



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102020024886-3 A2



(22) Data do Depósito: 04/12/2020

(43) Data da Publicação Nacional: 21/06/2022

(54) **Título:** MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE HEMICELULOSE POR ASSOCIAÇÃO DE PROCESSO BIOLÓGICO E QUÍMICO

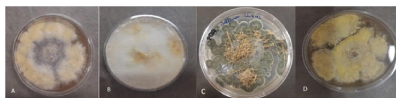
(51) **Int. Cl.:** C08B 37/14; C12N 3/00; C12N 1/22; C12N 1/14; C08H 8/00; (...).

(52) **CPC:** C08B 37/143; C12N 3/00; C12N 1/22; C12N 1/14; C08H 8/00; (...).

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO; UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS.

(72) **Inventor(es):** JEFFERSON POLES FELIPUCI; DERLENE ATTILI DE ANGELIS; MICHEL BRIENZO.

(57) **Resumo:** MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE HEMICELULOSE POR ASSOCIAÇÃO DE PROCESSO BIOLÓGICO E QUÍMICO. Trata-se de método de extração de hemicelulose, especificamente, extração de xilana de biomassa lignocelulósica; dito método de extração de hemicelulose compreende a associação do pré-tratamento biológico com tratamento químico para o aumento da extração de xilana de material lignocelulósico; dito pré-tratamento biológico é previamente executado ao tratamento químico na decomposição do bagaço de cana-de-açúcar avaliando o grau de deslignificação do material para a verificação do efeito no processo de extração de xilana para o uso de menor carga de reagente químico, bem como avalia-se digestibilidade enzimática do material pré-tratado; dito pré-tratamento biológico emprega fungos que provoca alteração na composição da lignina e/ou do material, e conseqüente diminuição da recalcitrância da biomassa resultando em maior rendimento na extração de hemicelulose.



“MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE HEMICELULOSE POR ASSOCIAÇÃO DE PROCESSO BIOLÓGICO E QUÍMICO”.

CAMPO TÉCNICO DA INVENÇÃO

[001] A presente patente de invenção trata de método de extração de hemicelulose por associação de processo biológico e químico, especificamente, extração de xilana de biomassa lignocelulósica onde, por meio do tratamento biológico previamente ao tratamento químico na decomposição do bagaço de cana-de-açúcar, avalia-se o grau de deslignificação do material e, com isso, verifica-se este efeito no processo de extração de xilana utilizando menor carga de reagente químico, bem como avalia-se digestibilidade enzimática do material pré-tratado. A combinação do pré-tratamento biológico com o processo químico compõe uma alternativa para aumentar o rendimento na extração dos componentes da biomassa, além de reduzir custos.

HISTÓRICO DA INVENÇÃO

[002] O bagaço de cana-de-açúcar é obtido a partir da moagem da cana para extração do caldo e pode ser utilizado para geração de energia elétrica por meio da queima, ou reutilizado para produzir etanol de segunda geração ou aproveitado na produção de moléculas de maior valor agregado. Para isto, é importante a separação e isolamento das macromoléculas que estão presentes em sua parede celular, isto é, celulose, hemicelulose e lignina. Um dos principais polissacarídeos do bagaço é a xilana, um tipo de hemicelulose. Esta macromolécula, quando isolada dos demais componentes da parede celular, tem aplicação para diversos fins industriais, como aditivo na produção de papel, na área farmacêutica e de alimentos, dentre outros.

[003] A extração de xilana da biomassa da cana-de-açúcar pode ser realizada por métodos variados, no entanto estes resultam em impurezas e consomem grande quantidade de reagentes químicos. A estrutura recalcitrante da parede celular vegetal, a interação com a lignina e constituintes químicos dificultam os processos de separação da hemicelulose.

[004] Isto posto, tratamentos em meios alcalinos são utilizados para separar as macromoléculas da biomassa. Tais tratamentos são frequentemente selecionados para a extração de xilana na forma macromolecular, contudo observa-se que uma parte da

lignina é extraída junto à hemicelulose. Dependendo do uso pretendido para esta xilana, é interessante que não haja resíduos de lignina, uma vez que isto pode interferir na qualidade do produto final. Um exemplo disto é o papel, o qual é composto majoritariamente por celulose e, caso apresente uma quantidade significativa de lignina, ficará mais amarelado e mais suscetível a rasgos.

[005] A aplicação de peróxido de hidrogênio e hidróxido de sódio e outros agentes alcalinos quebra as ligações entre celulose e hemicelulose, enquanto a lignina é separada num processo posterior com lavagem em etanol. Nestes processos pode haver resíduos de lignina na hemicelulose extraída, bem como de reagentes químicos usados no procedimento. Uma alternativa a tratamentos químicos e físico-químicos para a separação/isolamento da hemicelulose da biomassa lignocelulósica é o uso de tratamentos biológicos. Existem espécies de fungos filamentosos reconhecidamente degradadores de lignina, que podem ser uma alternativa não somente ao tratamento alcalino, no qual parte da lignina é solubilizada, mas também a outros que não atingem o grau de pureza do produto desejado (independente se macromolecular ou monossacarídeos, como proveniente de pré-tratamento ácido).

[006] A capacidade de degradar a lignina por meio de ações enzimáticas específicas, como a lignina peroxidase (LiP) e manganês peroxidase (MnP), justifica o crescente interesse pelo uso de espécies fúngicas em estudos dessa natureza. Contudo, a grande complexidade molecular da lignina a torna quase sempre uma segunda opção para os fungos, atrás da hemicelulose e celulose. Isso significa que, apesar de determinados fungos consumirem a lignina do material, geralmente os outros componentes também serão consumidos, em menor ou maior quantidade.

ANÁLISE DO ESTADO DA TÉCNICA

[007] Em pesquisa realizada em bancos de dados especializados foram encontrados documentos referentes ao método de extração de hemicelulose, tal como, previsto no documento de nº. FI126212 (UPM KYMMENE CORP.) que trata de método e sistema para isolar xilana a partir do material de planta, xilana, fibra de celulose, carbonato de cálcio precipitado, e, uso de uma xilana.

[008] O documento de nº. FI123309 (UPM KYMMENE CORP.) trata de método para a

fabricação de pasta de papel, em que o método de fibras celulósicas quimicamente transformadas em polpa de madeira dura são usadas como matéria-prima. O método compreende separar xilana das referidas fibras de celulose por meio de hidróxido de sódio; adicionar dióxido de carbono a uma mistura contendo as referidas fibras de celulose, xilana dissolvida e hidróxido de sódio, para precipitar a xilana; adicionar hidróxido de cálcio à referida mistura contendo xilana precipitada e fibras de celulose, para formar carbonato de cálcio precipitado; e remover o hidróxido de sódio da referida mistura contendo hidróxido de sódio, xilana, fibras de celulose e carbonato de cálcio. Além disso, a invenção refere-se a pasta de papel feita pelo método.

