UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

VERÔNICA TÁVILLA FERREIRA SILVA

**Utilização do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com sulfito alcalino para
obtenção de xilo-oligossacarídeos por via enzimática**

Lorena
2019

VERÔNICA TÁVILLA FERREIRA SILVA

**Utilização do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com sulfito alcalino para
obtenção de xilo-oligossacarídeos por via enzimática**

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Concentração de Conversão de Biomassa.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Adriane Maria Ferreira Milagres

Versão Original

Lorena
2019

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado
da Escola de Engenharia de Lorena,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Silva, Verônica Távilla Ferreira

Utilização do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com sulfito alcalino para obtenção de xilo oligossacarídeos por via enzimática / Verônica Távilla Ferreira Silva; orientadora Adriane Maria Ferreira Milagres - Versão Corrigida. - Lorena, 2019.
110 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências - Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Conversão de Biomassa) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2019

1. Xilanase. 2. Luminase. 3. Xilana. 4. Antioxidante. 5. Carvão ativado. I. Título. II. Milagres, Adriane Maria Ferreira , orient.

*Dedido este trabalho a minha família
Antonia de Maria, Valdecy Francisco,
Rafael Deleon e Valéria Cristina - amo-os
imensamente! E a meu amado Marcos
Felipe Schmidt.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família por acreditar no meu potencial e por todo suporte que me deram durante minha vida acadêmica e pessoal. Com amor, à minha mãe Antônia de Maria Campos Ferreira Silva, e aos meus irmãos Rafael Deleon e Valéria Cristina. E ao meu amado pai, Valdecy Francisco Silva, que me ensinou nos meus tenros anos de idade, que devemos ser bons de coração e caráter.

A minha orientadora, professora Dra. Adriane Maria Ferreira Milagres, pela excelente orientação na realização deste trabalho. Agradeço imensamente pela dedicação e compreensão durante estes dois anos de mestrado.

Ao meu namorado Marcos Felipe R. A. Schmidt, por ser essa pessoa maravilhosa e companheira que é, por sempre acreditar que eu era/sou capaz mesmo eu achando que não. Por sempre me incentivar a ir além, e por me amar e ser o amor da minha vida.

Gostaria de agradecer ternamente aos meus amigos Patricia, Josman, Bruno, Samara, Tainã, Pedro, Aline e todos os demais amigos que compartilharam esses dois anos.

Ao professor Dr. Ezequiel Marcelino e família pelo apoio e acolhimento aqui em Lorena - SP, pelo incentivo a realizar o mestrado e despertar interesse na carreira docente.

Agradeço também a todo o corpo docente do Departamento de Biotecnologia Industrial, por contribuir enormemente com minha formação acadêmica e profissional.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo fomento à pesquisa (Código de financiamento 001).

RESUMO

SILVA, V. T. F. Utilização do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com sulfito alcalino para obtenção de xilo-oligossacarídeos por via enzimática. 2019. 110 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2019.

A obtenção de xilo-oligossacarídeos (XOS) a partir da fração hemicelulósica do bagaço de cana-de-açúcar vem ganhando notoriedade nos últimos anos devido as propriedades funcionais, ação antioxidante e comprovado efeito prebiótico destes açúcares. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi obter XOS por reação enzimática da xilanase comercial (Luminase PB-200) com o bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com sulfito alcalino. Também foi objetivo deste estudo purificar, caracterizar estruturalmente e determinar as atividades antioxidantes dos XOS obtidos. Inicialmente, foi determinada a termoestabilidade da xilanase, que mostrou alta estabilidade térmica em 70 °C, mantendo mais de 80% de sua atividade no pH 6, durante 6 horas. Os ensaios de extração de xilana de bagaço pré-tratado (5% m/v) com 5U de xilanase/g foram avaliados nas temperaturas (50, 60 e 70 °C), pH (6 e 8) e tempos (3, 6 e 24 h). No teste realizado a 70 °C, pH 6 e 24 h, o rendimento de xilana foi de 28,8%. Nessas condições, foi avaliado o efeito do aumento da carga de sólidos de 5 a 15% (m/v) e da carga enzimática de 5 a 45 U/g. O aumento na carga de sólidos não melhorou a extração de xilana, observando-se uma redução de 27,5% no rendimento, empregando 5 U/g. Na maior carga enzimática (45 U/g), obteve-se 14,9% e 38,3% a mais de xilana em 5 e 15% (m/v) de sólidos, respectivamente. A adição de feruloil esterase (FEA) ou arabinofuranosidase (Araf) com a xilanase, aumentou o rendimento da extração de xilana, enquanto a adição conjunta das três enzimas aumentou a extração de xilana, mas em menor grau do que se adicionadas separadamente. Foi realizada a extração em escala preparativa de xilana do bagaço pré-tratado, com 5U/g e 5% de sólidos, e o hidrolisado enzimático obtido foi utilizado para separar as frações de xilana por diferentes métodos. As xilanas extraídas foram precipitadas com etanol (30, 60 e 90% v/v), gerando frações com massas molares (Mm) superiores a 1800 g/mol. Utilizando a filtração em gel, foi possível separar três frações com massas molares médias de 1727, 834, 511 g/mol. A separação de XOS também foi realizada por adsorção em carvão ativado seguida pela eluição com gradiente de etanol (10 a 70% v/v). As frações eluídas continham proporções diferentes de XOS entre dois e seis monômeros, sendo observado XOS de maior massas molares em concentração maior de etanol. Testes foram realizados para avaliação da atividade antioxidante dos XOS pelos métodos de captura de radicais livres ABTS^{•+}, DPPH[•] e Fosfo-molibdênio. As frações com maior conteúdo fenólico e grau de polimerização apresentaram maior atividade antioxidante, para todos os métodos.

Palavras Chave: Xilanase. Luminase. Xilana. Antioxidante. Carvão Ativado.

ABSTRACT

SILVA, V. T. F. Utilization of alkaline pretreated sugarcane bagasse for xylo-oligosaccharides production assisted by enzymes. 2019. 110 p. Dissertation (Master of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2019.

The production of xylo-oligosaccharides (XOS) from hemicellulosic fraction of sugarcane bagasse has gained notoriety in recent years due to the functional properties, antioxidant action and prebiotic effect of these sugars. In this context, the objective of this study was to obtain XOS by enzymatic reaction of commercial xylanase (Luminase PB-200) with alkaline sulfite pretreated sugarcane bagasse. It was also objective of this study to purify, characterize structurally and determine the antioxidant activities of the obtained XOS. Initially, the xylanase thermostability was evaluated, showing high stability at 70 °C, retaining more than 80% of overall enzyme activity at pH 6 for 6 hours. The xylan extraction assays of pretreated bagasse (5% w/v) with 5U xylanase/g were evaluated by varying temperature (50, 60 and 70 ° C), pH (6 and 8) and time (3, 6 and 24 h). In the test conducted at 70 ° C, pH 6 and 24 h, the xylan yield was 28.8%. Under these conditions, the effect of increasing solids loading from 5 to 15% (m/v) and enzyme loading from 5 to 45 U/g was evaluated. The increase in solids loading did not improve the xylan extraction, resulting in 27.5% decrease in the yield, when employing 5 U/g. At 45 U/g enzyme loading, 14.9% and 38.3% more xylan were extracted with 5 and 15% (w/v) solids, respectively. The addition of feruloyl esterase (FEA) or arabinofuranosidase (Araf) with xylanase increased the xylan extraction yield. When mixtures of Araf and FEA were used with the xylanase, the xylan extraction yield increased but to a lesser extent than if combined individually. Scaled-up extraction of xylan of pretreated sugarcane bagasse, with 5U/g and 5% solids was carried out, and the enzymatic hydrolysate obtained was used to separate the xylan fractions by different methods. The extracted xylans were precipitated with ethanol (30, 60 and 90% v/v), generating fractions with average weight molar mass (Mw) higher than 1800 g/mol. Using gel filtration, it was possible to separate fragments from supernatant into three fractions with Mw of 1727, 834, 511 g/mol. XOS separation was also performed by activated charcoal adsorption followed by ethanol gradient elution (10 to 70% v/v). These fractions contained different proportions of XOS, from two to six monomers, where the XOS with higher molecular weight was observed at higher ethanol concentration. Tests were carried out for antioxidant evaluation of XOS by ABTS^{•+}, DPPH[•] and Phospho-molybdenum free radical capture methods. The fractions with higher phenolic contents and degree of polymerization presented the highest antioxidant activity for all methods.

Key words: Xylanase. Luminase. Xylan. Antioxidant. Activated Charcoal.

ABREVIATURAS

2G	Etanol de segunda geração
ABTS	2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)
Ac	Absorbância do controle da reação
ANOVA	Análise de Variância
Araf	α -L-arabinofuranosidase
Ax	Absorbância da reação de XOS com o radical
AX	Arabinoxilana
AXH	α -Arabinofuranosidase
BSA	Albumina de soro bovina
CAT	Capacidade antioxidante total
CA-XOS	Carvão ativado contendo os XOS adsorvidos
CAZy	Enzimas ativas em carboidratos
DNS	Ácido 3,5-dinitrossalicílico
GP	Grau de polimerização
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
EAG	Equivalente de Ácido Gálico
Eq	Equivalente
etOH	Etanol
F10	Xilana eluída com etanol a 10% (v/v)
F20	Xilana eluída com etanol a 20% (v/v)
F30	Xilana eluída com etanol a 30% (v/v)
F40	Xilana eluída com etanol a 40% (v/v)
F50	Xilana eluída com etanol a 50% (v/v)
F60	Xilana eluída com etanol a 60% (v/v)
F70	Fração eluída do carvão ativado com etanol a 70% (v/v)
FEA	Feruloil esterase
G	Guaiacila
GAX	Glucuronoarabinoxilana
GH	Glicosil hidrolase
H	<i>p</i> -hidroxifenila
LCC	Complexo lignina-carboidrato
Lum	Luminase PB-200

Mm	Massa molar ponderal média
Mn	Massa molar numérica média
D	Índice de dispersividade
S	Siringila
SB90	Sobrenadante da precipitação com 90% (v/v) de etanol
SAL	Bagaço Pré-tratado com sulfito alcalino e lavado
SANL	Bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com sulfito alcalino não lavado
TLC	Cromatografia em camada fina
Trolox	2-carboxílico-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano
UI	Unidade Internacional de atividade enzimática
X1	Xilose
X2	Xilobiose
X3	Xilotriose
X4	Xilotetraose
X5	Xilopentaose
XOS	Xilo-oligossacarídeos

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação do arranjo dos principais constituintes da biomassa lignocelulósica em celulose, hemicelulose e lignina.	22
Figura 2 – Estrutura da celulose vegetal em microfibrilas.	23
Figura 3 – Cadeia de xilana acetilada contendo resíduo de ácido metilglucurônico (acetilglucuronoxilana) e cadeia de xilana ramificada com ácido metilglucurônico e arabinose esterificada a um ácido ferúlico (arabinoglucuronoxilana).	24
Figura 4 – Moléculas presentes na fração hemicelulósica dos vegetais.	25
Figura 5 – Composição da lignina: unidades precursoras.	26
Figura 6 – Tipos de ligações presentes na macromolécula de lignina.	27
Figura 7 – Remoção de carboidratos pela reação de <i>Peeling</i> no terminal redutor de uma glucomanana na presença de álcali.	30
Figura 8 – Representação dos sítios de ação das enzimas que hidrolisam a hemicelulose.	34
Figura 9 – Modo de ação das enzimas das famílias GH10 e GH11 na hidrólise de glucuronoxilana.	35
Figura 10 – Fluxograma do processo de separação de XOS por adsorção em carvão ativado.	49
Figura 11 – Termoestabilidade da Luminase PB-200 em tampão fosfato de sódio, 50 mM, pH 6 e 8, por 24 h a 50, 60, 70 e 80 °C	57
Figura 12 – Extração de xilana do bagaço pré-tratado com sulfito alcalino com 5 U/g de Luminase PB-200 em 5% de sólidos, empregando diferentes temperaturas e pHs.	58
Figura 13 – Xilanas extraídas do bagaço pre-tratado com sulfito alcalino, na ausência de enzima e após 24 h de reação.	60
Figura 14 – TLC dos produtos de reação da Luminase PB-200 (5 U/g) com 5% (m/v) de bagaço pré-tratado com sulfito alcalino em diferentes temperaturas e pH.	62
Figura 15 – Gráfico de Pareto para a estimativa dos efeitos das variáveis carga de sólidos (A) e carga de enzimas(B) sobre o rendimento de extração de xilana do bagaço pré-tratado com sulfito alcalino.	66
Figura 16 – TLC dos produtos da reação da Luminase PB-200 realizadas nas condições do planejamento fatorial 2 ²	67
Figura 17 – Cromatograma do efeito combinado das enzimas acessórias na extração de xilana do bagaço pré-tratado com sulfito alcalino.	71
Figura 18 – Extração enzimática da xilana do bagaço pre-tratado, em escala preparativa.	72
Figura 19 – Perfil de separação das xilanas do hidrolisado enzimático obtido a partir do bagaço pré-tratado SANL.	74

Figura 20 – Perfil das xilanas presentes em cada fração obtida após a precipitação com gradiente de etanol em coluna de exclusão por tamanho (Biogel P2).	76
Figura 21 – Cromatograma em camada fina das frações precipitadas com etanol.	78
Figura 22 – Cinética de adsorção dos açúcares do hidrolisado enzimático em carvão ativado.	80
Figura 23 – Lavagem sequencial do carvão ativado com diferentes concentrações de etanol para eluição dos XOS adsorvidos.	81
Figura 24 – Detecção dos XOS das amostras eluídas do carvão ativado, empregando diferentes concentrações de etanol, por sistema acoplado de colunas em HPLC.	83
Figura 25 – Perfil de xilo-oligossacarídeos por fração eluída do carvão ativado empregando diferentes concentrações de etanol.	84
Figura 26 – Perfil das eluições dos XOS com etanol.	84
Figura 27 – Cromatografia em camada fina das frações de XOS eluídas com diferentes concentrações de etanol do carvão ativado.	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Planejamento fatorial 2^2 completo com triplicata no ponto central – Avaliação da influência da carga de sólidos e carga enzimática sobre a extração de xilana do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com sulfito alcalino (variável resposta).	45
Tabela 2 – Avaliação das enzimas acessórias na extração de xilana do bagaço pré-tratado.	46
Tabela 3 – Extração de xilana do do bagaço pré-tratado com sulfito alcalino em duas etapas sequenciais, enzimática e alcalina.	61
Tabela 4 – Relação Arabinose:Xilose (A:X) da fração de xilana extraída do bagaço pré-tratado com sulfito alcalino (5%), empregando 5 U de Luminase PB-200.	63
Tabela 5 – Extração de xilana do bagaço pré-tratado com sulfito alcalino (SAL) com Luminase PB-200 (pH 6, 70°C, 24h)	64
Tabela 6 – Efeito combinado entre a endo-xilanase Luminase PB-200 e enzimas acessórias na extração de xilana do bagaço pré-tratado.	69
Tabela 7 – Massas molares correspondentes aos picos de eluição dos xilo-oligossacarídeos em coluna de exclusão por tamanho (Biogel P2).	74
Tabela 8 – Caracterização das xilanas precipitadas com gradiente de etanol quanto a massa molar ponderal média (Mm), massa molar numérica média (Mn) e índice de dispersividade (D).	77
Tabela 9 – Presença de fenólicos e atividade antioxidante dos XOS obtidos por hidrólise enzimática do bagaço de cana de açúcar pré-tratado com sulfito alcalino e separados por diferentes metodologias.	89

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.1 Bagaço de cana-de-açúcar.....	21
2.2 Componentes da biomassa lignocelulósica	22
2.2.1 Celulose.....	22
2.2.2 Hemicelulose	23
2.2.3 Lignina.....	25
2.3 Pré-tratamento da biomassa lignocelulósica	28
2.3.1 Recalcitrância da biomassa	28
2.3.2 Pré-tratamento alcalino	29
2.4 Extração da Hemicelulose do material Lignocelulósico.....	31
2.4.1 Extração das xilanas assistida por enzimas	33
2.5 Aplicações da Hemicelulose	38
2.6 Atividade antioxidante dos xilo-oligossacarídeos e xilanas.....	39
3 OBJETIVOS.....	41
3.1 Objetivo geral.....	41
3.2 Objetivos específicos.....	41
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
4.1 Substratos	42
4.2 Enzimas.....	42
4.2.1 Determinação de atividade de xilanase	43
4.2.2 Ensaio de termoestabilidade.....	43
4.3 Avaliação das condições enzimáticas para extração de xilanas do bagaço pré-tratado com sulfito alcalino (SAL)	44
4.3.1 Avaliação do pH e temperatura	44
4.3.2 Influência da carga enzimática e carga de sólidos.....	44

4.3.3 Efeito de enzimas acessórias sobre o rendimento de extração de xilana do bagaço pré-tratado.....	45
4.4 Extração de xilana em escala preparativa do bagaço SANL	46
4.5 Métodos empregados na separação de xilanas e XOS.....	46
4.5.1 Separação por precipitação fracionada com etanol	46
4.5.2 Separação por adsorção em carvão ativado.....	47
4.5.2.1 Preparo do carvão ativado	47
4.5.2.2 Preparo do adsorbato (hidrolisado).....	47
4.6 Caracterização das xilanas e xilo-oligossacarídeos	49
4.6.1 Determinação de rendimento de extração de açúcares	49
4.6.1.1 Cálculo de rendimento de xilana	50
4.6.2 Determinação da massa molar das xilanas.....	50
4.6.3 Análise dos xilo-oligossacarídeos por HPLC.....	51
4.6.4 Análise dos xilo-oligossacarídeos por cromatografia em camada fina (TLC)	52
4.6.5 Análise de fenólicos totais	52
4.7 Avaliação da atividade antioxidante dos xilo-oligossacarídeos	53
4.7.1 Método de captura de radicais livres do DPPH•	53
4.7.2 Método de captura de radicais livres ABTS• ⁺	54
4.7.3 Capacidade Antioxidante Total (CAT).....	55
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
5.1 Extração enzimática da xilana.....	56
5.1.1 Influência da temperatura e pH	56
5.1.2 Efeito da concentração de sólidos e carga de enzima na extração de xilana.....	63
5.2 Emprego de enzimas acessórias na extração de xilana do bagaço SAL.....	67
5.3 Avaliação no aumento de escala da extração enzimática de xilana do bagaço pré-tratado com sulfito alcalino	72
5.4 Avaliação de métodos de separação de xilanas	74
5.4.1 Fracionamento de xilanas por precipitação com etanol.....	74

5.4.2 Purificação dos xilo-oligossacarídeos.....	78
5.4.2.1 Cinética de adsorção do XOS em carvão ativado	79
5.5 Atividade antioxidante dos xilo-oligossacarídeos	86
6. CONCLUSÕES	91
REFERÊNCIAS.....	92
APÊNDICE.....	107

1 INTRODUÇÃO

Os materiais lignocelulósicos, principalmente os resíduos agroindustriais, representam uma biomassa sustentável e de baixo custo para a sua transformação em produtos de alto valor econômico, dentro das biorrefinarias (BONASSA et al., 2017; AREVALO-GALLEGOS et al., 2017). No entanto, a recalcitrância natural da biomassa lignocelulósica limita seu uso extensivo, exigindo o emprego de pré-tratamentos para a separação dos seus principais constituintes; celulose, hemicelulose e lignina. Considerado uma das etapas cruciais para o uso dos materiais lignocelulósicos, o pré-tratamento, além de separar as frações da biomassa, tem por finalidade diminuir a recalcitrância e aumentar a acessibilidade das enzimas aos carboidratos (ANWAR; GULFRAZ; IRSHAD, 2014; AREVALO-GALLEGOS et al., 2017; RODRIGUES et al., 2017).

Dentre os resíduos lignocelulósicos, o bagaço da cana-de-açúcar é extensivamente reportado na literatura para a produção de etanol de segunda geração (2G). Porém, estudos relacionados ao uso da fração hemicelulósica do bagaço têm ganhado destaque na área farmacêutica, alimentícia e química, com a produção de xilo-oligossacarídeos (XOS) para uso como prebióticos e antioxidantes, para a produção de xilitol, hidrogéis e na produção de furfural (SILVA et al., 2011; YOON et al., 2012; PENG; SHE, 2014; SAINI J.; SAINI R.; TEWARI, 2015; ÁVILA; FORTE; GOLDBECK, 2018).

Vários métodos foram desenvolvidos para a extração de xilanas e, mais recentemente tem-se experimentado a extração assistida por enzimas, pelo fato de se obter xilanas mais puras, se comparadas às extraídas por via química. Entre os métodos químicos empregados para a extração de xilanas, destacam-se os métodos alcalinos, que conseguem extrair uma grande quantidade de xilana na forma polimérica a partir da fração hemicelulósica, no entanto, durante o tratamento parte da lignina é solubilizada, diminuindo assim o grau de pureza das xilanas obtidas (SPORCK et al., 2017). Outros métodos como a autohidrólise são empregados para obtenção de xilanas de cadeias mais curtas (XOS) (FREITAS; CARMONA; BRIENZO, 2019). Já o método de extração enzimática de xilana é capaz de obter xilanas com maior grau de pureza, devido ao modo de ação mais específico das enzimas e ausência de reações secundárias (SPORCK et al., 2017; BRIENZO et al., 2016).

O emprego de xilanases, com diferentes modos de ação sobre a fração hemicelulósica resulta na liberação de xilo-oligossacarídeos (XOS) com grau de substituição e de polimerização variados, conferindo características únicas ao produto gerado (BIELY; SINGH; PUCHART, 2016). O crescente interesse na obtenção de xilo-oligossacarídeos se

deve em maior parte às suas propriedades funcionais, possuindo vasta aplicabilidade no setor alimentício, saúde humana, alimentação animal, dentre outras áreas (WANG et al., 2018b). Além de comprovado efeito prebiótico, os XOS também apresentam atividade antioxidante, propriedade esta de grande interesse na área de cosméticos e alimentícia (AACHARY, PRAPULLA, 2011; BIAN et al., 2013; MATHEW; KARLSSON; ADLERCREUTZ, 2017).

Visando um melhor aproveitamento das xilanas do bagaço de cana-de-açúcar, neste trabalho foram abordadas estratégias para a sua extração a partir do bagaço pré-tratado com sulfito alcalino, empregando uma xilanase comercial (Luminase PB-200). Os xilooligossacarídes obtidos foram fracionados por tamanho e o potencial antioxidante destes foi determinado por diferentes métodos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Bagaço de cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma gramínea extensivamente cultivada ao redor do mundo, sendo utilizada no setor sucro-energético na produção de açúcar, etanol e eletricidade. Entre os países com maior área de cana plantada destaca-se o Brasil como maior produtor, contribuindo com 42% da produção mundial. Esse resultado se deve em parte às condições favoráveis de clima e solo, além da disponibilidade de grandes áreas para cultivo (GONGORA; VILLAFRANCO, 2018).

Estima-se que a cada tonelada de cana processada sejam gerados 140 kg de bagaço em base seca (SOUSA; MACEDO, 2010; PIPPO et al., 2011). Levando em conta a produção estimada de 635,51 milhões de toneladas de cana para a safra 2018/2019 no Brasil, foram gerados aproximadamente 90 milhões de toneladas de bagaço (CONAB, 2018).

Na indústria sucroalcooleira, o bagaço é usualmente destinado à cogeração de energia elétrica para o abastecimento da usina e aquecimento das caldeiras, pela sua queima (DIAS et al., 2015; BRIENZO; SIQUEIRA; MILAGRES, 2009). Embora a queima do bagaço seja uma destinação economicamente atraente para as usinas em termos de economia energética, esta destinação subestima o potencial do bagaço como uma matéria-prima renovável. Empregando o conceito de biorrefinaria, em que se propõe o aproveitamento integral da biomassa, o bagaço seria uma fonte promissora na produção de produtos com aplicações diversas.

O bagaço de cana é um material lignocelulósico composto majoritariamente por celulose (40- 45%), hemicelulose (25-29%) e lignina (19-24%), frações estas intimamente associadas, formando uma rede complexa e resistente (Figura 1) (SILVA et al., 2011; ROCHA et al., 2015).

Figura 1 – Representação do arranjo dos principais constituintes da biomassa lignocelulósica em celulose, hemicelulose e lignina.

Fonte: Adaptado de Wang et al. (2017).

2.2 Componentes da biomassa lignocelulósica

2.2.1 Celulose

A celulose é o polissacarídeo de maior concentração na biomassa lignocelulósica, sendo a base para a estruturação das células vegetais. Este homopolissacarídeo é formado por unidades repetidas de celobiose, unidas por ligação glicosídica do tipo β -(1 $\rightarrow$ 4) entre as hidroxilas dos carbonos C1 e C4. A ligação glicosídica β -(1 $\rightarrow$ 4) entre as unidades da celobiose confere a esse polímero uma estrutura plana e linear, sendo que estas unidades podem estar associadas em cadeias longas, conferindo um alto grau de polimerização a celulose. O grau de polimerização (GP) da celulose, pode variar entre as espécies vegetais, estando na faixa de 7.000 a 15.000 (FENGEL; WEGENER, 1989; HON, 1996).

A celulose vegetal é constituída por regiões ordenadas (cristalinas), apesar de haver regiões menos ordenadas (amorfas) nas microfibrilas (Figura 2), que por sua vez formam feixes de fibrilas. A união compacta das fibrilas forma as longas fibras de celulose (BROWNING, 1902; HON; SHIRAISHI, 2010; FENGEL; WEGENER, 1989; HON, 1996).

Figura 2 – Estrutura da celulose vegetal em microfibrilas.

Fonte: Adaptado de Seidl; Goulart (2016).

