

Trabalho de Conclusão de Curso

Hidrólise de xilana de Beechwood com xilanase comercial imobilizada em óxido de grafeno magnetizado

Aluna: Heloisa Baeza Moreno

Orientador: Prof. Dr. Fernando Masarin

Araraquara

Novembro/2023

Heloisa Baeza Moreno

***Hidrólise de xilana de Beechwood com xilanase comercial
imobilizada em óxido de grafeno magnetizado***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Engenheira de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Masarin

Araraquara

Novembro/2023

M843h

Moreno, Heloisa Baeza.

Hidrólise de xilana de *Beechwood* com xilanase comercial
imobilizada em óxido de grafeno magnetizado / Heloisa Baeza
Moreno. – Araraquara: [s.n.], 2023.
79 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação – Engenharia de
Bioprocessos e Biotecnologia) – Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Fernando Masarin.

1. Óxido de grafeno. 2. Imobilização de enzimas. 3. Xilanase. 4.
Xilo-oligossacarídeos. 5. *Beechwood*. 6. Hidrólise enzimática. I.
Masarin, Fernando, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, que orgulhosamente sempre confiou em mim e me forneceu todos os recursos e forças necessárias para estudar. Agradeço ao Gustavo, por todos os incentivos e o melhor apoio que alguém poderia dar, mesmo nos dias mais difíceis me mostrou que o que o amor é capaz de fazer.

Aos meus amigos “Panelinha Formada”, gostaria de agradecer por todos os momentos compartilhados e todos os trabalhos que fizemos juntos, estudar com vocês foi uma honra. À Larissa, que tornou a saída de casa um ponto de luz para mim, obrigada pelo companheirismo e por dividir e confiar esse momento tão importante de nossas vidas comigo.

Gostaria também de agradecer ao grupo de pesquisa e colaboradores do laboratório: Ismael, Cecília, Eddyn, Bianca, Ana Lucia, Adriana, por auxiliar e compartilhar conhecimento. À FAPESP agradeço pela oportunidade e pelo auxílio acadêmico para realizar minha iniciação científica (2022/06025-4).

Por fim, gostaria de agradecer imensamente ao corpo docente da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e ao meu orientador, Fernando Masarin, por todos os ensinamentos, sugestões, conversas, paciência, encorajamento e pela oportunidade de me aproximar do meio acadêmico.

RESUMO

A biomassa lignocelulósica trata-se de um subproduto agroindustrial de fonte renovável com alta disponibilidade e baixo custo, é rico em celulose, xilana e lignina, e, portanto, apresenta um alto potencial de aproveitamento para a produção de bioprodutos com alto valor agregado, como por exemplo, os xilo-oligossacarídeos (XOS). Entretanto, o uso de enzimas pode ser economicamente inviável dependendo de seu custo e da dificuldade de manutenção de sua estabilidade durante o processo biocatalítico. A fim de superar essas limitações, surge como uma técnica promissora a imobilização de enzimas em materiais sólidos o que oferece algumas vantagens, destacando-se a possibilidade de reuso da enzima e melhora em sua estabilidade e maior facilidade na separação do bioproduto. Nesse cenário, o óxido de grafeno (OG) se apresenta como um material promissor para a imobilização de enzimas, uma vez que este possui uma grande área superficial, compreendendo átomos de carbono, hidrogênio e oxigênio. Nesse contexto, o presente projeto propõe imobilizar enzimas celulolíticas, de preparado enzimático comercial (*Celluclast-Novozymes*), em óxido de grafeno magnetizado (OGM), avaliar o potencial da imobilização no presente suporte, além do potencial de hidrólise sobre xilana comercial de *Beechwood* visando à produção de XOS. As atividades enzimáticas específicas médias de endoglucanase e xilanase nas condições ideais foram de 4,2 e 11,75 U.mg⁻¹, respectivamente. Os primeiros ensaios de imobilização foram satisfatórios, apresentando uma atividade enzimática do derivado enzimático (OGM-Enz) de endoglucanase e xilanase de 191,3 e 338,5 U.g⁻¹ (atividade por grama de derivado), respectivamente. O pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar (BCA) com peróxido-ácido acético (PHAA) mostrou-se seletivo para a remoção de lignina, porém também removeu significativamente a fração hemicelulósica, resultado não desejável. A hidrólise enzimática da xilana de *Beechwood* com OGM-Enz resultou em uma conversão de XOS máxima de 11,5% com uma carga de 180 U.g⁻¹ em 24 horas, resultando semelhante com a enzima em sua forma livre. Após o primeiro ciclo de hidrólise (após a recuperação do OGM-Enz) a conversão foi mantida, no entanto, após o quarto ciclo de reuso foi verificada uma conversão de 4,5% resultando em diminuição de 60%.

Palavras chaves: óxido de grafeno; imobilização de enzimas; xilanase; xilo-oligossacarídeos; *Beechwood*; hidrólise enzimática.

ABSTRACT

Lignocellulosic biomass is an agro-industrial byproduct from a renewable source with high availability and low cost, with high content of cellulose, xylan, and lignin, and, therefore, has a high potential for use in the production of bioproducts with greater added value, such as xylooligosaccharides (XOS). However, the use of enzymes may be uneconomical depending on their cost and the difficulty of maintaining their stability during the biocatalytic process. In order to overcome these constraints, the enzyme immobilization in solid materials arise as a promising technique, which offers some advantages, such as the possibility of enzyme reuse, easier byproduct separation, and better enzyme stability. In this context, graphene oxide (GO) is a propitious material for enzyme immobilization, since it has a high surface area, carrying carbon, hydrogen, and oxygen atoms. In this scenario, this work proposal aims to evaluate the immobilization of commercial xylanase (*Celluclast*-Novozymes) in magnetized graphene oxide (GO-MNP) and its hydrolysis potential on *Beechwood* xylan aiming the production of XOS. The specific enzymatic activities of endoglucanase and xylanase under ideal conditions were 4.2 and 11.75 U.mg⁻¹, respectively. GO-MNP synthesis was successfully achieved. The first immobilization assays were satisfactory, showing an enzymatic activity of the enzymatic derivative (GO-MNP-Enz) of endoglucanase and xylanase of 191.3 and 338.5 U.g⁻¹ (activity per gram of derivative), respectively. Pretreatment of sugarcane bagasse (SCB) with peroxide-acetic acid (PHAA) proved to be selective for the removal of lignin, but it also significantly removed the hemicellulosic fraction, unwanted result. The *Beechwood* xylan conversion maximum to XOS with GO-MNP-Enz was 11.5% with a load of 180 U.g⁻¹ in 24 hours, similar results with the enzyme in its free form. After the first hydrolysis cycle (after recovery of GO-MNP-Enz) the conversion was maintained, however, after the fourth reuse cycle the *Beechwood* xylan conversion to XOS was 4.5%, resulting in a decrease of 60%.

Keywords: graphene oxide; enzyme immobilization; xylanase; xylooligosaccharides; *Beechwood*; enzymatic hydrolysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fórmula estrutural do grafeno (A) e do óxido de grafeno (B).....	14
Figura 2. Rota esquemática para a síntese de OGM.....	15
Figura 3. Imobilização por ligação covalente em suporte funcionalizado.....	16
Figura 4. Imagens de microscopia de força atômica da peroxidase de rábano (HRP) ligada ao GO com (A) baixa carga de enzimas e (B) alta carga de enzimas. (C) Modelo esquemático da HRP ligada ao OG.....	17
Figura 5. (A) Procedimento de magnetização e (B) funcionalização do óxido de grafeno. (C) Imobilização de Lipase.....	18
Figura 6. Representação esquemática da imobilização de BSA em óxido de grafeno funcionalizado com EDAC e NHS.....	18
Figura 7. Representação da estrutura de um fragmento de celulose.....	20
Figura 8. Representação esquemática da estrutura geral de uma molécula de xilana.....	22
Figura 9. Estrutura - modelo da lignina.....	23
Figura 10. (A) Corte ilustrativo do sistema de camadas na parede das células de madeira. (B) Microscopia eletrônica de transmissão das células de madeira mostrando as camadas da parede celular: ML = lamela média, P = parede primária, S ₁ = parede secundária, S ₂ = parede secundária e T = parede terciária.....	24
Figura 11. (A) Microscopia eletrônica de lignocelulósico. (B) Modelo didático que explica como as microfibrilas de celulose estão organizadas e encaixadas em uma matriz de hemicelulose e lignina presente em um lignocelulósico.....	24
Figura 12. Ponto de clivagem da xilana por β -1,4 endoxilanase.....	25
Figura 13. Modo de ação das enzimas do complexo celulolítico de <i>Trichoderma reesei</i>	26
Figura 14. Curva analítica para determinação de atividade de endoglucanase. Concentração de glicose em função da absorbância.....	39
Figura 15. Curva analítica para determinação da atividade de endoglucanase. Concentração de glicose em função do logaritmo do inverso da diluição do preparado enzimático <i>Celluclast</i>	40
Figura 16. Concentração de glicose em função do logaritmo do inverso da diluição do preparado enzimático <i>Celluclast</i>	40

Figura 17. Triplicata da concentração de glicose em função do logaritmo do inverso da diluição do preparado enzimático <i>Celluclast</i> . Diluições de preparado enzimático <i>Celluclast</i> (1:5000, 1:2000, 1:1000, 1:600 e 1:400).....	41
Figura 18. Curva analítica para determinação da atividade de endoxilanase.....	42
Figura 19. Óxido de Grafeno (OG) após secagem.....	43
Figura 20. Processo de lavagem do Óxido de grafeno Magnetizado (OGM), com o auxílio de um ímã.....	43
Figura 21. Óxido de Grafeno Magnetizado (OGM) sendo atraído por um ímã....	44
Figura 22. Rendimento de imobilização (%) (azul), proteína imobilizada (mg.g ⁻¹) (laranja) e atividade de endoxilanase (U.g ⁻¹) (verde) em cada ensaio realizado, em relação a quantidade de proteína adicionada (mg) (eixo X). Os dados de proteína imobilizada foram reportados em miligramas por grama de suporte (OGM). Os dados de atividade enzimática foram reportados em U por grama de OGM.....	45
Figura 23. Rendimento de imobilização (%) (azul), proteína imobilizada (mg.g ⁻¹) (laranja) e atividade de endoglucanase (U.g ⁻¹) (verde) em cada ensaio realizado, em relação a quantidade de proteína adicionada (mg) (eixo X). Os dados de proteína imobilizada foram reportados em miligramas por grama de suporte (OGM). Os dados de atividade enzimática foram reportados em U por grama de OGM).....	45
Figura 24. Rendimento de imobilização por proteínas em função do tempo de imobilização.....	46
Figura 25. Bagaço de cana-de-açúcar em sua forma natura não moído.....	49
Figura 26. Cromatograma de padrões analíticos obtidos pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Foi utilizada a coluna cromatográfica HPX87H. (A) glicose (B) xilose (C) arabinose (D) ácido fórmico (E) ácido acético (F) ácido levulínico.....	50
Figura 27. Cromatograma de hidrolisado ácido do bagaço de cana-de-açúcar (BCA) obtidos pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Foi utilizada a coluna cromatográfica HPX87H. (A) glicose. (B) xilose. (C) arabinose. (D) ácido acético.....	51
Figura 28. Cromatograma de padrões analíticos obtidos pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Foi utilizada a coluna cromatográfica C18. (A) hidroximetilfurfural (HMF). (B) furfural.....	52
Figura 29. Cromatograma de hidrolisado ácido do bagaço de cana-de-açúcar (BCA) obtidos pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).	

Foi utilizada a coluna cromatográfica C18. (A) hidroximetilfurfural (HMF). (B) furfural.....52

Figura 30. Bagaço de cana-de-açúcar após pré-tratamento com PHAA por 120 min.....54

Figura 31. (A) Xilana de *Beechwood* comercial. (B) Xilana extraída de BCA.....57

Figura 32. Cromatograma de hidrolisado ácido do bagaço de cana-de-açúcar (BCA) obtidos pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Foi utilizada a coluna cromatográfica HPX87C. Cromatograma de padrões analíticos de XOS. (A) X_{>5}. (B) X₄. (C) X₃. (D) X₂. (E) X₁.59

Figura 33. Cromatograma de hidrolisado enzimático de xilana de *Beechwood* obtidos pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Foi utilizada a coluna cromatográfica HPX87C. Cromatograma de padrões analíticos de XOS. (A) X_{>5}. (B) X₄. (C) X₃. (D) X₂. (E) X₁.....60

Figura 34. Cromatograma de controle enzimático do substrato de xilana de *Beechwood* após 3 horas de incubação em solução tampão obtidos pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Foi utilizada a coluna cromatográfica HPX87C.....61

Figura 35. Cinética da hidrólise enzimática de xilana de *Beechwood* com xilanase de preparado enzimático *Celluclast*. (A) Livre. (B) Imobilizado 80 U.g⁻¹. (C) Imobilizado 160 U.g⁻¹.....63

Figura 36. Conversão de xilana em XOS a partir da hidrólise enzimática de xilana de *Beechwood* com preparado enzimático *Celluclast*. (A) Livre. (B) Imobilizado 80 U.g⁻¹. (C) Imobilizado 160 U.g⁻¹.....64

Figura 37. Conversão de xilana em XOS e xilose a partir do reuso do derivado enzimático (OGM-Enz).....66

Figura 38. Curva analítica para determinação da quantidade de proteínas totais, via método de *Bradford*. (Apêndice).....73

Figura 39. Curva analítica para determinação da concentração de glicose utilizando uma coluna HPX-87H. (Apêndice).....73

Figura 40. Curva analítica para determinação da concentração de xilose utilizando uma coluna HPX-87H. (Apêndice).....74

Figura 41. Curva analítica para determinação da concentração de arabinose utilizando uma coluna HPX-87H. (Apêndice).....74

Figura 42. Curva analítica para determinação da concentração de ácido fórmico utilizando uma coluna HPX-87H. (Apêndice).....75

Figura 43. Curva analítica para determinação da concentração de ácido acético utilizando uma coluna HPX-87H. (Apêndice).....	75
Figura 44. Curva analítica para determinação da concentração de ácido levulínico utilizando uma coluna HPX-87H. (Apêndice).....	76
Figura 45. Curva analítica para determinação da concentração de hidroximetilfurfural utilizando uma coluna C18. (Apêndice).....	76
Figura 46. Curva analítica para determinação da concentração de furfural utilizando uma coluna C18. (Apêndice).....	77
Figura 47. Curva analítica para determinação da concentração de xilose utilizando uma coluna HPX-87C. (Apêndice).....	77
Figura 48. Curva analítica para determinação da concentração de xilobiose utilizando uma coluna HPX-87C. (Apêndice).....	78
Figura 49. Curva analítica para determinação da concentração de xilotriose utilizando uma coluna HPX-87C. (Apêndice)	78
Figura 50. Curva analítica para determinação da concentração de xilotetraose utilizando uma coluna HPX-87C. (Apêndice).....	79

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	13
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
3.1 Óxido de grafeno.....	14
3.2 Magnetização do óxido de grafeno (OG)	15
3.3 Imobilização de enzimas.....	15
3.4 Imobilização de enzimas em óxido de grafeno (OG) como suporte....	17
3.5 Composição química e estrutura dos materiais lignocelulósicos.....	19
3.6 Enzimas de interesse comercial para conversão de biomassa.....	25
3.7 Oligossacarídeos não digeríveis.....	26
3.8 Xilo-oligossacarídeos (XOS).....	27
4. MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1 Determinação das atividades enzimáticas.....	28
4.2 Determinação de proteínas.....	29
4.3 Síntese de óxido de grafeno (OG).....	29
4.4 Síntese de óxido de grafeno magnetizado (OGM).....	30
4.5 Imobilização covalente de endoglucanase e endoxilanase em OGM.....	31
4.6 Obtenção e caracterização química de xilana de bagaço de cana-de- açúcar (BCA).....	32
4.7 Hidrólise enzimática da xilana e determinação dos xilo- oligossacarídeos (XOS).....	37
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1 Determinação de proteínas.....	38

5.2	Determinação das atividades enzimáticas do preparado enzimático <i>Celluclast</i>	38
5.3	Síntese do suporte para imobilização das enzimas.....	42
5.4	Imobilização de endoglucanase e endoxilanase em óxido de grafeno magnetizado (OGM).....	44
5.5	Obtenção e caracterização química das xilanas	49
5.6	Hidrólise Enzimática de xilana e determinação dos xilo-oligossacarídeos (XOS).....	59
6.	CONCLUSÃO	67
	REFERÊNCIAS	68
	APÊNDICE.....	73

1. INTRODUÇÃO

As celulasas e hemicelulasas são enzimas capazes de promover a hidrólise de materiais lignocelulósicos, os quais são compostos principalmente pelas seguintes macromoléculas: celulose, hemicelulose e lignina. Estas enzimas são biocatalisadores altamente específicos que atuam em conjunto na conversão de celulose/hemicelulose em oligossacarídeos e monômeros de açúcares com menor complexidade estrutural e mais facilmente metabolizáveis (MAITAN-ALFENAS *et al.*, 2015).

O Brasil, um dos maiores produtores agrícolas do mundo, gera quantidades significativas de subprodutos decorrentes do processamento de matérias-primas (cana-de-açúcar, arroz, milho, soja, dentre outros) em bioprodutos de interesse comercial (MORAES *et al.*, 2017). Os subprodutos agroindustriais são constituídos principalmente por celulose, hemicelulose e lignina. Atualmente, a utilização destes subprodutos tem crescido substancialmente abrangendo aspectos econômicos e ambientais. Os segmentos agrícola e florestal, seguindo princípios de sustentabilidade global, têm dado recentemente mais atenção à utilização completa da biomassa lignocelulósica e à sua conversão em produtos de alto valor a partir de uma etapa chave no processamento utilizando hidrólise (LI *et al.*, 2016). Entre estes, destacam-se os xilo-oligossacarídeos (XOS) que são especialmente atraentes nos setores farmacêutico, fitofarmacêutica e alimentar, pois, promovem atividade prebiótica sendo considerado um nutracêutico. Os XOS já têm uma procura global crescente que deverá atingir 130 milhões de dólares até 2025 (SANTIBÁÑEZ *et al.*, 2021).

O uso de enzimas em escala industrial torna-se inviável dependendo de seu custo e da dificuldade de manutenção da estabilidade estrutural durante o processo catalítico. A fim de superar essas limitações, surge como uma alternativa a técnica de imobilização de enzimas. A imobilização de enzimas em suportes sólidos possui uma série de vantagens, como por exemplo, a reutilização da enzima, maior facilidade nas etapas de *downstream*, por exemplo, o refino dos bioprodutos, além de possível aumento da estabilidade da enzima (ARAGON, 2013). A imobilização por ligação do tipo covalente, um dos métodos de imobilização mais estudados, envolve o acoplamento irreversível de enzimas a um suporte adequado. Este método, portanto, é uma das formas mais estáveis das técnicas de imobilização. Embora a literatura

ainda não reporte muitos estudos acerca da ligação de biomacromoléculas (enzimas) em óxido de grafeno (OG), sabe-se que este possui grande área superficial, abundantes grupos funcionais contendo oxigênio e capacidade de dispersar-se em água, desta forma, permitindo que este material seja muito promissor para a imobilização de enzimas de interesse comercial (HEIDARIZADEH *et al.*, 2017; PARK, RUOFF, 2009; PAZ-CEDENO *et al.*, 2021).

Dentro do contexto apresentado o presente trabalho pretende avaliar a eficiência de imobilização de endoxilanase e endoglucanase (presentes em preparado enzimático comercial, *Celluclast-Novozymes*) e o potencial de hidrólise de xilana comercial de *Beechwood* em XOS com a enzima imobilizada em OGM.

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo principal

Avaliar o potencial de hidrólise enzimática de xilana com endoxilanase de preparado enzimático comercial imobilizada em óxido de grafeno magnetizado (OGM).

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a atividade enzimática de endoglucanase e xilanase em sua forma livre (preparado enzimático comercial, *Celluclast-Novozymes*);
- Sintetizar o óxido de grafeno magnetizado (OGM);
- Imobilizar xilanase e endoglunase de *Celluclast* em suporte de óxido de grafeno magnetizado (OGM-Enz);
- Avaliar as atividades enzimáticas de endoglucanase e xilanase em sua forma imobilizada (OGM-Enz);
- Avaliar a extração de xilana a partir do bagaço de cana-de-açúcar (BCA);
- Avaliação do potencial de hidrólise de xilana comercial de *Beechwood* utilizando xilanase em suas formas livre e imobilizada em resposta à produção de xilo-oligossacarídeos (XOS);

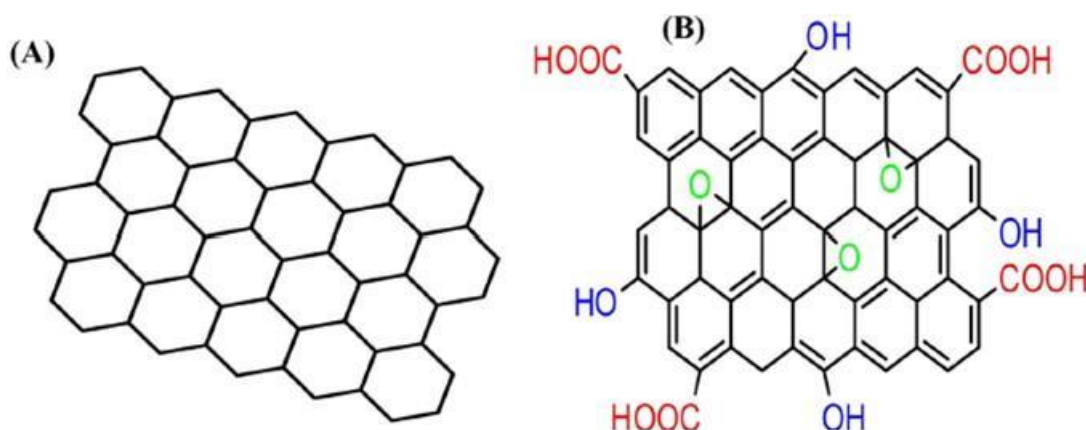
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Óxido de grafeno

Estudos acerca da oxidação de grafite têm sido realizados há mais de um século, abrangendo desde sua caracterização até suas aplicações. O grafite reage com agentes oxidantes fortes, tais como permanganato de potássio (KMnO_4) e ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) e, posteriormente, segue-se os processos de purificação e esfoliação em água, como introduzido por Hummers e Offeman (HUMMERS; OFFEMAN, 1958).

O óxido de grafite tem uma estrutura em forma de camadas semelhante à do grafite, porém o plano dos átomos de carbono está ligado à vários grupos que contêm oxigênio, os quais são responsáveis por expandir a distância entre as camadas e torná-las hidrofílicas. Estas camadas oxidadas podem ser esfoliadas em água sob a ação de ultrassom. Quando o material esfoliado contém apenas uma ou poucas camadas de átomos de carbono, como o grafeno, denomina-se óxido de grafeno (OG) (NOVOSELOV, 2004) (Figura 1).

