

Trabalho de Conclusão de Curso

Curso de Graduação em Engenharia Ambiental

**APROVEITAMENTO DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA COMO FONTE DE
EXTRAÇÃO DE HEMICELULOSE PARA USO COMO SUBSTRATO PARA
ATIVIDADE DE XILANASE**

Renato Henrique Calore

Prof. Dr. Michel Brienzo

Rio Claro (SP)

2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Instituto de Geociências e Ciências Exatas

Campus de Rio Claro

RENATO HENRIQUE CALORE

APROVEITAMENTO DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA
COMO FONTE DE EXTRAÇÃO DE HEMICELULOSE PARA
USO COMO SUBSTRATO PARA ATIVIDADE DE XILANASE

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Geociências e Ciências Exatas - Câmpus de Rio Claro, da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, para obtenção do grau de Bacharel em Engenharia Ambiental.

Rio Claro - SP

2022

C165a Calore, Renato Henrique
Aproveitamento de biomassa lignocelulósica como fonte de
extração de hemicelulose para uso como substrato para atividade de
xilanase / Renato Henrique Calore. -- Rio Claro, 2022
51 p.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Engenharia
Ambiental) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de
Geociências e Ciências Exatas, Rio Claro
Orientador: Michel Brienzo

1. Xilana. 2. Biomassa Lignocelulósica. 3. Xilanase. 4.
Hemicelulose. 5. Pré Tratamento Alcalino. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de
Geociências e Ciências Exatas, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

RENATO HENRIQUE CALORE

APROVEITAMENTO DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA COMO FONTE DE EXTRAÇÃO DE HEMICELULOSE PARA USO COMO SUBSTRATO PARA ATIVIDADE DE XILANASE

Trabalho de Formatura apresentado ao Instituto de Geociências e Ciências Exatas
- Câmpus de Rio Claro, da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho,
para obtenção do grau de Engenheiro Ambiental.

Comissão Examinadora

Michel Brienzo (orientador)

Caroline de Freitas

Rosangela Almeida Maia

Rio Claro, 28 de julho de 2022.



Assinatura do(a) aluno(a)



assinatura do(a) orientador(a)

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo, eu agradeço a Deus por me amparar durante todos esses anos e me dar forças quando mais foi preciso.

Agradeço, também meus pais que sempre me apoiaram e me permitiram estudar, oferecendo todo o suporte necessário.

Agradeço meus avós que participaram ativamente na minha criação, amparando meus estudos e guiando meu caminho.

Agradeço à Unesp por me permitir cursar a graduação gratuitamente, me oferecendo diversas oportunidades.

Agradeço aos meus professores, que se desdobraram durante o período de pandemia para continuar oferecendo as disciplinas da forma mais competente possível.

Agradeço meu orientador por me acolher no caminho da iniciação científica, estando sempre disponível para responder dúvidas e auxiliar na produção dos meus trabalhos acadêmicos.

Agradeço a todos os meus colegas de laboratório que compartilharam conhecimento comigo, me ajudando a desenvolver meu trabalho e evoluir.

Agradeço aos meus colegas de turma que estiveram comigo durante esse período, interagindo e me auxiliando de diversas maneiras.

RESUMO

CALORE, R.H. **Aproveitamento De Biomassa Lignocelulósica Como Fonte de Extração de Hemicelulose Para Uso Como Substrato Para Atividade de Xilanase.** 2022. Trabalho de Formatura apresentado ao Instituto de Geociências e Ciências Exatas - Campus de Rio Claro, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Engenheiro Ambiental. Rio Claro, 2022.

As hemiceluloses são moléculas de grande interesse, seja pela indústria ou pelo setor de pesquisa. Elas são compostas por pentoses e hexoses formando cadeias heterogêneas que atuam, em conjunto com a lignina, para a proteção da celulose na parede celular vegetal, concedendo resistência física e bioquímica. Essas moléculas podem ser extraídas de todos os materiais de origem lignocelulósica e podem ser aproveitados de diferentes maneiras, desde sua transformação a compostos para a indústria farmacêutica como prebióticos ou mesmo para a produção de filmes poliméricos. Dessa forma, o objetivo do trabalho foi explorar a extração de hemicelulose de 6 fontes de biomassa de origem lignocelulósica (bagaço de cana-de-açúcar, folha de cana-de-açúcar, palha de milho, pseudocaule de bananeira, bagaço de goiaba e bagaço de laranja), identificando sua composição e aplicabilidade como substrato em laboratório para a atividade enzimática, usando 2 coquetéis enzimáticos diferentes da marca Novozymes (Celluclast e Cellic HTEC). Os resultados sugerem que as melhores fontes de biomassa são o bagaço e a folha da cana-de-açúcar. As hemiceluloses extraídas desses materiais apresentaram bons resultados em todos os testes de determinação de atividade de xilanase

Palavras-Chave: Xilana; Biomassa Lignocelulósica; Xilanase; Hemicelulose; Pré Tratamento Alcalino.

ABSTRACT

CALORE, R.H. **Aproveitamento De Biomassa Lignocelulósica Como Fonte de Extração de Hemicelulose Para Uso Como Substrato Para Atividade de Xilanase.** 2022. Trabalho de Formatura apresentado ao Instituto de Geociências e Ciências Exatas - Campus de Rio Claro, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Engenheiro Ambiental. Rio Claro, 2022.

The hemicelluloses are molecules of great interest that can be used on the industry or in the research field. They are pentoses and hexoses that form heterogeneous chains that act, together with lignin, to protect the plant, granting physical and biochemical resistance to its cell wall. Those molecules can be extracted from all lignocellulosic biomasses and can be used in different ways, transformed into prebiotics by the pharmaceutical industry or as substrate to produce polymeric films. The goal of this research was exploring the extraction of hemicellulose from 6 different biomasses of lignocellulosic origin (sugarcane bagasse, sugarcane leaves, corn stove, banana pseudostem, guava bagasse and orange bagasse), identifying their composition and applying those hemicelluloses as substrate for xylanase activity in laboratory, using 2 different enzyme blends from Novozymes (Celluclast and Cellic HETC), to produce reducing sugars. The results of the research suggest that the sugarcane biomasses were the best source to extract hemicelluloses for laboratorial purposes. The hemicelluloses extracted from the leaves and the bagasse shows great results in all the tests.

Keywords: Xylan; Lignocellulosic Biomass; Xylanase; Hemicellulose; Alkaline Pre-Treatment.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3-1 Modelo esquemático da biomassa lignocelulósica	13
Figura 3-2 - Modelo de polimerização da celulose	14
Figura 3-3 Diferentes tipos de hemicelulose	15
Figura 3-4 Estrutura de uma cadeia de Xilana com alguns grupos acoplados.....	15
Figura 3-5 Exemplo de uma arabinoxilana e possíveis atuações enzimáticas.....	16
Figura 3-6 Polimerização de uma cadeia de xilanas	17
Figura 3-7 Exemplo esquemático da manana comercial obtida através da <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.....	18
Figura 3-8 Monômeros formadores das ligninas.....	19
Figura 3-9 Efeito da aplicação de um pré-tratamento	20
Figura 5-1 Estudo da Cinética Enzimática - Bagaço de Cana-de-açúcar	34
Figura 5-2 Estudo da cinética enzimática - Linearizado - Bagaço de cana-de-açúcar.....	35
Figura 5-3 Estudo da cinética enzimática - Bagaço de cana-de-açúcar.....	35
Figura 5-4 Estudo da cinética enzimática - linearizado - bagaço cana-de-açúcar	35
Figura 5-5 Estudo da cinética enzimática - linearizado - bagaço de goiaba	36
Figura 5-6 Estudo da cinética enzimática - linearizada - bagaço de goiaba	36
Figura 5-7 Estudo da cinética enzimática - bagaço goiaba	36
Figura 5-8 Estudo da cinética enzimática - linearizado - bagaço de goiaba	37
Figura 5-9 Estudo da cinética enzimática - bagaço de laranja.....	37
Figura 5-10 Estudo da cinética enzimática – linearizado – bagaço de laranja...37	37
Figura 5-11 Estudo da cinética enzimática - Folha da cana-de-açúcar	38
Figura 5-12 Estudo da cinética enzimática - linearizada - folha de cana-de-açúcar	38
Figura 5-13 Estudo da cinética enzimática - folha de cana-de-açúcar	39
Figura 5-14 Estudo da cinética enzimática - linearizado - folha da cana-de-açúcar	39
Figura 5-15 Estudo da cinética enzimática - palha de milho	40
Figura 5-16 Estudo da cinética enzimática - linearizada - palha de milho.....	40
Figura 5-17 Estudo da cinética enzimática - palha de milho	40
Figura 5-18 Estudo da cinética enzimática - linearizado - palha de milho	41

Figura 5-19 Estudo da cinética enzimática - pseudocaule de bananeira	41
Figura 5-20 Estudo da cinética enzimática - linearizado - pseudocaule de bananeira	41
Figura 5-21 Estudo da cinética enzimática - pseudocaule de bananeira	42
Figura 5-22 Estudo da cinética enzimática - linearizado - pseudocaule de bananeira	42
Figura 5-23 Vmax estimado - Cellic HTEC.....	43
Figura 5-24 KM estimado - Cellic HTEC	43
Figura 5-25 Vmax estimada - Celluclast	44
Figura 5-26 KM estimada - Celluclast	44

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Concentrações de açúcares observadas pelo método hplc.....	27
Gráfico 2 - Porcentagem de hemicelulose extraída (% , relação a massa total) .	29
Gráfico 3 - Parcela de lignina residual (% m/m).....	30
Gráfico 4 - Solubilidade da hemicelulose em tampão de acetato (pH 4,8)	32
Gráfico 5 - Concentração de xilose (mM) obtida após reação enzimática	33

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS.....	12
2.1. Objetivos específicos	12
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
3.1. Biomassa Lignocelulósica	13
3.2. Celulose	14
3.3. Hemicelulose	14
3.3.1. Xilose	16
3.3.2. Manose	18
3.3.3. Arabinose	18
3.4. Lignina	19
3.5. Solubilização da Hemicelulose	20
3.6. Métodos Físicos	20
3.7. Métodos Químicos	21
4. MATERIAIS E MÉTODOS	22
4.1. Extração da Hemicelulose.....	22
4.2. Determinação da atividade enzimática.....	23
4.3. Afinidade entre enzima e substrato.....	24
4.4. Determinação de lignina residual	25
4.5. Solubilidade da hemicelulose	25
4.6. Caracterização química	26
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	26
5.1. Caracterização das hemiceluloses	26
5.2. Extração da hemicelulose	28

5.3. Lignina residual.....	30
5.4. Solubilidade das hemiceluloses	31
5.5. Determinação da atividade enzimática.....	32
5.6. Estudo da cinética enzimática	33
5.6.1. Bagaço de Cana de Açúcar	34
5.6.2. Bagaço de Goiaba	36
5.6.3. Bagaço de Laranja.....	37
5.6.4. Folha de cana-de-açúcar	38
5.6.5. Palha de Milho	39
5.6.6. Pseudocaule de Bananeira.....	41
5.7. Cálculo das Vmax e Kms	42
6. CONCLUSÃO	45
7. BIBLIOGRAFIA:	47

1. INTRODUÇÃO

O estudo das hemiceluloses vem se desenvolvendo nos últimos tempos. Isso ocorre, pois, esse grupo de moléculas apresenta características muito interessantes e distintas, resultando no ganho de interesse em seu estudo. As hemiceluloses são um grupo de moléculas heterogêneas formadas por cadeias de 5 ou 6 carbonos. Correspondem à cerca de 15 % a 35 % da massa dos vegetais. Devido a esse interesse no estudo da molécula existem diversos trabalhos que pesquisam novas fontes de extração de hemicelulose. Algumas biomassas que podem ser citadas são o bagaço e palha da cana-de-açúcar (BRIENZO et. al., 2009), madeiras duras e moles (WANG et. al., 2015) e alguns grãos tais como soja e milho (CORREDOR et. al., 2008; BERNAL et. al., 2014).

Em muitos estudos é realizada a extração de hemicelulose a partir de biomassas lignocelulósicas, em especial de materiais provenientes de resíduos da indústria agrícola, tal como a cana-de-açúcar. Nesses trabalhos ocorre a avaliação de questões como a solubilidade e taxa de conversão da biomassa bruta em hemicelulose. Além de estudar taxa de conversão e sua solubilidade, esses trabalhos costumam realizar experimentos envolvendo a exposição de cadeias de hemicelulose à reação de enzimas, como substrato para determinação da atividade enzimática, em especial as xilanases que atuam diretamente nas xilanas, a hemicelulose mais abundante em gramíneas.

A xilana é, em sua forma natural de polissacarídeo, um material muito versátil (FREITAS et al., 2019). A xilana pode ser agregada como macromolécula na produção de papel, pode ser hidrolisada e utilizada na indústria farmacêutica como um poderoso prebiótico ou mesmo ter sua longa cadeia quebrada em monômeros para utilização na indústria química na produção de xilitol, por exemplo.

A quebra dessas longas cadeias em monômeros costuma ser realizada por enzimas que atacam especificamente as ligações glicosídicas, quebrando as polioses em monômeros de xilose e demais açúcares que compõem as hemiceluloses. Esse processo gera uma nova área de interesse dentro do estudo das hemiceluloses, a avaliação da atividade enzimática. Outro valor essencial das hemiceluloses é em laboratórios de pesquisa como substrato para realização de experimentos de hidrólise

enzimática, avaliando as enzimas mais eficientes em realizar a quebra desse polissacarídeo.

Considerando todas essas informações é necessário pesquisar, entre diversos materiais, quais as melhores biomassas para extração, destacando a quantidade e qualidades de cada hemicelulose extraída.

2. OBJETIVOS

O intuito deste trabalho é realizar um estudo comparativo entre diferentes biomassas, extraindo hemicelulose e comparando questões de quantidade, taxa de conversão, qualidade, pureza e eficiência para atividades enzimáticas elencando quais biomassas apresentam melhor desempenho.

