

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

ANA MARIA DOS SANTOS CAMARGOS

Reticulação de xilanas de baixa massa molar via acoplamento oxidativo dos ácidos  
hidroxicinâmicos

Lorena  
2020



ANA MARIA DOS SANTOS CAMARGOS

Reticulação de xilanas de baixa massa molar via acoplamento oxidativo dos ácidos  
hidroxicinâmicos

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 Biotecnologia Industrial.

Orientador: Prof. Dr. André Luis Ferraz

Versão Corrigida

Lorena  
2020

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)

Camargos, Ana Maria dos Santos

Reticulação de xilanas de baixa massa molar via acoplamento oxidativo dos ácidos hidroxicinâmicos / Ana Maria dos Santos Camargos; orientador André Luis Ferraz - Versão Corrigida. - Lorena, 2020.  
97 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências - Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Biotecnologia Industrial) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2020

1. Biorrefinaria. 2. Xilana. 3. Ácidos hidroxicinâmicos. 4. Lacase. 5. Reticulação. I. Título. II. Ferraz, André Luis , orient.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Wesley e Maria do Carmo e minha irmã Letícia pelo apoio, torcida, por não medirem esforços e se fazerem presentes mesmo há quilômetros de distância. Nada disso seria possível sem vocês. E também à toda minha família por todo suporte e carinho.

Ao professor André Ferraz pela orientação, confiança, paciência e pelo imensurável conhecimento compartilhado. Além disso, agradeço pela constante disponibilidade de tirar dúvidas e auxiliar no que fosse preciso.

À professora Adriane pelo suporte desde o início do desenvolvimento do projeto, seja nos experimentos, nas dúvidas e sugestões. Suas contribuições sempre foram muito importantes para a realização desse trabalho.

Ao Zé Moreira, "marvadinho" nas gambiarras, por todo o auxílio no dia a dia do laboratório e também por ter se tornado um grande amigo, sempre disposto a nos ouvir e motivar.

À Cris, Geralda e Creuza pelo sorrisos diários e abraços cheios de afago. Ao Isnaldi pela companhia nos cafezinhos e a disposição de sempre ajudar, e ao Zé Cobrinha pelas breves passagens diárias no laboratório com seus causos e piadas.

Aos amigos do Lab de Ciências da Madeira, Uira, Flávia e Ângela pela convivência sempre leve e colaborativa e, juntamente aos amigos do Lab de Ecotoxicologia, Caio, Lucas, Yumi, Diego, Felipe e Luis, pelas incontáveis risadas nos almoços do RU e conversas descontraídas no corredor. Agradeço em especial ao Otto, pela boa amizade e disponibilidade constante em me auxiliar, seja em experimentos, revisão de textos, dúvidas e favores.

À Mariana, Amanda, Livia e Fanny pela parceria, carinho e acolhida desde quando cheguei a Lorena. Vocês são especiais demais pra mim! E, em especial à Sarah, companheira pra todas as horas, gratidão por esse reencontro.

Aos amigos queridos Sophia, Italo, Will, Tainã, Henrique, Fernanda e Andrés. Vocês fizeram essa caminhada ser mais fácil, vou guardá-los sempre com muito carinho.

Aos amigos de Viçosa e Lafaiete, por todo o apoio e amizade mesmo há distância.

Aos funcionários do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e da Comissão de Pós-graduação pela disposição em ajudar.

À Escola de Engenharia de Lorena por todas as oportunidades oferecidas e por fornecer a estrutura necessária à realização desse trabalho.

À FAPESP pelo apoio financeiro concedido através do processo nº 2018/17417-5, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).



## RESUMO

CAMARGOS, A. M. S. **Reticulação de xilanas de baixa massa molar via acoplamento oxidativo dos ácidos hidroxicinâmicos**. 2020. 97 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2020.

A utilização de material lignocelulósico nas biorrefinarias, como o bagaço de cana-de-açúcar, atende à demanda atual por tecnologias mais sustentáveis. Nesse contexto, a xilana, polissacarídeo hemicelulósico mais abundante em gramíneas, possui potencial de aplicação biotecnológica em diversos setores da indústria. Esse polissacarídeo apresenta interações físicas e químicas com os outros componentes da parede celular, sendo requeridas uma ou mais etapas de pré-tratamento para aumentar a acessibilidade aos polissacarídeos e propiciar seu aproveitamento. Dentre os tratamentos mais utilizados, o processo quimiotermodinâmico que emprega sulfito alcalino é o responsável pela solubilização de frações da lignina e baixa remoção de polissacarídeos. O sólido pré-tratado pode ser encaminhado para etapas de sacarificação enzimática e fermentação dos monômeros gerados. Entretanto, a fermentação de pentoses não é tão eficiente quanto a de hexoses, demonstrando que seria interessante isolar a fração de xilana para geração de produtos de valor agregado. Essa extração pode ser conduzida por meio de tratamento enzimático, porém as xilanas extraídas apresentam uma baixa massa molar. Além disso, possivelmente se encontram associadas a porções de ácidos hidroxicinâmicos através de uma ligação éster entre a arabinose e o ácido hidroxicinâmico. A reticulação das xilanas de baixa massa molar a partir dos terminais fenólicos dos ácidos hidroxicinâmicos empregando enzimas oxidativas se apresenta como alternativa para promover o aumento da massa molar e possibilitar a expansão das aplicações desses materiais poliméricos. Dessa forma, o presente trabalho avaliou a extração de xilanas de bagaço pré-tratado com sulfito alcalino utilizando xilanases e desenvolveu processos de reticulação enzimática das frações de xilana empregando enzimas oxidativas como peroxidase de rabanete (HRP) e lacase. A caracterização química da xilana extraída com endoxilanases mostrou que ela continha cerca de 1% de ácido ferúlico e 4% de ácido *p*-cumárico em sua composição, os quais representam possíveis sítios de acoplamento oxidativo no material. O acoplamento oxidativo desta xilana catalisado por lacase foi desenvolvido com base em um planejamento experimental 2<sup>2</sup>, no qual foi verificado que apenas a carga enzimática afetou significativamente a formação de uma xilana reticulada, enquanto que o tempo de reação entre 4 h e 24 h não afetou a reação. A caracterização química e espectroscópica de uma xilana reticulada preparada em escala ampliada revelou um material composto por xilana, mas também por proteínas precipitadas simultaneamente durante o processo de recuperação da xilana. A massa molar da xilana reticulada foi cerca de 90 vezes superior à xilana extraída de partida. Os espectros UV da xilana de partida e da xilana reticulada diferiram nas absorções características das estruturas conjugadas dos hidroxicinâmicos, sugerindo que o acoplamento oxidativo ocorreu em função da abertura das  $\alpha$ - $\beta$  insaturações dos precursores. As xilanas extraída e reticulada também exibiram atividade antioxidante frente ao radical ABTS'. Os ensaios de acoplamento oxidativo empregando duas peroxidases (HRP) demonstraram que, mesmo em pequena extensão, foram observadas xilanas de maior massa molar na maior carga enzimática testada. De uma forma geral, o trabalho indicou que é possível reticular xilana de bagaço de cana por via enzimática oxidativa e, assim, gerar novos materiais que podem agregar valor à utilização de bagaço de cana no contexto das biorrefinarias.

**Palavras chaves:** Biorrefinaria. Xilana. Ácidos hidroxicinâmicos. Lacase. Reticulação.

## ABSTRACT

CAMARGOS, A. M. S. **Low molar mass xylans cross-linking via hydroxycinnamic acids oxidative coupling**. 2020. 97 p. Dissertation (Master of Science) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2020.

Lignocellulosic material utilization in biorefineries, such as sugarcane bagasse, meets the current demand for more sustainable technologies. In this context, xylan, the most abundant hemicellulosic polysaccharide in grasses, has the potential for several biotechnological applications in industry. This polysaccharide has physical and chemical interactions with other cell wall components, requiring one or more pre-treatment steps to increase polysaccharides accessibility for their utilization. Among the most employed treatments, alkaline-sulfite chemothermomechanical process is responsible for lignin fractions solubilization and low polysaccharide removal. The pretreated solids can be forwarded to enzymatic saccharification and fermentation. However, pentoses fermentation is not as efficient as that of hexoses, demonstrating that it would be interesting to isolate the xylan fraction, generating new value-added products. This extraction can be carried out through enzymatic treatment, however the extracted xylans have a low molar mass. In addition, they are possibly associated with hydroxycinnamic acids through an ester bond between arabinose and hydroxycinnamic acid. Low molar mass xylans cross-linking from the phenolic terminals of hydroxycinnamic acids catalyzed by oxidative enzymes is an alternative to increase the molecular size and enable the applications of these polymeric materials. Thus, the present work evaluated xylan extraction from alkaline-sulfite pretreated sugarcane bagasse using xylanases and developed enzymatic cross-linking processes of the xylan fractions using oxidative enzymes such as horseradish peroxidase (HRP) and laccase. The chemical characterization of xylan extracted with endoxylanases showed that it contained about 1% of ferulic acid and 4% of p-coumaric acid, which represent possible oxidative coupling sites in the material. The laccase-catalyzed oxidative coupling of this xylan was developed based on a 2<sup>2</sup> experimental design, in which it was verified that only the enzymatic load significantly affected the formation of a cross-linked xylan, while the reaction time between 4 h and 24 h did not affect the reaction. The chemical and spectroscopic characterization of a cross-linked xylan prepared after reaction scale-up revealed a material composed of xylan, but also proteins which precipitated during the xylan recovery process. The cross-linked xylan molar mass was about 90 times higher than that of originally extracted xylan. The UV spectra of the starting xylan and the cross-linked xylan differed in the characteristic absorptions of the hydroxycinnamic conjugated structures, suggesting that the oxidative coupling occurred due to the precursors  $\alpha$ - $\beta$  unsaturation opening. The extracted and cross-linked xylans also exhibited antioxidant activity against the ABTS radical. The oxidative coupling assays using two HRPs demonstrated that, even to a smaller extent, xylans of higher molar mass were observed at the highest enzyme load tested. In general, the work indicated that it is possible to crosslink xylan from sugarcane bagasse through an oxidative enzymatic route and, thus, generate new materials that can add value to the use of sugarcane bagasse in the context of biorefineries.

**Keywords:** Biorefinery. Xylan. Hydroxycinnamic acids. Laccase. Cross-linking.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Modelos de biorrefinaria a partir de conversão bioquímica da biomassa envolvendo duas vias distintas em que as correntes C5 e C6 aparecem combinadas ou separadas após a etapa de pré-tratamento. ....	17
<b>Figura 2.</b> Representação das ligações (a) $\alpha$ éter e (b) $\beta$ éter entre lignina e hemicelulose (Lam et al., 2001).....	20
<b>Figura 3.</b> Estrutura de uma arabinoxilana incluindo regiões não substituídas e regiões com substituição de arabinose e ácido ferúlico. Adaptado de Hatfield et al. (2017). ....	21
<b>Figura 4.</b> Ilustração de reticulação entre hemiceluloses através da ação de enzima oxidativa sobre os ácidos hidroxicinâmicos, destacando-se os principais dímeros de ácido ferúlicos resultantes. A representação dos símbolos é a seguinte: xilose ( $\circ$ ), arabinose ( $\square$ ), ácido ferúlico ( $\Delta$ ) e Di-FA ( $\blacktriangle \blacktriangle$ ). Adaptado de Carvajal-Millan et al. (2005b).....	27
<b>Figura 5.</b> Fluxograma das atividades desenvolvidas. ....	33
<b>Figura 6.</b> Conversão de glucana e xilana após 72 h de hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado (linha sólida) e material resultante após extração de xilana (linha pontilhada).....	48
<b>Figura 7.</b> Tipos de ligação que podem ser encontrados na parede celular de gramíneas. 1) Ligação éster de grupos acetila à xilana; 2) Ligação éster de ácido ferúlico à moléculas de arabinose; 3) Ligação entre arabinose e lignina; 4) Ligação entre duas moléculas de ácido ferúlico (5-5') e 5) Ligação éter entre o ácido ferúlico e lignina. Adaptado de Buanafina (2009).....	51
<b>Figura 8.</b> Reação de reticulação de xilana empregando a enzima lacase na carga de 15 $UI.mg^{-1}$ de xilana. (A) Perfil de eluição na cromatografia de permeação em gel da reação da xilana isolada em 280 nm. (B) Dados da eluição de carboidratos a partir da reação de fenol/sulfúrico com as frações coletadas no GPC. ....	53
<b>Figura 9.</b> Cromatogramas das reações de reticulação avaliando-se diferentes cargas enzimáticas e tempos de reação. ....	55
<b>Figura 10.</b> Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados, relacionando os fatores carga e tempo, e como variável resposta o somatório de área. ....	56
<b>Figura 11.</b> Relação entre o somatório de área e cargas enzimáticas empregadas nos ensaios do planejamento experimental. ....	57
<b>Figura 12.</b> Teste de cinética avaliando os tempos de 1 a 4 h de reação em uma carga de 45 $UI.mg^{-1}$ da enzima lacase. A) Distribuição da massa molar dos produtos de reação de reticulação de xilana iniciada por lacase em cada tempo avaliado. B) Representação da	

somatória das áreas do cromatograma da letra A em função do tempo, considerando o volume de eluição de 7-12 mL.....	58
<b>Figura 13.</b> Espectro na região do UV. A) Xilana comercial (BIOSUPPLIES AUSTRALIA) na concentração de 1 mg.mL <sup>-1</sup> . B) Xilana extraída enzimaticamente (linha sólida) e xilana reticulada (linha pontilhada); ambas na concentração de 0,1 mg.mL <sup>-1</sup> . .....	63
<b>Figura 14.</b> Possíveis produtos da condensação de duas unidades de ácido ferúlico, resultando em clivagem da ligação dupla entre os carbonos alfa e beta. Adaptado de Adalakun et al. (2012).....	64
<b>Figura 15.</b> Espectro de Infravermelho (FT-IR) da arabinoxilana comercial (BIOSUPPLIES AUSTRALIA), da xilana extraída enzimaticamente e da xilana reticulada. ....	65
<b>Figura 16.</b> Espectro RMN-2D-HSQC das amostras de xilana. A) Xilana extraída de bagaço de cana via enzimática. B) Xilana reticulada a partir da reação de xilana extraída na presença de enzimas lacases. ....	65
<b>Figura 17.</b> Perfil de eluição na cromatografia de permeação em gel. (A) arabinoxilana comercial (BIOSUPPLIES AUSTRALIA), (B) xilana isolada a partir de bagaço pré-tratado com sulfito alcalino e (C) xilana reticulada. ....	68
<b>Figura 18.</b> Análise da capacidade antioxidante das xilanas na presença de radical ABTS <sup>•+</sup> . A) Decréscimo da coloração de ABTS <sup>•+</sup> na presença de diferentes concentrações de xilana extraída. B) Porcentagem de atividade antioxidante para as concentrações testadas de xilana extraída. C) Decréscimo da coloração de ABTS <sup>•+</sup> na presença de diferentes concentrações de xilana reticulada. D) Porcentagem de atividade antioxidante para as concentrações testadas de xilana reticulada.....	70
<b>Figura 19.</b> Espectro obtido em análise na região do ultravioleta do ácido ferúlico (controle) e dos produtos obtidos das reações de ácido ferúlico na presença de cada enzima separadamente (reticulados).....	72
<b>Figura 20.</b> Perfil de eluição na cromatografia de permeação em gel de ácido ferúlico (controle) e dos produtos obtidos das duas reações deste composto na presença de cada enzima separadamente (reticulados). ....	73
<b>Figura 21.</b> Espectro obtido em análise na região do ultravioleta do ácido <i>p</i> -cumárico (controle) e do produto obtido nas reações desse substrato na presença de cada enzima separadamente (reticulados).....	74
<b>Figura 22.</b> Perfil de eluição na cromatografia de permeação em gel de ácido <i>p</i> -cumárico (controle) e dos produtos obtidos das duas reações deste composto na presença de cada enzima separadamente (reticulados). ....	74

<b>Figura 23.</b> Perfil de eluição na cromatografia de permeação em gel da reação da xilana de bagaço de cana com a enzima HRP-P8000 empregando carga de 4 UI.mg <sup>-1</sup> de xilana. ....	75
<b>Figura 24.</b> Perfil de eluição na cromatografia de permeação em gel da reação da xilana isolada com a enzima HRP-P8375 empregando carga de 12 UI.mg <sup>-1</sup> de xilana. ....	76
<b>Figura 25.</b> Reação de reticulação de xilana empregando a enzima HRP-P8375 na carga de 24 UI.mg <sup>-1</sup> de xilana. (A) Perfil de eluição na cromatografia de permeação em gel. (B) Dados da eluição de açúcares a partir da reação de fenol/sulfúrico com as frações coletadas da cromatografia de permeação em gel. ....	76
<b>Figura 26.</b> Gel de poliacrilamida desnaturante contendo as bandas referentes ao marcador de massa molecular e às amostras de cada HRP. Foram aplicados 15 µg de proteína em cada canaleta. ....	88
<b>Figura 27.</b> Gel de poliacrilamida desnaturante contendo as bandas referentes ao marcador de massa molecular e a amostra de lacase. ....	88
<b>Figura 28.</b> Perfil de distribuição de massa molar da reação de acoplamento de xilana comercial na presença de lacase. ....	90

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Composição do extrato comercial de lacase (Olempska-beer, 2004). .....	37
<b>Tabela 2.</b> Planejamento dos experimentos de reticulação enzimática das xilanas a partir de um desenho experimental $2^2$ completo com repetições no ponto central. ....	38
<b>Tabela 3.</b> Dados de composição química e balanço de massa para os componentes do bagaço <i>in natura</i> , bagaço pré-tratado com sulfito alcalino e sólidos residuais após extração de xilana do bagaço pré-tratado. ....	47
<b>Tabela 4.</b> Composição de ácidos hidroxicinâmicos e balanço de massa para o bagaço antes e após o pré-tratamento. ....	48
<b>Tabela 5.</b> Velocidade de conversão de glucana e xilana após 4 h de hidrólise enzimática de bagaço pré-tratado, antes e após extração da xilana (tempo inicial) e após 72 h de reação. ....	49
<b>Tabela 6.</b> Dados de composição química da xilana extraída de bagaço pré-tratado com sulfito alcalino. ....	52
<b>Tabela 7.</b> Valores de somatório de área utilizados no <i>software</i> Minitab. ....	56
<b>Tabela 8.</b> Comparação de alguns parâmetros composicionais, métodos de extração e condições de reação de reticulação para xilanas isoladas de diferentes fontes vegetais. ....	60
<b>Tabela 9.</b> Dados de composição dos elementos carbono, hidrogênio, nitrogênio e oxigênio nas amostras de xilana. ....	61
<b>Tabela 10.</b> Dados de composição química da amostra de xilana reticulada. ....	62
<b>Tabela 11.</b> Cálculo de parâmetros a partir da distribuição de massa molar da Figura 17 para a xilana extraída e a xilana reticulada. ....	69
<b>Tabela 12.</b> Atividade antioxidante para xilana extraída na presença de radical DPPH. ....	71
<b>Tabela 13.</b> Cálculo de parâmetros a partir da distribuição de massa molar da Figura 25. A reação de reticulação foi conduzida utilizando-se uma carga de 24 UI de HRP-P8375 por miligrama de xilana. ....	77
<b>Tabela 14.</b> Parâmetros avaliados no decorrer das etapas de ultrafiltração do extrato comercial de lacases. ....	89

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS	Ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzenotiazolina-6-sulfônico
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
CTM	Chemi-thermomechanical
DDT	Dicloro-Difenil-Tricloroetano
DDG	Dried Distillers Grains
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNS	Dinitrosalicylic Acid
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
FTIR	Fourier-Transform Infrared
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRP	Horseradish Peroxidase
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
RMN-2D	Ressonância Magnética Nuclear Bidimensional
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SEC	Size Exclusion Chromatography
TCA	Ácido Tricloroacético
TEMED	N, N, N, N-tetrametil-etilenodiamino de sódio
TIR	Taxa Interna de Retorno
UI	Unidade internacional
UV	Ultravioleta
XOS	Xilooligossacarídeos



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>17</b>
2.1 Biorrefinarias .....	17
2.2 Componentes da biomassa lignocelulósica.....	18
2.2.1 Características estruturais de xilanas em angiospermas.....	20
2.3 Pré-tratamento de biomassa lignocelulósica e o processo sulfito alcalino .....	21
2.4 Recuperação de xilanas no contexto das biorrefinarias .....	23
2.5 Aplicações biotecnológicas de xilanas .....	24
2.6 Reticulação de xilanas via oxidação dos ácidos hidroxicinâmicos.....	26
2.7 Ação das enzimas oxidativas peroxidases de rabanete (HRP) e lacases .....	29
<b>3 CONSIDERAÇÕES FINAIS SOBRE A REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>31</b>
<b>4 OBJETIVOS.....</b>	<b>32</b>
<b>5 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>33</b>
5.1 Materiais .....	33
5.2 Pré-tratamento da biomassa lignocelulósica.....	33
5.3 Determinação de atividade de xilanase.....	34
5.4 Extração enzimática de xilanas.....	34
5.5 Sacarificação enzimática.....	35
5.6 Determinação da atividade de HRP e lacase .....	35
5.7 Análise das proteínas presentes nos extratos comerciais das enzimas peroxidases de rabanetes e lacase.....	36
5.8 Purificação parcial do extrato comercial de lacase .....	36
5.9 Reações de xilanas, ácido ferúlico e ácido cumárico com HRP/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e lacase .....	37
5.9.1 Planejamento experimental das condições de reticulação .....	38
5.10 Caracterização dos substratos e dos materiais produzidos nas reações de reticulação	39
5.10.1 Composição química.....	39

5.10.2 Composição elementar .....	41
5.10.3 Determinação da massa molar aparente .....	41
5.10.4 Caracterização por análises espectroscópicas.....	42
5.11 Análise de atividade antioxidante das xilanas antes e após reticulação.....	43
<b>6 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>45</b>
<b>ITEM 1 - Reticulação de xilana de bagaço de cana via acoplamento oxidativo dos ácidos hidroxicinâmicos catalisado por lacase .....</b>	<b>45</b>
6.1 Características dos insumos lignocelulósicos .....	45
6.1.1 Composição química dos materiais .....	45
6.1.2 Hidrólise enzimática dos materiais antes e após a extração de xilanas .....	48
6.2 Características da xilana extraída.....	49
6.3 Reticulação de xilana com lacase.....	53
6.3.1 Efeito da carga de enzima e do tempo de reação nas reações de reticulação de xilana.....	54
6.3.2 Caracterização da xilana reticulada em condições ótimas de reação .....	61
6.3.3 Determinação da massa molar.....	66
6.3.4 Análise da atividade antioxidante das xilanas .....	69
<b>ITEM 2 - Exploração do emprego de peroxidases como iniciadores da reticulação de ácidos hidroxicinâmicos e de xilana .....</b>	<b>71</b>
6.4 Reticulação de ácidos hidroxicinâmicos na presença de HRP P8000 e P8375 .....	71
6.5 Reticulação de xilana com HRP P8000 e P8375 .....	75
<b>7 CONCLUSÕES .....</b>	<b>78</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>80</b>
<b>APÊNDICE A.....</b>	<b>87</b>
<b>APÊNDICE B.....</b>	<b>90</b>
<b>APÊNDICE C.....</b>	<b>92</b>
<b>APÊNDICE D.....</b>	<b>96</b>



## 1 INTRODUÇÃO

A definição de biorrefinaria se relaciona à obtenção de uma gama de produtos a partir da conversão de biomassas com o intuito tanto de agregar valor à cadeia produtiva, quanto de minimizar os possíveis impactos negativos ao meio ambiente (Vaz, 2017). No Brasil, há um destaque para a utilização do bagaço de cana-de-açúcar, já que o país é o maior produtor mundial de cana e seu processamento industrial resulta em uma elevada quantidade de bagaço, resíduo atualmente empregado na queima e geração de vapor e eletricidade nas usinas (CONAB, 2019).

A biomassa lignocelulósica representa a maior fonte de recurso orgânico renovável do mundo e sua composição consiste principalmente em açúcares na forma de polissacarídeos, como celulose (35-50 %) e hemicelulose (20-35 %) e lignina (15-27 %) (Mood et al., 2013). Na parede celular vegetal, a fração hemicelulósica pode apresentar ligação química com a lignina, originando os chamados complexos lignina-carboidratos (Fengel e Wegener, 1983; Lawoko et al., 2005). Esses complexos são bem estudados para as espécies de angiospermas, nas quais o principal tipo de hemicelulose encontrado é a xilana. A ligação da xilana com lignina é descrita por ocorrer entre resíduos de arabinose (ramificados às xilanas) e moléculas intermediárias, que incluem o ácido ferúlico e o *p*-cumárico (menos frequente), por ligações do tipo éster (Hatfield et al., 2017). Essas e outras interações entre os componentes da parede celular representam um obstáculo referente à utilização de material lignocelulósico no cenário de uma biorrefinaria, o que requer a adição de uma ou mais etapas de pré-tratamento da biomassa (Mood et al., 2013; Ferraz et al., 2014).

Nesse sentido, nosso grupo de pesquisa vem estudando os pré-tratamentos quimio-termomecânicos (CTM) que utilizam sulfito alcalino como agente deslignificante, pois este tipo de processo gera material pré-tratado com alta digestibilidade (Laurito-Friend et al., 2015). O tratamento com sulfito alcalino resulta em um licor favorável à obtenção de lignossulfonatos e em uma fração sólida predominante em polissacarídeos contendo açúcares C5 e C6. A análise técnico-econômica desse processo (Mendes et al., 2018) apontou que o preço do sulfito é um dos principais obstáculos referentes à viabilização econômica dos cenários estudados. Por outro lado, a fermentação conjunta de açúcares C5 e C6 apresentou contribuição positiva na taxa interna de retorno (TIR). Entretanto, essa corrente combinada de C5 e C6 exige microrganismos capazes de assimilar ambos os açúcares, o que ainda não é uma realidade comum no contexto industrial. Uma possível alternativa para utilização do material pré-tratado é extrair inicialmente as xilanas contidas

na fração sólida e, então, executar a sacarificação somente da fração rica em C6. Dessa forma, a xilana extraída pode ser melhor aproveitada para obtenção de outros produtos.

A recuperação de xilanas a partir da biomassa lignocelulósica envolve o emprego de soluções orgânicas, alcalinas ou aplicação de enzimas hemicelulolíticas. O tratamento mais comum envolve utilização de álcali e permite rendimentos superiores de xilana, além da obtenção de frações de xilanas com elevada massa molar (em torno de  $10^4 - 10^6 \text{ g.mol}^{-1}$ ). Entretanto, a pureza da xilana isolada pode ser comprometida devido a altas cargas de álcali requeridas nesse processo, que resultam em solubilização simultânea de lignina (Zhang et al., 2014; Hutterer et al., 2016). Como uma possível alternativa à baixa pureza do método alcalino, a extração de xilanas via enzimática pode ser empregada, porém resulta em rendimentos inferiores e os oligossacarídeos gerados geralmente apresentam uma menor massa molar em comparação ao tratamento com álcali (Aguedo et al., 2014; Sporck et al., 2017). A endo-xilanase (E.C. 3.2.1.8) é a enzima mais comumente utilizada para tal fim.

A obtenção de xilanas que integrem características tanto de maior pureza quanto massa molar elevada pode ser possível pela realização de extração enzimática seguida de reticulação a partir dos terminais fenólicos presentes. Esse acoplamento pode ser alcançado por ação de enzimas oxidativas, como peroxidases e lacases, que são capazes de formar radicais em moléculas de ferulatos e cumaratos (Niño-Medina et al., 2010).

