

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE OLIGOXILOSÍDEOS EM REATORES BATELADA  
E DE MICROCANAIS**

**LEONARDO BRUNELLI DO NASCIMENTO**

MARINGÁ, 30 DE AGOSTO DE 2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE OLIGOXILOSÍDEOS EM REATORES BATELADA  
E DE MICROCANAIS**

**LEONARDO BRUNELLI DO NASCIMENTO**

Tese de Doutorado submetida à Universidade Estadual de Maringá, como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Doutor em Engenharia Química, área de Biocatálise e Processos Bioquímicos.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Faria de Moraes

Coorientador: Prof. Dr. Marcos de Souza

MARINGÁ, 30 DE AGOSTO DE 2019

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR, Brasil)

N244p

Nascimento, Leonardo Brunelli do

Produção enzimática de oligoxilósídeos em reatores batelada e de microcanais / Leonardo Brunelli do Nascimento. -- Maringá, PR, 2023.  
94 f.: il. color., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Faria de Moraes.

Coorientador: Prof. Dr. Marcos de Sousa.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, 2023.

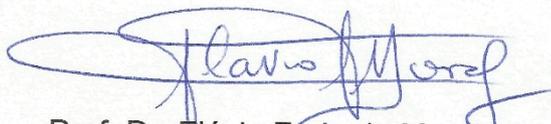
1. Microcanais. 2. Xilanase. 3. Polidimetilsiloxano (PDMS). 4. Transglicosilação. I. Moraes, Flávio Faria de, orient. II. de Sousa, Marcos, coorient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Tecnologia. Departamento de Engenharia Química. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. IV. Título.

CDD 23.ed. 660.284

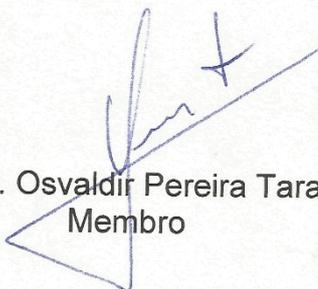
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Esta é a versão final da Tese de Doutorado apresentada por Leonardo Brunelli do Nascimento perante a Comissão Julgadora do Curso de Doutorado em Engenharia Química em 30 de agosto de 2019.

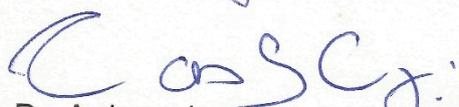
COMISSÃO JULGADORA



Prof. Dr. Flávio Faria de Moraes  
Presidente/Orientador



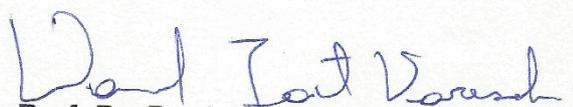
Prof. Dr. Osvaldir Pereira Taranto  
Membro



Prof. Dr. Arilson dos Santos Vianna Júnior  
Membro



Prof. Dr. Pedro Augusto Arroyo  
Membro



Prof. Dr. Daniel Tait Vareschini  
Membro

## **AGRADECIMENTOS**

À minha família, que sempre me incentivou nos estudos e deu todo o apoio necessário para a realização deste doutorado.

À minha esposa Deise, que sempre esteve presente e deu energia para seguir em frente.

Ao meu orientador Flávio Faria de Moraes pela orientação, paciência e grande contribuição para a conclusão deste trabalho.

## RESUMO

Nascimento, Leonardo Brunelli do. **Produção enzimática de oligoxilosídeos em reatores batelada e de microcanais.** Tese de Doutorado em Engenharia Química – Programa de Pós Graduação em Engenharia Química – Universidade Estadual de Maringá. Maringá – PR. 30 de agosto de 2019.

Palavras-chave: xilo-oligossacarídeo, transglicosilação, xilanase, microcanal, PDMS.

Há cada vez mais interesse na realização de processos químicos mais verdes, uma preocupação que não existia ou era ignorada até pouco tempo atrás. Atualmente há o descarte de uma grande quantidade de biomassa lignocelulósica, que contém inúmeras substâncias de alto valor agregado, como o polissacarídeo xilana, que é fonte de xilo-oligossacarídeos e seus derivados de interesse. A utilização de enzima como catalisador em microrreator pode auxiliar na redução do tempo de reação e da necessidade de recursos onerosos nos experimentos, trazendo novas informações sobre o processo. Assim, estabeleceu-se como objetivo deste trabalho a produção de oligoxilosídeos em três tipos de reatores: reator batelada; microcanal com escoamento laminar (MLFR); e de microcanal com leito de recheio (MPBR), utilizando três diferentes xilanases. Nas mesmas condições operacionais, o MLFR foi superior ao reator batelada em todos os casos. A melhor condição para a produção de oligoxilosídeos ocorreu com a Xilanase 1 a 50 °C, que apresentou um aumento de 54% na produção de oligoxilosídeos em relação ao reator batelada, além de um menor percentual de produtos monoméricos, que são indesejados neste estudo. Para o MPBR, operando com a mesma concentração enzimática, também foi observada uma vantagem em relação ao reator batelada, com a melhor condição para a mesma xilanase, mas agora a 40 °C. Houve considerável aumento na produção de oligossacarídeos (300%), além de uma maior seletividade apenas para produtos com duas e quatro unidades de xilose na cadeia. Adicionalmente, o tempo de reação foi reduzido de 72 h na reação em batelada para 6 h no MPBR. Portanto, pode ser muito vantajosa a realização de transglicosilação da xilana em MLFR, e também em um MPBR, a fim de se buscar condições mais favoráveis de reação.

## ABSTRACT

Nascimento, Leonardo Brunelli do. Enzymatic oligoxylosides production in batch and microchannel reactors. Doctoral Thesis in Chemical Engineering – Graduation Program in Chemical Engineering – State University of Maringá – PR. August, 30, 2019.

Keywords: xylooligosaccharides, transglycosylation, xylanase, microchannel, PDMS.

