible to reduce the brownish color of the fermentation broth. And finally, rapid tests were performed with the ferulic acid obtained by liquid-liquid extraction of real solution.

Keywords: Vanillin, Ferulic acid, Ultrafiltration, Reverse osmosis, Liquid-liquid extraction

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| AGRADECIMENTOS..... | IX |
| RESUMO | XIII |
| ABSTRACT | XIV |
| ÍNDICE..... | XVI |
| ÍNDICE DE FIGURAS | XVIII |
| ÍNDICE DE TABELAS | XIX |
| GLOSSÁRIO..... | XX |
| 1. INTRODUÇÃO | 23 |
| 1.1. CONTEXTUALIZAÇÃO DO PROBLEMA..... | 23 |
| 1.2. MOTIVAÇÃO PARA O PROJETO TESE..... | 24 |
| 1.2.1. <i>Economia circular e biorrefinaria</i> | 24 |
| 1.3. PRODUÇÃO BIOLÓGICA DE BIOVANILINA..... | 25 |
| 1.4. ÁCIDO FERÚLICO: SUBSTRATO..... | 26 |
| 1.4.1. <i>Extração Alcalina do ácido ferúlico através da fibra de milho</i> | 26 |
| 1.4.2. <i>Purificação do ácido ferúlico</i> | 27 |
| 1.5. BIOPROCESSO: <i>AMYCOLATOPSIS SP. ATCC 39116</i> | 29 |
| 1.5.1. <i>Toxicidade da vanilina</i> | 29 |
| 1.6. PURIFICAÇÃO DA VANILINA | 30 |
| 2. MATERIAIS E MÉTODOS | 33 |
| 2.1. MATERIAIS | 34 |
| 2.2. PROCEDIMENTOS | 38 |
| 2.3. MÉTODOS ANALÍTICOS | 42 |
| 2.4. CÁLCULOS..... | 43 |
| 3. DMONSTRAÇÃO DE RESULTADOS E DISCUSSÃO | 47 |
| 3.1. SEPARAÇÃO DO ÁCIDO FERÚLICO DO ARABINOXILANO | 47 |
| 3.2. PURIFICAÇÃO DO ÁCIDO FERÚLICO | 49 |
| 3.3. BIOPROCESSO | 51 |
| 3.3.1. <i>Diálise</i> | 51 |
| 3.3.2. <i>Testes Rápidos com ácido ferúlico proveniente de extração líquido-líquido com solução real</i> | 52 |
| 3.4. PURIFICAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DA VANILINA..... | 52 |
| 3.4.1. <i>Purificação da vanilina por ultrafiltração</i> | 52 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 3.4.2. | <i>Concentração da vanilina por osmose inversa</i> | 54 |
| 3.4.3. | <i>Purificação da vanilina por Extração Líquido-Líquido</i> | 60 |
| 4. | CONCLUSÃO E TRABALHO FUTURO | 63 |
| 4.1. | SEPARAÇÃO DOS ARABINOXILANOS DO ÁCIDO FERÚLICO..... | 63 |
| 4.2. | PURIFICAÇÃO DO ÁCIDO FERÚLICO | 63 |
| 4.3. | BIOPROCESSO | 64 |
| 4.4. | PURIFICAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DA VANILINA | 64 |
| 4.4.1. | <i>Purificação da vanilina por ultrafiltração</i> | 64 |
| 4.4.2. | <i>Concentração da vanilina por osmose inversa</i> | 65 |
| 4.4.3. | <i>Purificação da vanilina por extração líquido-líquido</i> | 66 |
| | BIBLIOGRAFIA | 69 |
| | ANEXO A | 73 |
| | ANEXO B | 74 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| FIGURA 1 - QUOTA DE MERCADO DOS PRODUTORES DE BAUNILHA EM 2017 | 24 |
| FIGURA 2 - ECONOMIA CIRCULAR | 25 |
| FIGURA 3 - LIGAÇÃO ENTRE OS ARABINOXILANOS E O ÁCIDO FERÚLICO | 28 |
| FIGURA 4 - DIAGRAMA DE TODAS AS EXPERIÊNCIAS REALIZADAS | 33 |
| FIGURA 5 - ESQUEMA DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO PARA A PURIFICAÇÃO DO ÁCIDO FERÚLICO | 35 |
| FIGURA 6 - ETAPAS DE PURIFICAÇÃO E CONCENTRAÇÃO PARA A VANILINA | 36 |
| FIGURA 7 - EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DA SOLUÇÃO MODELO DE ÁCIDO FERÚLICO, COM PH 12 | 39 |
| FIGURA 8 - PROCESSO DE DIÁLISE | 40 |
| FIGURA 9 - EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO PARA A PURIFICAÇÃO DA VANILINA | 42 |
| FIGURA 10 - VARIAÇÃO DA PERMEÂNCIA DA MEMBRANA UP 150 NOS ENSAIOS DE PURIFICAÇÃO DO ÁCIDO FERÚLICO COM EXTRATO ALCALINO | 47 |
| FIGURA 11 - VARIAÇÃO DA PERMEÂNCIA COM O FATOR DE CONCENTRAÇÃO PARA A ULTRAFILTRAÇÃO COM A MEMBRANA UP 150 | 49 |
| FIGURA 12 - RETA DE CALIBRAÇÃO DO ÁCIDO FERÚLICO EM FASE AQUOSA (EM CIMA) E RETA DE CALIBRAÇÃO DO ÁCIDO FERÚLICO EM ETANOL (EM BAIXO)..... | 50 |
| FIGURA 13 - VARIAÇÃO DA PERMEÂNCIA COM O FATOR DE CONCENTRAÇÃO PARA A SOLUÇÃO MODELO OPERADA COM UMA MEMBRANA GH | 54 |
| FIGURA 14 - COMPACTAÇÃO DA MEMBRANA SW 30 PARA OSMOSE INVERSA DE PURIFICAÇÃO DE SOLUÇÕES MODELO DE VANILINA | 55 |
| FIGURA 15 - COMPACTAÇÃO DA MEMBRANA BW 30 PARA OSMOSE INVERSA DE CONCENTRAÇÃO DE SOLUÇÕES MODELO DE VANILINA | 55 |
| FIGURA 16 - VARIAÇÃO DA PERMEÂNCIA DAS MEMBRANAS SW 30 E BW 30 COM O FATOR DE CONCENTRAÇÃO..... | 58 |
| FIGURA 17 - VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO ÁCIDO FERÚLICO COM O FATOR DE CONCENTRAÇÃO | 59 |
| FIGURA 18 - VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA VANILINA COM O FATOR DE CONCENTRAÇÃO | 59 |
| FIGURA 19 - VARIAÇÃO DA PERMEÂNCIA DA MEMBRANA SW 30 COM O FATOR DE CONCENTRAÇÃO PARA A SOLUÇÃO REAL, TENDO EM CONTA A PRESSÃO OSMÓTICA | 60 |
| FIGURA 20 - RETA DE CALIBRAÇÃO PARA A VANILINA EM FASE AQUOSA (EM CIMA) E RETA DE CALIBRAÇÃO PARA A VANILINA EM ETANOL (EM BAIXO) | 61 |

ÍNDICE DE TABELAS

| | |
|---|----|
| TABELA 1 - SOLVENTES ORGÂNICOS UTILIZADOS NA PURIFICAÇÃO DO ÁCIDO FERÚLICO | 35 |
| TABELA 2 - CONCENTRAÇÕES E ESPECIFICAÇÕES DOS FENÓLICOS NAS SOLUÇÕES MODELO | 36 |
| TABELA 3 - ESPECIFICAÇÕES DAS MEMBRANAS UTILIZADAS NA PURIFICAÇÃO DA VANILINA..... | 37 |
| TABELA 4 - BALANÇO DE MASSA, REJEIÇÃO E RECUPERAÇÃO PARA O ENSAIO 1 COM A MEMBRANA UP 150..... | 48 |
| TABELA 5 - BALANÇO DE MASSA, REJEIÇÃO E RECUPERAÇÃO PARA O ENSAIO 2 COM A MEMBRANA UP 150..... | 48 |
| TABELA 6 - RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO PARA SOLUÇÃO MODELO DE ÁCIDO FERÚLICO | 51 |
| TABELA 11 - BALANÇO DE MASSA E REJEIÇÃO POR COMPOSTO PARA O ENSAIO COM A MEMBRANA GH | 53 |
| TABELA 7 - BALANÇO DE MASSA E REJEIÇÃO POR COMPOSTO PARA O ENSAIO COM A MEMBRANA SW 30, COM SOLUÇÃO MODELO | 56 |
| TABELA 8 - BALANÇO DE MASSA E REJEIÇÃO POR COMPOSTO PARA O ENSAIO COM A MEMBRANA SW 30 (DUPLICADO), COM SOLUÇÃO MODELO | 56 |
| TABELA 9 - BALANÇO DE MASSA E REJEIÇÃO POR COMPOSTO PARA O ENSAIO COM A MEMBRANA BW 30, COM SOLUÇÃO MODELO | 56 |
| TABELA 10 - BALANÇO DE MASSA E REJEIÇÃO POR COMPOSTO PARA O ENSAIO COM A MEMBRANA BW 30..... | 57 |
| TABELA 12 - BALANÇO DE MASSA E REJEIÇÃO POR COMPOSTO PARA O ENSAIO COM A MEMBRANA SW 30, COM SOLUÇÃO REAL | 58 |
| TABELA 13 - RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO PARA A SOLUÇÃO MODELO DE VANILINA | 61 |

GLOSSÁRIO

D

Da – Dalton

F

FI - Alimentação Inicial (Feed Inicial)

FF - Retentado final (Feed Final)

G

g/ L - Grama por litro

H

HCl - Ácido clorídrico

HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*

Hz – Hertz

K

KDa - Kilodalton

Kg – Quilograma

L

L – Litro

M

M – Molar

mg/ L - Miligrama por litro

Mol – Mol

MWCO - *Molecular weight cut-off* (limite de corte)

N

NaOH – Hidróxido de Sódio

nm - Nanómetros

P

PFG - Permeado final global

1.1. Contextualização do problema

O presente trabalho insere-se na produção biológica de vanilina, que conta com uma parceria entre a Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade Nova de Lisboa e a COPAM – Companhia Portuguesa de Amidos, S.A.

Este trabalho tem como foco a otimização do processo de produção da biovanilina através da valorização da fibra de milho, uma vez que o milho representa uma fonte renovável e de baixo valor na indústria do amido, e que é particularmente rica em ácido ferúlico (precursor da vanilina juntamente com o biopolímero arabinosilano). A via de produção da vanilina é a bioconversão do ácido ferúlico usando uma bactéria como biocatalisador (*Amycolatopsis* sp. ATCC 39116).

A produção biológica da vanilina advém da necessidade de acompanhar o crescimento do mercado deste aroma, e criar alternativas à sua produção mais saudáveis e sustentáveis, relativamente a outras vias de produção praticadas. Uma vez que, o processo biológico e as consequentes etapas de separação foram já estudadas anteriormente pelos diversos participantes neste processo, resta assim otimizar de forma eficaz o processo reduzindo os custos que lhe são inerentes em diferentes etapas, sendo estas a purificação do ácido ferúlico e a purificação da vanilina, maioritariamente.

De forma a clarificar aquilo que está neste momento em vigor no processo e quais são os pontos que se pretendem otimizar, temos que:

1. Em relação à purificação do ácido ferúlico utilizam-se resinas que é um processo bastante caro a nível industrial, e assim surgiu a possibilidade de estudar o desempenho da extração líquido-líquido;
2. No processo de purificação da vanilina, está a ser estudada a possibilidade da utilização de membranas para a sua purificação, como alternativa a processos evaporativos, que são também bastante dispendiosos a nível industrial.

Assim define-se o objetivo deste trabalho que é o estudo de alternativas aos métodos de separação praticados atualmente de forma a otimizar o processo e a torná-lo economicamente mais viável, estudando alternativas que produzam resultados igualmente eficientes ou melhores, em termos de rendimento e purificação dos compostos do interesse.

1.2. Motivação para o projeto tese

A motivação deste trabalho parte do interesse crescente, por parte dos consumidores, na produção da vanilina de forma natural e mais saudável. Desta forma, foi feita uma pequena análise aos aspetos que motivam este projeto.

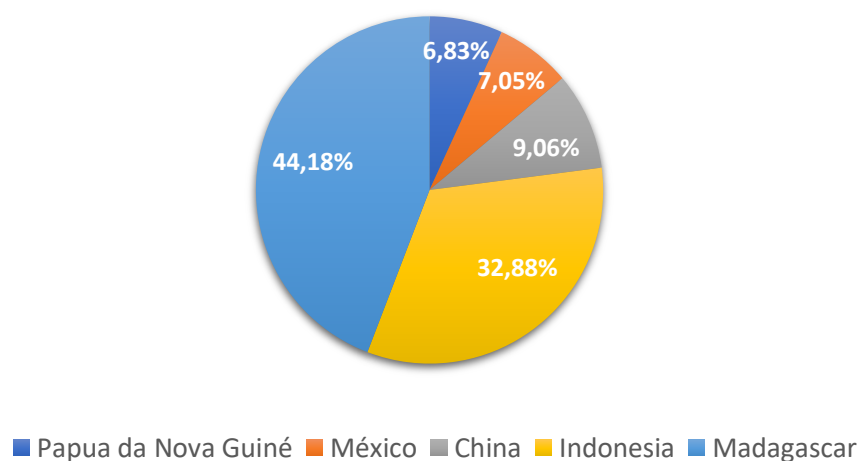


Figura 1 - Quota de mercado dos produtores de baunilha em 2017

1.2.1. Economia circular e biorrefinaria

Entende-se por economia circular um conceito estratégico que assenta nos princípios da redução, da reutilização, da reciclagem de materiais e da energia.

Devido ao aumento de população dos últimos anos, este é um conceito cada vez mais importante.

A pressão dos recursos naturais do nosso planeta têm vindo a enfatizar a importância das sociedades a adotarem um comportamento mais sustentável, uma economia mais "verde", que assegure a continuação do desenvolvimento económico, a melhoria das condições de vida das populações, assim como, a regeneração dos recursos naturais.⁷

Deste modo, a economia circular é outra das motivações para a procura de alternativas à produção de biovanilina através da valorização da fibra de milho, uma vez que, esta representa um recurso natural e renovável.

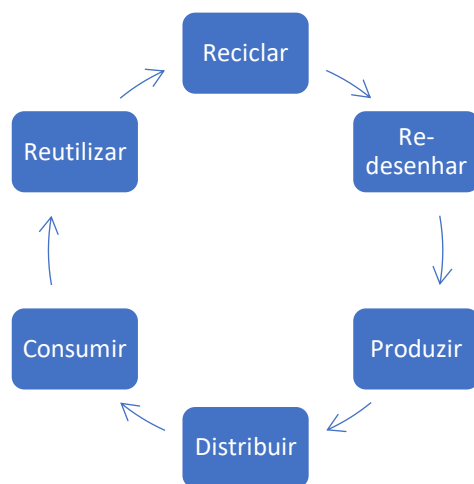


Figura 2 - Economia Circular

Adicionalmente, temos que, de um ponto de vista económico, a produção da biovanilina segue também uma abordagem de biorrefinaria, uma vez que a sua produção se realiza através da valorização de matérias-primas renováveis e de baixo custo. É de acrescentar que a indústria amilácea, mais particularmente o processamento de milho por via húmida, pode ser considerada uma forma de biorrefinaria, pelo facto de esta dar origem a uma variada quantidade de subprodutos que servem conseqüentemente de matéria-prima para muitas outras aplicações.⁸

1.3. Produção biológica de biovanilina

A produção biológica da vanilina é o processo que tem obtido mais interesse por parte dos consumidores finais, pois assume o papel de substituir a vanilina sintética por um produto que parte de uma base biológica e natural. Sendo então a vanilina produzida por esta via considerada natural, de acordo com os regulamentos alimentares que se encontram em vigor de momento.⁹

Dentro dos processos biológicos encontram-se várias vias que se podem seguir que incluem a utilização de enzimas para gerar a vanilina, desenvolvimento de culturas de tecidos, utilização de microrganismos para bio converter vários substratos, e por fim a utilização da engenharia genética.⁹

No processo em questão para a produção da biovanilina utilizam-se microrganismos de forma a converter o substrato – ácido ferúlico.