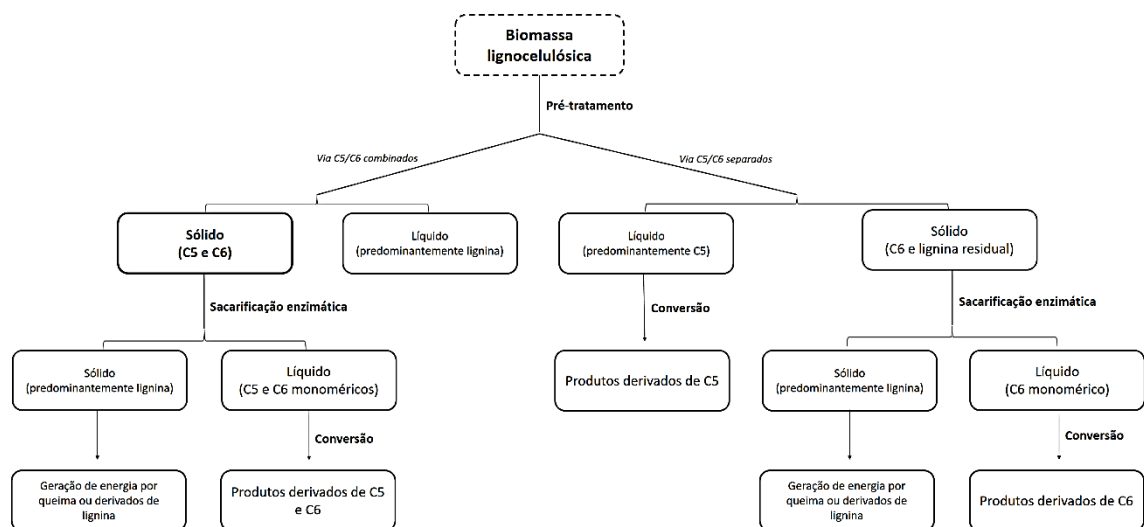
Dessa forma, o presente trabalho visa associar essas informações e aumentar a massa molar de xilana de bagaço de cana obtida por via enzimática dentro do processo de biorrefino com sulfito alcalino como forma de agregar valor às biorrefinarias.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Biorrefinarias

As biorrefinarias envolvem a conversão de biomassas em energia, combustíveis líquidos e produtos adicionais que agreguem valor à cadeia produtiva. Aliado ao processo que deve gerar diversos produtos a partir da biomassa, se espera que toda a cadeia produtiva seja sustentável (Vaz, 2017). Ao contrário das refinarias de petróleo, esse modelo possibilita a utilização de uma gama variada de matérias-primas de origem renovável, permitindo a descentralização da produção de combustíveis, o que leva à redução da dependência de combustíveis fósseis existente em muitos países (B. Kamm e M. Kamm, 2004).

As biorrefinarias podem seguir rotas termoquímicas ou bioquímicas, ou ainda a combinação das duas rotas, para a conversão das frações da biomassa (Carvalho et al., 2008; de Jong e Jungmeier, 2015). Nas rotas bioquímicas, há a possibilidade de dividir as biorrefinarias em dois grandes modelos. O primeiro separa os polissacarídeos em duas frações principais: C5 (pentoses) e C6 (hexoses). O outro modelo gera as frações C5 e C6 combinadas, conforme ilustrado na Figura 1. Em ambos modelos, a lignina é um subproduto do processo e pode ser empregada na queima para geração de energia ou na produção de derivados de lignina.



**Figura 1.** Modelos de biorrefinaria a partir de conversão bioquímica da biomassa envolvendo duas vias distintas em que as correntes C5 e C6 aparecem combinadas ou separadas após a etapa de pré-tratamento.

A biomassa lignocelulósica é vista como um material interessante para obtenção de bioproductos em biorrefinarias devido à sua vasta disponibilidade e ao seu custo

relativamente baixo (Limayem e Ricke, 2012). Nesse contexto, a utilização de bagaço de cana-de-açúcar se destaca no cenário brasileiro, já que a produção de cana-de-açúcar foi de cerca de 643 milhões de toneladas na safra 2019/20, de acordo com o último levantamento anual publicado pelo Conselho Nacional de Abastecimento do Brasil (CONAB, 2019). Em relação à essa produção, cerca de 1/3 da área de cultivo nacional concentra-se na região do cerrado do estado de São Paulo, a qual corresponde a cerca de 1% do território brasileiro (IBGE, 2017). Após processamento industrial, uma tonelada de cana de açúcar (base úmida, *in natura*) gera cerca de 130 kg de bagaço de cana (base seca) (Masarin et al., 2011). Um diferencial favorável ao bagaço de cana é que o transporte da cana de açúcar para o interior do complexo industrial já consta nos custos de produção de açúcar e etanol, diferindo dos casos onde o resíduo agrícola é gerado no campo e demanda transporte específico para o setor industrial em que será processado. Dessa forma, o uso de bagaço de cana em biorrefinarias mostra-se positivamente diferenciado, o que tem estimulado grande atividade de pesquisa para o aproveitamento desse material e de seus principais constituintes.

## 2.2 Componentes da biomassa lignocelulósica

A biomassa lignocelulósica representa a maior fonte de recurso orgânico renovável do mundo, sendo produzida a partir de resíduos agrícolas, resíduos florestais, culturas energéticas, resíduos do beneficiamento de grãos e resíduos agroindustriais e municipais (Limayem e Ricke, 2012). Sua composição consiste principalmente em açúcares na forma de polissacarídeos, como celulose (35-50 %) e hemicelulose (20-35 %), os quais podem estar física e quimicamente associados entre si e também com a lignina (15-27 %) (Mood et al., 2013).

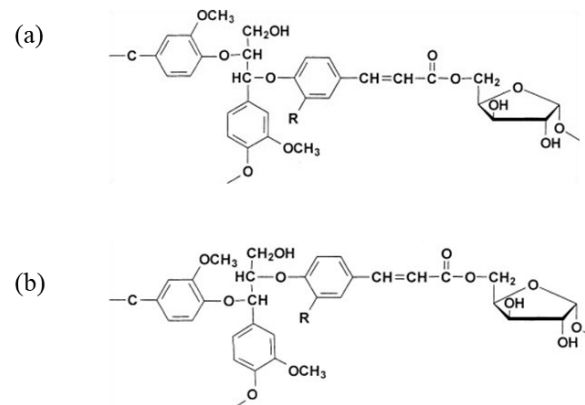
A celulose é um polímero linear cuja unidade repetitiva é a celobiose, isto é, duas moléculas de glicose unidas por ligação glicosídica do tipo  $\beta$ -1,4 (Fengel e Wegener, 1983). As cadeias de celulose podem apresentar tanto interações de *Van der Waals* quanto ligações de hidrogênio, sendo estas últimas responsáveis pela estrutura cristalina do polissacarídeo (Fengel e Wegener, 1983). Nas biorrefinarias, a celulose é a principal fonte de monômeros C6 (glicose).

Já a lignina é uma molécula aromática amorfa formada pela polimerização de radicais provenientes de unidades de álcool *p*-cumárico, coniferílico e sinapílico, sendo que estes, quando incorporados à lignina, passam a ser denominados *p*-hidroxifenilpropano (H), guaiacila (G) e siringila (S), respectivamente. Sua estrutura química varia de acordo com a

espécie vegetal, porém, de maneira geral, as ligninas de gimnospermas são do tipo G, as de angiospermas do tipo GS e de gramíneas GHS (Gellerstedt et al., 2009; Chundawat et al., 2011). Além disso, a lignina é uma macromolécula hidrofóbica e altamente resistente à degradação química e biológica. Funciona como uma matriz que envolve os polissacarídeos presentes na parede celular das plantas, além de ocorrer em elevada concentração na lamela média que une as células vegetais. Esta característica da lignina, auxilia a resistência mecânica das plantas e torna as paredes celulares menos permeáveis à água (Limayem e Ricke, 2012).

A hemicelulose (que é o objeto principal do presente projeto) apresenta uma estrutura amorfa e variável dependendo da espécie vegetal ou mesmo do tecido de uma mesma espécie. Trata-se de uma macromolécula formada por unidades básicas de hexoses e/ou pentoses, além de ácidos hidroxicinâmicos, ácidos urônicos e grupos acetila, eventualmente ligados aos açúcares (Limayem e Ricke, 2012). A quantidade e os tipos de grupos pendentes que podem ser encontrados nas hemiceluloses dependem da natureza e fonte da matéria-prima (Naidu et al., 2018). Angiospermas (que incluem madeiras duras e gramíneas) contém principalmente xilanas, enquanto gimnospermas (que incluem as madeiras moles ou coníferas) contém glucomanas, xiloglucanas e xilanas (Scheller e Ulvskov, 2010; Limayem e Ricke, 2012). Nas biorrefinarias, a hemicelulose de angiospermas é a principal fonte de monômeros C5 (xilose e arabionose).

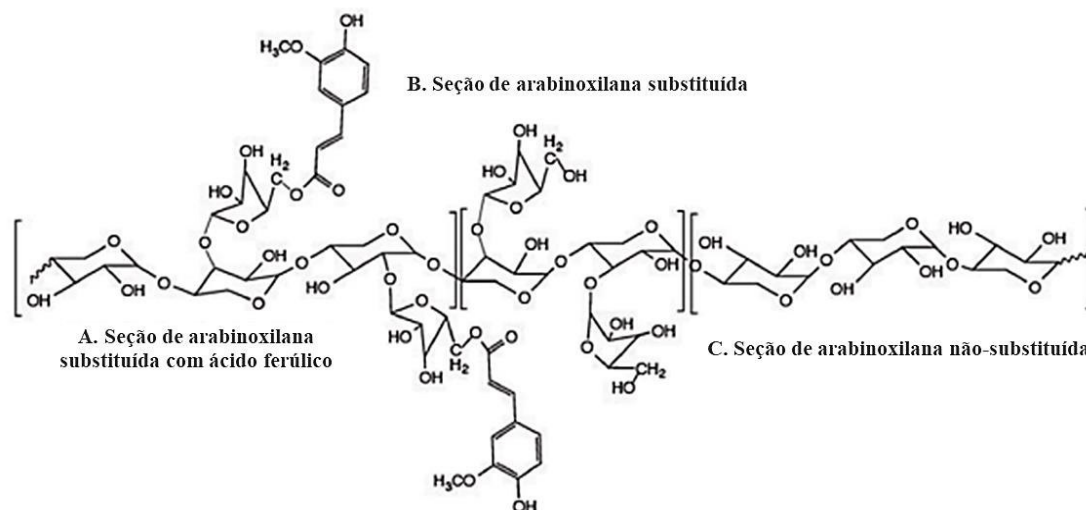
As hemiceluloses, diferentemente da celulose, podem apresentar ligação química com a lignina através de moléculas intermediárias que incluem o ácido ferúlico e, menos frequentemente, o ácido *p*-cumárico, formando complexos lignina-carboidratos (Fengel e Wegener, 1983; Lawoko et al., 2005). Uma ligação típica entre uma hemicelulose e a lignina é ilustrada na Figura 2. O oxigênio do carbono 5 de uma molécula de arabinose ligada à cadeia principal de xilana forma um éster com o ácido ferúlico que tem seu oxigênio ligado ao carbono 4 aromático formando um éter com uma molécula de lignina (Hatfield e Marita, 2010; Bian et al., 2012). A ocorrência destas ligações tem sido identificada com predominância nas regiões de canto celular e sugere que o ácido ferúlico esterificado à hemicelulose funciona como nucleador de deposição de lignina durante o processo de lignificação (Buanaфина, 2009; Ralph, 2010; Hatfield et al., 2017). O ácido *p*-cumárico pode cumprir papel semelhante, mas a baixa estabilidade de seu radical fenoxila tem sido associada com a baixa frequência de pontes hemicelulose-ácido cumárico-lignina (Ralph, 2010).



**Figura 2.** Representação das ligações (a)  $\alpha$  éter e (b)  $\beta$  éter entre lignina e hemicelulose (Lam et al., 2001).

### 2.2.1 Características estruturais de xilanas em angiospermas

A xilana é o principal componente do complexo hemicelulósico em angiospermas, sendo sua cadeia principal constituída por resíduos de anidro-xilose unidos por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4. A diversidade estrutural das xilanas de angiospermas é resultado da organização das cadeias laterais do polímero que pode dar origem a arabinoxilanas (substituídas com arabinose), glucuronoxilanas (substituídas com ácidos urônicos) e glucuronoarabinoxilanas (substituídas com arabinose e ácidos urônicos) (Collins et al., 2005; Scheller e Ulvskov, 2010; Hatfield et al., 2017; Naidu et al., 2018). Em todos os casos, as unidades de anidro-xilose podem apresentar ésteres de grupos acetila ligados às posições 2 e 3. Esses tipos de xilanas apresentam ainda a substituição eventual com ácidos ferúlico e, menos frequentemente, *p*-cumárico conectados à arabinose por meio de ligações éster no oxigênio do carbono 5 (Buanafina, 2009; Hatfield et al., 2017) (Figura 3). Conforme comentado anteriormente, estes ácidos podem fazer ligações covalentes com a lignina ou estar com os grupos fenólicos livres. O grau de substituição com cada um dos grupos pendentes difere entre as espécies vegetais e mesmo entre os diferentes tecidos de uma mesma espécie vegetal (Scheller e Ulvskov, 2010; Costa et al., 2016).



**Figura 3.** Estrutura de uma arabinoxilana incluindo regiões não substituídas e regiões com substituição de arabinose e ácido ferúlico. Adaptado de Hatfield et al. (2017).

### 2.3 Pré-tratamento de biomassa lignocelulósica e o processo sulfito alcalino

A transformação de biomassa lignocelulósica dentro de uma biorrefinaria requer a realização de pelo menos uma etapa de pré-tratamento (Figura 1). Esta etapa é necessária, pois a lignocelulose está contida em uma organização celular complexa e existe forte interação entre os polissacarídeos e a lignina na parede celular vegetal (Mood et al., 2013; Ferraz et al., 2014; Seidl e Goulart, 2016). Esta etapa de pré-tratamento é responsável por custo expressivo associado à utilização de biomassa lignocelulósica no contexto das biorrefinarias e influencia a eficiência de toda a linha posterior de processamento da biomassa (Seidl e Goulart, 2016).

Dentre os pré-tratamentos mais utilizados, os químicos e físico-químicos são descritos como os mais efetivos para a conversão posterior do material pré-tratado (Seidl e Goulart, 2016). Diversos compostos químicos podem ser empregados na etapa de pré-tratamento. Se o processo é executado em meio ácido (adicionado de fonte externa ou oriundo da hidrólise de grupos acetila da própria biomassa - denominado autohidrólise) ocorre solubilização predominante da hemicelulose, com eventual remoção ou redistribuição da lignina (Donohoe et al., 2008; Seidl e Goulart, 2016). No caso do pré-tratamento em meio alcalino, há preservação da maior parte da celulose, com remoção expressiva de lignina e remoção parcial da hemicelulose (Kim et al., 2016). Os processos em meio ácido são responsáveis pela geração de correntes C5 e C6 separadas, enquanto os processos em meio alcalino são responsáveis pela geração de correntes C5 e C6 inicialmente unificadas, conforme ilustrado anteriormente na Figura 1. São exemplos de pré-tratamento em meio

ácido os processos com ácido sulfúrico diluído, autohidrólise, explosão a vapor e sulfito ácido (Mood et al., 2013; Kumari e Singh, 2018). Pré-tratamentos em meio alcalino incluem os processos que empregam hidróxido de sódio, sulfeto de sódio (licor verde), amônia e sulfito alcalino (Kim et al., 2016; Kumari e Singh, 2018).

Os pré-tratamentos químicos podem contar com a associação de um processo mecânico com o intuito de aumentar a área superficial dos sólidos pré-tratados para favorecer o processo de sacarificação enzimática posterior (Limayem e Ricke, 2012; Mood et al., 2013).

Os pré-tratamentos químio-termomecânicos (CTM) que empregam sulfito alcalino tem sido foco de nosso grupo de pesquisa, pois geram material pré-tratado de alta digestibilidade (Laurito-Friend et al., 2015). Este processo também se beneficia de longo desenvolvimento tecnológico progresso referente aos processos de polpação CTM (Zhu et al., 2009). Os principais efeitos promovidos durante este tratamento são a total ou parcial separação da lignina (bem como sua despolimerização) dos polissacarídeos, além do aumento da área superficial dos sólidos pré-tratados (Zhu et al., 2009; Seidl e Goulart, 2016). Utilizando-se essa metodologia é possível gerar material pré-tratado de alta digestibilidade que retém celulose e parte expressiva da hemicelulose, além de um licor que contém moléculas de lignossulfonatos.

Mendes et al. (2018) realizaram a análise técnico-econômica do pré-tratamento sulfito alcalino, avaliando quatro diferentes híbridos de cana-de-açúcar, a severidade do pré-tratamento, tempo de hidrólise enzimática e destinação da fração de pentoses nos custos e rentabilidade do processo. Em todos os cenários avaliados, não foi possível obter valores de taxa interna de retorno (TIR) superiores a 12% ao ano (taxa mínima de atratividade), indicando que o investimento em qualquer um dos cenários foi considerado desfavorável economicamente. Foi constatado que o pré-tratamento da biomassa, mais especificamente o preço do sulfito, representa um dos principais entraves na viabilização do processo. Preços de sulfito de sódio praticados no mercado nacional se mostram proibitivos para o processo, apesar de a análise de sensibilidade paramétrica desta variável indicar que se o preço do sulfito de sódio praticado for da ordem daquele correntemente disponível no mercado norte-americano, o processo passa a atingir valores de TIR da ordem de 12%. Os autores apontam diversas formas de contornar a situação do custo elevado do sulfito de sódio, incluindo a produção *in situ* de sulfito ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ) a partir de  $\text{SO}_2$  e  $\text{NaOH}$  e a recuperação da lignina sulfonada como possíveis alternativas. Quanto à fração de hemicelulose, pode-se verificar nesse estudo que sua incorporação na etapa de fermentação juntamente à fração C6



contribuiu positivamente na taxa interna de retorno. No entanto, essa corrente combinada de C5 e C6 exige microrganismos mais especializados para fermentar os dois açúcares, limitando o uso de leveduras industrialmente robustas como é o caso atual da indústria de etanol de primeira geração. Uma alternativa é extrair inicialmente as xilanas dos sólidos pré-tratados e, então, executar a sacarificação somente da fração rica em C6, o que pode permitir o uso de leveduras industriais convencionais na fermentação de glicose e o aproveitamento da fração hemicelulósica para obtenção de outros bioprodutos dentro desse cenário.

#### **2.4 Recuperação de xilanas no contexto das biorrefinarias**

O isolamento de xilanas a partir da biomassa lignocelulósica pode ser realizado por meio da utilização de soluções contendo álcali ou solventes orgânicos como o dimetilsulfóxido (DMSO) e metanol, empregando-se água quente ou, ainda, enzimas relacionadas ao complexo hemicelulolítico (Bian et al., 2012; Sporck et al., 2017; Naidu et al., 2018). A escolha do método de extração varia de acordo com as características da xilana de interesse (Zhang et al., 2014).

Grande parte dos trabalhos publicados na literatura envolve a utilização de soluções alcalinas (Lapierre et al., 2001; Bian et al. 2012; Ayala-Soto et al., 2014; Paz-Samaniego et al., 2015; Sporck et al., 2017), variando-se o grau de severidade e tempo de reação e/ou associando a extração alcalina a uma etapa prévia de deslignificação do material de partida, por exemplo. No tratamento com álcali, os íons hidroxila são responsáveis pela ruptura das ligações de hidrogênio entre celulose e hemicelulose, além de ligações do tipo éster formadas entre xilanas e os ácidos hidroxicinâmicos. Esse processo é um dos mais eficientes na obtenção de rendimentos superiores de xilana e de frações de elevada massa molar ( $10^4 - 10^6 \text{ g.mol}^{-1}$ ) (Zhang et al., 2014). No entanto, altas cargas de álcali (em torno de 0,5 a 1 M) podem ser requeridas dependendo do material em estudo, resultando em solubilização da lignina, o que diminui a pureza da xilana isolada (Hutterer et al., 2016). Por outro lado, a extração de xilanas também pode ser realizada por via enzimática, resultando em menores rendimentos e em oligossacarídeos de massa molar inferior ( $10^2 - 10^4 \text{ g.mol}^{-1}$ ), porém o material extraído apresenta menor grau de contaminação por lignina (Aguedo et al., 2014). A endo-xilanase (E.C. 3.2.1.8) é a enzima mais comumente utilizada para tal fim. Essas enzimas são glicosil hidrolases responsáveis pela hidrólise das ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 da cadeia principal da xilana, gerando oligossacarídeos solúveis de xilose (Collins et al., 2005; Paës et al., 2012).

Sporck et al. (2017) realizaram extração de xilana a partir de biomassa pré-tratada com sulfito alcalino por três estratégias distintas, sendo duas destas empregando-se soluções alcalinas e a terceira por meio da utilização da enzima xilanase. Os autores constataram que as xilanas extraídas enzimaticamente apresentaram uma baixa massa molar (frações com massa molar estimada como menor que 6 kDa) e maior pureza em comparação aos métodos alcalinos, em conformidade com dados da literatura. Adicionalmente, o espectro obtido pela análise de RMN-2D da xilana extraída por via enzimática apresentou sinais de ácido *p*-cumárico, que possivelmente encontra-se ligado à estrutura da xilana. Esses resultados não foram observados para os tratamentos que empregaram soluções alcalinas na extração da xilana. A ocorrência de ácidos hidroxicinâmicos ligados à xilana obtida por via enzimática abre uma possibilidade para que os terminais fenólicos destes ácidos hidroxicinâmicos sejam utilizados como iniciadores de reações de acoplamento oxidativo, gerando xilanas de maior massa molar, mesmo por uma via de extração enzimática. A reticulação desses materiais (e consequente obtenção de produtos de maior massa molar) permite a expansão das possibilidades de aplicação industrial das arabinoxilanas.

## 2.5 Aplicações biotecnológicas de xilanas

As xilanas, bem como outros tipos de hemiceluloses, podem ser empregadas em uma gama de aplicações industriais. Diversos estudos descrevem a utilização desse polissacarídeo para produção de insumos químicos (bioetanol, ácido láctico, furfural e xilitol), prebióticos, embalagens, hidrogeis, entre outros bioprodutos (Deutschmann e Dekker, 2012; Chandel et al., 2018; Naidu et al., 2018).

Na indústria de etanol de segunda geração, a xilana convertida em monômeros C5 pode ser fermentada à etanol empregando leveduras fermentadoras de pentoses (Carvalho et al., 2008; Gírio et al., 2010). Entretanto, a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, empregada atualmente na indústria de etanol, não apresenta capacidade de assimilar pentoses naturalmente. Nesse contexto, a fim de contornar tal fato, muitas pesquisas vem sendo desenvolvidas principalmente empregando-se a tecnologia do DNA recombinante, a qual poderá futuramente viabilizar a utilização de hemiceluloses para produção de bioetanol (Gírio et al., 2010; Chandel et al., 2018).

O ácido láctico é amplamente sintetizado industrialmente por via química, porém o procedimento leva à geração de dois isômeros, sendo requerida uma etapa de separação que acarreta em aumento dos custos do processo. A produção desse ácido a partir da fração de hemicelulose da biomassa representa uma vantagem nesse quesito, já que apenas um isômero

é obtido ao final do processo (Christopher, 2012; Naidu et al., 2018). Já o composto furfural pode ser obtido a partir da hidrólise ácida da xilana e subsequente desidratação do monômero formado. A produção desse bioproduto, realizada somente a partir de biomassa lignocelulósica, é estimada em cerca de 200.000 toneladas por ano e é voltada principalmente para utilização como aditivo em tintas, adesivos e aromatizantes (Christopher, 2012; Naidu et al., 2018).

O xilitol é um poliol amplamente utilizado na indústria alimentícia como substituto do açúcar convencional (sacarose) e na indústria da saúde, no setor odontológico, por apresentar potencial anticáries, exibindo também função prebiótica. Este composto é produzido por rota química através da hidrogenação catalítica da xilose, principalmente isolada a partir de madeira (Prakasham et al., 2009) e sua produção representa um mercado de 1 bilhão de dólares até 2022 (<https://globenewswire.com>). O xilitol também pode ser obtido por via biotecnológica a partir da fermentação de monômeros C5 e o emprego de leveduras, principalmente as do gênero *Candida* (Naidu et al., 2018).

Inúmeras pesquisas também apontam a utilização de xilanas para obtenção de xilooligossacarídeos (XOS). Os XOS exibem uma grande variedade de atividades, como a estimulação do crescimento de bactérias benéficas (bifidobactérias e lactobacilos) no organismo, melhoria na absorção de cálcio, redução do risco de alguns tipos de câncer, além de possuírem propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, entre outras (Deutschmann e Dekker, 2012; Bian et al., 2013; Valls et al., 2018). Os xilooligossacarídeos podem ser produzidos a partir de biomassa lignocelulósica por meio de tratamento químico (autohidrólise ou hidrólise ácido-diluída), enzimático ou a combinação destes (Bian et al., 2013).

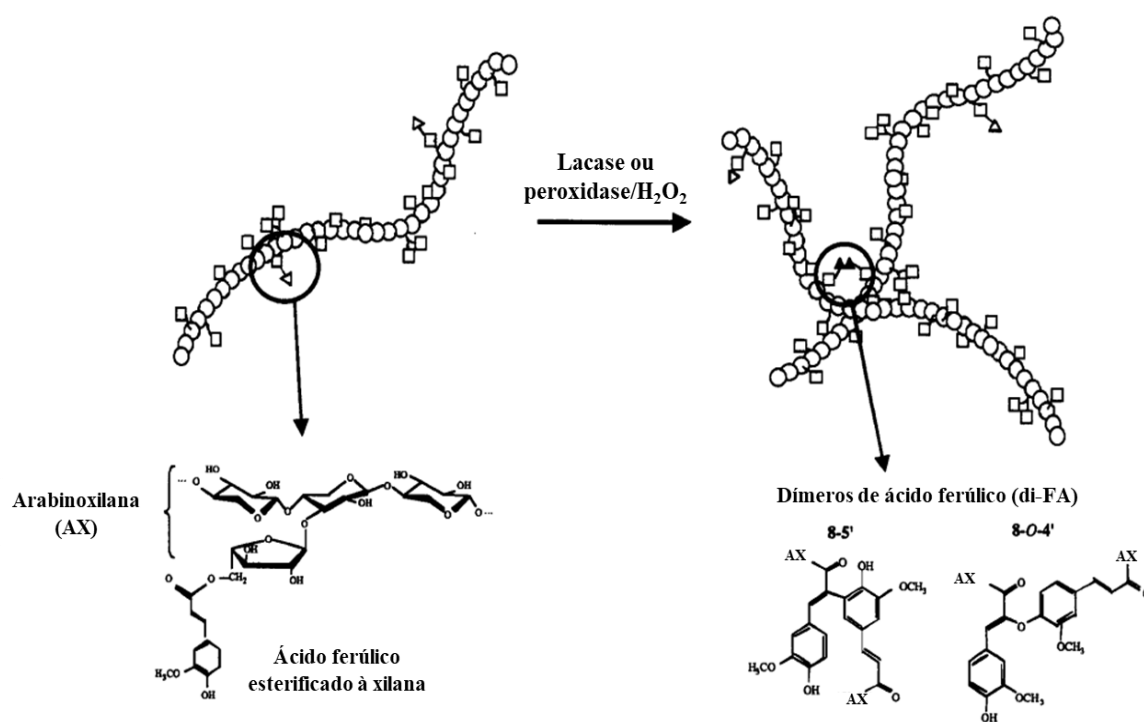
Em relação ao setor de materiais, a xilana pode ser empregada em embalagens por possuir característica hidrofílica, baixa permeabilidade ao O<sub>2</sub> e alta transmitância de luz. Por outro lado, este biopolímero apresenta baixa habilidade de formação de filmes e é necessário combiná-lo com outro material, como poliacetato de vinila, celulose nanofibrilada e quitosana (Naidu et al., 2018).