There is an increasing interest in greener chemical processes, a concern that did not exist or was ignored until recently. A large amount of lignocellulosic biomass is now being disposed of, which may be the source of numerous high added-value substances, such as the xylan polysaccharide, which is the source of xylooligosaccharides and their derivatives of interest. The use of enzyme as a catalyst in a microreactor can help to reduce reaction time and the need for costly resources in the experiments, bringing new information about the process. Thus, the objective of this work was the production of oligoxylosides in three reactors types: batch, microchannel laminar flow (MLFR), and microchannel packed bed (MPBR), using three different xylanases. Under the same operating conditions, the MLFR is superior to the batch reactor in all cases. The best condition for the production of oligoxylosides occurred with Xylanase 1 at 50 ° C, which showed a 54% increase over the second-best xylanase, additionally providing a lower percentage of monomeric products, which are undesired in this study. For the MPBR operating at the same enzyme concentration, an advantage over the batch reactor was also observed, with the best condition seen with Xylanase 1, but at 40 ° C. In this case, there was a considerable increase in the production of oligosaccharides (300%) and higher selectivity for products with two and four xylose units in the chain. Additionally, the reaction time was reduced from 72 h in the batch reaction to 6 h in the MPBR. Therefore, xylan transglycosylation in a MLFR and also in a MPBR can be very advantageous, for finding more favorable reaction conditions.

## LISTA DE SÍMBOLOS

ABS	–	polímero acrilonitrila-butadieno-estireno
CAD	–	<i>computer aided design</i> (desenho assistido por computador)
$D_t$	–	diâmetro do tubo [cm]
G	–	energia livre de Gibbs [J]
$\Delta G^\circ$	–	variação da energia livre de Gibbs padrão [ $\text{J mol}^{-1}$ ]
MLFR	–	<i>microchannel laminar flow reactor</i> , ou seja, reator de microcanal com escoamento laminar
MPBR	–	<i>microchannel packed bed reactor</i> , ou seja, reator de microcanal com leito de recheio
PDMS	–	polidimetilsiloxano
Re	–	$\text{Re} = \rho v D_t / \mu$ ; número de Reynolds
$v$	–	vazão do fluido [ $\text{cm s}^{-1}$ ]
$V_{\text{total}}$	–	volume interno total do reator MPBR [ $\text{cm}^3$ ]
$V_{\text{vazios}}$	–	volume de vazios do reator MPBR preenchido com sílica [ $\text{cm}^3$ ]
X1	–	xilosídeo com uma unidade de xilose
X2	–	xilosídeo com duas unidades de xilose
X3	–	xilosídeo com três unidades de xilose
X4	–	xilosídeo com quatro unidades de xilose
XOS	–	xilo-oligossacarídeos
Letras Gregas		
$\mu$	–	viscosidade do fluido [ $\text{g cm}^{-1} \text{s}^{-1}$ ]
$\rho$	–	densidade do fluido [ $\text{g cm}^{-3}$ ]

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema estrutural da biomassa lignocelulósica. ....	17
Figura 2 – Estrutura da celulose. ....	18
Figura 3 – Componentes da lignina. ....	18
Figura 4 – Estrutura hipotética de uma xilana, com possíveis substituintes e as respectivas enzimas para a quebra da ligação. ....	20
Figura 5 – Reação de hidrólise da xilana produzindo xilo-oligossacarídeos. ....	21
Figura 6 – Exemplos de produtos da transglicosilação de xilanas. ....	22
Figura 7 – Níveis estruturais nas proteínas. ....	24
Figura 8 – Variação da energia livre de Gibbs ao longo da coordenada de reação. ....	25
Figura 9 – Energia de ativação da reação sem e com catalisador. ....	26
Figura 10 – Exemplos de silanos para imobilização enzimática. ....	30
Figura 11 – Hidrólise inicial do APTES em meio aquoso. ....	30
Figura 12 – Possibilidades de ancoramento do APTES ao suporte. ....	31
Figura 13 – Processo de imobilização enzimática: (a) ancoramento do APTES hidrolisado ao suporte; (b) ligação com glutaraldeído; (c) ligação com enzima; (d) redução da base de Schiff. ....	32
Figura 14 – Estágios de desenvolvimento de um processo convencional e um processo com microrreatores. ....	36
Figura 15 – Estrutura do PDMS. ....	39
Figura 16 – Busca atual pelo caminho da química verde. ....	41
Figura 17 – União dos tópicos que formam este trabalho. ....	43

Figura 18 – Reação de transglicosilação entre xilana e glicolato de butila. ....	48
Figura 19 – Estrutura do ABS. ....	49
Figura 20 – Obtenção do fio fino de ABS. ....	50
Figura 21 – Modelo tridimensional de uma espiral de ABS com 1 m de comprimento. ....	51
Figura 20 – Molde de acrílico para a moldagem do reator de PDMS: (a) modelo CAD; (b) peça real. ....	51
Figura 21 – Reator de PDMS pronto para uso. ....	52
Figura 24 – Bomba de seringa construída para este trabalho. ....	55
Figura 23 – Modelo tridimensional para o suporte do canal de silicone. ....	58
Figura 24 – Atividade de hidrólise, em $U mL^{-1}$ , em função da temperatura, em $^{\circ}C$ , para as xilanases estudadas. ....	60
Figura 25 – Atividade de hidrólise de xilana, em $U mg^{-1}$ , em função da temperatura, em $^{\circ}C$ , para as xilanases estudadas. ....	61
Figura 26 – Atividade de hidrólise em função do pH, em $U mL^{-1}$ , para as xilanases estudadas .....	62
Figura 27 – Perfil de concentração dos produtos para a reação em batelada com a Xilanase 1: (a) $40^{\circ}C$ , (b) $50^{\circ}C$ , (c) $60^{\circ}C$ . ....	66
Figura 28 – Perfil de concentração dos produtos para a reação em batelada com a Xilanase 2: (a) $40^{\circ}C$ , (b) $50^{\circ}C$ , (c) $60^{\circ}C$ . ....	68
Figura 29 – Perfil de concentração dos produtos para a reação em batelada com a Xilanase 3: (a) $40^{\circ}C$ , (b) $50^{\circ}C$ , (c) $60^{\circ}C$ . ....	70
Figura 30 – Concentrações finais dos produtos para as reações batelada, após 72 h de reação. .....	71