Os microrganismos são conhecidos por serem capazes de produzir hidroxibenzoatos como a vanilina, através de vários substratos naturais ou à base de petróleo através de processos de biodegradação ou biotransformação. Microrganismos como *Psychrobacter sp. CSW4*, *Candida galli PGO6*, *Pseudomonas resinovorans SPR1*, *Bacillus pumilus S-1*, *Streptomyces* e *Brevibacillus agriforum* foram analisados para a eventual biotransformação do ácido

ferúlico, entre outros substratos de estrutura semelhante. Em particular, as actinomicetas, em que se encontram as várias espécies de *Streptomyces*, são bastante eficientes na degradação de ácidos hidroxicinâmicos, este grupo de bactérias mostram um rendimento e produtividade mais elevado, relativamente aos outros microrganismos supramencionados, na conversão do substrato a vanilina.¹⁰

1.4. Ácido Ferúlico: Substrato

O ácido ferúlico (também conhecido como 4-hidroxi-3-metoxicinâmico) representa um papel fundamental na produção biológica da vanilina, sendo este o precursor da sua produção. É um antioxidante sendo também um composto bastante utilizado na indústria dos cosméticos (mais especificamente para cremes faciais *anti-aging*), na indústria alimentar e também com aplicabilidade na indústria farmacêutica (para o combate de problemas de coagulação do sangue) e no desenvolvimento de medicamentos.^{11, 12}

Este composto pertence ao grupo dos ácidos hidroxicinâmicos e é o ácido mais abundante na parede celular das células vegetais (farelo de milho e trigo, polpa de beterraba sacarina e farelo de arroz) e em certas sementes de frutos. Podendo ser obtido por extração enzimática ou química (extração alcalina ou ácida).^{2, 13}

Todos estes subprodutos agro-industriais supramencionados são de baixo custo e sustentáveis para a produção de compostos de valor acrescentado, sendo que a sua utilização pode contribuir para a redução do impacto ambiental, uma vez que a matéria-prima é a fibra de milho (fonte renovável). A fibra de milho contém uma quantidade considerável de ácido ferúlico presente na sua composição (50 g/ Kg).¹⁴

O ácido ferúlico não existe na forma livre, mas existe quando ligado ao biopolímero arabinosilano, estes encontram-se fortemente ligados, e representam um dos componentes das paredes celulares das células vegetais.¹⁵

1.4.1. Extração Alcalina do ácido ferúlico através da fibra de milho

A extração enzimática é um processo "verde", uma vez que é mais eficiente em termos de consumo energético, do que a extração química. Outra das suas vantagens é o facto de ser seletivo, ou seja, tem a capacidade de recuperar o ácido ferúlico sem danificar outros compostos químicos valiosos. Por outro lado, apresenta algumas desvantagens, como a não obtenção de um rendimento tão favorável quando comparada com a extração química, neste caso. Outros aspetos negativos da extração enzimática é o facto das enzimas serem difíceis de recuperar depois de utilizadas, e também os tempos de extração serem mais longos.¹⁶

A extração química pode ainda ser alcalina ou ácida, sendo que a alcalina apresenta resultados mais positivos, pelo facto de degradar menos os ácidos fenólicos (presentes no milho) que são libertados. A extração do ácido ferúlico já foi extensamente reportada, pelo

que foi provado que a extração alcalina é o método com melhores resultados para este efeito.¹⁷

Da extração alcalina da fibra de milho, resulta no final um extrato particularmente rico em arabinosilanos (polissacáridos) e ácido ferúlico.¹⁸

1.4.2. Purificação do ácido ferúlico

- Separação do ácido ferúlico dos arabinosilanos

Após a extração alcalina é obtido um extrato rico em ácido ferúlico e arabinosilanos, e pretende-se concentrar este extrato em ácido ferúlico.

Os arabinosilanos são hemiceluloses que se encontram na parede celular de plantas, que consistem em dois co-polímeros de dois açúcares pentose: xilose e arabinose. Este é um composto que apresenta uma função estrutural nas células vegetais, sendo também um reservatório de ácido ferúlico e outros ácidos fenólicos que se encontram covalentemente ligados.¹⁹

De forma a separar estes dois compostos foi sugerido o processo de ultrafiltração, uma vez que, ambas as substâncias apresentam pesos moleculares bastante distintos. Enquanto o ácido ferúlico apresenta uma massa molecular de 194 Da, o peso molecular dos arabinosilanos varia dependendo da sua proveniência, mas no caso de ser proveniente da fibra de milho o seu peso molecular pode variar entre os 244 e os 491 kDa.²⁰ No retentado obtém-se a parte do extrato enriquecida em arabinosilanos, enquanto no permeado obtém-se uma solução diluída rica em ácido ferúlico. A membrana de ultrafiltração que foi utilizada é a Nadir UP 150 que apresenta resultados favoráveis e eficientes para a separação destes compostos, isto é uma rejeição⁽¹⁾ favorável ao ácido ferúlico.²¹

É de notar que os arabinosilanos apresentam uma alta viscosidade o que dificulta o processo, à medida que aumenta o fator de concentração.²²

A ultrafiltração é um método reportado com extratos de ácido ferúlico obtidos através de outras fontes renováveis, como é o caso do farelo de trigo.¹⁴

⁽¹⁾ Rejeição – Rejeição é tudo aquilo que é rejeitado pela membrana, ou seja, que não permeia.

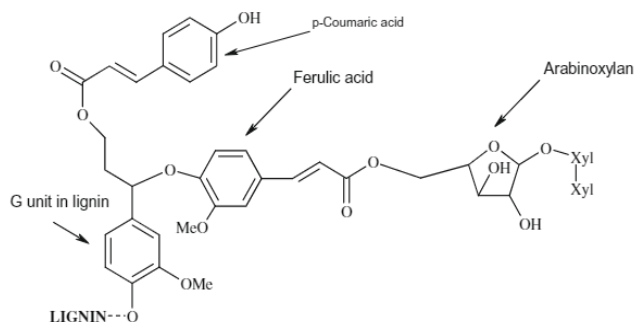


Figura 3 - Ligação entre os arabinoxilanos e o ácido ferúlico

- Remoção dos ácidos orgânicos, furfural e hidroximetilfurfural do extrato ácido ferúlico

O ácido ferúlico, uma vez retirados os arabinoxilanos contem impurezas como ácidos orgânicos, furfural e o hidroximetilfurfural, que são inibidores da bactéria essencial ao bioprocesso, desta forma, estas impurezas têm de ser removidas antes da fermentação.²³

A utilização de resinas macroporosas como método de purificação do ácido ferúlico foi já reportado para a remoção das impurezas supramencionadas, como sendo um processo eficaz, mas a nível industrial acarreta grandes custos de operação. O processo de extração líquido-líquido é um método reportado na purificação de fenólicos (vanilina), quando a fonte renovável da qual estes surgem é a beterraba. Desta forma, através da fibra de milho não estão reportados estudos para a purificação do ácido ferúlico através deste método.^{21, 24, 25}

Para além das resinas e da extração líquido-líquido existem outros métodos de purificar este ácido quando derivado de fontes renováveis. Como a purificação por membranas (processos de ultrafiltração, nanofiltração seguidos de cristalização), este processo omite a utilização de resinas o que simplifica bastante o processo. No entanto, este método está apenas reportado para quando a extração do ácido ferúlico é realizada com etanol.^{26, 27} Outro método de purificação (reportado para o caso do ácido ferúlico ter origem no farelo de trigo e ser obtido através de extração enzimática) é com uma resina de permuta aniônica fraca. Neste processo é também realizada uma desmineralização por eletrodialise homopolar antes da troca de aniões que permite remover a maior parte dos aniões inorgânicos. (Dupoiron, et al., 2018)

Adicionalmente, o objetivo do estudo da purificação do ácido ferúlico foi encontrar uma alternativa à utilização das resinas. Desta forma foir realizada uma extração líquido-líquido com os seguintes solventes: hexano, heptano, acetato de etilo e acetato de butilo.

Antes da extração o extrato livre de arabinoxilanos foi concentrado cinco vezes com o rota-vapor, retirando-se a água em excesso. A razão entre a solução concentrada de ácido ferúlico e o solvente foi de 1:3, que de acordo com (T. Llano, et al., 2015) é a razão mais eficiente de extração. O pH foi a variável em estudo e utilizou-se um pH de 4 e 12 para a realização da experiência.

1.5. Bioprocesso: *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116

Dentro dos processos biológicos encontram-se várias vias que se podem seguir que incluem a utilização de enzimas para libertar e gerar a vanilina, desenvolvimento de culturas de tecidos, utilização de microrganismos para bio converter vários substratos, e por fim a utilização da engenharia genética. No processo em questão para a produção da biovanilina utilizam-se microrganismos de forma a converter o substrato – ácido ferúlico.⁹

Os microrganismos são conhecidos por serem capazes de produzir hidroxibenzoatos como a vanilina, através de vários substratos naturais ou à base de petróleo através de processos de biodegradação ou biotransformação. Microrganismos como *Psychrobacter* sp. CSW4, *Candida galli* PGO6, *Pseudomonas resinovorans* SPR1, *Bacillus pumilus* S-1, *Streptomyces* e *Brevibacillus agri* foram analisados para a eventual biotransformação do ácido ferúlico, entre outros substratos de estrutura semelhante.¹⁰ Em particular, as actinomicetas, em que se encontram as várias espécies de *Streptomyces*, são bastante eficientes na degradação de ácidos hidroxicinâmicos, este grupo de bactérias mostram um rendimento e produtividade mais elevado, relativamente aos outros microrganismos supramencionados, na conversão do substrato a vanilina.^{9, 10}

A *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116 encontra-se no domínio das bactérias, no filo das actinobactérias e é extremamente necessária de forma a degradar o substrato e funcionando assim como catalisador no processo. Este microrganismo apresenta uma capacidade fenomenal na produção de vanilina através do ácido ferúlico, tolerando assim concentrações elevadas quer de substrato quer de produto. Foi já reportada como sendo a bactéria mais indicada na conversão do ácido ferúlico a vanilina. Uma vez terminado o bioprocesso, a vanilina encontra-se presente no caldo com uma concentração de 4,50 g/ L e com um rendimento molar de 96,1%.^{10, 28}

Esta bactéria catalisa assim a produção do ácido ferúlico através da desacetilação não oxidativa, sendo bastante eficaz neste processo.¹³

1.5.1. Toxicidade da vanilina

Como mencionado anteriormente, é de notar que foram já estudadas inúmeras espécies de microrganismos para a produção de biovanilina utilizando o ácido ferúlico como precursor. Assim, através de estudos prévios, sabe-se que a vanilina, como vários outros aldeídos aromáticos, tem um efeito tóxico na maioria dos microrganismos, o que torna difícil a obtenção de rendimentos elevados deste composto (Converti, Aliakbarian, Domínguez, Bustos Vázquez, & Perego, 2010). Logo, existe a possibilidade de haver a degradação da estirpe bacteriana da vanilina a compostos que lhe causam menos danos, como é o caso do ácido vanílico, do álcool vanílico e do guaiacol. É por esta razão, que a bactéria *Amycolatopsis*

sp. ATCC 39116 é utilizada, uma vez que é o microrganismo que suporta maiores concentrações de vanilina.^{2, 26, 29}

Segundo a literatura, a partir de 7 gramas por litro de concentração de vanilina é provocada morte celular após algumas horas e acima de 10 gramas por litro a concentração tem ainda um efeito mais forte num menor espaço de tempo. De forma a superar esta dificuldade podem ser tomadas algumas medidas prévias, como a otimização da composição média e das condições de operação do funcionamento do biorreator, a redução do contacto entre a vanilina e o microrganismo utilizando resinas que adsorvem o produto, e por último, pode-se utilizar a bactéria geneticamente modificada *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116 de forma a evitar a conversão da vanilina em ácido vanílico.^{2, 26, 29}

1.6. Purificação da vanilina

A purificação da vanilina é realizada partir do caldo de fermentação que resulta do bioprocessamento com a bactéria. Ao purificar este composto, um dos objetivos a cumprir é que este mantenha todas as suas propriedades físico-químicas no final de todos os tratamentos.³⁰

Atualmente, a vanilina obtida naturalmente pode ser purificada através de um solvente, seguida de cristalização. A cristalização, serve essencialmente, para garantir a qualidade do produto final, que não se consegue obter em estado de solução, para este processo é utilizado um solvente polar. No entanto, o processo de cristalização, é um processo bastante utilizado aquando da purificação de caldos de fermentação. Este procedimento, no caso da vanilina, torna-se competitivo apenas quando a concentração deste composto supera os 10 gramas por litro no caldo que resulta da reação.^{26, 31}

A técnica da cristalização foi a técnica mais aplicada nos últimos anos para este efeito. No entanto, tem vindo a ser substituída, pois apresenta algumas desvantagens. Um dos inconvenientes desta etapa é o facto de exigir a utilização de solventes orgânicos, que podem apresentar malefícios do ponto de vista toxicológico e ambiental.¹¹ Até ter surgido o processo de adsorção, não tinha ainda sido sugerido nenhum processo sem a presença da etapa de cristalização. (Hubert, Revelant, & Vibert, 2017)

A destilação sob vácuo é outros dos métodos conhecidos para a purificação da vanilina, que foi patenteado pela *Rhodia Operations*. Este método patenteado inclui ainda operar em colunas de destilação sucessivas (2 ou 3), e ainda uma evaporação seguida de condensação.³²

O processo de adsorção para a recuperação e purificação da vanilina natural já foi reportado. De acordo com trabalhos realizados anteriormente, o carbono ativado apresentou uma capacidade grande para adsorver compostos aromáticos, no entanto, não foi específico

para a vanilina. Desta forma, foram testados outros adsorventes que poderiam ser mais vantajosos à recuperação da vanilina.^{33, 34}

As desvantagens apresentadas ao processo são a dificuldade de encontrar um adsorvente com uma seletividade exclusiva à vanilina, vestígios de contaminantes adsorventes são também difíceis de evitar, o que exige um controlo constante do produto recuperado, e, por último, a utilização de solventes orgânicos, que são geralmente necessários para dessorção.²¹

No entanto, foi um processo que apresentou resultados favoráveis à purificação da vanilina, quando o utilizado o etanol absoluto como solvente.³³

O método da pervaporação foi também estudado e proposto. Este processo indica uma elevada seletividade em relação à vanilina. No entanto, o fluxo de permeado é baixo devido à baixa volatilidade da vanilina, o que foi já comprovado em estudos anteriores. Este facto é particularmente verdadeiro quando a temperatura é baixa. Este processo apresenta algumas desvantagens do ponto de vista económico devido ao facto de ter de se realizar a evaporação da solução que se pretende purificar. Especialmente neste caso, pois a vanilina é termossensível e a evaporação deste composto tem de ser realizado em vácuo de forma a não danificar o composto.^{35, 36, 37}

De seguida, a extração líquido-líquido para a purificação da vanilina foi também um método já reportado, e patenteado no passado pela *Rhodia Operations*. No entanto, realizou-se experimentalmente extrações líquido-líquido com os mesmos solventes utilizados na purificação do ácido ferúlico: hexano, heptano, acetato de etilo e o acetato de butilo em soluções modelo de vanilina, de forma a verificar se estes solventes são seletivos à vanilina (solubilizam a vanilina).³⁸

A patente referente à extração líquido-líquido para a purificação deste aroma da Rhodia, sugere um processo evaporativo, seguido de extrações líquido-líquido sucessivas com diferentes solventes orgânicos a diferentes pH. Em que o passo final se precipita a vanilina, ajustando o pH, e isolando assim o composto. Este processo permite recuperar uma alta percentagem de vanilina com uma alta purificação.³⁹

Adicionalmente, a purificação da vanilina por membranas (osmose inversa e ultrafiltração), seguida de uma extração líquido-líquido, é um processo que ainda não foi relatado como tendo sido realizado.

As membranas utilizadas foram a SW 30, a BW 30 e a GH. Para a osmose inversa utilizaram-se a SW 30 e a BW 30, e para a ultrafiltração utilizou-se a GH. As membranas SW 30 e BW 30, utilizadas na osmose inversa, são normalmente utilizadas para a dessalinização da água do mar, são membranas capazes de processar fluxos bastante altos, mas também manter uma rejeição alta aos sais. Ambas as membranas são utilizadas à escala industrial. A membrana GH, utilizada na ultrafiltração, é também utilizada no tratamento de águas (mais

especificamente, águas superficiais), para a redução de cor e também na purificação química.
40, 41, 42

Aquilo que se pretende analisar são as rejeições destas membranas aos compostos fenólicos (vanilina, ácido ferúlico, álcool vanílico e ácido vanílico) e estudar se esta poderá ser uma possível via de purificação da vanilina.

Após o estudo realizado para a purificação da vanilina, com as diferentes membranas, foram realizados ensaios com soluções modelo (na presença de vanilina). Foram utilizados quatro solventes distintos (hexano, heptano, acetato de etilo e acetato de butilo) para avaliar a seletividades destes solventes orgânicos para a vanilina.