Uma outra aplicação promissora da xilana relaciona-se à formulação de hidrogéis, principalmente para fins farmacêuticos. Este destaque se deve a algumas características desse tipo de hemicelulose, como biocompatibilidade, atoxicidade, biodegradabilidade e alta hidrofiliabilidade. O hidrogel produzido a partir de xilana é indicado para encapsulamento de medicamentos, já que apresenta resistência à digestão no estômago humano (Oliveira et al., 2010; Deutschmann e Dekker, 2012). Além disso, apresenta aplicações como suporte de

imobilização de enzimas e como matriz para engenheiramento de tecidos na área de medicina regenerativa (Naidu et al., 2018). Adicionalmente, hidrogeis formados a partir da reticulação de xilanas isoladas de materiais lignocelulósicos, por apresentarem ligação com ácidos hidroxicinâmicos (advindas das ligações químicas entre hemicelulose e lignina) podem apresentar capacidade antioxidante (Niño-Medina et al., 2010). Tal característica é interessante para aplicação desse material como agente cicatrizante, por exemplo. Em 2008, a Medestea Research & Production SpA, uma companhia farmacêutica italiana, registrou um biofilme produzido a partir de hemicelulose de cana-de-açúcar. O produto é denominado Veloderm® e a empresa o descreve como um curativo capaz de permitir permeabilidade seletiva de gases e vapores e impedir a da água. Adicionalmente, Veloderm® possui a capacidade de reduzir a dor e promover uma condição favorável para o crescimento de células de fibroblastos em locais de feridas (Farhat et al., 2017).

## **2.6 Reticulação de xilanas via oxidação dos ácidos hidroxicinâmicos**

A interação entre lignina e hemicelulose é descrita por ocorrer através da ligação química entre ácidos hidroxicinâmicos e resíduos de arabinose, encontrados principalmente como grupos pendentes de arabinoxilanas e glucuronoarabinoxilanas. Nesse contexto, sabe-se que mesmo após tratamento alcalino de gramíneas, alguns dos ácidos hidroxicinâmicos podem permanecer incorporados ao material pré-tratado (Reinoso et al., 2018). Uma maneira de promover o aumento da massa molar de xilanas extraídas de biomassa é a realização de reticulação das frações através do emprego de enzimas oxidativas. Peroxidases e lacases são conhecidas por catalisarem tal acoplamento, a partir da formação de radicais em moléculas de ferulatos e cumaratos, já que são enzimas envolvidas no processo de lignificação (Oinonen et al., 2015). A Figura 4 representa o fenômeno de reticulação entre fragmentos de hemiceluloses a partir de moléculas de ácidos hidroxicinâmicos associados à sua estrutura, após ação de uma enzima oxidativa (lacase ou peroxidase/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).



**Figura 4.** Ilustração de reticulação entre hemiceluloses através da ação de enzima oxidativa sobre os ácidos hidroxicinâmicos, destacando-se os principais dímeros de ácido ferúlicos resultantes. A representação dos símbolos é a seguinte: xilose (○), arabinose (□), ácido ferúlico (Δ) e Di-FA (▲▲). Adaptado de Carvajal-Millan et al. (2005b).

Quanto ao mecanismo de ação, Figueroa-Espinoza e Rouau (1998) descreveram que inicialmente há a remoção de um próton e um elétron do OH fenólico do ácido ferúlico (carbono 4) pela ação de uma enzima oxidativa, como a lacase ou peroxidase, ou de outros agentes oxidantes como, por exemplo, persulfato de amônio e cloreto férrico. A perda do próton e do elétron leva à formação de um radical fenoxila bastante reativo, que pode ser transferido para os carbonos 5 ou 8 (também denominado  $\beta$ ) da molécula. Com isso, duas moléculas com radicais no mesmo carbono ou em carbonos distintos podem dimerizar e, caso exista outro radical, há a possibilidade de um segundo acoplamento, ocasionando a formação de trímeros ou oligômeros.

Ralph et al. (1994) descreveram as ligações químicas resultantes da reticulação de terminais fenólicos do ácido ferúlico, a partir da quantificação dos dímeros e trímeros formados (denominados di-FA e tri-FA, respectivamente) em associação a análises reológicas e de viscosidade. Foram identificados sete dímeros de ácido ferúlico representados pelas ligações  $\beta$ -5,  $\beta$ - $\beta$ ,  $\beta$ -O-4, 4-O-5 e 5-5, seguindo a numeração dos carbonos de acordo com a nomenclatura para a molécula de lignina. Dentre esses, os mais

predominantes são  $\beta$ -5 e  $\beta$ -O-4 (Figura 4). A ligação covalente estabelecida nos dímeros de ácido ferúlico se apresenta com um dos primeiros fatores responsáveis pela ocorrência da gelificação do material e também por suas propriedades finais, mas ligações de hidrogênio e interações de *Van der Waals* entre as cadeias de polissacarídeos também favorecem esse processo (Carvajal-Millan et al., 2005a, b). Além disso, dados experimentais gerados a partir da reticulação de arabinoxilanas isoladas de fibras de milho provenientes de diferentes tratamentos, apontam que há correlação entre a quantidade de ácido ferúlico e a capacidade de formação de gel, sendo estas variáveis diretamente proporcionais (Ayala-Soto et al., 2014).

Trabalhos desenvolvidos com algumas espécies de madeira reportam a reticulação de moléculas de xilanas e outros tipos de hemiceluloses que apresentam baixa massa molar. Oinonen et al. (2013) realizaram o acoplamento de galactoglucomananas a partir de porções de moléculas aromáticas (advindas da lignina) ligadas às hemiceluloses empregando uma lacase isolada do fungo *Trametes villosa*. Os pesquisadores obtiveram frações reticuladas, as quais foram utilizadas para a confecção de um biofilme que apresentou boas propriedades mecânicas. Em trabalho posterior, Oinonen et al. (2015) alcançaram um aumento de 2,4 vezes na massa molar de galactoglucomananas, após reação na presença de lacases. Estudos mais recentes desenvolvidos por Thuvander et al. (2016) também empregaram lacase com o intuito de promover acoplamento oxidativo das frações de hemiceluloses, porém o aumento de massa molar não foi observado para as hemiceluloses, apenas para as moléculas de lignina que ocorriam associadas fisicamente à amostra de xilana. Os autores explicaram que esse fato pode ser devido à menor extensão de ligação entre as hemiceluloses e lignina após o pré-tratamento utilizado, pois também foi observada menor concentração de lignina em comparação a estudos anteriores.

Carvajal-Millan et al. (2005a) realizaram o acoplamento oxidativo de xilanas de farelo de milho, avaliando a estabilidade do material por até 6 dias a 25 °C. Os geis obtidos apresentaram boa estabilidade ao longo do tempo, desde que fosse realizada a inativação térmica das lacases após a reação de reticulação. As lacases, quando ainda ativas, produziam novos radicais que poderiam estar envolvidos em reações secundárias, resultando em degradação da molécula de hemicelulose reticulada.

Carvajal-Millan et al. (2005b), empregando uma lacase de *Pycnoporus cinnabarinus*, alcançaram o acoplamento de arabinoxilanas oriundas de endosperma do grão de trigo cuja proporção de ácido ferúlico foi estimada em 2,3  $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$  de hemicelulose. De acordo com os autores, em moléculas de xilanas substituídas com menos de 0,5 resíduos de ácido ferúlico

por 1000 resíduos de xilose, não foi possível observar o fenômeno de gelificação do material após o tratamento enzimático.

Já Martínez-López et al. (2018) compararam o *cross-linking* de xilanas de farelo de milho na presença de lacase e HRP/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (peroxidase de rabanetes) separadamente. Os autores observaram que os produtos obtidos apresentaram diferenças nas características reológicas e estruturais. Em análise por microscopia de força atômica, foi constatado que o gel formado pela reação com lacase apresentou uma microestrutura mais esponjosa, enquanto o gel formado pela ação de peroxidase apresentou um aspecto menos coeso. Essas diferenças podem ser explicadas pelos diferentes mecanismos de ação dessas enzimas, em que a reação com lacase aparentemente ocorre de uma forma mais lenta, o que pode favorecer interações mais efetivas. Além disso, foi observado que o excesso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na reação com HRP pode promover a oxidação dos dímeros já formados, desfavorecendo a formação de estruturas reticuladas. Dessa forma, os autores concluíram que o tratamento com lacases se mostrou mais efetivo para obtenção de geis de arabinoxilana com aplicações biotecnológicas.

## **2.7 Ação das enzimas oxidativas peroxidases de rabanete (HRP) e lacases**

A enzima peroxidase de rabanetes (HRP) (E.C. 1.11.1.7) é responsável pela catálise de reações oxidativas, por meio da transferência de elétrons para o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, promovendo oxidação de substratos orgânicos e inorgânicos. O isolamento de peroxidases a partir de rabanete (*A Armoracia rusticana*) vem de um interesse na alta produção da enzima para fins imunológicos (Veitch, 2004). Em relação à sua estrutura, esta enzima apresenta uma cadeia polipeptídica contendo quatro pontes dissulfeto, além de possuir composição de cerca de 18% de carboidratos, caracterizando-se como uma glicoproteína. Além disso, sua massa molar aproximada é de 44 kDa (Welinder, 1979).

Hatfield e Marita (2010) descreveram que peroxidases, quando incorporadas na parede celular, são capazes de oxidar ácido ferúlico ao radical feruloil e este pode, então, formar uma ligação covalente com outro radical, resultando em dímeros. Dessa forma, sua importância biológica está relacionada à participação no processo de lignificação e também no mecanismo de defesa em tecidos vegetais danificados ou infectados (Hamid e Rehman, 2009). As principais aplicações biotecnológicas da HRP são na remoção de contaminantes fenólicos e/ou recalcitrantes, como moléculas aromáticas nos efluentes de indústrias têxteis, síntese orgânica e de polímeros, biossensores e kits de diagnóstico imunológico (Veitch, 2004).

As enzimas lacases (E.C. 1.10.3.2), também pertencentes ao grupo das oxidoredutases, catalisam a oxidação de uma gama de compostos fenólicos e se diferenciam das enzimas peroxidases por utilizarem o oxigênio molecular como acceptor final de elétrons, em detrimento do peróxido de hidrogênio, o que torna essas enzimas mais adequadas às aplicações industriais (Viswanath et al., 2014). Quanto ao seu isolamento, lacases podem ser encontradas em plantas, insetos, bactérias e fungos, principalmente os classificados como fungos de podridão branca. As lacases fúngicas apresentam massa molar em torno de 85 kDa e, estruturalmente, apresentam uma única cadeia polipeptídica, contendo quatro átomos de cobre em seu sítio ativo. O cobre do tipo I é responsável pela intensidade da cor azul dessas enzimas a 600 nm. O tipo II e III estão próximos e formam um centro trinuclear, onde ocorre a redução do oxigênio molecular (Kunamneni et al., 2008).

As lacases têm recebido destaque por atuarem na degradação de uma variedade de poluentes recalcitrantes, que são estruturalmente similares à lignina, como DDT, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, clorofenóis e outros xenobióticos. Além da biorremediação de solos e água, as aplicações biotecnológicas dessas enzimas incluem o desenvolvimento de processos ambientalmente amigáveis na indústria de papel e celulose, utilização na indústria de alimentos e bebidas, nanotecnologia, entre outros (Kunamneni et al., 2008).



### **3 CONSIDERAÇÕES FINAIS SOBRE A REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

Agregar valor às biorrefinarias pode ser decorrente de se obter xilanas dentro do processo. As xilanas isoladas por via enzimática são relativamente livres de lignina, mas apresentam baixa massa molar. Na literatura, existem inúmeros trabalhos que investigaram a reticulação de frações pequenas empregando enzimas oxidativas que atuam sobre os ácidos hidroxicinâmicos ligados covalentemente à xilana. Em sua maioria, as pesquisas foram conduzidas empregando-se xilanas oriundas de diferentes fontes vegetais como trigo, milho, além de certas espécies de madeira, não sendo reportada tal abordagem para arabinoxilanas isoladas de bagaço de cana-de-açúcar.

Portanto, o presente trabalho visou associar estas informações e aumentar a massa molar de xilana de bagaço de cana obtida por via enzimática dentro do processo de biorrefino com sulfito alcalino, no qual já é possível obter bioprodutos como lignossulfonatos, açúcares monoméricos e etanol.

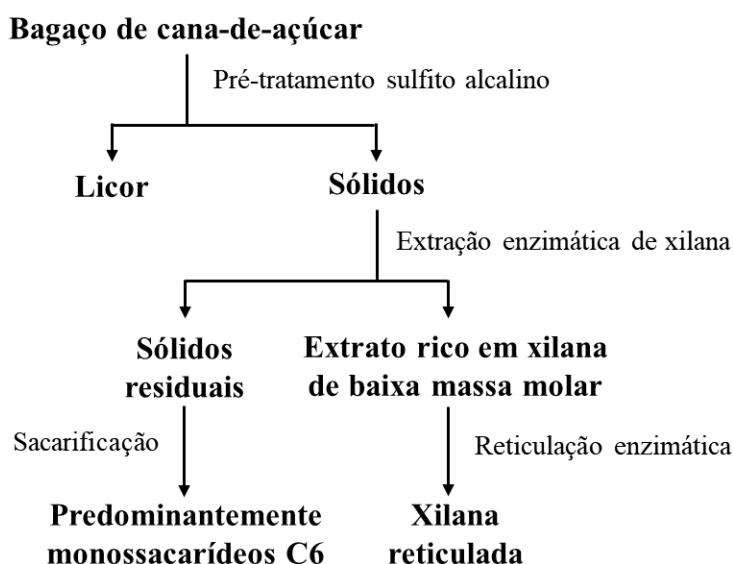
#### 4 OBJETIVOS

O objetivo geral desse trabalho foi avaliar a reticulação de xilanas de bagaço de cana-de-açúcar a partir dos substituintes fenólicos empregando enzimas oxidativas como catalisador. Para atingir esse objetivo foram executadas as etapas descritas a seguir:

- Obtenção de xilana por extração enzimática, partindo de bagaço pré-tratado com sulfito alcalino;
- Avaliação das condições reacionais para o acoplamento oxidativo das xilanas empregando HRP/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e lacase comerciais;
- Caracterização química e estrutural das xilanas extraídas e das xilanas reticuladas.

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

O fluxograma indicado a seguir resume as etapas experimentais realizadas durante o presente trabalho.



**Figura 5.** Fluxograma das atividades desenvolvidas.

### 5.1 Materiais

O bagaço de cana-de-açúcar utilizado nesse trabalho foi obtido na Usina Zilor na cidade de Quatá, SP. A xilanase comercial (Luminase PB 200, VERENIUM) foi utilizada para extração das xilanas. Para a reação de reticulação das xilanas foram empregadas as enzimas peroxidase de rabanetes – HRP (Peroxidases P8000 e P8375, SIGMA) e uma lacase recombinante de *Myceliophthora thermophila* expressa em *Aspergillus oryzae* (Olempska-Beer, 2004; relatório interno, NOVOZYMES, SA). Como controle das reações de acoplamento foi utilizada uma arabinoxilana comercial isolada a partir de endosperma de trigo ( $M_w$ : 65000 g.mol<sup>-1</sup>; BIOSUPPLIES AUSTRALIA), que contém alguns resíduos de ácido ferúlico esterificados à sua estrutura.

### 5.2 Pré-tratamento da biomassa lignocelulósica

O pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar foi conduzido de acordo com metodologia descrita por Mendes et al. (2011), com algumas adaptações. As adaptações em questão fazem parte do trabalho de doutorado do aluno Otto Heinz (PPG em Biotecnologia Industrial - EEL/USP) e visam aproximar as condições de processo às condições industriais

de polpação CTM. Uma carga de 7,5% de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  e 3,75% de NaOH (expressos com base na massa de bagaço seco) foi adicionada a 1200 g de bagaço de cana e 1200 mL de água, em um reator de aço inoxidável. A digestão da biomassa foi feita a 127 °C por 2 h. Os sólidos pré-tratados foram suspensos em água pré-aquecida a 95°C até ser atingido 3% de consistência e refinados em um refinador de discos REGMED MD-300 (REGMED, Brasil) com um espaço entre os discos de 0,1 mm. Os sólidos resultantes foram recuperados por centrifugação. O material pré-tratado foi seco ao ar e caracterizado quimicamente conforme metodologia desenvolvida por Ferraz et al. (2000), descrita no item 5.9.1.

### 5.3 Determinação de atividade de xilanase

A determinação da atividade de xilanase foi conduzida com o substrato xilana *birchwood*, segundo metodologia descrita por Bailey et al. (1992), sendo avaliada a formação de açúcar redutor utilizando o reagente ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) pelo método de Miller (1959). O volume total de reação do ensaio foi de 2,5 mL, contendo 0,9 mL de xilana 1% (m/v) preparada em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,8 e 0,1 mL da enzima na diluição 1:50000. As condições da reação foram 50 °C por 5 min com posterior adição de 1,5 mL de reagente DNS. Os tubos, então, foram fervidos por 5 min e, após resfriamento, a liberação de açúcar redutor foi determinada a 540 nm. D-xilose (SIGMA) foi usada como padrão de açúcar redutor. Uma unidade internacional de xilanase (UI) foi definida como 1  $\mu\text{mol}$  de xilose liberada por minuto nas condições do ensaio.

### 5.4 Extração enzimática de xilanas

O bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com sulfito alcalino foi utilizado para extração de xilanas por via enzimática, segundo metodologia descrita por Sporck et al. (2017). Para isso, o material foi suspenso em água com 5% de consistência e o pH ajustado para 8, sendo utilizada uma massa seca de bagaço pré-tratado de 90 g e volume final de reação de 1,8 L. A suspensão obtida foi mantida estacionária por 24 h para ocorrer a absorção completa de água pelas fibras. Após este período, foi adicionada uma carga enzimática equivalente à 8  $\text{UI}\cdot\text{g}^{-1}$  de biomassa, seguido de incubação por 24 h a 50 °C e agitação de 120 rpm. Após esse período, o material foi submetido à fervura por 5 min, a fim de promover a inativação das enzimas. O material, então, foi filtrado à vácuo em filtro de vidro poroso n° 2, e a fração sólida foi seca ao ar. Já a fração líquida teve seu pH ajustado para 7 e foi congelada para posterior liofilização.

## 5.5 Sacarificação enzimática

Os sólidos resultantes após extração de xilana foram submetidos à hidrólise enzimática em pequena escala (volume final de reação de 1 mL). Os tubos contendo material com 2% de consistência foram pré-incubados em tampão acetato de sódio pH 4,8 por 24 h e, após esse tempo, foi adicionado um volume de coquetel enzimático Cellic CTec2 correspondente a 10 FPU.g<sup>-1</sup> de substrato, seguido de nova incubação a 45 °C e 120 rpm. Aliquotas de 20 µL foram retiradas nos tempos 4, 8, 24, 48 e 72 h, e adicionadas a tubos *Eppendorfs* contendo 20 µL de TCA 10%, a fim de promover precipitação das proteínas. O volume de cada *Eppendorf* foi completado para 400 µL com água destilada. As amostras foram congeladas para posterior análise.

Anteriormente à análise, as amostras foram centrifugadas a 12000 rpm por 2 min e então, aplicadas em HPLC contendo uma coluna BIORAD AMINEX HPX – 87H, com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mM como fase móvel e fluxo de 0,6 mL.min<sup>-1</sup>. Um detector de índice de refração foi utilizado a uma temperatura controlada de 35 °C (WATERS, modelo 2414). A concentração de carboidratos foi determinada através da calibração com padrões, de grau analítico, secos sob pentóxido de fósforo e vácuo.

O bagaço pré-tratado com sulfito alcalino (utilizado como material de partida para extração de xilanas) também foi submetido à mesma metodologia de sacarificação enzimática para efeito de comparação dos resultados obtidos.

## 5.6 Determinação da atividade de HRP e lacase

A determinação de atividade de peroxidase foi realizada utilizando-se o substrato siringaldazina, segundo metodologia descrita por Guerra (1998). A oxidação da siringaldazina foi acompanhada durante 10 min a 525 nm ( $\epsilon = 65000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). O volume total de reação foi de 1 mL, contendo 0,1 mL de enzima diluída em tampão fosfato de potássio 100 mM pH 6,5, 0,7 mL do mesmo tampão, 0,1 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200 mM e 0,1 mL de siringaldazina (1 mM em etanol absoluto). Uma unidade internacional de peroxidase (UI) foi definida como 1 µmol de quinona formada por minuto nas condições do ensaio.

A atividade de lacase foi determinada pela oxidação de ABTS – ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzenotiazolina-6-sulfônico) (Bourbonnais e Paice, 1990). O volume total de reação foi de 1 mL contendo 0,3 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM pH 6,5, 0,1 mL de água, 0,5 mL de extrato enzimático diluído e 0,1 mL de ABTS 0,5 mM. A reação foi

monitorada a 420 nm ( $\epsilon = 36000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Uma unidade internacional de lacase (UI) foi definida como 1  $\mu\text{mol}$  de ABTS oxidado por minuto.

### **5.7 Análise das proteínas presentes nos extratos comerciais das enzimas peroxidases de rabanetes e lacase**

O teor de proteínas dos extratos comerciais de HRP P8000 e P8375 e de lacase foi determinado pelo método de Lowry (Ghose, 1987). Posteriormente, foi conduzida a análise de eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%) contendo SDS, conforme descrito por Laemmli (1970). Os mini-géis foram preparados a partir de solução estoque de acrilamida/N, N-metileno bis acrilamida 30% (m/v), tampão Tris/HCl 1,5 M, pH 8,6, para o gel separador e tampão Tris/HCl 0,5 M, pH 6,8, para o gel empilhador, persulfato de amônio 10% (m/v), dodecil sulfato de sódio (SDS) 10% (m/v) e N, N, N, N-tetrametil-etilenodiamino de sódio (TEMED). A corrida eletroforética foi realizada à temperatura ambiente, 130 V, em placa do sistema de mini-gel da Bio-Rad Laboratories, Inc. (HERCULES, CA, USA).

As amostras submetidas à eletroforese foram ressuspensas com tampão de amostra desnaturante 3X (0,19 M Tris/HCl, pH 6,8, SDS 2,3% m/v, glicerol 1% v/v,  $\beta$ -mercaptoetanol 5% v/v e azul de bromofenol), fervidas durante 4 min e aplicadas no gel.

Posteriormente, as proteínas presentes no gel foram reveladas em uma solução contendo *Coomassie Brilliant Blue* R-250, metanol 95%, ácido acético e água, por no mínimo 4 h e, então, foi aplicada uma solução descorante.

### **5.8 Purificação parcial do extrato comercial de lacase**

O extrato comercial de lacase (NOVOZYMES) empregado nesse trabalho apresenta um teor considerável de açúcares e outros compostos (Tabela 1) que podem interferir nos resultados do teste de fenol/sulfúrico (utilizado para detecção dos açúcares totais antes e após as reações de reticulação).

**Tabela 1.** Composição do extrato comercial de lacase (Olempska-beer, 2004).

Composição (%)							
Sólidos orgânicos totais	Sorbitol	Lactato de sódio	Glicose	Glicina	Água	Sorbato de potássio	Benzoato de sódio
5,3	30,0	5,0	3,0	2,0	54,3	0,2	0,2

Com o intuito de minimizar esse efeito, o extrato comercial foi submetido a duas etapas de filtração em dispositivo de ultrafiltração (Amicon, MERCK) contendo membrana de celulose regenerada com corte nominal de 30 kDa, sob agitação e pressão de 4 bar. Após cada etapa, foram realizadas análises em espectrofotômetro a 280 nm, além de análises de atividade enzimática (item 5.6) e açúcares totais. Posteriormente, o extrato parcialmente purificado foi analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante, conforme descrito no item 5.7.

### 5.9 Reações de xilanas, ácido ferúlico e ácido cumárico com HRP/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e lacase

O sistema oxidativo HRP/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi avaliado quanto a capacidade de iniciar reações de reticulação em ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico e xilana extraída de bagaço de cana pré-tratado.

As reações de reticulação iniciadas por HRP/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram conduzidas de acordo com Guerra et al. (2000), com modificações. A carga enzimática empregada foi de 4 UI.mg<sup>-1</sup> substrato. Cada um dos substratos foi suspenso ou dissolvido em um volume final de 5 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM pH 6,5, a fim de atingir a consistência de 0,1%. A esta mistura foi adicionado 6,3 mg de HRP-P8000 ou 0,7 mg de HRP-P8375, que representam quantidade suficiente para atingir 4 UI.mg<sup>-1</sup> substrato. A seguir foi adicionado H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200 mM para atingir a proporção de 1,2 μmol.UI<sup>-1</sup> de HRP. A mistura reacional foi submetida à agitação de 120 rpm por 4 h a 27 °C.

Já as reações de reticulação iniciadas por lacase foram conduzidas com o substrato xilana de bagaço de cana. A metodologia foi baseada no trabalho desenvolvido por Oinonen et al. (2013). A carga enzimática empregada foi de 15 UI.mg<sup>-1</sup> de xilana, pH 6,5 e temperatura de 27 °C por 4 h e 120 rpm.

Após as reações de acoplamento, as soluções resultantes foram congeladas para as análises químicas e determinação da massa molar (conforme descrito no item 5.10.3).

### 5.9.1 Planejamento experimental das condições de reticulação

Foram realizados ensaios adicionais para verificar o efeito da carga de enzima e tempo de ensaio na massa molar da xilana obtida por reação de acoplamento oxidativo. Os níveis destas variáveis foram definidos de acordo com um planejamento experimental  $2^2$  com triplicata no ponto central, indicado na Tabela 2.

**Tabela 2.** Planejamento dos experimentos de reticulação enzimática das xilanas a partir de um desenho experimental  $2^2$  completo com repetições no ponto central.

Experimento	Carga de Lacase (UI.mg <sup>-1</sup> de xilana)	Tempo de reação (h)
1	15	4
2	45	4
3	15	24
4	45	24
5	30	14
6	30	14
7	30	14

Ao final de cada tempo de reação de reticulação avaliado, com o intuito de interromper a ação das enzimas, o pH das soluções foi ajustado para 12 com NaOH 1 M e o volume completado para 20 mL com água destilada. Dessas soluções, foram retiradas alíquotas de 10 mL, as quais o pH foi ajustado para 7 com adição de HCl 4 M e, então, foi adicionado a cada uma delas um volume de etanol absoluto a fim de se alcançar a concentração final de 63%. As soluções contendo etanol foram deixadas a 4 °C por 18 h para promover precipitação das xilanas de massa molar aumentada. Após esse tempo, as soluções foram centrifugadas a 4000 x g por 15 min. Os sobrenadantes foram desprezados e os precipitados de cada reação foram ressuspensos em 2,5 mL de NaOH 0,01 M. Finalmente, foi aplicado 1 mL de cada reação em uma coluna cromatográfica para análise da distribuição de massa molar, conforme descrito no item 5.10.3.

Assim, os dados foram tratados no *software* Minitab 18.1, sendo os valores obtidos de somatório de área de cada cromatograma resultante da reação de fenol/sulfúrico em absorbância de 490 nm (correspondente aos volumes de eluição de 7-12 mL) utilizados como resposta para a definição da carga enzimática e tempo de reação a serem empregados na produção de xilana reticulada em maior escala. Os somatórios das áreas referentes à distribuição de massa molar da lacase nas diferentes cargas enzimáticas empregadas nas reações de reticulação foram descontados para a análise no *software*.



### 5.9.2 Produção de xilana reticulada em maior escala

Foram realizados experimentos em maior escala na condição experimental empregando a enzima lacase em que houve a maior proporção de xilanas de massa molar aumentada, a fim de preparar xilanas em quantidade suficiente para uma caracterização química e espectroscópica mais detalhada.

Para isso, a reação de reticulação em maior escala foi conduzida com massa total de 2 g de xilana extraída. Com o intuito de promover manutenção dos parâmetros de reação em relação aos testes anteriores, foram utilizados 12 frascos erlenmeyers contendo 200 mg de xilana extraída cada, sendo adicionado volume da enzima lacase correspondente à carga enzimática de 45 UI.mg<sup>-1</sup> e tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 6,5 para atingir volume de 200 mL em cada frasco. Após o tempo reacional de 2 h, os volumes dos frascos foram reunidos em quatro provetas de 2 L e foi adicionado etanol absoluto a cada uma delas, na proporção de 1:2, isto é, a cada 0,6 L de solução de xilana (contida em uma proveta), adicionou-se 1,2 L de EtOH. As provetas foram mantidas a 4 °C por 18 h para promover precipitação das xilanas. Após esse tempo, as soluções foram centrifugadas a 5000 x g por 30 min, e o material precipitado foi congelado para posterior liofilização. Após a liofilização das xilanas, foram realizadas 3 lavagens do material com o intuito de retirar sais provenientes do tampão utilizado na reação de reticulação. As lavagens foram feitas em água, sendo o material submetido à centrifugação (4000 x g por 15 min) entre cada uma delas. Além disso, durante o processo, a condutividade das soluções foi analisada com o auxílio de um condutivímetro (COLLEMAN, modelo MCA 150).