Figura 31 – Perfil de concentração dos produtos para a reação em MLFR com a Xilanase 1: (a) 40 °C, (b) 50 °C, (c) 60 °C. ....	73
Figura 32 – Perfil de concentração dos produtos para a reação em MLFR com a Xilanase 2: (a) 40 °C, (b) 50 °C, (c) 60 °C. ....	75
Figura 33 – Perfil de concentração dos produtos para a reação em MLFR com a Xilanase 3: (a) 40 °C, (b) 50 °C, (c) 60 °C. ....	76
Figura 34 – Concentrações finais dos produtos para as reações em MLFR, após 72 h de reação. ....	77
Figura 35 – Perfil de concentração dos produtos para a reação em MPBR com a Xilanase 1: (a) 40 °C, (b) 50 °C, (c) 60 °C. ....	80
Figura 36 – Perfil de concentração dos produtos para a reação em MPBR com a Xilanase 2: (a) 40 °C, (b) 50 °C, (c) 60 °C. ....	82
Figura 37 – Perfil de concentração dos produtos para a reação em MPBR com a Xilanase 3: (a) 40 °C, (b) 50 °C, (c) 60 °C. ....	83
Figura 38 – Concentrações finais dos produtos para as reações em leito fixo, após 6 h de reação. ....	84
Figura 39 – Curva padrão para a solução de Bradford. ....	96
Figura 40 – Curva padrão para o método DNS. ....	96

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Exemplos de produtores e propriedades de algumas xilanases. ....	33
Tabela 2 – Volume de solução enzimática equivalente a 100 U em função da temperatura. ..	48
Tabela 2 – Volume de solução enzimática equivalente à 33,3 U em função da temperatura. .	53
Tabela 3 – Relação entre tempo de residência e comprimento do microcanal para o reator de PDMS. ....	53
Tabela 4 – Tempos de retenção para a análise cromatográfica dos produtos da reação. ....	59
Tabela 5 – Concentração de proteína para as xilanases estudadas. ....	60
Tabela 6 – Temperatura ótima para as xilanases estudadas. ....	61
Tabela 7 – pH ótimo para as xilanases estudadas. ....	62
Tabela 8 – Resultados da imobilização das xilanases em sílica. ....	63
Tabela 9 – Resultados de outros estudos com imobilização de xilanases. ....	64
Tabela 10 – Maior concentração de cada xilosídeo nas reações batelada. ....	72
Tabela 11 – Maior concentração de cada xilosídeo nas reações em escoamento laminar. ....	77
Tabela 12 – Aumento na produção para o reator MLFR, comparado com o reator batelada. .	78
Tabela 13 – Maior concentração de cada xilosídeo nas reações em leito fixo. ....	84
Tabela 14 – Aumento na produção para o reator MPBR, comparado com o reator batelada. .	85

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
1.1	OBJETIVOS DO TRABALHO .....	15
1.2	ESTRUTURA DA TESE .....	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1	BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA .....	17
2.1.1	Xilana .....	19
2.1.2	Xilo-oligossacarídeos e derivados .....	20
2.2	ENZIMAS .....	23
2.2.1	Imobilização enzimática .....	26
2.2.2	Xilanases.....	33
2.3	REATORES E MODOS DE CONDUÇÃO DA REAÇÃO .....	35
2.3.1	Reator batelada .....	35
2.3.2	Reator de leito microcanal com leito de recheio .....	35
2.3.3	Microrreatores e reator de escoamento laminar .....	36
2.3.4	PDMS .....	39
2.4	QUÍMICA VERDE .....	40
2.5	CONSIDERAÇÕES.....	42
3	MATERIAIS E MÉTODOS .....	44
3.1	MATERIAIS .....	44

3.2	MÉTODOS.....	45
3.2.1	Medida do teor de proteína das xilanases.....	45
3.2.2	Medida da atividade enzimática das xilanases .....	46
3.2.3	Reação em reator batelada.....	47
3.2.4	Produção do reator de microcanal de PDMS.....	49
3.2.5	Reação no MLFR (reator de microcanal com escoamento laminar).....	52
3.2.6	Construção da bomba de seringa.....	54
3.2.7	Imobilização das xilanases em sílica.....	55
3.2.8	Preparo do microcanal com leito de recheio .....	57
3.2.9	Reação no MPBR (reator de microcanal com leito de recheio).....	58
3.2.10	Análise dos produtos da reação .....	58
4	RESULTADOS .....	60
4.1	TEOR DE PROTEÍNA DAS XILANASES .....	60
4.2	ATIVIDADE DAS XILANASES.....	60
4.3	IMOBILIZAÇÃO DAS XILANASES .....	62
4.4	REAÇÃO EM REATOR BATELADA .....	64
4.4.1	Xilanase 1 .....	64
4.4.2	Xilanase 2 .....	67
4.4.3	Xilanase 3 .....	69
4.5	REAÇÃO EM MLFR (REATOR DE MICROCANAL COM ESCOAMETO LAMINAR).....	72

4.5.1	Xilanase 1 .....	72
4.5.2	Xilanase 2 .....	74
4.5.3	Xilanase 3 .....	74
4.6	REAÇÃO EM MPBR (REATOR DE MICROCANAL COM LEITO DE RECHEIO) .....	78
4.6.1	Xilanase 1 .....	79
4.6.2	Xilanase 2 .....	81
4.6.3	Xilanase 3 .....	81
5	CONCLUSÕES.....	86
5.1	RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....	87
6	REFERÊNCIAS .....	88

## 1 INTRODUÇÃO

Atualmente há a preocupação com a reutilização e transformação de diversos materiais que antes eram simplesmente descartados. Matéria vegetal também se enquadra neste caso, pois uma quantidade muito grande de biomassa é gerada anualmente e muitas vezes é descartada ou queimada apenas com o propósito de se livrar de um “lixo”.

Essa matéria vegetal, denominada biomassa lignocelulósica, é a biomassa mais abundante no planeta, composta por lignina, celulose e hemicelulose, polissacarídeos que formam a estrutura fibrosa dos vegetais. Existem inúmeros estudos para o reaproveitamento e conversão de cada um dos constituintes citados, utilizando os resíduos diretamente para outros propósitos, ou então extraíndo substâncias de alto valor agregado, que serão então utilizadas para fins mais nobres e específicos. Um destes componentes, a hemicelulose, compõe até 35% da massa vegetal e pode ser formado por diversos açúcares, dependendo da espécie da planta e sua idade, mas a cadeia principal é formada pelo polissacarídeo xilana, um polissacarídeo formado majoritariamente por unidades de xilose.