MATERIAIS E MÉTODOS

O esquema dos diferentes estudos experimentais realizados neste trabalho, visando a produção sustentável da biovanilina, apresenta-se na figura em seguida:

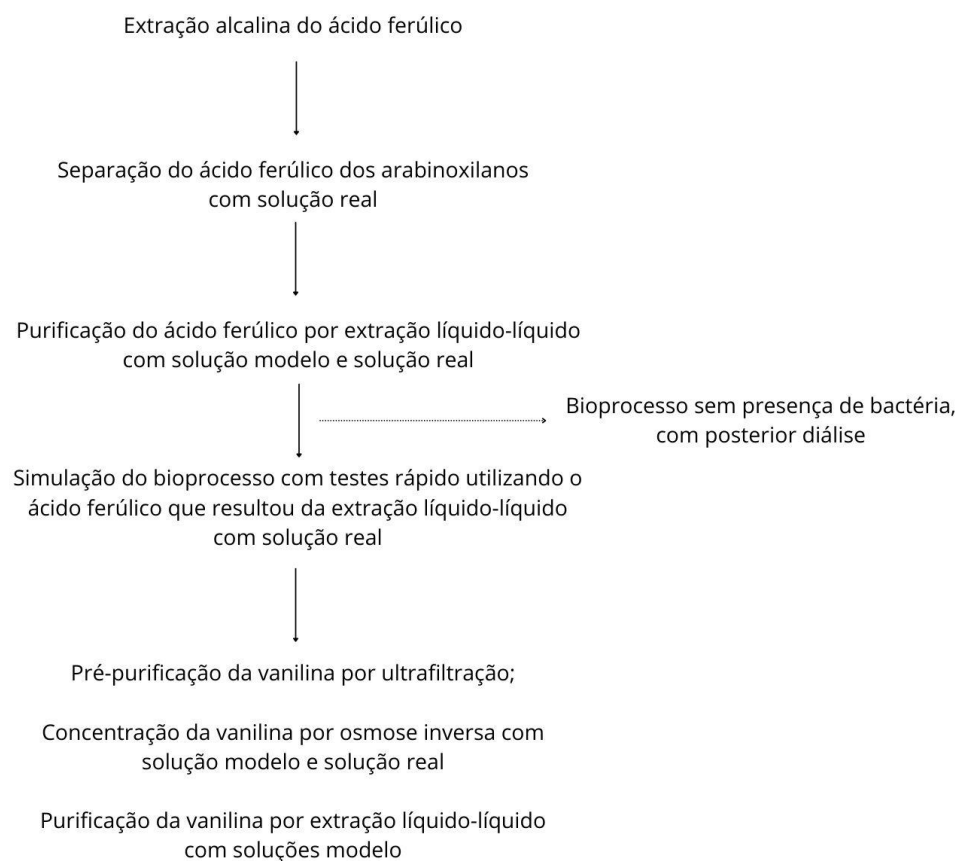


Figura 4 - Diagrama de todas as experiências realizadas

2.1. Materiais

2.1.1. Extração alcalina do ácido ferúlico a partir da fibra de milho

O extrato alcalino foi produzido de forma a avaliar o desempenho da etapa seguinte (separação do ácido ferúlico do arabinosilano) desta forma, foram utilizados os mesmos materiais e condições de operação que foram já relatadas e revelaram ser bem sucedidas.⁴³

O material utilizado foi a fibra de milho cedida pela COPAM. Esta fibra de milho é colocada num extrator com NaOH 0,25M e água durante 7 horas a 30 °C, com uma razão líquido-sólido de 10 *g solução de extração / g fibra seca*. Após este tempo de extração é obtido um extrato alcalino rico em ácido ferúlico com uma concentração aproximada de 2,10 ± 0,09 *g / L*.²¹ Foi a partir deste extrato de onde se partiu para a etapa seguinte.

2.1.2. Separação do ácido ferúlico do arabinosilano

Na etapa de separação do ácido ferúlico do arabinosilano a membrana utilizada foi a Nadir UP150 que foi já reportada como apresentando bons resultados na separação destes dois compostos.²¹ É devido à diferença de tamanho molecular entre o ácido ferúlico e os arabinosilanos que é possível realizar este processo de separação.²⁰ Esta membrana apresenta um MWCO de 150 kDa, pode operar até aos 95 °C, a um pH entre 1 e 14, é constituída por polietersulfona e é produzida pela Microdyn-Nadir.⁴⁴ O caldo processado foi o caldo que surgiu da extração alcalina realizada na etapa anterior a esta.

2.1.3. Purificação do ácido ferúlico

O ácido ferúlico que foi extraído através da extração alcalina, e posteriormente separados do arabinosilano, logo contém impurezas que necessitam de ser retiradas, uma vez que estas têm um efeito inibidor no microrganismo aquando do processo de fermentação, como referido anteriormente.

De forma a retirar estas impurezas (ácidos orgânicos, furfural e hidroximetilfurfural) é realizada uma extração líquido-líquido com uma razão de 1:3, que foi já testada anteriormente como sendo a melhor razão de extração, quer com solução modelo, quer com extrato real.⁴⁵

As variáveis analisadas foram o pH e o solvente a utilizar:

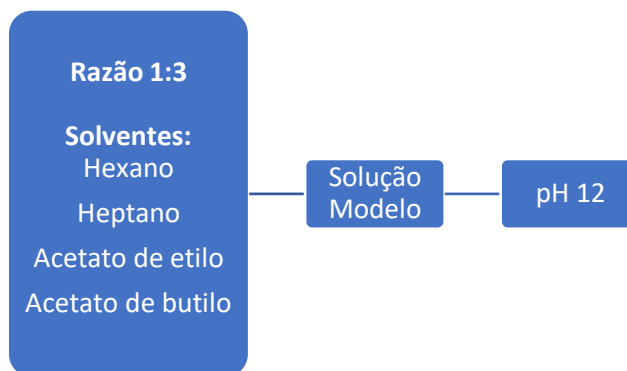


Figura 5 - Esquema do processo de extração líquido-líquido para a purificação do ácido ferúlico

Aqui observam-se os solventes utilizados, os fornecedores e a pureza de cada um deles:

Tabela 1 - Solventes orgânicos utilizados na purificação do ácido ferúlico

| Solvente | Fornecedor | Pureza |
|-------------------|---------------|--------------------|
| Hexano | Sigma-Aldrich | ReagentPlus, > 99% |
| Heptano | Sigma-Aldrich | Anidrido, > 99% |
| Acetato de etilo | Sigma-Aldrich | > 99,5% |
| Acetato de butilo | Sigma-Aldrich | > 98,5% |
| Etanol Absoluto | Sigma-Aldrich | 99% |

Desta forma, em tubos de Falcon de 50 ml, é colocado um volume de água de 7,5 ml e ácido ferúlico (Fluka, 99%) a uma concentração de 3 g/L, no caso das soluções modelo. O pH da fase aquosa foi acertado para um valor de 12 com uma solução de NaOH (1M).

2.1.4. Bioprocesso realizado sem a presença de bactéria com posterior diálise

A diálise consistiu na colocação de 140 ml de caldo de fermentação dentro de uma manga de diálise (Spectrum Labs) com 12-14 kDa, no interior de um gobelet de 5 L com água destilada e agitação, na presença de azida sódica, de forma a não haver crescimento de contaminações no meio. A água foi sendo alterada por água limpa ao longo da experiência (4 dias).

2.1.5. Simulação do bioprocesso através de testes rápidos com o ácido ferúlico proveniente da extração líquido-líquido da solução real

A estirpe utilizada, para a preparação do meio, foi a *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116, foi mantida em crioviais contendo 20 % (v/v) de glicerol a 80 °C negativos. A cultura foi cultivada

num meio de crescimento contendo: Na₂HPO₄, 4 g/ L; KH₂PO₄, 1g/ L; MgSO₄·7H₂O, 0,2 g/ L; CaCl₂·H₂O, 0,05 g/ L; Glucose Anidra, 20 g/ L; e extrato de levedura, 5 g/ L.

O meio foi esterilizado em autoclave a 1 bar, 121 °C durante 30 minutos.

A preparação do inóculo consistiu em colocar o conteúdo de um criovial em 200 ml de meio em que ficou a crescer num baffled shake flask de 500 ml, durante 24 horas a 45 °C e 200 rpm num orbital shaker.

2.1.6. Purificação e concentração da vanilina

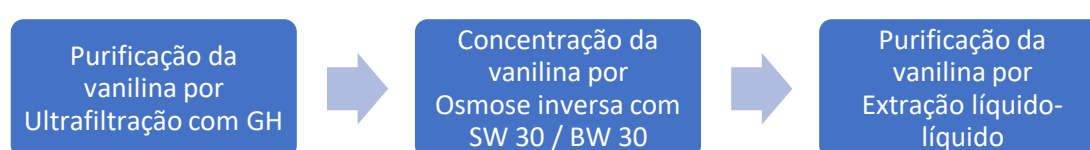


Figura 6 - Etapas de purificação e concentração para a vanilina

A purificação e concentração da vanilina com membranas foi realizada tanto com soluções modelo, como com soluções reais.

Em termo de soluções modelo, foram realizadas soluções modelo de 200 ml com vanilina, ácido vanílico, álcool vanílico e ácido ferúlico, com as concentrações que se podem encontrar em seguida. O pH foi ajustado para um valor de 8,2 através da adição de NaOH. Estas concentrações foram escolhidas com base nas concentrações que apresentadas pelo caldo de fermentação real. A composição da solução modelo para os processos de membranas, foi sempre igual e encontra-se na tabela em baixo.

Tabela 2 - Concentrações e especificações dos fenólicos nas soluções modelo

| Composto | Concentração g/L | Fabricante |
|-----------------|------------------|--------------------|
| Vanilina | 5 | Fluka, 99% |
| Ácido Vanílico | 2 | Fluka, ≥97% |
| Álcool Vanílico | 1 | Fluka, ≥98% |
| Ácido ferúlico | 1 | Sigma Aldrich, 99% |

As soluções modelo foram processadas a partir de uma METcell *dead-end* (EVONIK) - ou METCell de fluxo frontal. Ou seja, num sistema sem recirculação. As membranas utilizadas para o processamento de soluções modelo foram a GH, a SW 30, e a BW 30. Mais

especificamente a membrana GH serviu para realizar uma ultrafiltração à solução modelo como uma pré-purificação à solução de vanilina. E as membranas SW 30 e BW 30 tiveram o propósito de concentrar as soluções de vanilina, por osmose inversa.

A purificação da vanilina a partir de solução real, significa que foi a partir de caldo de fermentação, que foi preparado anteriormente a este projeto, que se encontrava no congelador. A quantidade utilizada foi de 500 ml, uma vez que o sistema utilizado tem uma capacidade mais elevada. O sistema utilizado foi a METcell *cross-flow*⁽²⁾ (EVONIK), que quer dizer que o sistema tinha recirculação, de forma a evitar problemas de colmatação, uma vez que se está a operar com uma solução real. A membrana utilizada para o processamento do caldo foi a SW 30.

As características das membranas podem-se observar na tabela que se segue:

Tabela 3 - Especificações das membranas utilizadas na purificação e concentração da vanilina

| Membrana | Fabricante | Material | Temperatura, C | Pressão, bar | pH | MWCO, kDa |
|-------------|--------------|-----------|----------------|--------------|--------|-----------|
| GH | SUEZ (GE) | Poliamida | 50 | 28 (aprox.) | 2 - 10 | 2,5 |
| SW30 | Dow FilmTech | Poliamida | 45 | 69 | 2 - 11 | - |
| BW30 | Dow FilmTech | Poliamida | 45 | 41 | 2 - 11 | - |

Também estas membranas foram compactadas, a uma pressão superior à de operação, tal como a membrana UP 150 utilizada para a separação dos arabinosídeos e do ácido ferúlico.

Nesta fase foram também medidas as permeabilidades hidráulicas. No entanto, em todos estes ensaios o peso do permeado estava a ser medido por uma balança (Kern 572). A pressão foi debitada ao sistema através de uma botija de gás de azoto (inerte).

No processo de extração líquido-líquido, em tubos Falcon de 50 ml, fizeram-se soluções modelo exclusivamente com vanilina (Fluka, 99%) com uma concentração de 5 g/ L. O objetivo desta extração foi encontrar um solvente orgânico que seja seletivo para a vanilina, e que este processo de extração proceda aos processos de membranas, de forma a recuperar a vanilina. No entanto, este processo de extração foi apenas realizado com soluções modelo, para avaliar se esta via poderia a ser uma possibilidade para a purificação deste aroma.

⁽²⁾ Uma METCell *cross-flow* é uma METCell que opera com fluxo tangencial. O fluxo tangencial refere-se à direção com que a solução de alimentação passa na membrana. Neste caso, a direção da alimentação incide tangencialmente na membrana. Ao contrário da METCell *dead-end* (fluxo frontal), em que a direção da alimentação incide perpendicularmente à membrana.

A extração líquido-líquido foi feita com uma razão de 1:3, a um pH da fase aquosa de 9 (ajustado com NaOH 1 M), e os solventes utilizados foram: o hexano, heptano, o acetato de etilo e o acetato de butilo (mesmos solventes utilizados na purificação do ácido ferúlico).

2.2. Procedimentos

2.2.1. Separação do ácido ferúlico do arabinoxilano

Em processos de membranas é essencial uma força motriz, que neste caso foi a pressão. A pressão faz com que o ácido ferúlico permeie pela membrana, uma vez que o seu tamanho é menor que o dos arabinoxilanos, que ficam retidos. De forma a realizar este processo com extrato real, utilizou-se um módulo de membranas com recirculação, o que ajuda a não colmatar a membrana.⁴⁶

O fator de concentração foi de 5, o que significa que se obtém um retentado cinco vezes mais concentrado que a alimentação inicial, no final da experiência. A temperatura de operação foi de 50 °C, que foi conseguida através de um banho térmico ao reator, cujo volume é de 5 L.

Entre o reator e o módulo membranar existe uma bomba, que faz a recirculação do sistema, que opera entre os 25 e os 30 Hz, aproximadamente. A pressão de operação para este processo foi de 0,7 bar, e foi controlada à saída do módulo (de onde sai o permeado) por um manómetro.

Antes da utilização da membrana no ensaio foi necessário compactar. A compactação foi realizada com água destilada por cerca de 1 hora. As membranas quando são submetidas a pressão sofrem deformações mecânicas que podem diminuir o fluxo de permeado (através de polarização da concentração ou colmatação). Neste processo, a membrana deve operar a uma pressão maior do que aquela que é submetida no ensaio. Deste modo, a pressão utilizada foi de 1,7 bar.⁴⁷

De forma a medir a permeabilidade hidráulica e a saber se a membrana já se encontra pronta a operar, mediu-se o volume que era atingido numa proveta graduada após 1 minuto, processo que foi repetido várias vezes, até que este volume estabilizasse. Após o volume se apresentar estável, a membrana encontra-se compactada e pronta a ser utilizada no ensaio.⁴⁷

2.2.2. Purificação do ácido ferúlico

Aquilo que se pretende observar, quer na solução modelo, quer na solução real, é quanto do ácido ferúlico passa para o solvente orgânico, e com que pureza é possível fazer a sua recuperação. A única forma de obter um bom rendimento na extração líquido-líquido é assegurar que passa uma quantidade de ácido ferúlico significativa da fase aquosa para o

solvente orgânico. Assim, a única forma de garantir isto é um solvente orgânico que tenha uma boa seletividade para o ácido ferúlico (ou seja, um solvente em que o ácido ferúlico seja solúvel).

- Solução Modelo:

Após estar preparada a solução aquosa com ácido ferúlico com pH 12, juntou-se um volume de 22,5 ml de solvente orgânico. A Figura que se encontra em seguida, ajuda a visualizar as extrações realizadas:

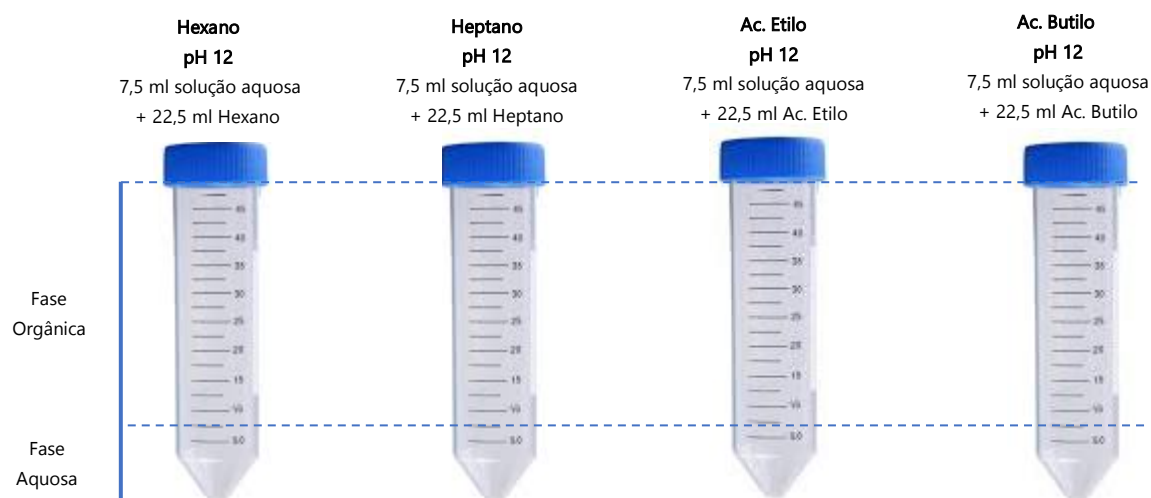


Figura 7 - Extração líquido-líquido da solução modelo de ácido ferúlico, com pH 12

Ao juntar o solvente orgânico (imiscível com a fase aquosa), foi necessário garantir que o ácido ferúlico era bem envolvido em ambas as fases. Desta forma, foi realizado o processo de *Bligh and Dyer*. Este processo consiste em misturar a solução modelo com o solvente orgânico no vórtice durante 8 minutos, e centrifugar posteriormente a mistura a 3 800 g.