A estrutura linear e compacta da celulose se deve às interações de hidrogênio intra e intermoleculares existentes entre as cadeias de anidroglicose, tornando este material rígido, insolúvel e resistente a solventes orgânicos (SAINI J.; SAINI R.; TEWARI, 2015; ANWAR; GULFRAZ; IRSHAD, 2014).

2.2.2 Hemicelulose

A hemicelulose é o segundo polissacarídeo mais abundante nos vegetais, constituindo de 15 a 35% da biomassa lignocelulósica, ramificado e com grau de polimerização de 80-200 (GÍRIO et al., 2010). Esse polímero de natureza amorfa encontra-se associado à celulose por ligações de hidrogênio e à lignina por ligações covalentes (GÍRIO et al., 2010; PENG et al., 2012). As hemiceluloses podem ser formadas de unidades de D-xilopirranose, ou por dois ou mais tipos de carboidratos (glucomananos, xiloglucanas). As unidades formadoras da cadeia principal da hemicelulose são unidas entre si por ligações do tipo $\beta(1\rightarrow4)$. A xilana é a hemicelulose mais comumente encontrada na biomassa

lignocelulósica, estando presente principalmente em gramíneas e folhosas (FENGEL; WEGENER, 1989; BROEKER et al., 2018). Além da espécie vegetal, o tipo e a concentração de hemicelulose pode variar a depender do tecido de origem e da fase de crescimento da planta. Por exemplo, em Pinus, os tecidos mais velhos contêm mais glucomanana e menos xilana que os tecidos mais novos da planta (EK; GELLERSTEDT; HENRIKSSON, 2009).

As xilanas diferem entre as espécies vegetais não só pela composição da cadeia principal, mas também pela presença de grupos pendentes variados (Figura 3). As estruturas destes grupos substituintes estão representadas na Figura 4. As xilanas predominantes no bagaço de cana podem conter resíduos α -L-arabinofuranosil ligados na posição 2-O e ou 3-O da xilose e outros grupos como ácido urônico 4-O-metilglucopiranosil nas posições 2-O, podendo ainda conter grupo acetil. A presença destes grupos pendentes também define a solubilidade e a capacidade de interação da xilana com a celulose e demais componentes da parede celular vegetal. Xilanas mais substituídas tendem a ser mais solúveis em água, uma vez que a presença de grupos laterais diminui as interações entre os polissacarídeos e aumentam as interações cadeia-solvente. A diminuição destas interações cadeia-cadeia leva a uma menor afinidade de ligação da xilana com a celulose (BIELY; SINGH; PUCHART, 2016; HON, 1996; HON; SHIRAISHI, 2010; SAHA, 2003; SAULNIER et al., 2007).

Figura 3 – Cadeia de xilana acetilada contendo resíduo de ácido metilglucurônico (acetilglucuronoxilana) e cadeia de xilana ramificada com ácido metilglucurônico e arabinose esterificada a um ácido ferúlico (arabinoglucuronoxilana).

Fonte: Adaptado de Biely; Singh; Puchart (2016).

Figura 4 – Moléculas presentes na fração hemicelulósica dos vegetais.

Fonte: Wang et al. (2017).

2.2.3 Lignina

A lignina é uma macromolécula aromática e heterogênea que confere resistência física ao material lignocelulósico, funcionando ainda como agente de adesão entre a celulose e a hemicelulose. Esta macromolécula é formada a partir de três constituintes principais; álcool *p*-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico, que são precursores das unidades *p*-hidroxifenila (H), guaiacila (G), siringila (S), respectivamente (Figura 5). A biossíntese da lignina ocorre através do mecanismo de polimerização desidrogenativa das unidades base (H, G, S) (HON, 1996; FENGEL; WEGENER, 1989; HON; SHIRAISHI, 2010). Os tipos de ligninas são classificadas de acordo com a frequência de unidades formadoras na estrutura da lignina. Em plantas gminospermas há predominância da lignina G, composta majoritariamente por álcool coniferílico, pequena porção de álcool *p*-cumarílico e pode conter quantidades traços de álcool sinapílico. Nas angiospermas, a lignina G-S é o tipo mais comum, contendo quantidades equivalente de G e S, algumas espécies apresentam quantidades pequenas de álcool *p*-cumárico. Em gramíneas, a lignina é do tipo H-G-S, contendo em maior concentração o álcool *p*-cumárico (EK; GELLERSTEDT; HENRIKSSON, 2009).

Figura 5 – Composição da lignina: unidades precursoras.

Fonte: Budziak; Maia; Mangrich (2004).

A complexidade da lignina se deve em grande parte aos diversos tipos de ligações existentes entre suas unidades formadoras. Na lignina estão presentes ligações do tipo: β -O-4, α -O-4, β - β , β -1, β -5, 4-5, 5-5 (Figura 6), com predominância das ligações do tipo β -O-4 (HON, 1996). A composição química da lignina pode variar de planta para planta, sendo sua concentração distribuída de forma não uniforme entre os tecidos vegetais (FENGEL; WEGENER, 1989; WATKINS et al., 2015; ANWAR; GULFRAZ; IRSHAD, 2014; CHANDRA et al., 2007).

Figura 6 – Tipos de ligações presentes na macromolécula de lignina.

Fonte: Wang et al. (2017).

Além de recobrir e unir a celulose e hemicelulose, é sabido que a lignina também forma ligações com a hemicelulose (LCCs) por meio dos ácidos hidroxicinâmicos, ferúlico e *p*-cumárico. Ferulatos formam ésteres com hemiceluloses e éter com a lignina. O *p*-cumárico forma predominantemente ligação éter com a lignina (REINOSO et al. 2018). A existência de ligações éster e éter entre lignina e carboidratos dificulta a separação total dos componentes da biomassa (OLIVEIRA et al., 2015). A presença de lignina no material lignocelulósico é uma barreira limitante à acessibilidade das enzimas aos polissacarídeos na matriz lignocelulósica, não só por sua natureza recalcitrante, mas também pela hidrofobicidade e pelo fenômeno de adsorção improdutivo das enzimas à lignina (CHANDRA et al., 2007; ALVIRA et al., 2010; LI; ZHENG, 2018).

2.3 Pré-tratamento da biomassa lignocelulósica

2.3.1 Recalcitrância da biomassa

A biomassa lignocelulósica possui uma estrutura complexa e recalcitrante que limita seu uso como matéria-prima em larga escala. Esta recalcitrância é um mecanismo de defesa natural das plantas, devendo-se em maior parte à presença de lignina, que impermeabiliza as células vegetais criando uma barreira contra o ataque microbiano e suas enzimas. Além da composição química do material diminuir a sua digestibilidade, a estrutura física também contribui para esta recalcitrância, como a alta cristalinidade da celulose que impede o acesso das enzimas por tornar a biomassa lignocelulósica rígida e muito compacta. A intrínseca associação física e química dos constituintes majoritários da biomassa lignocelulósica é um dos principais fatores que dificultam a separação parcial ou completa destes (JAIN; KURMI; AGRAWAL, 2018; NOSRATPOUR; KARAMI; SADEGHI, 2018).

Frente a isso, para o uso de resíduos lignocelulósicos como o bagaço de cana-de-açúcar, faz-se necessário a aplicação de pré-tratamentos sobre esses materiais no intuito de aumentar a acessibilidade e digestibilidade de seus polissacarídeos (SINGH; SUHAG; DHAKA, 2015; JÖNSSON; MARTÍN, 2016; NOSRATPOUR; KARAMI; SADEGHI, 2018). A seletividade dos pré-tratamentos na remoção e separação das frações que compõem a biomassa depende dos agentes químicos empregados e das condições do processo (WU et al., 2011).

Os pré-tratamentos utilizados para a separação das frações que compõe a biomassa vegetal são divididos em físicos (mecânicos), biológicos e químicos. Em muitos casos, o emprego combinado de pré-tratamentos é indicado na tentativa de maximizar os rendimentos, reduzir perdas de polissacarídeos e diminuir a produção de inibidores durante o processamento da biomassa. O pré-tratamento a ser adotado depende primordialmente da fração de interesse a ser extraída da biomassa e do custo do processo (MOSIER et al., 2005; CHANDRA et al., 2007; ALVIRA et al., 2010; JÖNSSON; MARTÍN, 2016; SUN et al., 2016).

Os pré-tratamentos físicos tem por finalidade reduzir o tamanho da biomassa lignocelulósica em pequenas partículas, aumentando assim a área superficial do material. A maior área superficial do material melhora o processo de sacarificação da fração polissacarídica pelas enzimas. Pré-tratamentos mecânicos como moagem, trituração ou refinamento, dependendo da intensidade do tratamento, podem diminuir a cristalinidade da

celulose, melhorando a sacarificação enzimática (CHANDRA et al., 2007; HIDENO et al., 2009; ZAKARIA; HIRATA; HASSAN, 2014). Uma das vantagens deste processo é não depender das características físicas ou químicas do material a ser tratado. Em contrapartida, este método requer grande consumo energético, e não remove lignina do material (CHANDRA et al., 2007).

O método biológico de pré-tratamento é realizado empregando-se microrganismos que secretam enzimas capazes de degradar ou modificar a lignina presente no material lignocelulósico, como os fungos de degradação branca e de degradação parda, respectivamente. Os fungos de degradação branca são empregados na remoção de lignina do material, uma vez são capazes de secretar enzimas como lacase, manganês-peroxidase e versátil peroxidase (CHANDRA et al., 2007; SINDHU; BINOD; PANDEY, 2016). Apesar de o método empregar condições amenas e não gerar inibidores, o método demanda muito tempo de processo, não sendo recomendado para processos em escala industrial (SINDHU; BINOD; PANDEY, 2016).

Dentre os pré-tratamentos empregados para redução da recalcitrância da biomassa lignocelulósica, o método químico é mais utilizado. Geralmente são aplicados pré-tratamentos ácidos ou alcalinos para solubilizar um ou mais componentes da biomassa. Os tratamentos alcalinos usualmente são utilizados em processos que visam a remoção da lignina. Já o uso de ácidos diluídos, com ácido sulfúrico diluído, promovem a hidrólise da hemicelulose em oligômeros e monômeros (CHANDRA et al., 2009; HIMMEL et al., 2007).

2.3.2 Pré-tratamento alcalino

O pré-tratamento alcalino é um dos métodos químicos mais utilizados para aumentar a digestibilidade do material lignocelulósico, devido as condições do processo, como uso de reagentes não-corrosivos, temperaturas amenas e custo relativamente acessível do pré-tratamento (a depender do álcali utilizado) e menor solubilização dos polissacarídeos se comparado a outros métodos. O emprego de álcalis no tratamento da biomassa promove modificações estruturais, por meio do inchamento das fibras, aumento do tamanho dos poros e remoção de grande parte da lignina e grupos acetilas presentes (LIU et al., 2016a; KIM J. S.; LEE; KIM T. H., 2016). Desta forma, o pré-tratamento alcalino melhora a conversão enzimática dos carboidratos por tornar esse material mais acessível à catálise por enzimas.

Quando um material lignocelulósico é colocado em contato com soluções alcalinas, as hidroxilas dos polissacarídeos são solvatadas pelos ions OH^- , causando o inchamento dos

polissacarídeos, o qual permite o afastamento de suas cadeias. Em condições mais severas, acima de 100 °C pode ocorrer a dissolução dos polissacarídeos (FENGEL; WEGENER, 1989), como representado na Figura 7. Um subsequente aumento do grau de cristalinidade da celulose pode ocorrer devido a remoção das regiões amorfas (KIM J. S.; LEE; KIM T. H., 2015). Nos tratamentos alcalinos, a remoção da lignina ocorre principalmente pela quebra das ligações aril-éter. As ligações α -aril éter de unidades fenólicas da lignina são facilmente quebradas. As ligações C-C entre as unidades de lignina são bastante estáveis dentro da estrutura da molécula de lignina. As ligações β -aril-éter de unidades fenólicas não são clivadas apenas com álcali. Para que isso ocorra é necessária a presença de um nucleófilo mais forte que os íons OH^- (FENGEL; WEGENER, 1989).

Os métodos alcalinos apesar de promoverem grande remoção de lignina e baixa solubilização dos polissacarídeos, assim como outros pré-tratamentos, também apresentam desvantagens. Devido o método ser geralmente realizado em altas temperaturas (acima de 100°C), há o aumento com custo do processo com consumo de energia. Outra desvantagem importante no processo, é a conversão de alcalis em sais de difícil recuperabilidade, ou ainda a incorporação destes sais na biomassa lignocelulósica durante o pré-tratamento (CARVALHO et al., 2016; SINGH et al., 2015).

Figura 7 – Remoção de carboidratos pela reação de *Peeling* no terminal redutor de uma glucomanana na presença de álcali.

Reação de Peeling

Fonte: Adaptado de Wang et al. (2017)

Entre os tratamentos alcalinos, o pré-tratamento sulfito alcalino pode ser empregado quando se objetiva grande remoção da lignina do material lignocelulósico. Em seu trabalho sobre a hidrólise enzimática do bagaço de cana, Mendes et al. (2011) compararam a remoção de lignina pelo pré-tratamento alcalino (NaOH , 5% m/m) e sulfito alcalino (5% m/m de

NaOH e 10% m/m de Na_2SO_3), após 2 horas de cozimento a 120 °C. Os autores obtiveram melhor eficiência na remoção de lignina do bagaço para o pré-tratamento sulfito alcalino (54%) em comparação quando se usou apenas NaOH (33%). Além disso, os autores reportam uma maior fibrilação e hidrofilicidade do material tratado com sulfito alcalino.

A eficiência do pré-tratamento depende, dentre vários fatores, da natureza da biomassa a ser tratada e da severidade do processo, como a carga de álcali, tempo e temperatura do processo. Wang et al. (2018a) ao tratarem a biomassa do híbrido de capim elefante com solução de sulfito alcalino (5% m/m de NaOH e 20% m/m de Na_2SO_3) a 121 °C por 1 hora, obtiveram uma redução de 34,6% no conteúdo de lignina. Para o bagaço de cana, Mendes et al. (2013), utilizaram menor carga de sulfito (5% m/m de NaOH e 10% m/m de Na_2SO_3) e obtiveram uma remoção de lignina de 54% com 1 hora de reação a 120 °C. Neste estudo, Mendes et al. (2013) observaram também que a maior parte da remoção de lignina ocorre nos primeiros 30 minutos do processo.

Laurito-Friend et al. (2015) também reportaram alta remoção de lignina do bagaço de cana pelo pré-tratamento sulfito alcalino. Os autores avaliaram a deslignificação em híbridos de cana-de-açúcar empregando licor sulfito alcalino composto pelas cargas de 2,5%, 3,75% e 5% (m/m) de NaOH e 5%, 7,5% e 10% (m/m) de Na_2SO_3 , respectivamente. Empregando as mesmas condições de processo reportadas por Mendes et al. (2011), a deslignificação obtida foi maior conforme aumentou-se a carga de reagentes químicos, com melhores resultados na maior carga (5% (m/m) de NaOH e 10% (m/m) de Na_2SO_3). No geral, o pré-tratamento sulfito alcalino utilizando a maior carga removeu mais de 42% de lignina para todos os híbridos.

2.4 Extração da Hemicelulose do material Lignocelulósico

Os métodos mais comuns de extração da hemicelulose incluem o emprego de ácidos, extração alcalina, autohidrólise com vapor de água e o uso de solventes orgânicos (GÍRIO et al., 2010). O processo mais adequado para cada tipo de biomassa é aquele que resulta menores perdas de polissacarídeos e gera uma menor concentração de produtos de decomposição (YI et al., 2013). Os processos de extração química com ácido levam à alta solubilização da hemicelulose e em menor grau da lignina, gerando uma porção sólida rica em celulose. Em geral, o controle da reação é difícil, podendo despolimerizar as hemiceluloses até monossacarídeos e, dependendo da severidade do processo, ocorre a

formação de produtos de decomposição, principalmente furfural (KIM J. S.; LEE; KIM T. H., 2015).

O método de extração de xilana por autohidrólise, empregando vapor de água em alta pressão, é considerado um método simples e de baixo custo, uma vez que emprega apenas vapor de água no processo. O processo de autohidrólise é realizado em temperaturas de 130 a 230 °C, podendo ser conduzido em períodos que variam de poucos segundos a várias horas. Devido as condições de alta temperatura e pressão do processo de autohidrólise, as pontes de hidrogênio intermoleculares da água são enfraquecidas, possibilitando a autoionização da água, resultando assim em alta concentração de íons hidrônio (H_3O^+) livres. Estes íons atuam então como catalisadores, removendo grupos acetilas presentes na biomassa, que por sua vez, juntos aos íons hidrônio e o efeito da alta temperatura e pressão, iniciam o processo em cascata de despolimerização da hemicelulose (ZHU et al., 2016; BATALHA et al., 2015). Durante o processo, além da hidrólise da hemicelulose em xilo-oligossacarídeos e xilanas, também ocorre a modificação química e a solubilização de parte da lignina devido a alta temperatura (BATALHA et al., 2015).

Oriez et al. (2018) realizaram a extração alcalina da xilana de bagaço de cana-de-açúcar empregando NaOH (30% m/m) em um processo conduzido a 60 °C por 6 horas, obtendo remoção significativa de lignina (46%) e extração de 22% de xilana, com preservação de 95% da fração de glucana do bagaço. Devido às condições brandas de temperatura, os autores reportam que não houve quantidade significativa de produtos de decomposição dos carboidratos. A extração de xilana na presença de álcalis é geralmente maior quando se emprega alta carga de químicos em altas temperaturas, no entanto, esse tipo de processo resulta em maiores perdas de sólidos e geram uma maior concentração de produtos da despolimerização dos polissacarídeos (SPORCK et al., 2017). Brienzo et al. (2009) em condições alcalinas mais brandas, empregando peróxido alcalino (H_2O_2 6% m/m, pH 11,6, 20 °C) obtiveram um rendimento de 86% de extração de xilana em 4 horas de reação. Jayapal et al. (2013) avaliaram o efeito das cargas de NaOH e KOH (2-12% m/m) sobre a extração de xilana do bagaço de cana. Os resultados obtidos indicaram que o aumento na carga de álcali elevou o rendimento de extração após 16 horas de reação, com rendimento máximo de 8,7% para o KOH e 11,91% para o NaOH, empregando a maior carga 12% (m/m).

A extração da fração hemicelulósica dos materiais lignocelulósicos é um desafio devido sua complexidade estrutural e química. Obtê-la de forma isolada e pura é um dos principais objetivos de processos que visam o beneficiamento deste material. Visando a

extração mais seletiva e pura da xilana dos materiais lignocelulósicos, o emprego de enzimas é uma alternativa promissora, dada a alta especificidade e seletividade destes catalisadores biológicos.

2.4.1 Extração das xilanas assistida por enzimas

Em contraste com os processos químicos, os tratamentos enzimáticos são muito específicos e são realizados em condições mais brandas de reação. Assim, os tratamentos enzimáticos são implementados após ou mesmo entre estágios de pré-tratamento para auxiliar no fracionamento e extração dos componentes poliméricos.

As xilanases são as enzimas mais utilizadas para auxiliar a extração das xilanas presentes nos materiais lignocelulósicos, pois ao produzirem quebras no interior da cadeia da xilana, as tornam mais solúveis e extraíveis em soluções aquosas levemente alcalinas (SPORCK et al., 2017). O exemplo mais comum é o uso de xilanases na indústria de celulose, antes do pré-tratamento alcalino, visando reduzir reagentes químicos tóxicos usados no branqueamento das polpas (VIIKARI et al., 1994).

Dependendo do tipo de enzima e das condições do ensaio, a xilana pode ser parcialmente ou completamente despolimerizada a partir da biomassa pré-tratada. A hidrólise completa das hemiceluloses presentes no material lignocelulósico requer o emprego combinado de uma série de enzimas (Figura 8), devido a composição química e estrutural deste material (DUTTA; CHAKRABORTY, 2018; SAHA, 2003). As enzimas que atuam na despolimerização da hemicelulose são produzidas por microrganismos, como fungos, bactérias e leveduras. As xilanases disponibilizadas comercialmente têm vasta faixa de pH e temperaturas ótimas de atuação, atuando geralmente entre os pH de 4,5 a 6 e temperaturas de 30 a 50 °C. As principais xilanases requeridas para a hidrólise da xilana são as endo-xilanases (EC 3.2.1.8) e β -xilosidases (EC 3.2.1.37) (POLLET; DELCOUR; COURTIN, 2010; HWANGBO; TRAN; CHU, 2019). O primeiro grupo de enzimas cliva ligações glicosídicas β -(1 $\rightarrow$ 4)-xilopirranose no interior da cadeia da xilana, e as β -xilosidases são enzimas que clivam a ligação glicosídica de xilobiose e xilo-oligossacarídeos de cadeia curta, gerando xilose (DUTTA; CHAKRABORTY, 2018; BROEKER et al., 2018).

Figura 8 – Representação dos sítios de ação das enzimas que hidrolisam a hemicelulose.

Fonte: Carvalho et al. (2013).

Em sua maioria, as enzimas que despolimerizam a hemicelulose são classificadas em glicosil hidrolases (GH), sendo agrupadas em diversas famílias: 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 16, 26, 30, 43, 44, 51 e 62 (WALIA et al., 2017). No geral, as enzimas são subdivididas em famílias baseando-se em semelhanças estruturais e na sequência de aminoácidos. A comparação e a classificação das enzimas em cada família é feita através do banco de dados para enzimas ativas em carboidratos (CAZy) (WALIA et al., 2017; BROEKER et al., 2018). As xilanases podem ainda serem classificadas de acordo com sua massa molar, ponto isoelétrico (pI), especificidade ao substrato e pelas características do seu produto de hidrólise. Baseando-se neste tipo de classificação, a maior parte das endo-xilanases produzidas por bactérias e fungos pertencem as famílias GH10 e GH11, possuindo atuação ótima em temperaturas de 40 a 60 °C, e pH que variam de ligeiramente ácidos para xilanases fúngicas a alcalinos para xilanases de origem bacteriana (COLLINS; GERDAY; FELLER, 2005).

As xilanases pertencentes à família 10 (GH10) atuam clivando a ligação glicosídica situada após dois resíduos de xilopiranoses não substituídos, enquanto da família GH11 necessitam de pelo menos três resíduos não substituídos para atuarem (Figura 9) (LABOUREL et al., 2016). A maior parte das xilanases da família 10 são capazes de clivar as ligações glicosídicas em xilanas de cadeia curta como a xilotriose, evidenciando a especificidade de seu sítio ativo por substratos pequenos, podendo ainda serem ativas em celulose de baixa massa molar (COLLINS; GERDAY; FELLER, 2005). As xilanases GH10 geralmente possuem massa molecular acima de 30 kDa e um pI ácido. Comparativamente,

as endo-xilanases da família 11 possuem massa mola menor que 30 kDa e pI alcalino, obtendo produtos com maior grau de polimerização. Além de serem conhecidas como xilanases verdadeiras, por não serem capazes de hidrolisar a celulose. (COLLINS; GERDAY; FELLER, 2005; POLLET; DELCOUR; COURTIN, 2010; WALIA et al., 2017).

Figura 9 – Modo de ação das enzimas das famílias GH10 e GH11 na hidrólise de glucuronoxilana.

Fonte: Adaptado de Biely; Singh; Puchart (2016).

A presença de variados grupos laterais nas xilanas limita a acessibilidade das endo-xilanases à cadeia principal. Assim, para a completa hidrólise das xilanas faz-se necessário o emprego de enzimas acessórias, como as α -arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55), α -glucuronidasas (EC 3.2.1.139) e esterases como a feruloil esterase, enzimas também classificadas em glicosil hidrolases. Partindo do modo de ação das α -arabinofuranosidases, estas podem ser divididas em dois grupos, as enzimas com ação sobre unidades de xilopiranosil monossustituídas com arabinofuranosil (Araf) nas posições 2 ou 3, e as que aceitam unidades duplamente substituídas, mas clivam apenas a ligação α -(1→3), deixando a unidade 2 substituída. Além da ação específica das α -arabinofuranosidases sobre o tipo de substituição, estas não clivam resíduos Araf esterificados com ácido ferúlico (BIELY; SINGH; PUCHART, 2016).

Há poucos relatos na literatura sobre o modo de ação e classificação das feruloil esterases. As pesquisas reportadas sobre esta enzima classificam-na de acordo com sua especificidade ao substrato em quatro tipos, dependendo do tipo de metil ésteres de ácidos hidroxicinâmicos (ácido ferúlico, *p*-cumárico, sinapato ou cafeato) que elas são capazes de clivar, e também a capacidade de liberar ácido diferúlico (CREPIN; FAULDS; CONNERTON, 2004). Todas as enzimas pertencentes a este grupo liberam ácido transferúlicos de Araf esterificadas com ácido ferúlico. Também é relatado para esta enzima a capacidade de clivar ligações éster de resíduos Araf ligados ao carbono 2 da unidade de xilopirranose (BIELY; SINGH; PUCHART, 2016).

As xilanas comumente presentes em gramíneas, como na cana-de-açúcar, são em sua maioria do tipo glucuronoarabinoxilana (GAX) e arabinoxilana (AX). Essas xilanas possuem entre os grupos laterais que se ligam a cadeia principal de xilose, resíduos de arabinose, ácido metil-glucurônico e grupos acetila (CARVALHO et al., 2017), em que alguns dos grupos arabinosil podem estar ligados a fragmentos de lignina por ligações ester intermediadas por grupos hidroxicinâmicos como ácido ferúlico e *p*-cumárico (LAGAERT et al., 2014; MOREIRA; FERREIRA FILHO, 2016). A presença destes grupos laterais nas cadeias de xilana, apresenta-se como um impedimento estérico à ação das endo-xilanases, desta forma impedindo a ação de enzimas hemicelulolíticas sobre as xilanas do material vegetal. Uma das estratégias empregadas na tentativa de diminuir o impedimento estérico devido a presença destes grupos, é a utilização de enzimas acessórias, como as enzimas arabinofuranosidase, glucuronidase e feruloil esterase, que removem de forma específica os grupos arabinosil, glucurônico e feruloil, respectivamente (POLLET, DELCOUR, COURTIN, 2010; LAGAERT et al., 2014; GOLDBECK et al., 2016; MOREIRA; FERREIRA FILHO, 2016). A remoção destes grupos, poderia auxiliar a ação das xilanases e portanto aumentar o rendimento de extração das xilanas, uma vez que suas ações deixam as cadeias de xilana mais lineares (HUANG et al., 2017).