Figura 1. Fórmula estrutural do grafeno (A) e do óxido de grafeno (B)



Fonte: Adeel et al. (2018)

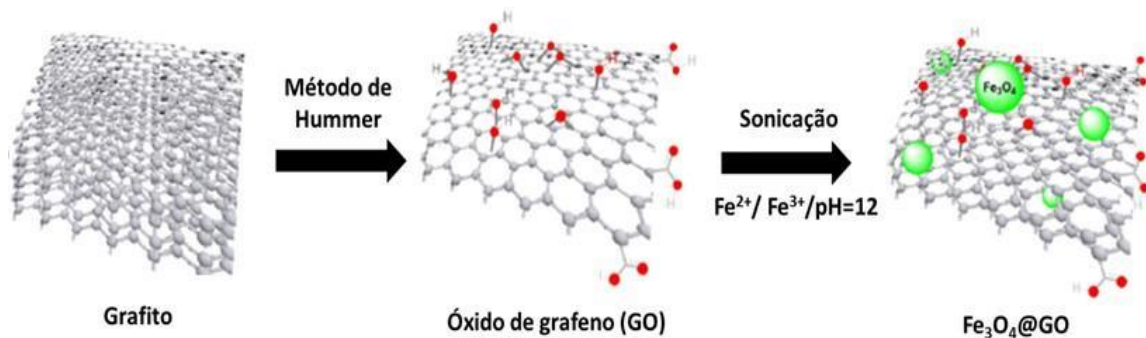
Sendo assim, o OG é um material de camada atômica única formada por moléculas de carbono, hidrogênio e oxigênio, e pode ser obtido pela oxidação de cristais de grafite, os quais são baratos e abundantes (RAY, 2015; ADEEL *et al.*, 2018).

O OG apresenta potencial para ser empregado em processos de imobilização de enzimas. Recentemente, alguns trabalhos sobre magnetização de OG, junto à sua utilização como suporte para imobilização de enzimas, têm revelado grande potencial para essa aplicação (HEIDARIZADEH *et al.*, 2017; PAZ-CEDENO *et al.*, 2021).

3.2. Magnetização do óxido de grafeno (OG)

Desde a descoberta das primeiras nanopartículas magnéticas, foram desenvolvidos vários tipos de aplicações e dentre elas, pode-se destacar a catálise (ROSTAMNIA *et al.*, 2015; ROSTAMNIA; DOUSTKHAH, 2015; SBISSI *et al.*, 2015). As nanopartículas magnéticas podem ser formadas a partir de óxido de ferro III (Fe_3O_4) e óxido de ferro II (Fe_2O_3). Estes nanomateriais são famosos por suas propriedades magnéticas, as quais permitem sua fácil recuperação com o auxílio de um ímã externo (Figura 2). Nanopartículas de Fe_3O_4 podem ser ligadas à superfície do OG por coprecipitação de Fe^{2+} e Fe^{3+} em solução alcalina sobre a adição de amônia a 80°C formando-se o oxido de grafeno magnetizado (OGM) (Figura 2) (DOUSTKHAH; ROSTAMNIA, 2016).

Figura 2. Rota esquemática para a síntese de OGM.



Fonte: Doustkhah; Rostamnia, (2016)

3.3. Imobilização de enzimas

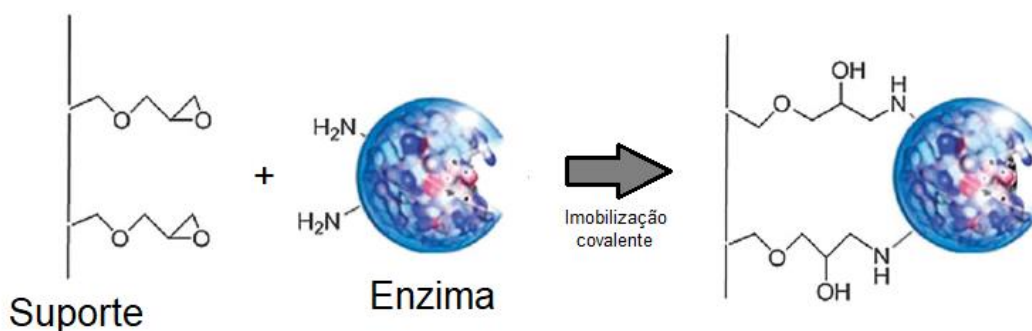
Enzimas são biocatalisadores específicos e sustentáveis na natureza. A biocatálise surgiu como uma importante tecnologia para atender à crescente demanda por produtos mais sustentáveis, especialmente na síntese de produtos farmacêuticos, alimentícios e outros produtos químicos finos. Graças aos avanços nas áreas de biotecnologia e de engenharia de proteínas, atualmente é possível produzir muitas

enzimas para fins comerciais, de tal maneira a garantir as propriedades enzimáticas desejadas, tais como à especificidade do substrato, atividade, seletividade e estabilidade (SHELDON; VAN PELT, 2013).

Apesar de todas as vantagens apresentadas, o uso de enzimas em escala industrial geralmente é dificultado pelos elevados custos desses recursos e pela difícil manutenção da estabilidade da enzima, o que muitas vezes não permite a reutilização desta. Sendo assim, as técnicas de imobilização visam suprir essas desvantagens. Além do manuseio mais adequado da enzima, com uma formulação sólida ao invés de líquida, a imobilização também facilita a recuperação e a reutilização da enzima, permitindo assim o seu uso rentável, como por exemplo, em operações contínuas em biorreatores de leito fixo. Outro benefício que também pode ser observado é o melhoramento da estabilidade frente as condições do processo catalítico (SHELDON; VAN PELT, 2013).

Sobretudo, os métodos de imobilização enzimática podem ser divididos em três categorias: ligação em suportes sólidos, confinamento e ligações cruzadas. A ligação a um suporte pode ser física (adsorção), iônicas ou covalentes. No entanto, em geral a adsorção física não é forte o suficiente para manter a enzima fixada ao suporte sob condições industriais rigorosas. As ligações iônicas e covalentes são mais fortes e capazes de impedir que a enzima sofra lixiviação da superfície do suporte. A ligação covalente é uma das formas mais estáveis de imobilização, uma vez que envolve a associação irreversível da enzima com o suporte adequado (Figura 3) (ARAGON, 2013; SHELDON; VAN PELT, 2013).

Figura 3. Imobilização por ligação covalente em suporte funcionalizado.



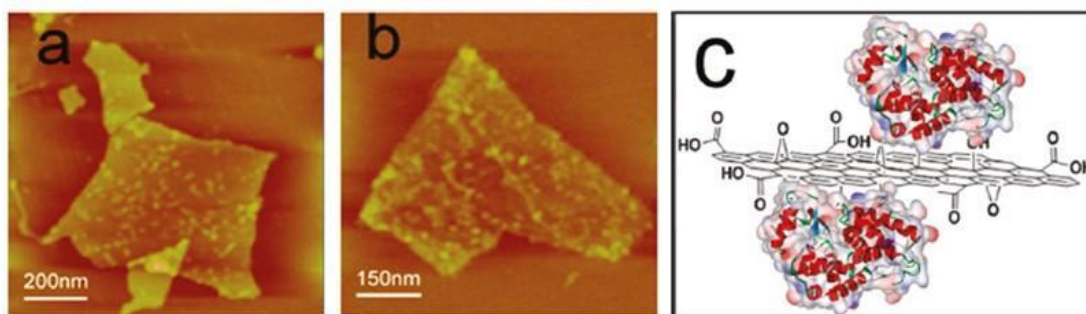
Fonte: Adaptado de Sheldon; Van Pelt (2013).

3.4. Imobilização de enzimas em óxido de grafeno (OG) como suporte

A área superficial teórica de 890 m² (MONTES-NAVAJAS *et al.*, 2013), os abundantes grupos funcionais contendo oxigênio, como grupos epóxi, hidroxila e carboxila e a alta solubilidade em água fazem com que OG seja um material muito promissor para muitas aplicações (LI *et al.*, 2008; PARK; RUOFF, 2009). No entanto, até o momento poucos estudos sobre ligações de biomacromoléculas, como enzimas, ao OG foram reportados na literatura (ZHANG *et al.*, 2010).

Zhang *et al.* (2010) demonstraram que filmes de OG podem ser usados como suportes para imobilizar a enzima peroxidase de rábano (HRP). Os grupos funcionais da superfície do OG fazem a imobilização das enzimas ocorrer rapidamente através da interação eletrostática sem fazer nenhuma modificação previa no material. A superfície plana do OG permite visualizar a enzima imobilizada *in situ* usando microscopia de força atômica, conforme apresentado na Figura 4 (ZHANG *et al.*, 2010).

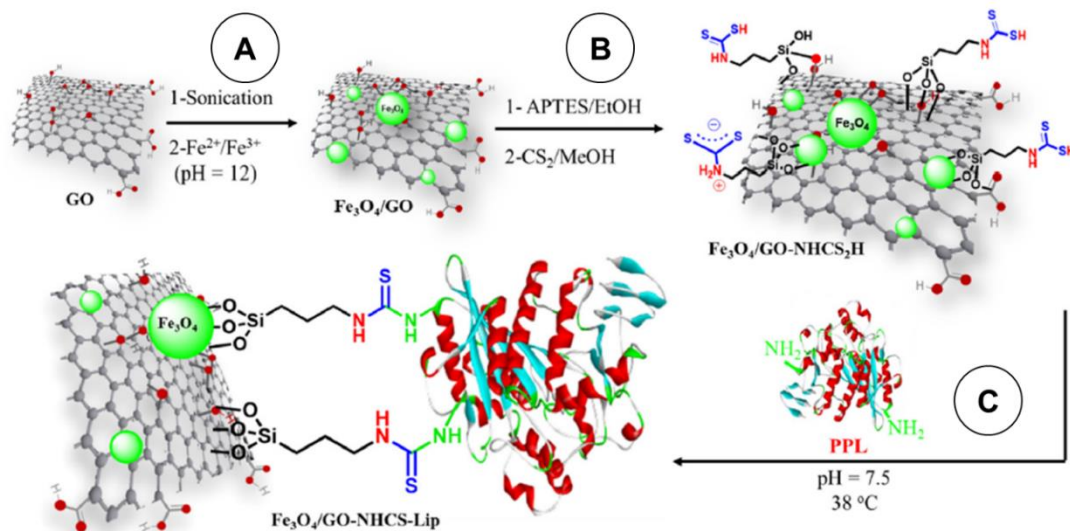
Figura 4. Imagens de microscopia de força atômica da peroxidase de rábano (HRP) ligada ao OG com **(a)** baixa carga de enzimas e **(b)** alta carga de enzimas. **(c)** Modelo esquemático da HRP ligada ao OG.



Fonte: Zhang *et al.* (2010).

Heidarizadeh *et al.* (2017) reportaram a imobilização covalente de lipase de pâncreas porcino (PPL) na superfície de OGM funcionalizando a superfície deste com a utilização de (3-aminopropil) trietoxissilano (APTES) e CS₂, conforme apresentado na Figura 5.

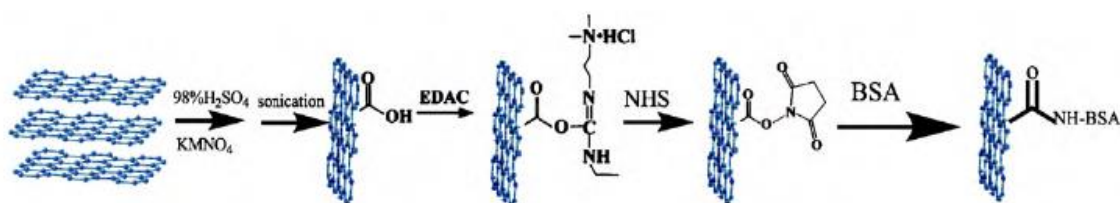
Figura 5. (A) Procedimento de magnetização e (B) funcionalização do óxido de grafeno magnetizado (OGM). (C) Imobilização de Lipase.



Fonte: Heidarizadeh *et al.* (2017).

Outro exemplo de funcionalização OG é o estudo reportado por Shen *et al.* (2010), o qual avaliou a imobilização da proteína albumina de soro bovino (BSA) utilizado como um modelo, a partir de amidação ativada por diimida (Figura 6). O processo contém duas principais etapas: primeiramente, os grupos carboxílicos do OG são ativados por cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDAC). O éster ativo estável é formado na presença de N-Hidroxissuccinimida (NHS). Em segundo lugar, o éster ativo reage com os grupos amina da BSA, formando uma ligação covalente entre a amida, o OG e o BSA (Figura 6). O procedimento de preparação do OG não causou desnaturação das espécies proteicas e garantiram a fixação uniforme da BSA no OG. Além disso, o presente método apresentado é promissor para ser usado na ligação de outros sistemas biológicos à materiais a base de grafeno (SHEN *et al.*, 2010).

Figura 6. Representação esquemática da imobilização de BSA em óxido de grafeno (OG) funcionalizado com cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDAC) e N-Hidroxissuccinimida (NHS).



Fonte: Shen *et al.* (2010).

Por fim, um estudo realizado por Paz-Cedeno *et al.* (2021) avaliou a imobilização de xilanase e celulasas de preparado enzimático *Cellic CTec 2- Novozymes* em OGM. O OG foi obtido pelo método tradicional de Hummer's e a adição de nanopartículas magnéticas foi realizada por co-precipitação de sais de ferro, obtendo o OGM. A imobilização das enzimas também foi realizada a partir de amidação ativada por diimida e sua caracterização estrutural (TEM, SEM e ATR-FTIR) mostrou que as nanopartículas magnéticas estão distribuídas homogeneamente na superfície das folhas de OG. Foi reportado uma alta estabilidade do biocatalisador, o qual manteve-se em alta atividade relativa mesmo após 10 ciclos de hidrólise com substrato específico. O biocatalisador (OGM-Enz) também se mostrou eficiente na conversão de celulose e xilana em glicose e xilose, respectivamente, de BCA pré-tratado. Essas descobertas sugerem que o OGM-Enz é um candidato com potencial para aplicações industriais, como por exemplo, à produção de etanol de segunda geração (PAZ-CEDENO *et al.*, 2021).

3.5. Composição química e estrutura dos materiais lignocelulósicos

A biomassa vegetal é a fonte renovável mais abundantemente encontrada na natureza, englobando principalmente os subprodutos agroindustriais e os resíduos urbanos. Os materiais lignocelulósicos são formados basicamente por celulose, hemicelulose e lignina. Essas frações dominantes são responsáveis por 97-99% de toda biomassa dos materiais lignocelulósicos (base seca). A composição química dos materiais lignocelulósicos presentes na parece celular varia de espécie para espécie. De maneira geral, a celulose está presente em maior quantidade, seguida da lignina e, por fim, da hemicelulose (CASTRO; JUNIOR, 2010; MAITAN-ALFENAS *et al.*, 2015).

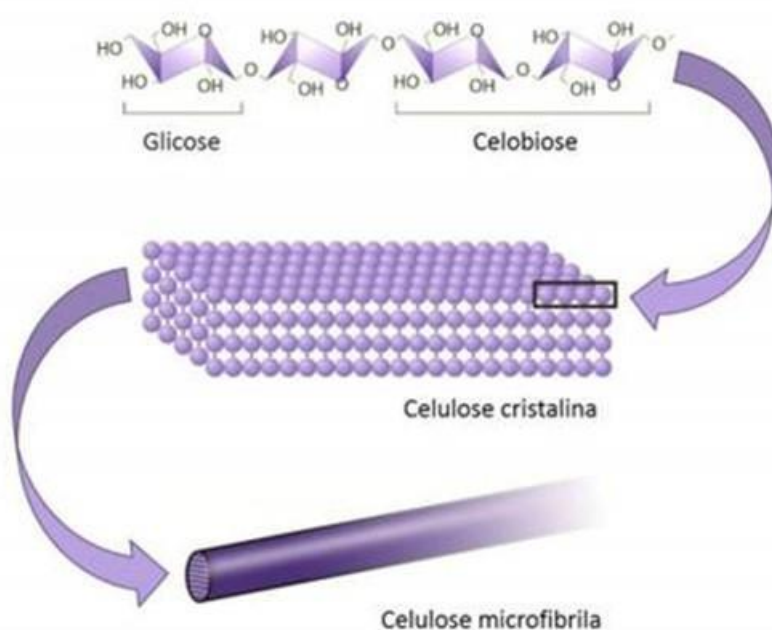
A composição química dos materiais lignocelulósicos pode ser dividida em frações de baixa e elevada massas molares. A fração de baixa massa molar é composta por substâncias orgânicas, geralmente denominadas de extrativos, e substâncias inorgânicas, que são sais de íons metálicos. Os extrativos compreendem vários compostos químicos, que podem ser extraídos com solventes orgânicos, embora alguns deles também sejam solúveis em água. Estes compostos são responsáveis por características como odor, cor e sabor dos lignocelulósicos e estão

presentes em pequenas quantidades (de 2 a 8%). Como exemplos de extrativos, existem: ceras, flavanóides, terpenos, lignanas e ácidos graxos, que são encontrados livres ou esterificados. Os compostos inorgânicos estão presentes em quantidades ainda menores nos lignocelulósicos (de 1 a 2%) (EK *et al.*, 2009).

3.5.1 Celulose

A celulose é um homopolissacarídeo linear constituído por moléculas de anidroglicose unidas entre si por ligações glicosídicas do tipo β -(1 $\rightarrow$ 4). Duas unidades de glicose adjacentes (celobiose) formam uma ligação glicosídica através da eliminação de uma molécula de água. A celobiose é a unidade básica de repetição da cadeia de celulose (Figura 7) (EK *et al.*, 2009; FARINAS, 2011).

Figura 7. Representação da estrutura de um fragmento de celulose.



Fonte: Adaptado de Fonseca, 2015.

A massa molar da celulose varia consideravelmente (50.000 - 2,5 milhões g.mol⁻¹), dependendo da origem da amostra. Por tratar-se de um polímero autêntico, o tamanho das cadeias é usualmente especificado como grau de polimerização, que é a razão entre a massa molar média da celulose e a massa molar de uma unidade de anidroglicose. Da mesma forma que a massa molar, o grau de polimerização varia com a origem da amostra, assumindo valores altos como no algodão (15.300) e

chegando a menos de 305 no Rayon.

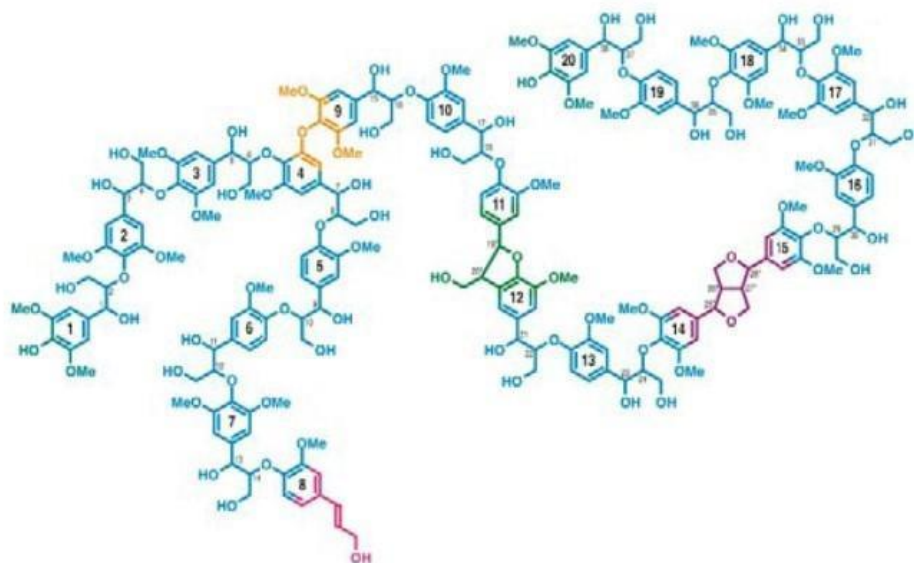
Outra característica da celulose é a possibilidade de formar ligações de hidrogênio intra e intermoleculares, o que proporciona a origem da formação das microfibrilas (Figura 7). As microfibrilas apresentam regiões cristalinas, local onde as fibras se encontram ordenadas, e regiões amorfas, local onde as fibras estão desordenadas (mais distantes entre si), apresentando-se menor empacotamento. A celulose cristalina é a responsável por conferir uma alta resistência à tração na parede celular dos vegetais. Na parede celular dos materiais lignocelulósicos, as microfibrilas de celulose estão paralelamente organizadas e encaixadas em uma matriz de hemicelulose e lignina (EK *et al.*, 2009).

3.5.2. Hemicelulose

As hemiceluloses representam um tipo de polissacarídeo de menor grau de polimerização (100-200 unidades). As hemiceluloses poliméricas obtidas a partir de resíduos agrícolas representam matéria-prima abundante e de baixo custo, e uma delas, a xilana da madeira de faia, seria objeto de pesquisa para o desenvolvimento de um processo integrado de reação/separação para produção de oligossacarídeos. A xilana de *Beechwood* (madeira de faia) é uma xilana que consiste em uma espinha dorsal de resíduos de D-xilopirranose ligados a β -1,4, com cadeias laterais de ácido 4-O-metilglucurônico ligadas à posição C2 da xilose e grupos O-acetil em posições C2 ou C3 (PULS, 1997).

As hemiceluloses são polissacarídeos lineares, porém contém grupos substituintes ao longo de sua cadeia principal (Figura 8).

Figura 9. Estrutura - modelo da lignina.



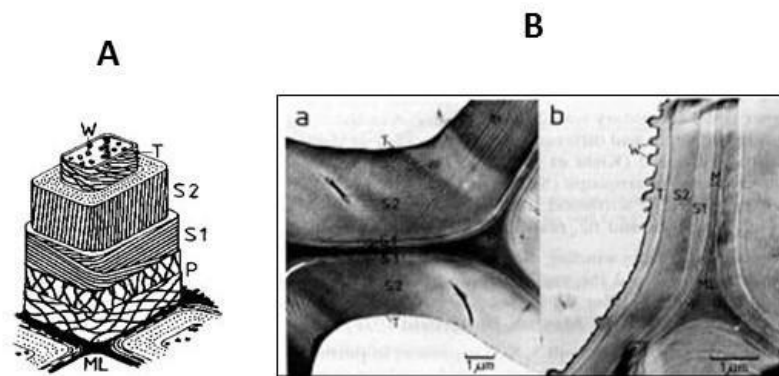
Fonte: Ralph *et al.* (2004).

A grande complexidade estrutural da lignina faz dela uma das macromoléculas naturais mais difíceis de caracterizar-se quimicamente. A maior parte da lignina não pode ser removida da matriz lignocelulósica sem que haja alterações estruturais durante a etapa de extração. Além disso, nenhum método de caracterização *in situ* é informativo o suficiente para ser empregado de forma conclusiva sem o auxílio de outras metodologias. Sendo assim, a melhor maneira de estudar a estrutura dessa macromolécula parece ser através do emprego de vários métodos complementares, que forneçam resultados corroborativos.