2.1. Objetivos específicos

- a) Extrair hemiceluloses da folha e bagaço de cana-de-açúcar, pseudocaule de bananeira, bagaço de laranja, bagaço de goiaba e palha do milho e determinar taxa de conversão da biomassa bruta em hemicelulose;
- b) Realizar a hidrólise das hemiceluloses obtidas e mensurar a velocidade de conversão em xilose;
- c) Determinar a afinidade enzima x substrato para cada par de hemicelulose e enzima;
- d) Determinar a solubilidade e o grau de pureza das hemiceluloses obtidas, avaliando a quantidade de lignina residual;
- e) Determinar a composição química das hemiceluloses que compõem o material extraído;

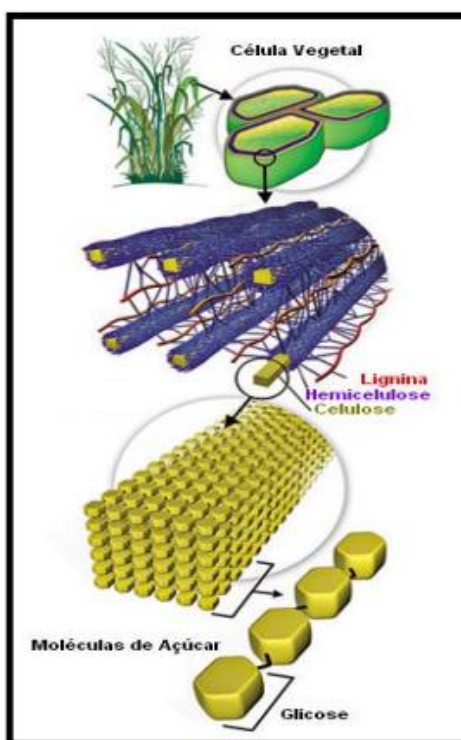
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Biomassa Lignocelulósica

A biomassa de origem lignocelulósica é um material muito abundante pois se trata de qualquer resíduo de origem vegetal, desde restos da produção agrícola até resíduos da poda de árvores. Essa biomassa é composta por celulose, hemicelulose e lignina. A junção desses 3 materiais forma uma estrutura cristalina extremamente estável que protege a planta da ação de fenômenos físicos e bioquímicos, preservando a integridade do vegetal (RESENDE, R.R.; SOCCOL, C.R., 2016).

A figura 3.1 corresponde à representação estrutural da interação entre a celulose, hemicelulose e lignina.

Figura 3-1 Modelo esquemático da biomassa lignocelulósica



FONTE: Santos et. al., 2012

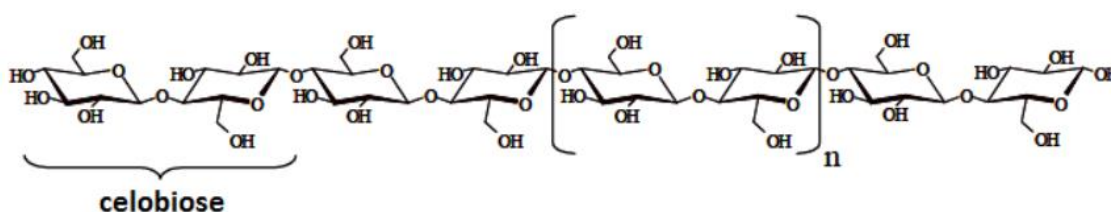
Nessa imagem pode-se ver que a celulose é protegida por uma estrutura formada por cadeias polimerizadas de hemicelulose, que por sua vez são estruturadas por ligninas, formando uma barreira bastante eficiente para a proteção da parede celular vegetal.

3.2. Celulose

A celulose é um polissacarídeo de cadeia longa composto por apenas um único monossacarídeo, a glicose (YANG et al., 2007). Essa cadeia longa é o principal componente das fibras vegetais. Devido à sua importância, costuma compor metade de toda matéria vegetal, sendo a outra metade composta por hemicelulose, lignina e demais componentes.

As fibras são formadas por ligações β -1,4.glicosídicas entre as hexoses da celulose. Esse tipo de polimerização entre as hexoses da celulose é chamado de celobiose (RAMOS, 2003). Na figura 3.2 é apresentado o modelo de polimerização das moléculas de celulose.

Figura 3-2 - Modelo de polimerização da celulose



Fonte: Tímár-Balázs & Eastop (1998).

3.3. Hemicelulose

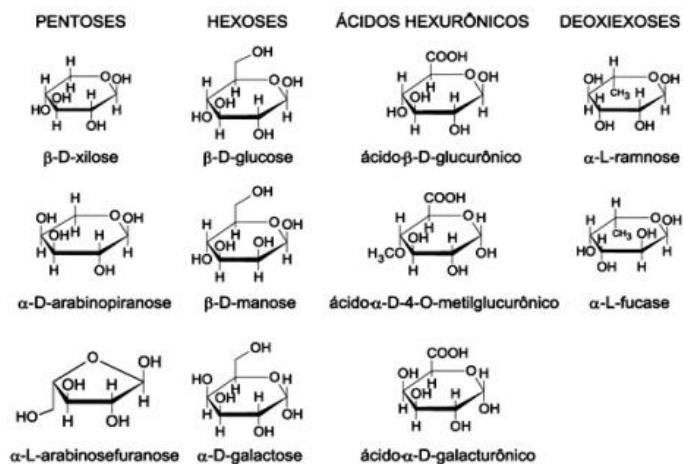
As hemiceluloses são uma classe de polissacarídeos muito abundantes na matéria vegetal. Cerca de 20 % a 30 % da composição do vegetal são as hemiceluloses (OGEDA, 2010).

Diferentemente das celulosas, as hemiceluloses não constituem um grupo único, mas sim uma classe de compostos macromoleculares distintos (MARABEZI, 2009).

As hemiceluloses são macromoléculas compostas por diferentes monômeros. Na figura 3.3 são apresentados os diferentes exemplos de monômeros que podem compor as hemiceluloses, entretanto é possível encontrar outros monômeros, além dos citados compondo as cadeias de hemiceluloses (OGATA, 2013). Nas figuras 3.4

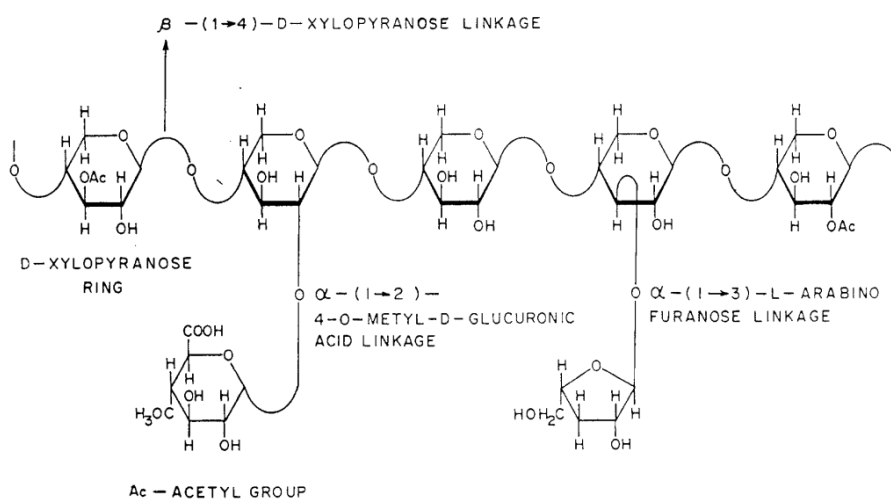
e 3.5 são apresentados exemplos de hemiceluloses que podem ser formados a partir dos monômeros.

Figura 3-3 Componentes da hemicelulose



Fonte: Ogata, 2013.

Figura 3-4 Estrutura de uma cadeia de Xilana com alguns grupos pendentes



Fonte: Beily, 1985 apud Bastawde, 1992

funcionais, os prebióticos e como aditivo em rações para animais domésticos e peixes. Na indústria farmacêutica a xilose é usada como controle para obesidade, tratamento de infecções que acometem o sistema gastrointestinal, agente ativo para o tratamento da osteoporose, no tratamento de otites, e demais disfunções na pele e cabelo. Já na agricultura a xilose pode ser utilizada ainda polimerizada, na forma de xilana, sendo aplicada como estimulante e acelerador de crescimento (VÁZQUEZ et al., 2000).

Outro subproduto bastante importante da xilose é o xilitol. O xilitol é um álcool obtido a partir da metabolização da xilose através da enzima xilose redutase. Esse composto tem um grande valor agregado devido sua alta aplicabilidade. Dentre vários estudos destaca-se a aplicação como adoçante e possui propriedade anticariogênica, sendo bastante empregado em dietas dietéticas. Além dessas propriedades o xilitol ainda pode ser como insumo para a indústria do papel e do fumo, bem como ser usado para fabricar filmes e resinas (SILVA et al., 2009).

Já na indústria do papel o estudo da xilana acaba por ter um papel essencial ao produzir a polpa de eucalipto. Uma parte significativa dessa polpa é composta por hemicelulose, que por sua vez possui a xilose como seu principal monômero de composição, portanto, a presença dessa molécula influencia diretamente no rendimento do material e nas características físicas do produto. Estudos indicam que a presença de xilose, ainda que em sua forma polimerizada, na produção de papeis tipo P&W representa um aumento no rendimento do produto, acondiciona melhores características físicas ao produto e reduz o consumo energético necessário para refinar a polpa (GOMES et al., 2015).

A figura 3.6 representa um possível exemplo de polimerização de uma cadeia de hemicelulose a partir de monômeros de xilose. Além desse modelo linear, podem existir outros grupos anexados à estrutura central, representando as ligninas ou outros monômeros constituintes das hemiceluloses, gerando diferentes tipos de hemiceluloses, tal como as xilanas e as arabinoxilanas.

Figura 3-6 Polimerização de uma cadeia de xilana



R = xylan chain

Fonte: Adaptado de Martins et al., 2022.

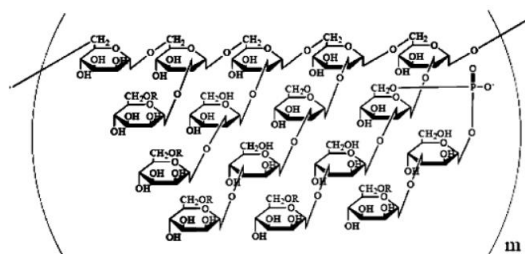
3.3.2. Manose

A manose é uma hexose presente na composição das hemiceluloses e é encontrada em menor abundância que a xilose. Na figura 3.7 é apresentado uma hemicelulose a qual o maior constituinte é a manose, no caso, a manana.

Similarmente a xilose, a manose também possui suas aplicações voltadas para a área farmacêutica.

Usualmente, as manoses são usadas como tratamentos alternativos, em especial para infecções no trato urinário. Entretanto, estudos mais recentes também indicam que a manose tem outras utilidades. Santos (2021) indica que a manose possui capacidades anti-inflamatórias. Já Sandoval et al. (2015) descreve que a associação da manose com vitamina C e ácido hialurônico fragmentado pode ter efeitos positivos para o tratamento do envelhecimento da pele.

Figura 3-7 Exemplo esquemático da manana comercial obtida através da *Saccharomyces cerevisiae*



Fonte: Giacomolli Junior, 2015.

3.3.3. Arabinose

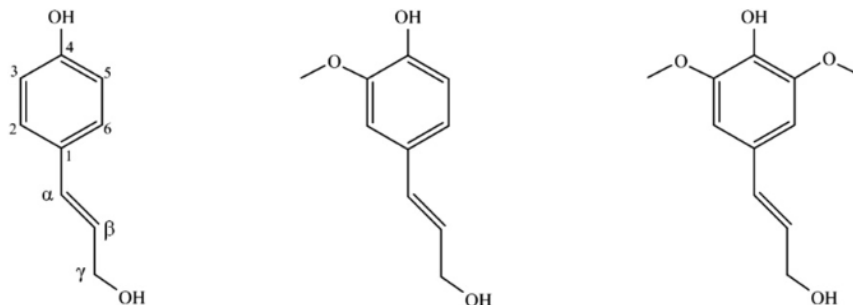
A arabinose é uma pentose com um grupo funcional aldeído acoplado, usualmente estando associada com cadeias de xilose formando arabinoxilanas, por exemplo. Essa molécula costuma ser utilizada na indústria como fonte de carbono para produção de outros subprodutos. Existem diversas pesquisas a respeito da produção de etanol de segunda geração. Jansen (2017) procurou desenvolver uma cepa de *Saccharomyces cerevisiae* com capacidade de fermentar a arabinose em etanol, como uma alternativa energética de baixo carbono. Além da aplicação para produção

energética, a arabinose pode ser utilizada como substrato para produção de enzimas. Oliveira (2019) descreve a produção de D-Tagatose catalisada pela enzima L-Arabinose isomerase. A D-Tagatose é um açúcar com alto poder adoçante e de baixa caloria, sendo bastante aproveitado em dietas diabéticas voltadas para a doença do tipo II.

3.4. Lignina

As ligninas são copolímeros amorfos formados a partir da polimerização aleatória de 3 monômeros primários fenilpropanos sendo eles os álcoois para-cumarílico, coniferílico e sinapílico, contendo de zero, um e dois grupos metoxila, respectivamente (AZADI et al., 2013). Na figura abaixo são exibidos esses monômeros respectivamente da esquerda para a direita.

Figura 3-8 Monômeros formadores das ligninas



Fonte: Azadi (2013)

As ligninas podem ser muito diversas, variando de acordo com a biomassa onde são encontradas. Nas madeiras moles (coníferas) a taxa de ligninas é de 27 a 33 %. Nas madeiras duras (eucaliptos) essa taxa decai para 18 a 25 %. Já nas gramíneas a concentração de ligninas é de 17 a 24 % (AZADI et al., 2013).

As ligninas, diferentemente das celulosas e hemicelulosas, possuem diversos tipos de ligação, sendo as mais comuns as ligações de éter, compondo cerca de dois terços das ligações de uma lignina.

A lignina tem várias funções na parede vegetal. Quando na camada mais externa a lignina tem função de segurar as células adjacentes juntas. Essa interação com as paredes celulares oferece rigidez através das ligações químicas com as microfibras

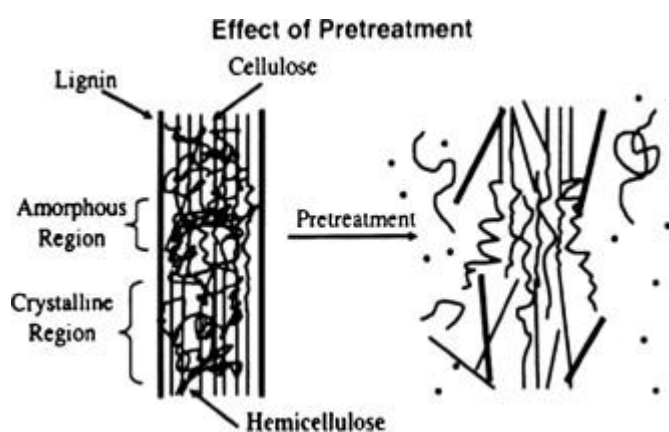
de hemicelulose e celulose. As ligninas ainda oferecem outras características, tal como resistência a ataques biológicos, impermeabilidade de água, resistência à decomposição e absorção de raios ultravioleta (AZADI et al., 2013).

3.5. Solubilização da Hemicelulose

A hemicelulose se junta com a celulose e a lignina para formar uma estrutura resistente à degradação química e física. Para permitir seu uso, é necessário que esta seja solubilizada. Para isso são usadas técnicas de tratamento químico, e biológico (FELIPUCI et al., 2021). Com a hemicelulose solubilizada, ocorre um aumento na área de superfície e redução da cristalinidade, ocasionando em um ganho de eficiência na atuação das enzimas (McMILLAN, 1994). Segundo Barreto (2009) os métodos de pré-tratamento podem ser distribuídos em 3 tipos, os físicos, os químicos e os físico-químicos.