Os processos descritos na literatura para a extração enzimática de xilanas, geralmente descrevem o emprego sequencial de enzimas após aplicação de algum tipo de pré-tratamento da biomassa, visto que a extração enzimática a partir de biomassa não tratada resulta em baixos rendimentos de extração, devido a recalcitrância natural deste material limitar a ação das enzimas sobre os carboidratos (RÉMOND et al., 2010; HAKALA; LIITIÄ; SUURNÄKKI, 2013; AGUEDO et al., 2014; REDDY; KRISHNAN, 2016). Rémond et al. (2010) descrevem a extração enzimática da xilana da palha de trigo com e sem pré-tratamento em amônia líquida (2,5% m/v). Para a hidrólise da palha de trigo empregando

endo-xilanase de *Thermobacillus xylanilyticus*, os autores empregaram uma carga de enzima de 350 UI/g de palha. Os resultados de extração de xilana alcançados em 6 horas de reação a 60 °C, foi de 22% para a palha não tratada, ao passo que, para a palha pré-tratada foi de 56%.

Aguedo et al. (2014) reportam a extração de xilana de farelo de trigo, empregando xilanases de *Bacillus subtilis*, em processo conduzido a 55 °C em carga de sólidos de 9% (m/v), por 24 h. Com a hidrólise enzimática obteve-se um rendimento de extração de xilana de 17,8%, com uma relação arabinose/xilose de 0,83, evidenciado que a maior parte dos oligômeros liberados eram muito ramificados.

Também foi reportada na literatura a extração de xilana de farelo de centeio por diferentes enzimas (FIGUEROA-ESPINOZA et al., 2004). Neste estudo, os autores realizaram a extração de arabinoxilana de farelo de centeio pré-tratados por extrusão. Foram utilizadas 3 xilanases puras e uma xilanase bruta, presente no extrato comercial Grindamyl S100. O maior rendimento de extração de xilana (22,7%) foi obtido pela xilanase purificada do cultivo de *Bacillus subtilis*, utilizando 5 U/g, 24 h de reação a 20 °C. Esta enzima foi então avaliada em combinação com arabinofuranosidase, endo-glucanase ou feruloil esterase. Destas, apenas a endo-glucanase em alta dosagem (5000 U/g) apresentou resultado positivo na extração de xilana (50%).

Na literatura também é reportado o uso de celulasas para melhorar a extração de xilana pelas xilanases por meio da desestruturação das cadeias de celulosas que confinam as xilanas em sua estrutura, tornando desta forma as xilanas mais acessíveis. Com esse intuito, Reinoso (2017) avaliou o efeito da adição de endoglucanase de *Aspergillus* sp (Carezyme 1000L) sobre o rendimento de extração de arabinoxilanas por xilanase (Luminase PB-200), do bagaço de cana pré-tratado com clorito ácido, em reação conduzida em pH 8, 24-48h, a 50 °C. O autor avaliou o efeito da adição simultânea das enzimas ao bagaço, e pré-incubação do bagaço com a endoglucanase, seguida pela adição da xilanase. Os resultados obtidos em 24 horas de hidrólise mostram aumento na extração de xilana tanto para a adição simultânea quanto para a adição sequencial das enzimas, em relação ao uso apenas da xilanase, com aumento de 4,5 e 4,6%, respectivamente. Além das celulasas, outras proteínas também podem ser utilizadas para aumentar a acessibilidade e digestibilidade dos polissacarídeos em materiais lignocelulósicos, como expansinas, mono-oxigenases líticas de polissacarídeos (LPMOs) e swolleninas. Estas proteínas tem o potencial de afrouxa a parede celular, facilitando desta forma, por exemplo, a ação de enzimas como xilanases sobre a fração hemicelulósica (HU et al., 2018).

2.5 Aplicações da Hemicelulose

Muitos processos industriais envolvendo o uso da biomassa lignocelulósica como matéria-prima descartam parte da hemicelulose durante as etapas de processamento ou têm baixo aproveitamento desta fração; muitas vezes pelo enfoque do processo ser apenas nos outros constituintes (celulose ou lignina) ou ainda pela falta de tecnologia de beneficiamento e etapas de separação. Visto que a hemicelulose apresenta-se como a segunda maior fração de polissacarídeos dos materiais lignocelulósicos, a exploração desta na obtenção de produtos com aplicabilidades diversas é uma alternativa economicamente atraente (PENG et al., 2014; FARHAT et al., 2017). A partir da fração hemicelulósica é possível produzir uma gama de compostos de alto valor agregado, como furfural, ácido levulínico, xilitol, biopolímeros, além da xilose fermentação para obter biocombustível (PENG et al., 2012).

Durante a produção de papel, a hemicelulose removida no processo de polpação pode ser reincorporada às fibras, no intuito de melhorar as características do papel, como por exemplo, a sua resistência (SCHÖNBERG et al., 2001).

Os xilo-oligossacarídeos apresentam grau de polimerização variando de 2 a 12, podendo estes ser obtidos a partir da hemicelulose. Os XOS possuem características para uso como prebiótico, uma vez que não são absorvidos pelo organismo humano e comprovadamente promovem o crescimento das bactérias benéficas a saúde humana. Os xilo-oligossacarídeos são reportados ainda como agentes funcionais, promovendo melhor absorção de cálcio pelo organismo, ação anti-inflamatória e melhorando o sistema imunológico (FREITAS; CARMONA; BRIENZO, 2019; OTIENO; AHRING, 2012; AMORIM et al., 2018; ZHANG et al., 2018).

Vários estudos tem sugerido que fragmentos de xilana contendo ácidos fenólicos, como ferúlico e *p*-cumárico, apresentam atividades antioxidantes em vários sistemas peroxidativos, podendo ser responsáveis por algumas das funções fisiológicas das xilanas (OHTA et al., 1994; EBRINGEROVÁ et al., 2008; YUWANG et al., 2018). Tais fragmentos de xilanas são muito atrativos porque combinam a atividade antioxidante dos fenólicos com as propriedades funcionais dos oligossacarídeos.

2.6 Atividade antioxidante dos xilo-oligossacarídeos e xilanas

Antioxidantes são substâncias capazes de retardar ou prevenir a oxidação de moléculas, por meio de mecanismo de ação como a captura de radicais livres, quelação de íons metálicos, prevenção da peroxidação lipídica, dentre outros mecanismos dependendo do tipo agente oxidante (CAROCHO; MORALES; FERREIRA, 2018).

De modo geral, os antioxidantes podem ser categorizados em sintéticos ou naturais. Os antioxidantes sintéticos são formados por estruturas fenólicas que apresentam variáveis graus de substitutos alquilas, enquanto os naturais são compostos fenólicos, como as quinonas, lactonas e polifenóis (ARAÚJO, 2004). Os antioxidantes sintéticos mais utilizados na indústria de alimentos são o BHT (hidroxitolueno butilado) e o BHA (hidroxianisol butilado). Estes são adicionados aos alimentos para aumentar o tempo de prateleira destes e preservar as características organolépticas do produto. No entanto, a preocupação quanto a segurança no uso destes compostos como aditivos em alimentos, para a saúde humana vêm aumentando o interesse na substituição destes por antioxidantes naturais (CAROCHO; MORALES; FERREIRA, 2013; SINDHI et al., 2013). Antioxidantes naturais podem incluir enzimas com ação antioxidante, como a catalase, e substâncias como ácidos fenólicos, vitaminas, flavonóides e carotenóides. Entre os antioxidantes mais utilizados, destacam-se os tocoferóis, principais antioxidantes naturais encontrados em vegetais e gordura animal, utilizados como aditivos para prevenção da oxidação de ácidos graxos e insaturados (RAMALHO; JORGE, 2006; ARAÚJO, 2004).

Quanto ao modo de ação dos antioxidantes, estes podem ser classificados com base em sua função, em primários e sinérgicos. Os antioxidantes primários são fenólicos polihidroxilados e fenóis com impedimento estrutural. Esses bloqueiam a ação dos radicais livres através da estabilização destes, que ocorre pela doação de hidrogênio ou elétrons. Os sinérgicos por sua vez, podem atuar por mecanismos diversos; como doação de hidrogênio, regeneração do radical fenoxil, e regeneração de um antioxidante primário (ARAÚJO, 2004).

A presença de derivados fenólicos esterificados às moléculas que compõem os polissacarídeos, conferem a estes atividade antioxidante, possibilitando a doação e captura de hidrogênio e elétrons (VALLS et al., 2018). A atividade antioxidante em polissacarídeos também está relacionada ao tipo de açúcar, massa molar e a presença de grupos laterais, como os grupos sulfato, carboxílico e metil (CHEN, 2008).

A atividade antioxidante de xilo-oligossacarídeos obtidos de bagaço de cana-de-açúcar (BIAN et al., 2013), sabugo de milho (GOWDHAMNAN; PONNUSAMI; 2015), palha de alho (KALLEL et al., 2015), farelo de trigo (LASRADO; GUDIPATI, 2014) e palha de trigo (AKPINAR et al., 2010) têm sido relatada. Uma comparação da atividade antioxidante de xilo-oligossacarídeos de tamanhos distintos, produzidos pela ação de xilanases GH10 e GH30 em glucuronoxilanas, mostrou resultados bastante diferentes no trabalho de Valls et al. (2018). A atividade antioxidante em ABTS^{•+} foi de 10% para os XOS menores produzidos pela xilanase GH10 e de 80% para os XOS produzidos pela GH30. Neste estudo, as glucuronoxilanas não apresentavam ramificações de ácido ferúlico, portanto a atividade oxidativa foi atribuída à presença de substituições de metil glucurônico. Também tem sido reportado que os grupos carboxílicos aumentam a atividade antioxidante de polissacarídeos (PRISTOV; MITROVIC; SPASOJEVIC, 2011).

Além da atividade antioxidante, os xilo-oligossacarídeos apresentam grande potencial como prebiótico, devido a características como: habilidade adoçante, capacidade de se ligar a água, alta resistência a digestão no trato gastro-intestinal e promover o crescimento de bactérias benéficas a saúde humana, como as bifidobactérias e bactérias lácticas (JIAN; KUMAR; SATYANARAYANA, 2015). Os xilo-oligossacarídeos podem ser utilizados como aditivo nos alimentos, conferindo aos alimentos propriedades funcionais e nutracêuticas, além de atuar como agente antioxidante, mantendo o valor nutricional, sabor e frescor dos alimentos por mais tempo (JIAN; KUMAR; SATYANARAYANA, 2015; CAROCHO; MORALES; FERREIRA, 2013). A utilização de xilo-oligossacarídeos também possui benefícios econômicos, uma vez que estes podem ser obtidos a partir de resíduos agroindustriais, empregando métodos como extração enzimática (JIAN; KUMAR; SATYANARAYANA, 2015).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo a extração, caracterização e avaliação da atividade antioxidante de xilo-oligossacarídeos, obtidos do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com sulfito alcalino, por método enzimático.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Estabelecer condições ótimas para a aplicação de xilanase no bagaço pré-tratado e avaliar o rendimento de extração de xilana;
- ✓ Avaliar o efeito combinado e em separado de enzimas acessórias (α -arabinofuranosidase e feruloil esterase) e xilanase sobre o rendimento de extração de xilana;
- ✓ Avaliar técnicas de isolamento de xilo-oligossacarídeos e caracterizar estruturalmente as frações obtidas;
- ✓ Avaliar o potencial antioxidante dos xilo-oligossacarídeos, utilizando ensaios de capacidade antioxidante total e sequestro de radicais livres.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Substratos

Foram utilizadas duas amostras de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratadas com sulfito alcalino, em que as amostras foram pré-tratadas e caracterizadas em trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa, seguindo a metodologia descrita por Mendes et al. (2011). O bagaço (600 g m. s.) foi colocado em reator de aço inox com tampa e, depois de retirar o ar por 30 min com uma bomba de vácuo, foi feita a impregnação com 6 L de uma solução sulfito alcalino (5% m/m NaOH e 10% m/m Na₂SO₃). O reator foi transferido para uma autoclave e a reação foi conduzida a 121 °C por 2 horas. Após a etapa termo-química, o bagaço foi filtrado até retenção dos finos e em seguida foi lavado para atingir o pH 7. Ao bagaço foi adicionado 25 L de água para ajustar a sua concentração em 2,4% antes de ser refinado no aparelho Regmed MD-300, com distanciamento entre os discos de 0,1 mm. Os sólidos e o líquido foram separados por filtração em papel de filtro, sob vácuo. A parte sólida, ou seja, bagaço pré-tratado com sulfito alcalino e lavado (SAL) teve sua composição química determinada, apresentando 49,8% de glucana, 24,4% de xilana, 2,8% de arabinosil, 0,3% de acetil e 13,2% de lignina (SPORCK et al., 2017). Este bagaço foi moído até passar por uma peneira de 25 mesh e utilizado nos ensaios em microescala.

A outra amostra de bagaço que foi utilizada no trabalho nos ensaio em escala preparativa foi preparada e caracterizada por Santos et al. (2019). O bagaço foi pré-tratado como descrito anteriormente porém não se realizou a etapa de lavagem do bagaço até pH 7. Esse bagaço pré-tratado apresentou o pH final de 9,8, e foi denominado sulfito alcalino não lavado (SANL). Sua composição química foi de 48,3% de glucana, 20,5% de xilana, 2,3% de arabinosil, 0,1% de acetil e 16,8% de lignina. Para os ensaios de extração enzimática de xilana em escala preparativa, o pH do bagaço foi ajustado para 6,0 com solução de HCl 9 M.

4.2 Enzimas

- Endo-xilanase: Coquetel LuminaseTM PB-200 (BASF), com faixa de atuação nas temperaturas de 60 a 90 °C e pHs de 5 a 9 (SOUZA et al., 2016);

- α -L-Arabinofuranosidase GH43 (B12 E-ABFBO21, *Bacteroides ovatus*, EC 3.2.1.55., pH 6 – 7,5, 40 – 50 °C, 16 U/mg) – Megazyme;

- Feruloil esterase CE1 (E-FAEZCT, *Clostridium thermocellum*, EC 3.1.1.73., pH 4 – 7, 50 a 60 °C, 0,5 U/mg) – Megazyme.

4.2.1 Determinação de atividade de xilanase

A atividade de xilanase foi determinada em xilana de *beechwood* (Megazyme) com detecção dos açúcares redutores pelo método de DNS (MILLER, 1959). A xilana de *beechwood* (1% m/v) foi preparada em tampão fosfato de sódio 50 mM, nos valores de pH 6 e 8. A reação enzimática foi realizada em tubos de ensaio contendo 0,9 mL de xilana e 0,1 mL de xilanase, incubados à 60 °C por 5 minutos. Decorrido o tempo de ensaio, adicionou-se 1,5 mL de DNS para interromper a reação, com posterior fervura dos tubos a 100 °C por 5 minutos e resfriamento em banho de gelo para leitura da absorbância a 540 nm em espectrofotômetro. As amostras controles foram feitas adicionando-se o DNS antes da adição da enzima. O cálculo da atividade enzimática foi feito pela determinação dos açúcares redutores, utilizando uma curva padrão de xilose para o reagente DNS nas concentrações de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9 e 10 μ mol/mL. O valor de absorbância obtido no ensaio enzimático foi transformado em micromoles de xilose, o qual foi dividido pelo volume de enzima e multiplicado pelo fator de diluição, quando necessário. Uma unidade de atividade enzimática (UI) foi definida como a liberação de 1 μ mol de açúcar redutor por minuto, nas condições do ensaio.

4.2.2 Ensaio de termoestabilidade

A termoestabilidade da xilanase (Luminase PB-200) foi determinada pela incubação da enzima, em estado estacionário, nas temperaturas de 50, 60, 70 e 80 °C em banho-maria por 24 h. Os ensaios foram realizados em microtubos tipo Eppendorf de 5 mL, com adição de 2 mL da enzima diluída em soluções tampão fosfato de sódio 50 mM preparadas nos pH 6 e pH 8. Amostras em triplicata foram coletadas em 6 e 24 horas, resfriadas por 10 minutos em banho de gelo e tiveram suas atividades ensaiadas como descrito no item 4.2.1. Determinou-se a atividade relativa em cada tempo baseando-se na atividade da enzima no tempo zero. As faixas de temperatura e de pH estudadas neste trabalho foram definidas com base no trabalho de Santos et al. (2019).

4.3 Avaliação das condições enzimáticas para extração de xilanas do bagaço pré-tratado com sulfito alcalino (SAL)

Os ensaios foram realizados em pequena escala utilizando 50 mg de bagaço pré-tratado (base seca) moído a 25 mesh, suspensos em 1 mL de solução tampão fosfato de sódio, 50 mM em pH definido em cada ensaio (pH 6 ou pH 8), contendo 5 U de xilanase/g de bagaço. As reações foram conduzidas em tubos tipo Eppendorf de 5 mL, em triplicatas, as quais foram colocados dentro de Erlenmeyers de 250 mL. Os frascos Erlenmeyers foram colocados em banho-maria com temperatura controlada e sob agitação recíproca de 120 rpm. As reações foram amostradas em intervalos de 3, 6 e 24 h. Para cada amostragem, foram retirados uma triplicata de tubos os quais foram colocados em banho-maria a 100 °C por 5 min para inativação da enzima. Os tubos foram centrifugados a 4600 rpm por 5 min a 10 °C, e o sobrenadante foi coletado e congelado para análises posterior de açúcares no HPLC.

O bagaço residual foi armazenado sob refrigeração. Foram feitos controles da extração de xilana do bagaço pré-tratado sem adição de enzima.

Uma extração alcalina foi feita nos bagaços após a extração enzimática, utilizando 1 mL de NaOH 0,1 mM (pH 10), por 1 h à 90 °C. As amostras foram centrifugadas a 4600 rpm por 5 minutos para coleta do sobrenadante, que foi analisado quanto ao conteúdo de xilana extraída.

4.3.1 Avaliação do pH e temperatura

Foram realizados ensaios com o bagaço SAL na concentração de sólidos de 5% (m/v) e carga enzimática de 5 U de xilanase/g de bagaço, nos pH 6 e pH 8, sob as temperaturas de 50, 60 e 70 °C.

4.3.2 Influência da carga enzimática e carga de sólidos

A partir da definição da temperatura e pH mais adequados ao processo determinados no trabalho de Santos et al. (2019), foram avaliados os efeitos dos fatores carga de sólidos e carga enzimática de acordo com um planejamento fatorial 2² completo, com três repetições no ponto central (Tabela 1). A reação foi conduzida na temperatura de 70 °C, pH 6 em 24 horas de reação. A faixa da carga enzimática

empregada neste trabalho (5 a 45 U) foi definida com base em trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa (SPORCK et al., 2017; SANTOS et al., 2019).

Para esta análise foi utilizado o programa computacional MINITAB®18.

Tabela 1 – Planejamento fatorial 2² completo com triplicata no ponto central – Avaliação da influência da carga de sólidos e carga enzimática sobre a extração de xilana do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com sulfito alcalino (variável resposta).

Ensaio	Variáveis independentes			
	Níveis codificados		Níveis reais	
	X ₁	X ₂	Carga de sólidos (%)	Carga enzimática (U/g)
1	-1	-1	5	5
2	1	-1	15	5
3	-1	1	5	45
4	1	1	15	45
5	0	0	10	25
6	0	0	10	25
7	0	0	10	25

Fonte: Arquivo pessoal.

Nota: X₁ - Carga de sólidos (% m/v); X₂ - Carga enzimática (U de xilanase /g de bagaço).

4.3.3 Efeito de enzimas acessórias sobre o rendimento de extração de xilana do bagaço pré-tratado

Avaliou-se o efeito das enzimas acessórias α -arabinofuranosidase (AXH) e feruloil esterase (FEA) separado e em combinação com a endo-xilanase (Luminase PB-200), sobre o rendimento de extração de xilana do bagaço pré-tratado com sulfito alcalino (SAL), como mostra a Tabela 2. Os ensaios, realizados em uma replicata, foram conduzidos em tubos tipo Eppendorf de 5 mL contendo 5% de sólidos (m/v) em 1 mL de tampão fosfato de sódio pH 6 (50 mM). Para os ensaios, utilizou-se 5 U de xilanase/g de bagaço e 1 mg de proteína de cada enzima acessória/g de bagaço. Os tubos foram incubados a 50 °C por 24 horas. Como controle, empregou-se albumina de soro bovino (BSA).

Tabela 2 – Avaliação das enzimas acessórias na extração de xilana do bagaço pré-tratado.

Ensaio	Composição dos ensaios
Luminase/BSA (1 mg)	1 mg de BSA + 5 U Lum
Luminase/BSA (2 mg)	2 mg de BSA + 5 U Lum
Luminase	5 U Luminase PB-200
Luminase/AXH	1 mg Araf + 5 U Lum
Luminase/FEA	1 mg FEA + 5 U Lum
Luminase/AXH/FEA	1 mg Araf + 1 mg FEA + 5 U Lum

Fonte: Arquivo pessoal.

Nota: Luminase/BSA (albumina de soro bovino) - controle, Lum (Luminase PB-200 -5 U xilanase/g substrato), Araf – arabinofuranosidase (AXH), FEA – feruloil esterase.

4.4 Extração de xilana em escala preparativa do bagaço SANL

Os ensaios foram realizados com o bagaço pré-tratado com sulfito alcalino (SANL), cujo pH foi ajustado para 6 com ácido clorídrico 9 M. As reações foram conduzidas em Erlenmeyers de 50 mL e de 1 litro, com carga de sólidos de 5% (m/v) e carga enzimática de 5 U xilanase/g de bagaço. A xilanase (Luminase PB-200) foi diluída no tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6 antes de ser adicionada ao bagaço. Os frascos Erlenmeyers foram vedados e incubados em banho-maria a 70 °C por 24 horas sob agitação de 120 rpm. Após a reação, os frascos foram fervidos por 5 minutos a 100 °C para inativação da enzima. Foram feitos ensaios controles sem a adição da enzima. Os sólidos foram separados por filtração a vácuo em filtro de nylon. O hidrolisado enzimático obtido foi posteriormente utilizado para a separação dos xilanos e xilanos oligossacarídeos.

4.5 Métodos empregados na separação de xilanas e XOS

4.5.1 Separação por precipitação fracionada com etanol

As xilanas presentes no hidrolisado enzimático do bagaço SANL foram precipitadas com etanol de forma sequencial, empregando as concentrações de 30, 60 e 90% (v/v) de etanol. Na primeira etapa, adicionou-se etanol (95% v/v) a 7 mL do hidrolisado enzimático até a concentração de 30% (v/v). A solução foi mantida em

repouso por 12 horas a 6 °C e depois foi centrifugada a 4600 rpm por 20 min. O precipitado formado foi removido e adicionou-se mais etanol de modo a aumentar a sua concentração para 60% (v/v) na fase líquida e promover a precipitação de mais xilana na nova fase precipitada. Um terceiro corte foi feito com 90% (v/v) de etanol. Os pellets formados durante as precipitações com 30, 60 e 90% (v/v) de etanol foram ressuspensos em 1 mL de água destilada com o pH ajustado para 12 (0,01M) com solução de NaOH 0,4 M. A massa molar das xilanas presentes em cada pellet foi determinada por cromatografia de exclusão por tamanho empregando a coluna Biogel P2. O sobrenadante final obtido após precipitação com 90% (v/v) de etanol (SB90) foi liofilizado e depois ressuspensionado em 3 mL de água destilada. Um mililitro e meio do sobrenadante SB90 foi aplicado na coluna Biogel P2 para fracionamento dos xilooligosacarídeos.

4.5.2 Separação por adsorção em carvão ativado

4.5.2.1 Preparo do carvão ativado

Cinco gramas de carvão vegetal ativado em pó (Labsynth) foram adicionados a 25 mL da solução HCl (1%), e então a mistura foi mantida sobre agitação magnética suave por 30 minutos. A amostra de carvão ativado foi filtrado a vácuo com papel de filtro (Whatman N°1), e lavado com 200 mL de água deionizada aquecida, e seco em estufa de secagem por 12 h a 100 °C.

4.5.2.2 Preparo do adsorbato (hidrolisado)

O pH do sobrenadante recuperado no processo de extração de xilana do bagaço SANL foi ajustado para 2,0 pela adição de HCl (9 M). Após ajuste do pH, o hidrolisado foi incubado em banho-maria a 50 °C por 1 hora (WANG et al., 2018b). Em seguida, o hidrolisado foi centrifugado a 4600 rpm por 20 minutos para remoção das impurezas precipitadas. O sobrenadante foi então empregado na etapa posterior de separação por adsorção em carvão ativado.

4.5.2.3 Adsorção dos xilo-oligossacarídeos (XOS) em carvão ativado

A separação de XOS por carvão ativado foi realizada conforme Zhang et al. (2018), com algumas modificações. A reação de adsorção dos XOS foi feita na proporção de 0,04 g de carvão para cada 1 mL do hidrolisado enzimático. As reações foram conduzidas em Erlenmeyers de 250 mL com 50 mL de hidrolisado. Após adição do carvão ativado, os Erlenmeyers foram vedados e incubados em shaker a 50 °C sob agitação de 80 rpm por 18 h. Durante o processo de adsorção, foi feita a coleta de 1 mL de amostra em intervalos de 30 min, 1, 2, 3, 5, 13 e 18 h para determinação da curva de adsorção no carvão ativado. As amostras coletadas foram centrifugadas a 10.000 rpm por 5 min. Após centrifugação, 500 µL do sobrenante foram separados para análise de açúcar total em cada tempo, e o carvão remanescente foi ressuspensionado e devolvido ao Erlenmeyer, para continuidade do processo de adsorção.