[009] O documento de nº. CN104302675 (UPM KYMMENE CORP.) trata de um método e um sistema para isolar xilana de material vegetal, bem como xilana, carbonato de cálcio e fibra de celulose. No método, são utilizadas fibras de celulose que contêm xilana, vantajosamente fibras de celulose de madeira dura; e a xilana é extraída das referidas fibras de celulose por meio de hidróxido de sódio para formar uma solução de extrato que contém xilana; as fibras de celulose são removidas da referida mistura que contém fibras de celulose e solução de extrato para isolar a referida solução de extrato da referida mistura; dióxido de carbono é adicionado à solução de extrato para isolar a xilana, em que o branqueador líquido e a xilana precipitada são formados; hidróxido de cálcio é adicionado ao referido branqueador isolado, para formar carbonato de cálcio precipitado e hidróxido de sódio líquido; e o hidróxido de sódio é removido da referida mistura que contém hidróxido de sódio e carbonato de cálcio precipitado, para isolar o carbonato de cálcio da referida mistura. Além disso, a invenção se refere a um sistema para isolar xilana de material vegetal, e carbonato de cálcio, fibra de celulose e uso de xilana.

[010] O documento de nº. CN101531722 (JIANGSU KANGWEI BIO CO. LTD.) revela um método aprimorado para preparar xilana vegetal por meio de extração por método alcalino. Fornece um método melhorado para preparar xilana por meio de extração por um método alcalino, que extrai matérias-primas fibrosas vegetais por álcali e obtém um produto de xilana em solução ou em pó após a separação por ultrafiltração. O método é caracterizado pelo fato de que o extrato alcalino é reciclado após ser suplementado

com hidróxido de sódio, é submetido à separação por ultrafiltração por uma membrana/fibra oca ou módulo enrolado em espiral com separação molecular entre 5.000 e 20.000 daltons sob as condições em que o pH inicial é 12,0 e a concentração da xilana está entre 4,0 e 4,5 por cento (p/p), e é concentrado em 50 a 60 por cento de um volume original, adicionado gentilmente água ao volume original, e continuamente sujeito à separação por ultrafiltração, repetidamente. O método reduz bastante o álcali empregado.

[011] O documento de nº. WO2016199042 (STORA ENSO OYJ) trata de método para produzir xilana refinada a partir de um hidrolisado de biomassa, incluindo: (i) fornecer um hidrolisado de biomassa, que compreende xilana; (ii) concentrar ou separar o referido hidrolisado de biomassa para obter um concentrado de xilana compreendendo xilana e impurezas; (iii) lavar e/ou extrair o concentrado de xilana com um solvente para obter xilana refinada e uma corrente de solvente compreendendo o solvente e impurezas; e (iv) coleta da xilana refinada.

[012] Assim, é fato que os documentos citados nos parágrafos acima, apesar de pertencerem ao mesmo campo de aplicação, não apresentam a aplicação combinada de processo químico e biológico para extração de xilana de biomassa lignocelulósica garantindo, assim, que o mesmo atenda aos requisitos legais de patenteabilidade.

DESENVOLVIMENTO

[013] A combinação de tratamento biológico com tratamento químico pode ser uma possibilidade para otimizar a extração de hemicelulose. O período de crescimento dos micro-organismos pode ser um impasse a nível industrial para a maioria dos estudos envolvendo tratamento biológico. Entretanto, no presente estudo, a modificação estrutural causada na biomassa lignocelulósica torna este método vantajoso ao aumentar o rendimento de extração e diminuir a carga de reagentes químicos no processo.

[014] Fungos de podridão branca são conhecidos por degradar lignina, e podem ser uma alternativa não somente ao tratamento alcalino, no qual parte da lignina é solubilizada, mas também a outros tratamentos, os quais não atingem o grau de pureza do produto desejado.

[015] A escolha de fungos de podridão branca é justificada por sua capacidade de degradar a lignina por meio de ações enzimáticas específicas, como por exemplo a lignina peroxidase (LiP) e manganês peroxidase (MnP). Contudo, a grande complexidade molecular da lignina a torna quase sempre uma segunda opção para os fungos, atrás da hemicelulose e celulose. Isso significa que apesar de determinados fungos consumirem a lignina do material, quase sempre os outros componentes também serão consumidos, em menor ou maior quantidade. A combinação de tratamento biológico com os tratamentos químicos pode ser uma opção para diminuir a carga de reagentes químicos no processo de extração.

[016] Para o presente desenvolvimento foram empregados os fungos '*Coniophora puteana*' (CBMAI 0870), '*Gloeophyllum trabeum*' (CBMAI 0872), '*Aspergillus fumigatus*' (CBMAI 0873) e '*Pleurotus Ostreatus*' (CCIBt 2338).

[017] Os fungos de podridão branca foram cultivados em placas de Petri em meio BDA previamente preparadas e foram mantidos a uma temperatura constante de 25 °C por períodos de 1 a 5 meses.

[018] Primeiramente, o bagaço (não moído) teve sua umidade ajustada a 75% e depois foi dividido em sacos de polipropileno (SILVA, 2007) contendo 250 g do material cada. No centro do material contido no saco foi introduzido um tubo de centrifuga para formação de um canal, e posterior introdução do inóculo. Utilizou-se papel manteiga e anéis concêntricos de PVC para fechar os sacos, que foram autoclavados à temperatura de 121 °C e 1 atm de pressão por 1 hora.

[019] Após a adição dos inóculos, os sacos plásticos contendo o bagaço foram mantidos em temperatura constante de 25 °C por períodos de 1 a 5 meses. O desenvolvimento foi feito em triplicata e foi executado da seguinte forma: cada saquinho foi inoculado transferindo-se cerca de um terço do micélio fúngico crescido em placa de Petri (90x15 mm), sendo 3 sacos para cada mês até o quinto mês (total 15 saquinhos). Após 30 dias, os 3 primeiros sacos de cada fungo foram abertos e o material foi analisado. O mesmo aconteceu após 60, 90, 120 e 150 dias. No total foram utilizados 60 sacos de polipropileno.