Existem diversos estudos tratando da utilização da xilana diretamente com polissacarídeo, ou hidrolisando sua cadeia e estudando os xilo-oligossacarídeos produzidos. Uma vertente interessante destes estudos é a produção de xilo-oligossacarídeos modificados por meio de reações de transglicosilação utilizando diferentes espécies de substituintes, o que introduz novos grupos funcionais a estes compostos orgânicos e amplia as possibilidades reacionais em produtos subsequentes, o que aumenta ainda mais o valor destas espécies.

Estas reações podem ser simplesmente catalisadas por espécies inorgânicas ácidas ou básicas, mas estes métodos acarretam reações não seletivas, o que pode gerar espécies indesejadas na reação e efluentes, que podem ser incompatíveis com algumas utilizações. Para contornar estas desvantagens pode-se utilizar enzimas que atuam em xilanas, denominadas xilanases, que, assim como todas as enzimas, agem de forma seletiva e geram produtos de reação mais puros, facilitando processos posteriores de separação, e permitem a utilização de condições operacionais mais brandas.

As reações enzimáticas podem então ser realizadas em meio homogêneo, com a xilanase solubilizada no meio reacional, ou heterogêneo, com a xilanase imobilizada em partículas sólidas, sendo que diferentes modos de conduzir a reação podem ter resultados igualmente

diferentes e interessantes, de modo que estes efeitos merecem ser estudados. Por exemplo, reatores de leito fixo permitem uma concentração maior de catalisador por volume, aumentando a velocidade de reação.

A maioria dos estudos com xilanas ainda é realizado em modo batelada, que possuem algumas vantagens em escala laboratorial e no desenvolvimento de processos. Reatores contínuos também podem ser utilizados para estas pesquisas, como os reatores de microcanais, que apresentam diversas vantagens nesta fase da pesquisa, como um grande controle das condições reacionais e tempo de residência, além de uma economia de reagentes, sendo que este modo de reação ainda é pouco explorado na conversão de xilanas.

Unindo todos os pontos anteriores, existe a proposta da Química Verde, que visa a criação de processos químicos que sejam mais seguros e eficientes, que não utilizem solventes e outras substâncias nocivas, e que minimizem a geração de efluentes. Assim, a união de reaproveitamento e valorização de matéria orgânica, a utilização de enzimas e reatores menores, torna a pesquisa mais responsável e focada nos problemas atuais. Esta estratégia foi tomada como a base da proposta deste estudo.

## 1.1 OBJETIVOS DO TRABALHO

Desta forma, este trabalho tem como objetivo a produção de derivados de xilo-oligossacarídeos utilizando xilanases como catalisador, em diferentes modelos de reator (batelada, microcanal com escoamento laminar e microcanal com leito de recheio), a fim de se comparar seus desempenhos na reação de transglicosilação.

Os objetivos específicos são:

- caracterização das xilanases utilizadas em relação à atividade, utilizando um reator batelada convencional;
- imobilização das xilanases em sílica;
- produção do reator de microcanais cilíndricos em polímero, para testar as reações de produção de derivados de xilo-oligossacarídeos em escoamento laminar;
- produção do reator contendo xilanase imobilizada nos microcanais cilíndricos, para testar as reações de produção de derivados de xilo-oligossacarídeos em leito fixo;
- avaliar o potencial de utilização de reator de microcanais na reação de transglicosilação.

## 1.2 ESTRUTURA DA TESE

Este trabalho foi dividido em seis capítulos, sendo que este primeiro apresenta uma visão geral do problema, os objetivos a serem alcançados, a metodologia a ser utilizada e a contribuição científica.

O segundo capítulo traz a revisão bibliográfica, no qual são apresentadas informações mais aprofundadas sobre os itens envolvidos neste trabalho, como a matéria lignocelulósica, xilanases e reatores.

No terceiro capítulo são apresentados os materiais utilizados neste trabalho, assim como reagentes e metodologias para a realização dos experimentos.

O quarto capítulo traz os resultados obtidos e sua análise, comparando-se com aqueles disponíveis na literatura, para avaliar se os dados obtidos neste trabalho se coadunam com os publicados.

No quinto capítulo encontram-se as conclusões do trabalho e as recomendações para estudos futuros.

Finalmente, o sexto capítulo apresenta as principais referências utilizadas durante a elaboração deste trabalho.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

A lignocelulose é a biomassa mais abundante no planeta, tanto que resíduos desta biomassa muitas vezes ainda são considerados como lixo, sendo queimados ou levados para áreas de descarte. Porém, com o tratamento adequado podem gerar produtos de alto valor agregado (CHAPLA; PANDIT; SHAH, 2012; NAIDU; HLANGOTHI; JOHN, 2018). Seus principais constituintes são celulose, hemicelulose e lignina, exemplificado na Figura 1, junto com pequenas quantidades de pectina e outras proteínas, unidas por ligações covalentes e de hidrogênio. A proporção de cada um destes componentes na biomassa depende da espécie da planta, sua idade e seu estágio de desenvolvimento (BURLACU; CORNEA; ISRAEL-ROMING, 2016).

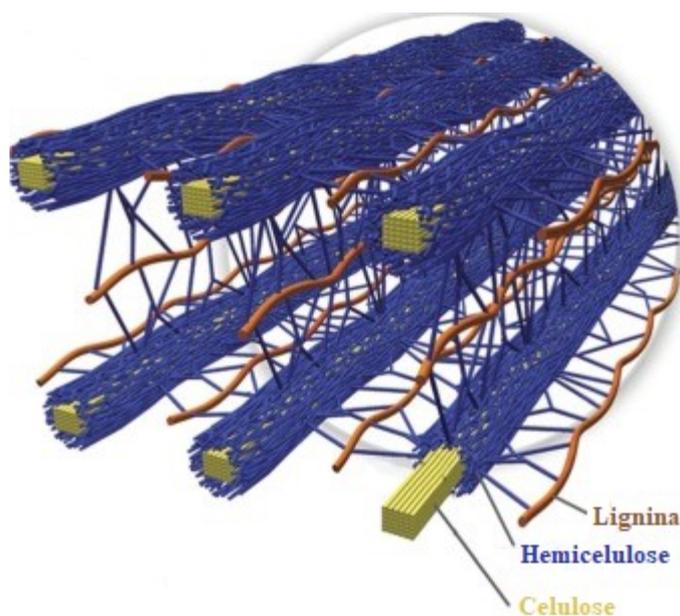


Figura 1 – Esquema estrutural da biomassa lignocelulósica.