## 5.10 Caracterização dos substratos e dos materiais produzidos nas reações de reticulação

### 5.10.1 Composição química

Os métodos descritos nessa seção foram utilizados para análise tanto do bagaço *in natura* e o bagaço pré-tratado com sulfito alcalino, quanto da xilana extraída enzimaticamente e a xilana reticulada obtida na melhor condição a partir do planejamento experimental realizado (Tabela 2).

#### *Determinação de açúcares monoméricos, lignina e grupos acetila*

Para caracterização da composição química dos materiais, foram realizadas análises em triplicata a partir de 300 mg (massa seca) de amostra, segundo metodologia descrita por

Ferraz et al. (2000). A cada tubo, foi adicionado 3 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 72%, seguido de incubação por 1 h a 30 °C. Posteriormente, as soluções foram transferidas para frascos Erlenmeyers de 250 mL, aos quais foram adicionados 79 mL de água destilada. Os Erlenmeyers foram, então, autoclavados a 121 °C e 1 atm por 1 h. Após autoclavagem, o material foi filtrado em filtro poroso nº 3 (previamente seco em estufa a 105 °C por 2 h e pesado), sendo a lignina insolúvel determinada por gravimetria e a solúvel por leitura em espectrofotômetro a 205 nm em diluição apropriada (absortividade igual a 105 L.g<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>). Os volumes das soluções filtradas foram completados para 200 mL em balão volumétrico. Uma alíquota de cada solução foi filtrada e utilizada para análise das concentrações de açúcares monoméricos gerados (glicose, xilose, arabinose) e ácido acético. As análises desses compostos foram realizadas em um equipamento HPLC (WATERS) equipado com um detector de índice de refração e uma coluna HPX87H (BIORAD) a 35 °C, com fase móvel composta por ácido sulfúrico 5 mM e um fluxo de 0,6 mL.min<sup>-1</sup>. Os açúcares foram expressos como seus respectivos polissacarídeos de acordo com seus fatores de hidrólise: 0,90 para a glucanas, 0,88 para a xilana e arabinosil e 0,72 para acetil. As áreas dos cromatogramas foram convertidas em concentração utilizando curvas de calibração previamente construídas com soluções padrão de glicose, xilose, arabinose e ácido acético.

#### *Determinação de ácidos hidroxicinâmicos*

As amostras foram submetidas ao tratamento severo, conforme descrito por Masarin et al. (2011), no qual há hidrólise tanto das ligações do tipo éster entre os ácidos hidroxicinâmicos e as arabinoxilanas quanto das ligações do tipo éter entre os hidroxicinamatos e lignina. Para isso, foram adicionados em reatores (10 mL) de aço inoxidável 20 mg de material (massa seca) e 0,2 mg de antraquinona. Posteriormente, foram adicionados 1,6 mL de uma solução de NaOH 4 M. Os reatores foram fechados e colocados em banho de silicone a uma temperatura constante de 170 °C por 2 h. Após este tempo, os reatores foram resfriados e a mistura acidificada até pH 2. O volume da suspensão foi ajustado para 10 mL em balão volumétrico e mantido em repouso a 4 °C por 16 h. Ao final desse tempo, as soluções foram transferidas para tubos falcon de 15 mL e submetidas à centrifugação a 3400 x g por 10 min. Para quantificação dos ácidos hidroxicinâmicos (ácidos cumáricos e ferúlico), alíquotas dos sobrenadantes foram coletadas e analisadas em um cromatógrafo AKTA (GE), utilizando uma coluna ODS Hypersyl (Thermo Scientific), com um fluxo de 0,8 mL.min<sup>-1</sup> de uma fase móvel contendo acetonitrila:água (1:4 v/v) com 1% de ácido acético e um detector UV ajustado em 315 nm.

Para as amostras de xilana extraída e reticulada também foi realizado o tratamento brando, sendo este responsável pela hidrólise apenas das ligações do tipo éster entre os ácidos hidroxicinâmicos e as xilanas (Masarin et al., 2011). Nessa análise, foram empregados 20 mg de material, aos quais foram adicionados 2 mL de NaOH 1 M. As soluções foram incubadas a 30 °C por 24 h a 120 rpm. Após esse tempo, foi adicionado em cada reator um volume de 2 mL de HCl 6 M, com o intuito de diminuir o pH reacional até 2. O volume dos reatores foi completado para 5 mL e as soluções foram mantidas a 4 °C por 16 h. A quantificação dos ácidos hidroxicinâmicos foi realizada da mesma forma que a descrita anteriormente para as amostras do tratamento severo.

### **5.10.2 Composição elementar**

Amostras da xilana extraída e da xilana reticulada foram submetidas à análise dos elementos Carbono, Hidrogênio e Nitrogênio (CHN). Foram utilizados cerca de 20 mg de cada amostra, previamente secas em pentóxido de fósforo à vácuo. As análises foram realizadas em equipamento Perkin Elmer - CHN 2400, pela Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (CAIQ-USP).

### **5.10.3 Determinação da massa molar aparente**

A massa molar de xilo-oligômeros e da xilana reticulada foi determinada por cromatografia de exclusão de tamanho (SEC), utilizando uma coluna Superose 12 10/300 GL (GE HEALTHCARE), sendo o eluente NaOH 0,01 M. Um volume de 1 mL de solução de xilana a 1 mg.mL<sup>-1</sup> foi aplicado na coluna, com fluxo de 0,6 mL.min<sup>-1</sup>. A coluna foi calibrada com xilose (150,13 g.mol<sup>-1</sup>), rafinose (504 g.mol<sup>-1</sup>), xilohexose (810,8 g.mol<sup>-1</sup>), dextrana T1 (1000 g.mol<sup>-1</sup>), dextrana T3.5 (3500 g.mol<sup>-1</sup>), dextrana T6 (6000 g.mol<sup>-1</sup>), dextrana T10 (10000 g.mol<sup>-1</sup>), citocromo c (12384 g.mol<sup>-1</sup>), anidrase carbônica (29000 g.mol<sup>-1</sup>), albumina (66000 g.mol<sup>-1</sup>), álcool desidrogenase (150000 g.mol<sup>-1</sup>) e blue dextrana (2000000 g.mol<sup>-1</sup>). A detecção dos xilo-oligossacarídeos e xilanas eluídos da coluna foi realizada por reação de frações de 1 mL coletadas na saída da coluna empregando o método do fenol/ácido sulfúrico (Dubois et al., 1956). Um detector de UV em linha com a coluna também foi empregado para detectar o eluente a 280 nm e 315 nm, o que permitiu observar a co-eluição de frações de lignina e ácidos hidroxicinâmicos.

A partir das distribuições obtidas, os dados foram linearizados em equação do tipo  $\log M = a + bV_e$ , no qual M representa a massa molar e  $V_e$ , o volume de eluição. Para cálculo

da massa molar de polímeros, é necessário levar em consideração os valores de massa molar numérica média ( $M_n$ ) e massa molar ponderal média ( $M_w$ ). A dispersividade ( $D$ ) é obtida pela divisão entre os valores de  $M_w$  pelos de  $M_n$ . Essas propriedades foram obtidas de acordo com áreas divididas do cromatograma (Sarbu et al., 2003) e calculadas de acordo com as equações abaixo:

$$M_n = \frac{\sum \text{Area}_i}{\sum \left( \frac{\text{Area}_i}{M_i} \right)}$$

$$M_w = \frac{\sum (\text{Area}_i M_i)}{\sum \text{Area}_i}$$

#### 5.10.4 Caracterização por análises espectroscópicas

As análises descritas nesse item foram realizadas para a xilana extraída enzimaticamente, para uma xilana comercial (BIOSUPPLIES AUSTRALIA) e para a xilana obtida após a reação de reticulação na condição otimizada do planejamento experimental.

##### *Análise na região do ultravioleta (UV)*

A partir de soluções de concentração igual a 1 mg.mL<sup>-1</sup>, foi realizado um *scan* em espectrofotômetro (Evolution 201, THERMO-SCIENTIFIC) na região do UV de 240 a 400 nm. Para isso, as amostras foram diluídas na proporção 1:10 em solução de NaOH 0,01 M.

##### *Espectroscopia de infravermelho (FTIR)*

As amostras foram secas em P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> à vácuo por dois dias e, então, cerca de 1 mg de massa seca foi homogeneizada com KBr. As análises foram conduzidas em um equipamento Perkin Elmer-Spectrum GX, em 32 *scans* na região de número de onda correspondente entre 4000 cm<sup>-1</sup> e 400 cm<sup>-1</sup>. Os espectros foram normalizados em 1043 cm<sup>-1</sup>.

##### *Ressonância Magnética Nuclear Bidimensional (RMN-2D)*

A análise de RMN em duas dimensões foi realizada conforme descrito por Sporck *et al.* (2017). Os experimentos foram realizados em colaboração com o grupo liderado pelo Dr. José Carlos del Rio do Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla, CSIC, Av. Reina Mercedes, 10, 41012 Seville, Spain. Aproximadamente 50 mg de material foram dissolvidos em 0,75 mL de DMSO-*d*<sub>6</sub> e analisados em um instrumento de RMN (Bruker AVANCE III 500 MHz) a 25°C. Experimentos de HSQC (*heteronuclear single quantum coherence*) utilizaram o programa de pulso do equipamento Bruker 'hsqcetgpsisp2.2', sendo

que o pico central de solvente foi usado como referência interna. Os sinais de correlação de HSQC foram atribuídos após comparação com dados da literatura.

### 5.11 Análise de atividade antioxidante das xilanas antes e após reticulação

Com o intuito de avaliar a capacidade antioxidante das xilanas originais e das xilanas recuperadas após a reação de reticulação foram empregadas duas técnicas espectrofotométricas: método ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico) e método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil).

#### *Método ABTS*

Esta metodologia foi primeiramente descrita por Re et al. (1999) e se baseia na formação de radical catiônico ABTS<sup>•+</sup>, o qual apresenta uma coloração azul esverdeada proveniente da reação prévia deste composto com o persulfato de potássio. Dessa forma, para determinação do potencial antioxidante, é avaliada a capacidade de inibição da produção de radicais livres, relacionada com a extensão da descoloração da solução em função da concentração de antioxidante e tempo de reação.

Inicialmente, foram construídas curvas padrão (Apêndice D) empregando como padrões o composto sintético Trolox (ácido (±) -6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico) e o composto ácido ferúlico, de acordo com metodologia descrita por Rufino et al. (2007b). Os reagentes Trolox e ácido ferúlico, ambos na concentração de 2 mM, foram preparados no dia da análise.

O radical ABTS<sup>•+</sup> foi obtido após adição de 88 µL de persulfato de potássio 140 mM em 5 mL de ABTS 7 mM, seguido de incubação no escuro à temperatura ambiente, por 16 h. Posteriormente, a solução resultante foi diluída até atingir uma absorbância de  $0,70 \pm 0,05$  em comprimento de onda de 730 nm. Para análise das amostras de xilana extraída e reticulada, foram utilizadas soluções nas seguintes concentrações: 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 e 5.0 mg.mL<sup>-1</sup>. Para isso, 100 µL de cada solução foram adicionados a 900 µL de radical ABTS<sup>•+</sup>, sendo realizada leitura a 730 nm após 5 min de reação (Valls et al., 2018). Os experimentos foram realizados em triplicatas.

Dessa forma, considerando que a descoloração total da solução representa 100% de atividade antioxidante, a porcentagem de inibição da coloração (ou descoloração) de ABTS<sup>•+</sup> pelas soluções de xilana foi considerada como a porcentagem de atividade antioxidante. Para isso, foi utilizada a seguinte equação para o cálculo:

$$\text{ABTS}^{\bullet+} \text{ descoloração (\%)} = 100 \times \left( \frac{A_i - A_f}{A_i} \right)$$

Onde  $A_i$  é a absorbância do branco e  $A_f$  é o valor de absorbância após contato com cada solução de xilana.

#### *Método DPPH*

Esse método consiste em avaliar a capacidade antioxidante via atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila – DPPH $\cdot$ . O radical DPPH $\cdot$  é relativamente estável e apresenta coloração púrpura, absorvendo em comprimento de onda entre 515-517 nm (Brand-Williams et al., 1995). De forma similar à reação com ABTS, o decréscimo nos valores de absorbância pode ser correlacionado à extensão da atividade antioxidante.

Para essa análise, uma solução de DPPH 0,06 mM foi preparada no dia da análise, segundo metodologia descrita por Rufino et al. (2007a) para confecção da curva padrão (Apêndice D). Para a análise das amostras de xilanas, foram utilizados 25  $\mu$ L de solução nas concentrações de 2.0, 2.5, 3.0 e 5.0 mg.mL $^{-1}$  e 975  $\mu$ L de DPPH 0,06 mM. As soluções foram homogeneizadas e deixadas no escuro por 2 h e, então, submetidas à leitura em espectrofotômetro a 515 nm. Para o cálculo da capacidade antioxidante, foi utilizada a seguinte equação (Bian et al., 2013):

$$\text{DPPH descoloração (\%)} = \left( 1 - \frac{Abs_{amostra}}{Abs_{controle}} \right) \times 100$$

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seção de Resultados e Discussão dessa dissertação está apresentada na forma de dois itens que englobam conjuntos de dados mais relacionados entre si. O primeiro item abrange a caracterização química e estrutural dos materiais lignocelulósicos e das xilanas, além dos ensaios de reticulação e planejamento das condições de reação empregando lacases. Por fim, são apresentados alguns dados sobre a atividade antioxidante das xilanas. O segundo item compreende ensaios de reticulação de ácidos hidroxicinâmicos (ácido ferúlico e *p*-cumárico) e xilanas na presença de duas peroxidases (HRP).

### ITEM 1 - Reticulação de xilana de bagaço de cana via acoplamento oxidativo dos ácidos hidroxicinâmicos catalisado por lacase

#### 6.1 Características dos insumos lignocelulósicos

##### 6.1.1 Composição química dos materiais

O bagaço de cana-de-açúcar *in natura*, bem como os materiais resultantes após os tratamentos realizados (pré-tratamento sulfito-alcálico e extração enzimática de xilana), foram caracterizados quanto à composição química (Tabela 3). Os resultados obtidos a partir do balanço de massa de cada etapa indicam que o pré-tratamento foi responsável pela remoção de cerca de 40% de lignina do bagaço *in natura*, 9% de glucana e 15% de xilana. A remoção de lignina se deve à sulfonação da molécula pelos íons sulfito ( $\text{SO}_3^{-2}$ ) presentes no licor de pré-tratamento. Essa sulfonação pode levar à fragmentação da lignina e a consequente solubilização de fragmentos de lignina (Zhu et al., 2009; Mendes et al., 2011). O tratamento empregado também acarretou em maior remoção de xilana em comparação à glucana, o que pode ser explicado, pela característica amorfa da hemicelulose e pelo seu menor grau de polimerização comparado à celulose, tornando-a mais suscetível à degradação e solubilização em meio alcálico (Fengel e Wegener, 1983). O pré-tratamento sulfito alcálico também promoveu remoção significativa de grupos acetila (93,8%) e de ácidos hidroxicinâmicos (cerca de 58,8% de ácido ferúlico e 55,9% de ácido *p*-cumárico) (Tabela 4). Os resultados obtidos estão em conformidade com trabalhos prévios que empregaram o pré-tratamento sulfito alcálico com diferentes severidades, acarretando em remoções entre 35-55% de lignina, 0-15% de glucana e 3-30% de hemicelulose (Mendes et al., 2011; Laurito-Friend et al., 2015; Sporck et al., 2017; Reinoso et al., 2018).

O material pré-tratado foi submetido à extração enzimática de xilanas e o sólido residual gerado foi enriquecido em glucana, apresentando cerca de 53% desse polissacarídeo em sua composição. Esse material ainda apresenta um alto teor de xilana, o que pode ser explicado pela menor acessibilidade das enzimas xilanases a algumas porções da hemicelulose, dificultando sua extração completa do material pré-tratado (Sporck et al., 2017). O balanço de massas dos componentes indica que, da xilana originalmente existente no bagaço *in natura* (21,6 g/100 g de bagaço *in natura*), 13 g ainda permaneceram no resíduo final após a extração enzimática da xilana. Por outro lado, os grupos pendentes da xilana (principalmente acetila) foram removidos ao longo do processo, indicando que a xilana residual é menos ramificada.



**Tabela 3.** Dados de composição química e balanço de massa para os componentes do bagaço *in natura*, bagaço pré-tratado com sulfito alcalino e sólidos residuais após extração de xilana do bagaço pré-tratado.

Material	Composição química (%)					Rendimento (%)	Balanço de massa (g/100g de bagaço <i>in natura</i> )				
	Glucana	Lignina	Hemicelulose				Glucana	Lignina	Hemicelulose		
			Xilana	Arabinosil	Acetil				Xilana	Arabinosil	Acetil
Bagaço <i>in natura</i>	40,2±0,1	19,7±0,0	21,6±0,0	2,1±0,0	3,2±0,0	100	40,2	19,7	21,6	2,1	3,2
Bagaço pré-tratado	45,7±0,1	14,8±0,0	22,9±0,0	2,5±0,0	0,3±0,0	80,1	36,6	11,9	18,3	2,0	0,2
Sólidos pós-extração	53,0±0,5	14,5±0,1	19,0±0,1	1,9±0,1	0,1±0,0	68,6	36,4	9,9	13,0	1,3	0,1

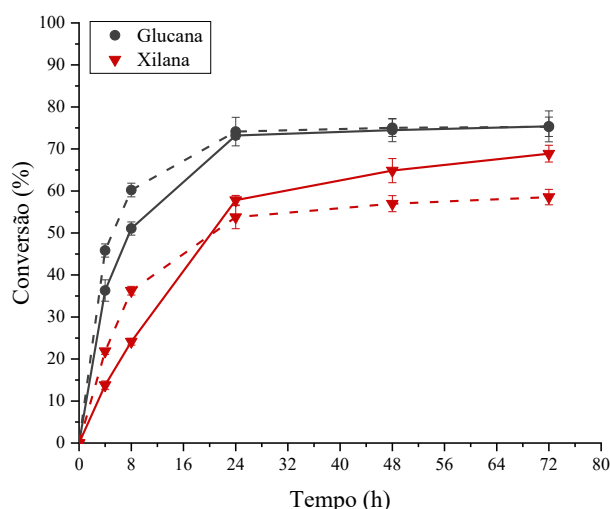
**Tabela 4.** Composição de ácidos hidroxicinâmicos e balanço de massa para o bagaço antes e após o pré-tratamento.

Amostra	Ácidos Hidroxicinâmicos (%)		Balanço de massa (g/100g)	
	Ferúlico	<i>p</i> -Cumárico	Ferúlico	<i>p</i> -Cumárico
Bagaço <i>in natura</i>	1,70±0,1	5,99±0,2	1,70	5,99
Bagaço pré-tratado	0,92±0,1	3,25±0,2	0,74	2,60

### 6.1.2 Hidrólise enzimática dos materiais antes e após a extração de xilanas

O isolamento da xilana do material lignocelulósico pré-tratado pode, eventualmente, facilitar o processo posterior de hidrólise do resíduo sólido e da etapa subsequente de fermentação, considerando que grande parte dos microrganismos industrialmente empregados atualmente nesse processo não são capazes de assimilar açúcares de cinco carbonos, como xilose e arabinose. Dessa forma, a extração da hemicelulose possibilita a obtenção de um material sólido rico em glucanas para conversão a etanol e, ao mesmo tempo, a melhor exploração da fração hemicelulósica no contexto de uma biorrefinaria.

Ao realizar a sacarificação enzimática do bagaço pré-tratado e do material obtido após a extração da arabinoxilana do bagaço, os dados obtidos indicam que a conversão final em glucana é similar entre os materiais avaliados, isto é, a extração de xilana não afetou o rendimento total de conversão desse polissacarídeo (Figura 6). A conversão de xilana foi inferior no material sólido residual da extração, já que cerca de 30% das hemiceluloses foi solubilizada no tratamento enzimático empregando xilanases e a xilana residual deve estar menos acessível à ação das enzimas.



**Figura 6.** Conversão de glucana e xilana após 72 h de hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado (linha sólida) e material resultante após extração de xilana (linha pontilhada).

Por outro lado, ao analisar a conversão de glucana e xilana nas primeiras 4 h de sacarificação, é possível observar que nos sólidos residuais após extração de xilana a taxa de conversão inicial de glucana foi 26,4% superior em comparação ao bagaço pré-tratado. Já a conversão em xilose foi 61,8% superior (Tabela 5). O aumento na eficiência de conversão em glicose pode estar correlacionado à solubilização de lignina na xilana extraída (cerca de 17%). Com isso, o sólido residual apresenta um menor conteúdo de lignina, sendo que essa macromolécula é descrita por causar adsorção não-específica das celulases e hemicelulases durante a hidrólise enzimática (Kim et al., 2016). Outro fator que possivelmente influenciou de maneira positiva no aumento da conversão de glicose foi a retirada de parte da hemicelulose, já que algumas evidências apontam a ocorrência de oclusão parcial desse polissacarídeo na fração celulolítica da parede celular vegetal (Buanafina, 2009; Scheller e Ulvskov, 2010).

Esses resultados indicam que, apesar de não haver diferença na conversão total, a extração da hemicelulose propicia um aumento na eficiência inicial de conversão, o que pode ser vantajoso no cenário de um bioprocessos.

**Tabela 5.** Velocidade de conversão de glucana e xilana após 4 h de hidrólise enzimática de bagaço pré-tratado, antes e após extração da xilana (tempo inicial) e após 72 h de reação.

Amostra	Conversão em glicose		Conversão em xilose	
	Velocidade inicial (%.h <sup>-1</sup> )	Conversão após 72h (%)	Velocidade inicial (%.h <sup>-1</sup> )	Conversão após 72h (%)
Bagaço pré-tratado com sulfito alcalino	9,1±0,6	75,4±3,7	3,4±0,2	68,9±1,9
Sólidos residuais após extração de xilana	11,5±0,4	75,3±2,3	5,5±0,2	58,6±1,8

## 6.2 Características da xilana extraída

A etapa de extração de xilana a partir de bagaço pré-tratado gerou uma xilana extraída que representou 29,8% da massa de xilana existente no material pré-tratado. Esse rendimento foi calculado por diferença entre as massas dos componentes xilose, arabinosil e acetila presentes no bagaço pré-tratado e no resíduo gerado após a extração de xilana. A xilana isolada apresentou ainda a contaminação por cerca de 2% de glucana e 17% de lignina em sua composição (Tabela 6). De maneira similar, Sporck et al. (2017) obtiveram um rendimento de 30% nessa etapa, ao realizarem extração de xilana em tampão empregando uma endo-xilanase. Entretanto, a xilana recuperada apresentou um valor menor que 3% de

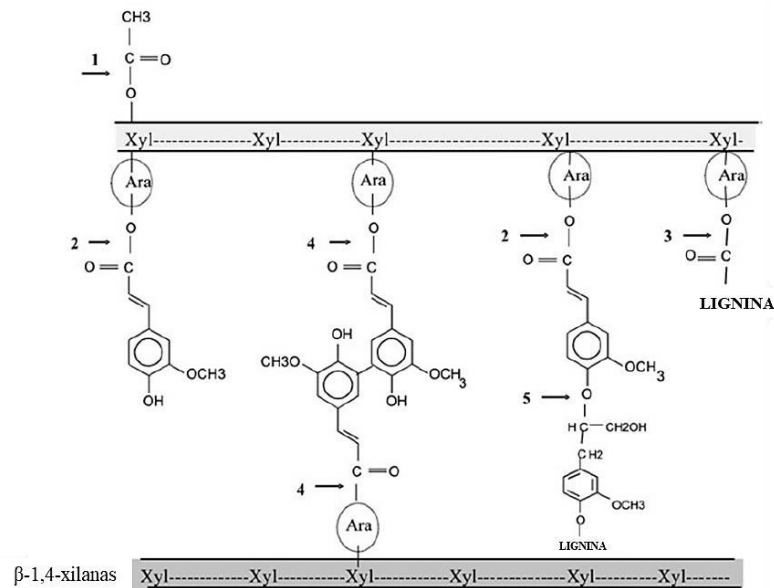
lignina em sua composição, inferior ao presente trabalho. Isso pode ser explicado pela diferença na severidade do pré-tratamento realizado por Sporck et al. (2017), no qual a carga de sulfito empregado foi de 10%, resultando em solubilização de cerca de 53% de lignina após o pré-tratamento. Dessa forma, a menor remoção de lignina no pré-tratamento conduzido no presente estudo, bem como a lavagem menos eficiente do material pré-tratado devido à baixa carga de álcali, possivelmente implicou em uma solubilização mais acentuada de lignina na posterior etapa de extração de xilana do material pré-tratado, levando à uma menor pureza da xilana isolada.

Lapierre et al. (2001), ao avaliarem a reticulação de xilanas extraídas de farelo de milho na presença de HRP, observaram que a capacidade de formação de gel das xilanas, além de depender do nível de substituição do material com ácido ferúlico, pode ser influenciada pela presença de estruturas de lignina associadas às xilanas. Segundo os autores, em frações de arabinoxilanas nas quais a concentração de lignina era inferior a 0,1% não foi possível observar a gelificação do material. De maneira similar, Ayala-Soto et al. (2014) estudaram xilanas isoladas a partir de diferentes regiões de milho e correlacionaram a concentração de lignina nos materiais com a formação de gel. Nesse estudo, a xilana isolada de fibra de milho com o maior teor de lignina dentre as demais xilanas avaliadas foi a que apresentou melhor capacidade de formação de gel. Essas observações indicam que a presença de lignina no material, apesar de diminuir sua pureza, pode favorecer a obtenção de geis de arabinoxilanas após reações de acoplamento oxidativo.

Outro aspecto relevante na xilana extraída é que foi detectada a presença de aproximadamente 1% de ácido ferúlico e 4% de ácido *p*-cumárico. Esses dados indicam que existem sítios para ocorrência de acoplamento catalisado por enzimas oxidativas a partir dos terminais fenólicos dos ácidos hidroxicinâmicos, foco principal do presente trabalho.

Conforme observado na Tabela 6, para a xilana extraída foram realizados dois tipos de tratamento para quantificação dos ácidos hidroxicinâmicos. O tratamento brando emprega uma menor carga de álcali e menor temperatura de reação, porém um tempo reacional superior se comparado ao tratamento severo. Em condições brandas, ocorre hidrólise de ligações do tipo éster entre os ácidos hidroxicinâmicos e os resíduos de arabinose ligados à cadeia principal de xilana e da lignina. Já na condição severa, há clivagem também das ligações do tipo éter existentes entre a molécula de lignina e os ácidos hidroxicinâmicos (Masarin et al., 2011). Portanto, o teor de ácidos hidroxicinâmicos detectado pelo tratamento brando indica que estes substituintes possuem o Oxigênio da posição 4 do anel aromático na forma de um fenol, o que é desejável para as reações de acoplamento oxidativo, conforme

demonstrado na Figura 7. Por outro lado, o teor de ácidos hidroxicinâmicos determinado pelo tratamento severo indica o total destas estruturas e a diferença entre os dois valores aponta para as estruturas que, além de formarem um éster com arabinose, formam também um éter com lignina. As estruturas com o éter na lignina não são passíveis da oxidação com enzimas como lacase e HRP, não sendo, portanto, susceptíveis ao tratamento desenvolvido no presente trabalho.