Após a mistura, retirou-se a fase aquosa, cuidadosamente com uma pipeta, e secou-se o solvente orgânico com ar. Assim, é possível observar se o ácido ferúlico se dissolve em cada um dos solventes (uma vez que este não apresenta uma grande solubilidade em água).
48, 49

Depois de seco o solvente, obteve-se sempre resíduo, para todos os solventes utilizados. De forma a se poder analisar a quantidade de ácido ferúlico que passou para o solvente orgânico, este resíduo final obtido, foi ressuspensionado em etanol, e analisado por HPLC.

2.2.3. Bioprocesso realizado sem a presença de bactéria com posterior diálise

Uma vez terminado o bioprocesso é perceptível a cor intensa acastanhada com que o caldo de fermentação sai do reator. Desta forma, simulou-se um bioprocesso, sem bactéria, uma vez que o caldo apresenta esta cor com ou sem a bactéria presente no processo de fermentação. O objetivo da diálise, posterior ao bioprocesso, é entender se é possível eliminar a cor intensa do caldo. Ou seja, o ácido ferúlico permearia sem cor para fora da manga de diálise, e o que fica no interior da manga são os restantes componentes com cor.

Foram retiradas amostras diariamente. No entanto, apenas ocularmente foi perceptível de que este processo não iria resultar, pois a água presente no gobelet ficou sempre colorida após alguns minutos.

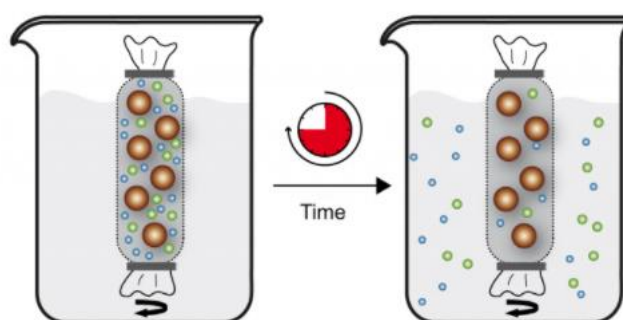


Figura 8 - Processo de diálise

2.2.4. Simulação do bioprocesso através de testes rápidos com o ácido ferúlico proveniente da extração líquido-líquido da solução real

Os testes rápidos pretenderam avaliar, de uma forma rápida e em menor escala, se o bioprocesso resultaria com o ácido ferúlico proveniente da extração líquido-líquido realizada com solução real (extrato alcalino, livre de arabinosídeos, concentrado cinco vezes com o auxílio do rota-vapor).

Foram preparados 3 erlenmeyers para a realização dos testes (2 testes com ácido ferúlico obtido na extração líquido-líquido e 1 teste com ácido ferúlico comercial). O teste com ácido ferúlico comercial serviu como guia daquilo que se deveria esperar na realidade.

A extração líquido-líquido da solução real enriquecida em ácido ferúlico foi concebida propositalmente para este ensaio, em que se pode observar ocularmente que com os solventes acetato de etilo e acetato de butilo obtém-se mais resíduo seco do que com o hexano ou o heptano.

Desta forma, foram realizadas 4 extrações com acetato de butilo e 8 extrações com acetato de etilo o que perfaz um total de 12 extrações. Através de cálculos, foi possível estimar a quantidade de ácido ferúlico que foi extraída no total das extrações. Foi assim, estimada uma massa de 0,72 g, aproximadamente.

Uma vez realizada a extração e seco o solvente orgânico, este resíduo (rico em ácido ferúlico), foi dissolvido na solução aquosa de NaOH preparada. E juntou-se ainda 8 g/ L de glucose e 1 g/ L de levedura, perfazendo o volume pretendido, em cada um dos erlenmeyers, de 50 ml, o pH foi acertado para um valor de 8,2. De seguida, centrifuga-se a solução preparada para a remoção dos sólidos (4 424 g durante 20 min).

No final do procedimento, os 3 erlenmeyers são colocados numa incubadora com agitação a 200 rpm, a uma temperatura de 45 °C durante 24 horas.

2.2.5. Purificação e concentração da vanilina

2.2.5.1. Pré-purificação da vanilina por ultrafiltração

Para ultrafiltração foi utilizada a membrana GH. Este processo de ultrafiltração apresenta poros maiores que as membranas de osmose inversa, por exemplo, desta forma pretende-se avaliar a rejeição dos compostos da solução modelo ao realizar este ensaio. O objetivo é garantir que esta membrana permeia os fenólicos, concentrando as impurezas de maior dimensão. A temperatura de operação foi de 50 °C, a pressão de 5 bar e o fator de concentração foi 5 também.

2.2.5.2. Concentração da vanilina por osmose inversa com solução modelo e real

Após a solução modelo estar preparada e devidamente solubilizada, inicia-se o processo de purificação através de um processo de osmose inversa à temperatura ambiente e com um fator de concentração 5. As membranas utilizadas foram a SW 30 (pressão de operação de 40 bar) e BW 30 (pressão de operação de 35 bar). Pretende-se assim que estas membranas apresentem rejeições bastante elevadas aos compostos presentes nas soluções modelo, para garantir que é possível concentrar a vanilina.

Quando utilizada a solução real (caldo de fermentação) foi utilizada a membrana SW 30 que é aquela que apresenta uma maior rejeição aos compostos fenólicos. A pressão de operação foi a mesma que foi utilizada para processar a solução modelo (40 bar), assim como o fator de concentração foi também de 5. A diferença mais relevante deste processo foi a utilização de uma MetCell *cross-flow*. Ou seja, um sistema com recirculação, o que ajuda a evitar a colmatação da membrana.

2.2.5.3. Purificação com Extração líquido-líquido

A extração para a purificação da vanilina foi realizada da mesma forma que a extração realizada para a purificação das soluções modelo de ácido ferúlico. A única variável diferente é o pH.

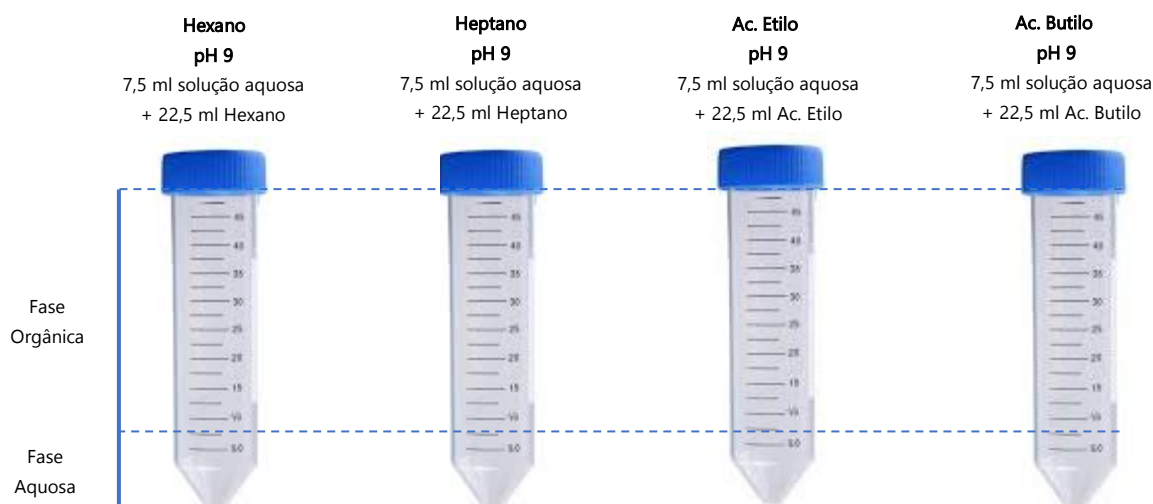


Figura 9 - Extração líquido-líquido para a purificação da vanilina

2.3. Métodos Analíticos

2.3.1. Quantificação de fenólicos

Em todas as experiências realizadas foram quantificados compostos fenólicos: vanilina, ácido vanílico, álcool vanílico e ácido ferúlico. A quantificação foi realizada através de HPLC equipada com um C18 (Nova-Pak) coluna de 3,9 mm x 150 mm (diâmetro de partículas de 4 mm) e coluna de guarda acoplada a um detetor PDA regulado para 280 nm. o volume injetado foi de 20 microlitros e a temperatura da coluna de 30. O ácido ferúlico foi analisado com um programa de eluição de gradiente ao caudal de 0,5 ml/ min. A fase móvel utilizou a mistura de 2 eluentes: o eluente A continha 10% (v/v) de metanol e 2% (v/v) de ácido acético em água Milli-Q; o eluente B continha 90% de metanol e 2% de ácido acético na água Milli-Q. O programa de eluição do gradiente foi de 0% B (0-10 min), de 0% a 15% B (10-25 min), de 15% a 50% B (25-35 min) e de 50% a 0% B (35-38 min).

2.3.2. Quantificação de ácido ferúlico e vanilina em soluções modelo

Às amostras recolhidas das extrações líquido-líquido realizadas com soluções modelo (com vanilina ou ácido ferúlico) a concentração de fenólicos foi obtida através da leitura da

absorvância com um espectrofotômetro a um comprimento de 280 nm (UV). Como este comprimento de onda se encontra na gama dos UV a célula utilizada para a leitura das amostras foi de quartzo. Antes da leitura da absorvância das amostras, foram realizadas retas de calibração para a vanilina e para o ácido ferúlico, separadamente. Todas as amostras foram diluídas de forma que as absorvâncias lidas pelo espectrofotômetro se encontrassem dentro dos valores mínimos e máximos das retas de calibração. Os brancos utilizados foram etanol absoluto e água destilada. O etanol foi utilizado como branco para a análise das amostras ressuspendidas em etanol absoluto. E a água destilada foi utilizada como branco para as amostras que se encontravam em solução aquosa.

2.4. Cálculos

i) Processos de Membranas

Para os processos de membranas (ultrafiltração e osmose inversa) é necessário calcular os pontos referidos em baixo de forma a tratar os resultados obtidos e retirar conclusões para os ensaios realizados.

Fator de concentração, FC

Com o decorrer do ensaio, seja de um processo de ultrafiltração ou de osmose inversa, é importante calcular o fator de concentração ao longo de todo ensaio. O fator de concentração indica quantas vezes se concentrou o retentado final, em relação à alimentação inicial.

$$FC = \frac{m_{FI}}{m_{FI} - m_P}$$

FC - Fator de concentração, adimensional

m_{FI} - Massa da alimentação inicial, g

m_P - Massa do permeado, g

Caudal volumétrico, Q_v

$$Q_v = \frac{V}{t}$$

Q_v - Caudal volumétrico, L/min

V - Volume, L

t - Tempo, min

Fluxo, J

$$J = \frac{Q_v}{A}$$

J - Fluxo, L/min

A - Área da membrana, m^2

Permeância membrana, Lp

A permeância da membrana é outro dos fatores que se mede ponto a ponto ao longo de todo o ensaio. Com o decorrer do ensaio, e com a alimentação a ficar cada vez mais concentrada, é natural que este valor vá diminuindo o seu valor.

$$P = \frac{V_p}{A \times t \times \Delta p}$$

P - Permeância, $L/m^2/h / bar$

V_p - Volume do permeado, L

A - Área da membrana, m^2

t - Tempo, h

Δp - Variação da pressão, bar

Permeabilidade Hidráulica da membrana tendo em conta a pressão osmótica, Lp

Neste caso, apresenta-se o cálculo da permeância com a contabilização do efeito da pressão osmótica na membrana. Quando há presença de sais na alimentação (solução real) este é um fator importante a ter em atenção e a contabilizar nos cálculos.

$$P = \frac{V_p}{A \times t \times (\Delta p - \pi)}$$

P - Permeância, $L/m^2/h / bar$

V_p - Volume do permeado, L

π - Pressão osmótica exercida, bar

Pressão Osmótica, π , bar

$$\pi = M * R * T * i$$

π - Pressão osmótica exercida, bar

M - Concentração molar, mol/L

T - Temperatura, K

i - Fator de Van'tt Hoff (adimensional)

Rejeição de cada composto pela membrana (através da concentração), $R(\%)$

$$R_c(\%) = \left(1 - \frac{C_{PFG}(t=t_{final})}{C_{FF}(t=t_{final})} \right) \times 100$$

$R_c(\%)$ - Rejeição calculada através da concentração, %

$C_{PFG}(t=t_{final})$ - Concentração do permeado final global, mg/L

$C_{FF}(t=t_{final})$ - Concentração da alimentação final, mg/L

Rejeição de cada composto pela membrana (através da massa), $R(\%)$

$$R_m(\%) = \left(1 - \frac{m_{ads}(t=t_{final}) + m_{PFG}(t=t_{final})}{m_{FI}} \right) \times 100$$

$R_m(\%)$ - Rejeição calculada através da massa, %

m_{FI} - Massa do composto na alimentação inicial, g

$m_{PFG}(t=t_{final})$ - Massa do composto no permeado final global, g

$m_{ads}(t=t_{final})$ - Massa do composto adsorvido pela membrana, g

Massa de composto adsorvido, m_{ads} , g

$$m_{FI} = m_{FF} + m_{PFG} + m_{ads}$$

$$m_{ads} = m_{FI} - (m_{PFG} + m_{FF})$$

m_{ads} - Massa de composto adsorvido, g

m_{FI} - Massa de alimentação inicial, g

m_{PFG} - Massa de permeado final global, g

m_{FF} - Massa de alimentação final, g

Recuperação de compostos, Recuperação (%)

$$\text{Recuperação}(\%) = \frac{\text{massa}_{\text{purificado}}}{\text{massa}_{\text{alimentação}}} \times 100$$

$\text{massa}_{\text{purificado}}$ - Massa do composto purificado, g

$\text{massa}_{\text{alimentação}}$ - Massa do composto na alimentação, g

Balço de massa ao processo de membranas

$$\text{Entrada: } m_{in} = c_{FI,i} * m_{FI,i}$$

$$\text{Saída: } m_{out} = c_{FF,i} * m_{FF} + c_{PFG,i} * m_{PFG}$$

m_{in} - Massa de entrada no sistema, g

$c_{FI,i}$ - Concentração da alimentação inicial do elemento i , g/L

m_{FI} - Massa da alimentação inicial do elemento i , g

$c_{FF,i}$ - Concentração da alimentação final do elemento i , g/L

m_{FF} - Massa da alimentação final do elemento i , g

$c_{PFG,i}$ - Concentração do permeado final global do elemento i , g/L

m_{PFG} - Massa do permeado global final do elemento i , g

m_{out} - Massa de saída do sistema, g

ii) **Extração Líquido-Líquido**

No caso da extração líquido-líquido aquilo que foi estudado foram essencialmente os rendimentos para cada um dos solventes. Ou seja, quanto do composto em estudo é que consegue passar para a fase orgânica.

Rendimento da extração, *Rendimento*, %

$$\text{Rendimento, \%} = \frac{\text{massa re-suspendida em Etanol}}{\text{massa fase aquosa}} \times 100$$

massa re-suspendida em Etanol - Massa do composto i presente no etanol, g

massa fase aquosa - Massa do composto i presente na fase aquosa, g

DMONSTRAÇÃO DE RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Separação do ácido ferúlico do arabinoxilano

De forma a retirar os arabinoxilanos do ácido ferúlico, obtido através da extração alcalina, foi realizada uma ultrafiltração com uma membrana UP 150. Foram realizados dois ensaios: o primeiro com um volume inicial de extrato de 5 L (ensaio 1) e o segundo ensaio com um volume de extrato de 4 L (ensaio 2). Como referido anteriormente, a membrana foi compactada antes da realização do ensaio, em que os fluxos de ambas as membranas utilizadas foram devidamente estabilizados.

Ao longo dos ensaios foi medida a permeância da membrana. Uma vez que, se trata do processamento de um extrato real é natural que haja sempre alguma acumulação na membrana que afete o seu desempenho ao longo do processo. Desta forma, é possível observar que no seguinte gráfico as permeâncias das membranas para ambos os ensaios decrescem ao longo do tempo.