Na figura 3.9 é apresentada a estrutura de uma parede vegetal que sofreu um pré-tratamento. As parcelas de hemicelulose, lignina e celulose foram separadas e expostas ao meio, tornando-se disponíveis para utilização. Cada tratamento tem uma abordagem diferente, possibilitando acessar diferentes moléculas de interesse descartando as demais.

Figura 3-9 Efeito da aplicação de um pré-tratamento



Fonte: Balat (2011), Métodos Físicos

Uma das formas de acessar as hemiceluloses é através dos métodos físicos. Monteiro et al. (2021) utilizou um método de fluxo contínuo para extrair xilooligosacarídeos. Observa-se que nesse método, o pH do meio sofre alteração que ocorre naturalmente devido à quebra das cadeias de hemicelulose e liberação de

grupos acetil no meio, reagindo com a água e liberando hidrônio no processo. Esse processo catalisa a reação de despolimerização da hemicelulose, possibilitando uma reação em cadeia. A característica do uso desse método é liberar hemicelulose despolimerizada, sendo o foco o aproveitamento do monômero.

3.6. Métodos Químicos

Para isolar a hemicelulose da biomassa podem ser usados métodos alcalinos e ácidos (XU et al., 2006), com ou sem associação de peróxido de hidrogênio (LEE et al., 2009; SUN et al., 2004).

No método alcalino são usados, usualmente, hidróxidos de sódio, potássio, cálcio e amônio. O uso desses alcalinos ocasiona na degradação dos ésteres e cadeias glicolíticas além de ocasionar a degradação de parte da lignina. Essa quebra das cadeias gera a descristalização da celulose e solubilização da hemicelulose (BRODEUR et al., 2011).

Além da ação das bases pode ser adicionado oxigênio no meio para oxidar os compostos dissolvidos na água. Essa oxidação é usada para fracionar as parcelas de material lignocelulósico através da solubilização da hemicelulose e remoção da lignina (BRODEUR et al., 2011).

Brienzo (2009) utilizou a associação de um tratamento alcalino, regulando o pH do meio usando NaOH, com a adição de um agente oxidativo, no caso o peróxido de hidrogênio, obtendo resultados de recuperação de até 94.6 % da hemicelulose a partir da biomassa de cana-de-açúcar.

Já Martínez-Patiño et al. (2017) usou uma associação de tratamento ácido, aplicando diferentes concentrações de ácido sulfúrico, e tratamento térmico, realizando a autoclave por diferentes tempos das porções de biomassa estudadas. Como resultados ele obteve uma taxa máxima de recuperação de 73 % dos açúcares de hemicelulose. Devido à natureza do método, foi possível perceber que as cadeias de hemicelulose eram hidrolisadas, liberando monômeros de xilose, galactose, arabinose e manose.

3.7. Xilanases

As xilanases são enzimas que possuem a capacidade de catalisar a hidrólise das ligações glicosídicas β -1,4 da cadeia principal de xilanas, reduzindo seu grau de polimerização (POLIZELI et al., 2015). Existem diversos tipos de xilanases, sendo as endo-(1,4)- β -xilanases e as β -xilosidases as principais enzimas responsáveis pela hidrólise das xilanas (GOSWAMI; RAWAT, 2015).

Cada enzima atua diferentemente no substrato gerando diferentes subprodutos. No caso das endoxilanases, a enzima atua na cadeia principal gerando como subproduto xilo-oligosacarídeos, já as β -xilosidases atuam nos oligômeros de xilose de cadeia curta, liberando unidades de xilose (COLLINS et al, 2005; SOMERA et al, 2009).

Além da xilose, as cadeias de xilana costumam possuir grupos pendentes, sendo necessário o uso de e enzimas acessórias para remover esses grupos e liberar o monômero da xilose isolado. Alguns exemplos de enzimas são as acetil xilana esterases, que aemmm diretamente nos grupos de O-acetil, as ferulosil esterases, que atuam nas ligações de ésteres do ácido ferúlico, as glucuronidases, que hidrolisam as ligações do ácido glucurônico residual na xilose e as α -L-arabinofuranosidases, que atuam removendo as L-arabinoses que substituem os monômeros de xilose nas cadeias de xilana (DODD; CANN, 2010).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Extração da Hemicelulose

Inicialmente, as biomassas foram moídas com um moinho de facas, utilizando peneira de 20 mesh. Após fragmentadas, as biomassas passaram por um tratamento de etilenodiamina (EDTA) a uma relação de 0,2 % de massa por volume. Cada uma das 6 biomassas (bagaço de cana-de-açúcar, folha da cana-de-açúcar, bagaço de goiaba, bagaço de laranja, pseudocaule de bananeira e palha de milho) foi tratada

durante 1 hora, a uma temperatura de 90 °C para remoção de metais (FANG et. al., 1999).

Após processadas com o EDTA, foi adicionado 10 gramas de cada biomassa a 200 mL de solução de H₂O₂ 6 % (m/v). O pH dessa solução foi ajustado até 11,6 usando uma solução de NaOH 5 M. Esses frascos foram agitados a 80 rpm, por 4 horas.

Após as 4 horas de agitação, cada um dos frascos foi removido do agitador e seu conteúdo foi filtrado individualmente usando uma bomba de vácuo, separando a parcela sólida da líquida. A parcela sólida foi descartada e a parcela líquida teve seu pH ajustado para 6 usando HCl 6 M. Com o pH ajustado a fração líquida foi seca em estufa a 50 °C onde foi concentrado. Durante o processo de concentração a fração líquida perdeu boa parte de seu volume.

A fração líquida concentrada foi adicionado primeiramente 3 volumes de etanol 92 %. As lavagens ocorreram diariamente. Cada lavagem consistiu em adicionar uma quantidade de etanol, cerca de 200 mL, no frasco contendo o material que foi extraído. Cerca de 200 mL de etanol foi adicionado à fração líquida que foi concentrada na estufa. Após adicionar o etanol e agitar o conteúdo, a hemicelulose decanta para o fundo do frasco enquanto as porções de celulose e lignina são dissolvidas no etanol ou formam uma porção sobrenadante, que são removidas diariamente. A troca do etanol foi realizada a partir da remoção de uma parcela do etanol antigo e adição de uma solução nova, dessa vez a uma concentração de 70 % (v/v). Essas lavagens ocorriam de 4 a 5 vezes até a clarificação da hemicelulose extraída.

Após clarificado o material foi seco em estufa até massa constante. Por fim esse material foi moído e armazenado em tubos Falcon.

O processo todo foi realizado em triplicata para avaliar a constância da extração visto que o método utilizado foi otimizado visando aplicação na biomassa da cana-de-açúcar.

4.2. Determinação da atividade enzimática

O método usado para realizar as atividades enzimáticas foi a metodologia descrita por Bailey et al. (1992). O processo foi realizado aplicando 2 tipos de coquetéis enzimáticos, Celluclast e Celic HTEC, diluídos 1000 vezes, em soluções de hemicelulose de diferentes biomassas a uma concentração de 10 g/L (1 %), ambas as soluções foram preparadas em uma solução tampão de acetato de sódio com pH

previamente ajustado para 4,8 para garantir que a reação ocorreria em situação de grande eficiência. Esses 2 elementos foram adicionados em tubos de ensaio, na proporção de 900 μ L de solução e 100 μ L de enzima diluída, e aquecidos a 50 °C por 5 minutos. Após o tempo de reação os tubos de ensaio foram removidos do banho e foi adicionado 1,5 mL de ADNS. Por fim os tubos eram adicionados novamente em um banho, agora fervente para reagir com o ANDS por mais 5 minutos, nessa temperatura a reação enzimática para pois as enzimas são desnaturadas. Além dos tubos iniciais com enzima e solução, foram aquecidos tubos sem a enzima, sendo esta adicionada após o ADNS, para a segunda etapa de reação. Essas soluções serviam para o controle, balizando a quantidade de açúcares redutores inicialmente presente na solução, antes da atuação das enzimas na hemicelulose durante a primeira etapa de reação a 50 °C.

Foi medida a absorbância a 540 nm das reações e dos controles para estimar a quantidade de açúcares produzidos durante a reação. Esse número era estimado a partir da aplicação do resultado obtido no equipamento em uma curva padrão de xilose previamente produzida. O resultado obtido foi a quantidade de açúcares redutores produzidos durante a reação. Estimada a quantidade de açúcares, foi calculada a velocidade média de produção da xilose dividindo o total produzido pelo tempo empregado, no caso, os 5 minutos da primeira etapa de reação a 50

4.3. Afinidade entre enzima e substrato

O método de análise para afinidade entre os diferentes substratos e as enzimas seguiu o método descrito por Neilands & Sumpf (1955). Através desse método é possível estimar valores da constante de Michaelis, K_m , e a velocidade máxima inicial, V_{max} .

O procedimento realizado para calcular a relação entre enzima e substrato foi a utilização de titulações da solução de hemicelulose diluída a 10 g/L. As concentrações utilizadas variavam de 0,9 g/L até 10 g/L. Além dessas titulações, foi necessário utilizar soluções mais concentradas (15g/L, 20 g/L, 25g/L e 30g/L) para algumas hemiceluloses visto que a velocidade inicial de produção de xilose não era perceptível em concentrações muito baixas.

Realizados os experimentos foi criado, para cada combinação de hemicelulose e coquetel enzimático, um gráfico linearizado. Esse gráfico linearizado foi utilizado para calcular o K_m e o V_{max} das reações.

4.4. Determinação de lignina residual

O método consistiu na reação de 300 mg de cada uma das hemiceluloses com 1,5 mL de ácido H_2SO_4 a 72 % (m/m) durante o tempo de 7 minutos a 45 °C (BRIENZO et al., 2009).

Após ocorrer a reação, foram adicionados 45 mL de água destilada na solução, interrompendo a reação. Então essa nova solução foi autoclavada por 30 minutos a uma temperatura de 121 °C (GOUVEIA et. al., 2009). Após esses 30 minutos, o conteúdo da solução foi filtrado em uma placa porosa de número 4, previamente tarada, com a ajuda de uma bomba a vácuo. Essa placa foi aquecida a uma temperatura de 105 °C para eliminar a umidade residual. Após secagem, as placas foram armazenadas em um dessecador e foram pesadas continuamente até que sua massa estivesse constante. A diferença entre massa total e a massa dos cadinhos previamente tarados representou a parcela insolúvel da lignina.

A parcela de lignina solúvel foi determinada pela leitura da absorbância, em espectrofotômetro, da parcela líquida da reação, a qual atravessou os filtros de placa porosa a, no comprimento de onda de 280 nm. Esses resultados estimados a partir da aplicação dos valores retornados de absorbância em uma curva padrão de lignina solúvel.

4.5. Solubilidade da hemicelulose

Para determinar a solubilidade das hemiceluloses foi utilizado o método descrito por Bailey (1992). Aplicando esse método cada uma das hemiceluloses foi solubilizada, em uma concentração de 1 % (m/v) em uma solução tampão de acetato, ajustada para um pH de 4,8. A solução foi aquecida, até próximo da fervura, em um micro-ondas, e então misturada até que a hemicelulose fosse dissolvida no meio.

Após dissolver, as soluções foram transferidas para um tubo Falcon e foram agitadas durante uma noite. As soluções foram centrifugadas durante 15 minutos a 10.000 xg. A centrifugação permitiu a separação da parcela líquida do material não solubilizado. A parcela sólida, não solubilizada foi transferida para outro recipiente e aquecida, durante uma noite, a 60 °C para remoção da umidade. Essa massa então foi pesada e comparada com a massa inicial de hemicelulose adicionada para fazer a solução a 1 %.

4.6. Caracterização química

A caracterização química foi realizada na hemicelulose extraída para determinar as concentrações dos diferentes monômeros que as compunham e ocorreu mediante o método de pré-tratamento ácido e posteriormente altas temperaturas. 300 miligramas de biomassa foram adicionados em 1,5 mL de solução de H₂SO₄ a 72 % (m/m) e essa mistura foi aquecida a 45° C durante 7 minutos (BRIENZO et al., 2009). A reação foi interrompida com a adição de 45 mL de água destilada na solução. A solução foi auto clavada a temperatura de 121° C por 30 minutos (GOUVEIA et al., 2009). Os açúcares liberados pela hidrólise ácida foram determinados usando o método de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) (GOUVEIA et al. 2009).

As configurações para realização do procedimento foram: Coluna HPx87H, Fase Móvel ácido sulfúrico 0,005M, Temperatura 50 °C, Fluxo 0,6mL/min e os valores foram mensurados através do índice de refração.

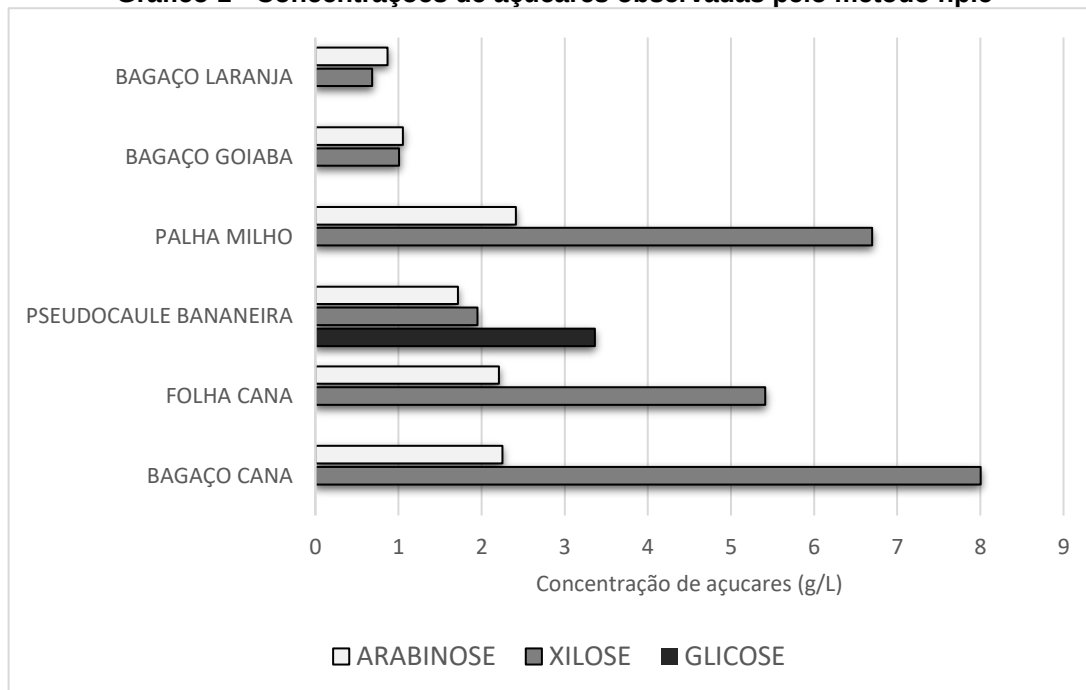
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Caracterização das hemiceluloses

A aplicação do tratamento de ácido concentrado e posteriormente da autoclave nas hemiceluloses extraídas liberou uma grande quantidade de açúcares que foram analisadas pelo método HPLC.