Extração de xilana

[020] A extração da xilana foi feita baseada no método otimizado para bagaço de cana-de-açúcar (Brienzo et al., 2009), com modificação na concentração de reagente. Um volume de 10 g da biomassa foi tratada com peróxido de hidrogênio 3% em meio alcalino com o pH ajustado para 11,6 com NaOH 5 mol/L, em um volume de reação de 200 mL. Referida concentração foi submetida a agitação de 110 rpm por 4 horas e depois foi filtrada, e o resíduo insolúvel foi lavado e utilizado para hidrólise enzimática para produção de açúcar fermentável. O líquido sobrenadante teve seu pH ajustado para 6 com HCl 6 mol/L e depois concentrado a cerca de um terço do seu volume sob circulação de ar a 50 °C. Na amostra concentrada foi adicionado etanol 95% para precipitar a xilana, e depois foi lavada cerca de quatro vezes com etanol 70%. A hemicelulose decantada foi seca por circulação de ar a 50 °C e depois pesada e armazenada em frascos plásticos.

OBJETIVOS DA INVENÇÃO

[021] É objetivo da invenção apresentar um método de extração de hemicelulose por associação de processo biológico e químico, sendo que o emprego de tratamento biológico permite reduzir reagente, colaborando para um processo amigável ao meio ambiente.

[022] É objetivo da invenção apresentar um método de extração de hemicelulose por associação de processo biológico e químico que apresenta baixo investimento, considerando equipamentos simples de laboratório e reagentes comuns.

[023] É objetivo da invenção apresentar um método de extração de hemicelulose por associação de processo biológico e químico cuja produção de produto é de interesse industrial, uma vez que, o método apresenta custo reduzido.

[024] É objetivo da invenção apresentar um método de extração de hemicelulose cuja combinação do pré-tratamento biológico com o químico configura uma alternativa para aumentar o rendimento na extração dos componentes da biomassa e reduzir custos.

[025] É objetivo da invenção apresentar um método de extração de hemicelulose cuja combinação do pré-tratamento biológico com o químico seja eficiente para diminuir a recalcitrância do bagaço de cana-de-açúcar não moído.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[026] A complementar a presente descrição de modo a obter uma melhor compreensão das características do presente invento e de acordo com uma preferencial realização prática do mesmo, acompanha a descrição, em anexo, um conjunto de figuras, onde, de maneira exemplificada, embora não limitativa, se representou:

[027] a figura 1 revela uma imagem fotográfica da macromorfologia dos fungos estudados em meio BDA onde 'A' '*Gloeophyllum trabeum*'; 'B' '*Pleurotus ostreatus*'; 'C' '*Aspergillus fumigatus*'; 'D' '*Coniophora puteana*';

[028] a figura 2 mostra uma imagem fotográfica do processo de preparação dos sacos contendo bagaço de cana-de-açúcar para inoculação dos fungos onde o 'A' revela o bagaço com 75% de umidade no saco de polipropileno; 'B' mostra o tubo Falcon inserido no bagaço para formação de um canal para a futura inoculação dos micro-organismos; e 'C' ilustra o saco fechado com rodela concêntrica de PVC e papel manteiga;

[029] a figura 3 revela um gráfico do rendimento de extração de xilana em massa (g) com peróxido de hidrogênio 3 % do bagaço (não moído) biologicamente pré-tratado *in natura* e pré-tratado com micro-organismos;

[030] a figura 4 mostra um gráfico do rendimento e extração de xilana do bagaço (não moído) biologicamente pré-tratado utilizando 3 e 6 % de reagente químico (H₂O₂);

[031] a figura 5 ilustra um gráfico da porcentagem de xilana extraída do bagaço (não moído) biologicamente pré-tratado com peróxido de hidrogênio 3 %; e

[032] a figura 6 revela um gráfico da porcentagem de xilana extraída do bagaço de cana-de-açúcar (não moído) comparando valores entre diferentes concentrações de reagente, 3 % e 6 % de peróxido de hidrogênio.

DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

[033] A presente patente de invenção se refere a um "MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE HEMICELULOSE POR ASSOCIAÇÃO DE PROCESSO BIOLÓGICO E QUÍMICO", mais precisamente trata-se de método de extração de hemicelulose, especificamente, extração de xilana de biomassa lignocelulósica.

[034] Segundo a presente invenção, o método de extração de hemicelulose compreende a associação do pré-tratamento biológico com tratamento químico de

forma a aumentar a extração de xilana de material lignocelulósico. Dito pré-tratamento biológico é previamente executado ao tratamento químico na decomposição do bagaço de cana-de-açúcar avaliando o grau de deslignificação do material para a verificação do efeito no processo de extração de xilana para o uso de menor carga de reagente químico, bem como avalia-se a digestibilidade enzimática do material pré-tratado.

[035] Dita extração pode ser aplicada a qualquer hemicelulose, considerando diferentes fontes de biomassa lignocelulósica como madeira dura, madeira mole, gramíneas ou resíduos orgânicos industriais.

[036] Dito pré-tratamento biológico emprega microrganismos de podridão branca que tem ação robusta suficiente para agir no material não moído, bagaço de cana-de-açúcar industrial, diminuindo sua recalcitrância e resultando em maior rendimento na extração de hemicelulose.

[037] As etapas que constituem o pré-tratamento biológico do método de extração de hemicelulose compreendem:

- a) Nesta etapa são empregados fungos (ver figura 1) como '*Coniophora puteana*' (CBMAI 0870) e '*Gloeophyllum trabeum*' (CBMAI 0872), '*Pleurotus ostreatus*' e '*Aspergillus fumigatus*'. Todas as linhagens são cultivadas em placas de Petri contendo 25 mL de meio Ágar Batata Dextrose (BDA) e mantidas a uma temperatura constante de 25 °C por período de 07 a 15 dias;
- b) Ajuste da umidade do bagaço de cana-de-açúcar para cerca de 75 %, e em seguida prepara-se sacos de polipropileno (ver figura 2) contendo cerca de 250 g preparados para receber os inóculos (BRIENZO; SILVA; MILAGRES, 2007). Um tubo Falcon é introduzido para formar um canal no centro do material contido no saco, com o objetivo de facilitar a inoculação. Utiliza-se papel manteiga ou material permeável e anéis concêntricos de PVC para fechar os sacos, os quais foram autoclavados duas vezes à temperatura de 121 °C e 1 atm de pressão por 1 h (ver Figura 2), em intervalos de 24 h;
- c) O experimento é realizado em triplicata e utiliza-se como inóculo cerca de um terço do micélio fúngico crescido na placa de Petri por 15 dias. Os sacos inoculados são então incubados a 25 °C por um período de 1 a 5 meses, em estufa incubadora para

análise de demanda bioquímica de oxigênio (BOD). Utiliza-se 3 sacos por análise até o quinto mês (total 15 sacos para cada micro-organismo). As análises aconteceram após 30, 60, 90, 120 e 150 dias de incubação. No total foram utilizados 60 sacos de polipropileno;

d) Após o período de crescimento do micélio, procede-se a realização dos experimentos de extração de xilana e caracterização química. Primeiramente, o bagaço pré-tratado foi seco sob temperatura ambiente até massa constante.