É importante ressaltar que os componentes dos materiais lignocelulósicos se encontram intimamente associados, para assim constituir o complexo celular da biomassa vegetal. Na parede celular do vegetal, tais compostos se organizam formando diferentes camadas. Desde a lamela média (ML) até o lúmen da célula, encontram-se as paredes primária (P), secundária, formada pelas camadas S₁, S₂ e terciária T (ou S₃). A lignina ocorre, em maior quantidade, na parede S₂ e apresenta concentração elevada na lamela média. As hemiceluloses dispõem-se rodeando as microfibrilas de celulose (EK *et al.*, 2009). As Figuras 10AB apresentam as várias camadas da parede celular e ilustram como a lamela média envolve as células,

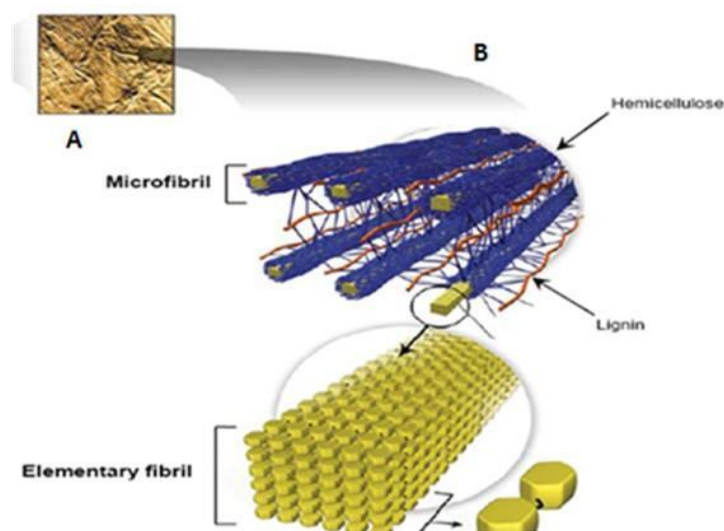
funcionando como sustentador do complexo celular que forma uma árvore. A Figura 11AB apresentam a microscopia eletrônica e um modelo didático de como as microfibrilas de celulose estão organizadas e encaixadas em uma matriz de hemicelulose e lignina (EK *et al.*, 2009).

Figura 10. (A) Corte ilustrativo do sistema de camadas na parede das células de madeira. (B) Microscopia eletrônica de transmissão das células de madeira mostrando as camadas da parede celular: ML = lamela média, P = parede primária, S₁ = parede secundária, S₂ = parede secundária e T = parede terciária.



Fonte: Fengel; Weneger (1989) e Ek *et al* (2009).

Figura 11. (A) Microscopia eletrônica de lignocelulósico. (B) Modelo didático que explica como as microfibrilas de celulose estão organizadas e encaixadas em uma matriz de hemicelulose e lignina presente em um lignocelulósico



Fonte: Ek *et al.* (2009).

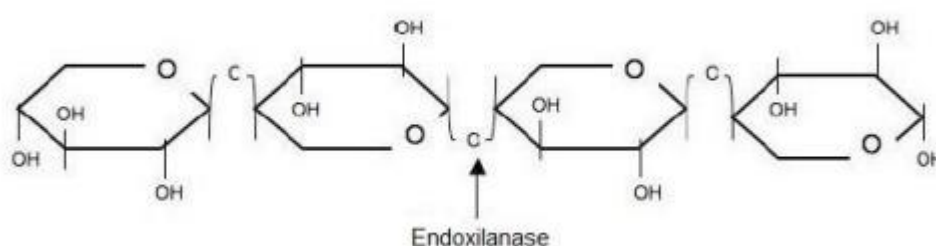
3.6. Enzimas de interesse comercial para conversão de biomassa

3.6.1 Xilanases

A endoxilanase (EC 3.2.1.8) é uma enzima que catalisa a hidrólise da xilana, o segundo polissacarídeo mais abundante e um importante componente do material hemicelulósico presente nas paredes celulares dos vegetais (EK et al, 2009;). Essas enzimas são capazes de hidrolisar as ligações β -1,4 da cadeia de xilana, produzindo diversos xilo-oligômeros de tamanho de cadeias variadas. A endoxilanase é produzida principalmente por bactérias, fungos e leveduras (BAJPAI, 2009) e as principais aplicações industriais encontram-se nos setores de biocombustíveis, papel e celulose, alimentos e bebidas e nutrição animal. Muitos desses microrganismos sob ação em substrato contendo materiais lignocelulósicos secretam endoxilanase a fim de liberar xilose e usá-la como um produto diretamente assimilável para o seu crescimento (SUBRAMANIYAN; PREMA, 2002).

Essas enzimas catalisam a clivagem das ligações glicosídicas da cadeia de xilana resultando na diminuição do grau de polimerização deste substrato e consequentemente formando-se XOS (Figura 12). De modo geral, a endoxilanase é uma glicoproteína monomérica, com massa molecular a partir de 20 kDa (PATEL e SAVANTH, 2015).

Figura 12. Ponto de clivagem da xilana por β -1,4 endoxilanase



Fonte: (MENEZES, 2018).

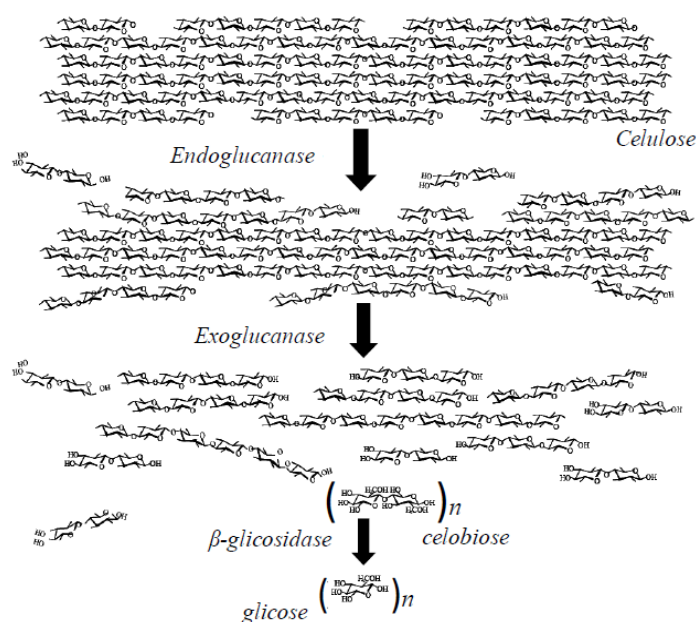
A β -xilosidase (EC 3.2.1.37) é capaz de hidrolisar xilobiose e XOS de cadeias curtas (KNOB; CARMONA, 2010). A β -xilosidase é responsável pela remoção da xilobiose em meio reacional, o que resulta na formação de xilose diminuído a inibição da endoxilanase e culminando em aumento da eficiência de hidrólise da xilana (COLLINS et al., 2005; POLIZELLI et al., 2005).

3.6.2 Celulases

As celulases (EC # 3.2.1.4) são enzimas que catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas do tipo β -1,4 presentes na molécula de celulose. As celulases são muito diversas em suas estruturas e modo de ação, desempenhando um importante papel no ciclo global do carbono na natureza. Elas podem ser produzidas por plantas, fungos, algumas bactérias e alguns animais (WILSON, 2009a).

Existem três tipos de celulases diferentes: endocelulases (também conhecidas como endoglucanases), exocelulases (também conhecidas como celobiohidrolases, CBH) e celobiase ou β -glicosidase. As endo-1,4- β -D-glucanases (EC 3.2.1.4) clivam aleatoriamente o interior da cadeia de celulose; as exo-1,4- β -D-glucanases ou celobiohidrolases (EC 3.2.1.91) clivam as extremidades redutoras e não redutoras da cadeia de celulose e liberam unidades de celobiose; e a β -glicosidases, ou celobiaes (EC 3.2.1.21) hidrolisam oligossacarídeos de cadeia curta e celobiose em glicose (BRIENZO *et al.*, 2008) (Figura 13).

Figura 13. Modo de ação das enzimas do complexo celulolítico de *Trichoderma reesei*



Fonte: Martins *et al.* (2008)

3.7 Oligossacarídeos não digeríveis

Os oligossacarídeos não digeríveis (ONDs) são um grupo de produtos de alto valor agregado e de interesse comercial que podem ser produzidos a partir de

biomassa lignocelulósica (MOURE *et al.*, 2006). Eles são compostos por 3-10 unidades de monossacarídeos, solúveis em água, não são hidrolisados pelo sistema digestivo humano, promovem a atividade de bactérias intestinais benéficas, contendo desta forma, propriedades prebióticas. Entre os ONDs se destacam os XOS que podem ser produzidos a partir da fração hemicelulósica da biomassa lignocelulósica e os celo-oligossacarídeos (COS) que podem ser produzidos a partir da fração celulósica.

Os ONDs podem ser produzidos a partir do fracionamento do BCA em xilana e celulose (fração sólida recuperada rica em celulose) (CANILHA *et al.*, 2012; EK *et al.*, 2009; RUIZ *et al.*, 2020). Assim, as frações hemicelulósica e celulósica podem ser hidrolisadas enzimaticamente por endoxilanase e endoglucanase obtendo-se hidrolisados de XOS e COS, respectivamente. A utilização de XOS e COS já é uma realidade em alguns países, sendo até mesmo licenciados como ingredientes em alimentos FOSHU (*food for specified health use*) pelo Ministério da Saúde do Japão (BARRETO *et al.*, 2015).

3.8 Xilo-oligossacarídeos (XOS)

Os XOS são oligômeros de açúcar constituídos principalmente por unidades de xilose (2-12 unidades repetitivas) e estão disponíveis naturalmente em brotos de bambu, frutas, vegetais, leite e mel. Geralmente, os XOS são misturas de oligossacarídeos formados por unidades de anidroxilose ligados através de ligações β -(1-4). O número de unidades de xilose em sua formação pode variar de 2 a 12 e são conhecidos como xilobiose, xilotriose etc. (AACHARY; PRAPULLA, 2011).

A produção de XOS por hidrólise enzimática requer complexos enzimáticos ricos em atividade de endoxilanase a qual é responsável por converter a xilana a XOS. A endoxilanase pode ser diretamente adicionada na reação, em sua forma livre ou imobilizada (YOON *et al.*, 2006).

Os XOS são responsáveis por diversos efeitos benéficos como a prevenção de cáries, diminuição de níveis séricos de colesterol e o estímulo do crescimento de bifidobactérias no trato-gastrointestinal. Os efeitos benéficos dos XOS à saúde estão relacionados às propriedades físico-químicas, por serem moderadamente doces,

estáveis em uma ampla faixa de pH e temperatura, além de conferirem características organolépticas aos alimentos. Além dos inúmeros benefícios do XOS para a saúde humana e animal, a estabilidade térmica e do pH, propriedades organolépticas, baixo valor calórico, poder adoçante e preço competitivo da dose recomendada em comparação com outros prebióticos são atributos que posicionam o XOS como um potencial ingrediente alimentar (AMORIM *et al.*, 2019).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Determinação das atividades enzimáticas

Endoglucanase: Foi utilizada a metodologia de Ghose (1987), com modificações na temperatura e pH visando a otimização de parâmetros com base em estudos já realizados no próprio laboratório (dados não publicados). Assim, foram adicionados em tubo de ensaio 0,5 mL de preparado enzimático comercial (*Celluclast-Novozymes*) previamente diluído em diferentes proporções (1/400, 1/600, 1/1000, 1/2000 e 1/5000) e 0,5 mL de solução de carboximetilcelulose (CMC 2%, massa/volume, Sigma-Aldrich, 0.7 grau de substituição, Lote MKCK7917) em tampão citrato de sódio 0,05 M e pH 4. A suspensão foi incubada durante 30 min a 60°C em banho maria (Inbras ALB 800 S). Após esse tempo adicionou-se 3 mL de ácido dinitrossalicílico (DNS) (MILLER, 1959). Os tubos foram tratados termicamente a 100°C por 5 min, esfriados, adicionados 20 mL de água ultrapura e tomada leitura em espectrofotômetro (Thermo Scientific - Genesys 10S UV-Vis) a 540 nm. Uma amostra controle foi preparada utilizando-se 0,5 mL de solução de CMC 2% (massa/volume) e somente após a adição do DNS, foi adicionado 0,5 mL de preparado enzimático diluído (1/400, 1/600, 1/1000, 1/2000 e 1/5000). O branco foi preparado adicionando-se 0,5 mL de solução de CMC 2% (massa/volume) e após os 30 min de incubação foram adicionados 0,5 mL de solução tampão acetato de sódio pH 4. Os valores de absorbância foram convertidos em concentração de glicose utilizando-se uma curva analítica previamente elaborada (Figura 14). Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar um μmol de glicose por minuto (U), a 60°C.

Endoxilanase: Foi utilizada a metodologia de Bailey, Biely e Pontanen (1992), com modificações na temperatura e pH visando a otimização de parâmetros com base em

estudos já realizados no próprio laboratório (dados não publicados). O método consiste na hidrólise da xilana de *Beechwood*, resultando na formação de xilose que posteriormente foi quantificada pelo método do DNS (MILLER, 1959). Desta forma, uma alíquota de 0,9 mL de solução composta por xilana de *Beechwood* 1% (massa/volume), dissolvida em tampão acetato de sódio 50 mM e pH 5 foi adicionada à 0,1 mL de preparado enzimático comercial (*Celucast-Novozymes*) previamente diluído (1/500). A mistura resultante foi mantida durante 5 min a 60°C. A reação então foi interrompida e adicionou-se de 1,5 mL de DNS. Uma amostra controle foi preparada utilizando 0,9 mL de xilana de *Beechwood* 1% (massa/volume) e, somente após a adição do DNS, foi adicionado 0,1 mL de preparado enzimático diluído (1/500). Todos os tubos foram tratados termicamente a 100°C por 5 min, esfriados e a leitura foi feita em espectrofotômetro em comprimento de onda de 540 nm. O branco foi preparado adicionando-se 0,9 mL de solução de xilana de *Beechwood* 1% (massa/volume), 0,9 mL de tampão acetato de sódio 50 mM pH 5 e 0,1 mL de água destilada. Os valores de absorbância foram convertidos em concentração de xilose utilizando-se uma curva analítica previamente elaborada (Figura 18). Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar um μmol de xilose por minuto (U), a 60°C.

4.2 Determinação de proteínas

O teor de proteína das amostras foi determinado segundo a metodologia de *Bradford* (1976) utilizando-se albumina de soro bovina (SBA, Sigma-Aldrich) como padrão analítico de proteína. Adicionou-se em um tubo de ensaio 1 mL de reagente de *Bradford* e 0,1 mL de preparado enzimático *Celluclast* devidamente diluído (1/400). A quantificação de proteínas foi determinada por espectrofotometria em comprimento de onda de 595 nm. Por fim, após a leitura em espectrofotômetro, utilizou-se a curva analítica, previamente elaborada (Apêndice - Item 1 - Figura 38) para converter os dados de absorbância obtidos em concentração de proteínas.

4.3 Síntese de óxido de grafeno (OG)

A síntese do OG foi realizada de acordo com a metodologia descrita na literatura, com algumas modificações (HUMMERS; OFFEMAN, 1958). Uma cuba de vidro,

contendo gelo, foi colocada sobre uma placa de agitação magnética. Em um balão de 500 mL, com fundo redondo, foi colocado 1 g de grafite (*“Graphite powder”* 99,99%, Sigma-Aldrich). O balão foi colocado dentro da cuba. Posteriormente, foram adicionados ao balão 60 mL de H_2SO_4 (96%, massa/massa), vagarosamente, mantendo-se sob agitação durante 15 min. Em seguida foram adicionados lentamente 100 mL de solução de KMnO_4 (3,5 g de KMnO_4 em 100 mL de água ultrapura) com o auxílio de uma pipeta *Pasteur*. Em seguida, o sistema foi retirado do banho de gelo e mantido sob agitação por mais 120 min. Passado o determinado período, o balão foi novamente colocado em banho de gelo e 100 mL de água destilada foram adicionados lentamente, lavando-se as paredes do balão. Depois, uma porção de aproximadamente 10 mL de H_2O_2 (30% massa/massa) foi adicionada até o sistema parar de borbulhar. O sistema foi retirado do banho de gelo e mantido na capela sem agitação e durante 12h, a fim de que ocorra formação de precipitado. Posteriormente, com o auxílio de uma pipeta *Pasteur*, retirou-se o sobrenadante até chegar nas proximidades do precipitado. A dispersão foi então filtrada sob sistema munido de vácuo e em seguida o sólido obtido foi lavado com os seguintes solventes: 500 mL de água destilada, 250 mL de uma solução aquosa de HCl (10%, volume/volume), 250 mL de etanol (98%, volume/volume) e por fim mais 200 mL de água destilada. Após a lavagem, o sólido foi devidamente mantido em uma estufa a 50°C para secagem.

4.4 Síntese de óxido de grafeno magnetizado (OGM)

A síntese foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Doustkhah e Rostamnia (2017) e Paz-Cedeno *et al.* (2021). Desta forma, foram adicionados 1,755 g de cloreto de ferro III hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) e 0,645 g de cloreto de ferro II tetra hidratado ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) à 100 mL de uma solução de ácido acético (3%, volume/volume), em um béquer de 250 mL previamente adicionado sob um agitador magnético. Em seguida, foram adicionados à mistura 10 mL de dispersão de OG ($5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) e então a temperatura foi acertada para 80°C . Após atingir a temperatura, foram adicionados 20 mL de hidróxido de amônio (25%, massa/massa) à mistura reacional, a qual permaneceu sob agitação vigorosa durante 15 min. Finalmente, a reação foi interrompida e o precipitado foi coletado por um ímã externo e lavado várias

vezes com água destilada e metanol (99%, volume/volume). Em seguida, o precipitado (OGM) foi seco em uma estufa a 50°C durante 12 h.

4.5 Imobilização covalente de endoglucanase e endoxilanase em OGM

A imobilização por ligação covalente no suporte OGM foi desenvolvida de acordo com as metodologias proposta por Paz-Cedeno *et al.* (2021). Foram preparados 20 mL de suspensão de OGM (0,5 mg.mL⁻¹) em tampão acetato de sódio 0,05 M (pH 4,8) e em seguida a suspensão foi submetida à sonificação durante 2h. Posteriormente, foram adicionados 20 mg de N-Hidroxisuccinimida (NHS) e novamente submetida à sonificação durante 15 min. Depois, foram adicionados 24 mg de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDAC), mantendo a solução em um agitador de rolos durante 3h. O material obtido foi recuperado com o auxílio de um ímã externo e lavado com o mesmo tampão. Posteriormente, o material foi disperso em tampão acetato 0,05 M (pH 4,8) atingindo-se uma concentração de 1 mg.mL⁻¹. Uma vez obtido o OGM ativo, adicionou-se uma quantidade de enzimas previamente determinada e a suspensão foi mantida sob agitação por 5h. O material obtido foi recuperado com o auxílio de um ímã externo e lavado duas vezes com o tampão de imobilização, uma vez com uma solução de glicina 1 M e novamente com o tampão de imobilização. Finalmente o material foi suspenso no tampão de imobilização e denominado de OGM-Enz.

Para avaliação da imobilização em OGM, foram determinadas as atividades enzimáticas de endoglucanase e endoxilanase em três momentos diferentes: inicial, no sobrenadante após 5 h de imobilização e no derivado imobilizado ao final do processo. Também foi determinado o teor de proteínas totais por *Bradford* para realizar o cálculo de massa de enzima ao longo do processo, portanto foram coletadas amostras em três momentos diferentes: inicial, no sobrenadante após 5 h de imobilização e do derivado imobilizado. Além disso, para confirmar o sucesso da imobilização enzimática, foram determinados os seguintes parâmetros: Rendimento de imobilização, eficiência de imobilização e atividade recuperada. Os cálculos foram realizados conforme as Equações 1, 2 e 3 (SHELDON; VAN PELT, 2013).

$$EI = \left(\frac{U_0 - U_f}{U_0} \right) * 100\% \quad \textbf{(Equação 1)}$$

Onde:

EI = Rendimento de imobilização (%).

U_0 = Atividade enzimática total da enzima livre (U).

U_f = Atividade enzimática total do sobrenadante final após a imobilização (U).

$$EFI = \left(\frac{U_{EI}}{U_0 - U_f} \right) * 100\% \quad \textbf{(Equação 2)}$$

Onde:

EFI = Eficiência de imobilização (%).

U_{EI} = Atividade enzimática total do derivado (U).

U_0 = Atividade enzimática total da enzima livre (U).

U_f = Atividade enzimática total do sobrenadante final após a imobilização (U).

$$AR = \frac{(U_{EI})}{(U_0)} * 100\% \quad \textbf{(Equação 3)}$$

Onde:

AR = Atividade recuperada (%)

U_{EI} = Atividade enzimática total do derivado (U)

U_0 = Atividade enzimática total da enzima livre (U)

4.6. Obtenção e caracterização química de xilana de bagaço de cana-de-açúcar (BCA)

4.6.1 Extração alcoólica do BCA

O BCA foi triturado em moinho de facas munido com peneira de 20 mesh (0,84 mm). Uma porção do material que passou pela peneira foi tratado com solução de ácido tetracético etilenodiamina (EDTA) 0,2% (massa/volume) durante 1h a 90°C para remoção de metais (FANG *et al.*, 1999). Uma porção do material previamente tratado com EDTA foi extraída em etanol 95% (volume/volume) por 48 h, em aparato *Soxhlet*. Ao final do processo a fração insolúvel foi seca em estufa com circulação de ar (Solab SL-102) a 60°C durante 4 dias, e estocadas a 25°C até o momento do uso.

4.6.2 Pré-tratamento químico do BCA

Para realizar a deslignificação do BCA foi utilizado a metodologia de pré-tratamento proposta por Liao *et al.* (2023) e Wen *et al.* (2021), utilizando-se uma solução de peróxido de hidrogênio P.A e ácido acético 80% (v/v) (PHAA) com uma proporção de 5:5 (volume/volume) entre esses dois reagentes. Em um balão de 200 mL foram adicionados 80 mL de peróxido de hidrogênio, 80 mL de ácido acético 80% (v/v), e por fim 1,066 mL de ácido sulfúrico (100 mM) como catalisador, completado o balão com água destilada. Foram adicionadas em um frasco de 1 L, 20 g de BCA obtido no item 4.6.1 e a solução ácida preparada anteriormente. Posteriormente, a suspensão foi mantida a 60°C durante 2h em banho maria, ao final da reação a suspensão foi filtrada e separada duas frações: líquida e sólida. A fração líquida foi coletada e armazenada a 10 °C até o momento de seu uso. A fração sólida retida no filtro foi lavada com 1 L de água destilada para sua neutralização, coletada e seca em estufa (Solab SL-102) com circulação de ar a 50°C durante 48 h e armazenadas a 25°C até o momento de seu uso. O rendimento mássico do pré-tratamento com PHAA foi calculado conforme a seguinte equação:

$$R = \left(\frac{M_f}{M_i} \right) * 100\% \quad \text{(Equação 4)}$$

Onde:

R = Rendimento mássico do pré-tratamento com PHAA (%)

M_f = massa seca inicial do material de partida (não tratado) (g)

M_i = massa seca final do material pré-tratado com PHAA (g)

4.6.3 Obtenção de xilana de BCA pré-tratado

A fração líquida obtida no item 4.6.2 foi seca a 50°C em estufa com circulação de ar durante 7 dias, até que se obtivesse uma solução concentrada (cerca de 3 vezes em relação ao volume inicial). Posteriormente, precipitou-se a suspensão utilizando 3 volumes de etanol 95% (v/v). Passados 12h, após total sedimentação do material, o sobrenadante foi removido e o precipitado lavado com 50 mL de etanol 70% (v/v), o qual foi mantido em repouso por 12h para sedimentação. A lavagem foi repetida 6 vezes até se obter um sobrenadante límpido. O precipitado, designado de xilana de

BCA pré-tratado, foi seco em estufa a 45°C por 24h e armazenado até momento de seu uso.