Os resultados apontaram a presença de 3 principais moléculas, a glicose, a xilose e a arabinose. No gráfico 1 são apresentados os valores de cada um desses componentes para cada fonte de biomassa.

Gráfico 1 - Concentrações de açúcares observadas pelo método hplc



Fonte: Produzido pelo autor.

Nas biomassas provenientes da cana e do milho, a xilose predomina, sendo de 2 a 4 vezes mais presente que a arabinose. Nas biomassas de laranja e goiaba a distribuição de arabinose é levemente superior que a xilose, entretanto ambas apresentam baixos valores se comparadas com as biomassas de cana e milho. Já o pseudocaule apresenta um terceiro componente, a glicose, proveniente da glucana/celulose a qual provavelmente foi solubilizada junto com a hemicelulose.

A presença desses diferentes elementos pode influenciar nas etapas de reação enzimática. Espera-se que um composto mais abundante em xilose obtenha melhores resultados pois os coquetéis enzimáticos possuem xilanases, as quais tem capacidade de quebrar as ligações glicosídicas das cadeias xilana e liberar mais açúcares no meio para reagir.

A presença de glicose no pseudocaule leva a suspeita da presença de celulose residual, sendo necessários estudos mais aprofundados para verificar a compatibilidade do método de extração com essa biomassa específica e qual a causa da presença dessa molécula nos resultados.

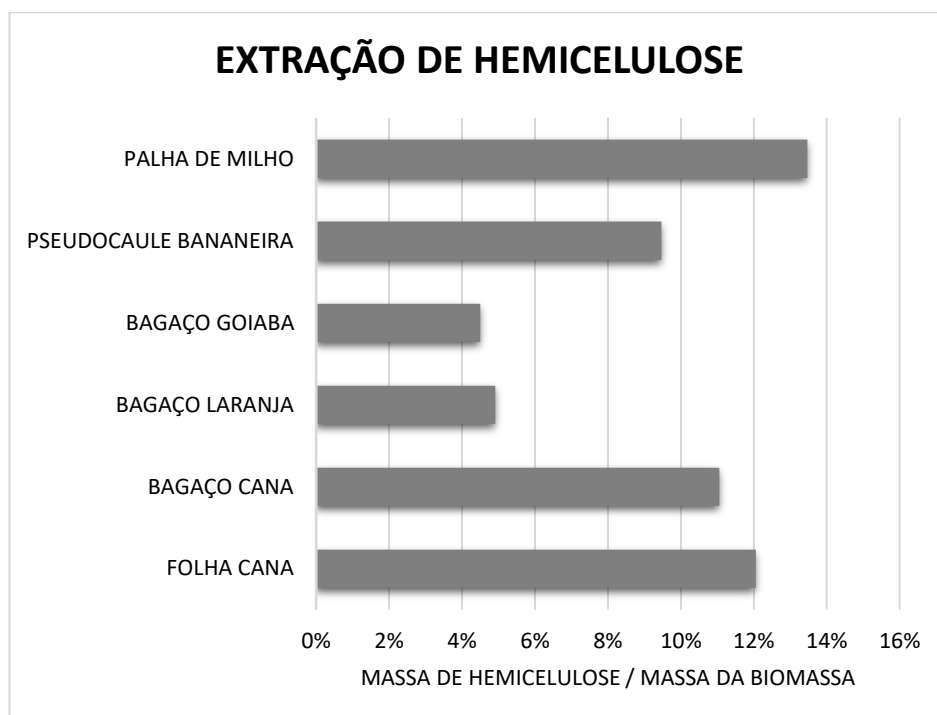
5.2. Extração da hemicelulose

A aplicação do método alcalino com peróxido de hidrogênio solubilizou as hemiceluloses de cada uma das 6 biomassas separando-as das parcelas de lignina e celulose. Após as etapas de ajuste de pH, concentração e clarificação com etanol foi obtido como resultado a hemicelulose livre da celulose e parcialmente deslignificada.

No gráfico 2 são apresentados os resultados, em porcentagem, de hemicelulose extraída de cada uma das biomassas. As biomassas mais produtivas são o milho e a cana-de-açúcar, contando com uma taxa de conversão de mais de 10 %.

As biomassas que apresentam menor conversão de biomassa bruta para hemicelulose foram os bagaços de goiaba e de laranja. Ambos os bagaços apresentaram dificuldades com o método de extração utilizado. No caso do bagaço da goiaba, devido à presença de óleos, não foi possível moer adequadamente o material, sendo necessário utilizar no processo uma partícula maior, reduzindo assim a área de contato com a solução e reduzindo as reações químicas. Algo similar ocorreu com a laranja. O material recebido veio em forma de grãos compactados, dessa forma, ao passar no moinho, os grãos reduziram de tamanho, mas continuaram densos, diferentemente dos outros materiais que formaram um pó mais fino. Outro problema apresentado foi a redução do pH durante o processo de pré-tratamento. Foi percebido que, passadas as 4 horas de agitação, a solução tinha seu pH reduzido de 11,6 para cerca de 10. Essa redução pode ser um fator marcante pois o processo de separação da hemicelulose dos demais componentes, segundo o método utilizado, foi otimizado para o pH de 11,6. Dessa forma, são necessários mais estudos aprofundados desta biomassa específica para avaliar o fator por trás desse fenômeno e se este realmente causa um efeito negativo para a separação da hemicelulose.

Gráfico 2 - Porcentagem de hemicelulose extraída (% , relação a massa total)



Fonte: Produzido pelo autor.

Comparando os resultados com a bibliografia disponível foi identificado que a taxa de conversão de bagaço de cana, folha de cana e o bagaço de milho encontram-se abaixo do esperado. Melati (2018) encontrou valores estimados de 23,9 % conversão para o bagaço de cana e 24,17 % para a folha da cana usando a mesma metodologia de solubilização da hemicelulose. Cong et al. (2015) conseguiu converter cerca de 24 % da biomassa de palha de milho em hemicelulose usando um método similar, onde o pH de solubilização foi de 11,5, a concentração de peróxido de 5 % (m/v) e a temperatura de extração ocorreu a 60 °C. Esses 24 % representaram cerca de 96 % da hemicelulose presente naquela biomassa.

Para os bagaços de laranja e goiaba a taxa de conversão foi calculada a partir do trabalho de Pereira (2022), onde as taxas de recuperação de hemicelulose foram, aproximadamente, 33,97 e 42,10 % para bagaço de goiaba e laranja, respectivamente. Esses valores foram aplicados na caracterização química dos materiais e representam cerca de 9,62 e 13,06 % de conversão de biomassa em hemicelulose extraída para cada hemicelulose respectivamente. Apesar do método se mostrar menos eficiente em recuperar hemicelulose nessas 2 biomassa se comparadas às biomassa de cana e milho, ainda sim a extração realizada está bem

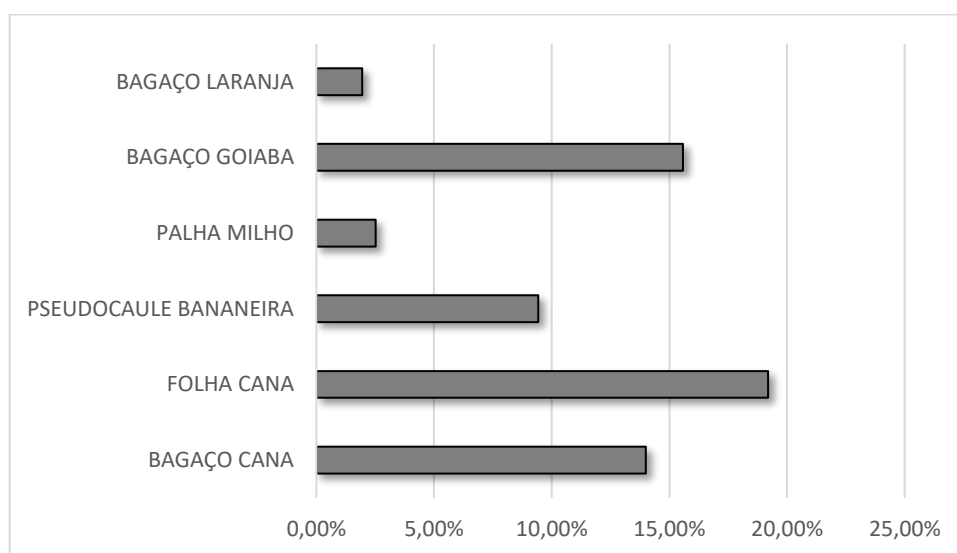
abaixo do esperado, resultando em valores menores que a metade se comparadas com a literatura.

Para avaliar melhor os resultados obtidos, é necessário realizar uma caracterização química das biomassas in natura para avaliar o real rendimento de hemicelulose encontrado no experimento.

5.3. Lignina residual

Como resultado do experimento, foi encontrada a parcela de lignina residual, que permaneceu agregada à hemicelulose após a etapa de pré-tratamento alcalino. Esses resultados são apresentados no gráfico 3.

Gráfico 3 - Parcela de lignina residual (% m/m)



Fonte: Produzido pelo autor.

As hemiceluloses com menor quantia lignina residual são as provenientes do bagaço de laranja e da palha de milho. Já a hemicelulose com maior concentração de lignina é a folha de cana, contendo cerca de 18 % de sua composição como lignina residual.

Seria interessante, para avaliar a real deslignificação do material e a eficiência do método de solubilização utilizado, realizar um estudo de caracterização química das biomassas in natura, destacando a parcela de lignina presente em cada uma das biomassas.

A lignina tem papel essencial na estrutura da biomassa vegetal. Sua forma complexa protege as camadas de hemicelulose e celulose contra degradação física e

bioquímica, protegendo a integridade da planta. A presença de lignina residual pode ocasionar no aumento de recalcitrância do material. Essa recalcitrância pode ocasionar redução na eficiência da atividade enzimática nas longas cadeias de hemicelulose, causando a diminuição da velocidade de liberação da xilose.

Além da recalcitrância, essa parcela de lignina pode interferir na capacidade de solubilizar a hemicelulose no meio, reduzindo a área de contato entre a enzima e os polissacarídeos, afetando negativamente a velocidade de formação dos açúcares redutores.

5.4. Solubilidade das hemiceluloses

Outro fator de grande importância para a ocorrência de reações químicas de forma eficiente é a área de contato das enzimas com o substrato. O jeito como as enzimas interagem com o substrato alteram significativamente o produto formado.

Freitas et al. (2021) realizou experimentos comparando a hidrólise de hemicelulose em fases solúveis e insolúveis e as principais diferenças entre a hidrólise do material solubilizado e insolúvel foram o tipo de reação entre enzima e substrato e os subprodutos da hidrólise enzimática.

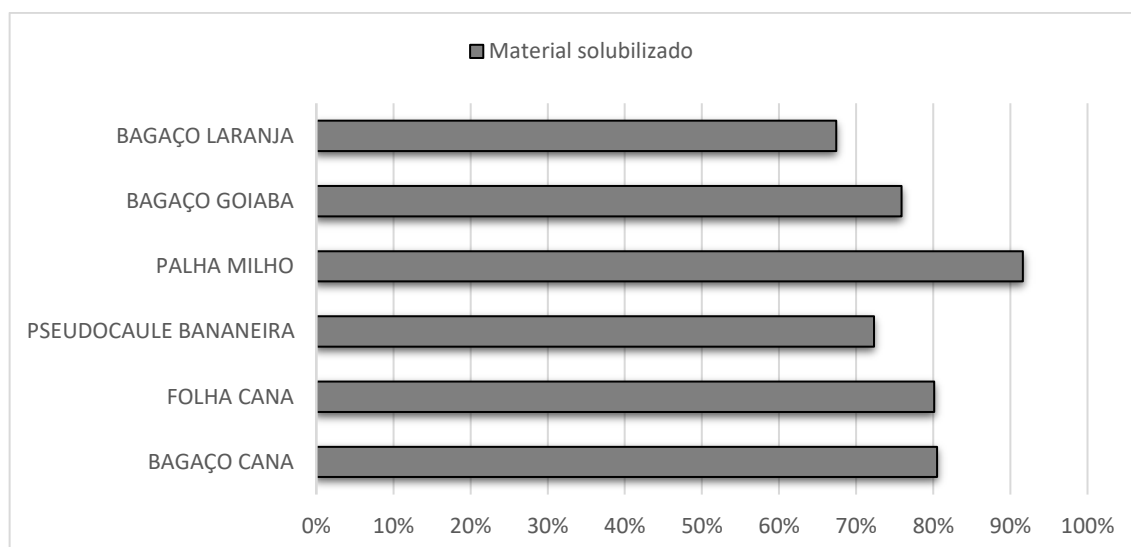
Usando um material solubilizado em meio líquido as enzimas tiveram acesso mais eficiente ao substrato e foram obtidos xilooligosacarídeos com maior polimerização como resultado da hidrólise. Já na reação com o substrato insolubilizado a reação ocorreu em 2 etapas diferentes. A reação ocorreu na superfície do material e dentro dos poros, ocasionando em um processo de degradação heterogêneo pois a enzima ataca as cadeias de hemicelulose em ambientes diferentes, liberando uma fração de xilooligosacarídeos mais diversa. Apesar dessas diferenças, a taxa de conversão das hemiceluloses em xilooligosacarídeos foi similar, sendo uma média de 58 % para a hemicelulose solubilizada e 48 % para a hemicelulose insolúvel.

Apesar da diferença ser pouca, ela ainda existe, sendo favorável a utilização da hemicelulose solubilizada. O acesso mais eficiente da enzima ao substrato pode indicar uma cinética enzimática provavelmente mais rápida, sendo necessários estudos mais aprofundados para confirmar essa hipótese para os materiais abordados neste estudo.

No gráfico 4 são apresentados os dados de solubilidade das hemiceluloses no tampão de acetato de sódio ajustado para pH 4,8. A hemicelulose extraída da palha

de milho apresentou a melhor solubilização, permanecendo com 91 % do material solubilizado após o processo de centrifuga. Os materiais com menor solubilidade foram o bagaço da laranja, o pseudocaule e o bagaço da goiaba, respectivamente.

Gráfico 4 - Solubilidade da hemicelulose em tampão de acetato (pH 4,8)



Fonte: Produzido pelo autor.

Observando os valores obtidos durante a reação enzimática a uma concentração de 10 g/L de substrato, foi possível evidenciar que as hemiceluloses menos solúveis também tiveram a menor conversão de hemicelulose para os xilose. Formando uma possível correlação positiva entre o grau de solubilidade e a taxa de conversão de hemicelulose em açúcares redutores.