Fonte: adaptado de Naidu, Hlangothi e John (2018).

A celulose é um polímero de glicose que sustenta a estrutura celular de células vegetais, compondo entre 30 e 50% da massa vegetal, de fórmula molecular  $(C_6H_{10}O_5)_n$ , sendo  $n$  um grau de polimerização entre oitocentas e quinze mil unidades de glicose, unidas por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4, como pode ser visto na Figura 2 (NAIDU; HLANGOTHI; JOHN, 2018). Apesar de apresentar regiões amorfas, ligações de hidrogênio fazem com que as cadeias de celulose sejam paralelas umas às outras, resultando em áreas cristalinas, o que a torna mais

resistente e demanda um maior processamento para sua separação (JEDVERT; HEINZE, 2017; SUHAS et al., 2016).

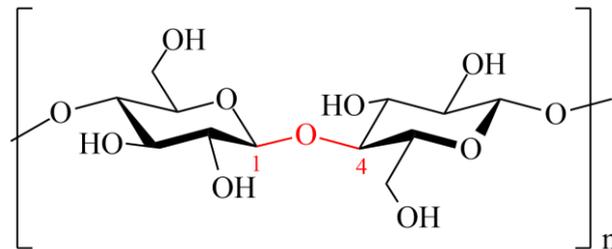


Figura 2 – Estrutura da celulose.

Fonte: elaborada pelo autor.

A lignina é um polímero complexo que corresponde a um percentual entre 10 e 20% da massa vegetal, que é formado por compostos aromáticos denominados lignóis, sendo os três principais constituintes os álcoois cumarílico, coniferílico e sinapílico (Figura 3). Estes fornecem uma característica hidrofóbica à lignina, fornecendo uma integridade estrutural e rigidez à estrutura vegetal, além de prevenir ataques de patógenos (NAIDU; HLANGOTHI; JOHN, 2018). Cadeias de lignina possuem massa molar entre mil e vinte mil  $\text{g mol}^{-1}$ , e quanto maior o número de ligações entre lignina e celulose, mais resistente à hidrólise este conjunto será (DOS SANTOS et al., 2019; RAVINDRAN; JAISWAL, 2016; UPTON; KASKO, 2016).

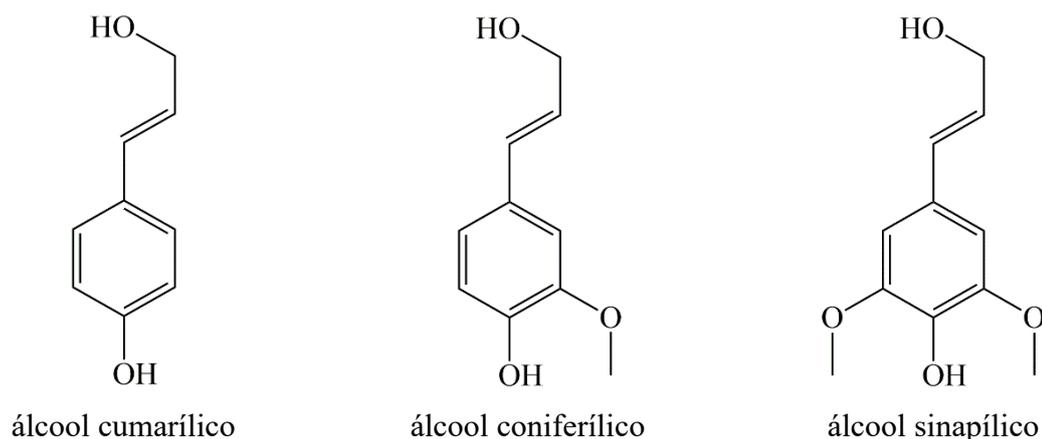


Figura 3 – Componentes da lignina.

Fonte: elaborada pelo autor.

Finalmente, hemiceluloses são polissacarídeos heterogêneos que compõem entre 15 e 35% da massa vegetal possuindo uma grande variedade estrutural e química, com seu esqueleto

com diversas cadeias laterais com oligo e monossacarídeos, assim como ácidos orgânicos, cuja composição exata irá variar entre as espécies de vegetais. Os blocos mais comuns para a hemicelulose são pentoses (xilose e arabinose), hexoses (glicose, galactose e manose), ácidos acético, glucurônico e fenólicos (assim como os constituintes da lignina) (BURLACU; CORNEA; ISRAEL-ROMING, 2016). Dependendo do monossacarídeo predominante na cadeia polimérica principal, hemiceluloses podem ser classificadas em xilanas, mananas, glucanas e xiloglucanas (polímero de xilose e glicose), sendo as xilanas as mais abundantes entre estas (BROEKER et al., 2018).

### 2.1.1 Xilana

O polissacarídeo xilana, objeto de estudo deste trabalho, é formado majoritariamente por unidades de xilose com ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas, apresentando uma massa molar média entre 5.600 e 40.000 g mol<sup>-1</sup>, com um grau de polimerização entre 70 e 220 unidades (BURLACU; CORNEA; ISRAEL-ROMING, 2016; MOTTA; ANDRADE; SANTANA, 2013). As xilanas podem ser divididas em homo ou heteroxilanas, baseado nos grupos funcionais existentes nas cadeias laterais, que são responsáveis pelas diferentes propriedades entre as xilanas, como solubilidade, reatividade e conformação física (BURLACU; CORNEA; ISRAEL-ROMING, 2016). Como esperado, heteroxilanas possuem vários grupos funcionais extras, como ácido 4-O-metilglucurônico, ácido glucurônico, arabinose, xilose, galactose e glicose (ZHOU et al., 2017). Na Figura 4 está representada uma estrutura hipotética de xilana, com alguns possíveis substituintes e as enzimas necessárias para a quebra de cada ligação, como será visto em itens posteriores.