4.6.4 Caracterização química dos materiais obtidos

O BCA em sua forma natura e pré-tratado (itens 4.6.1 e 4.6.2, respectivamente) e a xilana oriunda do BCA pré-tratado (item 4.6.3) foram hidrolisados com ácido sulfúrico 72% (m/m) (MASARIN *et al.*, 2011). Para isso 300 mg (base seca) de amostra foi tratada com 3 mL de ácido sulfúrico 72% (m/m) por 1h a 30°C, a cada 15 min utilizou-se um bastão de vidro para homogeneizar os tubos. Em seguida, o conteúdo do tubo de ensaio foi transferido para frascos do tipo Erlenmeyer de 250 mL com auxílio de 79 mL de água destilada. A mistura então foi autoclavada por 1h, a 121°C, resfriada e filtrada em filtros de vidro sinterizados de porosidade número 3 (Schott, Alemanha), previamente secos em estufa a 105°C por 2h, esfriados em dessecador munido com sílica e pesados. O material retido foi lavado, com 2 porções de 5 mL de água, e seco em estufa a 60°C por 12h. Posteriormente a temperatura foi aumentada até 105°C por 2h. Transferiu-se os filtros com o material retido para um dessecador munido com sílica até atingir temperatura de 25°C. Finalmente os filtros foram pesados, sendo que o material retido nos filtros de vidro sinterizados corresponde à lignina insolúvel.

O filtrado foi analisado quanto aos teores de açúcares monoméricos e ácidos orgânicos, para isso uma pequena alíquota do filtrado foi passada através de membranas de 0,45 µm e na sequência em cartuchos do tipo SEP-PAK C18 e injetada em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A análise cromatográfica foi efetuada utilizando-se uma coluna BIORAD AMINEX HPX-87H (300 x 7,8 mm), com ácido sulfúrico 0,005 M como eluente a 0,6 mL.min⁻¹, volume de amostra 20 µL, forno a 60°C e detecção por índice de refração a temperatura de 60°C e o tempo de análise foi de 20 min (Shimadzu, modelo C-R7A), a fim de detectar glicose, xilose, arabinose e ácido acético. As concentrações desses componentes foram determinadas através de uma curva analítica preparada com padrões de grau analítico, secos sob pentóxido de fósforo e vácuo (Apêndice, item 2, Figuras 39 a 44).

Para a detecção de inibidores, a mesma alíquota previamente filtrada em membrana de 0,45 µm (porém sem filtrar nos cartuchos do tipo SEP-PAK C18) foi

analisada por CLAE, utilizando-se uma coluna C18 Thermo-Fischer (250 x 4 mm). Utilizou-se como eluente a seguinte proporção dos solventes preparados: 89% (v/v) de ácido acético diluído 1,1% e 11% de acetonitrila (v/v) P.A a 0,8 mL.min⁻¹, volume de amostra 20 µL e forno a 30°C. A detecção foi feita por PDA no comprimento de onda 276 nm a 30°C e o tempo de análise foi de 15 min a fim de detectar hidroximetilfurfural (HMF) e furfural. As concentrações desses componentes foram determinadas através de uma curva analítica preparada com padrões de grau analítico, secos sob pentóxido de fósforo e vácuo (Apêndice - Item 3, Figuras 45 e 46). Os cálculos dos teores de celulose, xilana, grupos arabinosil e acetil, foram realizados de acordo com a Equação 5:

$$C = \left(\frac{M_f * f}{M_i} \right) * 100\% \quad \textbf{(Equação 5)}$$

Onde:

C = Teor mássico de celulose, xilana, grupos arabinosil ou acetil (%).

M_f = massa de glicose (refere-se a celulose), xilose (refere-se a xilana), arabinose (refere-se ao grupo arabinosil), ácido acético (refere-se ao grupo acetil), HMF (refere-se a celulose) ou furfural (refere-se a xilana) (g).

f = fator de hidrólise de cada componente.

M_i = massa inicial seca de BCA do processo de hidrólise ácida (g).

O teor de lignina insolúvel foi calculado a partir do peso dos filtros sinterizados, de acordo com a Equação 6:

$$L_I = m_{filt + res} - m_{filt} \quad \textbf{(Equação 6)}$$

Onde:

L_I = Lignina Insolúvel.

$m_{filt + res}$ = massa do filtro sinterizado seco contendo a lignina insolúvel (g).

m_{filt} = massa do filtro seco vazio (g).

O teor de lignina solúvel foi determinado pela medida de absorbância em um espectrofotômetro UV-visível (Modelo Ultospec™ 3100UV-Amersham Biosciences).

Transferiu-se uma alíquota de 1 mL de cada hidrolisado ácido (avolumados em balão volumétrico de 100 mL) para balões volumétricos de 50 mL que tiveram o volume aferido com água destilada. Utilizando cubetas de quartzo, as leituras de absorbância das soluções foram realizadas a 205 nm. Para a determinação das concentrações de lignina solúvel utilizou-se o coeficiente de extinção molar da lignina de $105 \text{ L.g}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ que é a média das absortividades apresentadas para modelos de lignina (BAILEY, BIELY, POUTANEN, 1992; SLUTIER *et al.*, 2008). O cálculo da massa de lignina solúvel foi realizado conforme a Equação 7:

$$C_{lig} = \left(\frac{A_{hid}}{105} \right) * (f) * (0,1) \quad \textbf{(Equação 7)}$$

C_{lig} = massa de lignina solúvel (g).

A_{hid} = Absorbância da amostra de hidrolisado em 205 nm.

f = Fator de diluição do hidrolisado ácido.

O teor de lignina total (L_t) foi calculado segundo a Equação 8. As massas de lignina solúvel e insolúvel foram somadas e multiplicadas por 100, o resultado foi dividido pela massa inicial do subproduto do processo de hidrólise ácida. Desta forma, o resultado do teor de lignina total foi expresso em porcentagem (grama/100 gramas de subproduto)

$$L_t = \left(\frac{(L_{sol} + L_{insol}) * 100\%}{M_i} \right) \quad \textbf{(Equação 8)}$$

Onde:

L_t = Teor mássico de lignina total (%).

L_{sol} : Massa de lignina solúvel em meio ácido (g)

L_{insol} : Massa de lignina insolúvel em meio ácido (g).

M_i : Massa inicial seca de BCA do processo de hidrólise ácida (g).

4.7 Hidrólise enzimática da xilana e determinação dos xilo-oligossacarídeos (XOS)

A xilana comercial de *Beechwood* (Sigma-Aldrich) foi submetida à hidrólise enzimática utilizando a enzima em sua forma livre e imobilizada (OG-NPM-Enz) segunda a metodologia de Mafei *et al.* (2019) e Paz-Cedeno *et al.* (2021). Para isto, foram adicionados 100 mg de xilana comercial (*Beechwood*) em frascos tipo Erlenmeyer de 125 mL e adicionou-se o preparado enzimático comercial (*Celluclast-Novozymes*) ou a suspensão de derivado enzimático (OG-NPM-Enz) em tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 4,8 com 0,01% (m/v) de azida de sódio com uma carga enzimática de endoxilanase de 80 e 160 U por grama de substrato (base seca). Os frascos foram colocados em incubadora a 45°C com agitação de 150 rpm. A hidrólise foi interrompida ao longo do tempo (3-72h) aplicando um campo magnético externo no caso do OGM-Enz. O sobrenadante foi retirado com auxílio de uma pipeta *Pasteur* e injetado em um sistema de CLAE para a determinação dos XOS. No tempo de 24h também foi avaliado o reuso do OGM-Enz, assim, após o primeiro ciclo de hidrólise o sobrenadante foi vertido e com o OGM-Enz ainda no frasco, lavou-se com tampão de hidrólise verteu-se o tampão e foi adicionado 10 mg de xilana de *Beechwood* (base seca) e 10 mL de tampão. O frasco foi levado a incubadora nas mesmas condições descritas anteriormente. O procedimento de reuso foi repetido até quatro vezes.

Os XOS foram determinados por CLAE (SHIMADZU modelo NEXERA XR) (MAFEI *et al.*, 2020; DIAS *et al.*, 2022) em uma coluna Aminex HPX-87C (300 x 7,8 mm) temperatura de forno de 80°C; eluente: água ultrapura com fluxo de 0,6 mL.min⁻¹; volume de amostra 20 µL; detector de índice de refração a 60°C (SHIMADZU, modelo RID-20A). A separação cromatográfica e a elaboração das curvas analíticas dos diferentes XOS foram realizadas com os seguintes padrões, de grau analítico, secos sob pentóxido de fósforo e vácuo: xilose (X₁), xilobiose (X₂), xilotriose (X₃), xilotetraose (X₄), Sendo X₁ da Sigma-Aldrich e X₂-X₄ da Megazyme-Irlanda (Apêndice – Item 4, Figuras 47 a 50). A conversão de xilana em XOS ou xilose foi determinada conforme a Equação 10:

$$\delta = \frac{[\text{Xilose ou XOS}] * f.100\%}{m} \quad \text{(Equação 10)}$$

Onde:

δ = conversão de xilana em xilose ou XOS.

[Xilose ou XOS] = massa de xilose ou XOS (g).

F = fator de hidrólise.

m = massa inicial de xilana em base seca (g).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Determinação de proteínas

A quantificação de proteínas foi realizada pelo método de *Bradford*, a curva analítica está apresentada no Apêndice (item 1). O teor de proteínas totais no preparado enzimático *Celluclast* utilizado foi de $158,0 \pm 2,4 \text{ mg.mL}^{-1}$. Ao se comparar os resultados obtidos com outros trabalhos reportados na literatura é possível verificar variações nos teores de proteínas deste preparado enzimático em estudo (mesmo que sejam provenientes da mesma origem). Além disso, embora se tratando do mesmo preparado enzimático, há variações no produto de acordo com o lote e o período de fabricação. A literatura relata as seguintes teores de proteínas totais em preparado enzimático *Celluclast*: $25,4 \text{ mg.mL}^{-1}$ (MAFEI, 2019); $177,2 \text{ mg.mL}^{-1}$ (MENDES, 2011); $107 \pm 5 \text{ mg.mL}^{-1}$ (GONÇALVES, 2013).

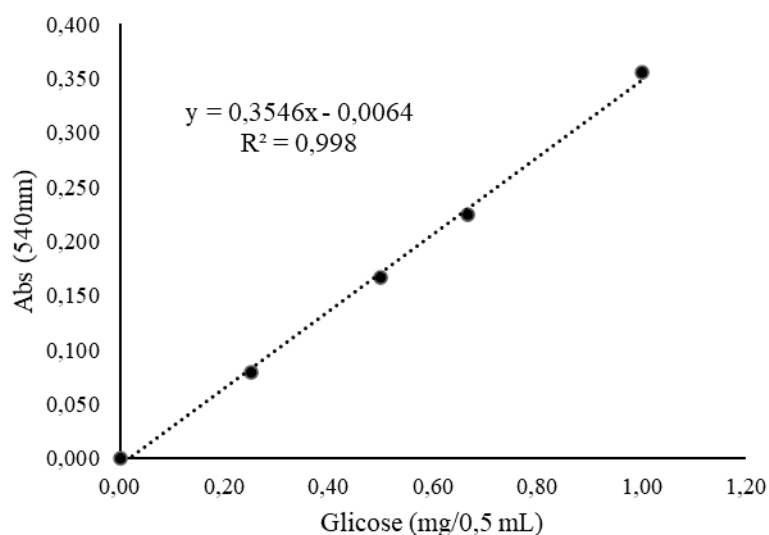
5.2 Determinação das atividades enzimáticas do preparado enzimático *Celluclast*

5.2.1 Endoglucanase

Para resultados quantitativos mais exatos de atividade específica de endoglucanase deve-se utilizar o método de Ghose (1987) que é uma norma mundialmente aplicada. Para a aplicação deste método o preparado enzimático em estudo deve ser diluído adequadamente até que a quantidade de produto plotada contra o logaritmo do inverso da diluição (fator de diluição do preparado enzimático) apresente um modelo matemático do tipo linear. Além disso, a curva linear deve passar pelo ponto de 0,5 mg de glicose/ 0,5 mL solução oriunda da hidrólise de CMC.

Além disso, para obter a atividade da endoglucanase, primeiro foi necessário elaborar uma curva analítica de concentração de glicose em função da absorbância adequada ao método (Figura 14).

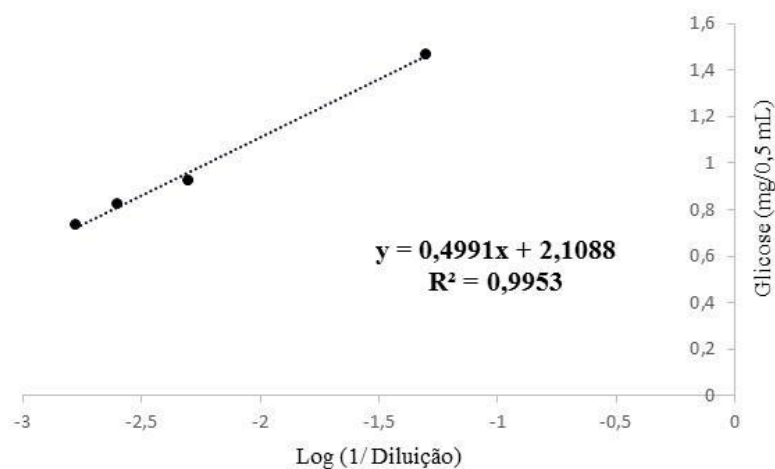
Figura 14. Curva analítica para determinação de atividade de endoglucanase. Concentração de glicose em função da absorbância.



Fonte: Elaborado pela autora.

A fim de obter a linearização adequada para a atividade de endoglucanase, estimando diluições do preparado enzimático que liberasse 0,5 mg de glicose/ 0,5 mL de solução, o procedimento foi repetido diversas vezes até que se encontrasse as diluições adequadas do fator de diluição (logaritmo 1/diluição) em função da concentração de glicose para se adequar a um modelo matemático do tipo linear, além de obter a concentração de 0,5 mg de glicose/0,5 mL de solução dentro da faixa linear da curva. Desta forma, inicialmente foram avaliadas as seguintes diluições do preparado enzimático:água: 1:20, 1:200, 1:400, 1:600, respectivamente, conforme demonstrado na Figura 15.

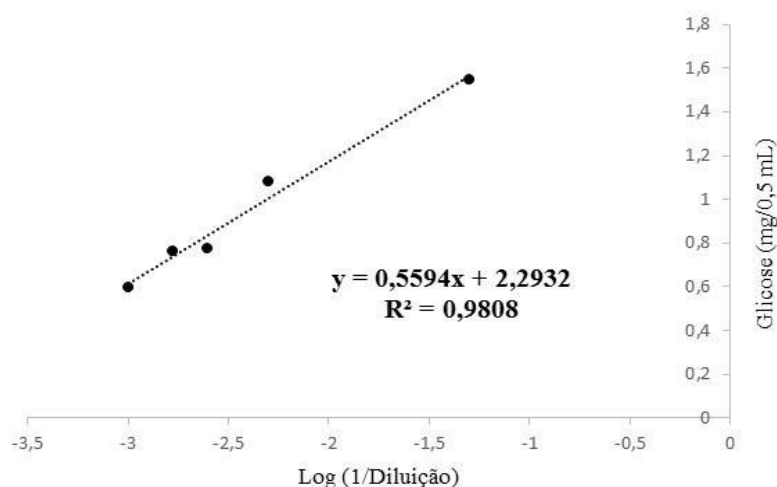
Figura 15. Curva para determinação da atividade de endoglucanase. Concentração de glicose em função do logaritmo do inverso da diluição do preparado enzimático *Celluclast*.



Fonte: Elaborado pela autora.

No entanto, a presente curva (Figura 15) não atingiu a concentração de glicose necessária (0,5 mg de glicose/0,5 mL de solução) dentro da faixa linear da curva. Assim, adicionou-se a diluição de 1:1000 do preparado enzimático:água, respectivamente, e o procedimento foi realizado novamente (Figura 16). A inclusão da diluição de 1:1000 do preparado enzimático resultou em uma concentração próxima a 0,5 mg de glicose/0,5 mL de solução, entretanto, houve piora do R^2 do modelo matemático do tipo linear quando comparado à Figura 15.

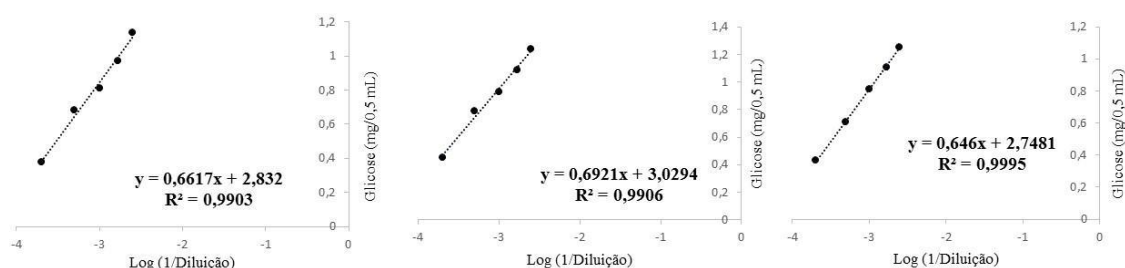
Figura 16. Curva para determinação da atividade de endoglucanase. Concentração de glicose em função do logaritmo do inverso da diluição do preparado enzimático *Celluclast*.



Fonte: Elaborado pela autora.

Assim, foram excluídas as diluições de 1:20 e 1:200 (pois estes pontos estavam muito afastados da concentração de 0,5 mg de glicose/0,5 mL de solução) e adicionadas as diluições de 1:2000 e 1:5000 do preparado enzimático, o que resultou em um ótimo R^2 , além de se atingir a concentração de glicose necessária (0,5 mg de glicose/0,5 mL de solução) dentro da faixa linear da curva, conforme orientação do método de Ghose (1987). Assim, foi possível realizar a triplicata do procedimento, conforme demonstrado na Figura 17.

Figura 17. Triplicata da concentração de glicose em função do logaritmo do inverso da diluição do preparado enzimático *Celluclast*. Diluições de preparado enzimático *Celluclast* (1:5000, 1:2000, 1:1000, 1:600 e 1:400).



Fonte: Elaborado pela autora.

Os resultados obtidos de atividades específicas para a enzima endoglucanase em sua forma livre contida em preparado enzimático *Celluclast*, através do método de Ghose (1987), nas condições ideais de pH e temperatura (pH 4 e 60°C) são apresentados na Tabela 1.

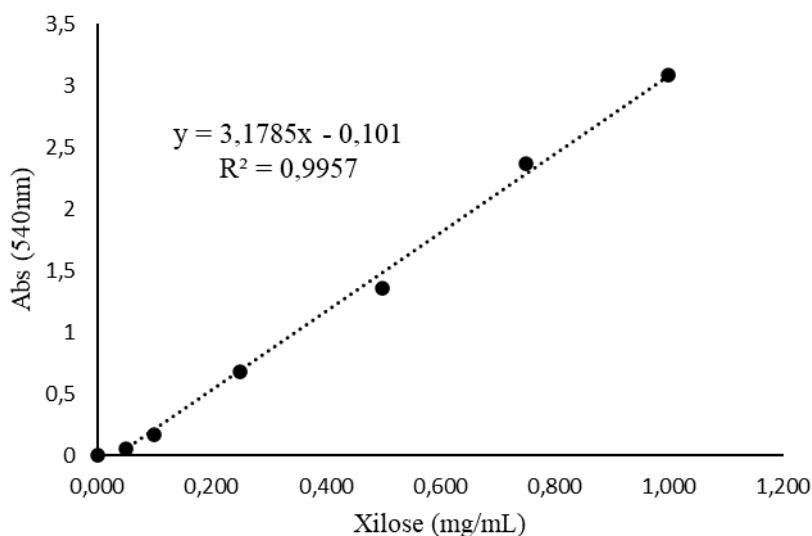
Tabela 1. Atividade específica ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$) da enzima endoglucanase em sua forma livre de preparado enzimático comercial *Celluclast*.

Atividade Específica ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$)	Referências
$4,2 \pm 0,9$	Este trabalho
5,1	(GONÇALVES, 2013)

5.2.2 Endoxilanase

Para obter a atividade específica de endoxilanase do preparado enzimático em estudo primeiro foi necessário elaborar uma curva analítica de concentração de xilose em função da absorbância (Figura 18).

Figura 18. Curva analítica para determinação da atividade de endoxilanase.



Fonte: Elaborado pela autora.

Os resultados obtidos de atividades específica para a enzima endoxilanase nas condições ideais de pH e temperatura (pH 5 e 60°C) foram então apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Atividade específica (U.mg⁻¹) da enzima endoxilanase de preparado enzimático comercial *Celluclast* (Novozymes).

Atividade Específica (U.mg ⁻¹)	Referências
11,75 ± 0,3	Este trabalho
27,3 ± 1,4	(MAFEI <i>et al.</i> , 2020)
6,2	(MENDES <i>et al.</i> , 2011)
4,5	(GONÇALVES, 2013)

5.3 Síntese do suporte para imobilização das enzimas

O processo iniciou-se com a síntese OG que resultou em um rendimento de aproximadamente 1,5 g. Desta forma, houve um aumento de massa total de 0,5 g em relação à carga inicial de grafite utilizada. É válido reforçar que esse aumento de massa ocorre devido a oxidação dos cristais de grafite e a consequente ligação de vários grupos que contêm oxigênio à matriz (RAY, 2015; ADEEL *et al.*, 2018; PAZ-CEDENO *et al.*, 2021).

Figura 19. Óxido de Grafeno (OG) após secagem.



Fonte: Elaborado pela autora.

A Figura 20 retrata uma das etapas após a síntese de OGM.

Figura 20. Processo de lavagem do óxido de grafeno magnetizado (OGM), com o auxílio de um ímã.



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 21. Óxido de Grafeno Magnetizado (OGM) sendo atraído por um ímã.



Fonte: Elaborado pela autora.