Paralelamente, foi feito outro ensaio de adsorção e após o período de 18 horas, o carvão foi separado por filtração a vácuo em papel filtro, e determinado o açúcar residual no filtrado. Neste ensaio foi feita a dessorção dos XOS utilizando etanol nas concentrações de 10, 20, 30, 40, 50, 60 e 70% (v/v).

Para a eluição dos XOS adsorvidos no carvão ativado, o carvão retido no filtro de papel foi transferido para um bequer de 50 mL e adicionou-se 25 mL de etanol a 10% (v/v). A eluição foi realizada incubando a solução de etanol e carvão por 3 h em agitação magnética branda. Em seguida, a solução foi filtrada e o eluato armazenado para posteriores análises. O procedimento foi repetido para todas as concentrações de etanol. Ao final, o carvão e o papel filtro foram secos a 100 °C por 1 hora, resfriados em dessecador e pesados, para determinar a perda de carvão no processo.

As frações de XOS eluídas com etanol foram colocadas em placas Petri e deixadas em estufa com circulação de ar (30°C) por 4 horas, para evaporação. A amostra líquida remanescente foi então liofilizada e ressuspensionada em água 1 mL de destilada. Estas frações foram caracterizadas quanto ao conteúdo de xilo-oligossacarídeos e de açúcares totais (DUBOIS et al., 1956). Também foi determinado o potencial antioxidante dos xilo-oligossacarídeos contidos nas amostras. A Figura 10 apresenta o fluxograma do processo de separação de XOS por adsorção em carvão ativado.

Figura 10 – Fluxograma do processo de separação de XOS por adsorção em carvão ativado.

Fonte: Arquivo pessoal.

Nota: CA-XOS – carvão ativado contendo xos adsorvidos; CA – carvão ativado resultante no final das eluições.

4.6 Caracterização das xilanas e xilo-oligossacarídeos

4.6.1 Determinação de rendimento de extração de açúcares

A composição química das xilanas e xilo-oligossacarídeos extraídos dos bagaços pré-tratados com sulfito alcalino foi determinada pela pós-hidrólise ácida das amostras seguindo a metodologia de Sluiter et al. (2008). As amostras foram centrifugadas a 8000 rpm por 5 minutos para sedimentação das partículas de bagaço. Uma alíquota de 200 µl do sobrenadante foi diluída para 1 mL com água destilada contendo 10 µl de ácido clorídrico concentrado. O pH foi determinado e a partir do valor obtido adicionou-se ácido sulfúrico (72%) para atingir a concentração de 4%, segundo os dados da tabela descrita no trabalho de Sluiter et al. (2008). O volume da amostra foi ajustado para 2 mL, transferido para tubos de vidro com tampa de rosca e autoclavada a 121 °C por 1 hora. Como controles da reação, preparou-se 5 mL da solução de xilose a 0,15 g/L, sendo metade do volume (2,5 mL) autoclavado e o restante sem autoclavar. As amostras foram filtradas em membrana de acetato (0,45 µm) e analisadas em HPLC (WATERS). A xilose e arabinose foram analisadas em coluna BioRad HPX87H a 45 °C a um fluxo de 0,6 mL/min, com detector de índice

de refração na temperatura de 35 °C (WATERS 2414) utilizando como eluente uma solução de ácido sulfúrico a 5 mmol/L.

4.6.1.1 Cálculo de rendimento de xilana

O rendimento de extração de xilana foi determinado utilizando a relação entre a massa de xilana (g) extraída e a massa (g) de xilana presente no bagaço pré-tratado, segundo a equação 1.

$$REX (\%) = \left(\frac{(X_e \cdot V \cdot d) \cdot fc}{X_b \cdot C} \right) \times 100 \quad (1)$$

Onde:

REX = Rendimento de extração de xilana

Xe = soma da xilose e arabinose (g/L), determinada após hidrólise ácida do material extraído do bagaço pré-tratado

V = volume de material extraído (L)

d = diluição da amostra na pós-hidrólise

fc = 0.88, fator de conversão da soma de xilose e arabinose em glucuronoarabinoxilana (GAX)

Xb = porcentagem de xilana (GAX) presente no bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado (% m/m)

C = massa seca do bagaço pré-tratado (g).

4.6.2 Determinação da massa molar das xilanas

As xilanas e os xilo-oligossacarídeos extraídos do bagaço pré-tratado foram caracterizados quanto a massa molar, por cromatografia de exclusão por tamanho. A cromatografia foi realizada em coluna (1,6 cm x 100 cm) empacotada com resina de poli(acrilamida) Biogel P2 (Bio-Rad), com faixa de separação de 100 a 1.800 g/mol. A coluna foi equilibrada com água destilada na separação das xilanas mais solúveis em água, e para as amostras pouco solúveis, ajustou-se o pH da água para 8, com solução de NaOH 0,4 M. Antes de serem aplicadas, as amostras pouco solúveis tiveram o pH ajustado para 12. As amostras foram aplicadas na coluna a um fluxo de 0,3 mL/min.

Frações de 3 mL foram coletadas e analisadas pelo método fenol/ácido sulfúrico para avaliação dos açúcares totais (DUBOIS et al., 1956).

Para determinação da massa molar foi construída uma curva de calibração utilizando soluções de glicose (180 g/mol), rafinose (504 g/mol), cobalamina (1.355 g/mol) e Blue-dextran (2.000.000 g/mol) como padrões. Os dados relacionados ao volume de eluição e massa molar dos padrões, foram linearizados para obtenção da curva do tipo $\text{Log } M = aV_e + b$, em que V_e é o volume de eluição da amostra, M é a massa molar (g/L), a e b são os coeficiente angular e coeficiente linear, respectivamente. Os valores da massa molar ponderal média (M_m), e massa molar numérica média (M_n) foram calculados a partir das equações 2 e 3. Para os cálculos, a área dos picos do cromatogramas foram divididos em várias áreas parciais. Cada área parcial foi aproximada a área de um trapézio, em que cada incremento de volume de eluição, a massa molar (M_i) é calculada pela curva de calibração (APÊNDICE A).

$$M_m = \frac{\sum \text{Área}_i M_i}{\sum \text{Área}_i} \quad (2)$$

$$M_n = \frac{\sum \text{Área}_i}{\sum \frac{\text{Área}_i}{M_i}} \quad (3)$$

A dispersividade ($\bar{D}$) será calculada pela relação M_m/M_n .

4.6.3 Análise dos xilo-oligossacarídeos por HPLC

Os xilo-oligossacarídeos foram determinados por HPLC (WATERS), empregando sistema de colunas acopladas em série. As colunas empregadas foram a HPX87C (Bio-Rad) e HPX42A (Bio-rad), conectadas nesta ordem. As amostras antes liofilizadas, foram ressuspensas em 1 mL de água deionizada e então filtradas em membrana de acetato de 0,2 μm , empregando seringa de vidro de 5 mL e suporte plástico para membranas. Para identificar e quantificar os xilo-oligossacarídeos contidos nas amostras, foram elaboradas curvas de calibração com soluções padrões de xilobiose (X2), xilotriose (X3), xilotetraose (X4), xilopentose (X5) e xilohexose (X6) (Megazyme®) nas concentrações de 25 a 200 mg/L de açúcar, com base na massa molar de cada oligômero. As amostras foram analisadas com as colunas à 65 °C, detector de índice de refração à 35 °C e um fluxo de 0,5 mL/min. Água deionizada

filtrada através de membrana 0,45 µm e desaerada em banho ultrassônico por 30 min, foi utilizada como eluente. A área dos picos gerados no cromatograma foi determinada empregando o software Origin®2019, e a concentração dos oligômeros foi determinada através das curvas de calibração (APÊNDICE B).

4.6.4 Análise dos xilo-oligossacarídeos por cromatografia em camada fina (TLC)

Utilizou-se placas de sílica gel 60 F254 (Merck) como fase estacionária e, fase móvel composta pela mistura dos solventes acetato de etila, ácido acético, propanol, ácido fórmico e água nas proporções de 25:10:5:1:15 (PUCHART; BIELY, 2008). A solução reveladora foi preparada em 200 mL de etanol, com adição de 1,8 g de N-(1-Naftil)-etilenoamina dihidroclorato (Sigma) e acréscimo lento de 20 mL de ácido sulfúrico concentrado. As amostras foram aplicadas a 1 cm da parte inferior da placa, com 0,8 cm de distância entre as amostras.

Aplicou-se 1 µl de amostra de forma sucessiva até volumes de 2 ou 3 µl. De maneira similar, 2 µl da mistura de padrões (X₁: xilose, X₂: xilobiose, X₃: xilotriose, X₄: xilotetraose e X₅: xilopentaose – Megazyme) foram aplicados por placa. A placa foi transferida para a câmara de desenvolvimento, já com a mistura de solventes a corrida foi desenvolvida por 1 h e 30 minutos, até que o solvente ascendesse ao topo da placa. Ao fim da corrida cromatográfica, a placa foi seca em estufa a 45 °C e borrifada com a solução reveladora. Por fim, a placa foi incubada em estufa a 100 °C por 5 minutos para a revelação dos açúcares.

4.6.5 Análise de fenólicos totais

O conteúdo de fenólicos totais presentes nas amostras foi determinado pelo método Folin-Ciocalteu (ATHUKORALA; KIM; JEON, 2006). Os ensaios foram realizados em placa de 96 poços e avaliadas em espectrofotômetro modelo infinite M200 PRO (TECAN).

A reação consistiu na mistura de 100 µl de água destilada, 20 µl de etanol (95% v/v), 20 µl da solução de XOS, 10 µl do reagente Folin-Ciocalteu (50% v/v) e 20 µl da solução de carbonato de sódio (5% m/v). À solução de água, etanol e XOS adicionou-se o reagente Folin-Ciocalteu para reagir por 5 minutos. Logo em seguida acrescentou-

se o carbonato de sódio, e a placa contendo as amostras foi mantida no escuro por 1 hora, medindo-se em seguida a absorbância das amostras a 725 nm. O branco da reação foi preparado pela substituição da amostra de XOS por água destilada. Uma curva de calibração foi elaborada, empregando ácido gálico como padrão nas concentrações de 0,4; 0,3; 0,2; 0,1; 0,08; 0,07; 0,06 e 0,05 mM (75,25 a 9,4 mg/L) (APÊNDICE C). Os valores de fenólicos foram reportados em mg equivalente de ácido gálico (EAG).

4.7 Avaliação da atividade antioxidante dos xilo-oligossacarídeos

4.7.1 Método de captura de radicais livres do DPPH•

O método baseia-se na transferência de elétrons em que, por ação de um antioxidante, o DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), o qual possui cor púrpura, é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com consequente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorbância. A partir dos resultados obtidos determinou-se a porcentagem de atividade antioxidante ou sequestradora de radicais livres (BIAN et al., 2013).

A reação consistiu na adição de 50 µl da solução contendo XOS em 50 µl da solução de DPPH (0,1 mM) diluída em etanol (95% v/v). Após homogeneização do meio reacional, incubou-se as amostras no escuro por 2 horas, e em seguida foi feita a leitura destas em espectrofotômetro Infinite M200 PRO (TECAN) a 517 nm. Um controle negativo feito pela adição de etanol e DPPH, o aparelho foi zerado com etanol (95% v/v). Um controle adicional foi realizado para determinar o valor da absorbância das amostras diluídas em água destilada, uma vez que os cromóforos presentes na amostra podem absorver neste comprimento de onda, e podem interferir na quantificação da atividade antioxidante. A determinação da atividade de inibição do radical livre foi calculada pela equação (Eq. 4), em que Ax corresponde a absorbância da reação de XOS com o radical, e Ac a absorbância do controle da reação.

$$(\%) \text{ inibição de DPPH}^\bullet = \left(1 - \frac{A_x}{A_c}\right) \times 100 \quad (4)$$

Os valores de atividade foram reportados em micromolar equivalente de Trolox por micrograma de açúcar total dos XOS (µM Eq. Trolox/ µg de açúcar redutor). Para

tanto, uma curva de calibração foi preparada com soluções padrão de 2-carboxílico-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano (Trolox) em água, nas concentrações de 2, 4, 6, 20 e 80 μM (APÊNDICE D). Na construção da curva, os valores de inibição do radical obtidos pela Eq. 4 foram plotados em função das concentrações de Trolox.

4.7.2 Método de captura de radicais livres $\text{ABTS}^{\bullet+}$

O método de detecção da atividade antioxidante empregando o radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ também foi utilizando para a determinação da atividade antioxidante dos xiloligossacarídeos, obtidos da extração enzimática. Uma solução de $\text{ABTS}^{\bullet+}$ foi preparada pela adição de 44,5 μl de persulfato de potássio (140 mM) em 2,5 mL de ABTS (7 mM), com incubação no escuro por 16 horas. A solução de radicais $\text{ABTS}^{\bullet+}$ de cor esverdeada foi diluída em água destilada até absorvância de $0,7 \pm 0,1$ (730 nm). A reação antioxidante foi feita pela adição de 20 μl da solução de XOS em 180 μl da solução de $\text{ABTS}^{\bullet+}$. A reação de descoloração foi acompanhada em leitor de microplaca Epoch™ 2 (BIOTEC®) por 10 minutos com leitura a cada 1 minuto, em comprimento de onda de 730 nm. Como controle, substitui-se a solução contendo os XOS por água destilada (VALLS et al., 2018). O potencial antioxidante foi definido como porcentagem de inibição do radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ segundo a equação 5,

$$(\%) \text{ inibição } \text{ABTS}^{\bullet+} = 1 - \left(\frac{A_x}{A_c} \right) \times 100 \quad (5)$$

onde A_x corresponde a absorvância da reação de XOS com o radical, e A_c a absorvância do controle da reação.

O potencial antioxidante das amostras foi reportado em micromolar equivalente de Trolox por micrograma de açúcar total da amostra (μM Eq. Trolox/ μg de açúcar total). Para tanto, uma curva de calibração empregando o antioxidante sintético Trolox foi elaborada empregando as concentrações de 10, 15, 20 e 40 μM (em etanol) (APÊNDICE E).

4.7.3 Capacidade Antioxidante Total (CAT)

A capacidade antioxidante total foi determinada pelo método fosfo-molibdênio, conforme metodologia de Prieto, Pineda e Aguilar (1999). A solução contendo fosfato-molibdênio foi preparada pela mistura de ácido sulfúrico (0,6 M), fosfato de sódio (28 mM) e molibdato de amônio (4 mM) em água destilada. Os ensaios para CAT foram realizados em microtubos de 1,5 mL contendo 200 µl da solução de fosfo-molibdênio com acréscimo de 20 µl da amostra de XOS. A reação foi conduzida a 95 °C por 90 min. Após reação, as amostras foram resfriadas a temperatura ambiente e em seguida lidas em espectrofotômetro Infinite M200 PRO (TECAN), a 695 nm. O branco da reação foi preparado substituindo a amostra por água destilada. Para quantificar a capacidade antioxidante total, foi construída uma curva de calibração utilizando o antioxidante Trolox como padrão, nas concentrações de 0,1, 0,3, 0,8, 2, 5 e 9 mM, sobre as mesmas condições de reação dos ensaios supracitados (APÊNDICE F).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Extração enzimática da xilana

O uso de xilanases visando a extração de xilanas do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com sulfito alcalino foi empregado pela primeira vez por Sporck et al. (2017). Seu estudo comparou o rendimento e as características das xilanas obtidas pelo método enzimático, com dois métodos alcalinos tradicionais. O ensaio enzimático foi conduzido com 8 U de xilanase/g de bagaço em 5% (m/v) de sólidos, em uma condição levemente alcalina (pH 8) a 50 °C, por 24 h. Como resultado, obteve-se uma xilana mais pura que por métodos alcalinos, porém com menor rendimento (22%).

No intuito de aumentar os rendimentos de extração de xilana do bagaço pré-tratado com sulfito alcalino, propôs-se continuar os estudos de extração enzimática de xilanas, avaliando algumas características da xilanase presente no extrato comercial (Luminase PB-200) e, também o efeito da concentração de enzima e de substrato.

5.1.1 Influência da temperatura e pH

Inicialmente foi feito um estudo da termoestabilidade da enzima Luminase PB-200 nas temperaturas de 50 a 80 °C, em pH 6 e pH 8. Na Figura 11 é possível observar que para as temperaturas de 50, 60 e 70 °C a estabilidade da enzima teve pouca variação, mantendo mais de 80% da atividade enzimática nos pH 6 e 8 por 6 horas. Na temperatura de 80 °C observou-se uma diminuição da atividade relativa em 30% no pH 6 e 75% e pH 8. Com maior tempo de reação (24 h), nota-se uma diminuição mais acentuada na atividade residual com o aumento da temperatura, sendo esse efeito mais pronunciado em pH 8. Este comportamento de inativação das enzimas em temperaturas mais elevadas e tempos prolongados é amplamente aceito, e a interação com o pH evidencia como as características da enzima afetam a reação (PETERSON et al., 2007; DANIEL et al., 2010). Estudos de termoestabilidade da Luminase PB-200, realizados por Govender (2014) revelaram alta estabilidade da enzima até 80 °C, porém em 3 horas de incubação. O autor também mostrou que a Luminase PB-200 apresenta uma maior estabilidade térmica em relação a outras xilanases comerciais, dentre elas a Luminase PB-100 e a xilanase de *Thermomyces lanuginous* DSM 5826.

Figura 11 – Termoestabilidade da Luminase PB-200 em tampão fosfato de sódio, 50 mM, pH 6 e 8, por 24 h a 50, 60, 70 e 80 °C .

Fonte: Arquivo pessoal.

Nota: Desvio padrão das amostras menor que o marcador ($< 0,03$).

Considerando que a Luminase PB-200 apresentou mais de 50% de atividade residual em 15 h de reação em temperaturas até 70 °C, nos pH 6 e 8, mesmo na ausência de substrato (incubada em tampão), essas condições foram avaliadas nos ensaios de extração de xilanas do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com sulfito alcalino. Para tanto, foram fixadas a carga de sólidos em 5% (m/v) e a carga enzimática em 5 U de xilanase/g de bagaço pré-tratado. Os resultados referentes ao rendimento de extração de xilanas estão apresentados na Figura 12. Observa-se um aumento expressivo no rendimento de extração de xilana nas primeiras 3 horas de reação; além desta faixa de tempo, houve um aumento gradual, porém mais lento. Esse resultado foi atribuído à hidrólise das xilanas que se encontravam na superfície das fibras do bagaço, um comportamento típico do processo de extração de xilana de materiais submetidos a pré-tratamentos em condições alcalinas (RÉMOND et al., 2010; HAKALA; LIITIÄ; SUURNÄKKI, 2013; AGUEDO et al., 2014). Durante o pré-tratamento do bagaço há o consumo de álcali e um consequente abaixamento do pH, ocasionado a

reprecipitação de parte das xilanas na superfície das fibra, sendo provavelmente mais acessível a ação enzimática. Este fato foi evidenciado por Viikari et al. (1994), os quais mostraram que apenas 20% de xilana foi solubilizada de polpas kraft utilizando xilanase purificada do cultivo de *Trichoderma reesei*. Os autores concluíram que apenas as xilanas localizadas na superfície das fibras foram acessíveis às enzimas, e que as frações de xilanas que se localizam entre as fibras são de difícil acesso, especialmente quando baixas cargas enzimáticas são usadas.

Figura 12 – Extração de xilana do bagaço pré-tratado com sulfito alcalino com 5 U/g de Luminase PB-200 em 5% de sólidos, empregando diferentes temperaturas e pHs.

Fonte: Arquivo pessoal.

Os maiores rendimentos de xilana foram obtidos nos ensaios em pH 6, por 24 horas, com extração de 29,7% e 28,8% em 60 e 70 °C, respectivamente (Figura 12). Em pH 8, a cinética foi mais lenta, confirmando que a enzima atua de forma menos eficiente neste pH. É importante ressaltar que nos ensaios em pH 8 foram utilizados maiores volumes de enzima, para que a dosagem de enzima em todos os ensaios ficasse

padronizada em 5 U xilanase/g substrato. Considerando que a atividade de xilanase determinada nos pH 6 foi 1,3 vezes maior que no pH 8, essa foi a diferença entre os volumes de enzima aplicados nos experimentos. Combinando então, a menor quantidade de enzima necessária para a hidrólise com um maior rendimento de extração, a condução dos ensaios em pH 6 é a escolha mais adequada, visto que a utilização de menos enzimas significa reduzir os custos com esse insumo e tornar o processo mais competitivo (KLEIN-MARCUSCHAMER et al., 2012).

Com relação à temperatura, não se observa grandes variações nos rendimentos de extração de xilana, exceto no ensaio a 70 °C e pH 8. Este resultado sugere que, nas demais condições não ocorreram diferenças estruturais na enzima que influenciassem na taxa de reação. Porém, à 70 °C e pH 8 parece ter ocorrido uma maior perda de atividade enzimática em tempo prolongado de reação, como reportado nos ensaios de termoestabilidade. Também é possível que tenha ocorrido perda de afinidade da enzima pelo substrato, devido a mudanças conformacionais e desnaturação das enzimas (DANIEL et al., 2010). A maior termoestabilidade da enzima em ensaios conduzidos em pH 6 ajuda a explicar um maior rendimento de extração.

O efeito da temperatura sobre a solubilização de carboidratos foi avaliado na ausência da enzima (controles), sob as mesmas condições fixadas. Os rendimentos de extração obtidos em 24 h de reação foram de no máximo 4% em 50, 60 e 70 °C, em ambos pHs (Figura 13). Conforme discutido anteriormente, as xilanas solubilizadas são provavelmente uma parte daquelas que se redepositam sobre o bagaço após o pré-tratamento e que se encontram adsorvidas na superfície das fibras, e que não foram removidas na etapa de lavagem do pré-tratamento (SUURNÄKKI et al., 1996; DAHLMAN; JACOBS; SJÖBERG, 2003). Observa-se na Figura 13, que apesar da pequena diferença entre os rendimentos de extração em função do pH, o aumento da temperatura resulta em aumento de extração de xilana.

Figura 13 – Xilanas extraídas do bagaço pre-tratado com sulfito alcalino, na ausência de enzima e após 24 h de reação.

Fonte: Arquivo pessoal.

Após a extração enzimática da xilana do bagaço, foi feita uma extração alcalina branda das amostras visando retirar xilanas que porventura não foram solubilizadas, devido ao pH utilizado na reação enzimática (Tabela 3). Pela análise dos valores entre parênteses, referentes ao aumento do percentual de xilana extraída pelo tratamento alcalino, é possível verificar um aumento no rendimento de extração de xilana, especialmente dos bagaços que foram tratados com enzima na temperatura de 50 °C e pH 6. Esse resultado mostra que nestas condições as xilanas foram clivadas, mas não totalmente solubilizadas no meio, necessitando de pH mais alcalino para que isso ocorresse. Por outro lado, o bagaço que foi pré-incubado com a enzima a 70 °C e pH 8 apresentou a menor solubilização de xilana após o tratamento alcalino. Adotar temperaturas mais altas no processo de extração enzimática pode diminuir a necessidade de etapas posteriores de extração alcalina. Uma vez que os ensaios a 70 °C apresentaram maior extração de xilanas, tanto pela solubilização das xilanas quanto pela ação enzimática. Além disso, empregar a extração enzimática a 70 °C após o pré-tratamento realizado a 121 °C, implica em maior economia energética do processo, uma vez que é mais vantajoso abaixar a temperatura até 70 °C do que até 50 °C. A temperatura de 70 °C foi mantida nos demais ensaios de extração de xilana com a enzima Luminase PB-200.

Tabela 3 – Extração de xilana do do bagaço pré-tratado com sulfito alcalino em duas etapas sequenciais, enzimática e alcalina.

Amostras	Variáveis			Extração de xilana ¹ (%)
	pH	Temperatura (°C)	Tempo (h)	
A1	6	50	6	24,08 (7,8)
A2	8	50	6	17,98 (2,7)
A3	6	50	24	33,47 (7,5)
A4	8	50	24	26,64 (2,3)
A5	6	60	6	21,54 (3,4)
A6	8	60	6	18,57 (1,8)
A7	6	60	24	32,05 (2,3)
A8	8	60	24	26,20 (1,7)
A9	6	70	6	22,75 (3,3)
A10	8	70	6	15,97 (2,2)
A11	6	70	24	31,44 (2,6)
A12	8	70	24	22,11 (1,6)

Fonte: Arquivo pessoal.

Nota: ⁽¹⁾ xilana obtida após reação com 5 U/g de Luminase PB-200 seguido do tratamento com NaOH, pH 10, 90 °C. Em parênteses estão os aumentos obtidos pela extração alcalina em pontos percentuais.