5.5. Determinação da atividade enzimática

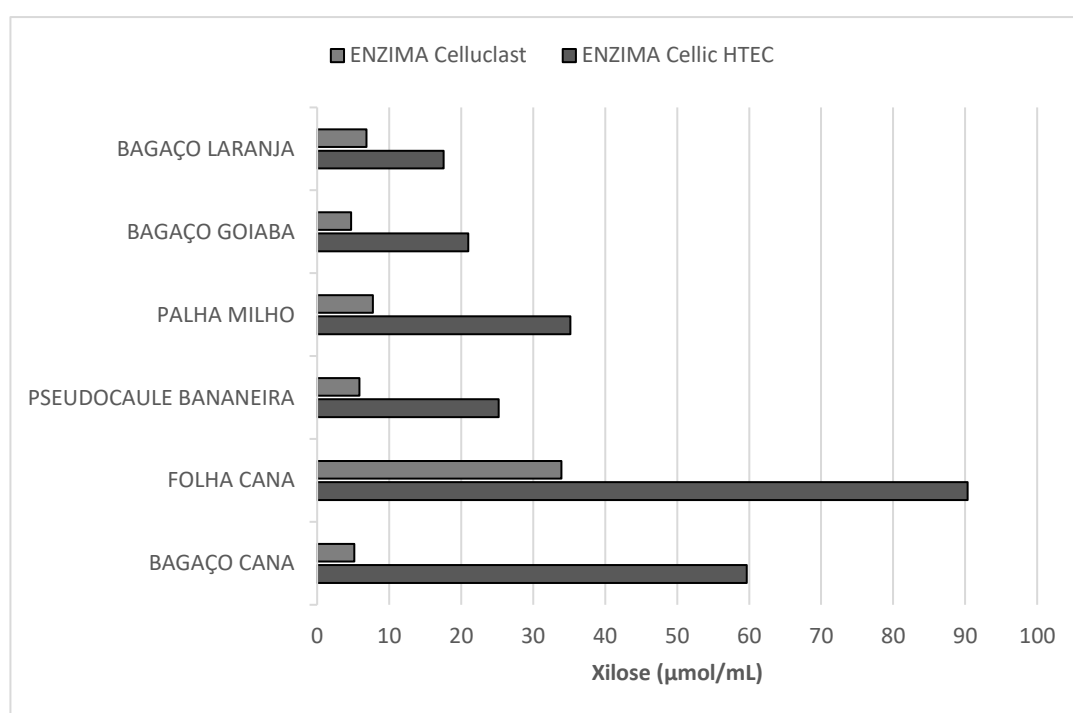
Como resultado obtido para esse experimento, aplicando a metodologia mencionada e os coquetéis, foi um estudo comparativo entre as cinéticas de conversão dos polissacarídeos de xilana em monossacarídeos e frações menores (oligossacarídeos) de açúcares redutores.

Os coquetéis enzimáticos utilizados nos experimentos são o Cellic Htec (novozymes) e o Celluclast (novozymes). Ambos os coquetéis foram expostos às mesmas condições experimentais e o coquetel que obteve melhor resultado foi o Cellic Htec. A carga de hemicelulases é maior, sendo mais eficiente na hidrólise desse material, liberando uma quantidade maior de açúcares redutores durante o tempo de

reação (5 minutos). A enzima Celluclast, segundo o fabricante, é mais voltada para a degradação de celulose, portanto possui uma carga mais abundante de celulases, o que explica a sua menor compatibilidade com o substrato se comparado com o outro coquetel.

No gráfico 5 são apresentados os dados referentes aos experimentos. Os melhores resultados foram encontrados na combinação entre o coquetel Cellic Htec com as hemiceluloses extraídas da cana-de-açúcar. A pior combinação de enzima e substrato foi a reação entre a hemicelulose extraída do bagaço da goiaba e o coquetel Celluclast, entretanto os demais resultados encontrados para essa enzima são próximos a esse resultado, sendo o único destoante a combinação da hemicelulose da folha de cana com o coquetel Celluclast, que rendeu resultados similares aos do coquetel Cellic Htec com as demais hemiceluloses estudadas.

Gráfico 5 - Concentração de xilose (mM) obtida após reação enzimática



Fonte: Produzido pelo autor

5.6. Estudo da cinética enzimática

A afinidade entre as enzimas e substratos foi estimada a partir da aplicação de modelos de cinética enzimática de Michaelis-Menten nos estudos de velocidade de produção por concentração de substrato para cada par de biomassa-coquetel

enzimático usando a metodologia de linearização Lineweaver-Burk para calcular os valores da constante K_m e V_{max} .

Como resultado foram obtidos 10 modelos de cinética enzimática, suas velocidades máximas e suas constantes K_m .

Os resultados são apresentados por relação substrato e as enzimas, nas abscissas são apresentadas as concentrações iniciais de hemicelulose, nas ordenadas a velocidade média de conversão das xilanas em xilose. Para cada estudo de cinética enzimática é realizada uma linearização de pontos, contendo uma linha de tendência e uma equação de reta, a qual foi usada para estimar os valores de K_m e V_{max} para cada reação de enzima x substrato. Os resultados são exibidos desde a figura 5-1 até a figura 5-22.

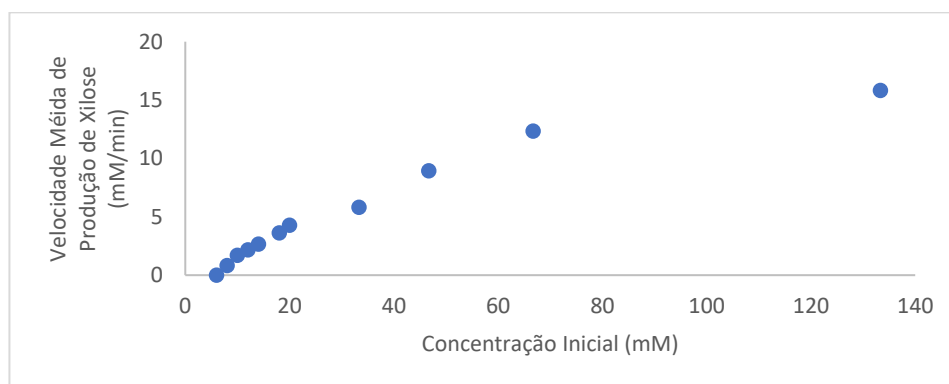
A avaliação de afinidade entre enzima e substrato é avaliada a partir dos valores de K_m e V_{max} encontrados.

Quanto maior o V_{max} , maior a velocidade de degradação da hemicelulose. Já para o K_m , quanto menor o valor encontrado maior a compatibilidade da enzima com o substrato. A interpretação do K_m é a concentração inicial de substrato o qual irá ativar a metade do valor da velocidade máxima. Portanto quanto menor o valor de K_m , menos concentrado o meio precisa ser para que a enzima atue com grande eficiência.

5.6.1. Bagaço de Cana de Açúcar

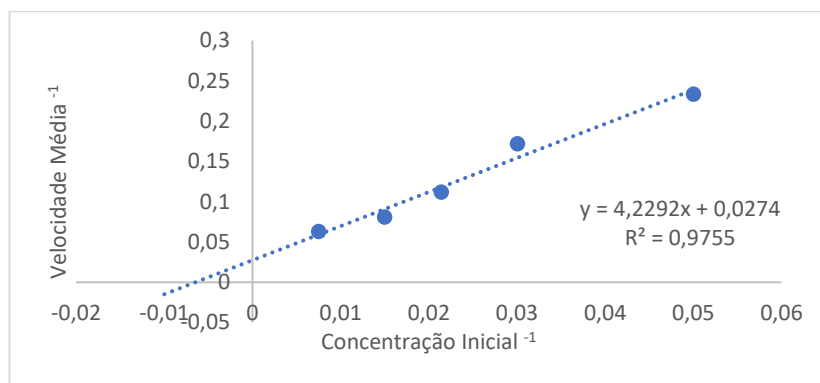
Cellic HTEC

Figura 5-1 Estudo da Cinética Enzimática - Bagaço de Cana-de-açúcar



Fonte: Produzido pelo autor.

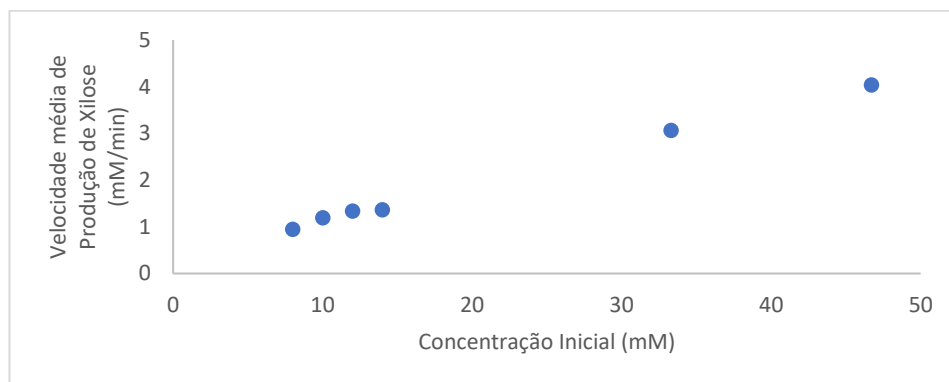
Figura 5-2 Estudo da cinética enzimática - Linearizado - Bagaço de cana-de-açúcar



Fonte: Produzido pelo autor.

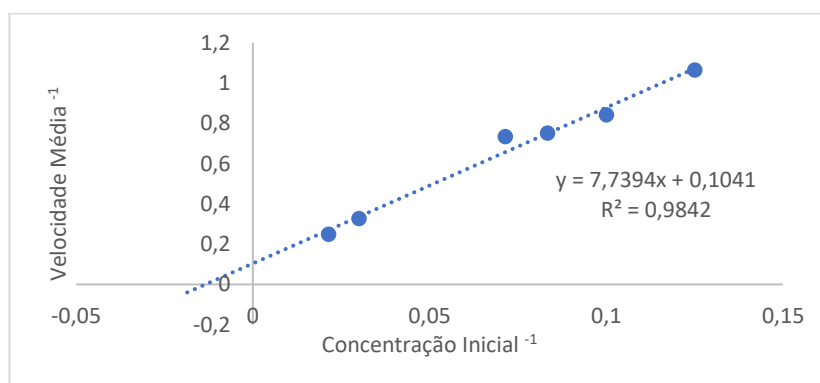
Celluclast

Figura 5-3 Estudo da cinética enzimática - Bagaço de cana-de-açúcar



Fonte: Produzido pelo autor

Figura 5-4 Estudo da cinética enzimática - linearizado - bagaço cana-de-açúcar

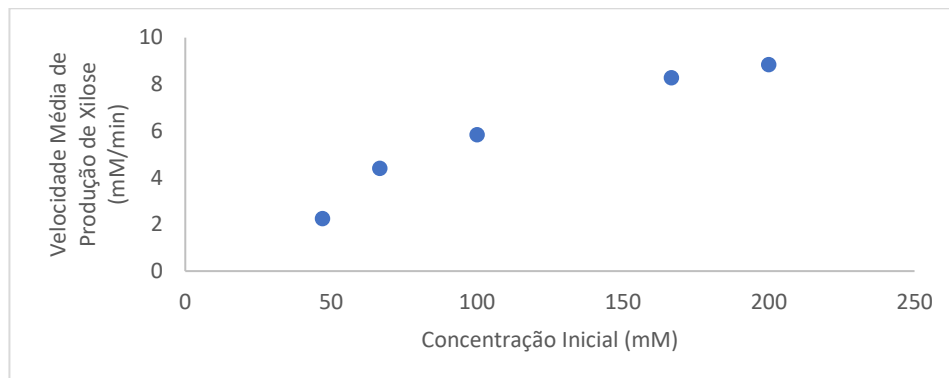


Fonte: Produzido pelo autor.

5.6.2. Bagaço de Goiaba

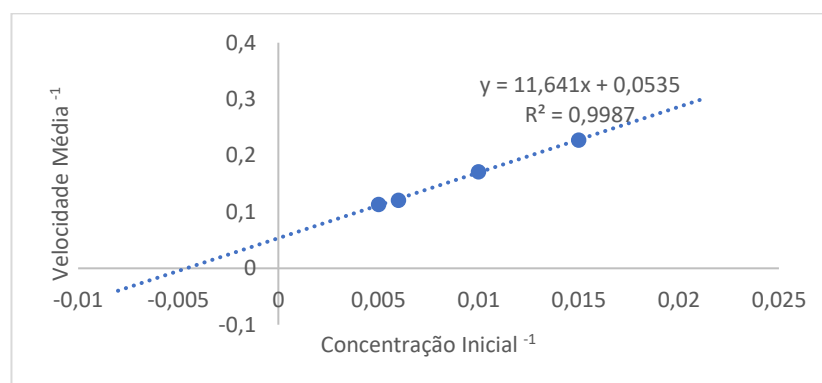
Cellic HTEC

Figura 5-5 Estudo da cinética enzimática - linearizado - bagaço de goiaba



Fonte: Produzido pelo autor.

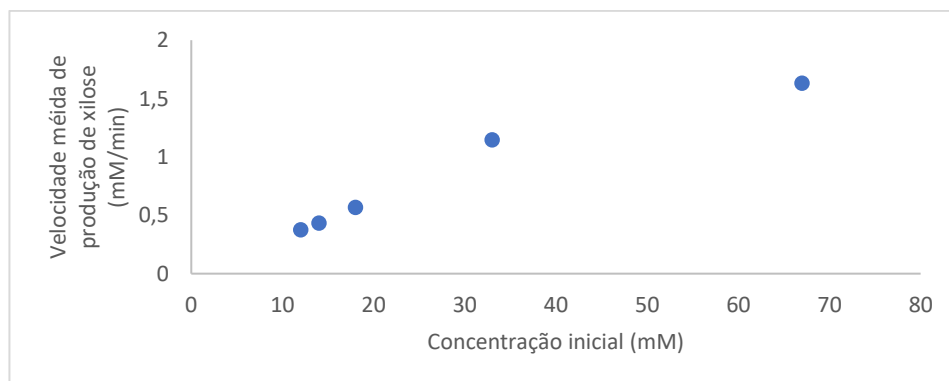
Figura 5-6 Estudo da cinética enzimática - linearizada - bagaço de goiaba



Fonte: Produzido pelo autor.