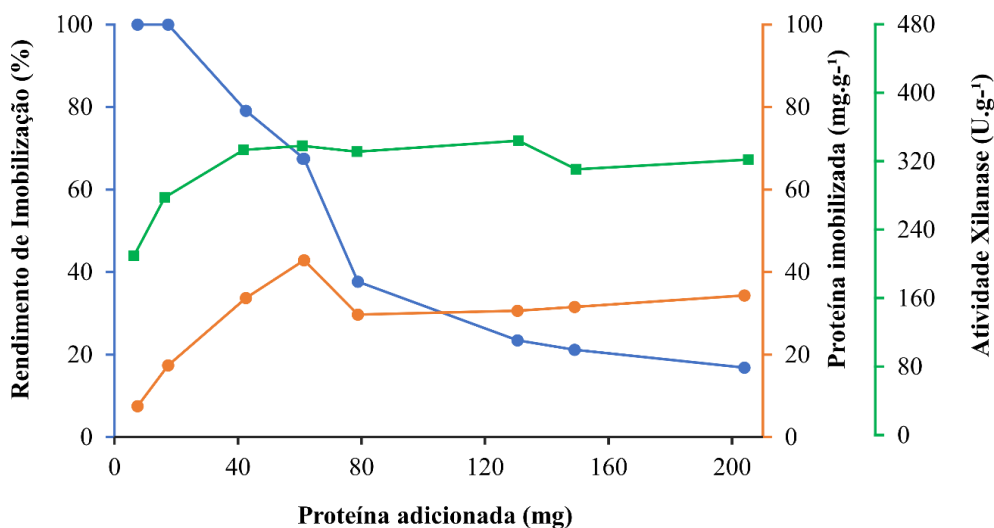
O proposto processo de síntese de OGM gerou 891,3 mg. Desta forma, houve um aumento da massa total de 841,3 mg considerando que inicialmente foram utilizados 50 mg de OG, ou seja, um rendimento de 17,8 vezes, em relação a quantidade inicial de OG. Esse aumento de massa ocorre devido a interação das nanopartículas de Fe_3O_4 com a superfície do OG a partir da coprecipitação de Fe^{2+} e Fe^{3+} em solução alcalina sobre a adição de amônia a 80°C (DOUSTKHAH; ROSTAMNIA, 2016; PAZ-CEDENO *et al.*, 2021). O material sintetizado apresentou propriedades magnéticas como esperado (Figura 21).

5.4 Imobilização de endoglucanase e endoxilanase em óxido de grafeno magnetizado (OGM)

Uma vez obtido o OGM reativo no processo de imobilização, foi necessário adicionar uma quantidade de proteína pré-determinada, contendo atividade de endoglucanase e endoxilanase. A quantidade de proteínas ideal está relacionada com a saturação do suporte, ou seja, momento quando as enzimas não se ligam mais covalentemente no OGM reativo presente no meio reacional de maneira a garantir sua função, principalmente devido ao fato de não haver mais extremidades reativas na estrutura do OGM. Para esta avaliação, foi considerado um estudo do rendimento da imobilização, avaliando a quantidade de proteína imobilizada, atividades enzimáticas

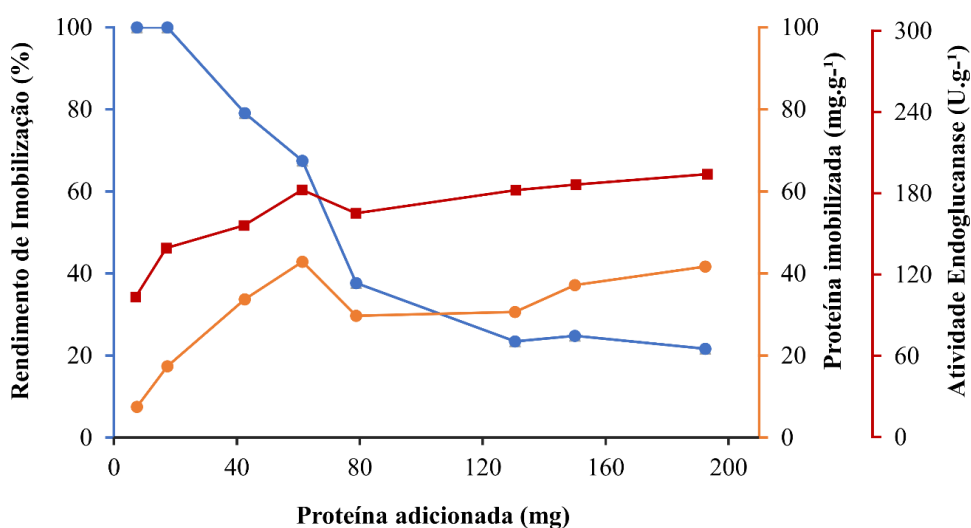
de endoxilanase e endoglucanase do derivado enzimático obtido (OGM-Enz) (Figuras 22 e 23).

Figura 22. Rendimento de imobilização (%) (azul), proteína imobilizada (mg.g^{-1}) (laranja) e atividade de endoxilanase (U.g^{-1}) (verde) em cada ensaio realizado, em relação a quantidade de proteína adicionada (mg) (eixo X). Os dados de proteína imobilizada foram reportados em miligramas por grama de suporte (OGM). Os dados de atividade enzimática foram reportados em U por grama de OGM.



Fonte: Elaborado pelo grupo de pesquisa.

Figura 23. Rendimento de imobilização (%) (azul), proteína imobilizada (mg.g^{-1}) (laranja) e atividade de endoglucanase (U.g^{-1}) (verde) em cada ensaio realizado, em relação a quantidade de proteína adicionada (mg) (eixo X). Os dados de proteína imobilizada foram reportados em miligramas por grama de suporte (OGM). Os dados de atividade enzimática foram reportados em U por grama de OGM).

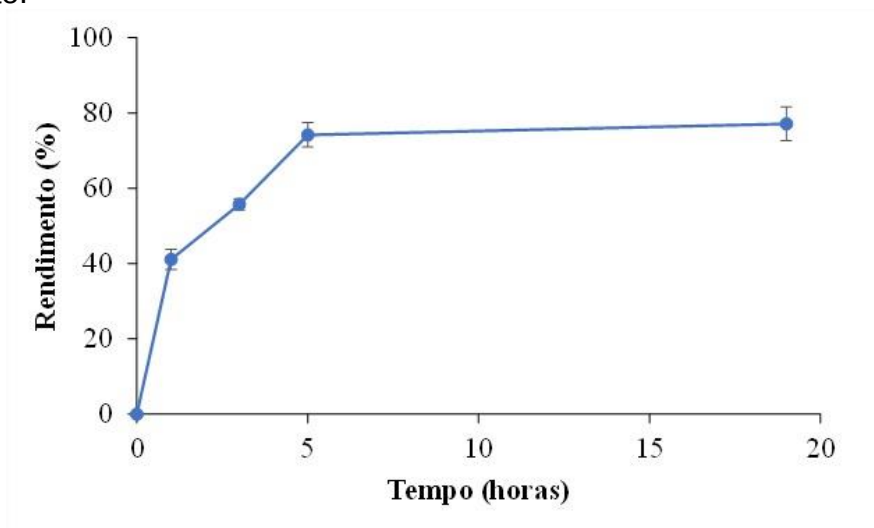


Fonte: Elaborado pelo grupo de pesquisa.

Através deste estudo foi possível concluir que à estabilização das atividades enzimáticas de endoxilanase e endoglucanase foram alcançadas a partir da carga inicial de 60 mg de proteína (com atividade média de 320 U.g^{-1} e 180 U.g^{-1} endoxilanase e endoglucanase, respectivamente). Além disso, de acordo com referidos gráficos apresentados, também é possível verificar que a quantidade de proteína imobilizada se estabiliza a partir da carga inicial de aproximadamente 60 mg de proteína, caracterizando assim a saturação do OGM. Portanto, para o presente ensaio, definiu-se como a faixa ideal para a quantidade de proteínas adicionada (carga inicial) de 55 mg.

Estudos com a imobilização da *Celluclast* também avaliaram o rendimento de imobilização em função do tempo. A partir da Figura 24, é possível verificar um perfil crescente da quantidade de proteínas imobilizada (miligramas de proteína por grama de OGM), até se atingir um patamar de aproximadamente 75% de rendimento de imobilização. Este patamar foi alcançado em 5h de reação, portanto definiu-se este tempo de imobilização para o presente estudo visando a otimização do processo como um todo. Os resultados são apresentados na Tabela 3.

Figura 24. Rendimento de imobilização por proteínas em função do tempo de imobilização.



Fonte: Elaborado pelo grupo de pesquisa.

Tabela 3. Rendimento, eficiência e atividade recuperada no processo de imobilização de endoglucanase e endoxilanase de preparado enzimático comercial (*Celluclast-Novozymes*) em óxido de grafeno magnetizado (OGM).

Enzima	Rendimento imobilização (%)	Eficiência (%)	Atividade Recuperada (%)	*Atividade enzimática (U.g ⁻¹)
Endoglucanase	26,4 ± 1,7	71,7 ± 3,6	14,6 ± 3,9	191,3 ± 5,0
Xilanase	40,1 ± 9,8	84,8 ± 8,6	33,8 ± 7,4	338,5 ± 62,8

Os ensaios foram realizados a partir de uma carga inicial de aproximadamente 55-65 mg de proteínas e nas respectivas condições ideais para a atividades das enzimas na forma livre e imobilizada, previamente determinadas.

*Atividades de endoglucanase e endoxilanase reportadas em unidades internacionais (U) por grama de suporte (OGM).

Conforme apresentado anteriormente, foi escolhida como carga inicial ideal de proteínas a faixa de 55-65 mg, na qual se obteve um rendimento médio de imobilização por proteínas de 68% e a maior atividade enzimática do derivado enzimático (OGM-Enz) observada. Porém, como o preparado enzimático (*Celluclast*) é um complexo composto principalmente por endoxilanase e endocelulase, é importante avaliar o processo de imobilização a partir da atividade de cada enzima estudada. Nesse sentido, determinaram-se os parâmetros de rendimento, eficiência e atividade recuperada.

Quanto ao rendimento de imobilização (o qual relaciona a atividade inicial e a atividade presente no sobrenadante após a imobilização) obteve-se valores de 26,4% e 40,1% para endoglucanase e endoxilanase, respectivamente. Em relação à eficiência, a qual relaciona a atividade teórica imobilizada ($U_{\text{inicial}} - U_{\text{sobrenadante}}$) com a atividade do OGM-Enz, é possível verificar que a partir dos resultados obtidos de 71,7% e 84,8%, que o OGM-Enz apresentou uma boa atividade de endoglucanase e endoxilanase em relação à atividade teórica imobilizada. Nesse sentido, vale ressaltar que o cenário ideal seria uma eficiência de 100%, contudo geralmente esses valores são menores devido às limitações de transferência de massa, dificuldade de acessibilidade de sítios ativos, possíveis alterações conformacionais na estrutura da enzima, entre outros fatores (SHELDON; VAN PELT, 2013; PAZ-CEDENO, 2021). Por sua vez, a atividade recuperada relaciona a atividade do OGM-Enz com a atividade inicial, sendo assim, foram obtidos valores de 14,6% e 33,8% para endoglucanase e endoxilanase, respectivamente, e verifica-se que em relação a atividade inicial adicionada, o OGM-Enz apresentou uma atividade consideravelmente melhor.

Todavia, neste caso, é válido ressaltar que a diferença entre as referidas atividades pode ser intensificada devido às limitações de transferência de massa e a dificuldade de acessibilidade de sítios ativos em comparação com as enzimas em suas formas livre e imobilizada. Paz-Cedeno *et al.* (2021) determinou em seu estudo os mesmos parâmetros, contudo para a avaliação da imobilização de celulases, incluindo endoglucanase e β -glicosidase, e endoxilanase do preparado enzimático *Cellic CTec 2-Novozymes* em OGM pela rota EDAC-NHS. Para a endoglucanase, foram obtidos valores de 63,4%, 37,6% e 23,8% para rendimento, eficiência e atividade recuperada, respectivamente. Neste caso, é possível verificar que houve uma melhor imobilização de endoglucanase em comparação com o presente estudo, contudo esta não foi traduzida em uma melhor eficiência, a qual foi menor que no presente estudo, conforme os dados presentes na Tabela 3. Para a endoxilanase, foram obtidos valores de 27,0%, 55,2% e 14,9% para rendimento, eficiência e atividade recuperada, respectivamente. Neste caso, de acordo com a Tabela 3, todos os parâmetros obtiveram valores inferiores aos obtidos neste trabalho. O estudo de Paz-Cedeno *et al.* (2021) permite uma comparação interessante com o presente trabalho, uma vez que foram utilizados o mesmo suporte (OGM) e a mesma rota de imobilização, variando-se apenas o preparado enzimático contendo atividades de celulases e endoxilanase.

Por fim, outro parâmetro importante é a atividade das enzimas imobilizadas dadas em U por grama de OGM. No presente trabalho, foram obtidos valores de $191,3 \pm 5,0$ e $338,5 \pm 62,8$ U por grama de OGM, para endoglucanase e endoxilanase, respectivamente (Tabela 3). Nesse sentido, a atividade de endoglucanase obtida foi ligeiramente menor que a adquirida por Paz-Cedeno *et al.* (2021), a qual foi de $299,9 \text{ U.g}^{-1}$. No entanto, para a endoxilanase, o referido estudo obteve uma atividade aproximadamente três vezes maior. Nesse caso, como o mencionado estudo utilizou o mesmo suporte e a mesma rota de imobilização, é possível atribuir essas variações às características intrínsecas aos preparados enzimáticos de celulases e endoxilanase utilizados e às possíveis variações na metodologia empregada para tal avaliação. Destaca-se o alto desvio padrão resultante devido a presença de suspensão, pois o OGM é insolúvel em água, diferentemente da medida de atividade da enzima em sua forma livre, a qual se encontra em uma solução.

5.5. Obtenção e caracterização química de xilana de bagaço de cana-de-açúcar (BCA)

5.5.1 Pré-tratamento de BCA com peróxido de hidrogênio e ácido acético (PHAA)

A Figura 25 apresenta o BCA em sua forma natural não moído utilizado no estudo. O material apresenta-se na forma de uma serragem e uma análise prévia (qualitativa-visual) mostra uma variação considerável em sua granulometria, demonstrando ser um material pouco homogêneo.

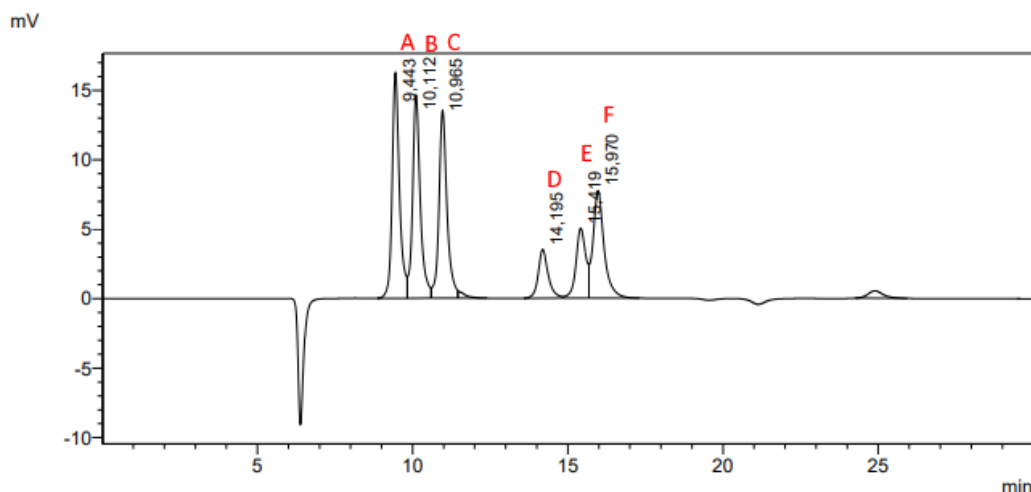
Figura 25. Bagaço de cana-de-açúcar em sua forma natural não moído.



Fonte: Elaborado pela autora.

Para a avaliação da composição química do BCA em sua forma natural, foi utilizada a metodologia da hidrólise ácida. O material foi lavado, moído e extraído com etanol previamente a hidrólise ácida e utilizou-se a coluna HPX-87H para análise de açúcares monoméricos e seus derivados em meio ácido. A Figura 26 apresenta o cromatograma típico obtido com a coluna HPX-87H para a eluição dos seguintes padrões de referência, com os seus respectivos tempos de retenção: glicose (9,4 min), xilose (10,1 min), arabinose (10,9 min), ácido fórmico (14,2 min), ácido acético (15,4 min) e ácido levulínico (16,0 min).

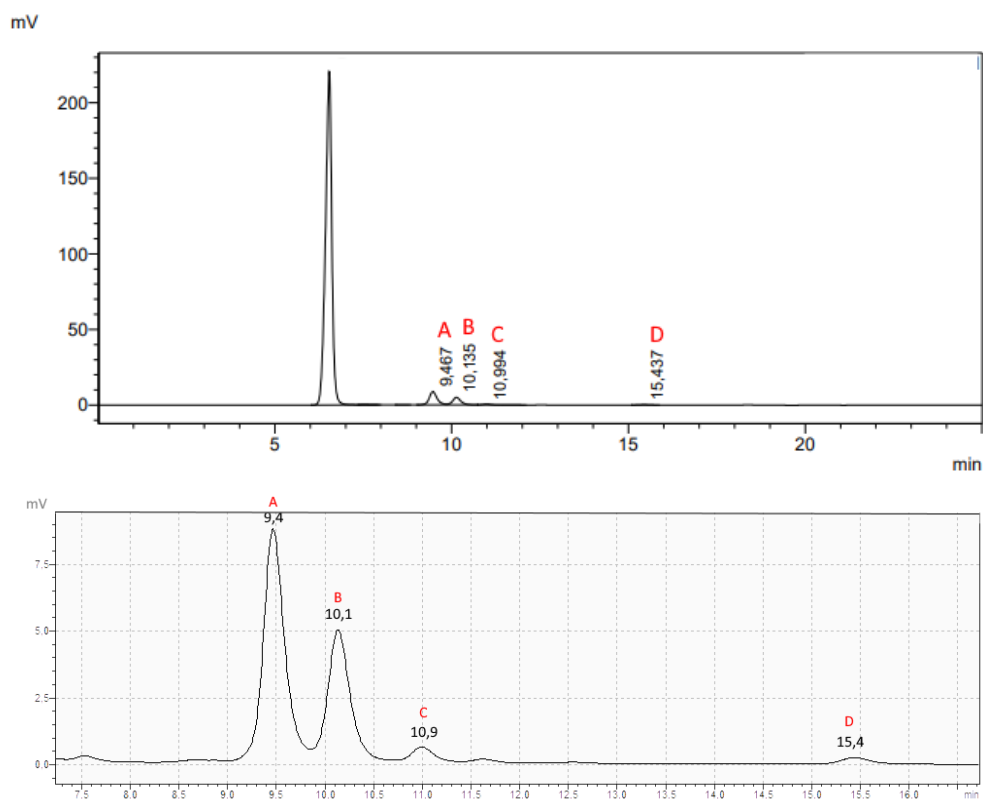
Figura 26. Cromatograma de padrões analíticos obtidos pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Foi utilizada a coluna cromatográfica HPX87H. (A) glicose. (B) xilose. (C) arabinose. (D) ácido fórmico (E) ácido acético. (F) ácido levulínico.



Fonte: Elaborado pela autora.

A Figura 27 apresenta o perfil do cromatograma obtido com a coluna HPX-87H do hidrolisado ácido da amostra de BCA previamente moído e extraída com etanol. Com base nos tempos de retenção dos padrões apresentados na Figura 26 confirma a presença de glicose, xilose, arabionose e ácido acético na amostra em estudo.

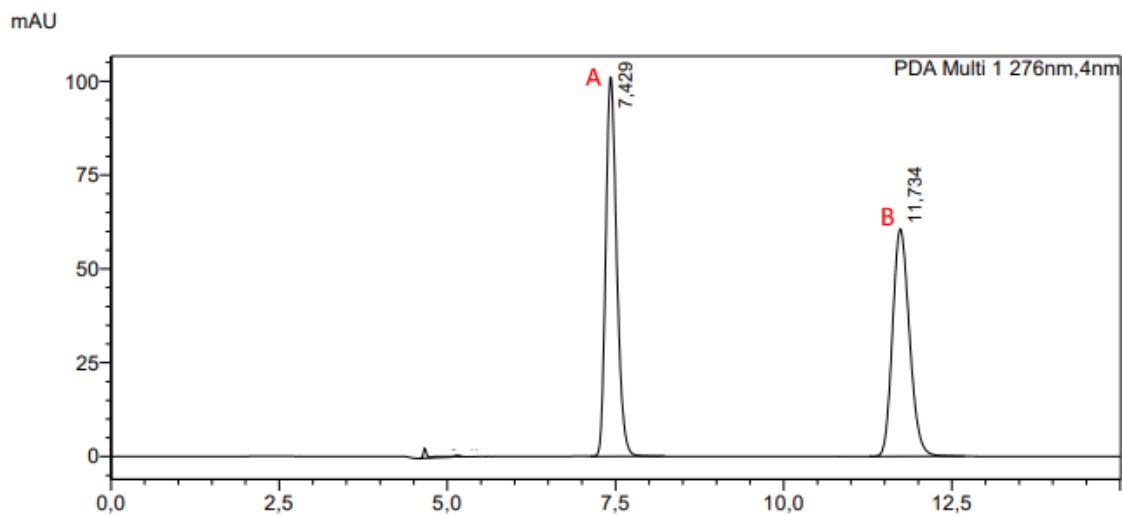
Figura 27. Cromatograma de hidrolisado ácido do bagaço de cana-de-açúcar (BCA) obtidos pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Foi utilizada a coluna cromatográfica HPX87H. (A) glicose. (B) xilose. (C) arabinose. (D) ácido acético.



Fonte: Elaborado pela autora.

Analisou-se também o teor de HMF e furfural da amostra de hidrolisado ácido de BCA utilizando-se uma coluna C18 (Thermo-Fischer). A Figura 28 apresenta o cromatograma típico obtido para a eluição dos seguintes padrões analíticos, com os seus respectivos tempos de retenção analisados em 276 nm: HMF (7,4 min) e furfural (11,7 min).

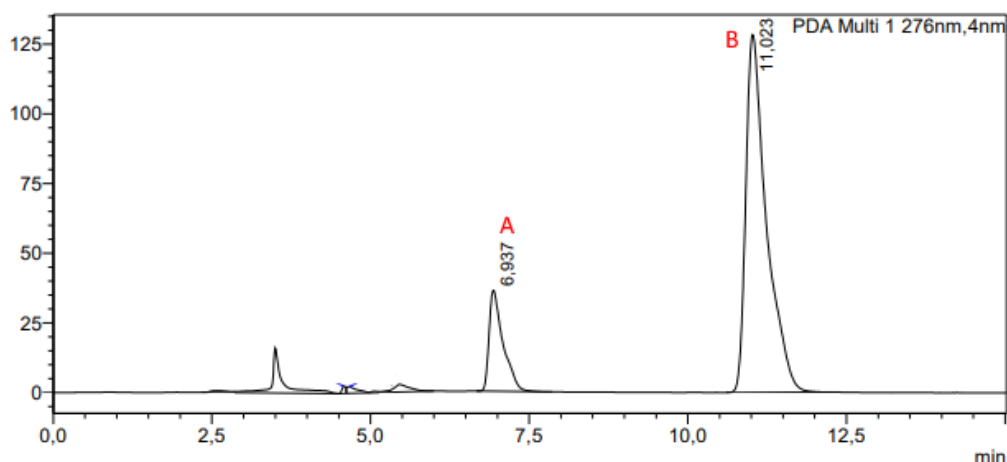
Figura 28. Cromatograma de padrões analíticos obtidos pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Foi utilizada a coluna cromatográfica C18. (A) hidroximetilfurfural (HMF). (B) furfural.