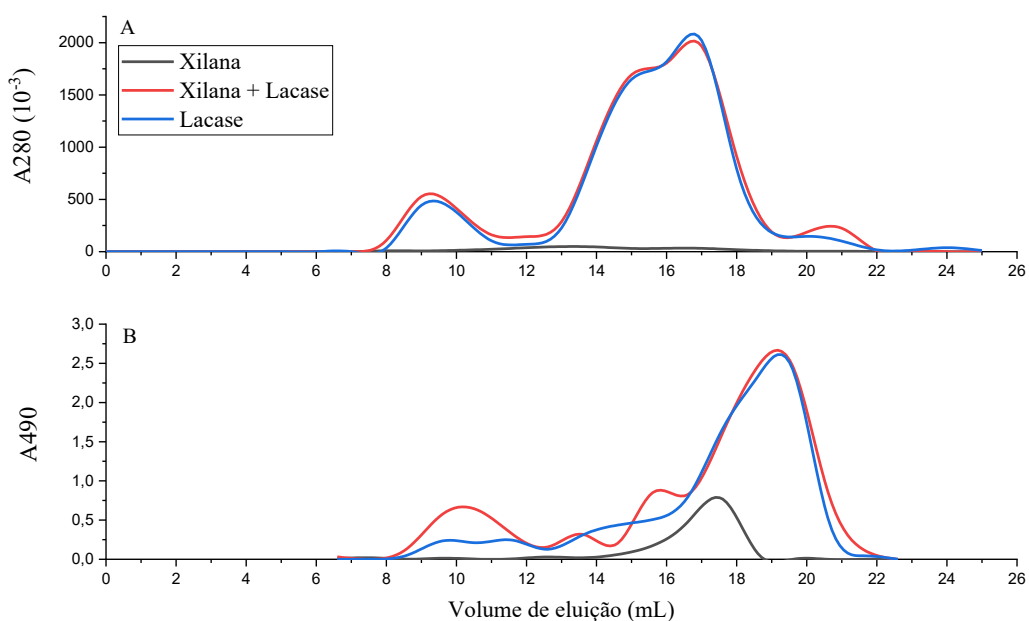
**Figura 7.** Tipos de ligação que podem ser encontrados na parede celular de gramíneas. 1) Ligação éster de grupos acetila à xilana; 2) Ligação éster de ácido ferúlico à moléculas de arabinose; 3) Ligação entre arabinose e lignina; 4) Ligação entre duas moléculas de ácido ferúlico (5-5') e 5) Ligação éter entre o ácido ferúlico e lignina. Adaptado de Buanafina (2009).

**Tabela 6.** Dados de composição química da xilana extraída de bagaço pré-tratado com sulfito alcalino.

<b>Composição química (%)</b>									
<b>Glucana</b>	<b>Lignina</b>	<b>Hemicelulose</b>			<b>Ácidos hidroxicinâmicos</b>				
		<b>Xilana</b>	<b>Arabinosil</b>	<b>Acetil</b>	<b>Tratamento Brando</b>		<b>Tratamento Severo</b>		
					<b>Ferúlico</b>	<b>Cumárico</b>	<b>Ferúlico</b>	<b>Cumárico</b>	
2,28±0,23	17,71±0,10	52,79±0,25	7,05±0,27	0,51±0,02	0,13±0,01	3,40±0,13	0,96±0,02	3,84±0,03	

### 6.3 Reticulação de xilana com lacase

Testes iniciais para avaliar a possibilidade de reticular a xilana extraída do bagaço pré-tratado, empregando lacases como catalisador, foram conduzidos com uma carga de enzima equivalente a  $15 \text{ UI}\cdot\text{mg}^{-1}$  de xilana e um tempo reacional de 4 h. Os meios reacionais completos produzidos foram analisados por cromatografia de permeação em gel, na qual foi empregada a detecção direta do eluente a 280 nm (detectando os compostos aromáticos presentes) e num sistema de reação pós-coluna empregando o reagente fenol/ácido sulfúrico. Neste caso, a detecção foi em comprimento de onda de 490 nm, atribuída a presença de carboidratos. Na análise em 280 nm foi possível notar que a enzima foi responsável por toda a absorção detectada (Figura 8a). Já a detecção em 490 nm revelou que o próprio extrato enzimático possui um alto teor de carboidratos. Apesar disso, foi possível notar no cromatograma da Figura 8b a presença de um pico em cerca de 8 a 12 mL, que representa um possível produto de xilana reticulada. Enquanto a integração da região de eluição da xilana extraída aponta para uma xilana com  $M_w$  de  $1189 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  (região do cromatograma entre 12,6 e 18,6 mL), a fração de elevada massa molar da xilana reticulada (região do cromatograma entre 8,6 e 11,6 mL) apresentou um valor de  $M_w$  de  $50345 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , sugerindo a formação de um material reticulado com massa molar 42 vezes superior à xilana extraída, mesmo que em pequena proporção.



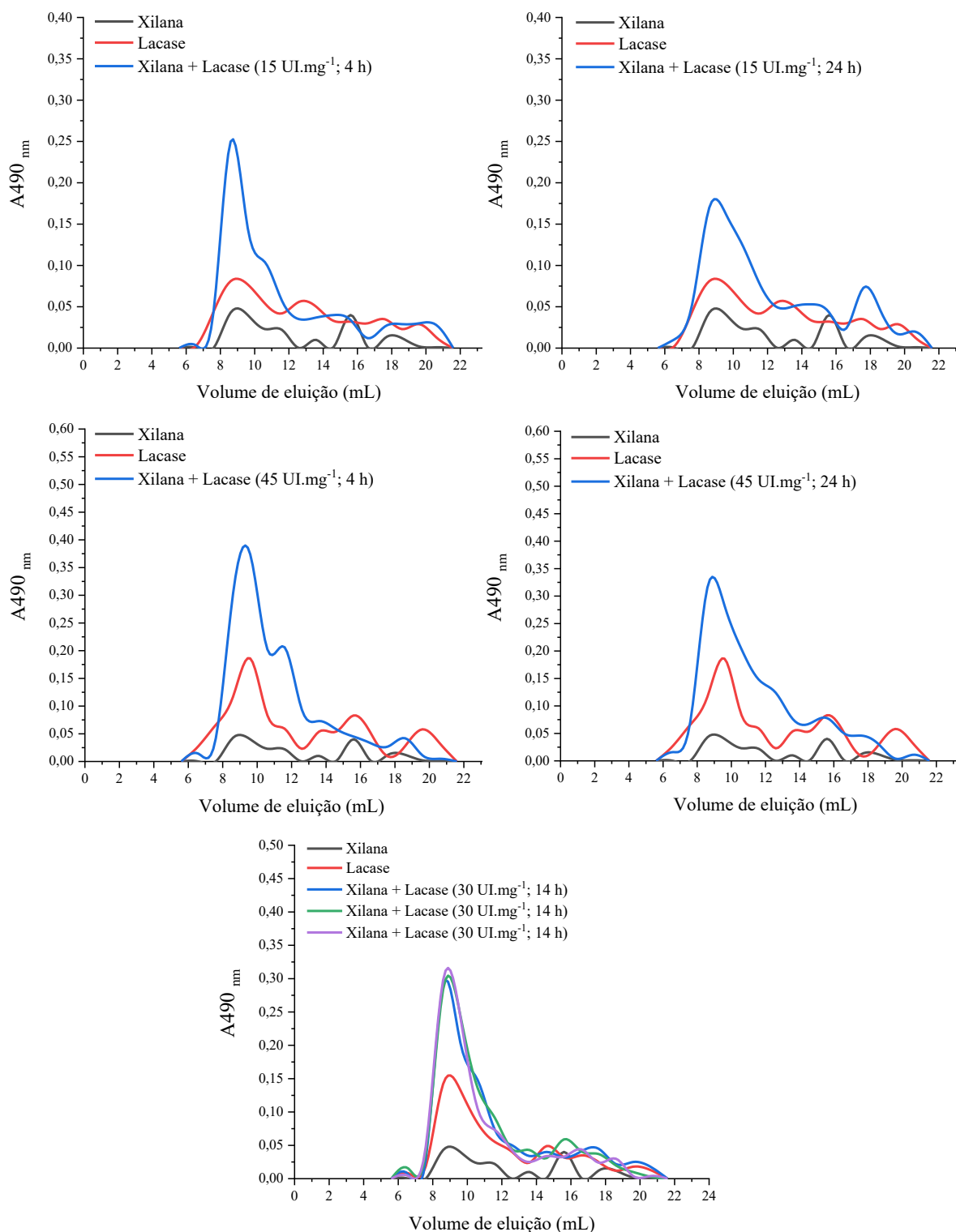
**Figura 8.** Reação de reticulação de xilana empregando a enzima lacase na carga de  $15 \text{ UI}\cdot\text{mg}^{-1}$  de xilana. (A) Perfil de eluição na cromatografia de permeação em gel da reação da xilana isolada em 280 nm. (B) Dados da eluição de carboidratos a partir da reação de fenol/sulfúrico com as frações coletadas no GPC.

Estes ensaios iniciais, apesar de promissores, mostraram que o extrato da enzima apresenta compostos responsáveis por interferência nos cromatogramas, tanto em análise a 280 nm, quanto em 490 nm após reação com fenol/sulfúrico. Dessa forma, uma etapa de purificação parcial do extrato de lacase foi realizada (Apêndice A) com o intuito de minimizar esses efeitos nos ensaios posteriores para estudo das condições de reação na presença de lacase, no qual seriam requeridas cargas superiores da enzima.

### **6.3.1 Efeito da carga de enzima e do tempo de reação nas reações de reticulação de xilana**

Após os testes iniciais de reticulação das xilanas na presença de lacases, foi realizado um planejamento experimental das condições de reação. Para isso, foram realizados ensaios para testar as condições de carga de enzima (15 e 45 UI.mg<sup>-1</sup>) e tempo de reação (4 e 24 h), com ponto central equivalente a uma carga de enzima de 30 UI.mg<sup>-1</sup> e tempo de reação de 14 h. Nestes ensaios foi empregada a enzima purificada conforme procedimento detalhado no Apêndice A. O processo de purificação da enzima permitiu eliminar parte expressiva dos componentes que interferiam na avaliação cromatográfica dos produtos de reação. Adicionalmente, passamos a adotar uma etapa de pré-purificação da xilana reticulada, imediatamente após o término da reação. Para isso, o produto de reação com lacase foi misturado com etanol até atingir uma concentração de 63% de etanol no meio reacional, o que ocasiona a precipitação da xilana de maior massa molar e praticamente não leva à precipitação da xilana originalmente extraída por via enzimática a partir do bagaço pré-tratado. Os cromatogramas obtidos em todas as condições experimentais avaliadas estão indicados na Figura 9.





**Figura 9.** Cromatogramas das reações de reticulação avaliando-se diferentes cargas enzimáticas e tempos de reação.

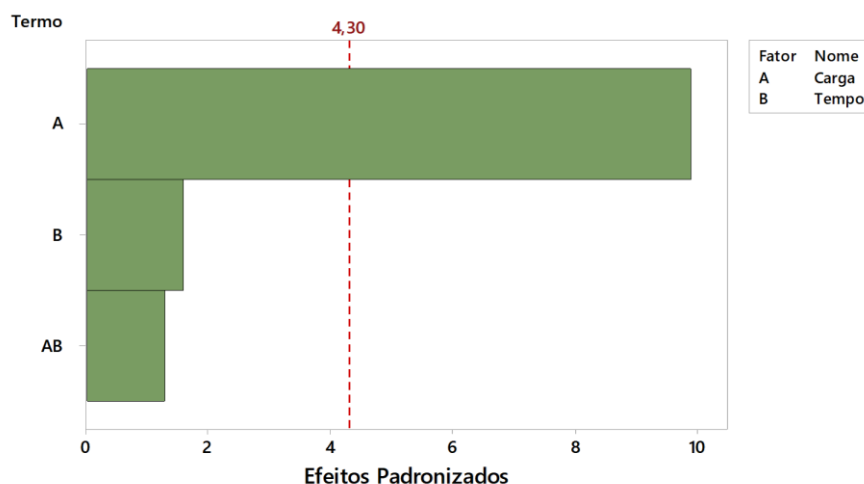
As áreas dos cromatogramas na região de eluição de 7 a 12 mL foram calculadas e empregadas como resposta correlacionada com o rendimento de xilana reticulada obtida em cada reação. Os dados obtidos (Tabela 7) foram utilizados como variável resposta no

*software* Minitab a fim de avaliar a influência das variáveis de reação na área de frações de alta massa molar dos cromatogramas gerados.

**Tabela 7.** Valores de somatório de área utilizados no *software* Minitab.

Tempo (h)	Carga (UL.mg <sup>-1</sup> )		
	15	30	45
4	273	-	559
14	-	305 ± 26	-
24	265	-	485

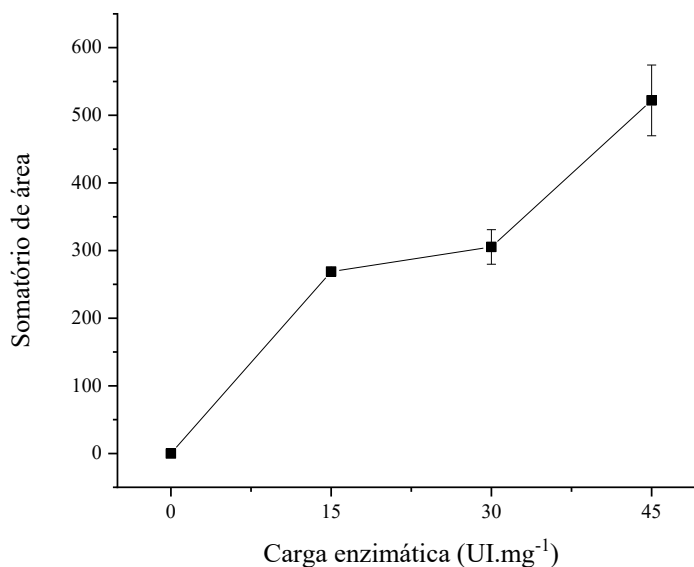
O gráfico de Pareto, que indica o efeito de cada variável na área do cromatograma está indicado na Figura 10. Os dados indicam que, com 95% de significância, a única variável de reação que afetou a área do cromatograma foi a carga de enzima. Neste caso, quanto maior a carga de enzima, maior foi a área do cromatograma, A variável tempo de reação não foi estatisticamente significativa nas condições testadas (4-24 h), indicando que, possivelmente, a reação de reticulação da xilana ocorre de forma rápida e já se desenvolveu completamente antes das 4 h de reação, que foi o menor tempo estudado neste planejamento experimental inicial.



**Figura 10.** Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados, relacionando os fatores carga e tempo, e como variável resposta o somatório de área.

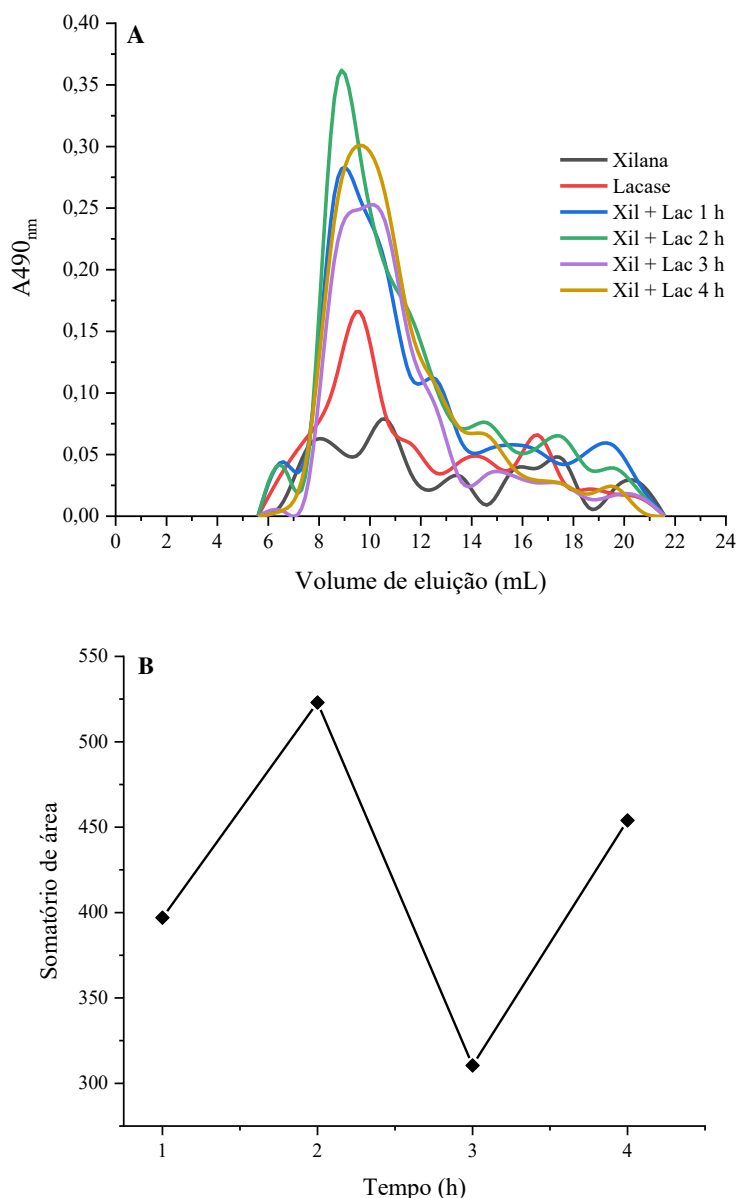
Considerando que o tempo de reação não foi relevante para influenciar a área do cromatograma da xilana reticulada, a Figura 11 representa um gráfico que relaciona somente a carga de enzima sobre a área do cromatograma. É possível notar que cargas crescentes de

enzima geraram áreas crescentes no cromatograma referente a xilana reticulada de alta massa molar. No entanto, não se nota um patamar para a área do cromatograma, sugerindo que maiores cargas de enzima continuariam a gerar mais xilana reticulada.



**Figura 11.** Relação entre o somatório de área e cargas enzimáticas empregadas nos ensaios do planejamento experimental.

Levando em consideração que os dados do planejamento experimental indicaram que o tempo de reação entre 4 e 24 h não afetou a reticulação da xilana e também baseado em outros trabalhos reportados na literatura que empregaram tempos mais curtos de reação em reações semelhantes às estudadas no presente trabalho (Lapierre et al., 2001; Carvajal-Millan et al., 2005b; Ayala-Soto et al., 2014; Paz-Samaniego et al., 2015), foram avaliadas reações com tempos entre 1 e 4 h, mantendo-se uma carga de lacase de 45 UI.mg<sup>-1</sup> (Figura 12).



**Figura 12.** Teste de cinética avaliando os tempos de 1 a 4 h de reação em uma carga de  $45 \text{ UI.mg}^{-1}$  da enzima lacase. A) Distribuição da massa molar dos produtos de reação de reticulação de xilana iniciada por lacase em cada tempo avaliado. B) Representação da somatória das áreas do cromatograma da letra A em função do tempo, considerando o volume de eluição de 7-12 mL.

Por meio dos resultados obtidos, pode-se notar que o tempo de reação de 2 h levou à formação de um pico de carboidratos de elevada massa molar e mais intenso em relação aos demais tempos de reação testados. É provável que, em tempos inferiores a 2 h, as reações de acoplamento ainda não tenham ocorrido de forma efetiva, considerando a limitada quantidade de sítios de reticulação disponíveis no material de partida. Além disso, em tempos superiores a 2 h de reação, as enzimas podem atuar oxidando as frações já reticuladas, promovendo a degradação dos produtos gerados e diminuindo a intensidade de

absorção no cromatograma. Esses efeitos também foram observados por Carvajal-Millan et al. (2005a) ao estudarem a estabilidade de hidrogéis produzidos por meio da reticulação de arabinoxilanas isoladas de trigo pela ação da enzima lacase.

A partir dos estudos do efeito de carga enzimática e tempo de reação de reticulação de xilana foi estabelecida a carga de 45 UI de lacase por miligrama de xilana e o tempo de reação de 2 h para a produção de xilana reticulada em maior escala a fim de caracterizar o produto de reação gerado. Essas condições de reação também foram utilizadas para avaliar o acoplamento oxidativo de uma arabinoxilana comercial (Apêndice B).

O tempo definido a partir do planejamento experimental no presente trabalho é similar ao reportado em diversos estudos sobre o acoplamento oxidativo de xilanas (Tabela 8). Já em relação à carga enzimática, a carga de 45 UI.mg<sup>-1</sup> é consideravelmente superior. Considerando a relação Ara:Xil de xilanas isoladas de diferentes fontes vegetais, a de bagaço de cana apresenta uma composição inferior de arabinose dentre as biomassas listadas na tabela, o que implica em uma menor possibilidade de substituição com ácido ferúlico nas moléculas e, conseqüentemente, em uma maior dificuldade de se alcançar o acoplamento entre duas moléculas menores a partir desses terminais. Dessa forma, para viabilizar a obtenção de produtos reticulados para xilanas de bagaço, foi requerida uma carga de enzima mais elevada em comparação a outros estudos.

**Tabela 8.** Comparação de alguns parâmetros composicionais, métodos de extração e condições de reação de reticulação para xilanas isoladas de diferentes fontes vegetais.

Fonte vegetal	Método de extração	Proporção A/X	[Ácido ferúlico]	[Xilana] para reticulação	Referência
Farinha de trigo	Extração aquosa; tratamento com amilase e precipitação com etanol 60%	0,55	11,2 nmol.mg <sup>-1</sup>	0,2% (m/v); 90 min Lacase: 0.5 nkat.mg <sup>-1</sup> HRP: 5.52 x 10 <sup>-3</sup> PU.mg <sup>-1</sup>	Figuroa-Espinoza e Rouau, 1998
Farelo de milho	NaOH 0,5M (30 °C, 2 h)	0,58	0,32 ug.mg <sup>-1</sup>	3% (m/v); 25 °C; 2 h HRP: 0,4 U.mg <sup>-1</sup>	Lapierre et al., 2001
Endosperma de grão de trigo	Extração aquosa (25 °C, 15 min); tratamento com enzimas e precipitação com etanol 65%	0,59	2,3 ug.mg <sup>-1</sup>	1% (m/v); 25 °C; 2 h Lacase: 1.675 nkat.mg <sup>-1</sup>	Carvajal-Millan et al., 2005b
Farelo de milho	-	0,72	0,25 ug.mg <sup>-1</sup>	4% (m/v); 25 °C; 6 h HRP: 1.670 PU.mg <sup>-1</sup>	Martinez-Lopez et al., 2011
Bagaço de cana-de-açúcar	Pré-deslignificação com NaClO <sub>2</sub> (75 °C, 2 h); Extração com KOH 10% (20-50 °C, 10 h)	0,13-0,15	-	-	Bian et al., 2012
Farelo de trigo	Tratamento com endoxilanase (55 °C, 24 h)	0,68-0,73	0,87-0,89%	-	Aguedo et al., 2014
Milho	NaOH 0,5 M (25 °C, 8 h); acidificação; precipitação com etanol 65%	0,53-0,57	0,52 – 1,20 ug.mg <sup>-1</sup>	4% (m/v); 25 °C; 2 h Lacase: 0,1 U.mg <sup>-1</sup>	Ayala-Soto et al., 2014
Trigo	Tratamento com enzimas (liquenase, amiloglicosidase); precipitação com etanol 95%	0,64-0,91	1,18 – 2,14 ug.mg <sup>-1</sup>	-	Malunga e Beta, 2015
DDG (milho)	NaOH 0,5 M (25 °C, 8 h); Precipitação com etanol 65%	-	-	2% (m/v); 25 °C; 1 h Lacase: 1.675 nkat.mg <sup>-1</sup>	Paz-Samaniego et al., 2015
Nejayote (milho)	-	-	-	10% (m/v); 25 °C; 4 h Lacase: 1.675 nkat.mg <sup>-1</sup>	-
Bagaço de cana-de-açúcar	8 UI xilanase.g <sup>-1</sup> (50 °C, 24 h)	0,16	-	-	Sporck et al., 2017
Farelo de milho	-	0,72	-	4% (m/v); 25 °C; 5 h HRP: 1.670 PU.mg <sup>-1</sup> Lacase: 1.670 nkat.mg <sup>-1</sup>	Martinez-Lopez et al., 2018
Bagaço de cana-de-açúcar	8 UI xilanase.g <sup>-1</sup> (50 °C, 24 h)	0,13	9,6 ug.mg <sup>-1</sup>	0,1% (m/v); 27 °C; 2 h Lacase: 45 U.mg <sup>-1</sup>	Presente estudo

### 6.3.2 Caracterização da xilana reticulada em condições ótimas de reação

#### 6.3.2.1 Composição química

As amostras antes e após o acoplamento oxidativo foram submetidas à análise de composição elementar, com o intuito de verificar a extensão da presença de proteínas nas xilanas reticuladas e precipitadas. O teor do elemento Oxigênio foi obtido considerando a somatória dos elementos CHN e subtraindo-a de 100%. Esses valores provavelmente encontram-se superestimados para a amostra de xilana reticulada, considerando que a enzima lacase empregada na reação possui mais de uma ponte dissulfeto (Olempska-Beer, 2004) e o elemento enxofre não foi quantificado por esse método. Além disso, também deve-se considerar a possível presença de enxofre advindo do pré-tratamento utilizado no presente trabalho, já que foram adicionados íons sulfito ( $\text{SO}_3^{-2}$ ) para aumentar a acessibilidade do bagaço *in natura* nas etapas iniciais do processo. De acordo com os resultados obtidos (Tabela 9) e considerando o fator de conversão de nitrogênio para proteína de 6.25 (Horwitz et al., 1970), tem-se que a amostra de xilana reticulada apresenta cerca de 60% de sua composição em proteínas.

**Tabela 9.** Dados de composição dos elementos carbono, hidrogênio, nitrogênio e oxigênio nas amostras de xilana.

Amostra	Composição elementar (%)			
	Carbono	Hidrogênio	Nitrogênio	Oxigênio
Xilana extraída	41,12	6,19	0,25	52,44
Xilana reticulada	46,01	6,43	9,66	37,90

Os dados de composição elementar complementam os dados obtidos após caracterização da composição química da xilana reticulada (Tabela 10), em que o material apresentou cerca de 15,3% de hemicelulose e um conteúdo significativo de lignina (aproximadamente 18,5%). Os valores obtidos indicam que as etapas de lavagem do material para retirada do tampão devem ter acarretado em perda considerável de xilana reticulada.

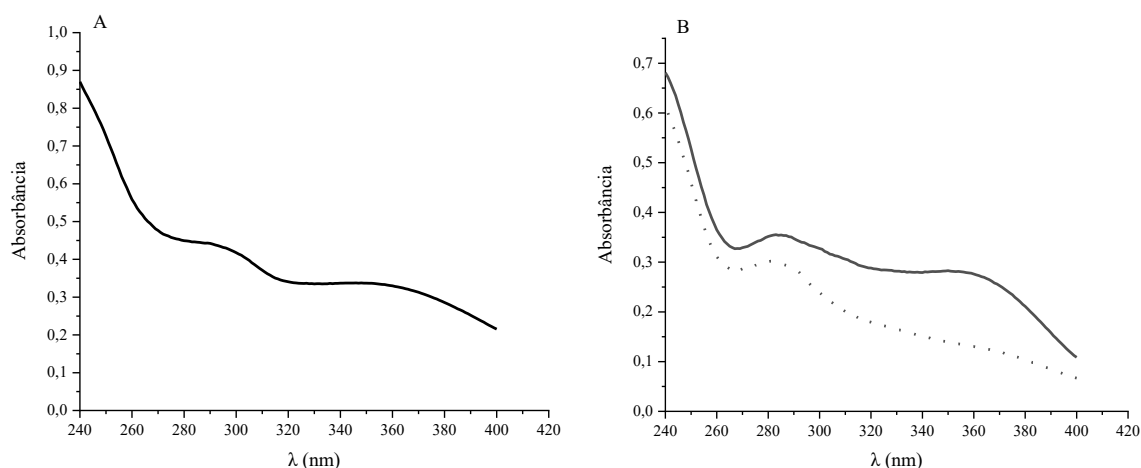
**Tabela 10.** Dados de composição química da amostra de xilana reticulada.