[038] Dito pré-tratamento biológico é seguido pelo processo químico de extração de xilana que compreende:

aa) Extração de xilana realizada com o bagaço não moído '*in natura*' e pré-tratado, baseada em método otimizado para bagaço de cana-de-açúcar (Brienzo et al., 2009), com modificação na concentração de reagente peróxido de hidrogênio;

bb) Uma amostra de 10g da biomassa foi tratada com peróxido de hidrogênio 3% ou 6% em meio alcalino com o pH ajustado para 11,6 com NaOH 5 mol/L, em um volume de reação de 200 mL. A suspensão foi agitada a 110 rpm por 4 h e depois foi filtrada, e o resíduo insolúvel (fração sólida) foi lavado e utilizado na hidrólise enzimática para produção de açúcar fermentável;

cc) O líquido sobrenadante teve seu pH ajustado para 6 com HCl 6 mol/L, e depois concentrado a cerca de um terço do seu volume em estufa sob circulação de ar a 50 °C. Na amostra concentrada foi adicionado etanol 96 % para precipitar a xilana, a qual foi lavada cerca de quatro vezes com etanol 70 %;

dd) A hemicelulose decantada foi seca em estufa por circulação de ar a 50 °C e depois pesada e armazenada em frascos plásticos;

ee) Extração de xilana do bagaço foi realizada sem prévia moagem do material. O bagaço utilizado, da forma recebida da usina, apresentou um tamanho de partícula com predominância que corresponde a 16 mesh (malha) (FERNANDES, 2018). Nessa etapa utiliza-se 3 % de peróxido de hidrogênio, carga de peróxido de hidrogênio 50 %. Para a avaliação do efeito do crescimento dos fungos no bagaço, a carga de reagente é reduzida para melhor verificação da ação dos fungos facilitando a extração da xilana. Houve também a extração de xilana com peróxido de hidrogênio 6 % do bagaço *in natura* e dos

dois micro-organismos que obtiveram os melhores resultados para fins de comparação.

- Resultados

[039] A extração de xilana do bagaço *in natura* foi de 0,78 g, enquanto que para os materiais pré-tratados pelos fungos ocorreu majoritariamente uma diminuição na quantidade de xilana extraída (Figura 3). O bagaço que foi pré-tratado com *G. trabeum* teve rendimento de extração de xilana médio de 0,42 g, com valores entre 0,12 e 0,56 g no terceiro e primeiro mês, respectivamente. Para o bagaço pré-tratado com *A. fumigatus*, a extração de xilana resultou entre 0,46 e 0,68 g no segundo e primeiro mês, respectivamente, tendo uma média de 0,56 g.

[040] O bagaço pré-tratado por *C. puteana* apresentou os maiores valores de extração de xilana em comparação com os demais micro-organismos estudados. A massa de xilana extraída foi de 1,07 g respectivo ao quarto mês de cultivo e uma média de extração de 0,83 g. O menor valor de extração se deu no primeiro mês com 0,71 g de xilana, resultado acima da média em relação aos outros fungos estudados. A xilana extraída cujo pré-tratamento do bagaço foi com *P. ostreatus* apresentou média de 0,61 g, com rendimento máximo de 0,79 g no terceiro mês de tratamento e mínima de 0,51 g no quinto mês de tratamento.

[041] Com o teste estatístico de Friedman, os valores para a extração em massa da xilana foram comparados (Tabela 1). Se o valor de $p \geq 0,05$, então considera-se que os valores são iguais, ou seja, os pré-tratamentos não diferem entre si para a extração da xilana, mas se $p < 0,05$, então os valores são diferentes, isto significa que os pré-tratamentos se diferem.

[042] Tabela 1 – Valor de p quando comparados os valores de extração de xilana em massa (g) dos bagaços biologicamente pré-tratados, com o teste estatístico de Friedman.

	<i>G. Trabeum</i> (CBMAI 0872)	<i>A. fumigatus</i>	<i>C. Puteana</i> (CBMAI 0870)	<i>P. Ostreatus</i> (CCIBt 2338)
<i>G. trabeum</i> (CBMAI 0872)	x			
<i>A. fumigatus</i>	0,1797	x		
<i>C. puteana</i> (CBMAI 0870)	0,02535	0,0253	x	

<i>P. ostreatus</i> (CCIBt 2338)	0,65472	0,6547	0,1797	x
-------------------------------------	---------	--------	--------	---

[043] Os resultados das extrações cujo pré-tratamento utilizado foi com fungo '*C. puteana*' teve valor significativamente diferente dos pré-tratamentos referentes à '*G. trabeum*' e '*A. fumigatus*', com ambos valores de $p < 0,05$, porém, quando comparado com '*P. ostreatus*', o valor de $p > 0,05$, mostrando que não há diferença significativa entre os valores da extração. Já a comparação entre os valores de extração obtidos pelo pré-tratamentos com *G. trabeum*, *A. fumigatus* e *P. ostreatus* mostrou que não há diferença estatística.

[044] A extração de xilana também foi feita com peróxido de hidrogênio 6 % no bagaço "in natura" e na amostra referente à *C. puteana* do primeiro mês (Figura 4). Esta comparação permitiu avaliar se a extração pós pré-tratamento biológico alcançaria os mesmos resultados em comparação à extração utilizando metade do reagente.

- Xilana presente no bagaço após pré-tratamento biológico

[045] Os bagaços que passaram pelo pré-tratamento biológico tiveram valores para o teor de xilana menores que o bagaço *in natura*. Isto mostra que os micro-organismos tiveram preferência pela xilana do material em comparação com os demais compostos disponíveis. O bagaço cultivado por *C. puteana* apresentou o menor teor de xilana de todos, com média de 12,41 % e variação de 10,78 a 13,6 %, o que indica que este fungo consumiu mais xilana em comparação aos demais micro-organismos. *G. trabeum* teve média de 13,14 % no teor de xilana, com valores variando entre 11,68 e 14,74 %. O bagaço pré-tratado com *A. fumigatus* teve o maior teor de xilana apresentado, com máximo de 24,83 e mínimo de 14,98 %, com média de 19,46 % de xilana disponível. Ou seja, este fungo foi o que menos consumiu polissacarídeo dentre os micro-organismos.

[046] Tabela 2 – Teor de xilana no bagaço biologicamente pré-tratado após pré-tratamento biológico.