Fonte: Elaborado pela autora.

A Figura 29 apresenta o perfil do cromatograma obtido com a coluna C18 do hidrolisado ácido da amostra de BCA previamente moído e extraída com etanol em estudo. Com base nos tempos de retenção dos padrões apresentados na Figura 16 confirma-se a presença de HMF e furfural na amostra.

Figura 29. Cromatograma de hidrolisado ácido do bagaço de cana-de-açúcar (BCA) obtidos pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Foi utilizada a coluna cromatográfica C18. (A) hidroximetilfurfural (HMF). (B) furfural.



Fonte: Elaborado pela autora.

A soma total dos componentes do BCA em sua forma natura foi de 81,4%, sendo que os 18,6% são componentes indeterminados pela metodologia utilizada. Esses componentes geralmente são os teores de cinzas, teor de ácido metilglucurônico presente na cadeia de hemicelulose, além da formação de HMF e furfural que são derivados de reações de desidratação de açúcares, os quais não foram incorporados na soma de 81,4%. Comparando com os trabalhos apresentados por Paz-Cedeno (2021) e Nakanishi et al (2018), a composição do BCA apresenta valores semelhantes com a literatura, com pequenas variações relacionadas com a diversificação de plantios e localização do BCA. Quanto aos teores de HMF e furfural, a amostra apresentou 0,4% e 1,9%, respectivamente, e está dentro dos padrões esperados da metodologia aplicada (não foi calculado os valores correspondentes de celulose e hemicelulose oriundas de HMF e furfural para ser incorporados a soma de 81,4%). O estudo de Silva (2013) permite comparar os teores desses componentes visto que se focou em uma metodologia específica para a detecção dos mesmos, o autor obteve como resultado valores de $1,5 \pm 0,02 \mu\text{g}$ e $11,5 \pm 0,21 \mu\text{g}$ de HMF e furfural por mg de bagaço de cana-de-açúcar em sua forma natura (correspondendo a 0,15% e 1,15%, respectivamente).

Durante a hidrólise enzimática, as enzimas tendem a se ligar em superfícies ricas em lignina (adsorção improdutiva), diminuindo a eficiência do processo e dificultando a ação catalítica da endoxilanase sobre a xilana (RAHIKAINEN, 2013). Idealmente, um tratamento eficaz apresenta um baixo custo, com alta porcentagem de deslignificação da biomassa e com uma degradação/remoção mínima da fração de celulose e xilana, com a produção não significativa de compostos inibidores (GATT et al, 2018). Portanto, o BCA foi submetido a um pré-tratamento químico (PHAA) (LIAO et al., 2023) com o objetivo de deslignificá-lo, tornando mais susceptível à extração da fração da xilana por método convencional (BRIENZO et al., 2009)

Após o tratamento com PHAA, a recuperação da fração sólida do BCA foi de 45%. Devido à presença de H_2SO_4 no pré-tratamento avaliado foi constatado que houve remoção de lignina, xilana e celulose. Comparando o BCA tratado com o não tratado (forma natura), percebe-se que visualmente o material tratado apresentou um visual mais claro, como mostrado na Figura 30.

Figura 30. Bagaço de cana-de-açúcar (BCA) após pré-tratamento com PHAA por 120 min.



Fonte: Elaborado pela autora.

A composição química do BCA após o tratamento com PHAA está apresentando na Tabela 4.

Tabela 4. Composição química do bagaço de cana-de-açúcar (BCA) após pré-tratamento com PHAA.

Referência	Biomassa	Rendimento (%,m/m)	Componentes da amostra (g/100 g de material bruto)					% de remoção de componentes (g/100 g de material não tratado)		
			Celulose (%)	Xilana (%)	Lignina total (%)	Grupo acetil (%)	Grupo arabinosil (%)	Celulose (%)	Xilana (%)	Lignina Total (%)
Presente Trabalho	BCA natural	-	31,0 ± 0,1	18,9 ± 0,2	23,8 ± 0,3	2,4 ± 0,0	2,2 ± 0,2	-	-	-
Presente Trabalho	BCA pré-tratado	45	63,7 ± 2,4	14,8 ± 0,5	10,6 ± 0,5	2,2 ± 0,1	0,3 ± 0,2	8,8	64,7	79,9
Liao et al. (2023)	Álamo natural	-	39,9 ± 0,9	17,8 ± 0,6	28,0 ± 0,5	3,4 ± 0,2	0,8 ± 0,1	-	-	-
Liao et al. (2023)	Álamo pré-tratado	69	52,8 ± 0,3	23,2 ± 0,2	6,5 ± 0,8	5,9 ± 0,7	-	8,6	9,9	84,0

Dados em base seca.

Os níveis de celulose, xilana, lignina, grupos acetil e arabinosil do BCA pré-tratado foi de 63,7%, 14,8%, 10,6%, 2,2% e 0,3%, respectivamente. A soma dos componentes atingiu 91,6%. Os componentes não determinados podem ser atribuídos a cinzas, ácido metilglucurônico presente nas cadeias de hemicelulose e desidratação de açúcares. Houve remoção de 8,8% de celulose, a degradação de celulose é relativamente baixa devido à baixa reatividade da solução de PHAA sobre os grupos hidroxila alcoólicos da molécula de celulose (LIAO *et al.*, 2023); remoção de 64,7% de xilana, um resultado não desejado visto que o objetivo do estudo é a obtenção de XOS através da hidrólise enzimática da fração de xilana; e remoção de 79,9% de lignina total, um valor satisfatório. Portanto, foi verificado uma boa eficiência para remoção da fração de lignina, entretanto, como apresentado na Tabela 4, foi constatado um alto nível de degradação da fração de xilana (ZHANG *et al.*, 2010).

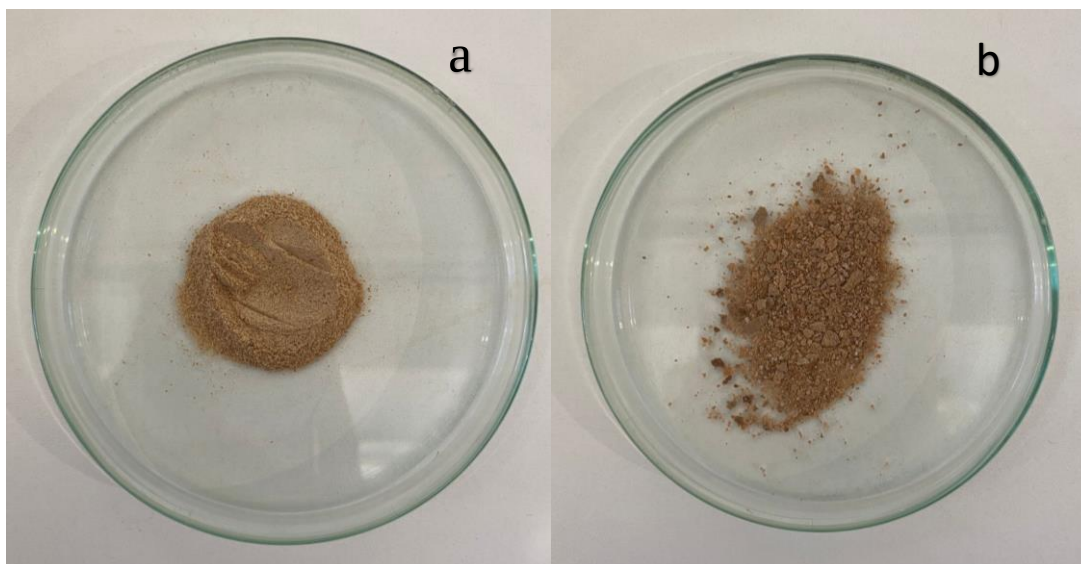
A literatura reporta pré-tratamento com PHAA sobre álamo com as mesmas condições realizadas para BCA. Os autores obtiveram um rendimento mássico foi de 69.1%. Houve remoção de 8,6, 9,9 e 84% de celulose, xilana e lignina, respectivamente. Assim, foi observado que a xilana de BCA foi menos resistente ao pré-tratamento proposto, ou seja, possivelmente a xilana de madeira de álamo é mais resistente a acidez (pois foi adicionado ácido sulfúrico) quando comparado a xilana de BCA, portanto sendo recomendável diminuir/eliminar o ácido sulfúrico no pré-tratamento com PHAA para se obter um material adequado para a extração da xilana (LIAO *et al.*, 2023)

O uso do ácido sulfúrico utilizado em pré-tratamentos de material lignocelulósico pode causar hidrólise da fração hemicelulósica, alterações estruturais na lignina, clivagem das ligações lignina-carboidrato e diminuição no tamanho das partículas. Portanto é importante otimizar variáveis do pré-tratamento com PHAA em BCA, como temperatura, concentração do ácido sulfúrico e tempo de reação de forma a resultar em elevada remoção de lignina, no entanto, sem degradar as frações polissacarídicas (celulose e xilana).

5.5.3 Extração de xilana de bagaço de cana-de-açúcar (BCA)

A extração da xilana seria realizada com base no estudo apresentado por Mafei *et al.* (2019). Porém, com base nos resultados apresentados do BCA pré-tratado com PHAA, em que não foi observado um alto teor de xilana, como esperado, não foi dado prosseguimento na extração. Como houve a remoção de 64% da xilana, foi avaliada a obtenção dos compostos solubilizados no processo de lavagem do pré-tratamento, por precipitação com etanol com o objetivo de recuperar a fração de xilana removida no pré-tratamento. A Figura 31 mostra o aspecto visual da xilana obtida em comparação com a xilana comercial. Observa-se que a xilana extraída é mais heterogênea, porém suas cores se assemelham.

Figura 31. (A) Xilana de *Beechwood* comercial. (B) Xilana extraída de BCA.



Fonte: Elaborado pela autora.

A Tabela 5 apresenta a caracterização química dos componentes macromoleculares da xilana obtida após o pré-tratamento com PHAA em BCA.

Tabela 5. Composição química de xilana obtida de BCA por pré-tratamento com PHAA e outras xilanas comerciais.

Referências	Componentes da amostra (grama/100 grama de material bruto)					
	Celulose (%)	Xilana (%)	Grupo Arabinosil (%)	Grupo Acetil (%)	Lignina (%)	Soma (%)
Xilana de BCA	12,9 ± 0,1	13,7 ± 0,1	0,3 ± 0,1	10,5 ± 0,0	4,6 ± 0,0	48,1
Xilana de <i>Beechwood</i>	1,0 ± 0,9	64,7 ± 0,7	-	-	2,6 ± 0,4	63,1
Xilana de <i>Birchwood</i> (Mafei 2019)	1,0 ± 0,2	58,5 ± 1,2	-	-	4,1 ± 1,1	64,1

A Tabela 5 também apresenta a composição química em relação a xilana comercial (*Beechwood* e *Birchwood*). A xilana de BCA do presente trabalho apresentou 12,9% de celulose, 13,6% de xilana, 0,3% de grupo arabinosil, 10,5% de grupo acetil, 4,6% de lignina e a soma dos componentes foi de 48,1%, desconsiderando o teor de cinzas. A partir da comparação com xilana comercial, é possível confirmar que xilana recuperada após o pré-tratamento do BCA não apresenta pureza compatível com as xilanas comerciais, sugerindo que esta xilana já é parcialmente degradada e está contaminada com outros componentes. O teor comumente reportado na literatura de xilana é da ordem de 58,5%, no entanto, a xilana obtido de BCA mostrou um teor de 13,6%. Além disso a xilana de BCA apresentou alto teor de grupos acetil confirmando que foi dissolvida/degradada durante o pré-tratamento com PHAA. Desta forma, apesar do pré-tratamento com PHAA em BCA ter sido bem-sucedido em relação a deslignificação, a xilana foi parcialmente hidrolisada e sua recuperação resultou em um formato degradada, além de estar contaminada com outros compostos.

Por fim, devido a caracterização demonstrar que a xilana obtida de BCA não apresenta pureza e estrutura característica de uma xilana, não foi dado prosseguimento na avaliação de sua hidrólise enzimática utilizando-se endoxilanase imobilizada em OGM, portanto, sendo necessário primeiramente um ajuste nos parâmetros do pré-tratamento com PHAA o qual será realizado mais adiante pelo

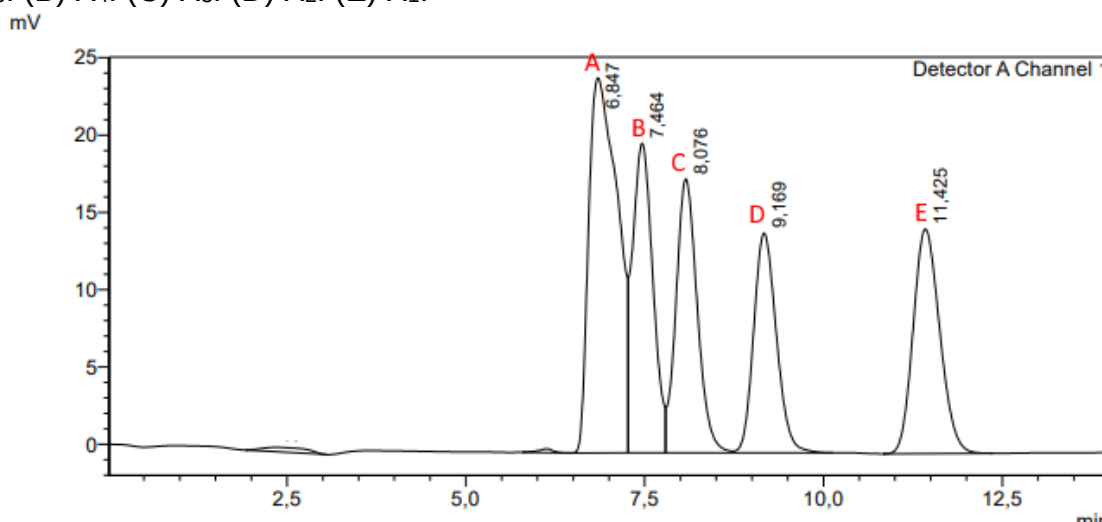
grupo de pesquisa. Assim, foi realizada a hidrólise enzimática com endoxilanase em sua forma livre e imobilizada (OGM-Enz) sob xilana comercial de *Beechwood*.

5.6 Hidrólise Enzimática de xilana e determinação dos xilo-oligossacarídeos (XOS)

A xilana comercial de *Beechwood* foi hidrolisada utilizando os preparados enzimáticos de *Celluclast* em sua forma livre e imobilizada (OGM-Enz). A atividade enzimática de endoxilanase foi determinada para que fosse definida a quantidade de enzima adicionada na hidrólise, seguindo a variação de carga enzimática.

A Figura 32 apresenta o cromatograma típico obtido com a coluna BIO-RAD Aminex HPX-87C para a eluição dos seguintes padrões analíticos, com os seus respectivos tempos de retenção: xilonanaose, xilooctaoese, xiloheptaoese, xilohexaoese e xilopentaose (6,8 min), xilotetraose (7,4 min), xilotriose (8,0 min), xilobiose (9,1 min) e xilose (11,4 min).

Figura 32. Cromatograma de hidrolisado ácido do bagaço de cana-de-açúcar (BCA) obtidos pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Foi utilizada a coluna cromatográfica HPX87C. Cromatograma de padrões analíticos de XOS. (A) X_{>5}. (B) X₄. (C) X₃. (D) X₂. (E) X₁.

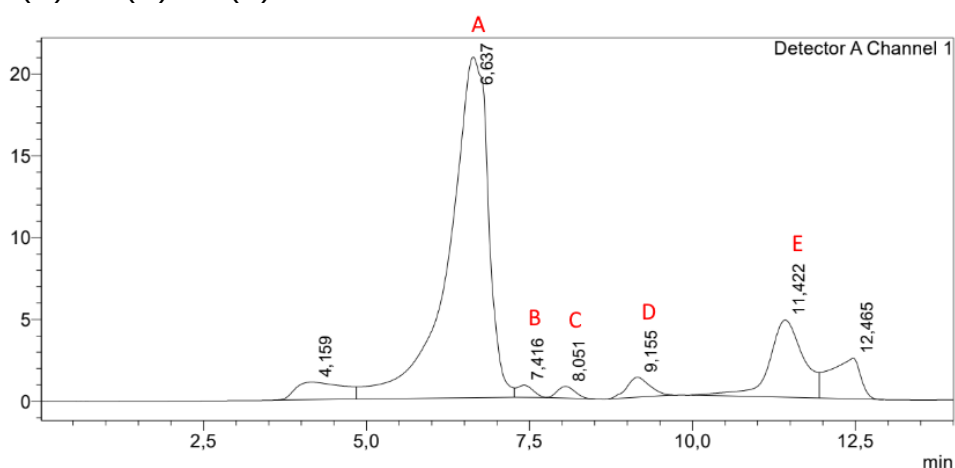


Fonte: Elaborado pela autora.

A Figura 33 apresenta o perfil do cromatograma obtido com a mesma coluna do hidrolisado enzimático com endoxilanase em sua forma livre (após 3 horas de hidrólise com 80 U por grama de substrato). Com base nos tempos de retenção dos

padrões apresentados na Figura 32 a princípio confirma-se a presença de X_1 a X_9 na amostra.

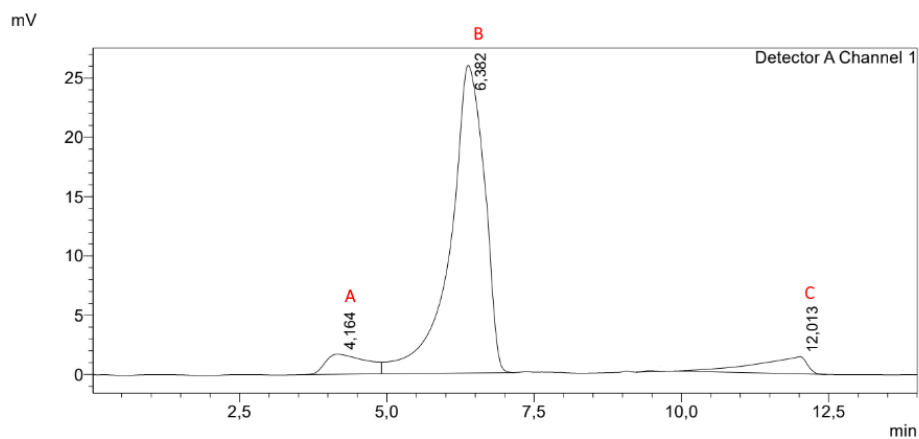
Figura 33. Cromatograma de hidrolisado enzimático de xilana de *Beechwood* obtidos pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Foi utilizada a coluna cromatográfica HPX87C. Cromatograma de padrões analíticos de XOS. (A) $X_{>5}$. (B) X_4 . (C) X_3 . (D) X_2 . (E) X_1 .



Fonte: Elaborado pela autora.

Devido a larga área apresentada no pico A, realizou-se um ensaio controle do substrato (xilana de *Beechwood*) nas mesmas condições da hidrólise anterior, porém sem a presença da enzima. A Figura 34 mostra o cromatograma obtido apenas para o controle enzimático. Observa-se que o pico B é significativo pois o seu tempo de retenção é o mesmo do $>X_5$. É possível que a xilana esteja se dissolvendo na solução tampão e coelindo no mesmo tempo de retenção dos padrões analíticos de $>X_5$. Portanto, para as quantificações dos ensaios de hidrólise enzimática de xilana *Beechwood* foi desconsiderado o pico de $>X_5$ devido a não confiabilidade dos dados que se obtém.

Figura 34. Cromatograma de controle enzimático do substrato de xilana de *Beechwood* após 3 horas de incubação em solução tampão obtidos pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Foi utilizada a coluna cromatográfica HPX87C.



Fonte: Elaborado pela autora.

A Tabela 6 apresenta os resultados da hidrólise enzimática da xilana comercial de madeira de *Beechwood*. As conversões de xilana em X_4 , X_3 , X_2 e X_1 foram ranqueadas de acordo com as cargas enzimáticas e imobilização da enzima, ao longo dos tempos de hidrólise enzimática (3-72h).

Tabela 6. Conversão de xilana em XOS e xilose em função do tempo e carga enzimática.

Carga Enzimática	Tempo (h)	Conversão de xilana em produtos (%)					Concentração de produtos (g.L ⁻¹)	
		X4	X3	X2	X1	XOS*	X1	XOS *
Livre	3	2,9±0,9	5,6±1,0	8,6±0,0	8,7±4,3	17,1	0,7±0,3	1,3
	6	2,2±0,0	4,2±0,1	8,8±0,2	13,5±1,4	15,2	1,1±0,1	1,3
	12	1,0±0,0	1,9±0,0	6,1±0,6	20,6±2,8	9,0	1,7±0,2	0,7
	24	2,0±0,1	1,9±0,6	7,0±1,9	56,2±15,9	10,9	4,7±1,3	0,8
	48	2,6±0,3	1,0±0,1	3,2±1,0	61,2±14,1	6,8	5,1±1,0	0,4
	72	2,5±0,1	1,9±0,9	5,3±2,1	63,4±4,9	9,7	5,2±0,2	0,7
Imobilizada 80 UI.g ⁻¹	3	1,3±0,4	1,4±0,2	3,1±0,3	12,1±1,1	5,8	1,0±0,1	0,4
	6	1,4±0,5	2,7±1,3	4,8±0,5	28,8±5,4	8,9	2,4±0,5	0,7
	12	1,4±0,0	1,0±0,0	2,6±1,8	31,7±3,2	5,0	2,7±0,4	0,4
	24	5,8±3,0	0,0±0,0	1,5±0,3	35,2±7,9	7,3	2,9±0,7	0,5
	48	3,2±3,0	0,0±0,0	1,2±0,0	33,3±0,0	4,4	3,8±0,8	0,3
	72	7,2±0,1	0,7±0,1	1,1±0,2	66,9±16,3	9,0	5,6±1,5	0,7
Imobilizada 160 UI.g ⁻¹	3	1,6±0,0	1,5±0,2	3,7±0,2	15,1±1,9	6,8	1,3±0,1	0,5
	6	2,1±0,0	0,7±0,1	1,0±0,1	18,8±4,5	3,8	3,2±2,8	0,4
	12	6,3±0,8	1,0±0,7	2,0±0,4	46,7±12,4	9,3	3,9±1,0	0,8
	24	6,1±0,8	0,0±0,0	1,6±0,2	40,7±11,3	7,7	3,4±0,8	0,6
	48	4,3±3,4	0,8±0,0	2,3±1,5	66,9±16,2	7,4	5,7±1,5	0,6
	72	6,9±1,0	0,5±0,0	0,9±0,2	83,7±29,5	8,3	7,1±2,7	0,6

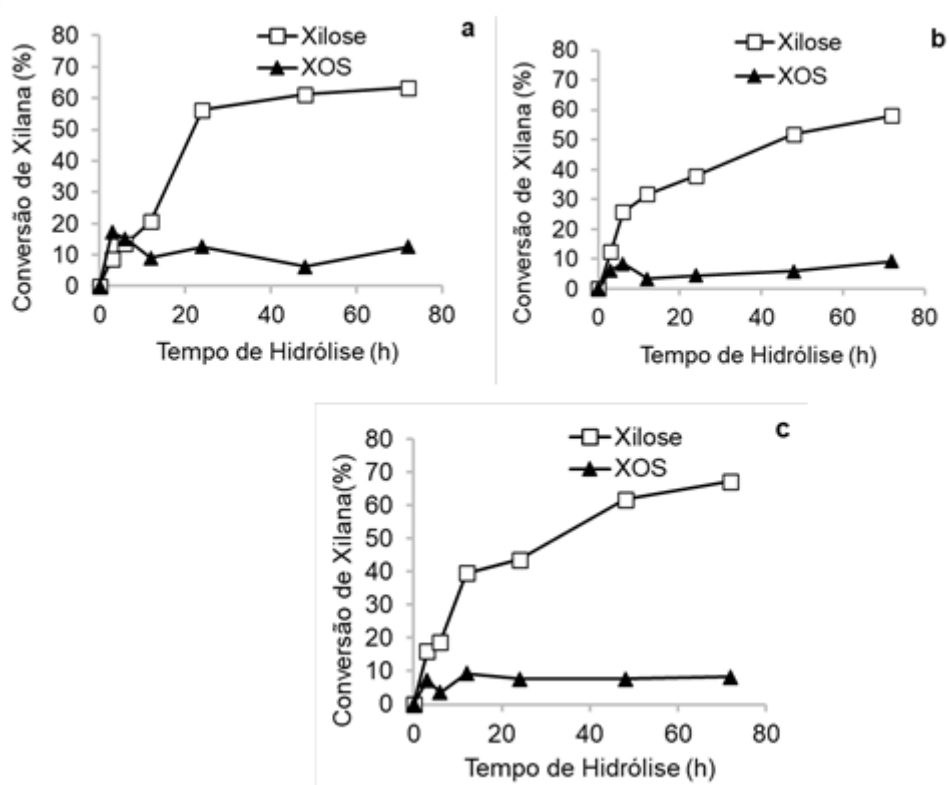
(X₁)= xilose, (X₂)= xilobiase, (X₃) = xilotriose, (X₄) = xilotetraose.