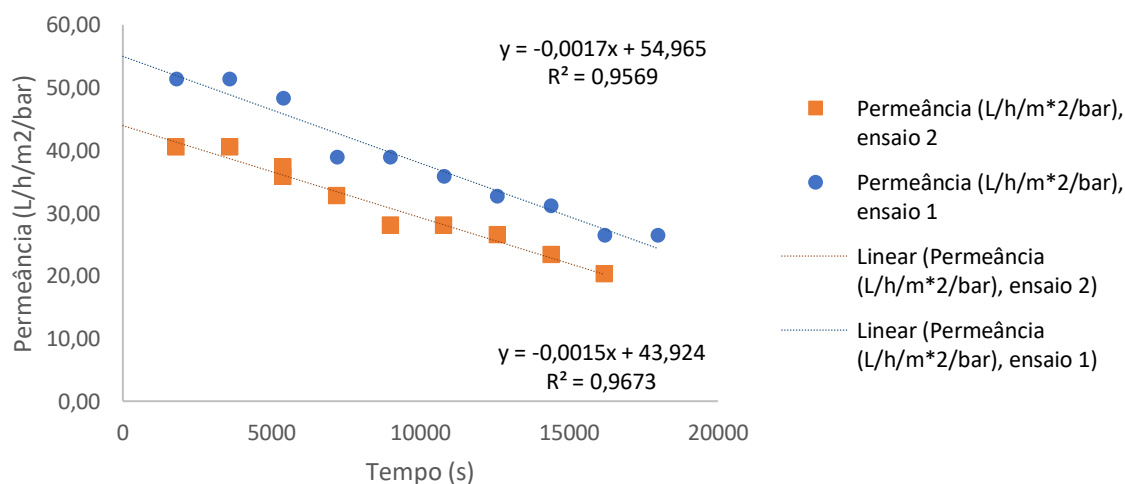


Figura 10 - Variação da permeância da membrana UP 150 nos ensaios de purificação do ácido ferúlico com extrato alcalino

Como se pode observar ambas as retas apresentam um comportamento muito semelhante.

Uma vez terminado o ensaio, o permeado final global corresponde ao extrato rico em ácido ferúlico, e o retentado final (FF, ou alimentação final) corresponde ao extrato rico em arabinoxilanos. E assim se pode determinar a rejeição da membrana UP 150 ao ácido ferúlico, assim como a recuperação deste composto no permeado final global.

Tabela 4 - Balanço de massa, rejeição e recuperação para o ensaio 1 com a membrana UP 150

| UP 150, Ensaio 1 | Ácido Ferúlico |
|---|-----------------------|
| m Alimentação Inicial, mg | 8 241,56 |
| m Permeado Final Global, mg | 6 738,42 |
| m Retentado Final, mg | 1 374,879 |
| m em Solução no Retentado Final, % | 17% |
| m Adsorvido, mg | 128,25 |
| m Adsorvido, % | 1,56% |
| Rejeição, % | 18,24% |
| Recuperação, % | 81,76% |

Tabela 5 - Balanço de massa, rejeição e recuperação para o ensaio 2 com a membrana UP 150

| UP 150, Ensaio 2 | Ácido Ferúlico |
|--|-----------------------|
| m Alimentação Inicial, mg | 10 162,33 |
| m Permeado Final Global, mg | 7 305,46 |
| m Retentado Final, mg | 1 390,65 |
| m em Solução no Retentado Final | 13,68% |
| m Adsorvido, mg | 1 466,22 |
| m Adsorvido, % | 14,43% |
| Rejeição, % | 28% |
| Recuperação, % | 72% |

Como se pode observar na tabela em cima, a membrana UP 150 tem uma percentagem de rejeição ao ácido ferúlico baixa, ou seja, deixa que este permeie pela membrana. Desta forma, a recuperação deste composto faz-se no permeado global, como mencionado anteriormente. Temos assim para os dois ensaios uma rejeição média de 23 % \pm 0,05 e uma recuperação média de 77 % \pm 0,05 tendo em conta um fator de concentração 5. Adicionalmente, observa-se que no ensaio 1 a rejeição foi inferior à do ensaio 2, e que a recuperação foi superior à do ensaio 2. Desta forma, existe uma relação entre estas duas variáveis. Quanto maior a rejeição, menor a recuperação - como a rejeição é maior não permeia tanto composto pela membrana, e assim a recuperação no permeado global não vai ser tão elevada (no caso do composto de interesse se encontrar no permeado global).

Nas tabelas apresentam-se ainda os balanços mássicos para o ácido ferúlico, para ambos os ensaios. O balanço mássico tem ligeiras discrepâncias entre a massa inicial e final de ácido ferúlico presente, devido a uma pequena percentagem que é adsorvida pela membrana. Como se pode observar a massa de ácido ferúlico, em ambos os casos, é bastante superior no permeado global total.

Adicionalmente, apresenta-se ainda a figura em baixo, que mostra a variação da permeância da membrana com o fator de concentração. Apesar de se ter tentado alcançar um fator de concentração 5 não foi possível fazê-lo devido à viscosidade que o extrato apresentava:

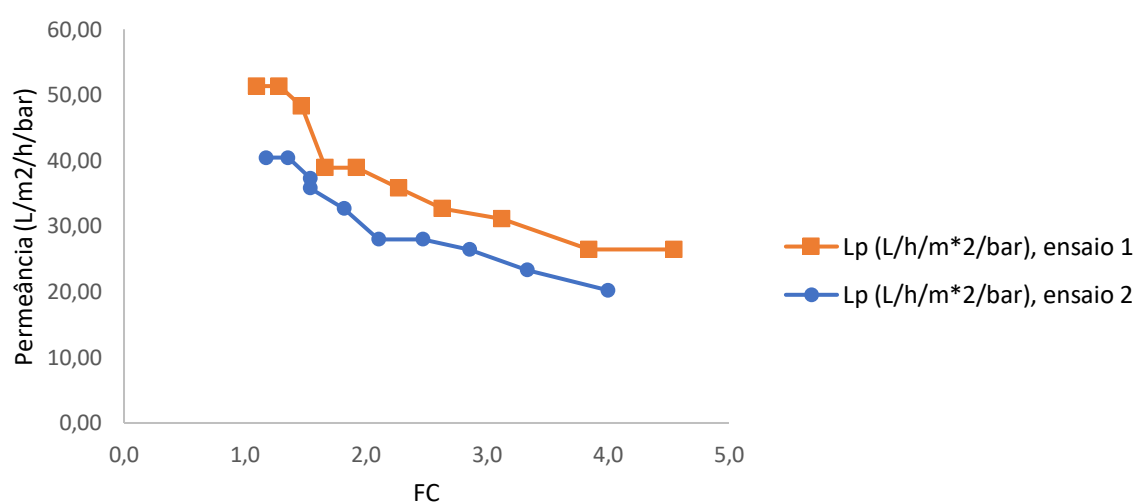


Figura 11 - Variação da permeância com o fator de concentração para a ultrafiltração com a membrana UP 150

3.2. Purificação do ácido ferúlico

- Solução modelo

A extração líquido-líquido para a purificação do ácido ferúlico contou com uma solução modelo com uma concentração de 3 g/ L em ácido ferúlico e uma razão fase aquosa - solvente orgânico de 1:3. O objetivo foi avaliar se através dos solventes utilizados, algum era seletivo para a recuperação deste composto e se seria possível obter uma pureza razoável através deste processo, de forma a evitar a utilização de resinas para a purificação do ácido ferúlico. Desta forma, através das leituras das absorvâncias com um espectrofotómetro a um comprimento de onda de 280 nm foi possível obter as concentrações de ácido ferúlico das fases aquosas e das resuspensões em etanol, para cada uma das extrações com os distintos solventes orgânicos.

A primeira fase contou com a realização de duas retas de calibração para o ácido ferúlico, uma para a fase aquosa, e outra para a ressuspensão em etanol, que se encontram nas seguintes figuras:

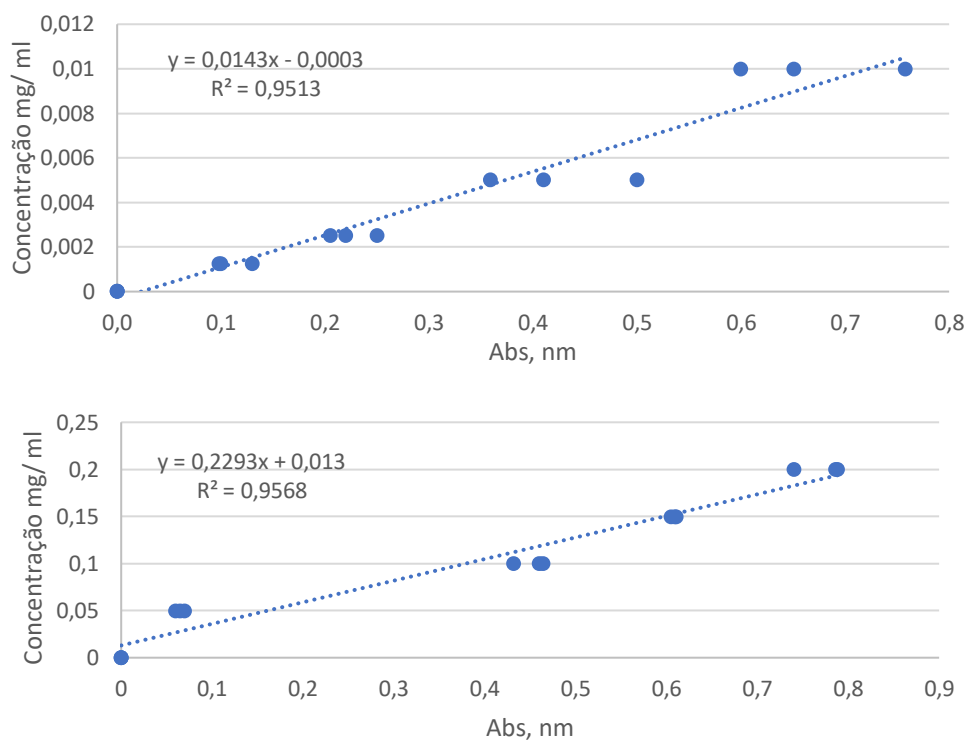


Figura 12 - Retas de calibração do ácido ferúlico em fase aquosa (em cima) e retas de calibração do ácido ferúlico em etanol (em baixo).

Após realizadas as retas de calibração, medem-se as absorvâncias das amostras para os diferentes ensaios, em que apenas se variou o solvente utilizado: as que estão em fase aquosa (que corresponde ao ácido ferúlico na solução modelo), e as que estão em etanol (que corresponde ao ácido ferúlico obtido depois de seco o solvente orgânico). Para que as leituras de absorvância sejam válidas têm de estar sempre entre os valores mínimo e máximo das retas de calibração.

Desta forma, foi calculado o rendimento de cada extração, de forma a avaliar qual o solvente mais seletivo para o ácido ferúlico:

Tabela 6 - Rendimento da Extração Líquido-Líquido para solução modelo de ácido ferúlico

| Solvente Orgânico | Rendimento da Extração, % |
|--------------------------|----------------------------------|
| Hexano | 10 % |
| Heptano | 1 % |
| Acetato de etilo | 39 % |
| Acetato de butilo | 150 % |

Como se pode observar para o ácido ferúlico, o hexano e o heptano não são os solventes indicados para a sua recuperação, devido ao baixo rendimento de extração de 10% e 1%, respetivamente. O mesmo não acontece com o acetato de etilo que já demonstra um rendimento bastante mais elevado. No entanto, continua a não ser um processo de purificação rentável devido ao rendimento apresentado de 39%. Em relação ao acetato de butilo, temos um resultado que não corresponde à realidade, uma vez que o valor do rendimento é superior que 100%. Após a obtenção deste valor, observou-se no espectrofotómetro que o acetato de butilo absorve a 280 nm (com branco de etanol). Mesmo depois de seco o solvente orgânico e obtido o ácido ferúlico, pode haver um pequeno conteúdo de acetato de butilo que se esteja a sobrepor à leitura de absorvância do ácido ferúlico, e que esteja assim a "mascarar" o composto que nos interessa extrair. No entanto, esta é uma teoria que não foi possível confirmar como sendo a razão deste valor de rendimento de 150%. Desta forma, a causa mais provável para a obtenção deste resultado é a imprecisão das retas de calibração obtidas para o ácido ferúlico em água e etanol.

3.3. Bioprocesso

3.3.1. Diálise

A diálise foi realizada com o objetivo de eliminar a cor do caldo de fermentação. A ideia inicial era que o ácido ferúlico, presente no caldo, permeasse pela manga de diálise, e que os compostos que dão cor ao caldo se mantivessem no seu interior. No entanto, não foram analisadas as amostras recolhidas, pois os resultados foram ocularmente observados. A cor do caldo de fermentação não reduziu após 4 dias de diálise. Mesmo tendo-se trocado a água que envolvia a manga de diálise por água limpa. Esta apresentou sempre coloração após alguns minutos. (Anexo A)

3.3.2. Testes Rápidos com ácido ferúlico proveniente de extração líquido-líquido com solução real

Os testes rápidos consistiram em observar se seria possível a produção de vanilina, com o ácido ferúlico obtido através da extração líquido-líquido realizada com solução real. De forma a avaliar a viabilidade dos testes foi calculado o consumo de ácido ferúlico, durante todo o processo, e também a produção de vanilina e de ácido vanílico. Após a análise de amostras e tratamento dos dados experimentais, não foi observada produção de vanilina, assim como também não foi observado consumo de ácido ferúlico. Desta forma, devido ao insucesso deste ensaio não foram colocados os resultados relativos aos testes rápidos.

3.4. Purificação e concentração da vanilina

3.4.1. Purificação da vanilina por ultrafiltração

Para a purificação da vanilina idealizou-se o processo de ultrafiltração com a membrana GH, com a solução modelo estipulada no capítulo 2 na tabela 2, que contém vanilina, ácido ferúlico, ácido vanílico e álcool vanílico. O objetivo deste processo de ultrafiltração é que os compostos fenólicos permeiem pela membrana, de forma a eliminar apenas os compostos de maior dimensão (presentes no caldo de fermentação). No entanto, a solução modelo apenas contém os fenólicos, e não os compostos de dimensões maiores, de forma a entender se seria possível obter um permeado final global rico em fenólicos, mas principalmente em vanilina, com a ajuda da membrana GH. Resumidamente, pretende-se obter valores de rejeição o menor possível para os compostos presentes na solução modelo.

Desta forma, começou por se compactar a membrana até que a sua permeabilidade hidráulica se encontrasse estável, tal como foi realizado na membrana UP 150. Depois de realizada a compactação da membrana, deu-se início ao ensaio com um banho térmico de 50 °C e a uma pressão de 5 bar, como mencionado anteriormente. Assim, resultou a seguinte informação relativa a este ensaio:

Tabela 7 - Balanço de massa e Rejeição por composto para o ensaio com a membrana GH

| Balanço, GH | Ácido Vanílico | Vanilina | Ácido Ferúlico |
|---|----------------|----------|----------------|
| m Alimentação Inicial, mg | 399,90 | 999,75 | 199,95 |
| m Permeado Final Global, mg | 227,69 | 660,25 | 102,12 |
| m Retentado Final, mg | 20,94 | 42,88 | 10,22 |
| m em solução no Retentado Final, % | 5,24% | 4,29% | 5,11% |
| m Adsorvido, mg | 151,28 | 296,61 | 87,61 |
| m Adsorvido, % | 37,83% | 29,67% | 43,81% |
| Rejeição, % | 43,06% | 33,96% | 48,93% |

Como se pode observar os valores de rejeição da membrana GH para os compostos apresentados na tabela não são rejeições baixas. Apesar de ser uma membrana de ultrafiltração, temos valores de rejeição consideravelmente elevadas. Estes valores provam que a membrana GH não permeia os compostos fenólicos como se tinha idealizado de início. A rejeição elevada dos compostos pode ser explicada por se estar a operar a uma pressão relativamente baixa e também por se estar a operar em fluxo frontal, o que não favorece a permeação dos compostos.

Como é possível observar pelos valores da tabela em cima, existe uma percentagem relativamente elevada de vanilina que foi adsorvida pela membrana (29,67%). O que reforça o facto desta substância não ter passado para o permeado, mas sim ter sido adsorvida. Facto que também pode ser explicado por se estar a operar em fluxo frontal. Desta forma, para o cálculo da recuperação da vanilina no retentado final, temos que: se contabilizarmos a massa de vanilina no retentado final mais a massa adsorvida pela membrana, o valor de recuperação obtido coincide com o valor de rejeição de 33,96%.

Através da figura representada em baixo é possível observar que foi possível atingir um fator de concentração 5, como pretendido. A permeância obtida para a membrana foi de 5,532 L/m²/h/bar, o que representa um valor dentro dos parâmetros normais para uma membrana de ultrafiltração, como é o caso.