Por estar ligada por ligações éter, éster e de hidrogênio com lignina e celulose, a extração da hemicelulose de material vegetal é complexa, mas realizada por diversos métodos, como extração alcalina, com solvente orgânico, água quente, explosão a vapor e ultrassom (LIN et al., 2017; NAIDU; HLANGOTHI; JOHN, 2018). Após a extração, pode ser desejável ainda a purificação dos componentes, que pode ser obtida por fracionamento alcalino, filtração e cromatografia (LIU et al., 2018).

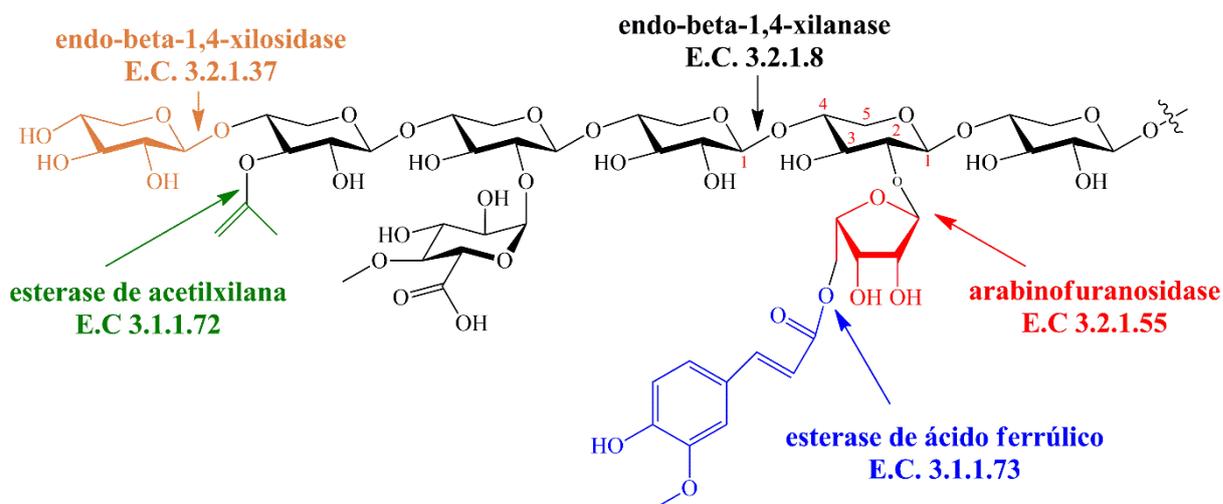


Figura 4 – Estrutura hipotética de uma xilana, com possíveis substituintes e as respectivas enzimas para a quebra da ligação.

Fonte: adaptado de Wu et al. (2016).

A xilana, como polímero, pode ser utilizada para a produção de biocompostos, já que apresenta propriedades biocompatíveis e não tóxicas. Por exemplo, a xilana pode estar presente em bioplásticos, com características hidrofílicas atuando como barreira para óleos e gorduras, e permitindo a passagem de água e aromas. Outro produto de interesse é o hidrogel, formado por cadeias poliméricas com ligações cruzadas, sendo insolúveis e com a habilidade de absorver grandes quantidades de água, assim como tecidos vivos, sendo útil para aplicações biomédicas. Outra área de interesse para as xilanas são produtos químicos, com sua hidrólise liberando diversos compostos, que podem ser convertidos em outras substâncias de interesse, como etanol de segunda geração, ácido lático, furfural e xilitol (NAIDU; HLANGOTHI; JOHN, 2018; PETZOLD-WELCKE et al., 2014).

### 2.1.2 Xilo-oligossacarídeos e derivados

Outro campo de muito interesse é composto pelos xilo-oligossacarídeos (XOS), que são produtos da hidrólise parcial de xilanas, podendo ser utilizados na indústria química (blocos de construção para moléculas mais complexas), farmacêutica, cosmética (propriedades antioxidantes) e alimentícia (reduz o nível de colesterol e melhora o funcionamento do sistema digestório) (ÁLVAREZ et al., 2017). As tecnologias utilizadas para a obtenção de XOS são os métodos químicos e enzimáticos de catálise. Por exemplo, a hidrólise ácida é um método industrial tradicional para hidrólise, mas a utilização de ácidos fortes gera uma grande

quantidade de efluentes, assim como a conversão de xilose em furfural, indesejável neste caso, pois diminui o rendimento de XOS. (LIN et al., 2017).

A hidrólise enzimática da xilana já foi abordada por diversos autores, gerando produtos como xilose, xilobiose, xilotriose entre outros com cadeias maiores, que possuem diversas aplicações específicas (CHANG et al., 2017). Um esquema simplificado desta reação é apresentado na Figura 5, onde  $m$  é o grau de polimerização da xilana, e  $n+1$  o número de unidades de xilose em uma molécula de produto.

Uma reação alternativa, que abre muitas possibilidades, é a transglicosilação na qual o resíduo de sacarídeo liberado (doador) é transferido para outra molécula com um grupo hidroxila (receptor), diferente da água (desse modo a hidrólise pode ser vista como uma transglicosilação com água). Diferentes grupos funcionais podem ser adicionados aos xilo-oligossacarídeos originais, mas deve ser levado em conta que hidrólise e transglicosilação são reações paralelas, então, é importante que seja utilizada uma maior concentração de receptor para que a reação de transglicosilação seja mais favorecida.

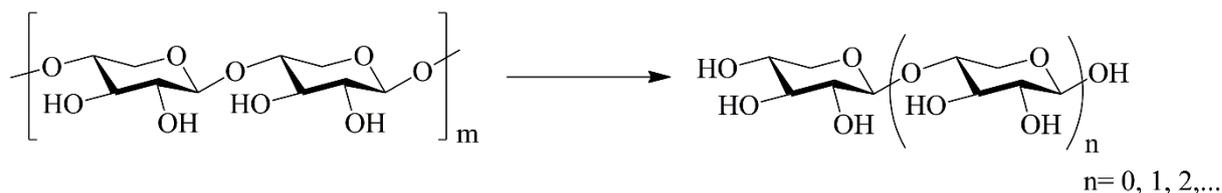


Figura 5 – Reação de hidrólise da xilana produzindo xilo-oligossacarídeos.