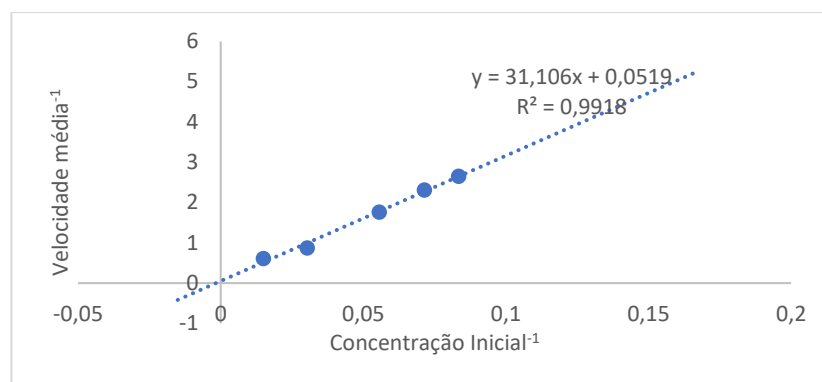
Celluclast

Figura 5-7 Estudo da cinética enzimática - bagaço goiaba



Fonte: Produzido pelo autor.

Figura 5-8 Estudo da cinética enzimática - linearizado - bagaço de goiaba

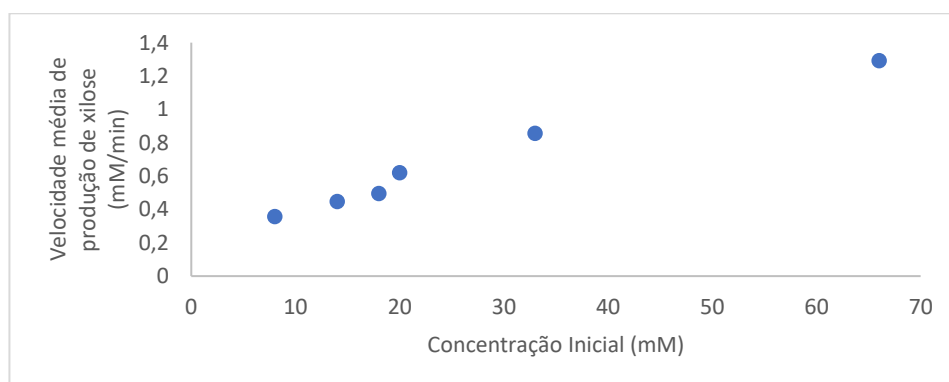


Fonte: Produzido pelo autor.

5.6.3. Bagaço de Laranja

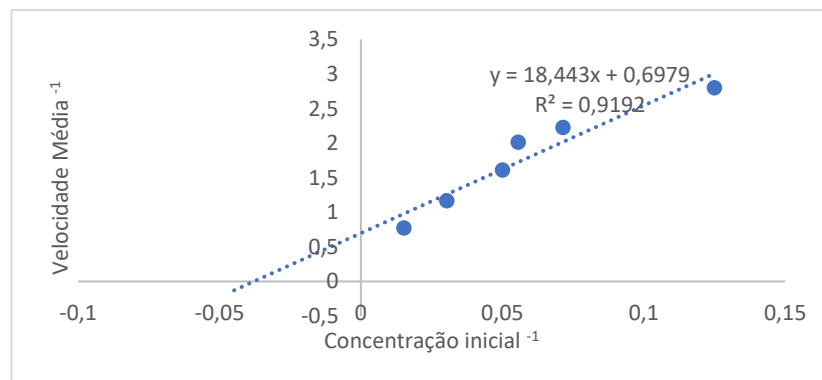
Cellic HTEC

Figura 5-9 Estudo da cinética enzimática - bagaço de laranja



Fonte: Produzido pelo autor.

Figura 5-10 Estudo da cinética enzimática – linearizado – bagaço de laranja



Fonte: Produzido pelo autor.

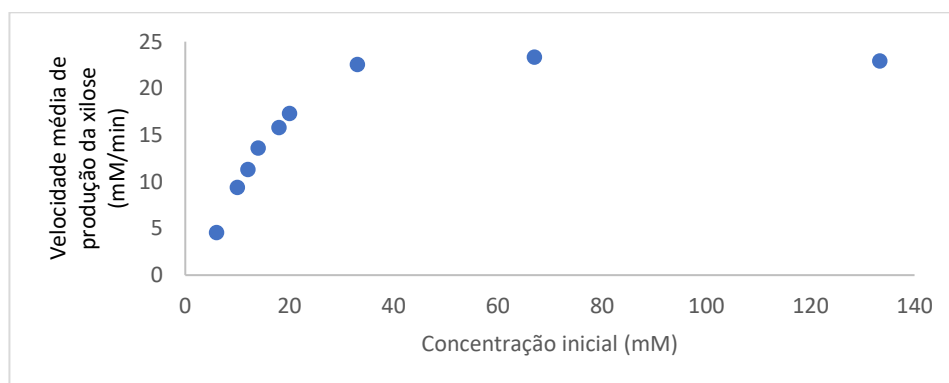
Celluclast

Não foi possível obter resultados para essa combinação de enzima e substrato. Ao realizar os experimentos foi observado que os valores obtidos nas leituras das reações e controles eram muito próximos, indicando nenhuma ação por parte da enzima. Estima-se que, para que seja possível identificar alguma reação, seja necessário refazer o experimento aplicando a enzima em meios mais concentrados e com maior tempo de reação com a enzima.

5.6.4. Folha de cana-de-açúcar

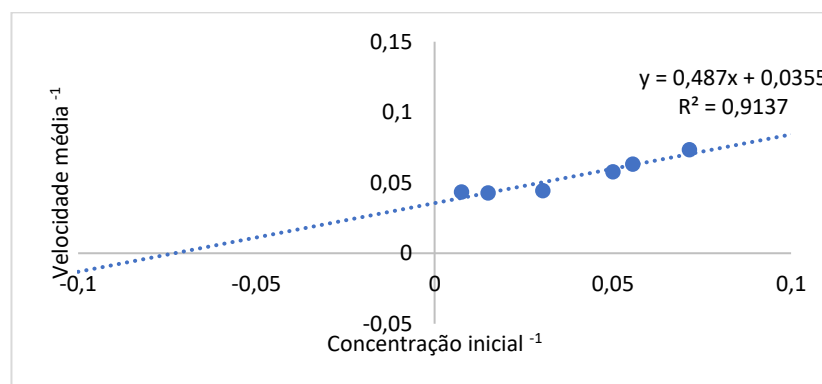
Cellic HTEC

Figura 5-11 Estudo da cinética enzimática - Folha da cana-de-açúcar



Fonte: Produzido pelo autor.

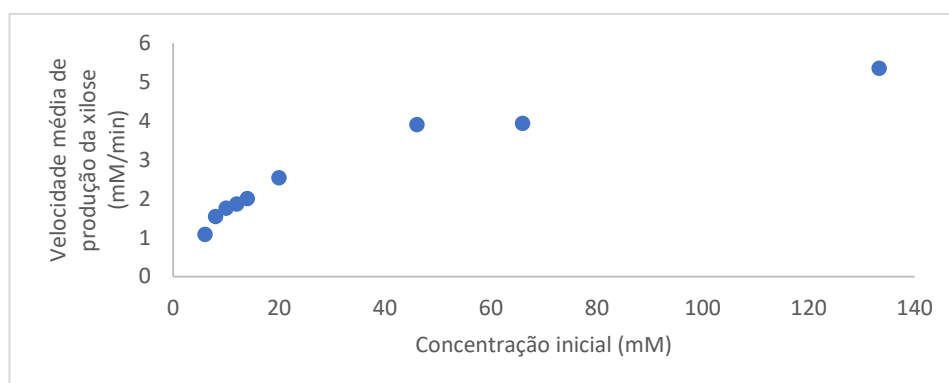
Figura 5-12 Estudo da cinética enzimática - linearizada - folha de cana-de-açúcar



Fonte: Produzido pelo autor.

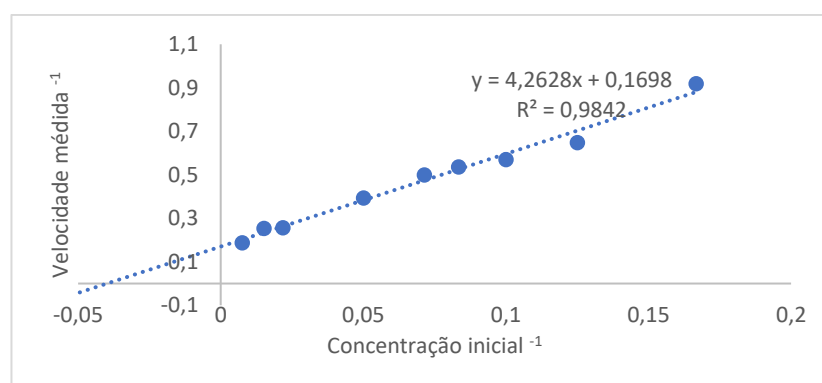
Celluclast

Figura 5-13 Estudo da cinética enzimática - folha de cana-de-açúcar



Fonte: Produzido pelo autor.

Figura 5-14 Estudo da cinética enzimática - linearizado - folha da cana-de-açúcar



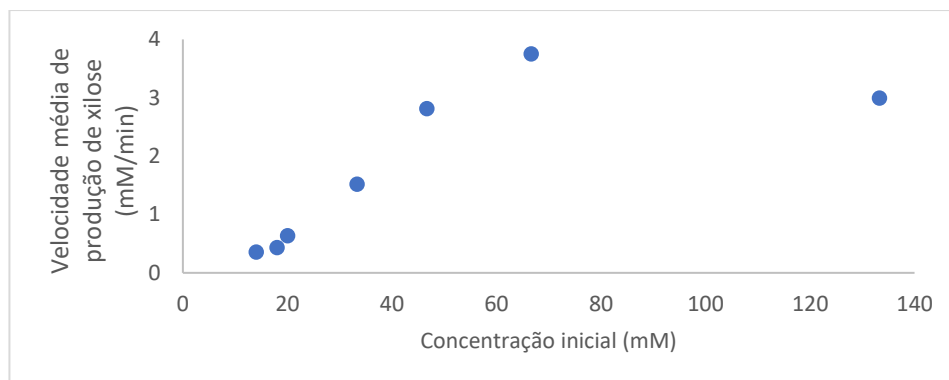
Fonte: Produzido pelo autor

5.6.5. Palha de Milho

Cellic HTEC

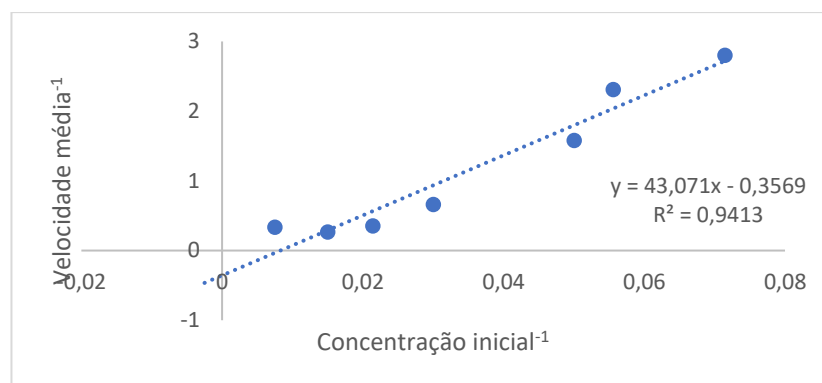
A figura 5.15 representa o estudo de velocidade média da reação variando a concentração de hemicelulose diluída no meio utilizando o coquetel Cellic HTEC. Já a figura 5.16, representa a linearização dos pontos encontrados. Para essa combinação de enzima substrato não foi possível calcular os valores de K_m e V_{max} . Isso ocorreu, pois, a equação derivada do método de linearização forneceu valores para b negativos, sendo assim não é possível aplicar o método de Lineweaver-Burk para estimar valores para K_m e V_{max} . Espera-se que realizar experimentos com meios mais concentrados possam resolver esse problema de linearização.

Figura 5-15 Estudo da cinética enzimática - palha de milho



Fonte: Produzido pelo autor.

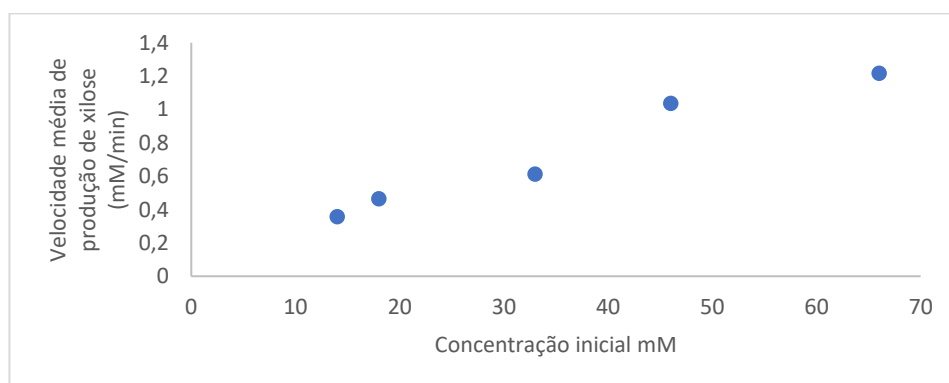
Figura 5-16 Estudo da cinética enzimática - linearizada - palha de milho



Fonte: Produzido pelo autor.

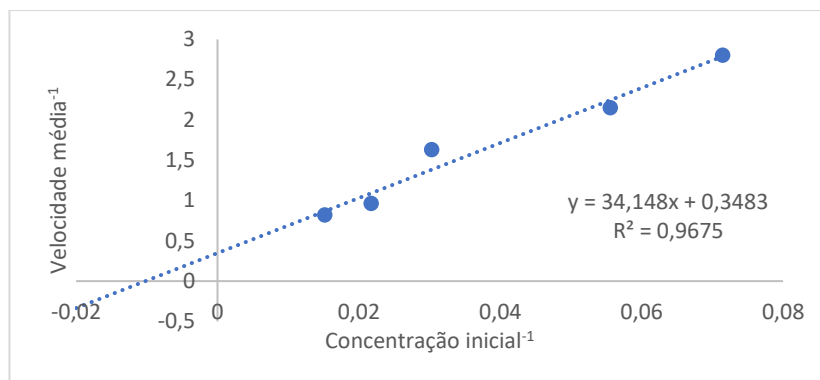
Celluclast

Figura 5-17 Estudo da cinética enzimática - palha de milho



Fonte: Produzido pelo autor.

Figura 5-18 Estudo da cinética enzimática - linearizado - palha de milho

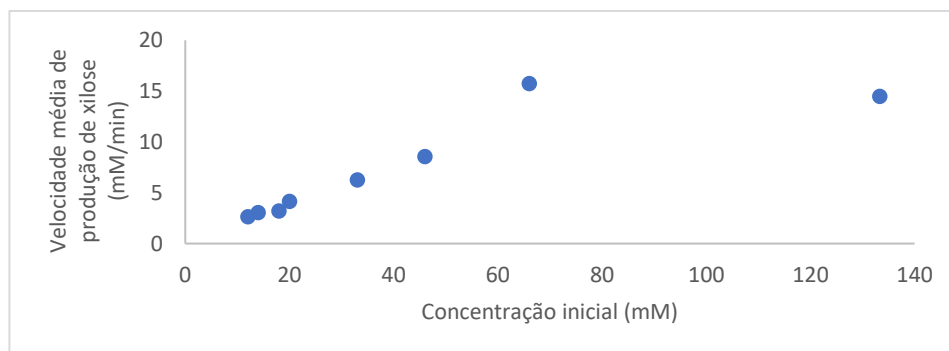


Fonte: Produzido pelo autor.