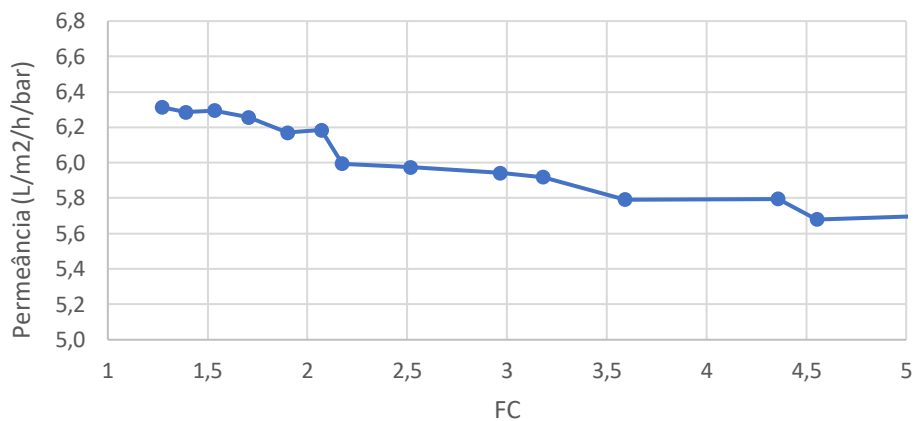


Figura 13 - Variação da permeância com o fator de concentração para a solução modelo operada com uma membrana GH

3.4.2. Concentração da vanilina por osmose inversa

- **Solução Modelo**

A vanilina foi concentrada através de um processo de osmose inversa, em que foi comparado o desempenho de duas membranas distintas (SW 30 e BW 30), com soluções modelo compostas por vanilina, ácido vanílico, álcool vanílico e ácido ferúlico, com as concentrações estipuladas anteriormente no capítulo 2 na tabela 2. Foram realizados 4 ensaios (2 ensaios para cada membrana mais um duplicado) em que o volume utilizado na MetCell de fluxo frontal foi de 200 ml com um pH de 8,2 ajustado com NaOH.

Como no processo de ultrafiltração, também na osmose inversa é necessário compactar as membranas. A compactação foi realizada por aproximadamente 2 horas com uma solução aquosa, também com pH de 8,2.

Na figura em baixo é possível observar dois exemplos de membranas compactadas, para uma SW 30 e uma BW 30. E como se pode observar a permeabilidade hidráulica estabiliza ao longo do tempo:

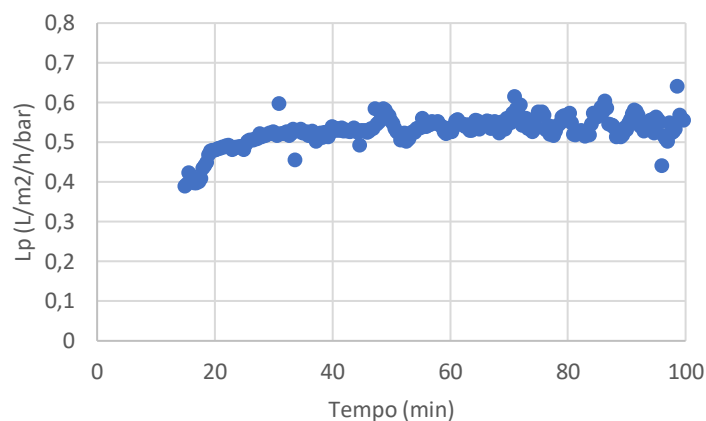


Figura 14 - Compactação da membrana SW 30 para osmose inversa de purificação de soluções modelo de vanilina

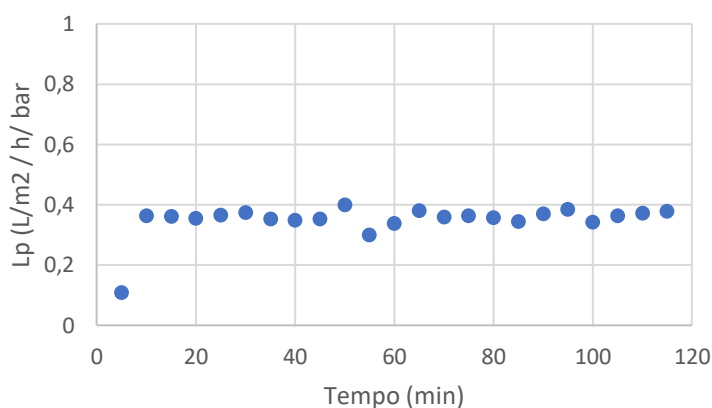


Figura 15 - Compactação da membrana BW 30 para osmose inversa de concentração de soluções modelo de vanilina

O objetivo do ensaio foi avaliar as rejeições dos compostos fenólicos em ambas as membranas de osmose inversa, e avaliar o seu desempenho, dizendo qual destas apresenta uma rejeição mais elevada à vanilina, ou seja, qual das membranas consegue concentrar mais eficazmente este composto, e adicionalmente, permear o ácido ferúlico e separá-lo dos compostos vanílicos. Desta forma, apresentam-se em baixo as tabelas que contemplam os balanços de massa e as rejeições por composto, após a realização dos 4 ensaios, para ambas as membranas:

Tabela 8 - Balanço de massa e Rejeição por composto para o ensaio com a membrana SW 30, com solução modelo

| Balanço, SW 30 | Álcool Vanílico | Ácido Vanílico | Vanilina | Ácido Ferúlico |
|------------------------------------|-----------------|----------------|----------|----------------|
| m Alimentação Inicial, mg | 200,00 | 400,00 | 1 000,00 | 200,00 |
| m Permeado Final Global, mg | 4,43 | 203,29 | 360,19 | 31,63 |
| m Retentado Final, mg | 101,22 | 197,61 | 351,75 | 31,63 |
| m em Solução no Retentado Final, % | 50,61% | 49,40% | 35,17% | 15,81% |
| m Adsorvido, mg | 94,35 | - | 288,07 | 136,75 |
| m Adsorvido, % | 47,18% | - | 28,81% | 68,37% |
| Rejeição, % | 97,79% | 49,18% | 63,98% | 84,19% |

Tabela 9 - Balanço de massa e Rejeição por composto para o ensaio com a membrana SW 30 (duplicado), com solução modelo

| Balanço, SW 30 (duplicado) | Álcool Vanílico | Ácido Vanílico | Vanilina | Ácido Ferúlico |
|------------------------------------|-----------------|----------------|----------|----------------|
| m Alimentação Inicial, mg | 200,00 | 400,00 | 1 000,00 | 200,00 |
| m Permeado Final Global, mg | 6,98 | 77,24 | 308,96 | - |
| m Retentado Final, mg | 149,06 | 75,11 | 298,20 | - |
| m em Solução no Retentado Final, % | 74,53% | 18,78% | 29,82% | - |
| m Adsorvido, mg | 43,96 | 247,65 | 392,83 | 200,00 |
| m Adsorvido, % | 21,98% | 61,91% | 39,28% | 100,00% |
| Rejeição, % | 96,51% | 80,69% | 69,10% | 100,00% |

Tabela 10 - Balanço de massa e Rejeição por composto para o ensaio com a membrana BW 30, com solução modelo

| Balanço, BW 30 | Álcool Vanílico | Ácido Vanílico | Vanilina | Ácido Ferúlico |
|------------------------------------|-----------------|----------------|----------|----------------|
| m Alimentação Inicial, mg | 200,00 | 400,00 | 1 000,00 | 200,00 |
| m Permeado Final Global, mg | 3,55 | 218,79 | 372,94 | - |
| m Retentado Final, mg | 108,30 | 214,47 | 368,05 | - |
| m em Solução no Retentado Final, % | 54,15% | 53,62% | 36,81% | - |
| m Adsorvido, mg | 88,16 | - | 259,01 | 200,00 |
| m Adsorvido, % | 44,08% | - | 25,90% | 100,00% |
| Rejeição, % | 98,23% | 45,30% | 62,71% | 100,00% |

Tabela 11 - Balanço de massa e Rejeição por composto para o ensaio com a membrana BW 30

(duplicado), com solução modelo

| Balanço, SW 30 | Álcool Vanílico | Ácido Vanílico | Vanilina | Ácido Ferúlico |
|---|-----------------|----------------|----------|----------------|
| m Alimentação Inicial, mg | 200,00 | 400,00 | 1 000,00 | 200,00 |
| m Permeado Final Global, mg | 18,59 | 84,94 | 304,78 | - |
| m Retentado Final, mg | 148,89 | 76,51 | 278,67 | - |
| m em Solução no Retentado Final, % | 74,45% | 19,13% | 27,87% | 0,00% |
| m Adsorvido, mg | 32,52 | 238,55 | 416,55 | 200,00 |
| m Adsorvido, % | 16,26% | 59,64% | 41,66% | 100,00% |
| Rejeição, % | 90,70% | 78,77% | 69,52% | 100,00% |

Desta forma, é possível observar que a rejeição média para a vanilina para a membrana SW 30 é de $67\% \pm 0,03$ e para a membrana BW 30 é de $66\% \pm 0,03$. Ambas as membranas apresentam um desempenho bastante semelhante na retenção deste composto. No entanto, para o ácido ferúlico não se esperavam valores de rejeição tão elevados. Uma vez que o objetivo era permear este composto e separá-lo da vanilina. Inicialmente, esperavam-se valores de rejeição mais elevados para a vanilina. O facto de não se terem obtido percentagens mais elevadas de rejeição, pode ser devido ao facto de se ter operado em fluxo frontal, e não em fluxo tangencial.

Em termos de massa adsorvida de vanilina, temos que uma parte considerável deste composto fica adsorvido na membrana. A adsorção média para a vanilina na membrana SW 30 é de $34\% \pm 0,05$, enquanto para a membrana BW 30 a adsorção média é de $34\% \pm 0,08$. Desta forma, pode-se afirmar que ambas adsorveram a vanilina na mesma medida.

Em relação à recuperação da vanilina no retido final, temos a mesma situação relativa à membrana GH: se contabilizarmos a massa do retido final mais a massa adsorvida na membrana, o valor da recuperação obtido vai coincidir com o valor de rejeição apresentado. Este facto é relevante, se houver alguma forma de recuperar a quantidade de vanilina que fica adsorvida na membrana. Caso não seja possível recuperar a quantidade adsorvida na membrana, o processo fica comprometido, na medida em que a percentagem recuperada seria apenas a quantidade de composto que se encontra em solução no retido final, que não representa uma percentagem elevada.

Como representado na seguinte figura, observa-se que foi possível atingir um fator de concentração 5 para a purificação das soluções modelo de vanilina. A permeância desce em todos os casos à medida que se avança no trabalho experimental. A permeância diminui ao longo dos ensaios, pois torna-se cada vez mais difícil permear a solução à medida que a alimentação vai ficando mais concentrada em solutos.

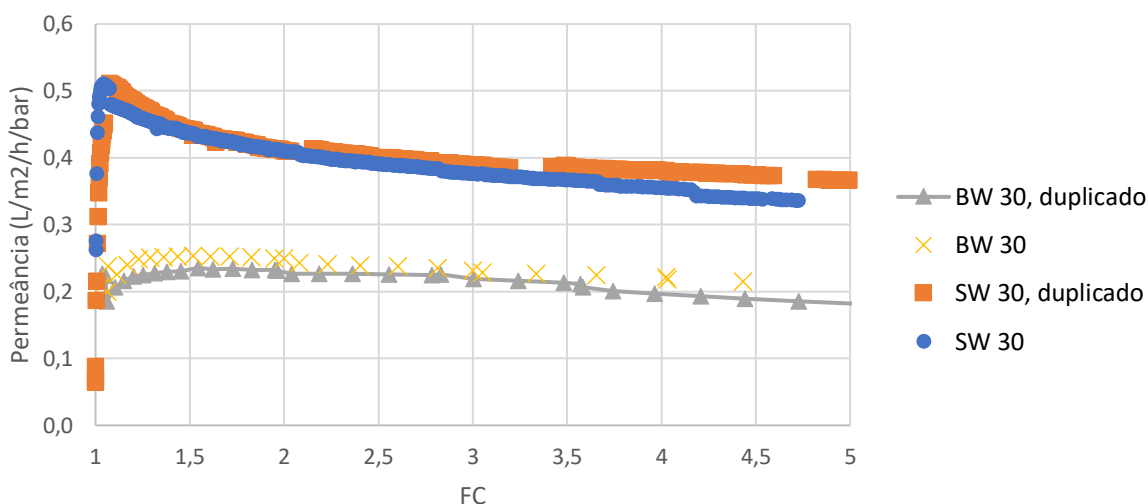


Figura 16 - Variação da Permeância das membranas SW 30 e BW 30 com o fator de concentração.

- **Solução Real**

Como mencionado no capítulo anterior, a solução real (caldo de fermentação) foi processada por uma membrana SW 30, com a diferença de que foi utilizada uma METcell *cross-flow*, de forma a evitar possíveis efeitos de *fouling* da membrana.

Antes do início do ensaio, compactou-se a membrana com água, como realizado anteriormente. Pretendeu-se assim avaliar se a rejeição da membrana aos compostos fenólicos era tão elevada como na solução modelo, desta forma apresentam-se o balanço de massa e os valores de rejeição apresentados para os seguintes compostos:

Tabela 12 - Balanço de massa e Rejeição por composto para o ensaio com a membrana SW 30, com solução real

| Balanço, SW 30 (real) | Vanilina | Ácido Ferúlico |
|------------------------------------|----------|----------------|
| m Alimentação Inicial, mg | 911,97 | 49,84 |
| m Permeado Final Global, mg | 2,44 | 2,20 |
| m Retentado Final, mg | 239,77 | 10,79 |
| m em Solução no Retentado final, % | 26,29% | 21,65% |
| m Adsorvido, mg | 669,76 | 36,85 |
| m Adsorvido, % | 73,44% | 73,94% |
| Rejeição, % | 99,73% | 95,59% |

Pelos valores podemos observar que a rejeição à vanilina foi mais elevada do que aquela obtida para os ensaios com solução modelo para as membranas SW 30 e BW 30. Este é um valor muito positivo, uma vez que se obtém a confirmação de que é possível concentrar o caldo de fermentação em vanilina com a membrana SW 30. No entanto, grande parte da

massa que se encontra no retentado final está adsorvida (73,44%), pelo que o valor de rejeição à vanilina de 99,73% tem apenas relevância se for possível recuperar a quantidade de vanilina que está adsorvida na membrana, uma vez que a vanilina que se encontra efetivamente em solução na vanilina é de 26,29%. No entanto, a rejeição para o ácido ferúlico encontra-se também bastante elevada, o que significa que este composto não permeia pela membrana, encontrando-se praticamente todo o ácido ferúlico presente no retentado final, grande parte dele também adsorvido. A pressão de operação poderia ser aumentada de forma a observar se seria possível fazer com que o ácido ferúlico permeasse.

As duas figuras que se encontram em baixo reforçam a adsorção que ocorre na membrana pelo ácido ferúlico e pela vanilina. As concentrações dos compostos no permeado a cada fator de concentração deveriam aumentar. O ácido ferúlico, cuja concentração diminui ligeiramente ao longo do ensaio no permeado, reforça a percentagem elevada de massa deste composto que é adsorvida (73,94%). Para a vanilina a variação da concentração com o fator de concentração não é constante e aumenta apenas ligeiramente relativamente ao fator de concentração 2, no fator de concentração 5. Comprovando assim a forte adsorção que ocorre na membrana (73,44% de massa adsorvida).

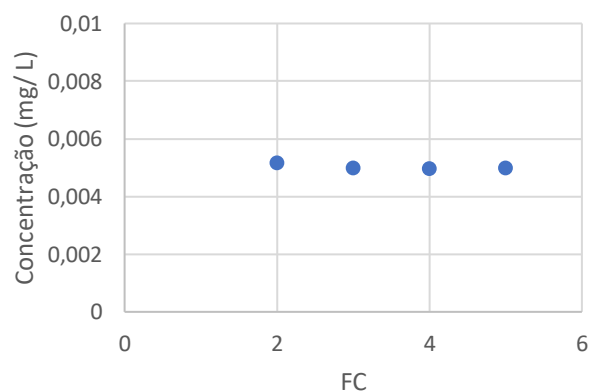


Figura 17 - Variação da concentração do ácido ferúlico com o fator de concentração

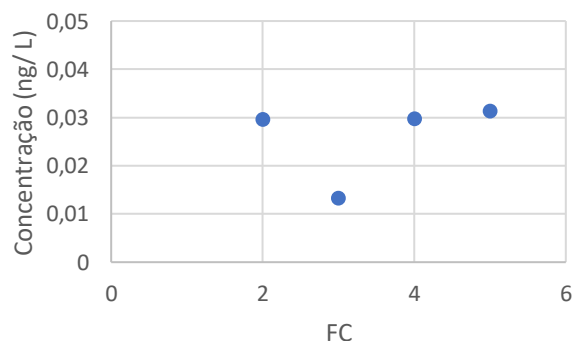


Figura 18 - Variação da concentração da vanilina com o fator de concentração

A figura em baixo, demonstra que apesar da viscosidade do caldo de fermentação, é possível alcançar um fator de concentração de 5. O cálculo da permeância contempla o efeito da pressão osmótica. Foi necessário o cálculo da pressão osmótica, uma vez que a solução real apresenta sais na sua constituição. Para o cálculo da pressão osmótica foi assumida uma rejeição de 100% pela membrana a estes sais, ou seja, a sua concentração molar inicial sobe proporcionalmente ao fator de concentração, ao longo de todo o ensaio. E como se pode observar a curva da permeância sobe, o que não é possível. No capítulo da conclusão irá ser explicada a razão deste acontecimento.