Fonte: elaborada pelo autor.

Matsumura et al. (1998) realizaram a síntese de oligoxilosídeos (mono, di e tri) entre xilana de trigo vermelho com substituintes com cadeias lineares com oito, dez ou 12 átomos de carbono (exemplos apresentados na Figura 6-a e Figura 6-c), com o intuito de avaliar a atividade superficial, propriedades antimicrobianas e biodegradabilidade destes compostos. As reações foram realizadas com catalisadores inorgânicos e diversas etapas de proteção de grupos e purificações, de forma que apenas 3% da xilana inicial foi convertida nos produtos de interesse do estudo.

Matsumura, Sakiyama e Toshima (1999) realizaram a transglicosilação em meio aquoso de xilana de trigo vermelho com 1-octanol ou 2-etilhexanol, obtendo xilosídeos e xilobiosídeos

destes dois álcoois, utilizando xilanase de *Aureobasidium pullulans*. A produção de derivados de 1-octanol foi de 110 mg por grama de xilana, enquanto que a produção de derivados de 2-etilhexanol (exemplo na Figura 6-b) foi de 54 mg por grama de xilana. A ausência de outros xilo-oligossacarídeos maiores neste estudo foi devido à xilanase utilizada, que reagia em posições específicas da cadeia de xilana e também de xilo-oligossacarídeos, liberando cadeias com uma ou duas unidades de xilose.

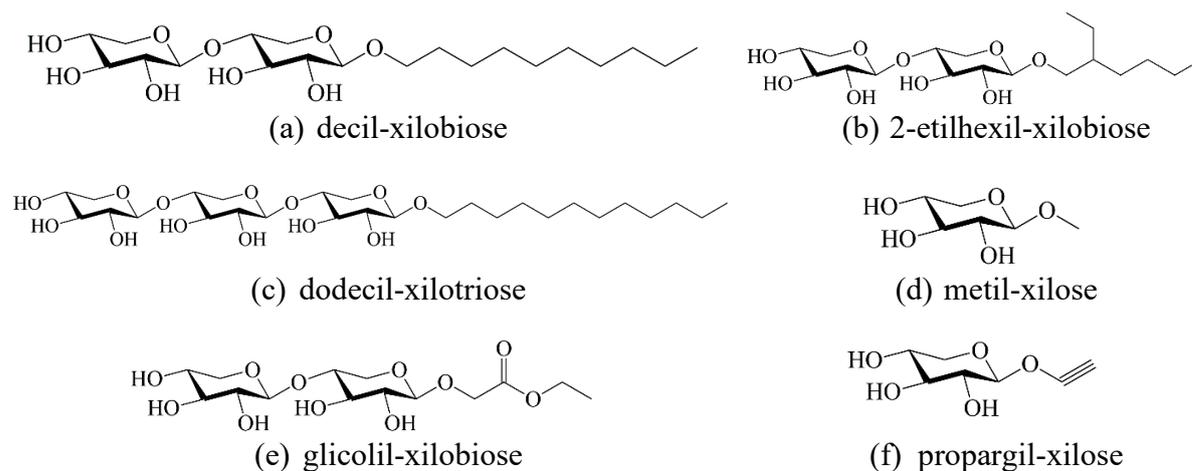


Figura 6 – Exemplos de produtos da transglicosilação de xilanas.

Fonte: elaborada pelo autor.

Nakamura, Toshima e Matsumura (2000) realizaram um estudo similar ao citado no parágrafo anterior, mas utilizando fluidos supercríticos ( $\text{CO}_2$  e  $\text{CHF}_3$ ) e xilanase. Foi observada a produção e acúmulo de xilotriosídeo, o que não ocorria em meio aquoso, sendo a produção total de oligo-xilosídeos de 250 mg por grama de xilana.

Jiang et al. (2004) utilizaram xilanase termofílica de *Thermotoga maritima* para catalisar a transglicosilação de xilana de bétula com vários álcoois, como metanol (Figura 6-d), etanol, propanol, 2-butanol e t-butanol. Foi encontrado que a reação de transglicosilação é mais rápida para álcoois de cadeias menores e álcoois primários. Por exemplo, para a reação com 1-butanol, os produtos de transglicosilação corresponderam a 74% dos produtos totais de reação, enquanto os produtos de hidrólise, 26%.

Ochs et al. (2011) utilizaram xilanase de *Thermobacillus xylanilyticus* e uma xilanase comercial NS 50030 (Novozymes). A transglicosilação foi realizada entre xilana de bétula (*birchwood*, árvore de clima temperado do hemisfério norte) e diversos álcoois, de metanol até

decanol, com uma produção máxima encontrada de 850 mg de xilosídeos por grama de xilana, nas condições ótimas (50 g L<sup>-1</sup> de xilana, 50 mL de álcool por litro de meio reacional e 30 U de xilanase). Foi observado que apesar de haver formação de xilotriosídeos, estes passam por uma posterior quebra, liberando resíduos com apenas uma e duas unidades de xilose, devido às características das xilanases utilizadas.

Brusa et al. (2014) realizaram a reação de transglicosilação com xilana de faia (árvore europeia) e álcool propargílico com xilanase comercial NS 22083 (Novozymes), obtendo produtos possuindo entre um e seis resíduos de xilose, sendo a menor cadeia apresentada na Figura 6-f. Os produtos com um, dois e três resíduos são os mais abundantes, com a formação de 290 mg por grama de xilana. Neste estudo, assim como em outros estudos deste grupo de pesquisa, foi encontrado que uma concentração de xilana no meio reacional acima de 100 g L<sup>-1</sup> tornam o meio muito viscoso e não causam um aumento significativo na produtividade da reação.

Gatard et al. (2017) realizaram a transglicosilação entre xilana de faia e glicolato de etila, obtendo produtos com um ou dois resíduos de xilose (Figura 6-e), utilizando xilanase de *Thermobacillus xylanilyticus*, com um rendimento de 140 mg de oligoxilosídeos por grama de xilana.