A composição química, as substituições e o grau de polimerização dos produtos gerados são aspectos importantes a serem avaliados no processo de extração enzimática da xilana do bagaço de cana. A partir destas informações é possível entender o modo de ação das enzimas empregadas nas condições experimentais utilizadas, e determinar a aplicabilidade do produto gerado (CHIMPHANGO; ZYL; GÖRGENS, 2012; BIELY; SINGH; PUCHART, 2016). No intuito de avaliar de forma qualitativa os produtos (xilanas e XOS) obtidos por extração enzimática do bagaço, estes foram analisados por cromatografia em camada fina (TLC) (Figura 14). Nas condições dos ensaios, não se observou o aparecimento nos cromatogramas de mancha correspondente à xilose. Os perfis dos xilo-oligossacarídeos nos cromatogramas mostram que o aumento do tempo e da temperatura de extração produzem bandas de coloração mais intensa na placa, associada à concentração dos produtos. Para todos os ensaios, os produtos mais abundantes foram XOS com graus de polimerização de X₃ a X₅, principalmente em pH 6, sendo possível notar ainda que em pH 6 de 3 a 24 horas

de reação, ocorreu o aparecimento de bandas correspondentes a xilobiose (X_2), e que este efeito é menor em pH 8. O aparecimento de xilobiose ao longo do tempo pode indicar que a enzima passou a clivar xilanas mais acessíveis, ou seja, aquelas que foram extraídas previamente, especialmente em pH 6 onde a enzima se encontra mais ativa. A pequena disparidade entre a posição das amostra e dos padrões pode indicar a presença de grupos laterais nos xilo-oligossacarídeos extraídos.

Figura 14 – TLC dos produtos de reação da Luminase PB-200 (5 U/g) com 5% (m/v) de bagaço pré-tratado com sulfito alcalino em diferentes temperaturas e pH.

Fonte: Arquivo pessoal.

Nota: (P) Padrão de XOS: X_1 xilose, X_2 xilobiose, X_3 xilotriose, X_4 xilotetraose, X_5 xilopentaose. XOS obtidos em reação em pH 6 (p6) e pH 8 (p8) em 3h, 6h e 24h de reação.

A composição química das xilanas extraídas do bagaço por Luminase PB-200 foi determinada e o grau de substituição foi calculado pela relação entre arabinose e xilose (A:X) (Tabela 4). No pH 6 e a 50 °C, observa-se que com o aumento do tempo de reação os produtos gerados são menos substituídos. Em pH 8, verifica-se uma pequena diminuição no grau de substituição da xilana. Como se utilizou um extrato enzimático bruto para a extração das xilanas, é possível que haja nele alguma atividade de arabinofuranosidase, mas com maior atuação em pH 6. Sporck et al. (2017) também reportaram o valor médio de 16:100 para a relação A:X dos compostos extraídos do bagaço pré-tratado com sulfito alcalino em pH 8 e 24 h a 50 °C, confirmando o padrão de clivagem da enzima (Tabela 4).

Nas demais temperaturas, a relação A:X permaneceu praticamente a mesma, tanto no pH 6 como no 8, sugerindo uma remoção de algumas arabinoses devido a temperatura de incubação.

Tabela 4 – Relação Arabinose:Xilose (A:X) da fração de xilana extraída do bagaço pré-tratado com sulfito alcalino (5%), empregando 5 U de Luminase PB-200.

Amostras	50 °C	60 °C	70 °C
pH 6 – 6 h	16:100	14:100	14:100
pH 6 – 24 h	12:100	13:100	13:100
pH 8 – 6 h	17:100	15:100	14:100
pH 8 – 24 h	16:100	15:100	13:100

Fonte: Arquivo pessoal.

Nota: relação A:X determinada pela relação arabinosil (g)/ xilose (g).

5.1.2 Efeito da concentração de sólidos e carga de enzima na extração de xilana

A hidrólise da biomassa lignocelulósica por via enzimática usualmente é realizada em baixas cargas de sólidos (5% m/v), permitindo uma eficiente transferência de massa e difusão das enzimas pelo substrato insolúvel. Contudo, na tentativa de aumentar a produtividade e conseguir maior economia em processos de extração de polissacarídeos de material lignocelulósico, uma das propostas foi empregar maiores cargas de sólidos (ROCHE et al., 2009a; BATTISTA et al., 2018; DUTTA; CHAKRABORTY, 2018). Outra forma de aumentar o rendimento dos produtos da reação enzimática diz respeito ao aumento da carga de enzimas. O aumento na dosagem de enzimas foi estudada na tentativa de contornar os efeitos negativos da alta carga de sólidos (GENG et al., 2015).

Neste trabalho foram realizados ensaios de aumento na carga de sólidos e de enzima, empregando um planejamento experimental fatorial completo 2². Os ensaios foram realizados utilizando a enzima Luminase PB-200 na extração de xilana do bagaço de cana pré-tratado, em reação conduzida em pH 6, 70 °C por 24 horas.

De uma forma geral, é possível notar que o aumento na carga de sólidos de 5% para 15% resultou na diminuição no rendimento de xilanas extraídas (Tabela 5). Por exemplo, no ensaio E2 extraiu-se 27,5% menos xilana que no ensaio E1 e no ensaio

E4, foram 12,8% menos xilana que no ensaio E3. Essa diminuição no rendimento de hidrólise com o aumento na carga de sólidos está de acordo com dados reportados na literatura para a hidrólise da biomassa lignocelulósica em cargas altas de sólidos (MUSSATTO et al., 2008; ZHANG et al., 2009; CASPETA et al., 2014; DU et al., 2017; GENG et al., 2015). O decréscimo no rendimento pode ser explicado pelos fatores limitantes à ação enzimática, como a baixa homogeneização e transferência de massa devido à alta viscosidade, o baixo teor de água livre disponível e o acúmulo de inibidores (ROCHE et al., 2009a; ZHANG et al., 2009; MODENBACH; NOKES, 2013; BATTISTA et al., 2018; SILVA et al., 2016; WOJTUSIK et al., 2016).

Tabela 5 – Extração de xilana do bagaço pré-tratado com sulfito alcalino (SAL) com Luminase PB-200 (pH 6, 70°C, 24h) .

Ensaio	Variáveis independentes		Variável resposta	Extração de xilana (mg)
	Carga de sólidos (%)	Carga enzimática (U/g)	Extração de xilana (%)	
E1	5	5	32,25	4,14
E2	15	5	23,37	11,19
E3	5	45	37,07	5,00
E4	15	45	32,33	15,68
E5*	10	25	29,69	8,3
E6*	10	25	28,82	9,22
E7*	10	25	29,15	9,43

Fonte: Arquivo pessoal.

Nota: * Pontos centrais.

Em relação à carga enzimática, observa-se que a variação de 5 para 45 U aumentou os rendimentos de extração de xilana do bagaço pré-tratado (Tabela 5), com ganho principalmente na maior carga de sólidos (15% m/v). Entretanto, o rendimento obtido não foi proporcional à carga enzimática, pois o aumento em 9 vezes na carga de enzimas possibilitou o aumento no rendimento de 1,14 e 1,4 vezes nos ensaios com 5 e 15% (m/v) de sólidos, respectivamente. O aumento relativamente baixo no rendimento de extração a 5% (m/v) com o incremento da carga enzimática, pode ser atribuído ao esgotamento da fração de xilana mais acessível na superfície da fibra (VIIKARI et al., 1994). Outro fator que pode estar ligado à baixa conversão da fração hemicelulósica é a adsorção não-específica das xilanases à lignina residual presente no

bagaço pré-tratado (ZHANG et al., 2013). Outros estudos mostraram esse mesmo efeito de redução de rendimentos de hidrólise de materiais lignocelulósicos em elevados teores de sólidos. Por exemplo, Geng et al. (2015) avaliaram a influência da carga de sólidos e carga de enzima na hidrólise da palha de milho pré-tratada com ácido diluído. Os autores avaliaram a sacarificação da palha de milho nas cargas de 5, 10 e 15% (m/v) de sólidos, obtendo em 96 horas de hidrólise, rendimentos de conversão dos carboidratos de 78, 76 e 73%; apresentando como no presente trabalho, uma queda gradual no rendimento devido ao aumento na carga de sólidos. Por outro lado, o aumento na dosagem de enzima apresentou efeito positivo no rendimento de hidrólise, aumentando a conversão de carboidratos em todas as cargas de sólidos estudadas.

Liu et al. (2017) estudaram o efeito da diminuição de água livre sobre a eficiência catalítica das enzimas. Ao substituir parcialmente o conteúdo de água por glicerol ou sorbitol do meio reacional, preparado com bagaço de cana pré-tratado com NaOH em alto teor de sólidos, os autores observaram uma diminuição nos rendimentos de sacarificação do bagaço. O decréscimo na eficiência de conversão evidencia o papel fundamental da água na hidrólise enzimática, uma vez que a água é necessária para o transporte da enzima e dispersão do produto gerado e também por ser um componente da reação (KRISTENSEN; FELBY; JORHENSEN, 2009; MODENBACH; NOKES, 2013).

Sendo assim, a complexa natureza da biomassa lignocelulósica e da hidrólise enzimática deste material não nos possibilita distinguir claramente o principal fator que leva ao baixo rendimento de extração de xilana do bagaço. Assim, foi feita a avaliação combinada da carga de sólidos e da carga enzimática. Uma análise baseada em modelos poderia ser útil para explicar as interações entre a enzima e o substrato. O modelo baseado em Michaelis-Menten leva em conta as reações homogêneas, logo não poderia ser aplicado à parte insolúvel da xilana, presente nos materiais lignocelulósicos. A condição necessária deste modelo é que a concentração de substrato esteja em excesso em relação a carga de enzima. Outros modelos levam em conta a adsorção, no entanto, podem fornecer informações apenas dependentes da concentração de substrato e não considera mudanças estruturais do substrato durante a reação (BANSAL et al., 2009; ANDERSEN et al., 2018). Sendo assim, a influência dos fatores carga de sólidos e carga de enzima sobre o rendimento de extração de xilana foi avaliada neste trabalho através de um modelo empírico mais simples, baseado nos

dados experimentais e análise estatística do teste *t* de Student, com a significância das variáveis expressas no gráfico de Pareto (Figura 15) (APÊNDICE G).

O modelo revelou que a carga enzimática e a interação entre as variáveis, carga de sólidos e carga enzimática, como fatores positivos no processo, enquanto a carga de sólidos teve efeito negativo (-15,50). A interação entre os dois fatores indica uma codependência dos efeitos destas variáveis. Um exemplo desta codependência pode ser observado no trabalho de Zhang et al. (2009), em que foi avaliado o efeito do aumento da carga enzimática na hidrólise de álamo, a 20% (m/v) de sólidos. Estes autores reportaram que apesar do aumento na carga de enzima em 50%, o rendimento final de açúcares não foi proporcional, aumentando de 124,5 g/L para 158,2 g/L.

Figura 15 – Gráfico de Pareto para a estimativa dos efeitos das variáveis carga de sólidos (A) e carga de enzimas(B) sobre o rendimento de extração de xilana do bagaço pré-tratado com sulfito alcalino.

Fonte: Arquivo pessoal.

Nota: (+) efeito positivo da variável sobre o processo, (-) efeito negativo da variável sobre o processo.

As condições ótimas previstas pelo planejamento definem a carga de sólidos em 5% (m/v) e carga de enzima em 45 U de xilanase/g de bagaço. No entanto, ao se determinar a eficiência da extração em termos de xilana extraída (mg) por carga enzimática utilizada (Tabela 5), a condição prevista é a menos eficiente, obtendo valor de eficiência de 0,11. Observa-se pelos dados tabelados, que a maior eficiência foi alcançada no ensaio de 15% (m/v) empregando 45 U de xilanase (2,24), seguida pelo ensaio com menor carga de sólidos e enzima (0,83). Uma vez que o processo empregando 5% (m/v) de sólidos e menor carga enzimática (5 U) apresenta um dos

maiores rendimentos de extração de xilana e foi eficiente em termos de liberação de xilana, essas condições foram definidas para os demais experimentos.

Os perfis de xilo-oligossacarídeos extraídos em maior carga de sólidos e enzima apresentaram predominantemente XOS com cadeias entre 3 e 5 unidades de xilose (X₃ e X₅) (Figura 16). Além da similaridade no grau de polimerização dos XOS, a relação A:X também se manteve entre 14:100 – 16:100.

Figura 16 – TLC dos produtos da reação da Luminase PB-200 realizadas nas condições do planejamento fatorial 2².

Fonte: Arquivo pessoal

Nota: (P) Padrão de XOS: X1 xilose, X2 xilobiose, X3 xilotriose, X4 xilotetraose, X5 xilopentaose; (E1) 5% (m/v) e 5 U/g, (E2) 15% (m/v) e 5 U/g, (E3) 5% (m/v) e 45 U/g, (E4) 15% (m/v) e 45 U/g, (E*) 10% (m/v) e 25 U/g.

5.2 Emprego de enzimas acessórias na extração de xilana do bagaço SAL

Conforme reportado na literatura, os grupos pendentes da xilana limitam a sua completa hidrólise a monossacarídeos (BIELY; SINGH; PUCHART, 2016). Esse fator poderia estar contribuindo para os baixos rendimentos de xilana obtidos nos ensaios enzimáticos, tendo em vista que a enzima atuaria até um determinado ponto, tendo sua atividade limitada. Dessa forma, os oligômeros formados seriam maiores e portanto mais difíceis de serem solubilizados do material. Objetivando o aumento no rendimento de extração de xilana do bagaço pré-tratado com sulfito alcalino, foi avaliada a suplementação do preparado enzimático de Luminase PB-200 com as enzimas acessórias, arabinofuranosidase (Araf) e feruloil esterase (FEA). Tais enzimas

têm como função a remoção dos grupos laterais arabinosil e feruloil, e consequentemente diminuem o efeito de impedimento estérico pela remoção destes grupos. As condições experimentais foram escolhidas de forma a não afetar a atuação das enzimas empregadas e promover um maior rendimento de extração de xilana ao final do processo. Para tanto, as reações foram conduzidas a 50 °C, pH 6, durante 24 horas, empregando carga de sólidos de 5% (m/v) e carga de endo-xilanase de 5 U/g de bagaço. Foi fixado a carga das enzimas acessórias em 1 mg de proteína/g de bagaço, como controle foi empregando o BSA.

A Tabela 6 apresenta os rendimentos obtidos com a adição de enzimas acessórias na hidrólise do bagaço pré-tratado. Como pode ser observado, nas amostras em que foram utilizados BSA obteve-se um maior rendimento de extração de xilana, se comparado com o emprego isolado da Luminase. Tal resultado sugere que a proteína BSA esteja agindo como estabilizante da Luminase, uma vez que esta propriedade de agir como estabilizante não-específico em preparados enzimáticos é extensivamente reportada para a proteína BSA (SILVA et al., 2018; KOUBAA et al., 2019). Outra explicação para o aumento da extração de xilana na presença do BSA seja a redução na adsorção inespecífica da luminase, quando na presença de outras proteínas. Isso pode ser deduzido também pelos ensaios realizados com a adição das outras enzimas, que também aumentaram a extração de xilana. Entretanto, o melhor resultado de extração de xilana foi obtido pela adição de arabinofuranosidase, evidenciando também o efeito positivo de sua remoção da cadeia de xilana. A adição da enzima feruloil esterase não apresentou esse mesmo efeito, quando empregada com a Luminase e tampouco na presença de arabinofuranosidase. É muito provável que nas condições do pré-tratamento (10% Na₂SO₃/5% NaOH, 2 h, 120 °C), a maior parte dos ferulatos ligados à arabinose por ligação ésteres não resistam e sejam removidos do bagaço (REINOSO et al., 2018). Entretanto, estes autores mostraram que uma parte dos ferulatos poderiam resistir ao pré-tratamento devido a acessibilidade dos reagentes na matriz lignocelulósica do bagaço. A extração da xilana pela adição conjunta da Luminase, arabinofuranosidase e feruloil esterase foi semelhante à obtida com a luminase, sugerindo a ocorrência de inibição de xilanase pelos aromáticos liberados, conforme relatado em vários trabalhos (MICHELIN et al., 2016, XIMENES et al., 2011, BOUKARI et al., 2011).

À excessão da xilana extraída com a mistura contendo xilanase e arabinofuranosidase, as demais xilanas extraídas apresentaram um grau de ramificação

muito semelhante (Tabela 6). No geral, a relação A:X manteve-se em torno de 15:100, mas no ensaio suplementado com arabinofuranosidase essa relação aumentou para 18:100. Como esta análise foi feita após uma hidrólise ácida do material extraído, de forma a levar seus constituintes a monômeros, é possível que o enriquecimento em arabinose no material extraído, seja devido à ação da arabinofuranosidase nos grupos arabinosil das cadeias de xilanas que não foram removidas do bagaço.

Tabela 6 – Efeito combinado entre a endo-xilanase Luminase PB-200 e enzimas acessórias na extração de xilana do bagaço pré-tratado.

Ensaio	Extração de xilana (%)	Relação arabinosil/xilose (A:X)
Luminase	29,32	15:100
Luminase/BSA (1mg)	38,67	15:100
Luminase /Araf	39,41	18:100
Luminase/FEA	34,92	15:100
Luminase/BSA (2 mg)	39,84	14:100
Luminase/Araf/FEA	31,23	14:100

Fonte: Arquivo pessoal.

Nota: BSA – Soro de albumina bovina, Araf – arabinofuranosidase, FEA – Feruloil esterase.

Figuerola-Espinoza et al. (2004) avaliaram o efeito das enzimas arabinofuranosidase e feruloil esterase na extração de arabinoxilana de farelo de centeio, com endo-xilanase de *Bacillus subtilis*. Como resultado, os autores reportam um aumento de 8% no rendimento de extração ao empregar a enzima arabinofuranosidase junto à endo-xilanase. No entanto, os ensaios com adição da enzima feruloil não apresentaram efeito sinérgico, não aumentando o rendimento de extração em relação ao controle utilizando apenas a endo-xilanase. Os autores não avaliaram o efeito combinado das duas enzimas junto à endo-xilanase.

Goldbeck et al. (2016) estudaram o efeito das enzimas acessórias arabinofuranosidase e feruloil esterase em conjunto com as endo-xilanases das famílias GH11 e GH10 sobre a hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com ácido fosfórico. Ao hidrolisar o bagaço pré-tratado com combinações das enzimas, os resultados obtidos mostraram que o efeito sinérgico entre as enzimas variou conforme a endo-xilanase empregada. Os resultados mostram um efeito positivo da adição de

arabinofuranosidase e feruloil esterase na conversão de hemicelulose, com rendimento na conversão de hemicelulose de 4,24% quando utilizou a xilanase GH10 e de 16,73% com a xilanase GH11. Entre as combinações das enzimas estudadas pelos autores, o maior efeito sinérgico foi observado para o ensaio com GH11 e feruloil esterase, com rendimento de conversão de 21,36%. Já no presente trabalho, o maior efeito sinérgico dentre as combinações, foi para a Luminase/Araf, com aumento de 25,6% na extração de xilana em relação a extração apenas com Luminase.

A atuação sinérgica entre as enzimas hemicelulolíticas e enzimas acessórias na extração de xilana depende de vários fatores, como por exemplo, da natureza do material a ser hidrolisado, condições de pH e temperatura, e a carga de enzimas empregada (OLIVEIRA et al., 2019). Além destes fatores, a combinação de algumas enzimas podem gerar um efeito antagônico (GOLDBECK et al., 2016), resultando em um decréscimo no rendimento do produto, se comparado ao emprego destas separadamente. A combinação das enzimas Luminase, arabinofuranosidase e feruloil esterase alcançou o menor rendimento entre os combinados enzimáticos (31,23%); esta diminuição no rendimento podendo ainda estar relacionada aos fatores supracitados. Outra possível explicação para a diminuição no rendimento de extração pode estar ligada à formação de agregados intermoleculares parcialmente insolúveis de xilana, que são formados pela remoção dos grupos arabinosil e feruloil. Estes agregados diminuem a acessibilidade tanto para as enzimas acessórias quanto para a endo-xilanase (MENDIS; SIMKE, 2015). Apesar disso, o ensaio Luminase/Araf/FEA ainda apresentou rendimento de extração superior ao ensaio apenas com Luminase.

A Figura 17 mostra os perfis dos xilo-oligossacarídeos gerados com o emprego das enzimas acessórias. As amostras controles, Luminase com BSA, apresentaram perfis mais parecidos, sem a presença visual de bandas correspondentes a xilose (X_1), com predominância de XOS com 2 a 5 monômeros de xilose com ramificações. Comparativamente, os oligômeros obtidos apenas pela ação da luminase apresentaram bandas menos intensas com algumas variações no fator de retenção. As demais amostras também contêm XOS do tipo X_3 , X_4 e X_5 com diferenças na distância em relação ao padrão (P), indicando a presença em maior ou menor grau de grupos laterais.

Figura 17 – Cromatograma do efeito combinado das enzimas acessórias na extração de xilana do bagaço pré-tratado com sulfito alcalino.

Fonte: Arquivo pessoal.

Nota: (P) Padrão de XOS: X₁ xilose, X₂ xilobiose, X₃ xilotriose, X₄ xilotetraose, X₅ xilopentaose. (CB1) Luminase PB-200 + 1 mg de BSA ; (CB2) Luminase PB-200 +2 mg de BSA ; (LuP) Luminase PB-200; (LX) Luminase PB-200+ Arabinofuranosidase; (LF) Luminase PB-200 + Feruloil esterase; (LXF) Luminase PB-200 + Arabinofuranosidase + Feruloil esterase.

Apesar do emprego das enzimas acessórias aumentar o rendimento de extração de xilana, é sabido que a remoção dos grupos laterais por estas enzimas implica na perda de certas características físico-químicas atribuídas às xilanas, como solubilidade (SAULNIER et al., 2007; BIELY; SINGH; PUCHART, 2016) e potencial antioxidante (MATHEW; KARLSSON; ADLERCREUTZ, 2017; YUWANG et al., 2018). Consequentemente, as xilanas e XOS gerados neste processo devem ser destinados a outros fins que não envolvam tais características, como prebióticos (MATHEW; KARLSSON; ADLERCREUTZ, 2017), biopolímeros (PENG et al., 2012), suplementação alimentar humana e animal (MORTIMER et al., 2010), aditivo na indústria de papel e celulose (SCHÖNBERG et al., 2001), dentre outras aplicações.

5.3 Avaliação no aumento de escala da extração enzimática de xilana do bagaço pré-tratado com sulfito alcalino

A extração enzimática do bagaço de cana-de-açúcar foi realizada em escala preparativa, a fim de que os xilo-oligossacarídeos obtidos nesta etapa fossem recuperados e caracterizados. A reação foi realizada em duas escalas diferentes nas condições mais eficientes de extração de xilanas obtidas no presente trabalho. Desta forma, os ensaios foram realizados com 5% (m/v) de sólidos, 5 U de Luminase PB-200/g de bagaço, a 70 °C no pH 6, por 24 horas. Os ensaios em menor escala foram realizados em volume reacional de 10 mL e o de maior escala em 200 mL, mantendo-se a mesma proporção de volume de meio por volume de frasco.

Figura 18 – Extração enzimática da xilana do bagaço pre-tratado, em escala preparativa.

Fonte: Arquivo pessoal.

Nota: Controle – Reação na ausência de enzima; V10mL – hidrólise enzimática conduzida em volume final de 10 mL; V200mL – hidrólise enzimática em 200 mL.

Na Figura 18 pode-se observar que o comportamento de extração em ambas escalas foram semelhantes, atingindo rendimentos de 30 e 28%, respectivamente. Este resultado demonstra a viabilidade na ampliação de escala do processo, desde que as condições deste sejam mantidas constantes. Os resultados obtidos mostram que a adoção de critérios simples como a proporcionalidade entre o volume de trabalho dos frascos possibilitam a previsão do comportamento de dado processo em uma maior escala (PRADO J. M., PRADO G. H. C., MEIRELES, 2011). Roche, Dibble e Stickel (2009b) também adotaram como critério o volume de trabalho dos frascos ao aumentarem a escala do processo de sacarificação enzimática de palha de milho. A

ampliação foi realizada com carga fixa de 20% (m/v) de sólidos, em frascos de 125 mL e 2 L, obtendo em ambas as escalas o mesmo padrão de sacarificação.

Estudos de ampliação de escala usualmente são necessários como etapa prévia à implementação de processos em escala industrial. Neste contexto, a etapa inicial em escala laboratorial é de suma importância na definição de parâmetros operacionais que possuam reprodutibilidade em maior escala. A definição destes parâmetros e a escolha dos critérios no aumento de escala podem variar a depender da forma como o processo será conduzido (PRADO J. M., PRADO G. H. C., MEIRELES, 2011; NASCIMENTO, 2016; LI et al., 2013).

Observou-se uma pequena redução nos rendimentos de extração de xilana em comparação aos obtidos nos ensaios em microescala. É importante ressaltar que nesse ensaio o bagaço pré-tratado não foi moído e também não foi excessivamente lavado. A menor área superficial e a transferência de massa e calor menos eficientes, podem ter influenciado negativamente o rendimento de extração das xilanas (KHULLAR et al., 2013). Por outro lado, os ensaios controles apresentaram maior liberação de açúcares do que os controles em microescala (Figura 13), provavelmente porque este bagaço foi lavado com menor volume de água e portanto havia xilanas redepositadas sobre o bagaço após o pré-tratamento, que foram então solubilizadas durante a incubação das amostras a 70 °C (SUURNÄKKI et al., 1996; DAHLMAN; JACOBS; SJÖBERG, 2003).

As massas molares dos xilo-oligosacarídeos obtidos após 24 h de reação da Luminase no bagaço pré-tratado, foram determinadas por cromatografia de exclusão por tamanho (Figura 19). Na parte A está mostrado o perfil de eluição dos padrões e na parte B a eluição das xilanas. O pico 1 corresponde as xilanas poliméricas com massa molar ponderal média (mM) maior que 1800 g/mol, o pico 2 com 880 g/mol e o pico 3 com 595 g/mol (Figura 19). A massa molar média ponderal correspondente aos xilo-oligosacarídeos (Pico 2-3) foi de 703 g/mol (Tabela 7).

Figura 19 – Perfil de separação das xilanas do hidrolisado enzimático obtido a partir do bagaço pré-tratado SANL.