Mês	<i>G. trabeum</i> (CBMAI 0872)	<i>A. fumigatus</i>	<i>C. puteana</i> (CBMAI 0870)	<i>P. ostreatus</i> (CCIBt 2338)	B. <i>in natura</i>
1	11,68 ± 2,25	14,98 ± 3,77	13,6 ± 5,22	19,41 ± 0,77	23,82 ± 10,12
2	14,74 ± 1,45	14,98 ± 4,43	12,39 ± 2,44	20,65 ± 0,34	
3	14,62 ± 0,29	24,83 ± 1	12,22 ± 0,23	20,57 ± 0,35	

4	12,21 ± 1,19	18,94 ± 0,87	10,78 ± 0,95	20,32 ± 0,11	
5	12,49 ± 1,17	23,59 ± 1,21	13,07 ± 4,53	18,73 ± 3,01	

[047] Com o teste estatístico de ‘*Mann-Whitney*’ foi possível comparar se os pré-tratamentos se diferem entre si (e com o ensaio *in natura*) enquanto à percentagem de xilana disponível no bagaço analisado (Tabela 3). Com este resultado pode-se diferenciar se a quantidade de xilana consumida pelos fungos são significativamente diferentes ou iguais.

[048] Para este teste estatístico, se $p > 0,05$, então corrobora com a hipótese nula H_0 - pré-tratamento biológico = *in natura*, mas se $p < 0,05$, então corrobora a hipótese alternativa H_a pré-tratamento biológico < *in natura*. Como não é possível que haja mais xilana disponível nas biomassas que passaram pelo pré-tratamento biológico, então usa-se o p valor unilateral.

[049] Tabela 3 – Valor de p quando comparados os teores de xilana no bagaço biologicamente pré-tratado pelos fungos.

	<i>G. trabeum</i> (CBMAI 0872)	<i>A. fumigatus</i>	<i>C. puteana</i> (CBMAI 0870)	<i>P. ostreatus</i> (CCIBt 2338)	<i>in natura</i>
<i>G. trabeum</i> (CBMAI 0872)	x				
<i>A. fumigatus</i>	0,0045	x			
<i>C. puteana</i> (CBMAI 0870)	0,3008	0,0045	x		
<i>P. ostreatus</i> (CCIBt 2338)	0,0045	0,3770	0,0045	x	
<i>in natura</i>	0,0721	0,2919	0,0339		x

[050] O bagaço *in natura* difere estatisticamente quanto à quantidade de xilana disponível apenas do bagaço pré-tratado por *C. puteana*, com valor de $p < 0,05$. Já o material que passou pelo pré-tratamento com *A. fumigatus* apresenta quantidade de xilana significativamente diferentes de *G. trabeum*, e *C. puteana*, enquanto a biomassa que foi pré-tratada com *G. trabeum* possui teor de xilana disponível significativamente igual à biomassa pré-tratada com *C. puteana*.

- Rendimento de extração de xilana em percentagem

[051] Com os dados dos valores da extração da xilana em massa e da quantidade da mesma disponível nos bagaços pré-tratados, foi possível calcular qual a porcentagem desta xilana que foi extraída (Figura 5). Como cada pré-tratamento foi feito com um micro-organismo diferente, e, considerando os diferentes valores para a degradação e extração, os valores para o rendimento da extração em porcentagem foram diferentes entre os ensaios, como já era esperado.

[052] O bagaço não moído *in natura* apresentou 32,86% de sua xilana extraída empregando 3% de peróxido de hidrogênio, com a metodologia utilizada. O bagaço que passou pelo pré-tratamento com *G. trabeum* teve média de 33,88% de sua xilana extraída, com máximo de 48,63% no primeiro mês de tratamento. O valor da mediana para este ensaio foi de 41,07%, valor próximo ao do bagaço *in natura*.

[053] Para o bagaço que foi feito pré-tratamento com *A. fumigatus*, os resultados para a quantidade de xilana extraída teve média de 30,31%, com valor máximo de 46,02%. O ensaio que teve como micro-organismo *C. puteana* apresentou os melhores valores.

[054] Após o crescimento do fungo no bagaço, foi possível extrair em média 68,60% da xilana disponível. No material referente ao quarto mês de tratamento, foi extraída 99,74% de toda xilana. Este foi o maior valor para extração deste polissacarídeo de todos os experimentos.

[055] O bagaço pré-tratado por *C. puteana* passou por extração de xilana utilizando o dobro de reagente (peróxido de hidrogênio 6%) em seu primeiro mês para comparação (Figura 6). Os resultados mostram que para o bagaço “*in natura*”, a extração com 3% de peróxido extraiu 32,86% da xilana disponível, enquanto a extração utilizando 6% de peróxido obteve 47,79% da xilana extraída, mostrando que o dobro de reagente não extrai o dobro da xilana. No bagaço que passou pelo pré-tratamento com ‘*C. puteana*’, a extração com metade do reagente rendeu mais xilana do que no experimento feito com 6% de peróxido.

[056] Utilizando o teste estatístico de Friedman para comparar os valores de extração entre os materiais que passaram pelo pré-tratamento biológico, foi utilizado o mesmo conceito, onde se $p > 0,05$, então os pré-tratamentos são estatisticamente iguais, mas se $p < 0,05$, então os pré-tratamentos são estatisticamente diferentes (Tabela 4). Neste

caso, o ensaio com '*C. puteana*' se mostrou estatisticamente diferente dos ensaios com os demais micro-organismos, enquanto os ensaios envolvendo '*A. fumigatus*' e '*G. trabeum*', apresentaram resultados estatisticamente iguais.

[057] A massa de xilana extraída é maior no bagaço *in natura* do que nos bagaços cultivados com os fungos. Por outro lado, foi extraída mais xilana em porcentagem utilizando o bagaço cultivado pelos fungos. A diferença de valores entre o bagaço *in natura* com o bagaço pré-tratado biologicamente mostra que ocorreu mudança estrutural no bagaço durante o processo de crescimento dos fungos.

[058] Tabela 4 – Comparação estatística entre rendimentos de extração de xilana utilizando diferentes micro-organismos.

	<i>G. trabeum</i> (CBMAI 0872)	<i>A. fumigatus</i>	<i>C. puteana</i> (CBMAI 0870)	<i>P. ostreatus</i> (CCIBt 2338)
<i>G. trabeum</i> (CBMAI 0872)	x			
<i>A. fumigatus</i>	0.6547	x		
<i>C. puteana</i> (CBMAI 0870)	0.0253	0.0253	x	
<i>P. ostreatus</i> (CCIBt 2338)	0,1797	0,1797	0,0253	x

[059] O aumento no rendimento de extração em porcentagem sugere que ocorreu uma redução na recalcitrância do bagaço de cana-de-açúcar, considerando o uso do bagaço não moído, de alta recalcitrância. Esta diminuição na recalcitrância do material mostra que além dos micro-organismos degradarem o polissacarídeo de interesse, eles também modificam a estrutura da parede celular de forma a facilitar a remoção da xilana por meios químicos.