5.6.6. Pseudocaule de Bananeira

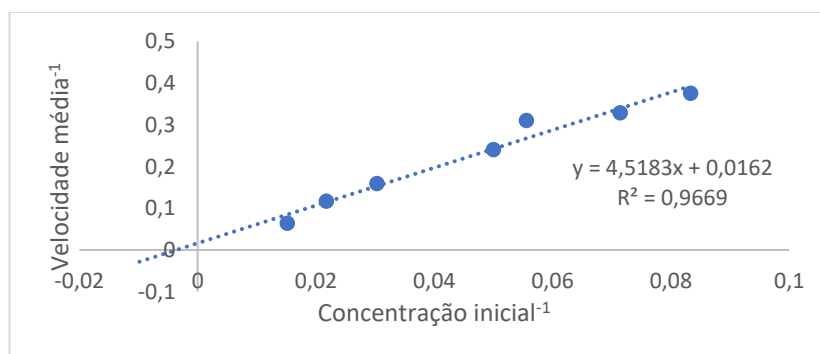
Cellic HTEC

Figura 5-19 Estudo da cinética enzimática - pseudocaule de bananeira



Fonte: Produzido pelo autor.

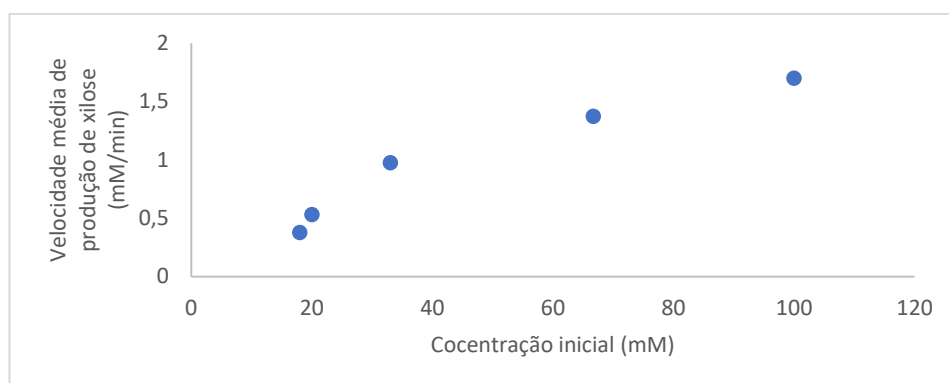
Figura 5-20 Estudo da cinética enzimática - linearizado - pseudocaule de bananeira



Fonte: Produzido pelo autor.

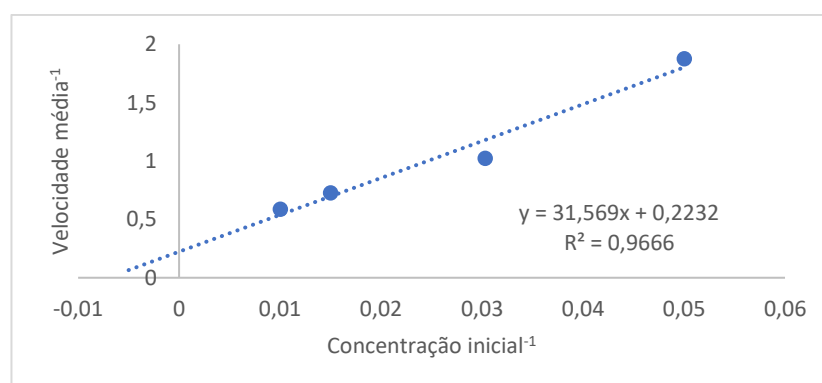
Celluclast

Figura 5-21 Estudo da cinética enzimática - pseudocaule de bananeira



Fonte: Produzido pelo autor.

Figura 5-22 Estudo da cinética enzimática - linearizado - pseudocaule de bananeira



Fonte: Produzido pelo autor.

5.7. Cálculo das Vmax e Kms

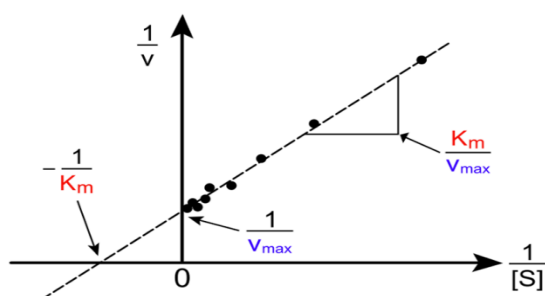
Após realizar a linearização dos pontos usando o método Lineweaver-Burk, foi utilizada uma ferramenta de planilhas para estimar uma linha de tendência e sua equação de reta correspondente.

O cálculo do Km foi realizado substituindo o valor de X nas equações por $-1/K_m$ e o valor de Y por 0 (zero).

Similarmente foi realizado para Vmax. Para calcular Vmax foi substituído o valor de Y por $1/V_{max}$ e X por 0 (zero). Isso foi realizado para todas as combinações de enzima e substrato.

Essa interpretação de cálculo é apresentada na figura 5-23. Na figura é indicado que $-1/K_m$ é X quando Y é 0 e $1/V_{max}$ é Y quando X é 0.

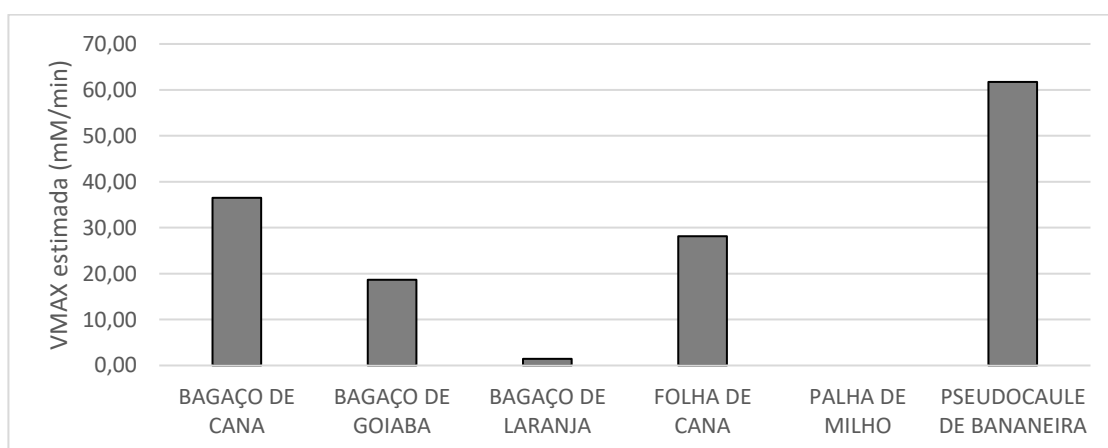
Figura 5-23 Modelo enzimático linearizado pelo método de Lineweaver-Burk



Fonte: Anon, 2020.

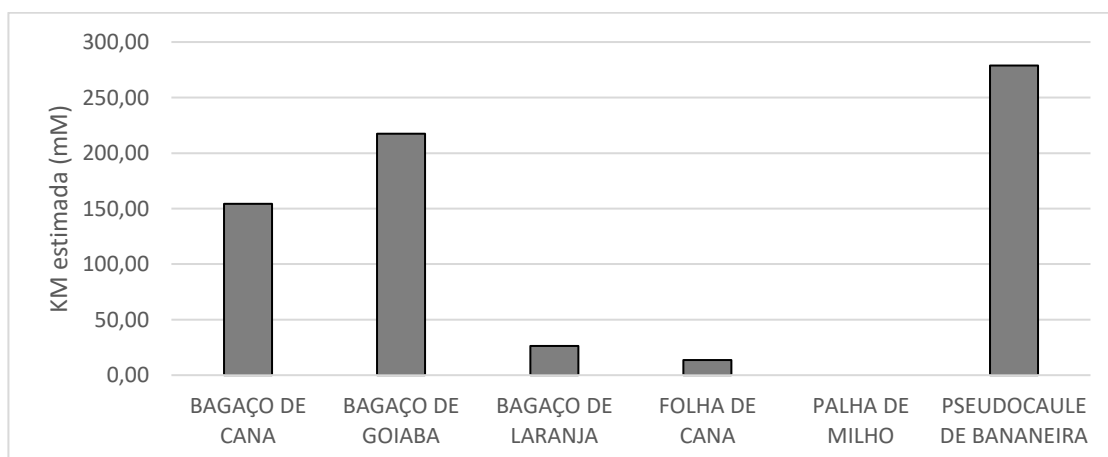
Os resultados estimados a partir dessas equações foram apresentados nas figuras 5-24, 5-25, 5-26 e 5-27.

Figura 5-24 Vmax estimado - Cellic HTEC

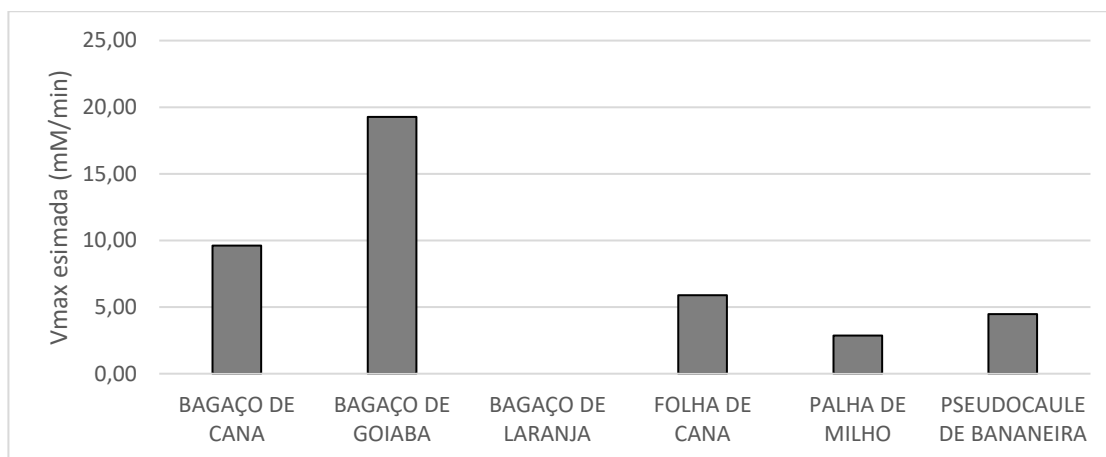


Fonte: Produzido pelo autor.

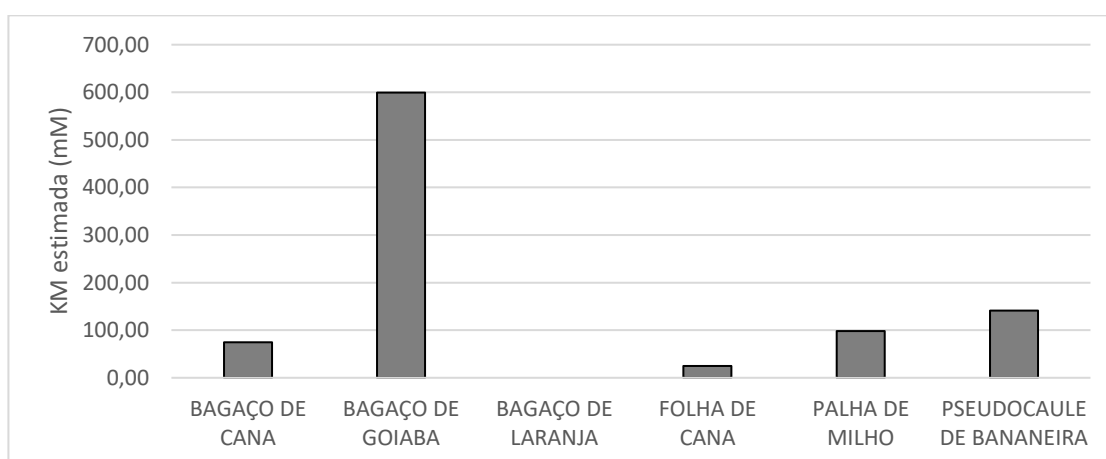
Figura 5-25 KM estimado - Cellic HTEC



Fonte: Produzido pelo autor.

Figura 5-26 Vmax estimada - Celluclast

Fonte: Produzido pelo autor.

Figura 5-27 KM estimada - Celluclast

Fonte: Produzido pelo autor.

Os resultados de indicam que a enzima Cellic HTEC possuem, em geral, maior compatibilidade com os substratos.

Os resultados de Km para o coquetel enzimático Celluclast são menores que seus pares do coquetel Cellic HTEC, indicando que menores quantidades de substrato atingem maiores velocidades de cinética enzimática. Entretanto os valores de velocidade máxima são ligeiramente superiores. Para as hemiceluloses extraídas da cana, a velocidade é quase que 4 a 5 vezes maior. No caso do pseudocaule, os valores estimados chegam a 11 vezes mais, entretanto o valor de Km torna essa velocidade inviável.

O bagaço de goiaba é a única biomassa que mantém velocidades similares entre as enzimas, entretanto os valores de Km são muito discrepantes, favorecendo o coquetel Cellic HTEC.

Na literatura existem diversos trabalhos estudando as relações de cinética enzimática entre as xilanas e xilanases em laboratório. Dutta e Chakraborty (2015) utilizaram xilana de beechwood como substrato para reação endo-1,4.β-xilanase proveniente do micro-organismo *T. longibrachiatum* para avaliar processos de inibição de hidrólise de hemicelulose, como resultados ele obteve resultados de $K_m = 3,93 \text{ mg/mL}$ e $V_{max} = 0,0252 \text{ mg/mL/min}$. A hemicelulose utilizada por ele foi do tipo xilana, sendo assim, os resultados convertidos, estimando que a maior parte dos açúcares liberados são do tipo xilose, são $K_m = 26,2 \text{ mM}$ e $V_{max} = 0,168 \text{ mM/min}$. Já Li et al. (2022) utilizou xilana extraída a partir da palha de milho para avaliar a capacidade de degradação de um coquetel de xilanases produzidos a partir de 2 micro-organismos (*Dictyoglomus thermophilum* e *Herbinix hemicellulosilytica*). Como resultados ele obteve K_m s iguais a $3,61 \text{ mg/mL}$ e $4,50 \text{ mg/mL}$ e V_{max} iguais a $172 \text{ } \mu\text{mol/min/mg}$ e $131,27 \text{ } \mu\text{mol/min/mg}$. Convertendo as unidades, utilizando como base a massa molar da xilose, temos K_m s iguais a $24,04 \text{ mM}$ e $29,97 \text{ mM}$ e V_{max} iguais a $0,172 \text{ mM/min/mg}$ e $0,13127 \text{ mM/min/mg}$.