Fonte: Arquivo Pessoal

Nota: Curva em preto – Eluição dos padrões em coluna Biogel P2; curva em azul – Eluição da xilana extraída enzimaticamente por 24 h do bagaço pré-tratado com sulfito alcalino; 1, 2 e 3 – picos separados da xilana extraída.

Tabela 7 – Massas molares correspondentes aos picos de eluição dos xilo-oligosacarídeos em coluna de exclusão por tamanho (Biogel P2).

Fração	Mm	Mn
Hidrolisado	1187	933
Pico 1	>1800 ²	>1800 ²
Pico 2-3 ¹	703	673
Pico 2	880	874
Pico 3	595	589

Fonte: Arquivo Pessoal

Nota: Mm – massa molar ponderal média; Mn – massa molar numérica média; ⁽¹⁾ Fração correspondente a união dos picos 2 e 3; ⁽²⁾ massa molar maior que 1800 g/mol.

5.4 Avaliação de métodos de separação de xilanas

5.4.1 Fracionamento de xilanas por precipitação com etanol

Um dos métodos mais comuns empregados na purificação e fracionamento de xilanas é a precipitação por solvente orgânico, sendo o etanol o solvente mais comumente empregado. Esse método baseia-se na diferença de solubilidade da xilana e da lignina na presença de solventes orgânicos (YOU et al., 2019). Além do etanol, outros solventes também podem ser utilizados com esta finalidade, como o metanol e

a acetona (PENG et al., 2012). Este método apresenta muitas vantagens como sua fácil manipulação, ser um método eficiente e de relativo baixo-custo, pois é possível recuperar o solvente ao final do processo. No entanto, xilanas de cadeias menores são mais solúveis e mais difíceis de precipitar mesmo com o emprego de etanol em altas concentrações (PENG et al., 2012; PENG et al., 2014; LIU et al., 2016b).

Ao hidrolisado enzimático, obtido a partir da reação da Luminase com o bagaço pré-tratado com sulfito alcalino, foi adicionado etanol nas concentrações de 30, 60 e 90% (v/v) para a precipitação das xilanas. Os precipitados gerados foram ressuspendidos em solução alcalina pH 12, e caracterizados quanto sua massa molar por cromatografia de exclusão por tamanho (Figura 20). A fração de xilanas que não precipitou com 90% (v/v) de etanol (SB90) também foi recuperada e caracterizada (Figura 20D).

A precipitação sequencial com etanol foi capaz de precipitar 48,8% das xilanas do hidrolisado enzimático. A maior parte destas (88%) foi eluída no volume vazio da coluna Biogel P2, cuja faixa de separação está entre 100 e 1800 g/mol, indicando assim que estas xilanas possuíam massa molar superior a 1800 g/mol (Figuras 20A-C).

Uma parte das xilanas poliméricas com massa molar igual ou superior a 1800 g/mol ainda permaneceu no sobrenadante, e também foi eluída no volume vazio da coluna (Figura 20D – pico 1). Essas xilanas não precipitaram provavelmente porque apresentam cadeias menores ou mais substituídas (PENG et al., 2011). Esta influência dos grupos laterais sobre a precipitação de polissacarídeos utilizando etanol foi observado por Liu et al. (2016b) ao precipitarem galactomananas de semente de *Gleditsia sinensis* (GSG) e *Gleditsia microphylla* (GMG) com etanol nas concentrações finais de 23,1, 28,6 e 33,3% (v/v). Como resultado, os autores obtiveram rendimento de precipitação próximos, de 81,7 e 82,9% para a galactomanana GSG e GMG, respectivamente. No entanto, durante as etapas de precipitação sequencial com etanol, foi observado que houve maior precipitação das galactomananas menos substituídas (GMG). Os autores atribuem esse efeito a menor solubilidade desses carboidratos pela menor densidade de ligações de hidrogênio, ligações estas promovidas pelos grupos laterais de galactose, que influenciam a solubilidade destes polissacarídeos.

Figura 20 – Perfil das xilanas presentes em cada fração obtida após a precipitação com gradiente de etanol em coluna de exclusão por tamanho (Biogel P2).

Fonte: Arquivo pessoal

Nota: A – amostra precipitada com 30% (v/v) de etanol; B – amostra precipitada com 60% (v/v) de etanol; C – amostra precipitada com 90% (v/v) de etanol; D – sobrenadante da precipitação com 90% (v/v) de etanol. Absorbância a 490nm, corresponde ao açúcar total pelo método fenol-sulfúrico.

Como pode ser observado na Figura 20, a massa molar ponderal média das xilanas precipitadas foi acima de 1800 g/mol, para todas as concentrações de etanol empregadas. No entanto, em processos de precipitação com gradiente de etanol é esperado que ocorra o fracionamento de xilanas pela diferença de solubilidade, em que xilanas maiores e menos substituídas são precipitadas a baixas concentrações de etanol (PENG et al., 2012). A similaridade entre as massas molares ponderais média obtidas empregando concentrações crescentes de etanol, sugere que a coluna empregada não foi eficiente na separação de xilanas, uma vez que a faixa de separação da coluna não permitiu a distinção entre massas molares superiores a 1800 g/mol. Colunas de exclusão por tamanho como a Biogel P30 podem ser empregadas na caracterização de xilanas com maior grau de polimerização (SPORCK et al., 2017). Cornetti (2018),

realizou o fracionamento de xilanas extraídas enzimaticamente (5U Luminase PB-200, pH 8, 6 h) com etanol e mostrou que as xilanas que precipitaram com 30% de etanol apresentaram massa molar aproximada de 30 kDa e a fração solúvel apresentava uma fração de 7 kDa e 2,8 kDa, analisada em Biogel P30. Neste estudo não foi possível separar os XOS de menor tamanho.

Tendo em vista que este trabalho está centralizado na obtenção de XOS, a caracterização abordada primou pela separação de xilanas de menor grau de polimerização, assim optando pelo uso da coluna Biogel P2. As xilanas com maior grau de polimerização obtidas durante a precipitação podem ser destinadas a inúmeras aplicações, como a produção de hidrogéis, na elaboração de cosméticos e também podem ser hidrolisados para a produção de XOS (VÁZQUEZ et al., 2000).

A Tabela 8 apresenta a caracterização das xilanas presentes no sobrenadante da precipitação com 90% (v/v) de etanol (Figura 20D). As xilanas contidas no sobrenadante (SB90) apresentaram massa molar média ponderal de 1025 g/mol com baixa dispersividade (1,31). As frações PF1, PF2 e PF3 obtidas a partir do fracionamento do sobrenadante SB90 por exclusão por tamanho, tiveram massas molares ponderais médias de 1727, 834 e 511 g/mol, respectivamente. O índice de dispersividade das amostras PF1, PF2 e PF3 foi próximo de 1,0, uma vez que a separação dos picos para determinação de suas massas eleva a homogeneidade das amostras, e consequentemente aproxima os valores de M_m e M_n .

Tabela 8 – Caracterização das xilanas precipitadas com gradiente de etanol quanto a massa molar ponderal média (M_m), massa molar numérica média (M_n) e índice de dispersividade (D).

Amostra	M_m (g/mol)	M_n (g/mol)	D
SB90	1025	783	1,31
PF1	1727	1702	1,01
PF2	834	814	1,02
PF3	511	500	1,02

Fonte: Arquivo Pessoal

Nota: M_m – Massa molar ponderal média; M_n – Massa molar numérica média; D – Índice de dispersividade; SB90 – xilana presente no sobrenadante após precipitação com 90% (v/v) de etanol; PF1, PF2 e PF3 – frações separadas a partir do sobrenadante da precipitação com 90% (v/v) de etanol.

A análise das xilanas precipitadas por etanol revelou bandas muito fracas no TLC, correspondentes aos xilo-oligossacarídeos (X_2 a X_5) e, uma mancha forte na origem de aplicação de cada fração (Figura 21). No sobrenadante (SB90) foi possível visualizar mais nitidamente as bandas correspondentes aos xilo-oligossacarídeos de X_2 a X_5 . Essa análise visual corrobora a eficiência da precipitação com etanol em separar xilanas com maior grau de polimerização dos xilo-oligossacarídeos.

Figura 21 – Cromatograma em camada fina das frações precipitadas com etanol.

Fonte: Arquivo pessoal

Nota: P – Padrão de xilo-oligossacarídeos; HE – hidrolisado hemicelulósico obtido a partir do bagaço pré-tratado com sulfito alcalino; P30E – xilana precipitada com 30% (v/v) de etanol; P60E – xilana precipitada com 60%(v/v) de etanol; P90E – xilana precipitada com 90% (v/v) de etanol; SB90 – xilana presente no sobrenadante da precipitação com 90% (v/v) de etanol.

Levando em consideração que 50% dos xilo-oligossacarídeos presentes no hidrolisado enzimático não foram precipitados com etanol, mesmo em concentrações elevadas (90% v/v), utilizou-se uma estratégia alternativa de separá-los pelo método de adsorção em carvão ativado, seguida por eluição com gradiente de etanol.

5.4.2 Purificação dos xilo-oligossacarídeos

Diversos são os métodos empregados na separação e purificação de xilo-oligossacarídeos, alguns destes métodos incluem o uso cromatografias (como as de troca iônica), membranas de separação por tamanho, extração com solventes orgânicos e adsorção em carvão ativado (OTIENO; AHRING, 2012; ZHANG et al., 2018). A

escolha do método a ser empregado, além de levar em consideração a pureza final do produto, também avalia a seletividade, acessibilidade, recuperabilidade e economia do processo (OTIENO, AHRING, 2012).

Neste contexto, a adsorção em carvão ativado foi empregada neste trabalho para separação e purificação dos xilo-oligossacarídeos obtidos do bagaço por extração enzimática.

Inicialmente, foi realizado o ajuste do pH do hidrolisado enzimático para 2,0, a fim de precipitar parte da lignina presente (WANG et al., 2018b; SANTOS et al., 2014; WALLMO et al., 2009). Alguns autores relatam que além de melhorar a coloração da solução contendo os XOS, este procedimento também aumenta o seu grau de pureza (WANG et al. 2018b; ZHANG et al. 2018). Devido às características naturais do carvão e propriedades químicas advindas da ativação e lavagem ácida, o abaixamento do pH do hidrolisado enzimático também favorece a adsorção dos XOS ao carvão (BANSAL; GOYAL; 2005; WANG et al., 2018b).

5.4.2.1 Cinética de adsorção do XOS em carvão ativado

Neste estudo, utilizou-se o hidrolisado enzimático completo, sem remover as xilanas de maior massa molar por precipitação com etanol. A adsorção dos açúcares em carvão ativado foi acompanhada durante 18 h (Figura 22). Pode-se observar que mais de 60% dos açúcares do hidrolisado enzimático foram adsorvidos nos primeiros 30 minutos de incubação. Após 3 horas de reação, o carvão ativado atingiu um patamar de saturação, com pequeno aumento na adsorção dos açúcares, atingindo adsorção de aproximadamente 80% dos açúcares em 18 h. Wang et al. (2018b), realizaram a separação de XOS de hidrolisado enzimático de talo de milho sobre condições similares de adsorção (0,04 g carvão/mL de hidrolisado, 50°C), observando também uma rápida adsorção das xilanas ao carvão durante os 30 – 40 minutos iniciais de incubação. A saturação do carvão ativado ao longo do tempo também foi reportada pelos autores. Os autores avaliaram ainda o processo de adsorção de açúcares em diferentes tipos de carvão ativado, em que o carvão vegetal em pó mostrou-se o mais eficiente, com taxa de adsorção de 47,6%.

Figura 22 – Cinética de adsorção dos açúcares do hidrolisado enzimático em carvão ativado.

Fonte: Arquivo pessoal.

Mesmo que a máxima adsorção tenha sido atingida em 3 h de incubação, optou-se por realizar os ensaios de adsorção em 18 h, para garantir uma adsorção completa dos xilo-oligosacarídeos.

Um ensaio de adsorção em escala preparativa foi feito com 25 mL do hidrolisado, resultando na adsorção de 86% dos açúcares presentes no hidrolisado enzimático ao carvão ativado. Na sequência, os açúcares adsorvidos ao carvão foram eluídos com concentrações de etanol de 10 a 70% (v/v). Nessa etapa foi obtido um rendimento de dessorção total dos açúcares de 60,7%. Essa eluição incompleta dos açúcares pode estar relacionada a fortes interações entre o hidrolisado e o carvão ativado (BANSAL; GOYAL, 2005), ou ainda ao entupimento dos microporos devido ao aprisionamento das xilanas na estrutura interna do carvão, impedindo desta forma o contato das cadeia de XOS com o etanol e sua subsequente eluição. Esta hipótese baseia-se na distribuição de poros maiores na superfície do carvão e menores em seu interior, possibilitando a entrada e o aprisionamento dos XOS (ALLEN; WHITTEN, 1998). Uma etapa adicional de lavagem com solução de etanol a 95% (v/v) foi realizada na tentativa de aumentar o rendimento de eluição, porém não se obteve o efeito desejado. A recuperação parcial dos açúcares não pode ser atribuída à perda de massa de carvão nas etapas de eluição, pois menos de 1% do carvão empregado foi perdido no processo.

Na Figura 23 são apresentados os rendimentos de dessorção obtidos para cada concentração de etanol utilizada. Como pode ser visto na Figura 23, uma maior

quantidade de açúcares foi eluída em menores concentrações de etanol. Nas lavagens do carvão com 20 e 30% (v/v) de etanol houve remoção de 20% de açúcares. Nas etapas posteriores de eluição com 50, 60 e 70% (v/v), a percentagem de dessorção diminuiu decorrente do esgotamento dos açúcares susceptíveis à eluição para cada concentração de etanol empregada. Resultados similares foram obtidos por Zhang et al. (2018) ao empregarem a eluição sequencial com etanol na dessorção de XOS de talo de milho adsorvidos em carvão ativado, obtendo rendimento de aproximadamente 20% ao lavar o carvão com etanol a 30% (v/v).

Figura 23 – Lavagem sequencial do carvão ativado com diferentes concentrações de etanol para eluição dos XOS adsorvidos.

Fonte: Arquivo pessoal.

Um fator importante a ser considerado ao empregar carvão ativado em pó em processos de purificação de xilo-oligossacarídeos por adsorção, diz respeito ao teor de cinzas presentes no carvão, uma vez que as cinzas podem contaminar o produto final (BANSAL; GOYAL, 2005). Além das cinzas, o carvão finamente particulado (finos) pode ser lixiviado junto aos açúcares durante a lavagem do carvão com etanol (LIN; CHEN; WANG, 2010). A presença de finos de carvão foi detectada visualmente nas amostras obtidas com as eluições com etanol a 10 e 20% (v/v), em que a primeira lavagem apresentou maior teor de finos na amostra. Para a remoção dos finos, todas as frações obtidas com o gradiente de etanol foram filtradas com membrana de acetato de 0,2 μm . A utilização de carvão ativado com maior grau de pureza e pré-lavagem do carvão para remoção dos finos são alternativas que podem melhorar a qualidade final dos xilo-oligossacarídeos purificados (NOBRE; TEIXEIRA; RODRIGUES, 2012).

A separação dos XOS com diferentes graus de polimerização em xilobiose (X_2), xilotriose (X_3), xilotetraose (X_4), xilopentose (X_5) e xilohexose (X_6) empregando carvão ativado é possível devido as características do carvão como sua porosidade, em que a distribuição de poros com diferentes diâmetros permite a separação de adsorbatos com tamanhos distintos. Essa natureza do carvão ativado permite o fracionamento e obtenção de XOS com diferentes massas molares pela lavagem do carvão com um gradiente de etanol, onde XOS com cadeias menores são eluídos em baixas concentrações de etanol (WANG et al., 2018b; NOBRE, TEIXEIRA, RODRIGUES, 2012).

Segundo os resultados obtidos por Nobre, Teixeira e Rodrigues (2012) na purificação dos fruto-oligossacarídeos: kestose (G_2), nistose (GF_3) e frutofuranosil nistose (GF_4), em carvão ativado, o processo de adsorção é seletivo, com adsorção preferencial dos carboidratos com maior massa molar, em que a força de interação carvão-açúcar é crescente com o aumento da massa molar do açúcar. A ordem de adsorção observada pelos autores foi de GF_4 para GF_2 . Também foi observada a adsorção posterior dos açúcares sacarose, glicose e frutose, nesta ordem.

A Figura 24 apresenta os perfis cromatográficos obtidos com a caracterização das frações de XOS eluídas com etanol. Devido a limitação da faixa de separação dos XOS pelas colunas HPX87C e HPX42, xilo-oligossacarídeos com cadeias maiores que X_6 não foram quantificados. Os tempos de retenção obtidos para os padrões X_2 , X_3 , X_4 , X_5 e X_6 foram de 28,67, 25,89, 23,86, 22,47 e 21,22 minutos, respectivamente (APÊNDICE B). Outros picos com menores tempos de retenção foram detectados, indicando a presença de XOS com maior massa molar (dados não apresentados). A técnica empregada possibilitou a detecção e quantificação mais precisa de X_2 , X_3 e X_4 , apresentando picos com melhor definição (Figura 24). Os picos X_5 e X_6 apresentaram-se menos definidos e com tempo de retenção ligeiramente deslocados, sendo detectados com 21,63 e 20,62 min, respectivamente. O maior grau de polimerização e a possível influência dos grupos laterais podem ter provocado essa mudança no tempo de retenção durante a caracterização desses oligômeros. As frações eluídas com 10 a 70% (v/v) de etanol foram denominadas como F10, F20, F30, F40, F50, F60 e F70, respectivamente.

Figura 24 – Detecção dos XOS das amostras eluidas do carvão ativado, empregando diferentes concentrações de etanol, por sistema acoplado de colunas em HPLC.

Fonte: Arquivo pessoal.

Nota: 10% à 70% - concentrações de etanol empregadas no fracionamento dos XOS.

Picos : X₂ – Xilobiose, X₃ – Xilotriose, X₄ – Xilotetraose, X₅ – Xilopentose, X₆ – Xilohexose.

A distribuição dos xilo-oligossacarídeos presentes nas frações F10 à F70 está apresentada na Figura 25. Como pode ser visto, os xilo-oligossacarídeos X₂ e X₃ foram eluidos majoritariamente nas frações F10 e F20, sendo ainda eluidos em pequenas quantidades nas demais concentrações de etanol. Carboidratos de menores massas molares eluem mais facilmente, um vez que a força da interação destas moléculas à superfície do carvão é menor (NOBRE; TEIXEIRA; RODRIGUES, 2012). A eluição dos xilo-oligossacarídeos X₄, X₅ e X₆ não apresentou decréscimo exponencial ao gradiente de etanol, sendo variada a percentagem presente em cada fração. Na Figura 26 é possível observar esse comportamento, em que X₂ e X₃ apresentam mesma tendência de eluição (Figura 26A), assim como X₄, X₅ e X₆ têm perfis de eluição similar entre si (Figura 26B). Os xilo-oligossacarídeos X₃ e X₅ foram principalmente eluídos em 30% de etanol (fração F30). Já a xilohexose (X₆) começou a ser eluída com 20% (v/v) de etanol, e o perfil de eluição decresceu exponencialmente nas demais concentrações de etanol.

Perfis similares de eluição foram observados nos estudos de Zhang et al. (2018) sobre a separação de xilo-oligossacarídeos em carvão ativado, em que os xilo-oligossacarídeos menores (X₂ e X₃) foram preferencialmente eluidos entre as

concentrações de 10 a 30% (v/v) de etanol. Os xilo-oligossacarídeos X₅ e X₆ também começaram a serem eluídos a partir de 20-30% (v/v) de etanol.

Figura 25 – Perfil de xilo-oligossacarídeos por fração eluída do carvão ativado empregando diferentes concentrações de etanol.

Fonte: Arquivo pessoal.

Nota: F10 à F70 - concentrações de etanol (v/v) empregadas sequencialmente no fracionamento dos XOS.

X2 – Xilobiose, X3 – Xilotriose, X4 – Xilotetraose, X5 – Xilopentose, X6 – Xilohexose.

Figura 26 – Perfil das eluições dos XOS com etanol.

Fonte: Arquivo pessoal.

A Figura 27 apresenta a cromatografia em camada fina do hidrolisado enzimático e de suas frações separadas por adsorção em carvão ativado e eluídas com etanol. As amostras He e Ha, correspondem ao hidrolisado enzimático, antes e após o ajuste do pH, respectivamente. A amostra Ha foi centrifugada antes de aplicar na placa e, mesmo depois desse procedimento, apresentou o mesmo perfil de oligossacarídeos que a amostra He. Esse resultado indica que a estrutura dos xilo-oligossacarídeos presentes no hidrolisado enzimático não se modificaram. O pellet (Pe), que foi separado após a centrifugação da amostra Ha, foi ressuspenso em água e aplicado na placa cromatográfica, não sendo verificada a presença de açúcares após a revelação. A amostra F18, correspondente ao filtrado obtido após as 18 h de adsorção do hidrolisado em carvão ativado, também não revelou açúcares, indicativo que a adsorção ao carvão foi eficiente. As demais amostras referem-se às frações F10 a F70, eluídas em gradiente de etanol. Observa-se uma pequena diferença entre o fator de retenção de todas as amostras em relação ao padrão, provavelmente devido a presença de grupos laterais contidos nos XOS, que aumentam a massa da amostra, dificultando o arraste dessa pela fase móvel. As amostras F10 e F20 apresentaram bandas mais intensas de X_2 e X_3 , e o aparecimento de bandas correspondente a xilo-oligossacarídeos maiores nas eluições sucessivas.

Figura 27 – Cromatografia em camada fina das frações de XOS eluídas com diferentes concentrações de etanol do carvão ativado.

Fonte: Arquivo pessoal.

Nota: P – padrão de xilo-oligossacarídeos (X₁ – xilose, X₂ – xilobiase, X₃ – xilotriose, X₄ – xilotetraose, X₅ – xilopentaose); HE – hidrolisado enzimático; HA – sobrenadante do hidrolisado enzimático ácido; Pe – Pellet; F18 – filtrado 18 h; 10 – etanol 10% (v/v); 20 – etanol 20%; 30 – etanol 30%; 40 – etanol 40%; 50 – etanol 50%; 60 – etanol 60%; 70 – etanol 70%.

5.5 Atividade antioxidante dos xilo-oligossacarídeos

No intuito de avaliar a aplicabilidade dos xilo-oligossacarídeos produzidos no presente trabalho a partir do bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino, como antioxidantes naturais, foram realizados testes de atividade antioxidante com amostras do hidrolisado enzimático: a) com as frações resultantes da purificação por cromatografia de exclusão por tamanho (Tabela 7 - Pico 1, Pico 2 e Pico 3); b) frações purificadas após precipitação com etanol (Tabela 8 - PF1, PF2 e PF3) e c) com as frações obtidas após separação em carvão ativado (Figura 25 - frações F10 a F70). Os XOS foram avaliados quanto a capacidade de captura e redução das espécies radicalares do ABTS^{•+}, DPPH[•] e Fosfo-molibdato. Os valores de atividade antioxidante para uma mesma amostra podem variar de um método para o outro, uma

vez que essa determinação depende de vários fatores, como tipo de solvente empregado e tempo de reação (AKSOY et al., 2013; SCHAICH; TIAN; XUE, 2015).

O método de determinação de atividade antioxidante empregando o radical $ABTS^{\bullet+}$ tem por princípio a quantificação da descoloração da solução de $ABTS^{\bullet+}$ em um período de tempo fixo na presença de um agente antioxidante. A descoloração da solução de $ABTS^{\bullet+}$ ocorre pela redução da espécie radicalar pelo antioxidante. De forma similar, a determinação de atividade antioxidante por DPPH leva em consideração a descoloração da solução de radicais livres na presença de um agente antioxidante (VALLS et al., 2018). Em contrapartida, o método fosfo-molibdênio baseia-se no aparecimento da coloração verde-azulada, que ocorre quando o fosfato-molibdênio VI é reduzido a fosfato-molibdênio V (PRIETO; PINEDA; AGUILAR, 1999). Antioxidantes potentes, como Trolox e ácido gálico, geralmente são empregados para a validação deste método (VALLS et al., 2018). No presente trabalho foi empregado o antioxidante sintético Trolox.

Segundo vários estudos, a atividade antioxidante de polissacarídeos está associada geralmente à presença de compostos fenólicos, como os ácidos hidroxicinâmicos feruloil e *p*-cumarílico, que podem estar ligados às cadeias de xilanas e a componentes da lignina (AKSOY et al., 2013; ZHANG et al., 2018; GOPALAN et al., 2015; MATHEW; KARLSSON; ADLERCREUTZ, 2017; SCHAICH; TIAN; XIE, 2015). Em xilo-oligossacarídeos, além da presença de fenólicos, a atividade antioxidante também depende do grau de polimerização e da relação entre arabinosil:xilose (MATHEW; KARLSSON; ADLERCREUTZ, 2017).

O teor de fenólicos totais presentes nas amostras de XOS foi determinado pelo método Folin-Ciocalteu, sendo expresso em miligramas equivalente de ácido gálico por grama de açúcar total da amostra (Tabela 10). No geral, é possível observar que o teor de fenólicos variou significativamente entre os métodos de separação empregados, com teor máximo de 149,63 (mg EAG/g açúcar) para F70 pelo método de adsorção com carvão ativado, e mínima de 3,82 (mg EAG/g açúcar) para PF3 pela precipitação com etanol. O estudo de Malunga e Beta (2015) correlaciona o conteúdo de compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante de polissacarídeos não-amiláceos (NSP) e arabinoxilanas extraídos de trigo (WEAX). Os autores observaram que amostras com o mesmo grau de substituição A/X, porém teor de fenólicos totais diferentes, apresentaram atividade antioxidante distintas, em que o aumento no conteúdo de fenólicos aumentou a atividade antioxidante dos polissacarídeos. Além disso, as

amostras NSP e WEAX com maior teor de fenólicos (5,03 e 5,3 µg de equivalente de ácido ferúlico) mostraram maior atividade antioxidante entre as amostras avaliadas.