[060] É certo que quando o presente invento for colocado em prática, poderão ser introduzidas modificações, sem que isso implique afastar-se dos princípios fundamentais que estão claramente substanciados no quadro reivindicatório, ficando assim entendido que a terminologia empregada não teve a finalidade de limitação.

Referências

BRIENZO, M.; SILVA, E. M.; MILAGRES, A. M. F. Degradation of eucalypt waste components by

Lentinula edodes strains detected by chemical and near-infrared spectroscopy methods. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 141, p. 37-49, 2007.

BRIENZO, M.; SIQUEIRA, A. F.; MILAGRES, A. M. F. Search for optimum conditions of sugarcane bagasse hemicellulose extraction. **Biochemical Engineering Journal**, v. 46, p. 199-204, 2009.

FERNANDES, E. S. **Efeito da granulometria no pré-tratamento ácido, acessibilidade, superfície exposta da lignina e sacarificação enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. 2018.** Dissertação (Mestrado em Ciências (Microbiologia Aplicada)). Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", UNESP, Rio Claro, SP.

REIVINDICAÇÕES

1) **“MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE HEMICELULOSE POR ASSOCIAÇÃO DE PROCESSO BIOLÓGICO E QUÍMICO”**, mais precisamente trata-se da extração de xilana de biomassa lignocelulósica, caracterizado por o método de extração compreender a associação do pré-tratamento biológico com tratamento químico com as seguintes etapas:

- pré-tratamento biológico na decomposição do bagaço de cana-de-açúcar (não moído) empregando microrganismos de podridão branca;
- avaliação do grau de deslignificação do material para a verificação do efeito no processo de extração de xilana para o uso de menor carga de reagente químico e avaliação da digestibilidade enzimática do material pré-tratado;
- o tratamento químico compreendendo a extração da xilana com modificação na concentração pelo reagente peróxido de hidrogênio.

2) **“MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE HEMICELULOSE POR ASSOCIAÇÃO DE PROCESSO BIOLÓGICO E QUÍMICO”**, de acordo com a reivindicação 1 e numa opção preferencial, caracterizado por os microrganismos de podridão branca serem os fungos ‘*Coniophora puteana*’ (CBMAI 0870) e ‘*Gloeophyllum trabeum*’ (CBMAI 0872), ‘*Pleurotus ostreatus*’ (CCIBt 2338) e ‘*Aspergillus fumigatus*’.

3) **“MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE HEMICELULOSE POR ASSOCIAÇÃO DE PROCESSO BIOLÓGICO E QUÍMICO”**, de acordo com a reivindicação 1 e numa opção de solução, caracterizado por o pré-tratamento biológico do método de extração de hemicelulose compreender as seguintes etapas:

- a) os fungos como ‘*Coniophora puteana*’ (CBMAI 0870) e ‘*Gloeophyllum trabeum*’ (CBMAI 0872), ‘*Pleurotus ostreatus*’ (CCIBt 2338) e ‘*Aspergillus fumigatus*’ são cultivadas em placas de Petri contendo 25 mL de meio Ágar Batata Dextrose (BDA) e mantidas a uma temperatura constante de 25 °C por períodos de 07 a 15 dias;
- b) a umidade do bagaço de cana-de-açúcar sendo cerca de 75 %;
- c) invólucros, do tipo sacos de polipropileno, são preparados contendo cerca de 250 g para receber os inóculos que compreende cerca de um terço do micélio fúngico crescido na placa de Petri por cerca de 15 dias; para inoculação emprega-se um tubo Falcon formando um canal no centro do material contido no invólucro;

d) os sacos são fechadas e autoclavadas duas vezes à temperatura de 121 °C e 1 atm de pressão por 1 h em intervalos de 24 h;

e) os invólucros inoculados são então incubados a 25 °C por um período de 1 a 5 meses, em estufa incubadora para análise de demanda bioquímica de oxigênio (BOD); utiliza-se 3 sacos por análise até o quinto mês (total 15 sacos para cada micro-organismo); as análises acontecem após 30, 60, 90, 120 e 150 dias de incubação;

d) após o período de crescimento do micélio, realiza-se os experimentos de extração de xilana e caracterização química.

4) **“MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE HEMICELULOSE POR ASSOCIAÇÃO DE PROCESSO BIOLÓGICO E QUÍMICO”**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por processo químico de extração de xilana, realizado posteriormente ao pré-tratamento biológico, compreender:

aa) extração de xilana realizada com o bagaço *in natura* e pré-tratado, baseada em método otimizado para bagaço de cana-de-açúcar, com modificação na concentração de reagente peróxido de hidrogênio bagaço sem estar moído, cujo tamanho de partícula tem predominância de retenção em 16 mesh (malha);

bb) uma amostra de 10 g da biomassa é tratada com peróxido de hidrogênio 3 % ou 6 % em meio alcalino com o pH ajustado para 11,6 com NaOH 5 mol/L, em um volume de reação de 200 mL; a suspensão é agitada a 110 rpm por 4 h e depois foi filtrada, e o resíduo insolúvel (fração sólida) é lavado e utilizado para hidrólise enzimática para produção de açúcar fermentável;

cc) o líquido sobrenadante tem seu pH ajustado para 6 com HCl 6 mol/L, e depois concentrado a cerca de um terço do seu volume em estufa sob circulação de ar a 50 °C; na amostra concentrada é adicionado etanol 96 % para precipitar a xilana, a qual foi lavada cerca de quatro vezes com etanol 70 %;

dd) a hemicelulose decantada é seca em estufa por circulação de ar a 50 °C e depois pesada e armazenada em frascos plásticos;

5) **“MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE HEMICELULOSE POR ASSOCIAÇÃO DE PROCESSO BIOLÓGICO E QUÍMICO”**, de acordo com as reivindicações anteriores, caracterizado por tratamento biológico para a deslignificação da biomassa lignocelulósica gerar

modificação no teor dos carboidratos e lignina presentes na parede celular.

6) **“MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE HEMICELULOSE POR ASSOCIAÇÃO DE PROCESSO BIOLÓGICO E QUÍMICO”**, de acordo com as reivindicações de 1, 2, 3 e 4, caracterizado por a redução na recalcitrância da biomassa basear-se na extração de xilana após o pré-tratamento biológico relacionado ao *C. puteana* com peróxido de hidrogênio 3 % (0,71 g de xilana extraída) compor resultados semelhantes ao tratamento com 6 % (0,82g de xilana extraída).