Esses resultados de K_m indicam alta compatibilidade do substrato com as enzimas, sendo pouco substrato necessário para que as reações ocorram de forma eficiente. Já as velocidades máximas não condizem com as velocidades estimadas nos experimentos, apresentando valores muito abaixo.

Para investigar a diferença das velocidades seria necessário a realização de outros experimentos, variando as concentrações, as enzimas e os tempos de reação para obter melhores ajustes nas equações linearizadas de Lineweaver-Burk, obtendo valores de K_m e V_{max} mais precisos e avaliando se os resultados estimados são condizentes com a realidade.

Outra possibilidade é utilizar outro método para estimar os parâmetros de K_m e V_{max} , comparando os resultados obtidos.

6. CONCLUSÃO

Para estudo em laboratório, as hemiceluloses extraídas da cana-de-açúcar apresentaram os melhores resultados. Os valores obtidos de velocidade máxima de produção de xilose, tanto para o coquetel HTEC tanto para o Celluclast. Além dos V_{max} elevados, as constantes K_m são relativamente baixas. O K_m representa a concentração necessária para que a reação atinja sua velocidade média, ou seja,

quanto menor o K_m menor quantidade de substrato deve ser adicionado ao meio para atingir altas velocidades reação. Dessa forma, apesar das velocidades máximas não serem atribuídas às biomassas da cana, elas apresentam velocidades máximas relativamente altas com concentrações não tão elevadas de substrato, tornando-as hemiceluloses mais eficientes para aplicação laboratorial.

Além dos aspectos de cinética enzimática, os dois materiais obtiveram bons valores de conversão, sendo possível extrair quantidades acima de 10 % da massa de biomassa bruta empregada, mesmo que esses valores sejam baixos se comparados a outros trabalhos encontrados na literatura que alcançam valores de mais de 90 % de extração de hemicelulose, o que pode chegar a 25 % da massa bruta do vegetal. Os materiais ainda apresentam boa solubilidade, sendo 80 % do material solubilizado no meio a uma concentração de 10 g/L, tornando a hidrólise mais homogênea.

O maior problema apresentado é a quantidade de lignina residual presente na hemicelulose da folha de cana. Cerca de 18 % do material extraído (hemicelulose) é composto por ligninas residuais que não foram removidas durante o pré-tratamento.

Apesar dos melhores resultados serem encontrados nas hemiceluloses provenientes da cana-de-açúcar, existem outras hemiceluloses que podem ser usadas. O pseudocaule de bananeira obteve bons resultados de velocidade máxima de produção de xilose usando o coquetel enzimático Cellic HTEC, entretanto as concentrações de K_m não permitem que seu uso em laboratório possa ser plenamente aproveitado. O bagaço de goiaba também teve resultados relevantes ao usar o coquetel Cellic HTEC, entretanto possui o mesmo problema do pseudocaule, sendo necessária uma grande concentração de substrato para a cinética enzimática atuar em sua velocidade máxima.

Outro ponto a ser considerado é a diferença entre os coquetéis enzimáticos. De modo geral, o Cellic HTEC obteve melhores resultados que o Celluclast. Isto deve ter ocorrido devido ao HTEC ser um coquetel exclusivo de xilanases. Apesar disso, o coquetel Celluclast ainda pode ser aproveitado pois apresentou capacidade, ainda que menor, de fragmentar as longas cadeias de xilanas em monômeros e oligossacarídeos.

Após analisar os resultados obtidos, conclui-se que as melhores hemiceluloses para aplicar como substrato para atividade enzimática, em laboratório, são as

hemiceluloses de origem da cana-de-açúcar. Entretanto esse resultado deve reavaliado quando combinados outros pré-tratamentos e coquetéis enzimáticos.

7. BIBLIOGRAFIA:

ANON, 2020. **The Equations of Enzyme Kinetics**. Disponível em: <https://chem.libretexts.org/@go/page/41362>. Último acesso 09 de agosto de 2022.

BALAT, Mustafa. **Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: a review**. Energy conversion and management, v. 52, n. 2, p. 858-875, 2011.

BARRETO, G. C. **Levantamento das Tecnologias para Produção de Etanol de Segunda Geração: O Potencial do Brasil**. 71 f. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Salvador, Salvador, 2009.

TAWDE, K. B. Xylan structure, microbial xylanases, and their mode of action. World Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 8, n. 4, p. 353-368, 1992.

BERNAL, Hilda Gómez; BERNAZZANI, Luca; GALLETTI, Anna Maria Raspolli. **Furfural from corn stover hemicelluloses. A mineral acid-free approach**. Green Chemistry, v. 16, n. 8, p. 3734-3740, 2014.

BAILEY, Michael J.; BIELY, Peter; POUTANEN, Kaisa. **Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity**. Journal of biotechnology, v. 23, n. 3, p. 257-270, 1992.

BRIENZO, M.; SIQUEIRA, A. F.; MILAGRES, ADRIANE MF. **Search for optimum conditions of sugarcane bagasse hemicellulose extraction**. Biochemical Engineering Journal, v. 46, n. 2, p. 199-204, 2009.

BRODEUR, Gary et al. **Chemical and physicochemical pretreatment of lignocellulosic biomass: a review**. Enzyme research, v. 2011, 2011.

COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. **Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases**. Fems Microbiology Reviews, v. 29, n. 1, p.3-23, 2005.

CONG, Li et al. **Characterization and components separation of corn stover by alkali and hydrogen peroxide treatments**. Polish Journal of Chemical Technology, v. 17, n. 2, p. 89--95, 2015.

CORREDOR, D. Y. et al. **Enzymatic hydrolysis of soybean hulls using dilute acid and modified steam-explosion pretreatments**. Journal of Biobased Materials and Bioenergy, v. 2, n. 1, p. 43-50, 2008.

DODD, D.; CANN, I. K. O. **Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production**. Gcb Bioenergy, v. 1, n. 1, p.2-17, 2009.

DUTTA, Sajal Kanti; CHAKRABORTY, Saikat. **Kinetic analysis of two-phase enzymatic hydrolysis of hemicellulose of xylan type**. *Bioresource technology*, v. 198, p. 642-650, 2015.

FREITAS, Caroline; CARMONA, Eleonora; BRIENZO, Michel. **Xylooligosaccharides production process from lignocellulosic biomass and bioactive effects**. *Bioactive carbohydrates and dietary fibre*, v. 18, p. 100184, 2019.

FREITAS, Caroline et al. **In vitro study of the effect of xylooligosaccharides obtained from banana pseudostem xylan by enzymatic hydrolysis on probiotic bacteria**. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 33, p. 101973, 2021.

FANG, J. M. et al. **Comparative study of hemicelluloses from wheat straw by alkali and hydrogen peroxide extractions**. *Polymer degradation and stability*, v. 66, n. 3, p. 423-432, 1999.

FELIPUCI, Jefferson Poles et al. **Biological pretreatment improved subsequent xylan chemical solubilization**. *Biomass Conversion and Biorefinery*, p. 1-8, 2021.

GIACOMOLLI JÚNIOR, Onésimo Damiano. **Funcionalização de nanocápsulas de núcleo lipídico com manana através de interações eletrostáticas**. 2015.

GOMES, Valéria J. et al. **The effect of eucalypt pulp xylan content on its bleachability, refinability and drainability**. *Cellulose*, v. 21, n. 1, p. 607-614, 2014.

GOMES, Valéria J. et al. **Influência do conteúdo de xilanas na branqueabilidade, propriedades higroscópicas, físico-mecânicas e óptica de polpas branqueadas de eucalipto**. *Química Nova*, v. 38, p. 221-226, 2015.

GOSWAMI, G K; RAWAT, S. **Microbial Xylanase and their applications - A review**. *International Journal of Current Research and Academic Review*, v. 3, n. 6, p.436-450, 2015.

GOUVEIA, Ester Ribeiro et al. **Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar**. *Química Nova*, v. 32, p. 1500-1503, 2009.

JANSEN, Mickel LA et al. **Saccharomyces cerevisiae strains for second-generation ethanol production: from academic exploration to industrial implementation**. *FEMS yeast research*, v. 17, n. 5, 2017.

KISZONAS, Alecia M.; FUERST, E. Patrick; MORRIS, Craig F. **Wheat arabinoxylan structure provides insight into function**. *Cereal Chemistry*, v. 90, n. 4, p. 387-395, 2013.

LEE, Dong-Hun; KIM, Chang-Joon; KIM, Sung-Bae. **Hemicellulose recovery from rice straw using dilute sulfuric acid**. *Microbiology and Biotechnology Letters*, v. 37, n. 3, p. 226-230, 2009.

LI, Na et al. **Improving catalytic efficiency of endoxylanase for degrading corncob xylan to produce xylooligosaccharides by fusing a β -xylosidase**. *Industrial Crops and Products*, v. 176, p. 114349, 2022.

MARABEZI, Karen. **Estudo sistemático das reações envolvidas na determinação dos teores de lignina e holocelulose em amostras de bagaço e palha de cana-de-açúcar**. 2009. Dissertação (Mestrado em Físico-Química) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009. doi:10.11606/D.75.2009.tde-07102009-100309. Acesso em: 2019- 02-11

MARTÍNEZ-PATIÑO, José Carlos et al. **Combined acid/alkaline-peroxide pretreatment of olive tree biomass for bioethanol production**. Bioresource technology, v. 239, p. 326-335, 2017.

MARTINS, Júlia Ribeiro; ABE, Mateus Manabu; BRIENZO, Michel. **Chemical Modification Strategies for Developing Functionalized Hemicellulose: Advanced Applications of Modified Hemicellulose**. In: Hemicellulose Biorefinery: A Sustainable Solution for Value Addition to Bio-Based Products and Bioenergy. Springer, Singapore, 2022. p. 171-205.

McMILLAN, J. D. in **Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production**, HIMMEL, M. E.; BAKER, J. O.; OVEREND, R. A. eds., ACS Symposium Series 566, American Chemical Society, Washington, DC, p. 411–437, 1994.

MELATI, Ranieri Bueno. **Influência anatômica da cana-de-açúcar em processos de extração de hemiceluloses e uso como substrato em atividade enzimática**. 2018.

MONTEIRO, Carla RM et al. **Hydrothermal treatment on depolymerization of hemicellulose of mango seed shell for the production of xylooligosaccharides**. Carbohydrate Polymers, v. 253, p. 117274, 2021.

NEILANDS, John Brian; STUMPF, Paul S. **Outlines of enzyme chemistry**. LWW, 1955.

OGATA, Bruna Harumi. **Caracterização das frações celulose, hemicelulose e lignina de diferentes genótipos de cana-de-açúcar e potencial de uso em biorrefinarias**. 2013. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

OGEDA, Thais Lucy; PETRI, Denise FS. **Hidrólise enzimática de biomassa**. Química nova, v. 33, p. 1549-1558, 2010.

OLIVEIRA, Ravena Casemiro. **Estudo das condições reacionais na produção de D-Tagatose catalisada por L-Arabinose isomerase**. 2019.

PEREIRA, Beatriz Salustiano et al. **Enzymatic Production of Xylooligosaccharides from Xylan Solubilized from Food and Agroindustrial Waste**. BioEnergy Research, p. 1-9, 2022.

POLIZELI, M. L. T. M. et al. **Xylanases from fungi: properties and industrial applications**. Applied Microbiology and Biotechnology. v. 67, n.5, p. 577-591, 2005.

RAMOS, Ludmila de Araujo et al. **Síntese de ésteres de celulose no novo sistema de solventes dimetilsulfóxido/tetrabutilamônio**. Resumos, 2003.

RESENDE, Rodrigo R.; SOCCOL, Carlos R. **Biotecnologia aplicada à agro&indústria: fundamentos e aplicações**. Editora Blucher, 2016. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788521211150/>. Acesso em: 11 abr. 2022.

SANDOVAL, Maria Helena Lesqueves; CAIXETA, Clarice Martins; RIBEIRO, Nathalia Meireles. **Avaliação in vivo e in vitro da eficácia de um produto com associação de vitamina C, ácido hialurônico fragmentado e manose na prevenção do envelhecimento cutâneo**. Surgical & Cosmetic Dermatology, v. 7, n. 1, p. 37-44, 2015.

SANTOS, Ana Lúcia Estevam dos et al. **Avaliação do efeito anti-inflamatório da Lectina Manose Ligante obtida das sementes de Machaerium acutifolium Vogel**. 2021.

SANTOS, Fernando A. et al. **Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol**. Química nova, v. 35, p. 1004-1010, 2012.

SARKAR, Nibedita et al. **Bioethanol production from agricultural wastes: an overview**. Renewable energy, v. 37, n. 1, p. 19-27, 2012.

SILVA, Mylenne Calciolari Pinheiro da. **Bioprospecção de xilanase e α -amilase por meio de métodos independentes e dependentes de cultivo microbiano em um solo de manguezal**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

SILVA, Rosimeire Oenning da. **Bioprospecção de leveduras fermentadoras de xilose visando a produção de etanol a partir de bagaço de cana-de-açúcar**. 2015.

SILVA, Silvio Silvério da et al. **Xilitol: um adoçante alternativo para a indústria de alimentos**. Alimentos e Nutrição Araraquara, v. 5, n. 1, 2009.

SOBRINHO CHEMMÉS, Camila, et al. **"Estudo de métodos físico-químicos no pré-tratamento de resíduos lignocelulósicos para produção de etanol de segunda geração."** Seminário Estudantil de Produção Acadêmica 12.1 (2013).

SOMERA, A. F. et al. **Effect of glycosylation on the biochemical properties of β xylosidases from *Aspergillus versicolor***. The Journal of Microbiology, v. 47, n. 3, p.270-276, 2009.

SUN, RunCang; SUN, X. F.; TOMKINSON, J. **Hemicelluloses and their derivatives**. 2004.

TÍMÁR-BALÁZSY, A. & EASTOP, D. **Chemical Principles of Textile Conservation Butterworth Heinemann**, Oxford, UK: ButterworthHeinemann. Trends in biotechnology, v. 24, n. 12, p. 549-56, 1998.

VÁZQUEZ, M. J. et al. **Xylooligosaccharides: manufacture and applications**. Trends in Food Science & Technology, v. 11, n. 11, p. 387-393, 2000.

WANG, Shurong et al. **Pyrolysis behaviors of four O-acetyl-preserved hemicelluloses isolated from hardwoods and softwoods.** Fuel, v. 150, p. 243-251, 2015.

XU, F. et al. **Characterisation of degraded organosolv hemicelluloses from wheat straw.** Polymer Degradation and Stability, v. 91, n. 8, p. 1880-1886, 2006.

YANG, Haiping et al. **Characteristics of hemicellulose, cellulose and lignin pyrolysis.** Fuel, v. 86, n. 12-13, p. 1781-1788, 2007.