*XOS = X₄+X₃+X₂

As Figuras 35 e 36 apresentam o comportamento cinético da hidrólise enzimática da xilana comercial de *Beechwood*. Neste caso as três diferentes condições de hidrólise em estudo (livre 80 UI.g⁻¹, imobilizada 80 UI.g⁻¹ e 160 UI.g⁻¹) mostraram comportamento semelhantes. A hidrólise enzimática com endoxilanase de *Celluclast* em sua forma livre apresentou um aumento na formação de XOS em até 3h de reação (aproximadamente 17% de conversão) (% massa/massa). Todavia,

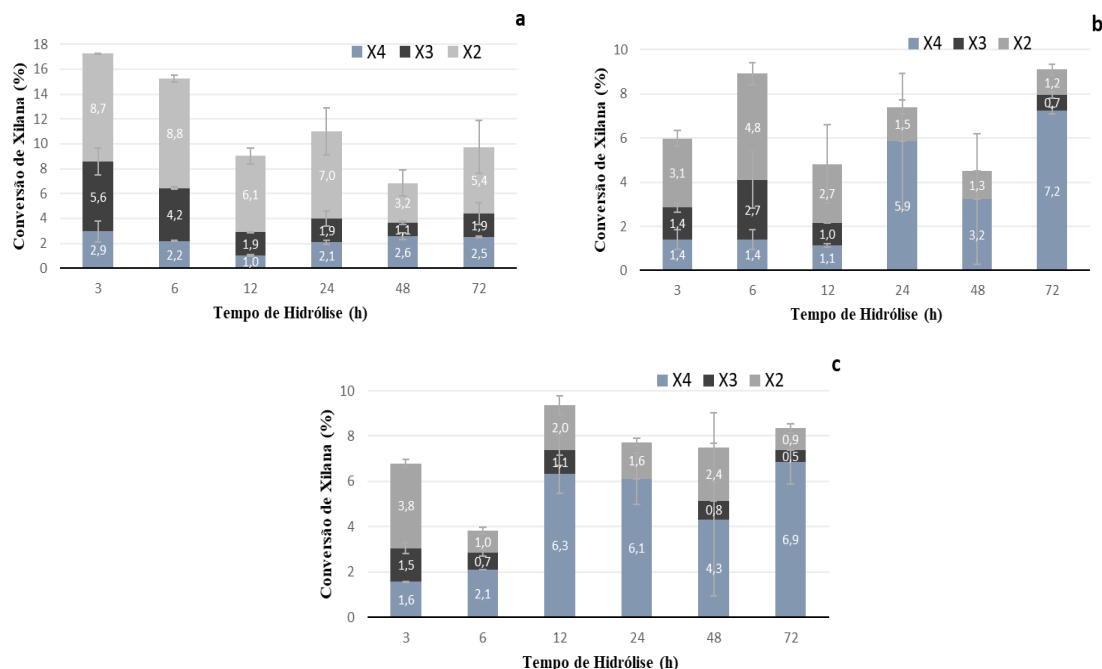
entre 3 e 6h de reação foi verificada uma diminuição da formação dos XOS (Figura 23a). Todavia, houve um aumento contínuo da formação de xilose ao longo do tempo de reação (3-72h), atingindo uma conversão máxima de 63,4% (% massa/massa). As conversões de XOS e xilose não se tornaram equivalentes mesmo após 72h de reação (Figura 22a).

Figura 35. Cinética da hidrólise enzimática de xilana de *Beechwood* com endoxilanase de preparado enzimático *Celluclast*. (A) Livre. (B) Imobilizado 80 U.g⁻¹. (C) Imobilizado 160 U.g⁻¹.



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 36. Conversão de xilana em XOS a partir da hidrólise enzimática de xilana de *Beechwood* com preparado enzimático *Celluclast*. (A) Livre. (B) Imobilizado 80 U.g⁻¹. (C) Imobilizado 160 U.g⁻¹.



Fonte: Elaborado pela autora.

A hidrólise enzimática com endoxilanase imobilizada com uma carga enzimática de 80 UI.g⁻¹, mostrou um aumento na formação de XOS até 6h de reação (aproximadamente 8,9% de conversão) (% m/m), após esse tempo, houve uma diminuição na produção permanecendo neste patamar até 48h de reação. Entretanto, após 72h de reação foi constatado aumento inesperado da formação dos XOS (9% de conversão) (Figura 35b). A Figura 35b também mostra um aumento contínuo da formação de xilose ao longo do tempo de reação (3-72h), atingindo uma conversão máxima de 66,9% (% massa/massa). As conversões de XOS e xilose não se tornaram equivalentes mesmo após 72h de reação (Figura 35b).

A hidrólise enzimática com endoxilanase imobilizada a uma carga enzimática de 160 UI.g⁻¹, mostrou um aumento na formação de XOS até 12h de reação (aproximadamente 9,3% de conversão) (% m/m). Todavia, após 12h de reação houve uma pequena diminuição da formação dos XOS. Ao final da hidrólise, assim como na carga de 80 UI.g⁻¹, apresentou um aumento de conversão de xilana em XOS. Também

é possível verificar um aumento contínuo da formação de xilose ao longo do tempo de reação (3-72h), atingindo a maior conversão máxima de 83,7% (% m/m) das três condições estudadas (Figura 35c). As conversões de xilana em XOS e xilose não se tornaram equivalentes mesmo após 72h de reação (Figura 35c). Os resultados da hidrólise com enzimas imobilizadas mostram que, apesar de nas primeiras horas a conversão ser menor em comparação com a hidrólise com a enzima em sua forma livre, após 72h a conversão de xilana em XOS atinge níveis mais elevados.

A literatura reporta a hidrólise enzimática da xilana de *Beechwood* utilizando-se endoxilanase obtida de *Thermomyces lanuginosus* (DÍAZ-ARENAS *et al.*, 2022). O autor reporta que houve uma maior conversão de xilana para xilobiose (31,4%), seguido por xilotriose (7,4%), todavia a conversão de xilose (3,3%) e xilotetraose (3,8%) foram menores em 1h de reação. Em outro estudo, a hidrólise da xilana de *Birchwood* apresentou uma conversão máxima de xilana em XOS de 28,8% (% m/m) em 3h de reação, sendo que a bioconversão de xilana em xilose e xilobiose prevaleceram (MIGUEZ *et al.*, 2022).

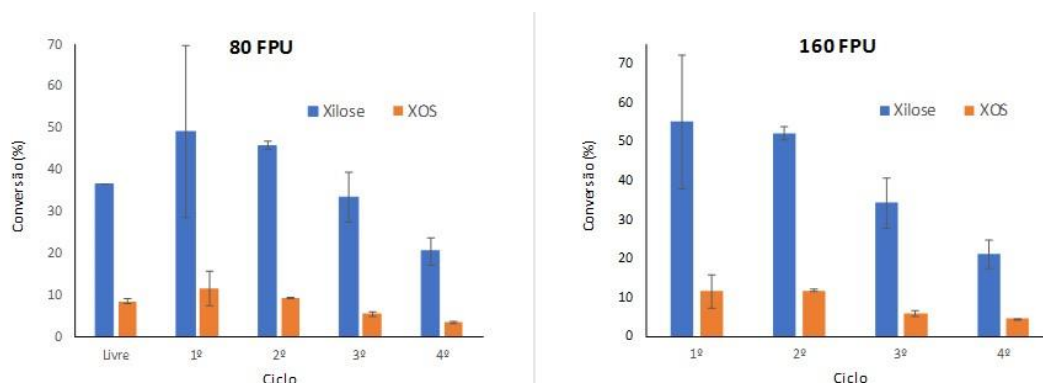
De uma maneira geral as conversões de xilana comercial de *Beechwood* em XOS ao longo do tempo de hidrólise enzimática (independente do preparado enzimático utilizado) diminui, enquanto as conversões de xilana em xilose aumentam. Esse aumento na conversão de xilana em xilose ao longo do tempo de hidrólise enzimática é indesejado durante o processo de geração de XOS. Esses dados corroboram com dados reportados na literatura onde ocorre o mesmo efeito nas conversões de xilana em XOS e xilose sobre uma xilana extraída de BCA (BRIENZO, 2010).

O principal objetivo da imobilização de enzimas é a reutilização do biocatalisador em vários ciclos de hidrólise. Por esse motivo, ensaios de hidrólise enzimática foram realizados no OGM-Enz e, após o término do ciclo de hidrólise, o biocatalisador foi recuperado com o auxílio de um ímã externo e reutilizado em um novo ciclo de hidrólise.

A Figura 37 compara a conversão de xilana em relação a enzima livre e os ciclos de hidrólise em diferentes cargas enzimáticas, considerando um ciclo como 24h. A enzima livre apresentou a menor conversão de xilana quando comparado com o primeiro ciclo da enzima imobilizada tanto com a carga de 80 quanto de 160 UI.g⁻¹.

Esse baixo rendimento pode estar relacionado a baixa estabilidade da enzima livre durante as 24h de hidrólise que ocorreram a condições de temperatura e agitação mais altas (45°C e 150 rpm).

Figura 37. Conversão de xilana em XOS e xilose a partir do reuso do derivado enzimático (OGM-Enz).



Fonte: Elaborado pela autora.

A hidrólise da xilana de *Beechwood* com OGM-Enz com carga enzimática de 80 UI.g⁻¹ alcançou um patamar de conversão de xilana em xilose e XOS de 49% e 11,5%, respectivamente, no primeiro ciclo, no entanto, foi verificada uma diminuição da conversão de xilana em xilose e XOS ao longo do ciclos atingindo-se 20,5% e 3,5%, respectivamente, no quarto ciclo (Figura 37). Embora esses valores não sejam altos, confirma-se uma perda média de eficiência do biocatalisador entre os ciclos de hidrólise, mantendo uma eficiência de 42% comparado ao primeiro ciclo.

O ensaio com carga enzimática de 160 UI.g⁻¹ apresentou um patamar de conversão de xilana em xilose e XOS de 55% e 11,5% no primeiro ciclo, no entanto, foi verificada uma diminuição da conversão de xilana em xilose e XOS ao longo do ciclos atingindo-se 21% e 4,5%, respectivamente, no quarto ciclo (Figura 37). Portanto, os resultados indicam uma eficiência do OGM-Enz de aproximadamente 38,2% após 4 ciclos de reuso comparado ao primeiro ciclo. A partir desses ensaios de hidrólise podemos mostrar que as conversões de xilana em XOS e xilose em cada ciclo de hidrólise aumentam em função do aumento da carga enzimática, porém, a eficiência de reuso do OGM-Enz atingiu níveis semelhantes nos ensaios com diferentes cargas.

6. CONCLUSÃO

O preparado enzimático *Celluclast* apresentou atividades específicas de endoglucanase e endoxilanase em suas formas livres compatíveis com o reportado na literatura. A síntese de OGM foi obtida com sucesso e o derivado sintetizado apresentou propriedades magnéticas como esperado. A imobilização do preparado enzimático *Celluclast* no OGM foi eficiente, sendo que o derivado enzimático (OGM-Enz) resultou com bom potencial de atividade enzimática de endoglucanase e endoxilanase.

A composição química do BCA em sua forma natura resultou em teores de celulose, hemicelulose e lignina compatíveis com o reportado na literatura. Todavia, O BCA pré-tratado com PHAA tornou-se enriquecido de celulose, entretanto, a fração de xilana foi extensamente hidrolisada. Dessa forma, pode-se confirmar que o pré-tratamento é efetivo para remoção de lignina, mas nestas condições muito agressivo para a fração hemicelulósica.

O preparado enzimático *Celluclast* em sua forma livre e imobilizado (OGM-Enz) apresentou um excelente desempenho na bioconversão de xilana (de *Beechwood* em XOS. O OGM-Enz com carga enzimática de 180 U.g^{-1} foi o que apresentou maiores conversões de xilana em XOS, atingindo 11,5%. O reuso do OGM-Enz resultou em rendimento razoável mesmo após quatro ciclos, permanecendo uma conversão média de xilana em XOS de 4,5%.

O processo de produção de XOS a partir do BCA é uma boa estratégia para o aproveitamento da fração de xilana dessa biomassa gerada no setor sucroenergético. Entretanto, ainda é necessário estudos estratégicos de obtenção de xilana de BCA e imobilização de endoxilanase em suportes sólidos.

REFERÊNCIAS

- AACHARY, A. A.; PRAPULLA, S. G. Xylooligosaccharides (XOS) as an emerging prebiotic: microbial synthesis, utilization, structural characterization, bioactive properties, and applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 10, n. 1, p. 2-16, 2011.
- ADEEL, M. *et al.* Graphene and graphene oxide: functionalization and nano-bio-catalytic system for enzyme immobilization and biotechnological perspective. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, p. 1430–1440, 2018.
- AMORIM, C. *et al.* From lignocellulosic residues to market: production and commercial potential of xylooligosaccharides. **Biotechnology advances**, v. 37, n. 7, p. 107397, 2019.
- ARAGON, C. **Imobilização multipontual covalente de xilanases: seleção de derivados ativos e estabilizados**. 2013. Tese (doutorado em Biotecnologia) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2013.
- BAJPAI, P. Xylanases. **Encyclopedia of Microbiology**, 3. ed., p. 600–612, 2009.
- BAILEY, M. J.; BIELY, P.; POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **Journal of Biotechnology**, v. 23, p. 257–270, 1992.
- BARRETO, A. R; ZANCAN, L. R.; MENEZES, C. R. Obtenção de Xilooligossacarídeos por resíduos lignocelulósicos: alternativa para produção de compostos funcionais para alimentos. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 19, n. 3, p. 821-836, 2015.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–54, 1976.
- BRIENZO, M. **Extração da hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar para 106 produção de xilo-oligossacarídeos**. 2010. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2010.
- 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.
- CANILHA, L. *et al.* Bioconversion of sugarcane biomass into ethanol: an overview about composition, pretreatment methods, detoxification of hydrolysates, enzymatic saccharification, and ethanol fermentation, J. **Biomed. Biotechnol.**, 989572, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1155/2012/989572>.
- CASTRO, A. M. DE; JUNIOR, N. P. Produção, propriedades e aplicação de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 181–188, 2010.
- COLLINS, T.; GERDAY C.; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p.3-23, 2005.

DÍAZ-ARENAS, G. L. *et al.* Chemometric optimisation of enzymatic hydrolysis of beechwood xylan to target desired xylooligosaccharides. **Bioresource Technology**, v. 352, p. 127041, 2022.

DIAS, L. M. **Avaliação de pré-tratamento hidrotérmico de palha e bagaço de cana-de-açúcar para produção de xilo-oligossacarídeos e hidrolisado enzimático de glicose.** 2013. Dissertação (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, 2013.

DOUSTKHAH, E.; ROSTAMNIA, S. Covalently bonded sulfonic acid magnetic graphene oxide: Fe₃O₄@GO-Pr-SO₃H as a powerful hybrid catalyst for synthesis of indazolophthalazinetriones. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 478, p. 280–287, 2016.

EK, M. *et al.* Pulp and paper chemistry and technology - Volume 1 - **Wood Chemistry and Wood Biotechnology**, 2nd ed., Walter de Gruyter, Berlin, 2009.

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.

FARINAS, C. S. A parede celular vegetal e as enzimas envolvidas na sua degradação. **Embrapa Instrumentação Agropecuária**, São Carlos, SP. p.13, 2011.

FONSECA, A. M. **Avaliação da produção de xilo-oligossacarídeos a partir de casca de soja.** 2015. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Departamento de Eng. Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2015.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and applied Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.

GONÇALVES, D. **Estudo sobre o modo de ação de enzimas hidrolíticas produzidas por fungos degradadores de madeira sobre substratos com elevado teor de lignina.** [s.l.] Universidade de São Paulo, 2013.

HEIDARIZADEH, M. *et al.* Dithiocarbamate to modify magnetic graphene oxide nanocomposite (Fe₃O₄-GO): A new strategy for covalent enzyme (lipase) immobilization to fabrication a new nanobiocatalyst for enzymatic hydrolysis of PNPD. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 101, p. 696–702, 2017.

HUMMERS, W. S.; OFFEMAN, R. E. Preparation of graphitic oxide. **Journal of the American Chemical Society**, p. 1339–1339, 1958.

KNOB, A.; CARMONA, E. C. Purification and characterization of two extracellular xylanases from *Penicillium sclerotiorum*: a novel acidophilic xylanase. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 162, 429e443, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8731-8>.

LI, H. *et al.* Enzymatic hydrolysis of hemicelluloses from *Miscanthus* to monosaccharides or xylo-oligosaccharides by recombinant hemicellulases. **Ind. Crops Prod.**, 2016.

LI, D. *et al.* Processable aqueous dispersions of graphene nanosheets. **Nat. Nanotechnol.**, v. 3, n. 2, 2008.

LIAO, Hong *et al.* Effect of preferential delignification on xylooligosaccharides production from poplar by acetic acid/sodium acetate hydrolysis. **Journal of Cleaner Production**, v. 392, p. 136178, 2023.

MAFEI, T. D. T. *et al.* Extraction and characterization of hemicellulose from eucalyptus by-product: assessment of enzymatic hydrolysis to produce xylooligosaccharides. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 190, n. 1, p. 197–217, 2019.

MAITAN-ALFENAS, G. P.; VISSER, E. M.; GUIMARÃES, V.; RIA M. Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: Converting food waste in valuable products. **Current Opinion in Food Science**, v. 1, n. 1, p. 44–49, 2015.

MARTINS, L. F. *et al.* Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 5, p. 1417–1424, 2008.

MASARIN, F. *et al.* Chemical composition and enzymatic digestibility of sugarcane clones selected for varied lignin content. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, n. 1, p. 55, 2011.

MENDES, F. M. *et al.* Enzymatic hydrolysis of chemithermomechanically pretreated sugarcane bagasse and samples with reduced initial lignin content. **Biotechnology Progress**, v. 27, n. 2, p. 395–401, 2011.

MENEZES, B. S. **Produção de xilooligossacarídeos a partir de resíduos lignocelulósicos e fungos filamentosos**. 2018. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2018.

MIGUEZ, N. *et al.* Enzymatic bioconversion of beechwood xylan into the antioxidant 2'-O- α -(4-O-methyl-D-glucuronosyl)-xylobiose. **Biomass Conversion and Biorefinery**, p. 1-12, 2022.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.

MONTES-NAVAJAS, P. *et al.* Surface area measurement of graphene oxide in aqueous solutions. **Langmuir**, v. 29, n. 44, p. 13443–13448, 2013. DOI: 10.1021/la4029904.

MORAES, S. L. de *et al.* Cenário brasileiro da geração e uso de biomassa adensada. **Revista IPT | Tecnologia e Inovação**, p. 58–73, 2017.

MOURE, A.; GULLÓN, P.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J.C. Advances in the manufacture, purification and applications of xylo-oligosaccharides as food additives and nutraceuticals. **Process Biochemistry**, v. 41, n.9, p.1913-1923, 2006.

NAKANISHI, S. C. *et al.* Comparative material balances and preliminary technical analysis of the pilot scale sugarcane bagasse alkaline pretreatment to 2G ethanol production. **Industrial Crops and Products**, v. 120, p. 187-197, 2018.

NOVOSELOV, K. S. *et al.* Electric field effect in atomically thin carbon films. **Science**, v. 306, n. 5696, p. 666-669, 2004.

PARK, S.; RUOFF, R. S. Chemical methods for the production of graphenes. **Nature nanotechnology**, v. 4, p. 217–224, 2009.

PATEL, S. J.; SAVANTH, V. D. Review on fungal xylanases and their applications. **International Journal of Advanced Research**, v. 3, n. 3, p. 311-315, 2015.

PAZ-CEDENO, F. R. *et al.* Magnetic graphene oxide as a platform for the immobilization of cellulases and xylanases: ultrastructural characterization and assessment of lignocellulosic biomass hydrolysis. **Renewable Energy**, v. 164, p. 491-501, 2020.

PAZ-CEDENO, F. R., *et al.* Composition and chemical structure of hemicelluloses and polysaccharides with capability of gel formation. In: Michel Brienzo. (Org.). **Hemicellulose biorefinery: a sustainable solution for value addition to bio- based products and bioenergy**. Singapura: Springer Nature, 2022, v. 4, p. 111-137.

POLIZELLI, M. L.; RIZZATTI, A. C.; MONTI, R.; TERENCE, H.; JORGE, J. AMORIM, D. Xylans and xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, (Mini-Review), v. 67, n. 5, p. 577-591, 2005.

PULS, J. Chemistry and biochemistry of hemicelluloses: relationship between hemicellulose structure and enzymes required for hydrolysis. **Macromol. Symp.**, v. 120, n. 1, p. 183-196, 1997.