<b>Composição química (%)</b>								
<b>Glucana</b>	<b>Lignina</b>	<b>Hemicelulose</b>			<b>Ácidos hidroxicinâmicos</b>			
		<b>Xilana</b>	<b>Arabinosil</b>	<b>Acetil</b>	<b>Tratamento Brando</b>		<b>Tratamento Severo</b>	
<b>Ferúlico</b>	<b>Cumárico</b>				<b>Ferúlico</b>	<b>Cumárico</b>		
3,67±0,14	18,49±0,88	13,58±0,20	0,97±0,03	0,71±0,01	0,07±0,01	1,79±0,05	0,45±0,02	1,93±0,02



### 6.3.2.2 Caracterizações estruturais

A xilana obtida após reação de reticulação foi caracterizada juntamente à xilana isolada de bagaço pré-tratado e à uma arabinoxilana comercial esterificada a alguns resíduos de ácido ferúlico (BIOSUPPLIES AUSTRALIA). A análise na região de UV (Figura 13) ratifica os dados de composição química obtidos, indicando que há contaminação da xilana extraída, principalmente por lignina, devido à maior intensidade de absorção em 280 nm.

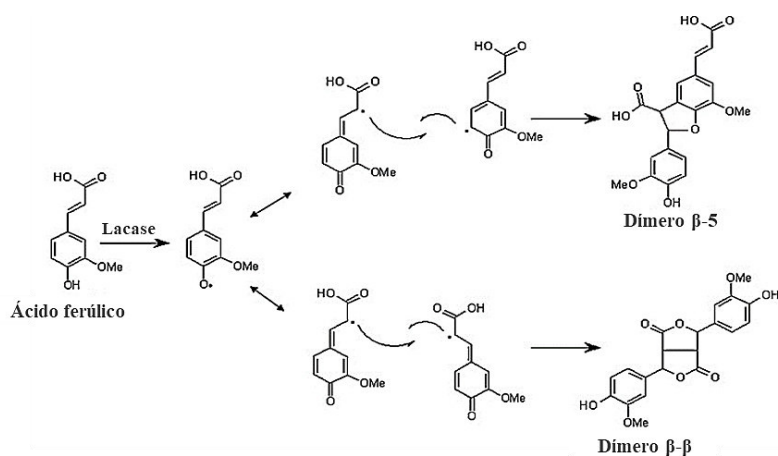


**Figura 13.** Espectro na região do UV. A) Xilana comercial (BIOSUPPLIES AUSTRALIA) na concentração de  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ . B) Xilana extraída enzimaticamente (linha sólida) e xilana reticulada (linha pontilhada); ambas na concentração de  $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ .

Os ácidos hidroxicinâmicos, quando dissolvidos em solventes orgânicos, apresentam uma absorvância máxima em torno de 310-320 nm (Pan et al., 2002). Essa absorção é característica do sistema conjugado envolvendo o anel aromático, a dupla ligação existente entre os carbonos  $\alpha$  e  $\beta$  das moléculas de ácido ferúlico e ácido *p*-cumárico e a carbonila do grupo carboxílico. No caso das amostras preparadas no presente trabalho, os produtos de acoplamento tiveram seu pH ajustado para 12,0 e, nesse valor de pH, os grupos carboxílicos e fenólicos das moléculas se encontram desprotonados, o que pode causar uma leve alteração da absorvância no sentido de maiores comprimentos de onda (efeito batocrômico).

Nos espectros obtidos na Figura 13b, é possível notar uma diminuição considerável da absorção na região entre 340-360 nm para a xilana reticulada em comparação à xilana extraída (atribuída à presença de hidroxicinamatos). Essa diminuição da intensidade de absorção pode ser correlacionada à perda da ligação dupla entre os carbonos  $\alpha$  e  $\beta$ , possivelmente devido à condensação de duas (ou mais) unidades de ácido ferúlico. A Figura

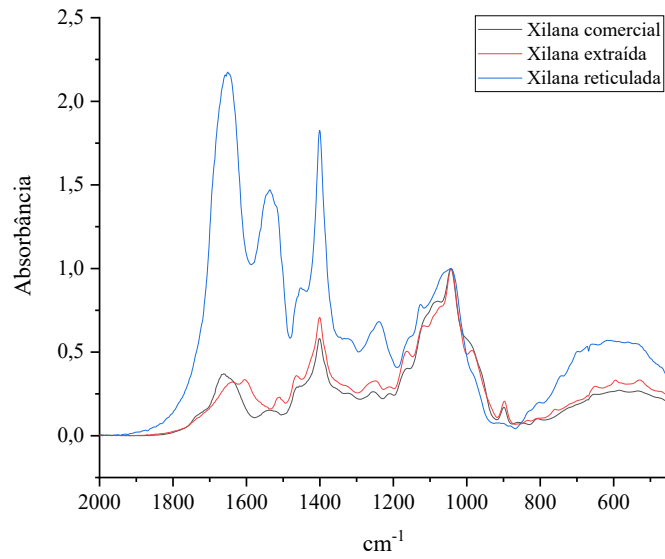
14 ilustra dois possíveis produtos da reação de acoplamento catalisada por uma enzima oxidativa, levando à formação de dímeros de ácido ferúlico (di-FA).



**Figura 14.** Possíveis produtos da condensação de duas unidades de ácido ferúlico, resultando em clivagem da ligação dupla entre os carbonos alfa e beta. Adaptado de Adelakun et al. (2012).

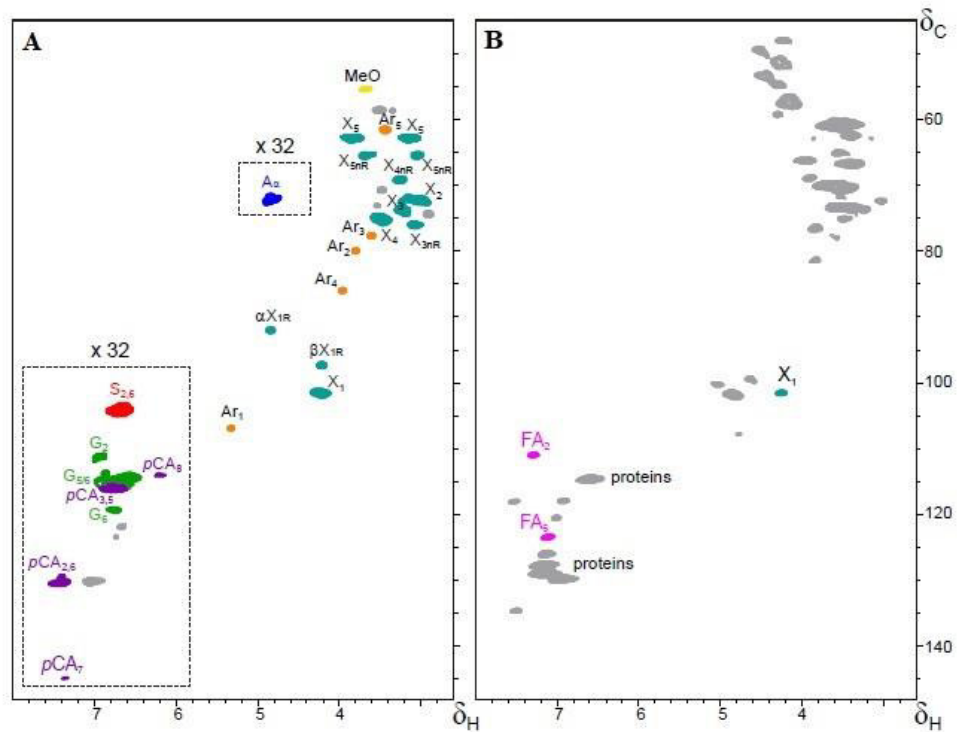
Já a análise de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) demonstrou um perfil de absorção bem semelhante entre a xilana isolada nesse trabalho e a xilana comercial (Figura 15). Os espectros foram normalizados em  $1043\text{ cm}^{-1}$ , região de absorção típica de carboidratos, relacionada a vibrações da ligação C-O do anel glicosídico (Silverstein et al., 2005). A banda entre  $1650$  e  $1700\text{ cm}^{-1}$  indica a ocorrência de ácidos hidroxicinâmicos em ambos materiais, bem como a banda em  $1510\text{ cm}^{-1}$ , atribuída para ligações do tipo C=C de anéis aromáticos, que possivelmente está relacionada à contaminação por lignina (Sporck et al., 2017), mais uma vez em conformidade com os dados de composição química da xilana isolada.

Já para a xilana reticulada, foi possível observar bandas de absorção intensificadas na faixa de  $1700$ - $1500\text{ cm}^{-1}$ , que podem estar relacionadas à absorções atribuídas a proteínas, especialmente entre  $1650$ - $1550\text{ cm}^{-1}$ , região típica de absorção de C=O de amidas e N-H de amins (Silverstein et al., 2005).



**Figura 15.** Espectro de Infravermelho (FT-IR) da arabinoxilana comercial (BIOSUPPLIES AUSTRALIA), da xilana extraída enzimaticamente e da xilana reticulada.

Adicionalmente, foi realizada a análise de Ressonância Magnética Nuclear Bidimensional (RMN-2D) (Figura 16).



**Figura 16.** Espectro RMN-2D-HSQC das amostras de xilana. A) Xilana extraída de bagaço de cana via enzimática. B) Xilana reticulada a partir da reação de xilana extraída na presença de enzimas lacases.

De acordo com os resultados obtidos, é possível notar que a xilana extraída enzimaticamente apresenta além de sinais de xilose, sinais de grupos arabinosil e ácido metilglucurônico, grupos pendentes desse tipo de hemicelulose em gramíneas. Além disso, a partir da obtenção de um maior aumento do espectro (32 vezes), podem ser observados sinais relacionados a subunidades de lignina, o que corrobora com os resultados obtidos na caracterização quanto à composição química e análise de infravermelho, bem como sinais de ácido *p*-cumárico. Os sinais detectados estão em conformidade com os obtidos no trabalho de Sporck et al. (2017), em que também foi realizada a extração de xilanas empregando xilanases a partir de bagaço pré-tratado com sulfito alcalino.

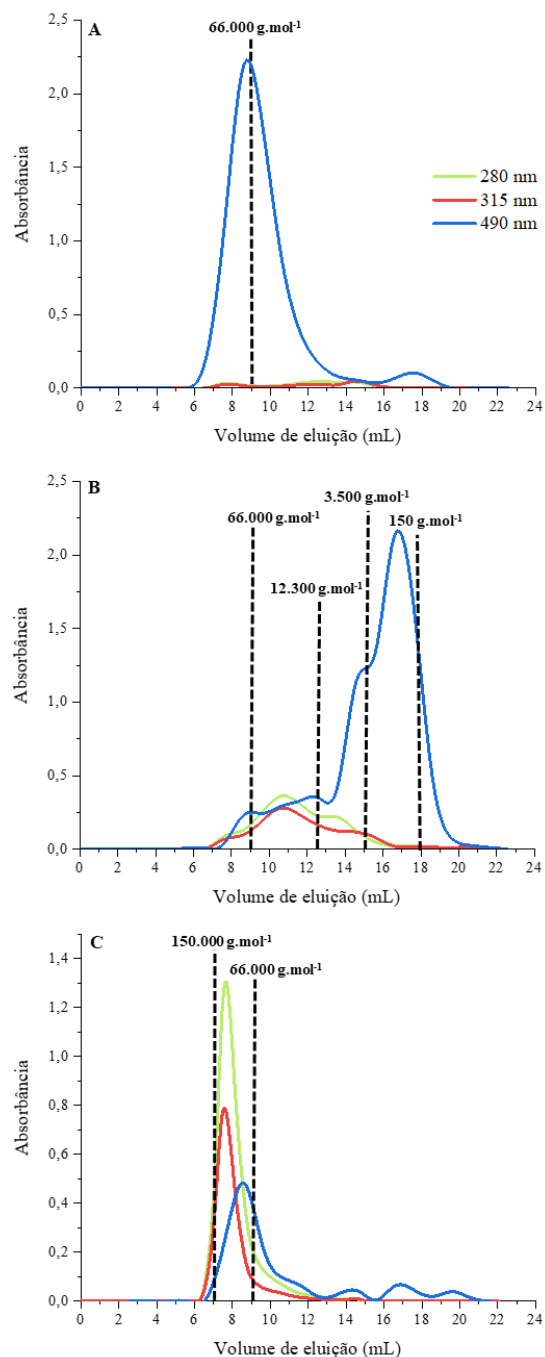
Já para a xilana reticulada, em concordância aos resultados da análise elementar, pode-se notar uma predominância de sinais relacionados a proteínas. Contudo, apenas nesse espectro é possível observar sinais relacionados à presença de ácido ferúlico na amostra, que representa um sítio de acoplamento das arabinoxilanas por meio da ação de enzimas oxidativas, foco principal do trabalho. Assim, esses resultados em conjunto com as demais análises realizadas no decorrer do desenvolvimento do projeto indicam que, possivelmente, ocorreu a reticulação de moléculas de xilanas a partir dos terminais fenólicos dos ácidos hidroxicinâmicos, ocasionando em um aumento de massa molar desse material em comparação à xilana de partida.

### 6.3.3 Determinação da massa molar

A figura 17 mostra o perfil de distribuição de massas molares da xilana comercial e das duas amostras de xilana estudadas no presente trabalho: a) xilana extraída do bagaço de cana por via enzimática e b) a xilana anterior submetida à reação de reticulação com lacase e purificada a partir da precipitação do meio reacional com etanol 63%. É possível observar que a maior parte da xilana isolada a partir do bagaço pré-tratado possui massa molar entre 150 e 3.500 g.mol<sup>-1</sup> e existe uma pequena fração de massa molar entre 12.000 a 60.000 g.mol<sup>-1</sup> que apresenta uma maior contaminação por lignina. A arabinoxilana comercial apresentou um perfil de distribuição mais homogêneo, exibindo uma massa molar ponderal média ( $M_w$ ) em torno de 66.000 g.mol<sup>-1</sup>, condizente com a descrição do produto, na qual a massa molar foi aproximada em 65.000 g.mol<sup>-1</sup>. Esses dados indicam que a calibração da coluna com os marcadores empregados se adequa à estimativa de massa molar das xilanas em estudo.

Já a xilana reticulada apresentou um pico intenso em 280 nm que, em parte, está relacionado à absorção da enzima lacase utilizada na reação de reticulação e é possível que também seja referente à presença de produtos de acoplamento de frações de lignina (ligadas

ou não às xilanas). A análise também foi conduzida em absorvância de 315 nm, que representa absorção típica de ácidos hidroxicinâmicos (conforme discutido no item 6.3.2.2), com o intuito de monitorar frações de xilana que apresentassem prevalência de absorção nesse comprimento de onda em comparação à absorvância em 280 nm. Em relação à absorção a 490 nm, referente aos carboidratos totais, pode-se notar uma fração de massa molar semelhante à arabinoxilana comercial. Esse resultado evidencia que foi possível a obtenção de um material reticulado após a reação de xilanas extraídas de bagaço na presença da enzima lacase.



**Figura 17.** Perfil de eluição na cromatografia de permeação em gel. (A) arabinoxilana comercial (BIOSUPPLIES AUSTRALIA), (B) xilana isolada a partir de bagaço pré-tratado com sulfito alcalino e (C) xilana reticulada.

A tabela 11 reúne os valores dos parâmetros  $M_n$ ,  $M_w$  e  $D$  estimados para a xilana extraída e a xilana reticulada com base nas absorções em 490 nm. Ao analisar os valores obtidos para a xilana extraída. Correlacionando o  $M_w$  da xilana extraída e da reticulada em volumes próximos de eluição (6,6 – 11,6 mL), é possível notar que houve um aumento de 2,2 vezes na massa molar das xilanas após a reação com lacases. Além disso, ao considerar

o volume total de eluição da xilana extraída (7,6 – 18,6 mL) e o volume apenas do menor pico observado no cromatograma (13,6 - 18,6 mL), o aumento é de cerca de 12,3 e 93,4 vezes, respectivamente.

**Tabela 11.** Cálculo de parâmetros a partir da distribuição de massa molar da Figura 17 para a xilana extraída e a xilana reticulada.

Amostra	Volume (mL)	Parâmetros		
		M <sub>n</sub>	M <sub>w</sub>	D
	7,6 – 11,6	32928	56936	1,7
Xilana extraída	13,6 – 18,6	763	1333	1,7
	7,6 – 18,6	931	10078	10,8
Xilana reticulada	6,6 – 10,6	83729	124462	1,5

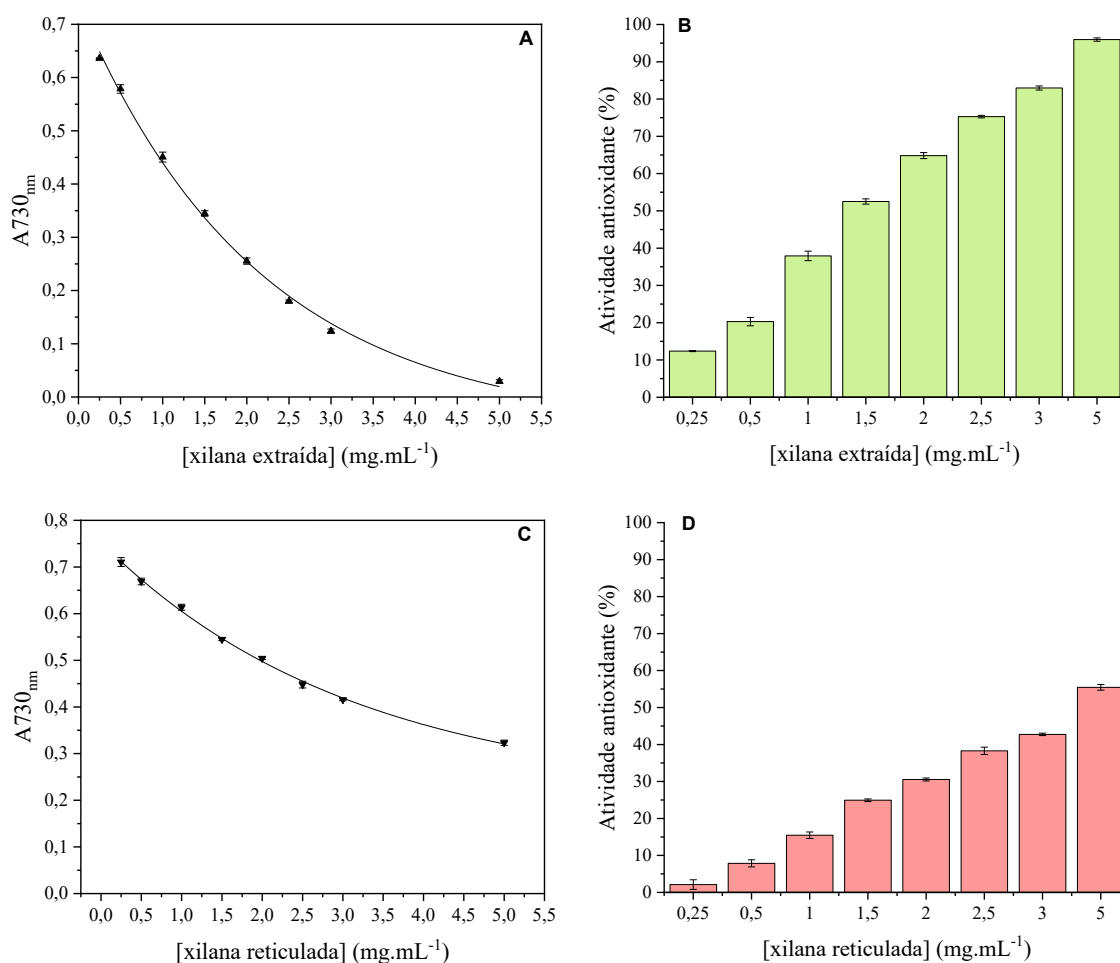
### 6.3.4 Análise da atividade antioxidante das xilanas

Considerando a potencial aplicação de arabinoxilanas isoladas de gramíneas na forma de hidrogeis que apresentam poder antioxidante (Niño-Medina et al., 2010), foi analisada a capacidade antioxidante das xilanas extraídas e das xilanas reticuladas na presença dos radicais ABTS<sup>•+</sup> e DPPH<sup>•</sup>. Compostos com atividade antioxidante possuem a capacidade de doar um elétron ou um átomo de hidrogênio a moléculas radiculares, prevenindo reações de oxidação (Malunga e Beta, 2015). Malunga e Beta (2015) avaliaram a atividade antioxidante de arabinoxilanas extraídas de trigo por diferentes métodos. Segundo os autores, alguns dos fatores que influenciam positivamente a atividade antioxidante são a massa molar e a proporção de ácido ferúlico ligado às moléculas de xilana. Por outro lado, foi observado que o grau de substituição de arabinose nas xilanas apresentou um efeito negativo.

A xilana extraída apresentou capacidade de sequestrar o radical ABTS<sup>•+</sup> consideravelmente superior em comparação à xilana reticulada. Na maior concentração testada (5 mg.mL<sup>-1</sup>), a xilana extraída apresentou cerca de 96% de descoloração, enquanto a xilana reticulada exibiu aproximadamente 55% (Figura 18). Paz-Samaniego et al. (2015) reportaram um comportamento semelhante em que a capacidade antioxidante sofreu uma diminuição de até 71% após acoplamento de arabinoxilanas provenientes de resíduos da destilação de milho (DDG). Apesar das diferenças entre os materiais, em ambos os casos a capacidade antioxidante aumentou juntamente com a concentração de xilana no meio.

Os compostos Trolox e ácido ferúlico foram utilizados para a confecção de curvas padrão na presença do radical ABTS<sup>•+</sup>. Ambos compostos demonstraram alto poder

antioxidante sendo que, para atingir 50% de descoloração, foi necessário 78,22  $\mu\text{M}$  de ácido ferúlico e 172,65  $\mu\text{M}$  de Trolox. A partir das curvas obtidas, foram calculados os valores de atividade antioxidante das xilanas equivalentes ao composto Trolox e ao ácido ferúlico. Para a xilana extraída, foram obtidos os valores de 153,61  $\mu\text{M Trolox.g}^{-1}$  e 49,58  $\mu\text{M ácido ferúlico.g}^{-1}$ , enquanto que para a xilana reticulada foram encontrados os valores de 54,76  $\mu\text{M Trolox.g}^{-1}$  e 20,03  $\mu\text{M ácido ferúlico.g}^{-1}$ .



**Figura 18.** Análise da capacidade antioxidante das xilanas na presença de radical ABTS<sup>•+</sup>. A) Decréscimo da coloração de ABTS<sup>•+</sup> na presença de diferentes concentrações de xilana extraída. B) Porcentagem de atividade antioxidante para as concentrações testadas de xilana extraída. C) Decréscimo da coloração de ABTS<sup>•+</sup> na presença de diferentes concentrações de xilana reticulada. D) Porcentagem de atividade antioxidante para as concentrações testadas de xilana reticulada.

A metodologia empregando o radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil também foi testada, porém não foi possível analisar as xilanas reticuladas por esse método. Tal fato ocorreu pois a solução do radical necessita ser preparada em metanol, o que promoveu a precipitação de parte das amostras, impossibilitando a obtenção de resultados conclusivos.



Além disso, foi observada turbidez nos tubos após reação. Já para a xilana extraída, foram analisadas as concentrações de 2, 3 e 5 mg.mL<sup>-1</sup> (Tabela 12), sendo que concentrações inferiores não acarretaram em diminuição significativa da coloração da solução e concentrações superiores também resultaram na formação de precipitados.

**Tabela 12.** Atividade antioxidante para xilana extraída na presença de radical DPPH.

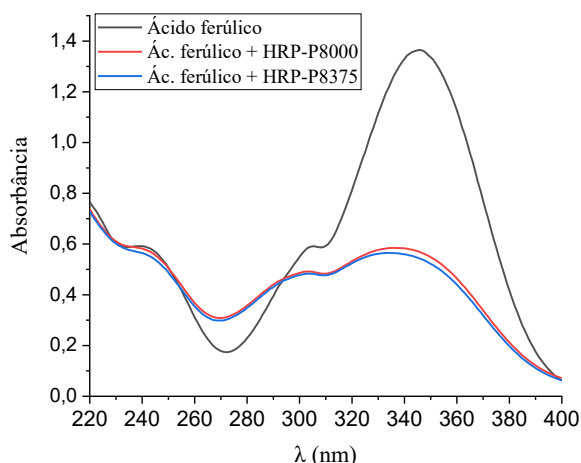
<b>Xilana extraída (mg.mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Atividade antioxidante (%)</b>
2	24,4
3	32,8
5	42,0

Assim, a partir da realização de dois testes que avaliam a capacidade de descoloração de soluções contendo radicais, foi possível verificar que as xilanas extraídas e reticuladas apresentam propriedade antioxidante, sendo essa atividade superior nas xilanas extraídas. Essa característica pode ser considerada atrativa visando uma possível aplicação do material produzido na forma de hidrogéis para fins medicinais, por exemplo (Niño-Medina et al, 2010).

## **ITEM 2 - Exploração do emprego de peroxidases como iniciadores da reticulação de ácidos hidroxicinâmicos e de xilana**

### **6.4 Reticulação de ácidos hidroxicinâmicos na presença de HRP P8000 e P8375**

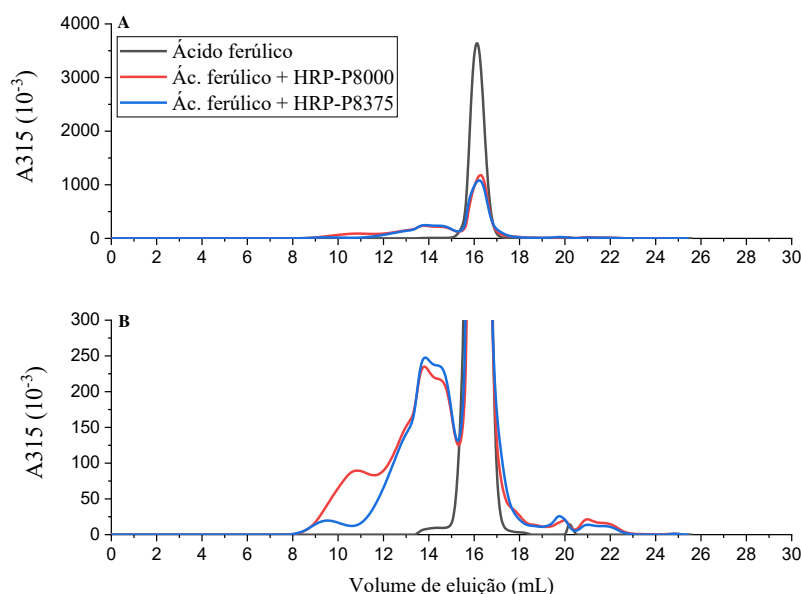
As enzimas peroxidases foram testadas inicialmente quanto a capacidade em promover o acoplamento do substrato ácido ferúlico isoladamente na forma de um ensaio de referência, prévio às tentativas de reticulação do ácido ferúlico ligado à xilana isolada de bagaço de cana. Os reagentes de partida (controle) e as soluções resultantes da reação de reticulação foram submetidos a um *scan* na região do UV (Figura 19) e a análises cromatográficas (Figura 20).



**Figura 19.** Espectro obtido em análise na região do ultravioleta do ácido ferúlico (controle) e dos produtos obtidos das reações de ácido ferúlico na presença de cada enzima separadamente (reticulados).

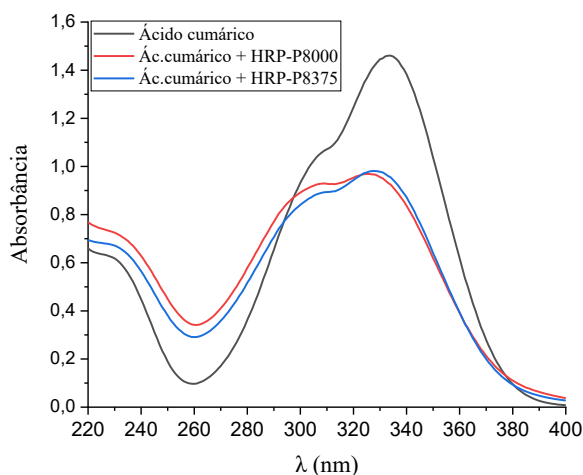
Os dados da figura 19 indicam que as duas HRP avaliadas alteraram a estrutura dos ácidos hidroxicinâmicos, pois a absorção em 340 nm do produto de reação foi consideravelmente menor do que a observada no ácido ferúlico controle. Esta diminuição de absorção em 340 nm está, provavelmente, associada com a abertura da dupla ligação entre os carbonos  $\alpha$  e  $\beta$  da cadeia lateral do ácido ferúlico, conforme discutido anteriormente para as reticulações de xilanas com lacase.