7) **“MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE HEMICELULOSE POR ASSOCIAÇÃO DE PROCESSO BIOLÓGICO E QUÍMICO”**, de acordo com as reivindicações 1, 2, 3 e 4, caracterizado por extração de xilana após o tratamento com *G. trabeum* e *C. puteana* apresentar resultados a 99,74 %.

8) **“MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE HEMICELULOSE POR ASSOCIAÇÃO DE PROCESSO BIOLÓGICO E QUÍMICO”**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por método de extração pode ser aplicado a qualquer hemicelulose, considerando diferentes fontes de biomassa lignocelulósica como madeira dura, madeira mole, gramíneas ou resíduos orgânicos industriais.

FIG.1

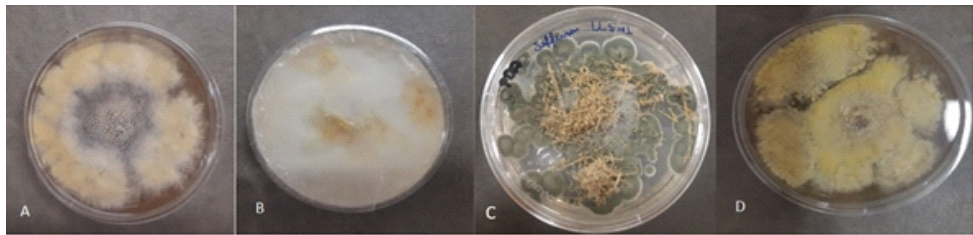


FIG.2

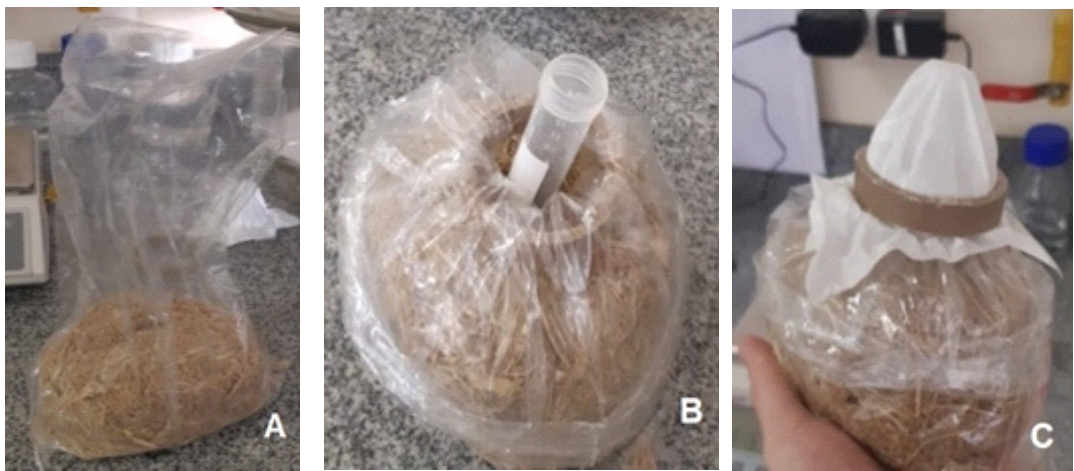


FIG.3

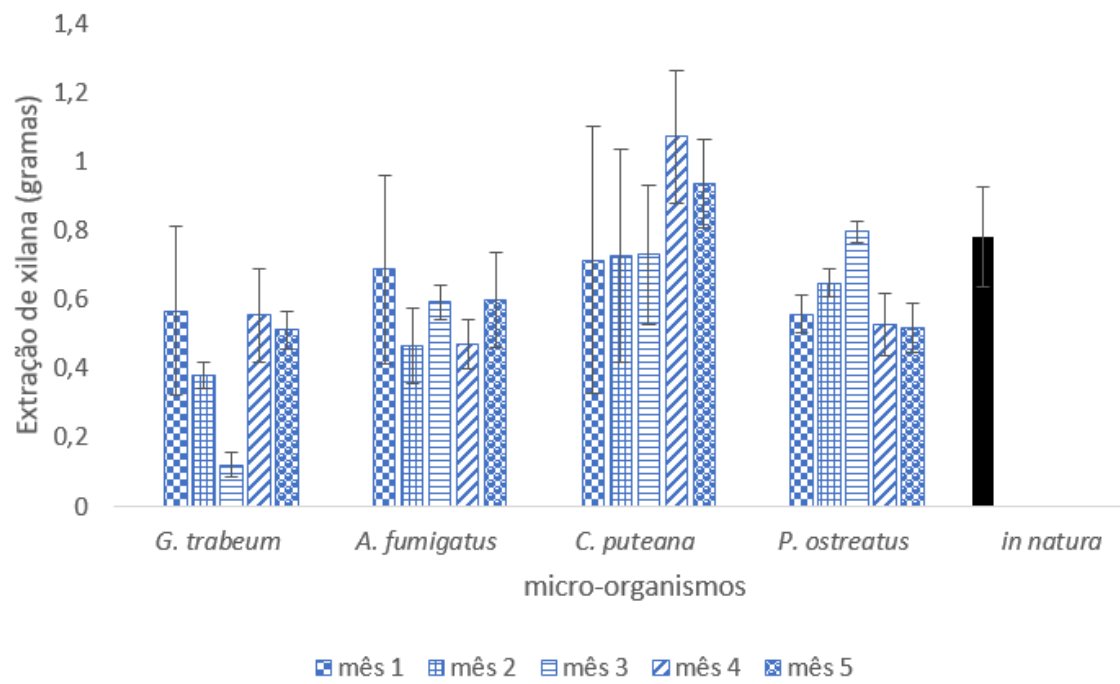


FIG.4

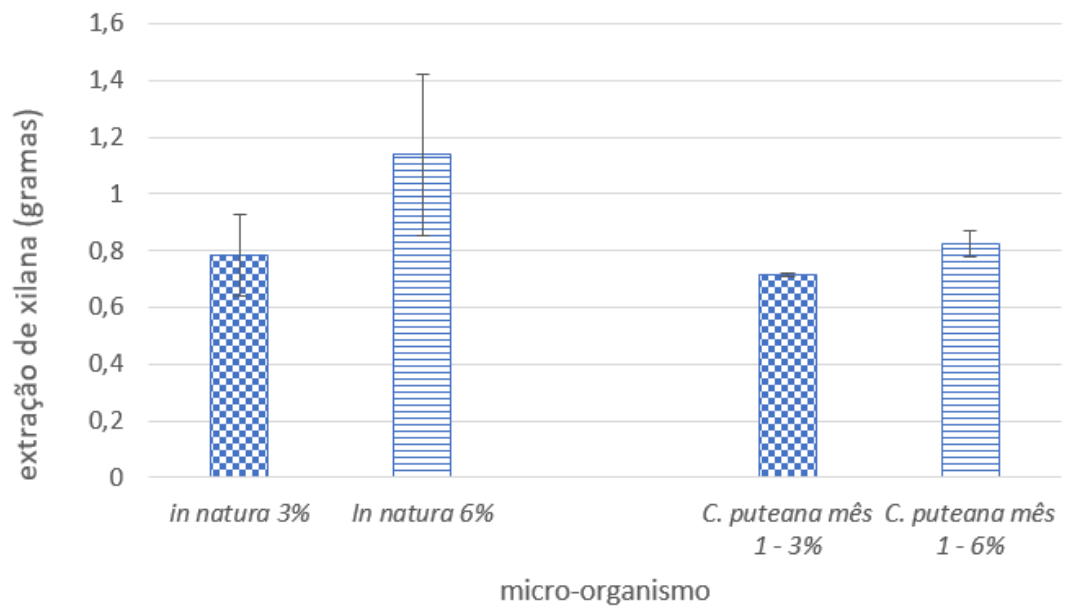


FIG.5

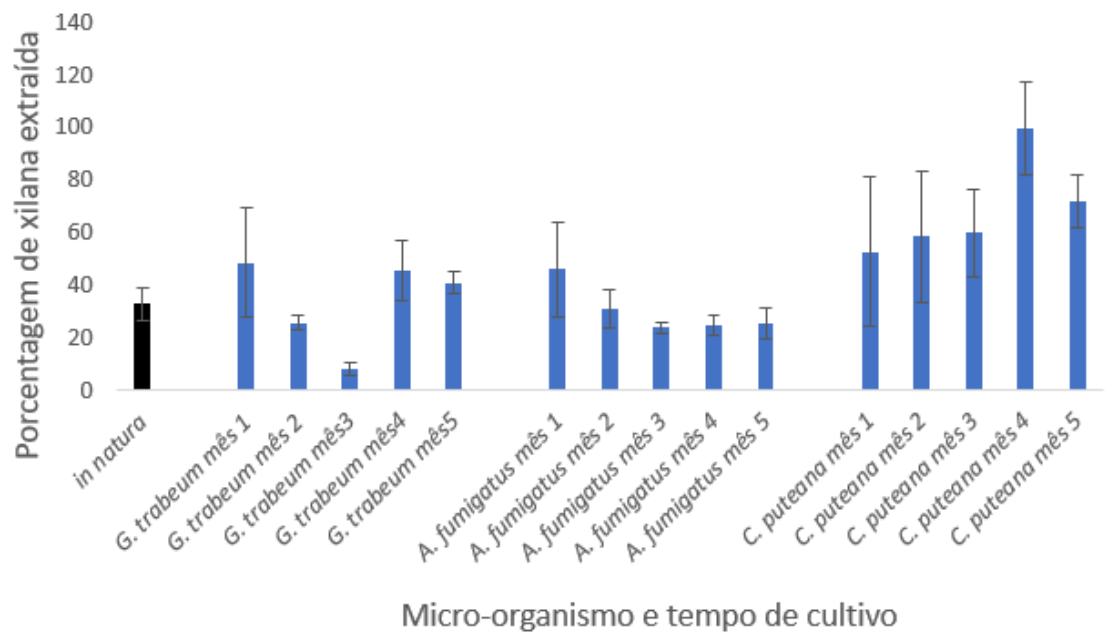
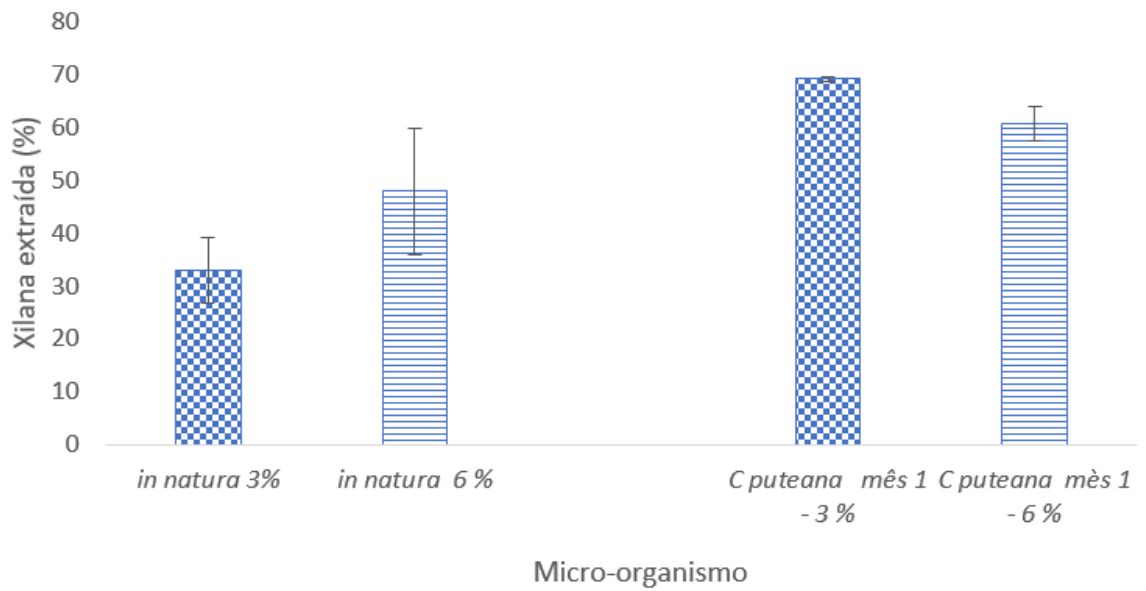


FIG.6



RESUMO

“MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE HEMICELULOSE POR ASSOCIAÇÃO DE PROCESSO BIOLÓGICO E QUÍMICO”.

Trata-se de método de extração de hemicelulose, especificamente, extração de xilana de biomassa lignocelulósica; dito método de extração de hemicelulose compreende a associação do pré-tratamento biológico com tratamento químico para o aumento da extração de xilana de material lignocelulósico; dito pré-tratamento biológico é previamente executado ao tratamento químico na decomposição do bagaço de cana-de-açúcar avaliando o grau de deslignificação do material para a verificação do efeito no processo de extração de xilana para o uso de menor carga de reagente químico, bem como avalia-se digestibilidade enzimática do material pré-tratado; dito pré-tratamento biológico emprega fungos que provoca alteração na composição da lignina e/ou do material, e conseqüente diminuição da recalcitrância da biomassa resultando em maior rendimento na extração de hemicelulose.