RAHIKAINEN, J. L. *et al.* Inhibitory effect of lignin during cellulose bioconversion: the effect of lignin chemistry on non-productive enzyme adsorption. **Bioresource technology**, v. 133, p. 270-278, 2013

RALPH, J. K. *et al.* Lignins: natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenyl-propanoids. **Phytochemistry Reviews**, n. 3, p. 29–60, 2004.

RAY, S. C. Application and uses of graphene oxide and reduced graphene oxide. In: **Applications of graphene and graphene-oxide based nanomaterials**. p. 39–56, 2015.

ROSTAMNIA, S.; DOUSTKHAH, E. Synthesis of water-dispersed magnetic nanoparticles (H₂O-DMNPs) of β -cyclodextrin modified Fe₃O₄ and its catalytic application in Kabachnik-Fields multicomponent reaction. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 386, p. 111–116, 2015.

SANTIBÁÑEZ, L. *et al.* Xylooligosaccharides from lignocellulosic biomass: A comprehensive review. **Carbohydr. Polym**, 2021.

SBISSI, K. V. *et al.* Fe doping effects on the structural, magnetic, and magnetocaloric properties of nano-sized Pr_{0.6}Bi_{0.4}Mn_{1-x}Fe_xO₃ (0.1 ≤ x ≤ 0.3) manganites, J. **Nanostructure Chem.**, v. 5, p. 313–323, 2015. DOI: 10.1007/s40097-015-0163-0.

SHELDON, R. A.; VAN PELT, S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. **Chemical Society reviews**, v. 42, n. 15, p. 6223–35, 2013.

SHEN, J. *et al.* Covalent attaching protein to graphene oxide via diimide-activated amidation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 81, n. 2, p. 434–438, 2010.

SILVA, J. L. **Detecção eletroquímica de furfural e hidroximetilfurfural em bagaço de cana-de-açúcar utilizando cromatografia líquida de alta eficiência**. 2013. 111 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Química de Araraquara, 2013.

SLUITER, A. *et al.* Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. **Laboratory analytical procedure**, v. 1617, n. 1, p. 1-16, 2008

SUBRAMANIYAN, S.; PREMA, P. Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology and application. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 22, p. 33-46, 2002.

WEN, P., ZHANG, Y., ZHU, J., XU, Y., ZHANG, J. Alkaline post-incubation improves the saccharification of poplar after hydrogen peroxide–acetic acid pretreatment. **Biotechnol. Biofuels** 14, 2021.

WILSON, D. B. Cellulases and biofuels. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, n.3, p. 295–299, 2009.

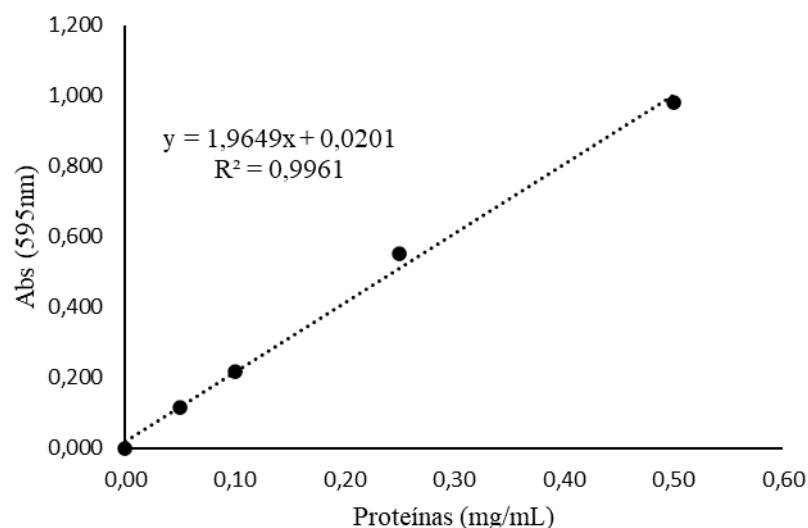
YOON, K.Y.; WOODAMS, E.E.; HANG, Y.D. Enzymatic production of pentoses from the hemicelulose fraction of corn residues. **Food Science and Technology**, v.39, p.387-391, 2006.

ZHANG, J. *et al.* Graphene oxide as a matrix for enzyme immobilization. **Langmuir**, v. 26, n. 9, p. 6083-6085, 2010.

APÊNDICE

1. Curva analítica para quantificação de proteínas

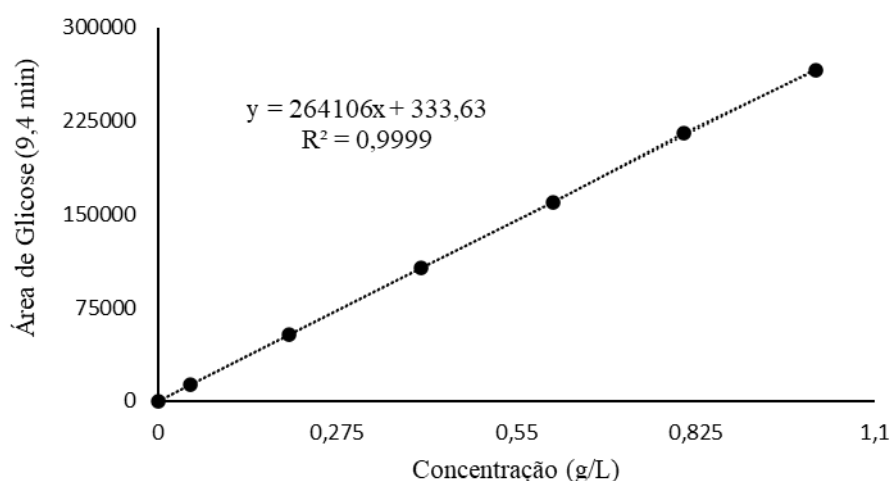
Figura 38. Curva analítica para determinação da quantidade de proteínas totais, via método de *Bradford*.



Fonte: Elaborado pela própria autora.

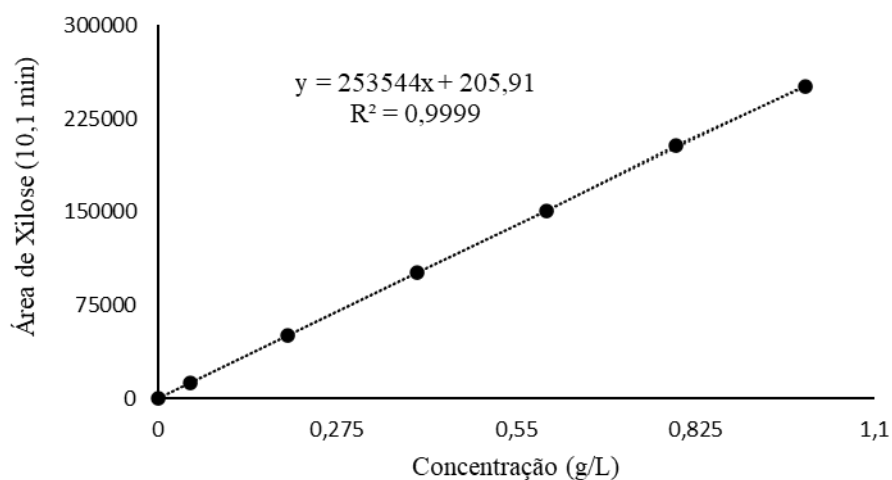
2. Curva analítica para quantificação de açúcares e ácidos orgânicos (coluna HPX-87H)

Figura 39. Curva analítica para determinação da concentração de glicose utilizando uma coluna HPX-87H.



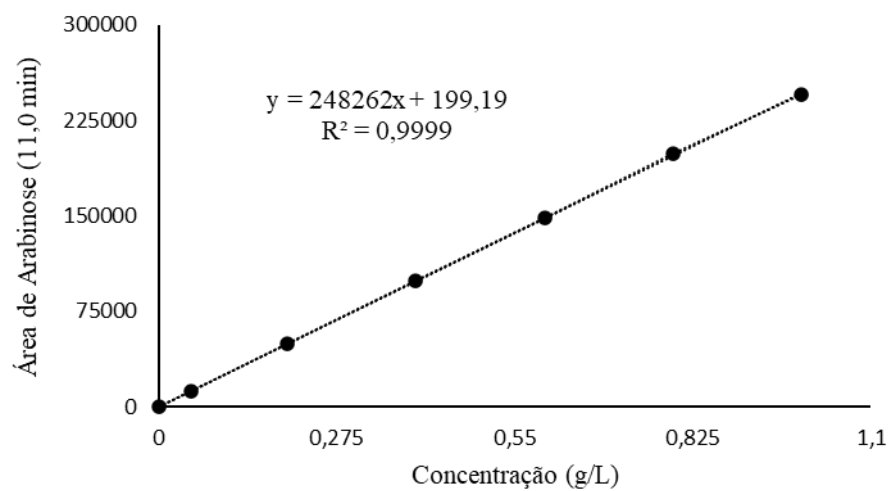
Fonte: Elaborado pela própria autora.

Figura 40. Curva analítica para determinação da concentração de xilose utilizando uma coluna HPX-87H.



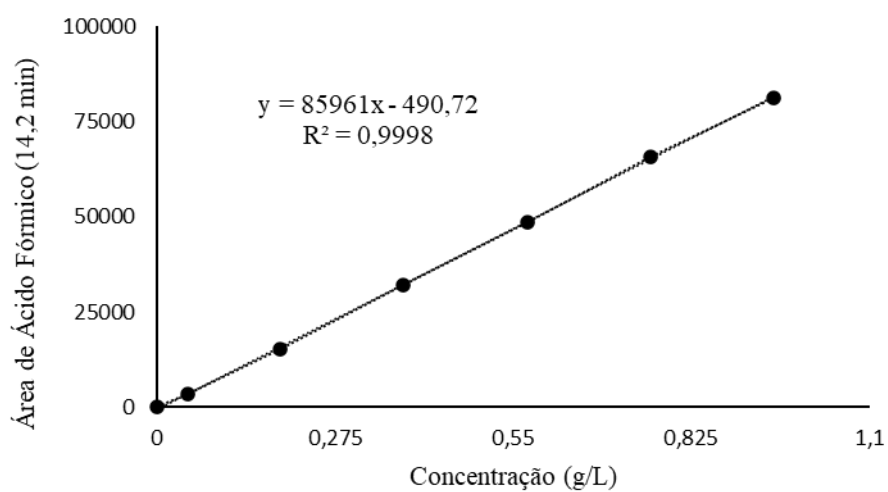
Fonte: Elaborado pela própria autora.

Figura 41. Curva analítica para determinação da concentração de arabinose utilizando uma coluna HPX-87H.



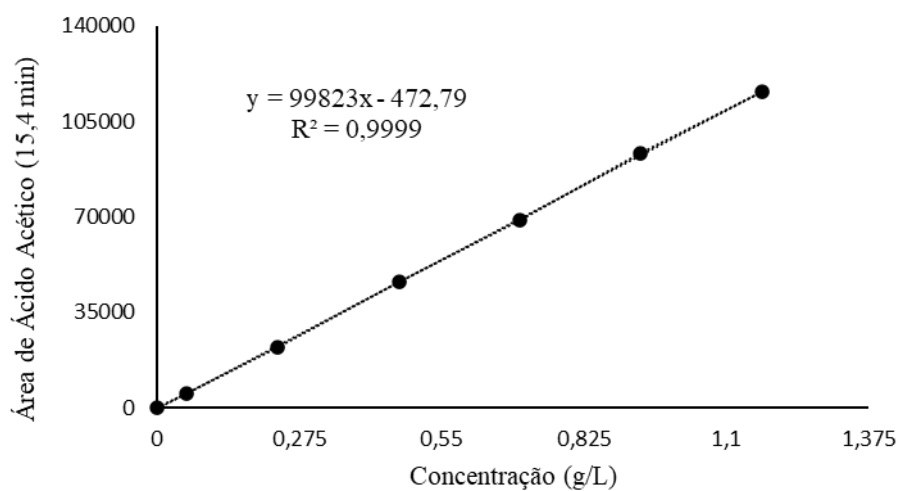
Fonte: Elaborado pela própria autora.

Figura 42. Curva analítica para determinação da concentração de ácido fórmico utilizando uma coluna HPX-87H.



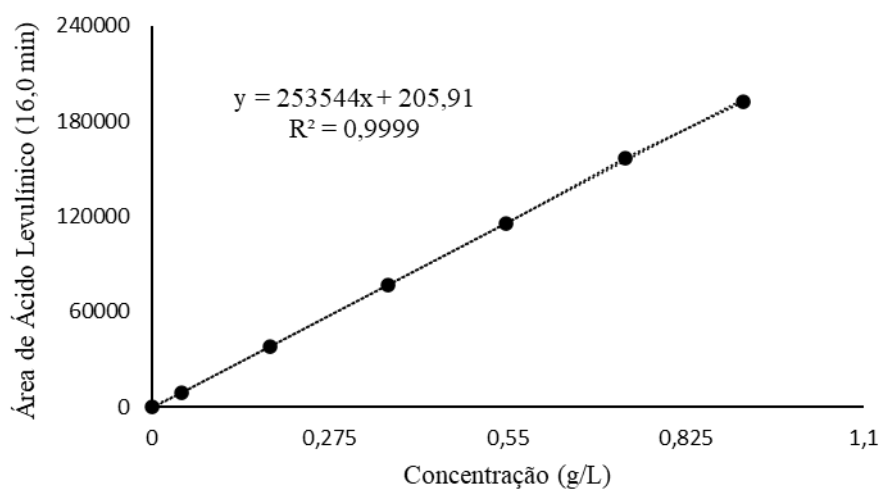
Fonte: Elaborado pela própria autora.

Figura 43. Curva analítica para determinação da concentração de ácido acético utilizando uma coluna HPX-87H.



Fonte: Elaborado pela própria autora.

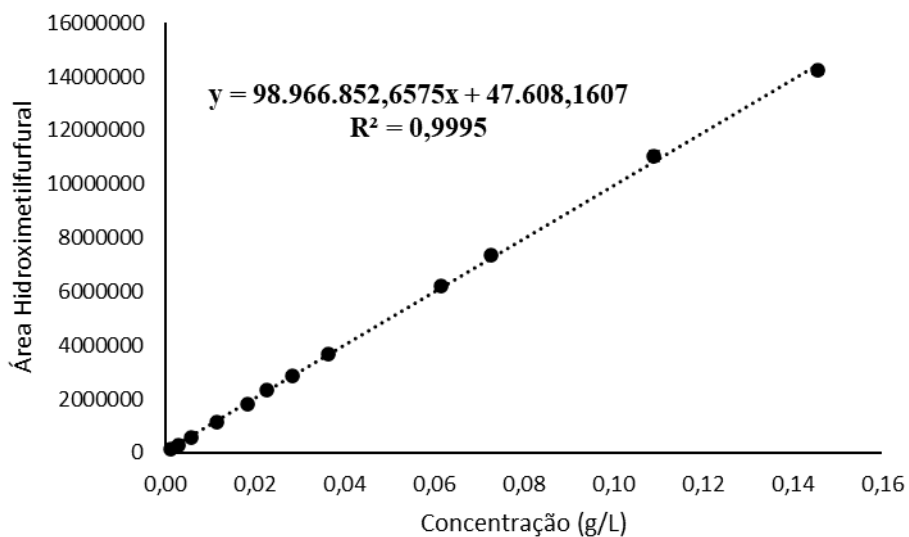
Figura 44. Curva analítica para determinação da concentração de ácido levulínico utilizando uma coluna HPX-87H.



Fonte: Elaborado pela própria autora.

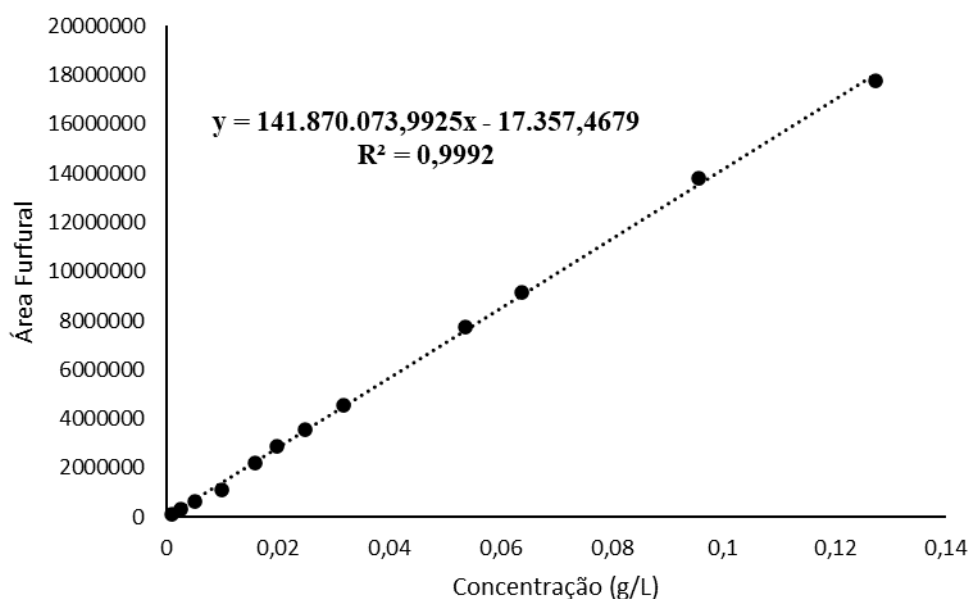
3. Curva analítica para quantificação de inibidores (coluna C18 usando SPD a 276nm)

Figura 45. Curva analítica para determinação da concentração de hidroximetilfurfural utilizando uma coluna C18



Fonte: Elaborado pela própria autora.

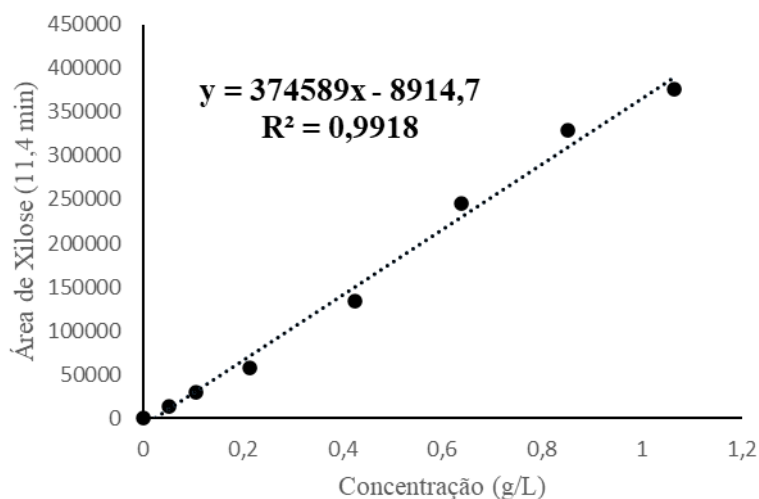
Figura 46. Curva analítica para determinação da concentração de furfural utilizando uma coluna C18



Fonte: Elaborado pela própria autora.

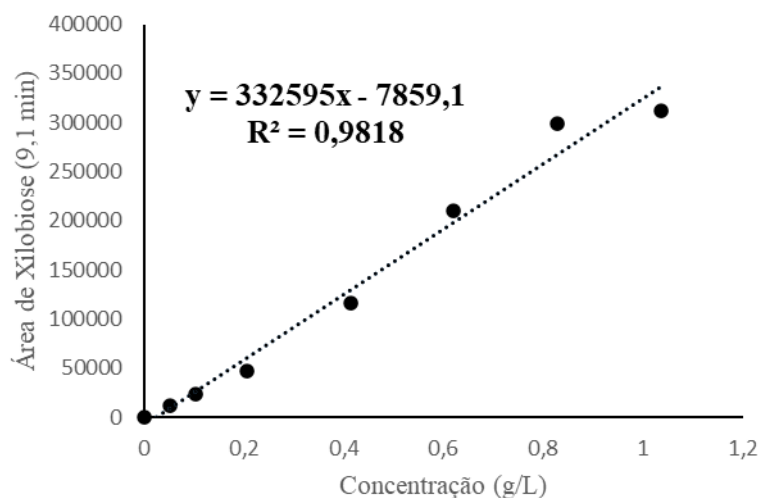
4. Curva analítica para quantificação de XOS (coluna HPX-87C)

Figura 47. Curva analítica para determinação da concentração de xilose utilizando uma coluna HPX-87C.



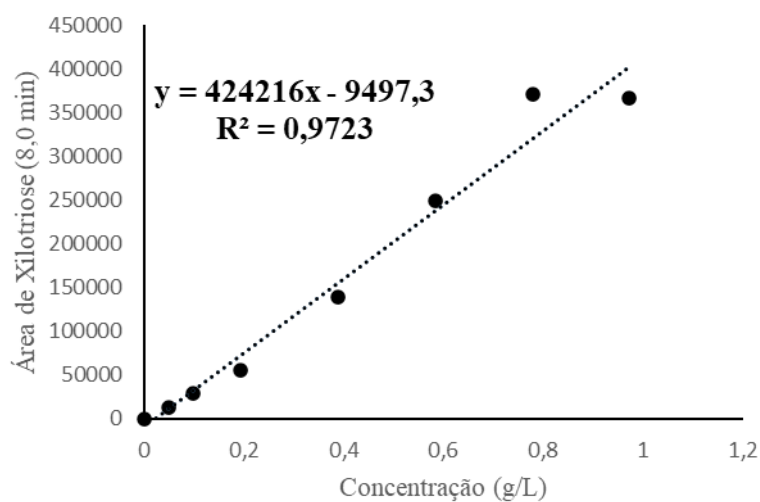
Fonte: Elaborado pela própria autora.

Figura 48. Curva analítica para determinação da concentração de xilobiose utilizando uma coluna HPX-87C.



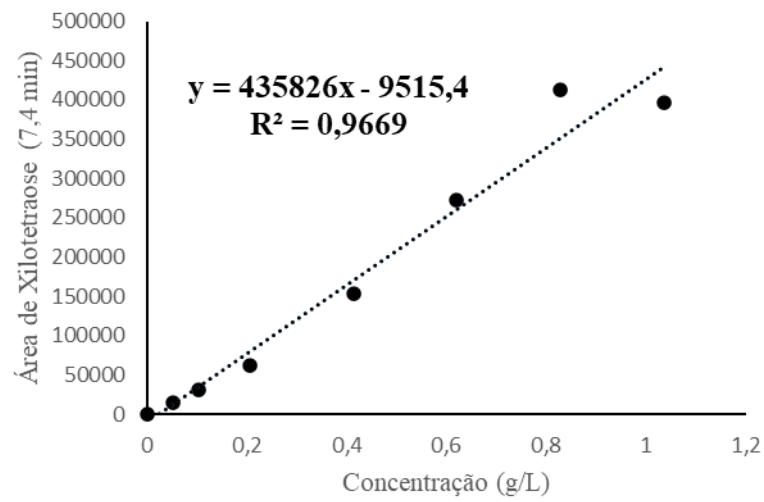
Fonte: Elaborado pela própria autora.

Figura 49. Curva analítica para determinação da concentração de xilotriose utilizando uma coluna HPX-87C.



Fonte: Elaborado pela própria autora.

Figura 50. Curva analítica para determinação da concentração de xilotetraose utilizando uma coluna HPX-87C.



Fonte: Elaborado pela própria autora.