Na Tabela 9 também estão apresentados os resultados referentes à atividade antioxidante dos xilo-oligossacarídeos, obtidos por purificação em coluna de exclusão por tamanho, precipitação com etanol e adsorção em carvão ativado. Como é possível observar, a atividade antioxidante variou consideravelmente dependendo do método de separação empregado que pode estar relacionada ao mecanismo de ação do antioxidante com a espécie radicalar (MALUNGA; BETA, 2015). No entanto, independente do método (ABTS, DPPH ou Fosfo-molibdênio), as frações com maior teor de fenólicos apresentaram maior atividade antioxidante.

Além do maior conteúdo de fenólicos, estas amostras têm em comum o fato de possuírem xilanas com maior grau de polimerização. Alguns trabalhos na literatura reportam o grau de polimerização como um dos fatores que afetam a atividade antioxidante de polissacarídeos (RAO; MURALIKRISHNA, 2006; MALUNGA; BETA, 2015). Em seu trabalho com xilo-oligossacarídeos obtidos a partir de xilanas comerciais, Valls et al. (2018) também observaram que xilanas de cadeias maiores apresentaram maior atividade antioxidante, esse resultado se mostrando igual para os produtos obtidos da hidrólise de glucuronoxilana com xilanases das famílias GH10 e GH30.

Tabela 9 – Presença de fenólicos e atividade antioxidante dos XOS obtidos por hidrólise enzimática do bagaço de cana de açúcar pré-tratado com sulfito alcalino e separados por diferentes metodologias.

Método	Fração (XOS)	Fenólicos (mg EAG/g açúcar total)	Atividade antioxidante		
			$\mu\text{M Eq. Trolox}/\mu\text{g açúcar (ABTS}^{\bullet+})$	$\mu\text{M Eq. Trolox}/\mu\text{g açúcar (DPPH}^{\bullet})$	$\mu\text{M Eq. Trolox}/\mu\text{g açúcar (Fosfo-molibdato)}$
<i>Separação cromatográfica¹</i>	Pico 1	121,93	5,04	9,20	216
	Pico 2	14,37	ND	4,54	ND
	Pico 3	13,72	ND	2,38	ND
<i>Adsorção em carvão ativado</i>	F70	149,63 $\pm$ 0,00*	4,30	15,21 $\pm$ 0,00	108,96 $\pm$ 0,21
	F60	39,59 $\pm$ 0,00	1,52	3,40 $\pm$ 0,00	34,92 $\pm$ 0,21
	F50	48,59 $\pm$ 0,00	1,17	4,11 $\pm$ 0,00	48,71 $\pm$ 0,0
	F40	35,84 $\pm$ 0,00	0,93	2,61 $\pm$ 0,00	33,84 $\pm$ 0,12
	F30	13,37 $\pm$ 0,01	0,10	0,77 $\pm$ 0,00	33,03 $\pm$ 0,00
	F20	11,80 $\pm$ 0,00	ND	0,43 $\pm$ 0,00	3,46 $\pm$ 0,02
	F10	14,34 $\pm$ 0,00	ND	2,48 $\pm$ 0,00	4,06 $\pm$ 0,01
<i>Precipitação com etanol¹</i>	PF1	89,23	2,04	9,20	182,23
	PF2	10,06	0,28	4,54	20,49
	PF3	3,82	ND	2,38	13,38

Fonte: Arquivo pessoal

Nota: (¹) Ensaios sem replicatas, devido a pequena quantidade de amostra disponível. EAG – Equivalente de ácido gálico; ND – não detectado; Eq. – Equivalente; (*) desvio padrão menor que 0,001.

Em relação aos métodos de separação dos XOS, as amostras pico 1, F70 e PF1 apresentaram valores mais altos de atividade antioxidante, teor de fenólicos e coloração. A detecção visual de cromóforos nas amostras pode indicar a presença de derivados de lignina, que podem estar contribuído para a ação antioxidante (ZHANG et al., 2018).

Dentre os métodos de separação de xilo-oligossacarídeos apresentados, a separação por carvão ativado foi o método mais eficiente em termos de fracionamento dos xilo-oligossacarídeos com características distintas em relação ao potencial antioxidante.

As amostras F10, F20 e F30 apresentaram baixos teores de fenólicos totais, este fato pode estar relacionado a incapacidade da baixa concentração de etanol de remover moléculas fenólicas adsorvidas ao carvão ativado (ZHANG et al., 2018). Com

o aumento gradual na concentração de etanol esses compostos passaram a ser eluídos do carvão, indicio disto é a presença da maior quantidade de fenólicos nas amostras F40, F50, F60 e F70. Zhang et al. (2018) também observaram esse efeito ao estudarem a eluição de xilo-oligossacarídeos do carvão ativado com gradiente de etanol de 10 a 70% (v/v). Os autores avaliaram a atividade antioxidante dos XOS fracionados obtidos e chegaram a resultados similares aos encontrados neste trabalho, onde as frações apresentam aumento crescente na atividade antioxidante conforme aumenta a concentração de etanol empregada na eluição. Na determinação da atividade antioxidante dos xilo-oligossacarídeos empregando DPPH, os autores obtiveram inibição máxima do radical de 89,98% para a amostra eluída com 70% (v/v) de etanol.

Devido a baixa concentração dos XOS nas amostras F10, F20, pico 1, pico 2 e PF3, e do curto tempo de reação dos ensaios, a determinação da atividade antioxidante não pode ser determinada nestas amostras, utilizando a curva de calibração dos métodos. Alguns estudos relatam que alguns agentes antioxidantes têm ação progressiva e lenta na redução de radicais livres, necessitando de tempos reacionais mais longos (BONDET; BRAND-WILLIAMS; BERSSET, 1997; SCHAICH; TIAN; XUE, 2015).

6. CONCLUSÕES

A avaliação inicial dos efeitos da temperatura, pH e tempo sobre o rendimento de extração de xilana do bagaço pré-tratado com sulfito alcalino pela xilanase Luminase PB-200, permitiu definir como condições de ensaio a temperatura de 70 °C, pH 6 e 24 horas de reação. Sobre tais condições o rendimento de extração de xilanas foi de 28,8%. Os maiores rendimentos de xilanas, alcançados nas temperaturas de 60 e 70 °C, foram associados à alta estabilidade térmica desta enzima e maior solubilização das xilanas em temperaturas mais elevadas.

O aumento na concentração do bagaço pré-tratado de 5 para 15% (m/v) não favoreceu a extração enzimática das xilanas, com redução no rendimento de extração de xilana.

As enzimas acessórias arabinofuranosidade e feruloil esterase apresentaram efeito positivo no rendimento de xilana extraída do bagaço pré-tratado com sulfito alcalino, ao serem adicionadas individualmente com a xilanase (Luminase PB-200), devido a remoção de grupos laterais que reduzem a ação da xilanase.

Os métodos de separação das xilanas por precipitação com etanol, exclusão por tamanho e adsorção em carvão ativado geraram xilanas de tamanhos variados, com massas molares superior a 1800 g/mol, xilanas entre 880 a 511 g/mol e xilo-oligossacarídeos de 2 a 5 monômeros, respectivamente. A partir da seleção de um destes métodos, é possível direcionar a obtenção de xilanas com tamanhos de cadeias desejáveis, a depender do objetivo de aplicação dessas xilanas.

As xilanas purificadas apresentaram atividade antioxidante para todos os métodos avaliados (ABTS, DPPH e Fosfo-molibdênio), onde as frações de xilanas com maior teor de fenólicos totais apresentaram maior potencial antioxidante, as quais também possuíam maior grau de polimerização, podendo este fato também estar contribuindo com o potencial antioxidante.

Em vista da ação antioxidante dos xilo-oligossacarídeos obtidos neste trabalho, e provável efeito prebiótico destes polissacarídeos, o beneficiamento do bagaço de cana-de-açúcar através da extração enzimática para sua obtenção é uma alternativa atraente para o mercado, uma vez que alia o uso de um resíduo lignocelulósico gerado em grandes quantidades e de baixo custo à produção de xilo-oligossacarídeos com alto valor agregado e com variada aplicabilidade comercial.

REFERÊNCIAS

- AGUEDO, M.; FOUGNIES, C.; DERMIENCE, M.; RICHEL, A. Extraction by three processes of arabinoxylans from wheat bran and characterization of the fractions obtained. **Carbohydrate Polymers**, v. 105, p. 317 – 324, 2014.
- AKPINAR, O.; GUNAY, K.; YILMAZ, Y.; LEVENT, O.; BOSTANCI, S. Enzymatic processing and antioxidant activity of agricultural waste autohydrolysis liquors. **Bioresources**, v. 5, n. 2, p. 699 – 711, 2010.
- AKSOY, L.; KOLAY, E.; AGILÖNÜ, Y.; ASLAN, Z.; KARGOIGLU, M. Free radical scavenging activity, total phenolic content, total antioxidant status, and total oxidant status of endemic *Thermopsis turcica*. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 20, p. 235 – 239, 2013.
- ALLEN, S. J.; WHITTEN, L. The production and Characterisation of Activated Carbons: A Review. **Developments in Chemical Engineering and Mineral Processing**, v. 6, n. 5, p. 231 – 261, 1998.
- ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M. J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4851 – 4861, 2010.
- AMORIM, C.; SILVÉRIO, S. C.; SILVA, S. P.; COELHO, E.; COIMBRA, M. A.; PRATHER, K. L. J.; RODRIGUES, L. R. Single-step production of arabinoxyloligosaccharides by recombinant *Bacillus subtilis* 3610 cultivated in brewers spent grain. **Carbohydrate Polymers**, v. 199, p. 546 – 554, 2018.
- ANDERSEN, M.; KARI, J.; BORCH, K.; WESTH, P. Michaelis-Menten equation for degradation of insoluble substrate. **Mathematical Biosciences**, v. 296, p. 93 – 97, 2018.
- ANWAR, Z.; GULFRAZ, M.; IRSHAD, M. Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: A brief review. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 7, p. 163 – 173, 2014.
- ARAÚJO, J. M. A. **Química de Alimentos: Teoria e Prática**. 4. ed. Belo Horizonte: Editora UFV – Universidade Federal de Viçosa, 2004. p. 122 – 158.
- ATHUKORALA, Y.; KIM, K.-N.; JEON, Y.-J. Antiproliferative and antioxidant properties of an enzymatic hydrolysate from brown alga, *Ecklonia cava*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, p. 1065 – 1074, 2006.
- BANSAL, P.; HALL, M.; REALFF, M. J.; LEE, J. H.; BOMMARIUS, A. S. Modeling cellulose kinetics on lignocellulosic substrates. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 833 – 848, 2009.
- BANSAL, R. C.; GOYAL, M. Activated carbon adsorption. **Environmental Science Technology**, v. 3, 2005.

BATALHA, L. A. R.; HAN, Q.; JAMEEL, H.; CHANG, H.-M.; COLODETTE, J. L.; GOMES, F. J. B. Production of fermentable sugars from sugarcane bagasse by enzymatic hydrolysis after autohydrolysis and mechanical refining. **Bioresource Technology**, v. 180, p. 97 – 105, 2015.

BATTISTA, F.; ALMENDROS, M. G.; ROUSSET, R.; BOIBINEAU, S.; BOUILLON, P.-A. Enzymatic hydrolysis at high dry matter content: The influence of the substrates' physical properties and of loading strategies on mixing and energetic consumption. **Bioresource Technology**, v. 250, p. 191 – 196, 2018.

BIAN, J.; PENG, F.; PENG, X.-P.; PENG, P.; XU, F.; SUN, R.-C. Structural features and antioxidant activity of xylooligosaccharides enzymatically produced from sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 127, p. 236-241, 2013.

BIELY, P.; SINGH, S.; PUCHART, V. Towards enzymatic breakdown of complex plant xylan structures: State of the art. **Biotechnology Advances**, v. 34, p. 1260 – 1274, 2016.

BONDET, V.; BRAND-WILLIAMS, W.; BERSET, C. Kinetics and mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH• Free Radical Method. **LWT, Food Science and Technology**, v. 30, p. 609 – 615, 1997.

BOUKARI, I.; O'DONOHUE, M.; RÉMOND, C.; CHABBERT, B. Probing a family GH11 endo- β -1,4-xylanase inhibition mechanism by phenolic compounds: Role of functional phenolic groups. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 72, n. 3 – 4, p. 130 – 138, 2011.

BRIENZO, M.; CARVALHO, A. F.; FIGUEIREDO, F. C.; OLIVEIRA NETO, P. Sugarcane bagasse hemicellulose properties, extraction technologies and xylooligosaccharides Production. In Riley, G. L. (Ed), **Food Waste: Practices, Management and Challenges**. Nova Science Publishers, New York, p. 115 – 188, 2016.

BRIENZO, M.; CARVALHO, W.; MILAGRES, A. M. F. Xylooligosaccharides Production from Alkaline-Pretreated Sugarcane Bagasse Using Xylanases from *Thermoascus aurantiacus*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, p. 1195 – 1205, 2010.

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

BROEKER, J.; MECHELKE, M.; BAUDREXL, M.; MENNERICH, D.; HORNBERG, D.; MANN, M.; SCHWARZ, W. H.; LIEBL, W.; ZVERLOV, V. V. The hemicellulose-degrading enzyme system of the thermophilic bacterium *Clostridium stercorarium*: comparative characterization and addition of new hemicellulolytic glycoside hydrolases. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, p. 229, 2018.

BROWNING, B. L. **The Chemistry of Wood**. New York: Interscience Publishers, 1902.

BUDZIAK, C. R.; MAIA, C. M. B. F.; MANGRICH, A. S. Transformações químicas da matéria orgânica durante a compostagem de resíduos da indústria madeireira. **Química Nova**, v. 27, n. 3, p. 399 – 403, 2004.

CAROCHO, M.; MORALES, P.; FERREIRA, I. C. F. R. Antioxidants: Reviewing the chemistry, food applications, legislation and role as preservatives. **Trends in Food Science & Technology**, v. 71, p. 107 – 120, 2018.

CARVALHO, A. F. A.; NETO, P. O.; SILVA, D. F.; PASTORE, G. M. Xylo-oligosaccharides from lignocellulosic materials: Chemical structure, health benefits and production by chemical and enzymatic hydrolysis. **Food Research International**, v. 51, p. 75 – 85, 2013.

CARVALHO, D. M.; SEVASTYANOVA, O.; QUEIROZ, J. H.; COLODETTE, J. L. Cold alkaline extraction as a pretreatment for bioethanol production from eucalyptus, sugarcane bagasse and sugarcane straw. **Energy Conversion and Management**, v. 124, p. 315 – 324, 2016.

CARVALHO, D. M.; MARTÍNEZ-ABAD, A.; EVTUGUIN, D. V.; COLODETTE, J. L.; LINDSTRÖM, M. E.; VILAPLANA, F.; SEVASTYANOVA, O. Isolation and characterization of acetylated glucuronoarabinoxylan from sugarcane bagasse and straw. **Carbohydrate Polymers**, v. 156, p. 223 – 234, 2017.

CASPETA, L.; CARO-BERMÚDEZ, M. A.; PONCE-NOYOLA, T.; MARTINEZ, A. Enzymatic hydrolysis at high-solids loadings for the conversion of agave bagasse to fuel ethanol. **Applied Energy**, v. 113, p. 277 – 286, 2014.

CHANDRA, R. P.; BURA, R.; MABEE, W. E.; BERLIN, A.; PAN, X.; SADDLER, J. N. Substrate Pretreatment: The Key to Effective Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulosics? **Biofuels**, v. 108, p. 67 – 93, 2007.

CHEN, H.; ZHANG, M.; QU, Z.; XIE, B. Antioxidant activities of different fractions of polysaccharide conjugates from green tea (*Camellia Sinensis*). **Food Chemistry**, v. 106, p. 559 – 563, 2008.

CHIMPHANGO, A. F. A.; ZYL, W. H. Van.; GÖRGENS, J. F. Isolation, characterization and enzymatic modification of water soluble xylans from *Eucalyptus grandis* wood and sugarcane bagasse. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 87, n. 10, p. 1419 – 1429, 2012.

COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p. 3 – 25, 2005.

CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da Safra Brasileira. v. 5 – Safra 2018/19 n.2 – Segundo Levantamento. Agosto 2018. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana>. Acesso em: 19 ago. 2018.

CORNETTI, A. A. A. **Caracterização das xilanas extraídas do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado como insumos potenciais para indústria de papel e**

celulose. 2018. 93 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, 2018.

CREPIN, V. F.; FAULDS, C. B.; CONNERTON, I. F. Functional classification of the microbial feruloyl esterases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 63, p. 647 – 652, 2004.

DAHLMAN, O.; JACOBS, A.; SJÖBERG, J. Molecular properties of hemicelluloses located in the surface and inner layers of hardwood and softwood pulps. **Cellulose**, v. 10, p. 325 – 334, 2003.

DANIEL, R. M.; PETERSON, M. E.; DANSON, M. J.; PRICE, N. C.; KELLY, S. M.; MONK, C. R.; WEINBERG, C. S.; OUDSHOORN, M. L.; LEE, C. K. The molecular basis of the effect of temperature on enzyme activity. **Biochemical Journal**, v. 425, p. 353 – 360, 2010.

DIAS, M. O. S.; MACIEL FILHO, R.; MANTELATTO, P. E.; CAVALETT, O.; ROSSELL, C. E. V.; BONOMI, A.; LEAL, M. R. L. V. Sugarcane processing for ethanol and sugar in Brazil. **Environmental Development**, v. 15, p. 35 – 51, 2015.

DU, J.; CAO, Y.; LIU, G.; ZHAO, J.; LI, X.; QU, Y. Identifying and overcoming the effect of mass transfer limitation on decreased yield in enzymatic hydrolysis of lignocellulose at high solid concentrations. **Bioresource Technology**, v. 229, p. 88 – 95, 2017.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350 – 356, 1956.

DUTTA, S. K.; CHAKRABORTY, S. Mixing effects on the kinetics and the dynamics of two-phase enzymatic hydrolysis of hemicellulose for biofuel production. **Bioresource Technology**, v. 259, p. 276 – 285, 2018.

EBRINGEROVÁ, A.; HROMÁDKOVÁ, Z.; KOST'ÁLOVÁ, Z. K.; SASINKOVÁ, V. Chemical Valorization of Agricultural By-products: Isolation and Characterization of Xylan-Based Antioxidants from Almond Shell Biomass. **BioResources**, v.3, n. 1, p. 60 – 70, 2008.

EK, M.; GELLERSTEDT, G.; HENRIKSSON, G. **Pulp and Paper Chemistry and Technology: Pulping Chemistry and Technology**. Berlin: De Gruyter, 2009.

FARHAT, W.; VENDITTI, R.; QUICK, A.; TAHA, M.; MIGNARD, N.; BECQUART, F.; AYOUB, A. Hemicellulose extraction and characterization for applications in paper coatings and adhesives. **Industrial Crops & Products**, v. 107, p. 370 – 377, 2017.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions**. Berlin: De Gruyter, 1989.

FIGUEROA-ESPINOZA, M-C.; POULSEN, C.; SOE, J. B.; ZARGAHI, M. R.; ROUAU, X. Enzymatic Solubilization of Arabinoxylans from Native, Extruded, and

High-Shear-Treated Rye Bran by Different Endo-xylanases and Other Hydrolyzing Enzymes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 4240 – 4249, 2004.

FREITAS, C.; CARMONA, E.; BRIENZO, M. Xylooligosaccharides production process from lignocellulosic biomass and bioactive effects. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, v. 18, p. 100184, 2019.

GENG, W.; JIN, Y.; JAMEEL, H.; PARK, S. Strategies to achieve high-solids enzymatic hydrolysis of diluted-acid pretreated corn stover. **Bioresource Technology**, v. 187, p. 43 – 48, 2015.

GÍRIO, F. M.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; MARQUES, S.; BOGEL-LUKASIK, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4775 – 4800, 2010.

GOLDBECK, R.; GONÇALVES, T. A.; DAMÁSIO, A. R. L.; BRENELLI, L. B.; WOLF, L. D.; PAIXÃO, D. A. A.; ROCHA, G. J. M.; SQUINA, F. M. Effect of hemicellulolytic enzymes to improve sugarcane saccharification and xylooligosaccharides production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 131, p. 36 – 46, 2016.

GONGORA, A.; VILLAFRANCO, D. Sugarcane bagasse cogeneration in Belize: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 96, p. 58 – 63, 2018.

GOPALAN, N.; RODRÍGUEZ-DURAN, L. V.; SAUCEDO-CASTANEDA, G.; NAMPOOTHIRI, K. M. Review on technological and scientific aspects of feruloyl esterases: A versatile enzyme for biorefining of biomass. **Bioresource Technology**, v. 193, p. 534 – 544, 2015.

GOVENDER, S. **Purification, application and immunolocalization of thermostable xylanases**. 2014. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade de Tecnologia de Durban, Durban, África do Sul, 2014.

GOWDHAMAN, D.; PONNUSAMI, V. Production and optimization of xylooligosaccharides from corncob by *Bacillus aerophilus* KGJ2 xylanase and its antioxidant potential. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 79, p. 595 – 600, 2015.

HAKALA, T. K.; LIITIÄ, T.; SUURNÄKKI, A. Enzyme-aided alkaline extraction of oligosaccharides and polymeric xylan from hardwood kraft pulp. **Carbohydrate polymers**, v. 93, p. 102 – 108, 2013.

HIDENO, A.; INOUE, H.; TSUKAHARA, K.; FUJIMOTO, S.; MINOWA, T.; INOUE, S.; ENDO, T.; SAWAYAMA, S. Wet disk milling pretreatment without sulfuric acid for enzymatic hydrolysis of rice straw. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 10, p. 2706 – 2711, 2009.

HIMMEL, M. E.; DING, S. Y.; JOHNSON, D. K.; ADNEY, W. S.; NIMLOS, M. R.; BRADY, J. W.; FOUST, T. D. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. **Science**, v. 315, n. 5813, p. 804 – 807, 2007.

HON, D. N.-S. **Chemical Modification of lignocellulosic Materials**. Nova York: Marcel Dekker, Inc., 1996.

HON, D. N.-S.; SHIRAISHI, N. **Wood and cellulosic chemistry**. 2 ed. New York: Marcel Dekker, Inc., 2010.

HU, J.; TIAN, D.; RENNECKAR, S.; SADDLER, J. N. Enzyme mediated nanofibrillation of cellulose by the synergistic actions of an endoglucanase, lytic polysaccharide monooxygenase (LPMO) and xylabase. **Nature – Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 3195, 2018.

HUANG, D.; LIU, J.; QI, Y.; YANG, K.; XU, Y.; FENG, L. Synergistic hydrolysis of xylan using novel xylanases, β -xylosidases, and an α -L-arabinofuranosidase from *Geobacillus thermodenitrificans*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 15, p. 6023 – 6037, 2017.

HWANGBO, M.; TRAN, J. L.; CHU, K.-C. Effective one-step saccharification of lignocellulosic biomass using magnetite-biocatalysts containing saccharifying enzymes. **Science of the Total Environment**, v. 647, p. 806 – 813, 2019.

JAIN, L.; KURMI, A. K.; AGRAWAL, D. Feasibility studies with lignin blocking additives in enhancing saccharification and cellulase recovery: Mutant UV-8 of *T. verruculosus* IIPC 324 a case study. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 118, p. 44 – 49, 2018.

JAYAPAL, N.; SAMANTA, A. K.; KOLTE, A. P.; SENANI, S.; SRIDHAR, M.; SURESH, K. P.; SAMPATH, K. T. Value addition to sugarcane bagasse: Xylan extraction and its process optimization for xylooligosaccharides production. **Industrial Crops & Products**, v. 42, p. 14 – 24, 2013.

JIAN, I.; KUMAR, V.; SATYANARAYANA, T. Xylooligosaccharides: an economical prebiotic from agroresidues and their health benefits. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 53, p. 131 – 142, 2015.

JÖNSSON, L. J.; MARTÍN, C. Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effect. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 103 – 112, 2016.

KALLEL, F.; DRISS, D.; CHAABOUNI, S.; GHORBEL, R. Biological Activities of Xylooligosaccharides Generated from Garlic Straw Xylan by Purified Xylanase from *Bacillus mojavensis* UEB-FK. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 175, n. 2, p. 950 – 964, 2015.

KHULLAR, E.; DIEN, B. S.; RAUSCH, K. D.; TUMBLESON, M. E.; SINGH, V. Effect of particle size on enzymatic hydrolysis of pretreated *Miscanthus*. **Industrial Crops and Products**, v. 44, p. 11 – 17, 2013.

KIM, J. S.; LEE, Y. Y.; KIM, T. H. A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 42 – 48, 2016.

KLEIN-MARCUSCHAMER, D.; OLESKOWICZ-POPIEL, P.; SIMMONS, B. A.; BLANCH, H. W. The Challenge of Enzyme Cost in the Production of Lignocellulosic Biofuels. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, n. 4, p. 1083 – 1087, 2012.

KOUBAA, S.; BREMER, A.; HINCHA, D. K.; BRINI, F. Structural properties and enzyme stabilization function of the intrinsically disordered LEA_4 protein TdLEA3 from wheat. **Nature - Scientific Reports**, v. 9, n. 3720, p. 1 – 11, 2019.

KRISTENSEN, J. B.; FELBY, C.; JORGENSEN, H. Yield-determining factors in high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Biotechnology for Biofuels**, v. 2, n. 1, p. 1 – 11, 2009.