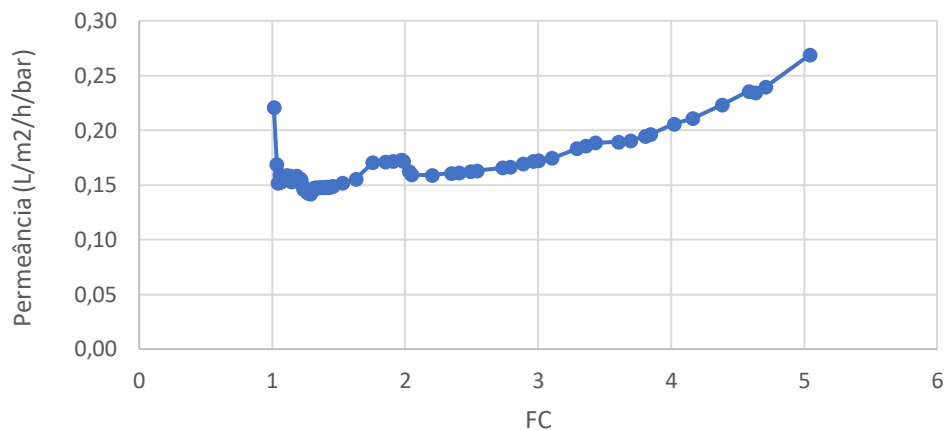


Figura 19 - Variação da permeância da membrana SW 30 com o fator de concentração para a solução real, tendo em conta a pressão osmótica

3.4.3. Purificação da vanilina por Extração Líquido-Líquido

De forma a purificar a vanilina, um dos objetivos seria realizar processos de extração líquido-líquido após os processos membranares de forma a precipitar a vanilina e obter um composto o mais puro possível ($\geq 99\%$). Por esta razão, foram feitas extrações líquido-líquido com soluções modelo apenas com vanilina, de forma a verificar se algum dos solventes utilizados era seletivo para a vanilina. Assim, através da leitura com um espectrofotómetro a um comprimento de onda de 280 nm foram estimadas as concentrações presentes nas fases aquosas e nas ressusensões em etanol.

A primeira fase foi realizar duas retas de calibração para a vanilina, uma para a fase aquosa, e outra para a vanilina em etanol, que se encontra na seguinte figura:

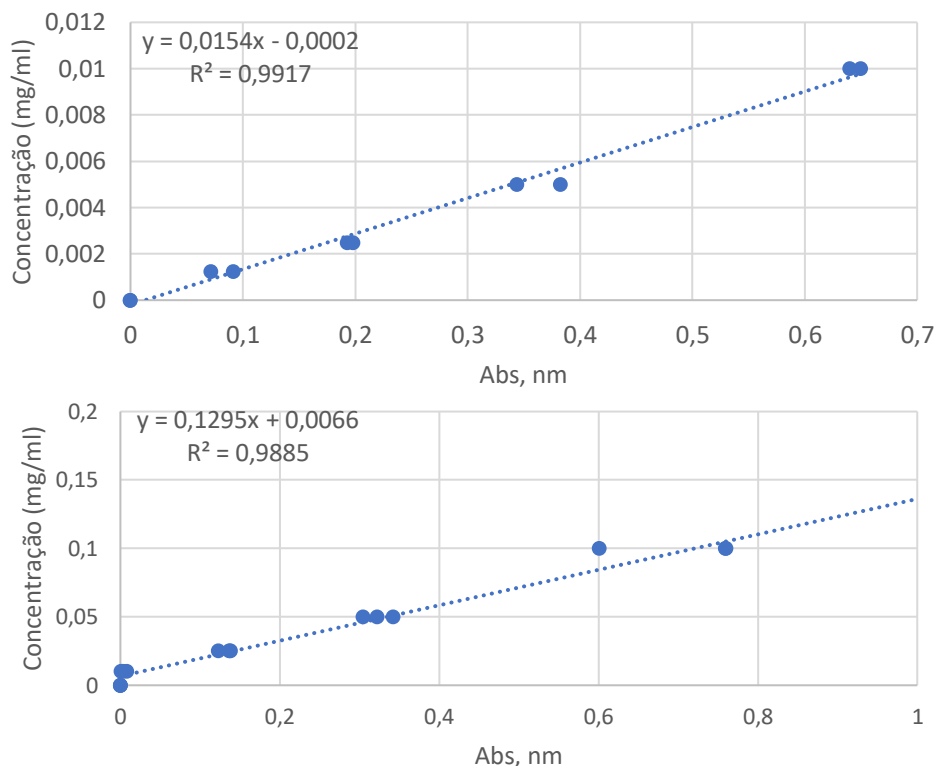


Figura 20 - Retas de calibração para a vanilina em fase aquosa (em cima) e retas de calibração para a vanilina em etanol (em baixo)

Após as retas de calibração mede-se a absorvância das amostras no espectrofotômetro, fazendo sempre as devidas diluições, para que estas leituras de absorvância se encontrem sempre dentro dos valores de mínimo e máximo das retas de calibração. Assim, foi calculado o rendimento de cada extração, para cada solvente orgânico:

Tabela 13 - Rendimento da extração líquido-líquido para a solução modelo de vanilina

| Solvente Orgânico | Rendimento da Extração, % |
|--------------------------|----------------------------------|
| Hexano | 7,80 % |
| Heptano | 9,36 % |
| Acetato de etilo | 122,07 % |
| Acetato de butilo | 39,87 % |

A vanilina apresenta-se mais solúvel que o ácido ferúlico no hexano e no heptano com um rendimento de extração de 7,8% e de 9,36%, respetivamente. No entanto, apesar do rendimento ser mais elevado, os valores são muito baixos, o que significa que pouca quantidade de vanilina passa da fase aquosa para o solvente orgânico, o que faz com que estes solventes não sejam indicados para a extração deste composto. Em relação ao acetato de butilo, chegamos a um rendimento de 39,87% sendo este o valor mais elevado (com valor

científico) que se obteve, pelo que este é o solvente com uma maior capacidade para a recuperação da vanilina. Em relação ao acetato de etilo, o rendimento é superior a 100% o que não é possível, assim como aconteceu com a extração líquido-líquido do ácido ferúlico. Desta forma, a explicação é a mesma que foi dada anteriormente, as retas de calibração quer para a fase aquosa como para o etanol, apresenta uma grande variabilidade de valores de absorvância para a mesma concentração.

CONCLUSÃO E TRABALHO FUTURO

4.1. Separação dos arabinosídeos do ácido ferúlico

O método utilizado para a separação do ácido ferúlico dos arabinosídeos é uma ultrafiltração com uma membrana Nadir UP 150. Este método já tinha sido testado anteriormente como um processo bem sucedido para esta separação, o que se comprovou neste trabalho. A membrana apresenta uma alta permeabilidade (baixa rejeição), ao ácido ferúlico de $23\% \pm 0,05$.

Ao se obter um permeado rico em ácido ferúlico, e para a sua posterior purificação, facilitaria se este se encontrasse mais concentrado. Assim, no futuro, seria uma hipótese após o processo de ultrafiltração, realizar um processo de osmose inversa de forma a concentrar o extrato em ácido ferúlico.

4.2. Purificação do ácido ferúlico

A purificação do ácido ferúlico foi realizada através de uma extração líquido-líquido com soluções modelo e solução real (extrato alcalino livre de arabinosídeos e concentrado). Este processo de extração tinha como objetivo passar o ácido ferúlico para a fase orgânica, secar a fase orgânica (imiscível em água) e obter o ácido ferúlico puro no estado sólido. Desta forma, o parâmetro em estudo foi a seletividade dos solventes orgânicos para o ácido ferúlico.

Em termos da solução modelo, foram obtidos rendimentos bastante baixos para a extração com o hexano e o heptano (10% e 1%, respetivamente). No caso do acetato de etilo e do acetato de butilo, os rendimentos foram de 39% e 150%, respetivamente. Estes resultados não foram muito positivos e não são fiáveis, uma vez que as retas de calibração apresentam muita incerteza e disparidade nos pontos. No entanto, pode-se concluir que se obtiveram melhores rendimentos de extração para o acetato de etilo e butilo. Como futuro, as amostras relativas a extração líquido-líquido deve ser analisadas por HPLC para uma maior segurança dos resultados.

Futuramente, existem duas vias possíveis para a purificação do ácido ferúlico. A primeira é a procura de solventes orgânicos que sejam seletivos para este composto, mas que não sejam seletivos para as impurezas presentes no extrato alcalino (como o furfural, o hidroximetilfurfural, o ácido acético, entre outros), o que requer um estudo profundo das solubilidades dos compostos presentes no extrato em solventes orgânicos. E a segunda via, é optar pela utilização das resinas que já foi comprovado como sendo um processo eficaz na purificação do ácido ferúlico com um elevado grau de eficácia, apesar dos elevados custos operacionais.

4.3. Bioprocesso

Como mencionado anteriormente a diálise não foi bem sucedida, uma vez que a água que envolvia a manga de diálise apresentava sempre coloração após pouco tempo. Em termos de prospeções para trabalho futuro é importante analisar aprofundadamente quais são os compostos que atribuem cor ao caldo, de forma a estudar uma forma de os retirar, para que se possa obter um produto final (vanilina) com o seu aspeto normal: sólido branco. Dependendo do tamanho das impurezas presentes no caldo de fermentação, poder-se-ia optar por processos com membranas.

Em relação aos testes rápidos realizados com o ácido ferúlico proveniente da extração líquido-líquido de soluções reais, foi possível observar que não houve conversão do ácido ferúlico em vanilina através da *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116. A não conversão do substrato deu-se provavelmente devido à baixa concentração obtida na extração líquido-líquido em ácido ferúlico, que afetou a sua conversão em vanilina.

4.4. Purificação e concentração da Vanilina

4.4.1. Purificação da vanilina por ultrafiltração

Em relação ao processo de ultrafiltração realizado com a membrana GH, não se esperavam rejeições tão elevadas para os fenólicos. O propósito deste ensaio era observar que os fenólicos eram capazes de permear, e que a rejeição pela membrana a estes compostos era baixa, de forma a reter apenas os compostos de grandes dimensões presentes no caldo de fermentação. Desta forma, para este efeito os resultados do ensaio não foram positivos, uma vez que os fenólicos apresentaram uma rejeição relativamente elevada, para aquilo que se pretendia. A rejeição à vanilina foi de 33,96% e de 48,93% para o ácido ferúlico. De futuro, poderia ser útil avaliar os resultados utilizando uma MetCell *cross-flow*, nas mesmas condições

e observar se os compostos fenólicos teriam uma menor percentagem de rejeição e também uma menor percentagem de adsorção. Adicionalmente, um processo de diafiltração poderia ser interessante, de forma a forçar a permeação dos fenólicos pela membrana, no entanto este processo apresenta a desvantagem do permeado global total ficar bastante diluído no final do ensaio, o que implicaria concentrar uma quantidade considerável o permeado final por osmose inversa.

4.4.2. Concentração da vanilina por osmose inversa

Em relação aos resultados obtidos na osmose inversa com soluções modelo, temos que foram realizados ensaios com as membranas SW 30 e BW 30, em que as rejeições apresentadas por ambas as membranas à vanilina foram bastantes próximas, apresentando valores de $67\% \pm 0,03$ e $66\% \pm 0,03$, respetivamente. Estes valores de rejeição são já algo elevados, e representam resultados positivos. Com a otimização das condições do processo, como trabalho futuro, estes valores de rejeição podem vir a ser mais elevados.

No entanto, em relação ao ácido ferúlico a rejeição foi ainda mais elevada do que em relação à vanilina, com uma rejeição de aproximadamente $93\% \pm 0,08$ para a SW 30 e de 100% para a membrana BW 30, este resultado pode ter sido atingido devido ao facto da solução modelo se encontrar a pH de 8,2, em que o ácido ferúlico se encontra ionizado em grande parte. Este ensaio não foi bem sucedido em parte, visto que, para além de ter como objetivo concentrar a vanilina, também se esperava que através da osmose inversa fosse possível separar o ácido ferúlico dos compostos vanílicos. Adicionalmente, também para o ácido ferúlico a adsorção foi bastante elevada.

Logo, como trabalho futuro poderia ser interessante fazer o mesmo ensaio operando com uma MetCell *cross-flow*. No caso da membrana SW 30 este estudo pode ser realizado a pressões mais elevadas do que 40 bar (limite de pressão de operação da SW 30 é de 69 bar), e seria interessante observar se desta forma o ácido ferúlico conseguiria permear. A MetCell *cross-flow* também poderia ter impacto na diminuição de adsorção de compostos pela membrana.

Ao processar a solução real pela membrana SW 30 numa MetCell *cross-flow* (fluxo tangencial) a rejeição à vanilina aumenta substancialmente o seu valor para uma rejeição de 99,73% o que representa uma percentagem bastante elevada, que era o principal objetivo deste ensaio. No entanto a recuperação da vanilina no retentado final apresenta um obstáculo. Ao longo do ensaio a vanilina existente na alimentação inicial permanece praticamente toda no retentado final, mas muita desta fica adsorvida na membrana (73,44%). A dessorção da vanilina da membrana é essencial para que a sua recuperação seja tão elevada quanto a sua rejeição. É possível observar que a vanilina concentra bastante. O mesmo acontece com o ácido ferúlico que apresenta um valor de rejeição bastante elevado (95,59%), apresentando-

se assim praticamente na sua totalidade no retentado final e adsorvido (73,94%), como a vanilina.

De forma a otimizar este processo é essencial a recuperação da massa de vanilina adsorvida pela membrana. Assim, no futuro analisar as membranas seria um passo importante a acrescentar ao processo, e determinar também uma forma de dessorver estes compostos com um solvente seletivo para a vanilina.

Por último, em relação à pressão osmótica do ensaio, podemos concluir que o cálculo (realizado da única forma possível tendo em atenção a informação disponível) considerou que as membranas têm retenção de 100% a todos os iões, o que representa uma aproximação exagerada. Desta forma, não se pode concluir com toda a segurança sobre a ocorrência de fouling. Pode ter ocorrido fouling, mas o cálculo sobrestimado da permeância sobrepõe-se. Em todo o caso, os resultados sugerem que o fouling poderá não ter sido muito severo (uma vez que, se fosse muito severo, a permeância desceria ao longo da concentração, mesmo com a forma como os cálculos foram realizados).

Em termos de trabalho futuro, o maior obstáculo é a adsorção de vanilina que ocorre por parte da membrana. Como mencionado anteriormente, para as soluções modelo processadas com as membranas SW 30 e BW 30, deveria ser realizada uma análise às membranas após o ensaio de forma a observar se a quantidade de vanilina traduzida nos cálculos se encontra realmente adsorvida. Após esta verificação, o próximo passo seria tentar retirar a vanilina que se encontra adsorvida, tentando dissolvê-la em água (cuja solubilidade é de 10 g/ L). Para trabalho futuro, seria também importante refletir numa forma de separar a vanilina do ácido ferúlico, visto que ficou comprovado que por osmose inversa com a membrana SW 30 não é possível. Adicionalmente, processar o caldo real por GH (processo de ultrafiltração) seria outra das etapas importantes a realizar futuramente de forma a observar se as macromoléculas presentes no caldo ficariam retidas, deixando permear os compostos vanílicos.

4.4.3. Purificação da vanilina por extração líquido-líquido

A extração líquido-líquido apresentou o mesmo obstáculo para a purificação da vanilina que apresentou para a purificação do ácido ferúlico. Através dos ensaios com solução modelo, depois de seco o solvente orgânico, obteve-se resíduo (vanilina) para todos os solventes (Anexo B). As conclusões retiradas foi a não seletividade do hexano e do heptano para a vanilina (os rendimentos foram bastante baixos: 7,8 % e 9,36 %, respetivamente). Para o acetato de etilo foi obtido um rendimento de 39,87% e para o acetato de etilo o rendimento é superior a 100%, o que não é possível. Através deste último resultado, pode-se dizer que as retas de calibração, utilizadas para analisar as amostras retiradas (fase aquosa e ressuspensão em etanol), não eram suficientemente precisas, e que de uma próxima vez, seria mais

vantajoso analisar as amostras através de HPLC para fenólicos, não estando assim dependente desta imprecisão das retas.