De maneira similar, os resultados obtidos na cromatografia de permeação em gel demonstram uma diminuição da intensidade da absorção em 315 nm nas amostras submetidas a tratamento enzimático (Figura 20a). A Figura 20b é uma representação em maior escala do cromatograma, na qual há evidência da formação de produtos de maior massa molar a partir da condensação de moléculas de ácido ferúlico, conforme indicado pelos picos gerados entre 9 e 15 mL.



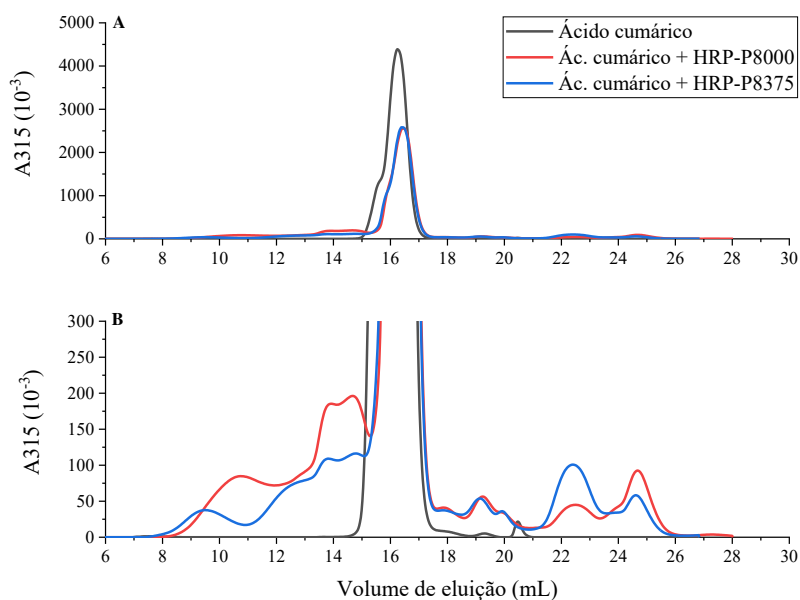
**Figura 20.** Perfil de eluição na cromatografia de permeação em gel de ácido ferúlico (controle) e dos produtos obtidos das duas reações deste composto na presença de cada enzima separadamente (reticulados).

A reação de reticulação também foi conduzida na presença de ácido *p*-cumárico. É possível notar uma menor diferença entre as intensidades do controle (ácido *p*-cumárico) e das soluções resultantes do tratamento com as enzimas peroxidases/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em comparação ao mesmo tratamento realizado com ácido ferúlico (Figura 21). Esse fato pode estar relacionado com a menor reatividade do cumarato frente às reações de reticulação, visto que o radical cumarato formado pela ação de peroxidases possui uma baixa estabilidade e rapidamente abstrai elétrons de outros compostos fenólicos, como o álcool sinapílico nos sistemas biológico vegetais *in natura*, formando radicais mais estáveis nestes álcoois que serão incorporados à lignina (Hatfield e Marita, 2010; Hatfield et al., 2017). Sabe-se que, *in vitro*, o ácido *p*-cumárico é capaz de sofrer acoplamento oxidativo, mas esse fenômeno não ocorre na parede celular de espécies de gramíneas (Ralph, 2010).



**Figura 21.** Espectro obtido em análise na região do ultravioleta do ácido *p*-cumárico (controle) e do produto obtido nas reações desse substrato na presença de cada enzima separadamente (reticulados).

Os resultados apresentados na Figura 22, de forma similar, apontam para uma diminuição na intensidade de absorção a 315 nm, porém de maneira menos significativa do que a observada na Figura 20 (reação de acoplamento de ácido ferúlico). No entanto, apesar dessa menor diferença de intensidade observada, ainda assim há evidência da formação de produtos reticulados de maior massa molar.

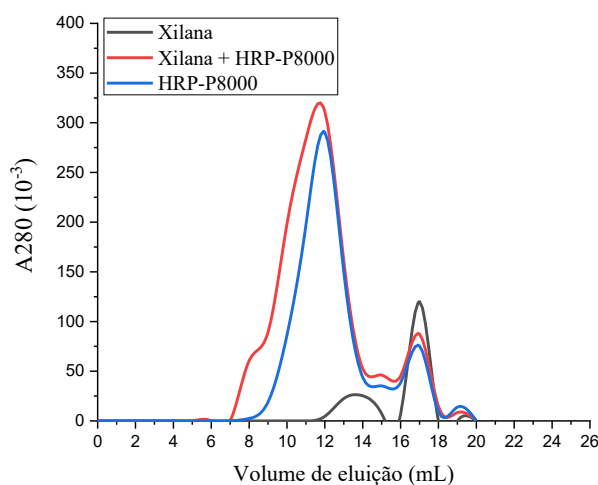


**Figura 22.** Perfil de eluição na cromatografia de permeação em gel de ácido *p*-cumárico (controle) e dos produtos obtidos das duas reações deste composto na presença de cada enzima separadamente (reticulados).

Em síntese, os dois testes envolvendo a reação dos ácidos hidroxicinâmicos demonstraram que as enzimas HRP P8000 e P8375 foram capazes de promover a formação de radical nas moléculas de ácido ferúlico e *p*-cumárico, levando ao acoplamento oxidativo.

### 6.5 Reticulação de xilana com HRP P8000 e P8375

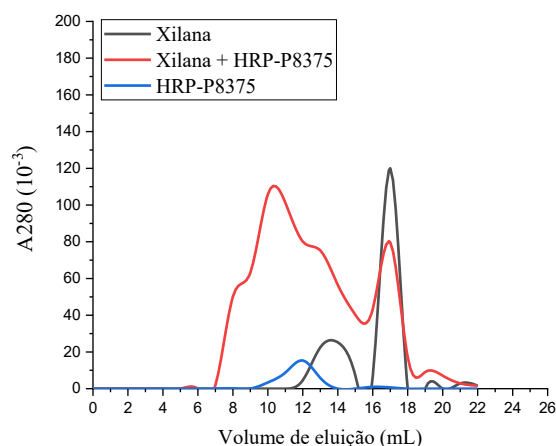
Após os testes com os substratos ácido ferúlico e *p*-cumárico, as enzimas peroxidases foram testadas na presença da xilana isolada de bagaço pré-tratado. Para isso, foi testada a carga inicialmente proposta de 4 UI.mg<sup>-1</sup> de xilana. De acordo com os resultados apresentados na Figura 23, a enzima HRP-P8000 apresentou um sinal intenso em 280 nm. Porém, sendo desprezada a absorbância referente à enzima, é possível notar que existe uma fração possivelmente reticulada em volume entre 8 e 9 mL. Para essa reação, os dados de fenol sulfúrico das frações coletadas não foram conclusivos, pois o extrato comercial liofilizado da enzima possui um alto conteúdo de carboidratos em sua composição. Esse fato também dificultou a realização de testes empregando a HRP-P8000 em cargas superiores a 4 UI.mg<sup>-1</sup>.



**Figura 23.** Perfil de eluição na cromatografia de permeação em gel da reação da xilana de bagaço de cana com a enzima HRP-P8000 empregando carga de 4 UI.mg<sup>-1</sup> de xilana.

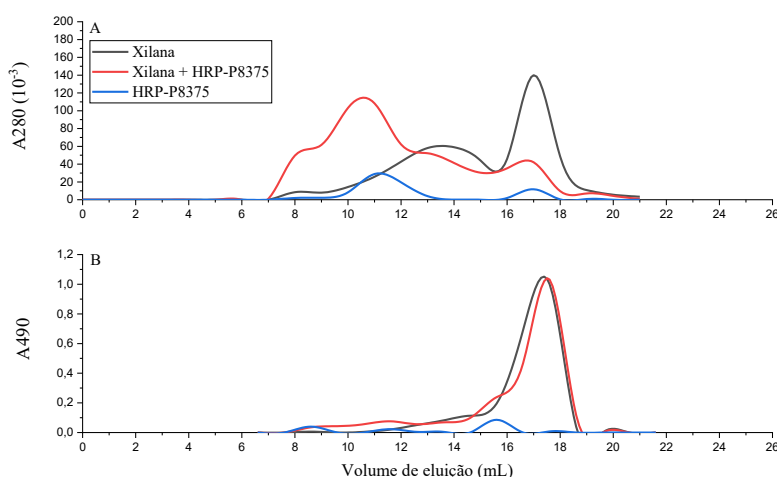
Já a enzima HRP-P8375 foi testada na carga de 4 UI.mg<sup>-1</sup>, mas não acarretou em alteração significativa dos cromatogramas. Dessa forma, foram testadas cargas superiores de HRP-P8375 equivalentes a 12 e 24 UI.mg<sup>-1</sup> de xilana. Diferentemente da enzima P8000, a P8375 é um extrato “mais purificado” e não apresentou um sinal tão intenso em 280 nm, possibilitando uma maior clareza na interpretação dos dados gerados na cromatografia de permeação em gel e na análise de fenol/sulfúrico. Para a carga de 12 UI de HRP-P8375, é

possível notar que há uma fração considerável entre 8-15 mL que pode ser referente a um produto reticulado (Figura 24). No entanto, as análises dos açúcares nas frações pelo método fenol/sulfúrico não foram conclusivas, não sendo possível observar nenhuma diferença no perfil das frações do “reticulado” em relação as frações obtidas da eluição de xilana (controle) (dados não apresentados).



**Figura 24.** Perfil de eluição na cromatografia de permeação em gel da reação da xilana isolada com a enzima HRP-P8375 empregando carga de 12 UI.mg<sup>-1</sup> de xilana.

Já na reação de acoplamento empregando a HRP-P8375 com carga de 24 UI por miligrama de xilana, nota-se uma fração reticulada na distribuição de massa molar (Figura 25a).



**Figura 25.** Reação de reticulação de xilana empregando a enzima HRP-P8375 na carga de 24 UI.mg<sup>-1</sup> de xilana. (A) Perfil de eluição na cromatografia de permeação em gel. (B) Dados da eluição de açúcares a partir da reação de fenol/sulfúrico com as frações coletadas da cromatografia de permeação em gel.

Da mesma forma, os dados de fenol/sulfúrico das frações (Figura 25b) demonstram a existência de um pequeno “ombro”, indicando a presença de carboidratos de maior massa molar se comparado ao controle de xilana original. Neste caso, os cálculos de  $M_w$ ,  $M_n$  e  $D$  feitos a partir deste cromatograma indicaram o  $M_w$  da xilana como  $1404 \text{ g.mol}^{-1}$ , apresentando uma dispersibilidade de 1,7 (Tabela 13). A solução resultante da reação de reticulação apresentou dois conjuntos de polímeros e, então, os parâmetros foram calculados para cada um separadamente. Os dados mostram que uma fração (entre 14,6-18,6 mL) permaneceu com massa molar praticamente inalterada e houve o aparecimento de uma fração (entre 9,6-13,6 mL) com  $M_w$  consideravelmente maior com o valor de  $18975 \text{ g.mol}^{-1}$ .

**Tabela 13.** Cálculo de parâmetros a partir da distribuição de massa molar da Figura 25. A reação de reticulação foi conduzida utilizando-se uma carga de 24 UI de HRP-P8375 por miligrama de xilana.

Amostra	Volume (mL)	Parâmetros		
		$M_n$	$M_w$	$D$
Xilana isolada	12,6 – 18,6	813	1404	1,7
Xilana pós reação	9,6 – 13,6	9726	18975	2,0
de reticulação	14,6 – 18,6	682	922	1,4

## 7 CONCLUSÕES

O presente trabalho avaliou o acoplamento oxidativo de xilanas extraídas de bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino. Inicialmente, foi possível isolar arabinoxilana de bagaço pré-tratado via tratamento enzimático com endoxilanasas, obtendo-se rendimento de extração de 30%. A xilana isolada apresentou ácidos hidroxicinâmicos em sua composição, o que representa possíveis sítios para as reações de acoplamento oxidativo.

Os sólidos residuais após a extração de xilanas de bagaço apresentaram eficiência 26% superior na conversão inicial de glucana em ensaios de sacarificação enzimática em comparação ao bagaço pré-tratado.

Os ensaios de reticulação enzimática da xilana empregando lacases como catalisador mostraram que, dentro das variáveis de reação avaliadas somente a carga enzimática afetou significativamente a fração de elevada massa molar da xilana reticulada (avaliada como área de cromatograma na região de elevada massa molar), enquanto que o tempo de reação entre 4 e 24 h não afetou a formação desta fração de xilana reticulada. Assim, foi definida a carga enzimática de 45 UI.mg<sup>-1</sup> de lacase e um tempo de reação de 2 h para a produção da xilana reticulada em maior escala.

Xilana reticulada preparada com uma carga de lacase de 45 UI.mg<sup>-1</sup> de xilana e um tempo de reação de 2 h gerou um produto de reação que precipitou com a adição de etanol na concentração final de 63%. A caracterização deste material indicou que, além de xilana reticulada, também houve precipitação de parte da enzima adicionada na reação, bem como de lignina. As caracterizações estruturais do material precipitado indicaram que a fração correspondente a carboidratos (xilana reticulada) apresentou um valor de  $M_w$  90 vezes superior à xilana extraída de bagaço. Além disso, as xilanas extraídas e reticuladas apresentaram atividade antioxidante frente aos radicais ABTS e DPPH.

Foram conduzidos testes de acoplamento oxidativo empregando duas peroxidases na presença de ácidos hidroxicinâmicos e de xilana. Foi possível notar que o tratamento com as peroxidases também acarretou na formação de frações de massa molar aumentada nos materiais analisados, mesmo que em pequena extensão. No entanto, de forma geral, a enzima lacase se mostrou mais eficiente para promover o acoplamento oxidativo em comparação às peroxidases de rabanete.

Finalmente, as estratégias utilizadas nesse estudo para atingir o acoplamento oxidativo de arabinoxilanas isoladas de bagaço pré-tratado com sulfito alcalino demonstraram a possibilidade de obtenção de um material de massa molar aumentada. A



xilana reticulada resultante pode ser aplicada industrialmente, principalmente na forma de hidrogeis. Esse material, ao agregar valor à utilização do bagaço de cana, pode contribuir para a viabilização econômica do processo que emprega o pré-tratamento sulfito alcalino num modelo de biorrefinaria.

## REFERÊNCIAS

- Adelakun, O.E., Kudanga, T., Parker, A., Green, I.R., Le Roes-Hill, M., Burton, S.G., 2012. Laccase-catalyzed dimerization of ferulic acid amplifies antioxidant activity. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 74, 29–35. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2011.08.010>
- Aguedo, M., Fougnyes, C., Dermience, M., Richel, A., 2014. Extraction by three processes of arabinoxylans from wheat bran and characterization of the fractions obtained. *Carbohydr. Polym.* 105, 317–324. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.01.096>
- Ayala-Soto, F.E., Serna-Saldívar, S.O., Pérez-Carrillo, E., García-Lara, S., 2014. Relationship between hydroxycinnamic profile with gelation capacity and rheological properties of arabinoxylans extracted from different maize fiber sources. *Food Hydrocoll.* 39, 280–285. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.01.017>
- Bailey, M.J., Biely, P., Poutanen, K., 1992. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *J. Biotechnol.* 23, 257–270. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(92\)90074-J](https://doi.org/10.1016/0168-1656(92)90074-J)
- Bian, J., Peng, F., Peng, X.P., Xu, F., Sun, R.C., Kennedy, J.F., 2012. Isolation of hemicelluloses from sugarcane bagasse at different temperatures: Structure and properties. *Carbohydr. Polym.* 88, 638–645. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.01.010>
- Bian, J., Peng, F., Peng, X.P., Peng, P., Xu, F., Sun, R.C., 2013. Structural features and antioxidant activity of xylooligosaccharides enzymatically produced from sugarcane bagasse. *Bioresour. Technol.* 127, 236–241. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.09.112>
- Bourbonnais, R., Paice, M.G., 1990. Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Lett.* 267, 99–102. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(90\)80298-W](https://doi.org/10.1016/0014-5793(90)80298-W)
- Buanafina, M.M.O., 2009. Feruloylation in grasses: Current and future perspectives. *Mol. Plant* 2, 861–872. <https://doi.org/10.1093/mp/ssp067>
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci. Technol.* 28, 25-30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Carvajal-Millan, E., Guigliarelli, B., Belle, V., Rouau, X., Micard, V., 2005a. Storage stability of laccase induced arabinoxylan gels. *Carbohydr. Polym.* 59, 181–188. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2004.09.008>
- Carvajal-Millan, E., Landillon, V., Morel, M.H., Rouau, X., Doublier, J.L., Micard, V., 2005b. Arabinoxylan gels: Impact of the feruloylation degree on their structure and properties. *Biomacromolecules* 6, 309–317. <https://doi.org/10.1021/bm049629a>
- Carvalho, F., Duarte, L.C., Gírio, F.M., 2008. Hemicellulose biorefineries: A review on biomass pretreatments. *J. Sci. Ind. Res. (India)*. 67, 849-864.
- Chandel, A.K., Silveira, M.H.L., 2017. Advances in Sugarcane Biorefinery: Technologies, Commercialization, Policy Issues and Paradigm Shift for Bioethanol and By-Products, *Advances in Sugarcane Biorefinery: Technologies, Commercialization, Policy Issues and Paradigm Shift for Bioethanol and By-Products*. Chapter 5, 97-133. <https://doi.org/10.1016/C2015-0-02033-0>

- Christopher, L., 2012. Adding Value Prior to Pulping: Bioproducts from Hemicellulose, in: *Global Perspectives on Sustainable Forest Management*. <https://doi.org/10.5772/36849>
- Chundawat, S.P.S., Beckham, G.T., Himmel, M.E., Dale, B.E., 2011. Deconstruction of Lignocellulosic Biomass to Fuels and Chemicals. *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* 2, 121–145. <https://doi.org/10.1146/annurev-chembioeng-061010-114205>
- Collins, T., Gerday, C., Feller, G., 2005. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 3–23. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.06.005>
- Conselho Nacional de Abastecimento (CONAB). Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar. V. 6 - Safra 2019/20 n.1 - Quarto levantamento. 2019. <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana/boletim-da-safra-de-cana-de-acucar>. (Acesso 06 jan. 2020).
- Costa, T.H.F., Vega-Sánchez, M.E., Milagres, A.M.F., Scheller, H. V., Ferraz, A., 2016. Tissue-specific distribution of hemicelluloses in six different sugarcane hybrids as related to cell wall recalcitrance. *Biotechnol. Biofuels.* 9, 99. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0513-2>
- de Jong, E., Jungmeier, G., 2015. Biorefinery Concepts in Comparison to Petrochemical Refineries, in: *Industrial Biorefineries and White Biotechnology*. p. 3–33. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63453-5.00001-X>
- Donohoe, B.S., Decker, S.R., Tucker, M.P., Himmel, M.E., Vinzant, T.B., 2008. Visualizing lignin coalescence and migration through maize cell walls following thermochemical pretreatment. *Biotechnol. Bioeng.* 101, 913–925. <https://doi.org/10.1002/bit.21959>
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal. Chem.* 28, 350–356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- Farhat, W., Venditti, R.A., Hubbe, M., Taha, M., Becquart, F., Ayoub, A., 2017. A Review of Water-Resistant Hemicellulose-Based Materials: Processing and Applications. *ChemSusChem.* 10, 305 – 323. <https://doi.org/10.1002/cssc.201601047>
- Fengel, D., Wegener, G., 1983. *Wood: chemistry, ultrastructure, reactions*. Berlin-New York, Walter de Gruyter.
- Ferraz, A., Baeza, J., Rodriguez, J., Freer, J., 2000. Estimating the chemical composition of biodegraded pine and eucalyptus wood by DRIFT spectroscopy and multivariate analysis. *Bioresour. Technol.* 74, 201–212. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(00\)00024-9](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(00)00024-9)
- Ferraz, A., Costa, T.H.F., Siqueira, G., Milagres, A.M.F., 2014. Mapping of cell wall components in lignified biomass as a tool to understand recalcitrance, in: *Biofuels in Brazil: Fundamental Aspects, Recent Developments, and Future Perspectives*. p. 173–202. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-05020-1\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-319-05020-1_9)
- Figuroa-Espinoza, M.C., Rouau, X., 1998. Oxidative cross-linking of pentosans by a fungal laccase and horseradish peroxidase: Mechanism of linkage between feruloylated arabinoxylans. *Cereal Chem.* 75, 259–265. <https://doi.org/10.1094/cchem.1998.75.2.259>
- Gellerstedt, G., Ek, M., Henriksson, G., 2009. *Wood chemistry and biotechnology*, Berlin: de Gruyter. <https://doi.org/10.1515/9783110213409>
- Ghose, T.K., 1987. Measurement of cellulase activities. *Pure Appl. Chem.* 59, 257–268. <https://doi.org/10.1351/pac198759020257>

- Gírio, F.M., Fonseca, C., Carvalheiro, F., Duarte, L.C., Marques, S., Bogel-Lukasik, R., 2010. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. *Bioresour. Technol.* 101, 4775–4800 <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.088>
- GlobeNewswire, 2017. Global Xylitol Market Overview 2017-2022: Prospects for Low-Calorie Sweeteners Brightened by Escalating Incidences of Obesity and Diabetes. <https://www.globenewswire.com/news-release/2017/01/16/905959/0/en/Global-Xylitol-Market-Overview-2017-2022-Prospects-for-Low-Calorie-Sweeteners-Brightened-by-Escalating-Incidences-of-Obesity-and-Diabetes.html> (acesso 17 dez. 2019)
- Guerra, A. A. 1998. Polimerização de lignina solúvel por polifenoloxidasas e peroxidases de rabanete/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. (Dissertação de mestrado). Lorena. SP. Faculdade de Engenharia Química de Lorena.
- Guerra, A., Ferraz, A., Cotrim, A.R., Da Silva, F.T., 2000. Polymerization of lignin fragments contained in a model effluent by polyphenoloxidasas and horseradish peroxidase/hydrogen peroxide system. *Enzyme Microb. Technol.* 26, 315–323. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(99\)00151-9](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(99)00151-9)
- Hamid, M., Khalil-ur-Rehman, 2009. Potential applications of peroxidases. *Food Chem.* 115, 1177–1186. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.02.035>
- Hatfield, R.D., Marita, J.M., 2010. Enzymatic processes involved in the incorporation of hydroxycinnamates into grass cell walls. *Phytochem. Rev.* 9, 35–45 <https://doi.org/10.1007/s11101-010-9165-1>
- Hatfield, R.D., Rancour, D.M., Marita, J.M., 2017. Grass cell walls: A story of cross-linking. *Front. Plant Sci.* 7, 2056. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.02056>
- Horwitz, W., Chichilo, P., Reynolds, H., 1970. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. *Off. Methods Anal. Assoc. Off. Anal. Chem.*
- Hutterer, C., Schild, G., Kliba, G., Potthast, A., 2016. Lignin profiling in extracted xylans by size-exclusion chromatography. *Carbohydr. Polym.* 151, 821–826. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.06.019>
- Instituto de Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Dinâmica Territorial da Produção Agropecuária, 2017. [https://www.ibge.gov.br/apps/dinamica\\_agropecuaria/](https://www.ibge.gov.br/apps/dinamica_agropecuaria/). (Acesso 06 jan 2020).
- Kamm, B., Kamm, M., 2004. Principles of biorefineries. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64, 137–145. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1537-7>
- Kim, J.S., Lee, Y.Y., Kim, T.H., 2016. A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* 199, 42–48. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.085>
- Kumari, D., Singh, R., 2018. Pretreatment of lignocellulosic wastes for biofuel production: A critical review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 90, 877–889 <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.03.111>
- Kunamneni, A., Plou, F., Ballesteros, A., Alcalde, M., 2008. Laccases and Their Applications: A Patent Review. *Recent Pat. Biotechnol.* 2, 10–24. <https://doi.org/10.2174/187220808783330965>
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>

- Lam, T.B.T., Kadoya, K., Iiyama, K., 2001. Bonding of hydroxycinnamic acids to lignin: Ferulic and p-coumaric acids are predominantly linked at the benzyl position of lignin, not the  $\beta$ -position, in grass cell walls. *Phytochemistry* 57, 987–992. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(01\)00052-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00052-8)
- Lapierre, C., Pollet, B., Ralet, M.C., Saulnier, L., 2001. The phenolic fraction of maize bran: Evidence for lignin-heteroxytan association. *Phytochemistry* 57, 765–772. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(01\)00104-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00104-2)
- Laurito-Friend, D.F., Mendes, F.M., Reinoso, F.M., Ferraz, A., Milagres, A.M.F., 2015. Sugarcane hybrids with original low lignin contents and high field productivity are useful to reach high glucose yields from bagasse. *Biomass and Bioenergy* 75, 65–74. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2015.02.015>
- Lawoko, M., Henriksson, G., Gellerstedt, G., 2005. Structural differences between the lignin-carbohydrate complexes present in wood and in chemical pulps. *Biomacromolecules* 6, 3467–3473. <https://doi.org/10.1021/bm058014q>
- Limayem, A., Ricke, S.C., 2012. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. *Prog. Energy Combust. Sci.* 38, 449–467. <https://doi.org/10.1016/j.peccs.2012.03.002>
- Malunga, L.N., Beta, T., 2015. Antioxidant capacity of water-extractable arabinoxylan from commercial barley, wheat, and wheat fractions. *Cereal Chem.* 92, 29–36. <https://doi.org/10.1094/CCHEM-11-13-0247-R>
- Martínez-López, A.L., Carvajal-Millan, E., Lizardi-Mendoza, J., López-Franco, Y.L., Rascón-Chu, A., Salas-Muñoz, E., Barron, C., Micard, V., 2011. The Peroxidase/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> System as a Free Radical-Generating Agent for Gelling Maize Bran Arabinoxylans: Rheological and Structural Properties. *Molecules* 16, 8410–8418. <https://doi.org/10.3390/molecules16108410>
- Martínez-López, A.L., Carvajal-Millan, E., Marquez-Escalante, J., Campa-Mada, A.C., Rascón-Chu, A., López-Franco, Y.L., Lizardi-Mendoza, J., 2019. Enzymatic cross-linking of ferulated arabinoxylan: effect of laccase or peroxidase catalysis on the gel characteristics. *Food Sci. Biotechnol.* 28, 311–318. <https://doi.org/10.1007/s10068-018-0488-9>
- Masarin, F., Gurpilhares, D.B., Baffa, D.C.F., Barbosa, M.H.P., Carvalho, W., Ferraz, A., Milagres, A.M.F., 2011. Chemical composition and enzymatic digestibility of sugarcane clones selected for varied lignin content. *Biotechnol. Biofuels.* 4, 55. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-4-55>
- Mendes, F.M., Siqueira, G., Carvalho, W., Ferraz, A., Milagres, A.M.F., 2011. Enzymatic hydrolysis of chemithermomechanically pretreated sugarcane bagasse and samples with reduced initial lignin content. *Biotechnol. Prog.* 27, 395–401. <https://doi.org/10.1002/btpr.553>
- Mendes, F.M., Vasconcelos, M.H., Dias, M.O.S., Ferraz, A., Milagres, A.M.F., Santos, J.C., Jesus, C.D.F., Watanabe, M.D.B., Junqueira, T.L., Bonomi, A., 2018. Alkaline sulfite pretreatment for integrated first and second-generation ethanol production: A techno-economic assessment of sugarcane hybrids. *Biomass and Bioenergy* 119, 314–321. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2018.10.005>
- Miller, G.L., 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem.* 31, 426–428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Mood, S. H., Hossein Golfeshan, A., Tabatabaei, M., Salehi Jouzani, G., Najafi, G.H., Gholami, M., Ardjmand, M., 2013. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a

focus on pretreatment. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 27, 77–93  
<https://doi.org/10.1016/j.rser.2013.06.033>

Naidu, D.S., Hlangothi, S.P., John, M.J., 2018. Bio-based products from xylan: A review. *Carbohydr. Polym.* 179, 28–41. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.09.064>

Niño-Medina, G., Carvajal-Millán, E., Rascon-Chu, A., Marquez-Escalante, J.A., Guerrero, V., Salas-Muñoz, E., 2010. Feruloylated arabinoxylans and arabinoxylan gels: Structure, sources and applications. *Phytochem. Rev.* 9, 111–120. <https://doi.org/10.1007/s11101-009-9147-3>

Oinonen, P., Areskog, D., Henriksson, G., 2013. Enzyme catalyzed cross-linking of spruce galactoglucomannan improves its applicability in barrier films. *Carbohydr. Polym.* 95, 690–696. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.03.016>

Oinonen, P., Zhang, L., Lawoko, M., Henriksson, G., 2015. On the formation of lignin polysaccharide networks in Norway spruce. *Phytochemistry* 111, 177–184. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.10.027>

Olempska-Beer, Z. 2004. Laccase from *Myceliophthora thermophila* expressed in *Aspergillus oryzae*. Chemical and Technical Assessment (Cta), FAO.