LABOUREL, A.; CROUCH, L. I.; BRÁS, J. L. A.; JACKSON, A.; ROGOWSKI, A.; GRAY, J.; YADAV, M. P.; HENRISSAT, B.; FONTES, C. M. G. A.; GILBERT, H. J.; NAJMYDIN, S.; BASLÉ, A.; CUSKIN, F. The Mechanism by Which Arabinoxylanases Can Recognize Highly Decorated xylans. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 42, p. 22140 – 22159, 2016.

LAGAERT, S.; POLLET, A.; COURTIN, C. M.; VOLCKAERT, G. β – Xylosidases and α – L – arabinofuranosidase: Accessory enzymes for arabinoxylan degradation. **Biotechnology Advances**, v. 32, p. 316 – 332, 2014.

LASRADO, L. D.; GUDIPATI, M. Antioxidant property of symbiotic combination of *Lactobacillus* sp. And wheat bran xylo-oligosaccharides. **Journal of Food and Science Technology**, v. 52, n. 7, p. 4551 – 4557, 2015.

LAURITO-FRIEND, D. F.; MENDES, F. M.; REINOSO, F. M.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A. M. F. Sugarcane hybrids with original low lignin contents and high field productivity are useful to reach high glucose yields from bagasse. **Biomass and Bioenergy**, v. 75, p. 65 – 74, 2015.

LI, C.; TANJORE, D.; HE, W.; WONG, J.; GARDNER, J. L.; SALE, K. L.; SIMMONS, B. A.; SINGH, S. Scale-up and evaluation of high solid ionic liquid pretreatment and enzymatic hydrolysis of switchgrass. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, p. 154, 2013.

LI, X.; ZHENG, Y. Investigation of dynamic changes of substrate features on enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. **Industrial Crops & Products**, v. 111, p. 414 – 421, 2018.

LIN, T.; CHEN, W. WANG, L. Particle properties in granular activated carbon filter during drinking water treatment. **Journal of Environmental Sciences**, v. 22, n. 5, p. 681 – 688, 2010.

LIU, Y.; ZHANG, B.; WANG, W.; HE, M.; XU, J.; YUAN, Z. Evaluation of the solvent water effect on high solids saccharification of alkali-pretreated sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 235, p. 12 – 17, 2017.

LIU, Y.-Y.; XU, J.-L.; ZHANG, Y.; LIANG, C.-Y.; HE, M.-C.; XIE, J. Reinforced alkali-pretreatment for enhancing enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse. **Fuel Processing Technology**, v. 143, p. 1 – 6, 2016a.

LUI, Y.; XU, Z.; ZHANG, W.; DUAN, J.; JIANG, J.; SUN, D. Characterization of Fractional Polysaccharides from *Gleditsia sinensis* and *Gleditsia microphylla* Gums. **Molecules**, v. 21, n. 12, p. 1745 – 1755, 2016b.

MALUNGA, L. N.; BETA, T. Antioxidant Capacity of Water-Extractable Arabinoxylan from Commercial Barley, Wheat, and Wheat Fractions. **Cereal Chemistry**, v. 92, n. 1, p. 29 – 36, 2015.

MATHEW, S.; KARLSSON, E. N.; ADLERCREUTZ, P. Extraction of soluble arabinoxylan from enzymatically pretreated wheat bran and production of short xylo-oligosaccharides and arabinoxyloligosaccharides from arabinoxylan by glycoside hydrolase family 10 and 11 endoxylanases. **Journal of Biotechnology**, v. 260, p. 53 – 61, 2017.

MENDES, F. M.; LAURITO, D. F.; BAZZEGGIO, M.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A. M. F. Enzymatic Digestion of Alkaline-Sulfite Pretreated Sugar Cane Bagasse and Its Correlation with the Chemical and Structural Changes Occurring During the Pretreatment Step. **Biotechnology Progress**, v. 29, n. 4, p. 890 – 895, 2013.

MENDES, F. M.; SIQUEIRA, G.; CARVALHO, W.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A. M. F. Enzymatic Hydrolysis of Chemithermomechanically Pretreated Sugarcane Bagasse and Samples with Reduced Initial Lignin Content. **Biotechnology Progress**, v. 27, n. 2, p. 395 – 401, 2011.

MENDIS, M.; SIMSEK, S. Production of structurally diverse wheat arabinoxylan hydrolyzates using combinations of xylanase and arabinofuranosidase. **Carbohydrate Polymers**, v. 132, p. 452 – 459, 2015.

MICHELIN, M.; XIMENES, E.; POLIZELI, M. L. T. M.; LADISCH, M. R. Effect of phenolic compounds from pretreated sugarcane bagasse on cellulolytic and hemicellulolytic activities. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 275 – 278, 2016.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426 – 428, 1959.

MODENBACH, A. A.; NOKES, S. E. Enzymatic hydrolysis of biomass at high-solids loadings – A review. **Biomass and Bioenergy**, v. 56, p. 526 – 544, 2013.

MOREIRA, L. R. S.; FERREIRA FILHO, E. X. Insights into the mechanism of enzymatic hydrolysis of xylan. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 12, p. 5205 – 5214, 2016.

MORTIMER, J. C.; MILES, G. P.; BROWN, D. M.; ZHANG, Z.; SEGURA, M. P.; WEIMAR, T.; YU, X.; SEFFEN, K. A.; STEPHENS, E.; TURNER, S. R.; DUPREE, P. Absence of branches from xylan in *Arabidopsis gux* mutants reveals potential for simplification of lignocellulosic biomass. **Proceedings of the National**

Academy of Sciences of the United States of America, v. 107, n. 40, p. 17409 – 17414, 2010.

MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y. Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 673 – 686, 2005.

MUSSATTO, S. I.; DRAGONE, G.; FERNADES, M.; MILAGRES, A. M. F.; ROBERTO, I. C. The effect of agitation speed, enzyme loading and substrate concentration on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain. **Cellulose**, v. 15, p. 711 – 721, 2008.

NASCIMENTO, V. M.; NAKANISHI, S. C.; ROCHA, G. J. M.; RABELO, S. C.; PIMENTA, M. T. B.; ROSSELL, C. E. V. Effect of Anthraquinone on Alkaline Pretreatment and enzymatic Kinetics of Sugarcane Bagasse Saccharification: Laboratory and Pilot Scale Approach. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 4, n. 7, p. 3609 – 3617, 2016.

NOBRE, C.; TEIXEIRA, J. A.; RODRIGUES, L. R. Fructo-oligosaccharides purification from fermentative broth using an activated charcoal column. **New Biotechnology**, v. 29, n. 3, p. 395 – 401, 2012.

NOSRATPOUR, M. J.; KARIMI, K.; SADEGHI, M. Improvement of ethanol and biogas production from sugarcane bagasse using sodium alkaline pretreatments. **Journal of Environmental Management**, v. 226, p. 329 – 339, 2018.

OHTA, T.; YAMASAKI, S.; EGASHIRA, Y.; SANADA, H. Antioxidative Activity of Corn Bran Hemicellulose Fragments. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, p. 653 – 656, 1994.

OLIVEIRA, D. M. de.; FINGER-TEIXEIRA, A.; MOTA, T. R.; SALVADOR, V. H.; MOREIRA-VILAR, F. C.; MOLINARI, H. B.; MITCHELL, R. A. C.; MARCHIOSI, R.; FERRARESE-FILHO, O.; SANTOS, W. D. dos. Ferulic acid: a key component in grass lignocellulosic recalcitrance to hydrolysis. **Plant Biotechnology Journal**, v. 13, n. 9, p. 1224 – 1234, 2015.

OLIVEIRA, D. M.; MOTA, T. R.; OLIVA, B.; SEGATO, F.; MARCHIOSI, R.; FERRARESE-FILHO, O.; FAULDS, C. B.; SANTOS, W. Feruloyl esterases: Biocatalysts to overcome biomass recalcitrance and for the production of bioactive compounds. **Bioresource Technology**, v. 278, p. 408 – 423, 2019.

ORIEZ, V.; BEYERLE, M.; PONTALIER, P.-Y.; PEYDECASTAING, J. Sugarcane bagasse mild alkaline fractionation and production of purified fractions by pulse chromatography with water. **Industrial Crops & products**, v. 1125, p. 370 – 378, 2018.

OTIENO, D. O.; AHRING, B. K. The potential for oligosaccharide production from the hemicellulose fraction of biomass through pretreatment processes: xylooligosaccharides (XOS), arabinooligosaccharides (AOS), and mannoooligosaccharides (MOS). **Carbohydrate Research**, v. 360, p. 84 – 92, 2012.

PENG, F.; PENG, P.; XU, F.; SUN R.-C. Fractional purification and bioconversion of hemicellulose. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 879 – 903, 2012.

PENG, P.; PENG, F.; BIAN, J.; XU, F.; SUN, R. Studies on the Starch and Hemicelluloses Fractionated by Graded Ethanol Precipitation from Bamboo *Phyllostachys bambusoides* f. shouzhu Yi. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 2680 – 2688, 2011.

PENG, P.; SHE, D. Isolation, structural characterization, and potential applications of hemicelluloses from bamboo: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 122, p. 701 – 720, 2014.

PETERSON, M. E.; DANIEL, R. M.; DANSON, M. J.; EISENTHAL, R. The dependence of enzyme activity on temperature: determination and validation of parameters. **Biochemical Journal**, v. 402, p. 331 – 337, 2007.

PIPPO, W. A.; LUENGO, C. A.; ALBERTERIS, L. A. M.; GARZONE, P.; CORNACCHIA, G. Energy Recovery from Sugarcane-Trash in the Light of 2nd Generation Biofuel. Part 2: Socio-Economic Aspects and Techno-Economic Analysis. **Waste and Biomass Valorization**, v. 2, n. 3, p. 257 – 266, 2011.

POLLET, A.; DELCOUR, J. A.; COURTIN, C. M. Structural determinants of the substrate specificities of xylanases from different glycoside hydrolase families. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 30, n. 3, p. 176 – 191, 2010.

PRADO, J. M.; PRADO, G. H. C.; MEIRELES, M. A. Scale-up study of supercritical fluid extraction process for clove and sugarcane residue. **The journal of Supercritical Fluids**, v. 56, p. 231 – 237, 2011.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E. **Analytical Biochemistry**, v. 269, p. 337-341, 1999.

PRISTOV, J. B.; MITROVIC, A.; SPASOJEVIC, J. A comparative study of antioxidative activities of cell-wall polysaccharides. **Carbohydrate research**, v. 346, n. 14, p. 2255 – 2259, 2011.

PUCHART, V.; BIELY, P. Simultaneous production of endo-beta-1,4-xylanase and branched xylooligosaccharides by *Thermomyces lanuginosus*. **Journal of Biotechnology**, v. 137, n. 1 – 4, p. 34 – 43, 2008.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes Utilizados em Óleos, Gorduras e Alimentos Gordurosos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 755 – 760, 2006.

RAO, R. S. P.; MURALIKRISHNA, G. Water soluble feruloyl arabinoxylans from rice and ragi: Changes upon malting and their consequence on antioxidant activity. **Phytochemistry**, v. 67, p. 91 – 99, 2006.

REDDY, S. S.; KRISHNAN, C. Production of high-pure xylooligosaccharides from sugarcane bagasse using crude β -xylosidase-free xylanase of *Bacillus subtilis*

KCX006 and their bifidogenic function. **LWT – Food Science and Technology**, v. 65, p. 237 – 245, 2016.

REINOSO, F. A. M. **Caracterização físico-química do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com sulfito alcaino, extração enzimática da hemicelulose e sacarificação dos polissacarídeos residuais**. 2017. 152 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, 2017.

REINOSO, F. A. M.; RENCORET, J.; GUTIÉRREZ, A.; MILAGRES, A. M. F.; DEL RÍO, J. C.; FERRAZ, A. Fate of p-hydroxycinnamates and structural characteristics of residual hemicelluloses and lignin during alkaline-sulfite chemithermomechanical pretreatment of sugarcane bagasse. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, p. 153, 2018.

RÉMOND, C.; AUBRY, M.; CRÔNIER, D.; NOËL, S.; MARTEL, F.; ROGE, B.; RAKOTOARIVONINA, H.; DEBEIRE, P.; CHABBERT, B. Combination of ammonia and xylanase pretreatments: Impact on enzymatic xylan and cellulose recovery from wheat straw. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 6712 – 6717, 2010.

ROCHA, G. J. M.; NASCIMENTO, V. M.; GONÇALVES, A. R. G.; SILVA, V. F. N.; MARTÍN, C. Influence of mixed sugarcane bagasse samples evaluated by elemental and physical-chemical composition. **Industrial Crops and Products**, v. 64, p. 52 – 58, 2015.

ROCHE, C. M.; DIBBLE, C. J.; KNUTSEN, J. S.; STICKEL, J. J.; LIBERATORE, M. W. Particle Concentration and Yield Stress of biomass Slurries During Enzymatic Hydrolysis at High-Solids Loadings. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 104, n. 2, p. 290 – 300, 2009a.

ROCHE, C. M.; DIBBLE, C. J.; STICKEL, J. J. Laboratory-scale method for enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass at high-solids loadings. **Biotechnology for Biofuels**, v. 2, n. 28, p. 1 – 11, 2009b.

SAHA, B. Hemicellulose bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 5, p. 279 – 291, 2003.

SAINI, J.; SAINI, R.; TEWARI, L. Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recent developments. **3 Biotech**, v. 5, p. 337 – 353, 2015.

SANTOS, M. P.; REINOSO, F. A. M.; TÁVILLA, V.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A. M. F. On-site produced and commercially available alkaline-active xylanases compared for xylan extraction from sugarcane bagasse. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 18, p. 101081, 2019.

SANTOS, P. S. B.; ERDOCIA, X.; GOTTA, D. A.; LABIDI, J. Characterisation of Kraft lignina separated by gradiente acid precipitation. **Industrial Crops and Products**, v. 55, p. 149 – 154, 2014.

SAULNIER, L.; SALDO, P.-E.; BRANLARD, G.; CHARMET, G.; GUILLON, F. Wheat arabinoxylans: Exploiting variation in amount and composition to develop enhanced varieties. **Journal of Cereal Science**, v. 46, p. 261 – 281, 2007.

SCHAICH, K. M.; TIAN, X.; XIE, J. Reprint of “Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays”. **Journal of Functional Food**, v. 18, p. 782 – 796, 2015.

SCHÖNBERG, C.; OKSANEN, T.; SUURNÄKKI, A.; KETTUNEN, H.; BUCHERT, J. The Importance of Xylan for the Strength Properties of Spruce Kraft Pulp Fibres. **Holzforschung**, v. 55, n. 6, p. 639 – 644, 2001.

SEIDL, P. R.; GOULART, A. K. Pretreatment processes for lignocellulosic biomass conversion to biofuels and bioproducts. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 2, p. 48 – 53, 2016.

SINDHU, R.; BINOD, P.; PANDEY, A. Biological pretreatment of lignocellulosic biomass – An overview. **Bioresource Technology**, v. 199, p.76 – 82, 2016.

SILVA, A. S.’A. da.; LEE, S.-H.; ENDO, T.; BON, E. P. S. Major improvement in the rate and yield of enzymatic saccharification of sugarcane bagasse via pretreatment with the ionic liquid 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate ([Emim][Ac]). **Bioresource Technology**, v. 102, p. 10505 – 10509, 2011.

SILVA, A. S.’A. da.; SOUZA, M. F. de.; BALLESTEROS, I.; MANZANARES, P.; BALLESTEROS, M.; BOM, E. P. S. High-solid content enzymatic hydrolysis of hydrothermally pretreated sugarcane bagasse using a laboratory-made enzyme blend and commercial preparations. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 10, p. 1561 – 1567, 2016.

SILVA, C.; MARTINS, M.; JING, S.; FU, J.; CAVACO-PAULO, A. Practical insights on enzyme stabilization. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 38, n. 3, p. 335 – 350, 2018.

SINDHI, V.; GUPTA, V.; SHARMA, K.; BHATNAGAR, S.; KUMARI, R.; DHAKA, N. **Potential applications of antioxidants – A review**, v. 7, p. 828 – 835, 2013.

SINGH, J.; SUHAG, M.; DHAKA, A. Augmented digestion of lignocellulose by steam explosion, acid and alkaline pretreatment methods: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 117, p. 624 – 631, 2015.

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D. **Determination of Sugars, By products, and Degradation Products in Liquid Fraction Process Samples – Laboratory Analytical Procedure (LAP)**. National Renewable Energy Laboratory, p. 11, 2008. Technical Report.

SOUSA, E. L. L. de.; MACEDO, I. de. C. **Etanol e Bioeletricidade: a cana-de-açúcar no futuro da matriz energética – ÚNICA: União da Indústria de Cana-de-açúcar**. São Paulo: Editora Luc Projetos de Comunicação Ltda, 2010.

SOUZA, M. F.; TEIXEIRA, R. S. S.; SILVA, A. S.; FERREIRA-LEITÃO, V. S.; BOM, E. P. S. **Alternatives biocatalysis Chlorine-Free Biomass processing: Enzymatic alternative for bleaching and hydrolysis of lignocellulosic materials.** *Chemistry Beyond Chlorine*, p. 241 – 268, 2016.

SPORCK, D.; REINOSO, F. A. M.; RENCORET, J.; GUTIÉRREZ, A.; RIO, J. C.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A. M. F. Xylan extraction from pretreated sugarcane bagasse using alkaline and enzymatic approaches. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, p. 296, 2017.

SUN, S.; SUN, S.; CAO, X.; SUN, R. The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 49 – 58, 2016.

SUURNÄKKI, A.; ANETTE, H.-H.; BUCHERT, J.; TENKANEN, M.; VIIKARI, L.; WESTERMARK, U. Localization of xylanase and mannanase action in kraft fibres. **Journal of Pulp and Paper Science**, v. 22, n. 3, p. 78 – 83, 1996.

VALENZUELA, S. V.; DIAZ, P.; PASTOR, F. I. J. Modular Glucuronoxylan-Specific Xylanase with a Family CBM35 Carbohydrate-Binding Module. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 11, p. 3923 – 3931, 2012.

VALLS, C.; PASTOR, F. I. J.; VIDAL, T.; RONCERO, M. B.; DÍAZ, P.; MARTÍNEZ, J.; VALENZUELA, S. V. Antioxidant activity of xylooligosaccharides produced from glucuronoxylan by Xyn10A and Xyn30D xylanases and eucalyptus autohydrolysates. **Carbohydrate Polymers**, v. 194, p. 43 – 50, 2018.

VÁZQUEZ, M. J.; ALONSO, J. L.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJO, J. C. Xylooligosaccharides: manufacture and applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 11, p. 387 – 393, 2000.

VIIKARI, L.; KANTELINEN, A.; BUCHERT, J.; PULS, J. Enzymatic accessibility of xylans in lignocellulosic materials. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 51, p. 124 – 129, 1994.

WALIA, A.; GULERIA, S.; MEHTA, P.; CHAUHAN, A.; PARKASH, J. Microbial xylanases and their industrial application in pulp and paper biobleaching: a review. **3 Biotech**, v. 7, p. 11, 2017.

WALLMO, H.; THEILANDER, H. JÖNSSON, A.-S.; WALLBERG, O.; LINDGREN, K. The influence of hemicelluloses during the precipitation of lignin in kraft black liquor. **Nordic Pulp and Paper Research journal**, v. 24, n. 2, p. 165 – 171, 2009.

WANG, J.; HAO, X.; YANG, M.; QIN, Y.; JIA, L.; CHU, J.; ZHANG, J. Impact of lignin content on alkaline-sulfite pretreatment of Hybrid Pennisetum. **Bioresource Technology**, v. 267, p. 793 – 796, 2018a.

WANG, S.; DAI, G.; YANG, H.; LUO, Z. Lignocellulosic biomass pyrolysis mechanism: A state-of-art review. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 62, p. 33 – 86, 2017.

- WANG, Y.-H.; ZHANG, J.; QU, Y.-S.; LI, H.-Q. Removal of chromophore in enzymatic hydrolysis by acid precipitation to improve the quality of xylo-oligosaccharides from corn stalk. **Bioresource Technology**, v. 249, p. 751-757, 2018b.
- WATKINS, D.; NURUDDIN, MD.; HOSUR, M.; TCHERBI-NARTEH, A.; JEELANI, S. Extraction and characterization of lignin from different biomass resources. **Journal of Materials Resource and Technology – JMR&T**, v. 4, n. 1, p. 26 – 32, 2015.
- WOJTUSIK, M.; ZURITA, M.; VILLAR, J. C.; LADERO, M.; GARCIA-OCHOA, F. Influence of fluid dynamic conditions on enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: Effect of mass transfer rate. **Bioresource Technology**, v. 216, p. 28 – 35, 2016.
- WU, L.; ARAKANE, M.; IKE, M.; WADA, M.; TAKAI, T.; GAU, M.; TOKUYASU, K. Low temperature alkaline pretreatment for improving enzymatic digestibility of sweet sorghum bagasse for ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 4793 – 4799, 2011.
- XIMENSES, E.; KIM, Y.; MOSIER, N.; DIEN, B.; LADISCH, M. Inhibition of cellulases by phenols. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, p. 170 – 176, p. 2010.
- YI, J.; HE, T.; JIANG, Z.; LI, J.; HU, C. AlCl_3 catalyzed conversion of hemicellulose in corn stover. **Chinese Journal of Catalysis**, v. 34, p. 2146 – 2152, 2013.
- YOU, X.; WANG, X.; LIANG, C.; LIU, X.; WANG, S. Purification of Hemicellulose from Sugarcane Bagasse Alkaline Hydrolysate Using an Aromatic-Selective Adsorption Resin. **Carbohydrate Polymers**, v. 225, p. 115216, 2019.
- YUWANG, P.; SULAEVA, I.; HELL, J.; HENNIGES, U.; BÖHMDORFER, S.; ROSENAU, T.; CHIRSOMBOON, B.; TONGTA, S. Phenolic compounds and antioxidant properties of arabinoxylan hydrolysates from defatted rice bran. **Journal of the Science of Food and Agricultural**, v. 98, n. 1, p. 140 – 146, 2018.
- ZAKARIA, M. R.; HIRATA, S.; HASSAN, M. A. Combined pretreatment using alkaline hydrothermal and ball milling to enhance enzymatic hydrolysis of oil palm mesocarp fiber. **Bioresource Technology**, v. 169, p. 236 – 243, 2014.
- ZHANG, J.; MOILANEN, U.; TANG, M.; VIKARI, L. The carbohydrate-binding module of xylanase from *Nonomuraea flexuosa* decreases its non-productive adsorption on lignin. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 18, p. 8, 2013.
- ZHANG, J.; WANG, Y.-H.; WEI, Q.-Y.; Du, X.-J.; QU, Y.-S. Investigating desorption during ethanol elution to improve the quality and antioxidant activity of xylo-oligosaccharides from corn stalk. **Bioresource Technology**, v. 249, p. 342-347, 2018.

ZHANG, X.; QIN, W.; PAICE, M. G.; SADDLER, J. N. High consistency enzymatic hydrolysis of hardwood substrates. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 5890 – 5897, 2009.

ZHU, M.-Q.; WEN, J.-W.; SU, Y.-Q.; WEI, q.; SUN, R.-C. Effect of structural changes of lignin during the autohydrolysis and organosolv pretreatment on *Eucommia ulmoides* Oliver for an effective enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 55, n. 32, p. 8691 – 8705, 2016.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Curva de calibração da Coluna Biogel P2.

Fonte: Arquivo pessoal.

APÊNDICE B – Curvas de calibração para quantificação de xilo-oligossacarídeos em HPLC empregando as colunas em série HPX87C e HPX42 (Bio-rad).

XOS	X2	X3	X4	X5	X6
Tempo de retenção (min)	28,67	25,89	23,86	22,47	21,22
Área mínima	11,93	17,52	16,229	8,197	20,14
Área máxima	94	134,79	115,93	69,20	135,05
Curva	$Y=451,28x+1,2367$	$Y=672,5x-0,085$	$Y=575x+2,524$	$Y=345,84x-0,6858$	$Y=659,67x+3,522$
R ²	0,9906	0,9998	0,9984	0,9994	0,9997

Fonte: Arquivo pessoal

Nota: Y – área no cromatograma; X – concentração de XOS em g/L

APÊNDICE C – Curva de calibração para determinação de fenólicos totais.

Fonte: Arquivo pessoal.

Nota: EAG – equivalente de ácido gálico.

APÊNDICE D - Curva de calibração para determinação da inibição do radical DPPH.

Fonte: Arquivo pesso.

Nota: Eq. – equivalente de trolox.

APÊNDICE E – Curva de calibração para determinação da inibição do radical ABTS.

Fonte: Arquivo Pessoal.

Nota: Eq. – equivalente de trolox.

APÊNDICE F – Curva de calibração para determinação da capacidade antioxidante total pelo método fosfo-molibdato.

Fonte: Arquivo pessoal.

Nota: Eq. – equivalente de trolox.

APÊNDICE G – Análise de variância (ANOVA) para o planejamento fatorial 2^2 para o efeito das variáveis carga de sólidos e carga de enzima no rendimento de extração de xilana.

Fonte de variação	GL	Soma quadrática	Média Quadrática	<i>F</i>	<i>p-valor</i>
Modelo	4	105,23	26,31	136,38	0,007
Linear	2	93,85	46,92	234,26	0,004
Carga de sólidos	1	46,37	46,37	240,42	0,004
Carga de enzimas	1	47,47	47,47	246,10	0,004
Interação de 2 fatores	1	4,28	4,28	22,21	0,042
Cg sólidos*Cg enzimas	1	4,28	4,28	22,21	0,042
Curvatura	1	7,10	7,10	36,80	0,026
Erro	2	0,386	0,1929		
Total	6	105,62			

Fonte: Arquivo pessoal.

Nota: GL – Grau de liberdade; Cg – Carga.

Coeficiente de determinação $R^2 = 0,9963$.