Adicionalmente, no futuro, poderiam ser realizadas mais extrações líquido-líquido com diferentes solventes avaliando a seletividade de cada um deles para a vanilina. Assim como, também poderia ser uma mais valia, após o caldo de fermentação ser processado por membranas e realizada a extração líquido-líquido, tentar precipitar a vanilina alterando o pH ao caldo e observar se esta precipita, e se seria possível separa a vanilina do ácido ferúlico desta forma.

BIBLIOGRAFIA

1. Dausch A, Pastore G. Production of vanillin: A biotechnological opportunity. *Quim Nova*. 2005;28(4):642-645. doi:10.1590/s0100-40422005000400017
2. Valério R, Bernardino ARS, Cristiana , et al. Feeding strategies to optimize vanillin production by *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116. 1:3. doi:10.1007/s00449-020-02482-7
3. COPAM - Companhia Portuguesa de Amidos. Accessed May 3, 2021. <http://www.copam.pt/#>
4. *FICHA DE INTERNACIONALIZAÇÃO MILHO CENÁRIO DE ANTECIPAÇÃO*.
5. Mordor Intelligence. Vanillin Market | Growth | Trends | Forecast (2020 - 2025). Accessed March 12, 2021. <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/vanillin-market>
6. Roskam S. The problem with Vanilla. *Dairy Ind Int*. 2016;81(5):21-22. doi:10.1021/cen-09436-cover
7. Economia Circular - O que é a Economia Circular? Accessed May 4, 2021. <https://eco.nomia.pt/pt/economia-circular/estrategias>
8. *Biorefinaria-Desenvolvimento de Plataformas Químicas Através de Tecnologias Integradas de Biomassa*; 2007. <http://www.pnl.gov/biobased/>
9. da P, Dal Bello Coordinatore Dottorato Relatore Alejandro Hochkoeppler Fabio Fava E. *Vanillin Production from Ferulic Acid with Pseudomonas Fluorescens BF13-1p4*.
10. Ma XK, Daugulis AJ. Effect of bioconversion conditions on vanillin production by *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116 through an analysis of competing by-product formation. *Bioprocess Biosyst Eng*. 2014;37(5):891-899. doi:10.1007/s00449-013-1060-x
11. What Is Ferulic Acid and What It Can Do for Your Skin | Dermstore Blog. Accessed February 26, 2021. https://www.dermstore.com/blog/top_ten/what-is-ferulic-acid/
12. Shuai S, Yue G. Ferulic Acid, A Potential Antithrombotic Drug. *J Lung Heal Dis*. 2018;2(2):25-28. doi:10.29245/2689-999x/2017/2.1127
13. Contreras-Jáquez V, Rodríguez-González J, Mateos-Díaz JC, Valenzuela-Soto EM, Asaff-Torres A. Differential Activation of Ferulic Acid Catabolic Pathways of *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116 in Submerged and Surface Cultures. *Appl Biochem Biotechnol*. 2020;192(2):494-516. doi:10.1007/s12010-020-03336-4
14. Buranov AU, Mazza G. Analytical Methods Extraction and purification of ferulic acid from flax shives, wheat and corn bran by alkaline hydrolysis and pressurised solvents. doi:10.1016/j.foodchem.2009.01.059
15. WO2017104961A1 - Method for producing ferulic acid from cornhusk at high purity and high yield - Google Patents. Accessed March 11, 2021. <https://patents.google.com/patent/WO2017104961A1/en>
16. Ferri M, Happel A, Zanaroli G, et al. *Advances in Combined Enzymatic Extraction of Ferulic Acid from Wheat Bran | Enhanced Reader*; 2020. Accessed May 25, 2021. <chrome-extension://dagcmkpajjlhakfdhnbomgmjdpkdklff/enhanced-reader.html?openApp&pdf=https%3A%2F%2Fpdf.sciencedirectassets.com%2F277035%2F1-s2.0-S1871678419X00084%2F1-s2.0-S187167841930113X%2Fmain.pdf%3FX-Amz-Security-Token%3DIQoJb3JpZ2luX2VjEG4aCXVzLWVhc>

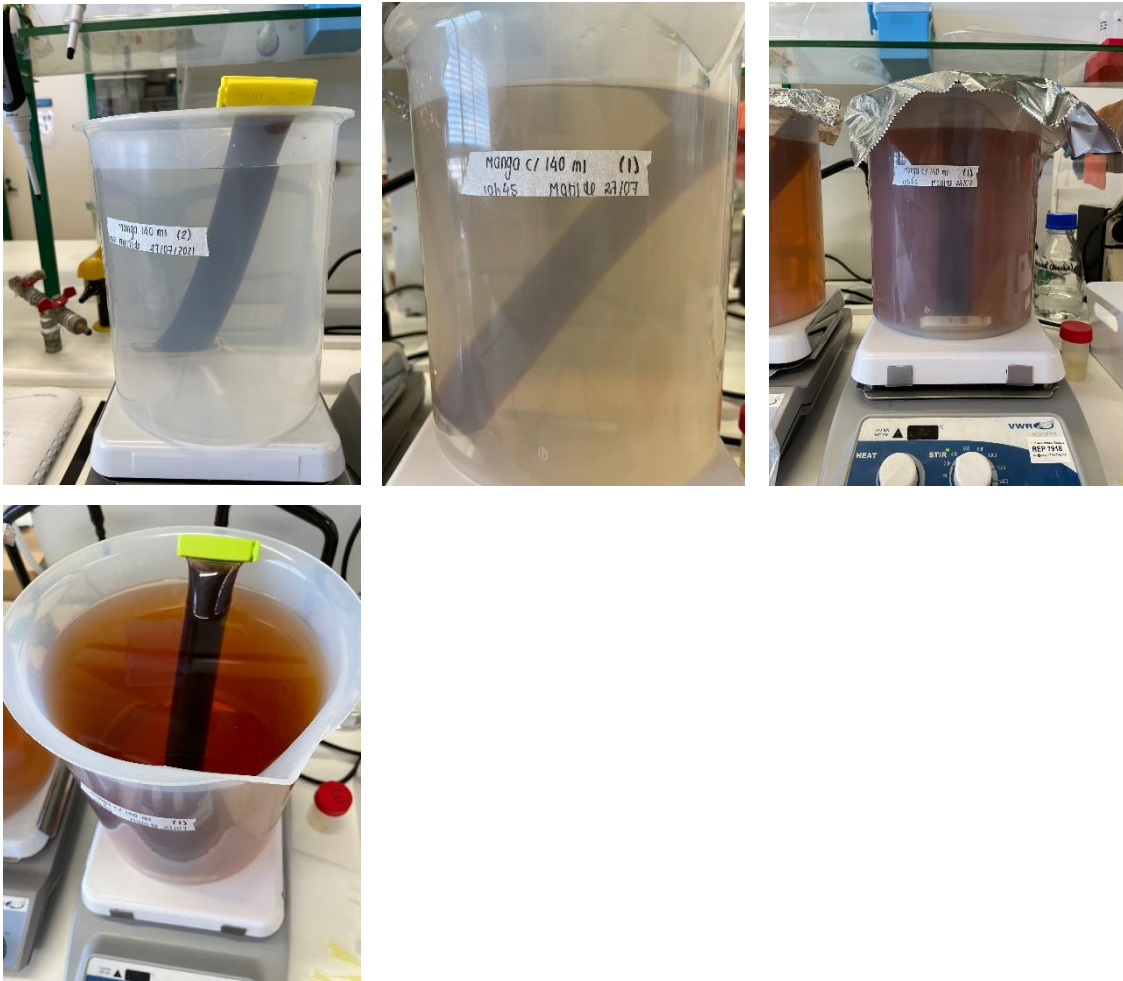
17. Kim K-H, Tsao R, Yang R, Cui SW. Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect of hydrolysis conditions. doi:10.1016/j.foodchem.2005.01.032
18. Revelant D, Foucher S, Horbez D, Marison P. Optimized process for extraction of ferulic acid with pretreatment. 2016;1(19):1-5.
19. Parvez MM, Wakabayashi K, Hoson T, Kamisaka S. *White Light Promotes the Formation of Diferulic Acid in Maize Coleoptile Cell Walls by Enhancing PAL Activity*. Vol 99. Wiley; 1997. doi:10.1111/J.1399-3054.1997.TB03428.X
20. Yadav MP, Fishman ML, Chau HK, Johnston DB, Hicks KB. Molecular Characteristics of Corn Fiber Gum and Their Influence on CFG Emulsifying Properties. *Cereal Chem*. 2007;84(2):175-180. doi:10.1094/CCHEM-84-2-0175
21. Valério RAC. Valorisation of corn fibre: Optimisation of an integrated process to produce bio- vanillin. *Tese Douturamento, Fac Ciências e Tecnol da Univ Lisboa*. Published online 2021.
22. Serra M, Weng V, Coelho IM, Alves VD, Brazinha C. Purification of arabinoxylans from corn fiber and preparation of bioactive films for food packaging. *Membranes (Basel)*. 2020;10(5):1-22. doi:10.3390/membranes10050095
23. Valério RAC. Valorisation of corn fiber:optimisation of an integrated process to produce bio-vanillin. Published online 2020.
24. Aarabi A, Honarvar M, Mizani M, Faghihian H, Gerami A. Extraction and purification of ferulic acid as an antioxidant from sugar beet pulp by alkaline hydrolysis. *Ital J Food Sci*. 2016;28(3):362-375. doi:10.14674/1120-1770/ijfs.v143
25. Ou S, Luo Y, Xue F, Huang C, Zhang N, Liu Z. Separation and purification of ferulic acid in alkaline-hydrolysate from sugarcane bagasse by activated charcoal adsorption/anion macroporous resin exchange chromatography. *J Food Eng*. 2007;78(4):1298-1304. doi:10.1016/J.JFOODENG.2005.12.037
26. Converti A, Aliakbarian B, Domínguez JM, Vázquez GB, Perego P. Microbial production of biovanillin. *Brazilian J Microbiol*. 2010;41(3):519-530. doi:10.1590/S1517-83822010000300001
27. Zhao S, Yao S, Ou S, et al. Preparation of ferulic acid from corn bran: Its improved extraction and purification by membrane separation. *Food Bioprod Process*. 2014;92(3):309-313. doi:10.1016/j.fbp.2013.09.004
28. Ma, Xiao Kui; J Daugulis A. *Effect of Bioconversion Conditions on Vanillin Production by Amycolatopsis Sp. ATCC 39116 through an Analysis of Competing by-Product Formation*. doi:10.1007/s00449-013-1060-x
29. Jonathan N, Aversch H, Poblete-Castro I, et al. Maximizing the Efficiency of Vanillin Production by Biocatalyst Enhancement and Process Optimization. *Front Bioeng Biotechnol / www.frontiersin.org*. 2019;7:279. doi:10.3389/fbioe.2019.00279
30. David M. (12) Patent Application Publication (10) Pub . No .: US 2017 / 0215756A1. 2017;1(19):2015-2018.
31. JP2006083117A - Method for crystallizing vanillin - Google Patents. Published 2004. Accessed November 9, 2021. <https://patents.google.com/patent/JP2006083117A/en>
32. Hubert Gayet, Denis Revelant, Martine Vibert. Method for the purification of natural vanillin. 2017;2(12). <https://patents.google.com/patent/US9617198>
33. Converti A, Aliakbarian ; B, Domínguez ; J M, Bustos Vázquez ; G, Perego P. MICROBIAL PRODUCTION OF BIOVANILLIN. *Brazilian J Microbiol*. 2010;41:519-530.
34. Stentelaire C, Lesage-Meessen L, Delattre M, Haon M, Sigoillot JC, Asther M. *Short*

- Communication: By-Passing of Unwanted Vanillyl Alcohol Formation Using Selective Adsorbents to Improve Vanillin Production with Phanerochaete Chrysosporium.*
35. Camera-Roda G, Augugliaro V, Cardillo A, Loddo V, Palmisano G, Palmisano L. A pervaporation photocatalytic reactor for the green synthesis of vanillin. doi:10.1016/j.cej.2012.10.037
 36. Camera-Roda G, Cardillo A, Loddo V, Palmisano L, Parrino F. Membranes Improvement of Membrane Performances to Enhance the Yield of Vanillin in a Pervaporation Reactor. *Membranes (Basel)*. 2014;4:96-112. doi:10.3390/membranes4010096
 37. Camera-Roda G, Parrino F, Loddo V, Palmisano L. A dialysis photocatalytic reactor for the green production of Vanillin. *Catalysts*. 2020;10(3):1-13. doi:10.3390/catal10030326
 38. Martine Vibert, Corine Cochenec AE. United States Patent US 9,126,917 B2. Published online 2015. Accessed May 14, 2021. <https://www.fsai.ie/uploadedFiles/>
 39. Method for purifying vanillin by liquid-liquid extraction: US Patent. *US Pat*. Published online December 13, 2012. Accessed November 9, 2021. <https://www.fsai.ie/uploadedFiles/>
 40. DUPONT. FilmTec™ SW30-4040. Accessed November 9, 2021. <https://www.dupont.com/products/filmtecs304040.html>
 41. DUPONT. FilmTec™ BW30-400. FilmTec Brackish Water Reverse Osmosis 8" elements. Accessed November 9, 2021. <https://www.dupont.com/products/filmtecbw30400.html>
 42. Lenntech. GH Series Industrial Ultrafiltration Elements-TFM* 2,500 MWCO. Accessed November 9, 2021. www.lenntech.com
 43. Valério R, Serra AT, Baixinho J, et al. Combined hydrothermal pre-treatment and enzymatic hydrolysis of corn fibre: Production of ferulic acid extracts and assessment of their antioxidant and antiproliferative properties. *Ind Crops Prod*. 2021;170:113731. doi:10.1016/J.INDCROP.2021.113731
 44. STERLITECH. Microdyn Nadir Membrane Filters, UP150, PES, UF, 25mm, 5/pk - 112. Accessed November 12, 2021. <https://www.sterlitech.com/microdyn-nadir-membrane-filters-up150-pes-uf-25mm-5-pk.html>
 45. Llano T, Alexandri M, Koutinas A, et al. Liquid-Liquid Extraction of Phenolic Compounds from Spent Sulphite Liquor. *Waste and Biomass Valorization*. 2015;6(6):1149-1159. doi:10.1007/s12649-015-9425-9
 46. Sludge processing. The MBR Site | O&M – MBR fouling, clogging and cleaning. Published 2018. Accessed November 12, 2021. <https://www.thembrsite.com/operation-maintenance/mbr-fouling-clogging-cleaning/>
 47. Ghiggi FF. UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL ESCOLA DE ENGENHARIA DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA TRABALHO DE DIPLOMAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA Tratamento de Águas para Consumo Doméstico com Membranas de Ultrafiltração.
 48. Breil C, Abert Vian M, Zemb T, Kunz W, Chemat F. "Bligh and Dyer" and Folch Methods for Solid-Liquid-Liquid Extraction of Lipids from Microorganisms. Comprehension of Solvation Mechanisms and towards Substitution with Alternative Solvents. *Int J Mol Sci*. 2017;18(4). doi:10.3390/IJMS18040708
 49. Mota FL, Queimada AJ, Pinho SP, et al. Aqueous Solubility of Some Natural Phenolic Compounds. *Some Nat Phenolic Compd Ind Eng Chem Res*. 2008;47(15). doi:10.1021/ie071452oi
 50. Vanillin CAS 121-33-5 | 818718. Accessed December 15, 2021. https://www.merckmillipore.com/PT/en/product/Vanillin,MDA_CHEM-

818718?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F

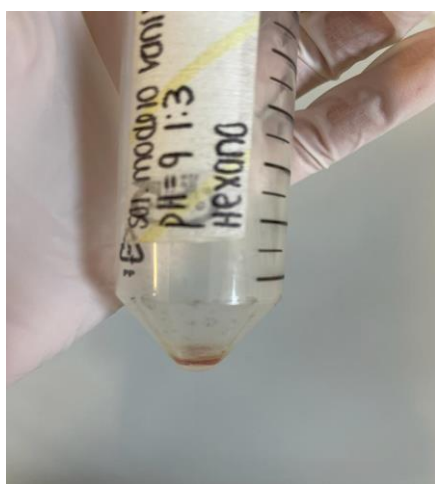
ANEXO A

Nestas imagens é possível observar como foi realizado o processo de diálise, que foi explicado no capítulo nos procedimentos para a diálise. É possível comprovar aquilo que foi referido anteriormente, e que a água que envolve a manga apresenta cor acastanhada (cor do caldo de fermentação).



ANEXO B

Através destas figuras, é possível observar que foi sempre possível obter resíduo de vanilina na extração líquido-líquido, depois de seco o solvente orgânico.





2021

MATILDE PEREIRA BRANCO DE
LACERDA E MELO

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DA BIOVANILINA ATRAVÉS DA
VALORIZAÇÃO DA FIBRA DE MILHO