Oliveira, E.E., Silva, A.E., Júnior, T.N., Gomes, M.C.S., Aguiar, L.M., Marcelino, H.R., Araújo, I.B., Bayer, M.P., Ricardo, N.M.P.S., Oliveira, A.G., Egito, E.S.T., 2010. Xylan from corn cobs, a promising polymer for drug delivery: Production and characterization. *Bioresour. Technol.* 101, 5402–5406. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.137>

Paës, G., Berrin, J.G., Beaugrand, J., 2012. GH11 xylanases: Structure/function/properties relationships and applications. *Biotechnol. Adv.* 30, 564–592. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.10.003>

Pan, G.X., Thomson, C.I., Leary, G.J., 2002. UV-Vis. Spectroscopic characteristics of ferulic acid and related compounds. *J. Wood Chem. Technol.* 22, 137–146. <https://doi.org/10.1081/WCT-120013358>

Paz-Samaniego, R., Méndez-Encinas, M., Fierro-Islas, J.M., Marquez-Escalante, J., Ráscon-Chu, A., Martínez-Lopez, A.L., Carvajal-Millan, E. 2014. Ferulated arabinoxylans recovered from low-value maize by-products: gelation and antioxidant capacity. *Ferulic Acid: Antioxidant Properties, Uses and Potential Health Benefits*, W. Bryce, Ed. p. 151-164.

Prakasham, R.S., Rao, R.S., Hobbs, P.J. 2009. Current trends in biotechnological production of xylitol and future prospects. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*. 3, 8-36.

Ralph, J., 2010. Hydroxycinnamates in lignification. *Phytochem. Rev.* 9, 65-83. <https://doi.org/10.1007/s11101-009-9141-9>

Ralph, J., Quideau, S., Grabber, J.H., Hatfield, R.D., 1994. Identification and synthesis of new ferulic acid dehydrodimers present in grass cell walls. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 3485–3498. <https://doi.org/10.1039/p19940003485>

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 26, 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)

Reinoso, F.A.M., Rencoret, J., Gutiérrez, A., Milagres, A.M.F., Del Río, J.C., Ferraz, A., 2018. Fate of p-hydroxycinnamates and structural characteristics of residual hemicelluloses and lignin

- during alkaline-sulfite chemithermomechanical pretreatment of sugarcane bagasse. *Biotechnol. Biofuels*. 11, 153. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1155-3>
- Rufino, M. do S.M., Alves, R.E., Brito, E.S. de, Morais, S.M. de, Sampaio, C. de G., Pérez-Jiménez, J., Saura-Calixto, F.D., 2007. Comunicado Técnico da Embrapa 127 - Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH. *Comun. Técnico Embrapa 127*, 1–4.
- Rufino, M. do S.M., Alves, R.E., Brito, E.S. de, Morais, S.M. de, Sampaio, C. de G., Pérez-Jiménez, J., Saura-Calixto, F.D., 2007. Comunicado Técnico da Embrapa 128 - Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS. *Comun. Técnico Embrapa 128*, 1–4.
- Sarbu, A., Gonçalves, F., De Pinho, M.N., 2003. Oat spelts xylan molecular mass estimation by size exclusion chromatography. *Carbohydr. Polym.* 53, 297–304. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(03\)00078-X](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(03)00078-X)
- Scheller, H.V., Ulvskov, P., 2010. Hemicelluloses. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61, 263–289. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112315>
- Seidl, P.R., Goulart, A.K., 2016. Pretreatment processes for lignocellulosic biomass conversion to biofuels and bioproducts. *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* 2, 48–53. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2016.09.003>
- Silverstein, R.S., Webster, X.F., Kiemle, J.D. 2005. *Spectrometric Identification of Organic Compounds*. Seventh ed. John Wiley & Sons. ISBN: 0-471-39362-2.
- Sporck, D., Reinoso, F.A.M., Rencoret, J., Gutiérrez, A., Del Rio, J.C., Ferraz, A., Milagres, A.M.F., 2017. Xylan extraction from pretreated sugarcane bagasse using alkaline and enzymatic approaches. *Biotechnol. Biofuels* 10, 296. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0981-z>
- Thuvander, J., Oinonen, P., Jönsson, A.S., 2016. Enzymatic treatment of hemicelluloses and lignin isolated from thermomechanical pulp mill process water. *Chem. Eng. J.* 296, 141–145. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.03.087>
- Valls, C., Pastor, F.I.J., Vidal, T., Roncero, M.B., Díaz, P., Martínez, J., Valenzuela, S. V., 2018. Antioxidant activity of xylooligosaccharides produced from glucuronoxylan by Xyn10A and Xyn30D xylanases and eucalyptus autohydrolysates. *Carbohydr. Polym.* 194, 43–50. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.04.028>
- Vaz, S., 2019. Sugarcane-biorefinery, in: *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, p. 125–136. [https://doi.org/10.1007/10\\_2016\\_70](https://doi.org/10.1007/10_2016_70)
- Veitch, N.C., 2004. Horseradish peroxidase: A modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry* 65, 249–259. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2003.10.022>
- Viswanath, B., Rajesh, B., Janardhan, A., Kumar, A.P., Narasimha, G., 2014. Fungal laccases and their applications in bioremediation. *Enzyme Res.* 1, 21. <https://doi.org/10.1155/2014/163242>
- Welinder, K.G., 1979. Amino Acid Sequence Studies of Horseradish Peroxidase: Amino and Carboxyl Termini, Cyanogen Bromide and Tryptic Fragments, the Complete Sequence, and Some Structural Characteristics of Horseradish Peroxidase. *Eur. J. Biochem.* 96, 483–502. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1979.tb13061.x>

- Zhang, Z., Smith, C., Li, W., 2014. Extraction and modification technology of arabinoxylans from cereal by-products: A critical review. *Food Res. Int.* 65, 423–436. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.05.068>
- Zhu, J.Y., Pan, X.J., Wang, G.S., Gleisner, R., 2008. Sulfite pretreatment (SPORL) for robust enzymatic saccharification of spruce and red pine. *Bioresour. Technol.* 100, 2411–2418. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.10.057>



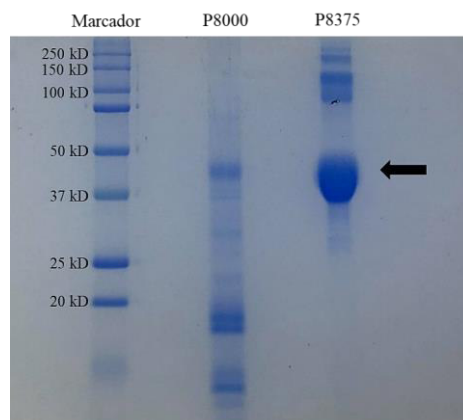
## APÊNDICE A

### 1 Análise das proteínas nos extratos comerciais das HRP's e da lacase

As proteínas presentes nos extratos comerciais foram quantificadas e o perfil proteico analisado por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante. Essa análise foi conduzida para verificar a composição dos extratos, já que inicialmente não foi proposta uma etapa prévia de purificação dos mesmos para os testes de reticulação.

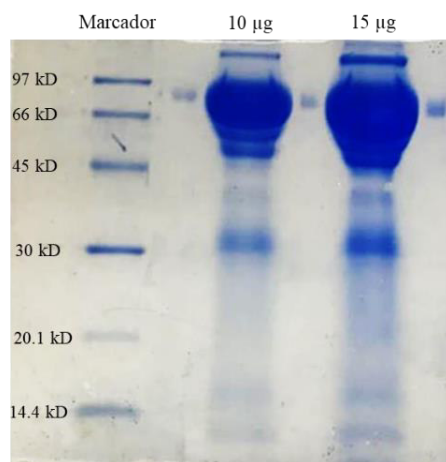
Em relação às peroxidases, a atividade específica de cada preparado enzimático diferiu significativamente, sendo que a HRP-P8000 se mostrou um preparado com maior grau de contaminação por outras proteínas e, conseqüentemente, menor atividade específica ( $2,7 \text{ UI} \cdot \text{mg}^{-1}$  de proteína) quando comparado com a HRP-P8375 ( $30,8 \text{ UI} \cdot \text{mg}^{-1}$  de proteína). A maior pureza do preparado HRP-P8375 foi confirmada pela análise de eletroforese (Figura 26) conduzida com cargas idênticas de proteínas totais ( $15 \mu\text{g}$  de proteína em cada canaleta do gel).

A massa molar estimada das peroxidases de *Azorella rusticana* é de aproximadamente 44 kDa, sendo que cerca de 33,9 kDa correspondem à cadeia proteica e 9,4 kDa correspondem a carboidratos (Welinder, 1979). De acordo com o resultados obtidos, nota-se que o extrato da HRP-P8000 contém uma banda localizada entre os padrões de 37 e 50 kDa no gel, possivelmente referente à peroxidase e outras bandas com diferentes intensidades e menores massas molares. Já o extrato comercial da HRP-P8375 apresentou uma banda mais intensa em torno de 40 kDa, indicando que há maior abundância da enzima peroxidase nesse extrato em comparação ao da HRP-P8000. Além disso, podem ser notadas proteínas de maior massa molar no extrato da P8375.



**Figura 26.** Gel de poliacrilamida desnaturante contendo as bandas referentes ao marcador de massa molecular e às amostras de cada HRP. Foram aplicados 15  $\mu\text{g}$  de proteína em cada canaleta.

Já a análise do extrato comercial de lacase revelou uma concentração de proteínas de cerca de  $4,4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , o que resultou em uma atividade específica de  $159,1 \text{ UI}\cdot\text{mg}^{-1}$ . Foram aplicados 10 e 15  $\mu\text{g}$  de proteínas no gel (Figura 27). A massa molar da lacase de *M. Thermophila* expressa em *A. Oryzae* é estimada em 85 kDa, sendo considerada uma glicoproteína composta por três ligações dissulfeto internas, além de quatro átomos de cobre (Cu) no seu sítio ativo (Olempska-Beer, 2004).



**Figura 27.** Gel de poliacrilamida desnaturante contendo as bandas referentes ao marcador de massa molecular e a amostra de lacase.

Os resultados indicam que, apesar da presença de outras bandas de proteínas, a lacase é a proteína predominante no extrato comercial utilizado nesse trabalho.

## 2 Purificação parcial da lacase comercial

Conforme observado no cromatograma obtido após reação de acoplamento das xilanas na presença de lacase (Figura 8), o extrato comercial dessa enzima possui compostos que interferem na absorção tanto em 280 nm, quanto na leitura a 490 nm após reação de fenol/sulfúrico. Isso pode ocorrer devido à coloração escura do extrato de lacase, além da sua composição (Tabela 1). Dessa forma, foi realizada uma etapa de purificação parcial do extrato, utilizando-se uma membrana de ultrafiltração de 30 kDa. Considerando que a lacase apresenta uma massa molar de aproximadamente 85 kDa, o objetivo dessa etapa foi promover a retirada de compostos interferentes menores, possibilitando a retenção da enzima na membrana de ultrafiltração.

Foram realizadas duas lavagens e os parâmetros de atividade enzimática e absorbância a 280 e 490 nm foram avaliados no decorrer do processo (Tabela 14). De acordo com os resultados obtidos, é possível observar que a 1ª etapa de ultrafiltração foi responsável por remoção de mais de 50% de compostos interferentes no teste de fenol/sulfúrico, sendo que o mesmo ocorreu após a realização da 2ª etapa. Essa remoção foi acompanhada pela redução na absorção a 280 nm, indicando a retirada de outros compostos que poderiam atuar como interferentes. Já a atividade enzimática, expressa em unidades totais, praticamente não sofreu alteração após as duas etapas de ultrafiltração conduzidas.

**Tabela 14.** Parâmetros avaliados no decorrer das etapas de ultrafiltração do extrato comercial de lacases.

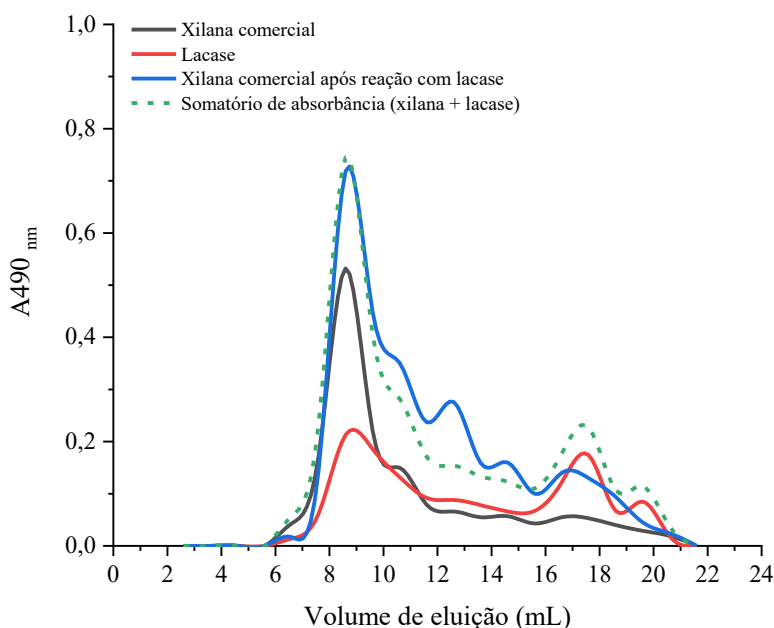
Amostra	1ª etapa				2ª etapa			
	Volume (mL)	A280* mL	A490* mL	Ativ. enzimática (U)	Volume (mL)	A280* mL	A490* mL	Ativ. enzimática (U)
EB	150	111,3	131,1	20115	150	37,5	45,2	12370
Retido	40	50,8	56,2	17720	30	24,7	27,4	11210
Filtrado	108	56,8	77,4	86,9	118	21,2	29,7	134,5

Além disso, para verificar o efeito dessa etapa no perfil de proteínas do extrato foi realizada uma análise de eletroforese em gel de poliacrilamida, que indicou que a ultrafiltração não promoveu alterações significativas na composição proteica do extrato.

## APÊNDICE B

### 1 Avaliação da reticulação de uma xilana comercial na presença de lacase

Na mesma condição de reação de reticulação estabelecida pelos ensaios de planejamento experimental (45 UI lacase por miligrama de xilana e 2 h de reação) também foi conduzida uma reação empregando uma xilana comercial esterificada com resíduos de ácido ferúlico (BIOSUPPLIES AUSTRALIA). Neste caso, não foi empregada a etapa de pré-purificação da xilana reticulada por precipitação com etanol. Desta forma, os cromatogramas indicados se referem a todo o meio reacional, após um tempo definido de reação (2 h). Os resultados de distribuição de massa molar do produto de reação está indicado na figura 28.



**Figura 28.** Perfil de distribuição de massa molar da reação de acoplamento de xilana comercial na presença de lacase.

De acordo com os resultados obtidos, é possível verificar que praticamente toda a absorbância exibida pela amostra de xilana após reação com a enzima (linha azul) é referente à soma das absorbâncias individuais desses componentes (representado pela linha verde pontilhada). Entretanto, há uma região entre 12-13 mL de eluição que pode corresponder a uma pequena fração reticulada, considerando a diminuição de absorção observada entre 17-18 mL.

Portanto, o teste empregando a xilana comercial não acarretou em aumento significativo de massa molar após a reação com lacases, o que pode ser decorrente da existência de poucos sítios de reticulação no material.

## APÊNDICE C

### 1 Cálculo de atividade enzimática das enzimas peroxidases de rabanete

#### 1.1 HRP-P8000

Ensaio:

- 0,1 mL de enzima diluída em tampão fosfato de potássio 100 mM pH 6,5;
- 0,7 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM pH 6,5;
- 0,1 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200 mM;
- 0,1 mL de siringaldazina 1 mM em EtOH absoluto.

A atividade enzimática foi avaliada nas diluições de 100, 200 e 250x. A oxidação do substrato foi acompanhada por 10 min a 525 nm ( $\epsilon = 65.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Para as diluições testadas, o resultado foi linear até 2 min de reação. Dessa forma, os dados foram linearizados e os coeficientes angulares obtidos foram utilizados para cálculo de atividade enzimática por meio da equação (1):

$$\Delta\text{Abs} = \epsilon \cdot b \cdot c \quad (\text{Equação 1})$$

Onde,  $\Delta\text{Abs}$  corresponde ao coeficiente angular obtido a partir do ensaio com cada diluição;

$\epsilon$  = absortividade molar ( $=65.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ );

$b$  = caminho óptico da cubeta ( $=1 \text{ cm}$ );

$c$  = concentração de produto formado na reação.

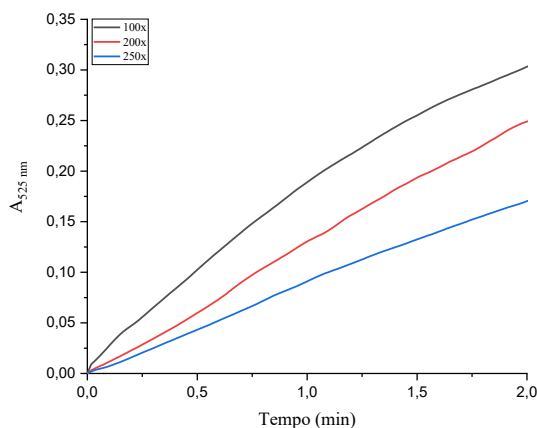
#### Equações obtidas:

$$100x: y = 0,1494x + 0,0267$$

$$200x: y = 0,1278x - 0,0009$$

$$250x: y = 0,0873x + 0,0006$$

**Atividade enzimática: 3,2 UI.mL<sup>-1</sup>**



## 1.2 HRP-P8375

Ensaio:

- 0,1 mL de enzima diluída em tampão fosfato de potássio 100 mM pH 6,5;
- 0,7 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM pH 6,5;
- 0,1 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200 mM;
- 0,1 mL de siringaldazina 1 mM em EtOH absoluto.

A atividade enzimática foi avaliada nas diluições 2.000, 2.500 e 5.000x. A oxidação do substrato foi acompanhada por 10 min a 525 nm ( $\epsilon = 65.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Para as diluições testadas, o resultado foi linear até 6 min de reação. Dessa forma, os dados foram linearizados e os coeficientes angulares obtidos foram utilizados para cálculo de atividade enzimática por meio da equação (1):

$$\Delta\text{Abs} = \epsilon \cdot b \cdot c \quad (\text{Equação 1})$$

Onde,  $\Delta\text{Abs}$  corresponde ao coeficiente angular obtido a partir do ensaio com cada diluição;

$\epsilon$  = absorvidade molar ( $=65.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ );

$b$  = caminho óptico da cubeta ( $=1 \text{ cm}$ );

$c$  = concentração de produto formado na reação.

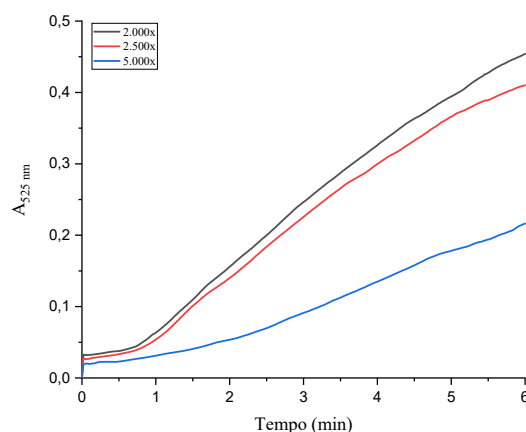
### Equações obtidas:

$$2.000x: y = 0,0788x - 0,0308$$

$$2.500x: y = 0,0726x - 0,0007$$

$$5.000x: y = 0,0355x - 0,006$$

**Atividade enzimática: 28,0 UI.mL<sup>-1</sup>**



## 2 Cálculo de atividade enzimática da enzima lacase no extrato bruto (NOVOZYMES)

Ensaio:

- 0,5 mL de enzima diluída em tampão fosfato de potássio 100 mM pH 6,5;
- 0,3 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM pH 6,5;
- 0,1 mL de H<sub>2</sub>O;
- 0,1 mL de ABTS 0,5 mM.

A atividade enzimática foi avaliada nas diluições 50.000, 80.000 e 100.000x. A oxidação do substrato foi acompanhada por 10 min a 420 nm ( $\epsilon = 36.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Para as diluições testadas, o resultado foi linear até 5 min de reação. Dessa forma, os dados foram linearizados e os coeficientes angulares obtidos foram utilizados para cálculo de atividade enzimática por meio da equação (1):

$$\Delta\text{Abs} = \epsilon \cdot b \cdot c \quad (\text{Equação 1})$$

Onde,  $\Delta\text{Abs}$  corresponde ao coeficiente angular obtido a partir do ensaio com cada diluição;

$\epsilon$  = absorvidade molar ( $=36.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ );

$b$  = caminho óptico da cubeta ( $=1 \text{ cm}$ );

$c$  = concentração de produto formado na reação.

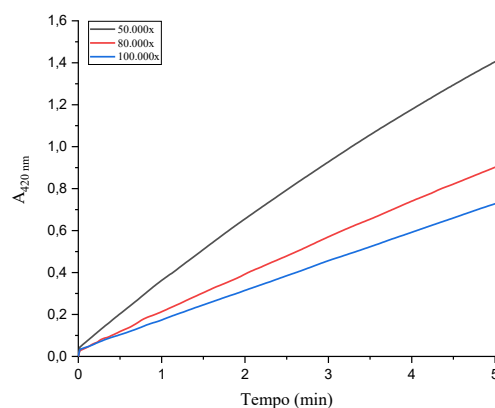
### Equações obtidas:

$$50.000x: y = 0,2738x + 0,0881$$

$$80.000x: y = 0,1756x + 0,0368$$

$$100.000x: y = 0,1393x + 0,035$$

**Atividade enzimática: 771,9 UI.mL<sup>-1</sup>**





### 3 Cálculo de atividade enzimática da enzima lacase após a etapa de ultrafiltração

Ensaio:

- 0,5 mL de enzima diluída em tampão fosfato de potássio 100 mM pH 6,5;
- 0,3 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM pH 6,5;
- 0,1 mL de H<sub>2</sub>O;
- 0,1 mL de ABTS 0,5 mM.

A atividade enzimática foi avaliada na diluição de 50.000x. A oxidação do substrato foi acompanhada por 10 min a 420 nm ( $\epsilon = 36.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Para a diluição testada, o resultado foi linear até 8 min de reação. Dessa forma, os dados foram linearizados e os coeficientes angulares obtidos foram utilizados para cálculo de atividade enzimática por meio da equação (1):

$$\Delta \text{Abs} = \epsilon \cdot b \cdot c \quad (\text{Equação 1})$$

Onde,  $\Delta \text{Abs}$  corresponde ao coeficiente angular obtido a partir do ensaio com cada diluição;

$\epsilon$  = absorvidade molar ( $=36.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ );

$b$  = caminho óptico da cubeta ( $=1 \text{ cm}$ );

$c$  = concentração de produto formado na reação.

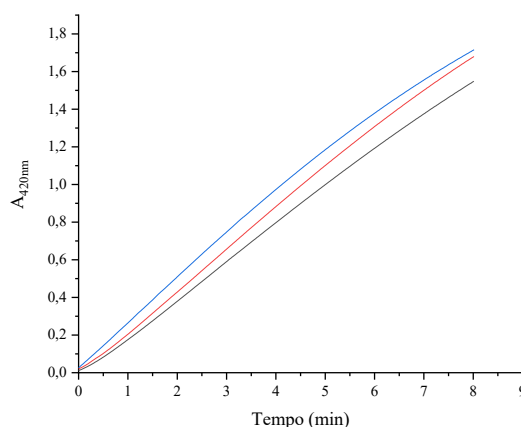
#### Equações obtidas:

Repetição 1:  $y = 0,2145x + 0,0779$

Repetição 2:  $y = 0,1988x - 0,01$

Repetição 3:  $y = 0,2147x + 0,0068$

**Atividade enzimática: 581,3 UI.mL<sup>-1</sup>**



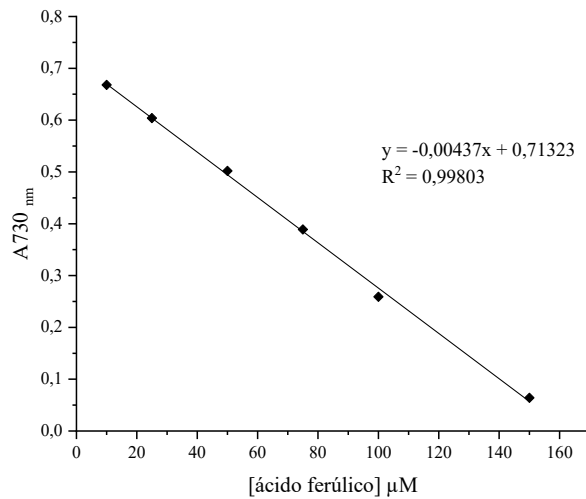
## APÊNDICE D

### 1 Curvas-padrão para análise de atividade antioxidante na presença de radical ABTS<sup>•+</sup>

#### 1.1 Ácido Ferúlico

Ensaio:

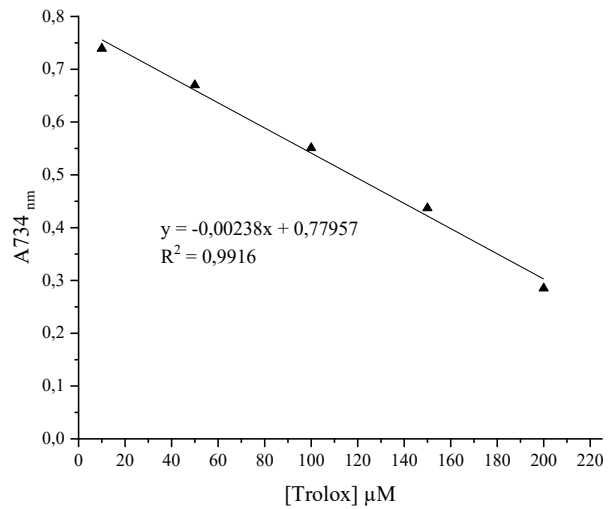
- 0,1 mL de soluções em diferentes concentrações de ácido ferúlico
- 0,9 mL de solução de radical ABTS<sup>•+</sup>



#### 1.2 Trolox

Ensaio:

- 0,1 mL de soluções em diferentes concentrações de Trolox
- 0,9 mL de solução de radical ABTS<sup>•+</sup>



## 2 Curva-padrão para análise de atividade antioxidante na presença de radical DPPH

Ensaio:

DPPH 0,06 mM (mL)	Álcool metílico (mL)	[DPPH] $\mu$ M
0	1	0
0,170	0,830	10
0,330	0,670	20
0,500	0,500	30
0,670	0,330	40
0,830	0,170	50
1	0	60

- Leitura em 515 nm.