De acordo com os exemplos acima, todos realizados em reator em batelada, pode-se notar a variedade de grupos que podem ser introduzidos em moléculas de xilose a fim de criar possíveis blocos de construção, sendo este tipo de reação o foco deste trabalho.

## 2.2 ENZIMAS

Enzimas são proteínas que catalisam reações químicas nos organismos vivos. Estes catalisadores biológicos foram reconhecidos e descritos ainda no século XVI, em estudos sobre a digestão de carne por secreções do estômago e conversão de amido em açúcar pela saliva, mas apenas em 1926 a primeira enzima foi isolada e cristalizada (NELSON; COX, 2008).

Com exceção de um pequeno grupo de moléculas de RNA catalíticas, todas as enzimas são proteínas, com a atividade catalítica dependendo da integridade de sua conformação. Quando uma enzima é desnaturada ou dissociada em subunidades, a atividade catalítica geralmente é perdida. Portanto, as estruturas primária, secundária, terciária e quaternária são

essenciais para o funcionamento das enzimas (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2002). De forma resumida, a estrutura primária é a formada por uma cadeia linear de aminoácidos ligados por ligações peptídicas; a estrutura secundária é formada por interações entre átomos próximos da cadeia, de forma a criar um formato de espiral ou folha; a estrutura terciária ocorre com o dobramento da cadeia peptídica sobre si mesma, causada por interações de átomos mais distantes da própria cadeia; e a estrutura quaternária é a união de duas ou mais cadeias peptídicas, iguais ou não, que se agrupam para formar a estrutura geral de uma enzima.

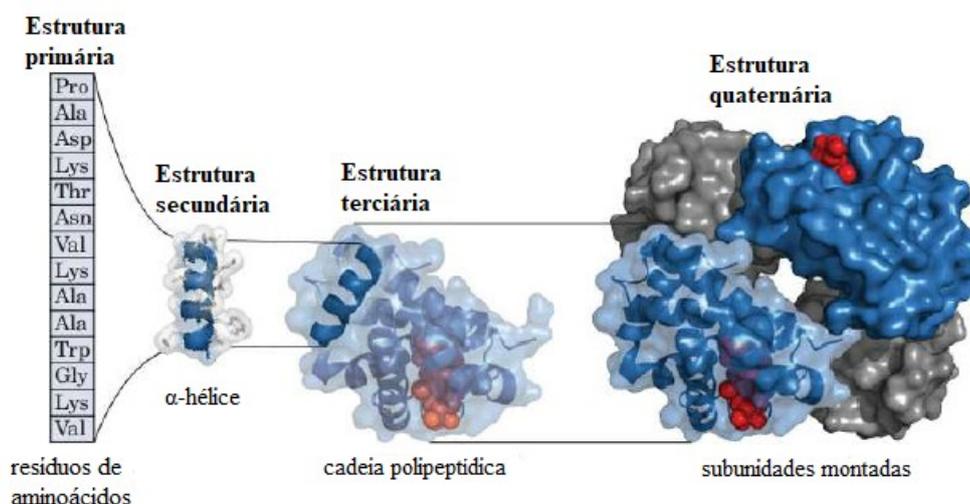
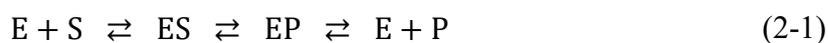


Figura 7 – Níveis estruturais nas proteínas.

Fonte: adaptado de Nelson e Cox (2008).

A principal característica de uma reação enzimática é que ela ocorre em uma área específica da enzima, denominado sítio ativo, sendo a molécula que se liga ao sítio ativo denominada substrato. O complexo enzima-substrato é o ponto inicial para explicar a ação das enzimas e também para análises matemáticas de sua cinética (MADIGAN et al., 2012). Como visto na equação (2-1), em uma reação enzimática a enzima (E) se liga ao substrato (S), formando um complexo enzima-substrato (ES). A reação ocorre, produzindo o complexo enzima-produto (EP) e então o produto (P) é liberado, recuperando também a enzima.



Enzimas aumentam a velocidade de uma reação, mas não alteram seu equilíbrio químico. A energia em sistemas biológicos é descrita em termos de energia livre de Gibbs (G), e o equilíbrio entre produtos e reagentes é resultado da diferença de energia entre os dois

estados. Como pode ser observado na Figura 8, a energia dos produtos é menor que a energia dos reagentes (de modo que  $\Delta G^\circ$  seja negativo), portanto o equilíbrio da reação está deslocado na direção dos produtos.

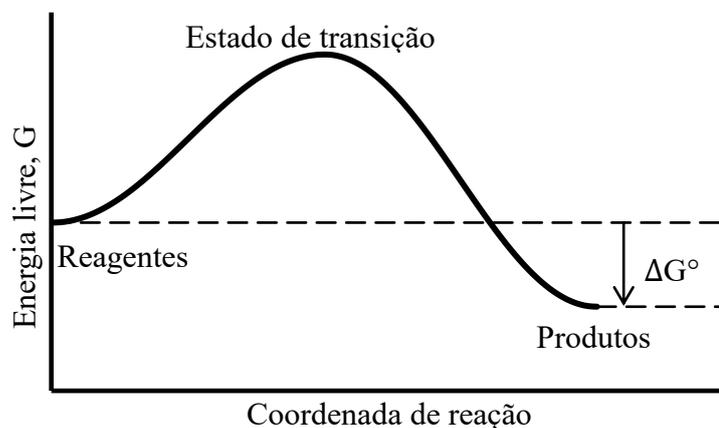


Figura 8 – Variação da energia livre de Gibbs ao longo da coordenada de reação.

Fonte: elaborada pelo autor.

Um equilíbrio favorável não significa que a reação irá ocorrer com uma velocidade considerável. Existe uma barreira energética entre reagentes e produtos: a energia necessária para o alinhamento dos grupos reacionais; formação de estados intermediários; rearranjo de ligações; e outras transformações necessárias para a reação. A energia que cria este estado é a energia de ativação, sendo o ponto que esta configuração molecular tem igual probabilidade de se converter em produtos ou retornar à forma de reagentes. Catalisadores aumentam a velocidade de reação, pois diminuem a energia de ativação, de modo que mais moléculas possuem a energia necessária para a reação. Na Figura 9 é apresentada uma mesma reação genérica exotérmica sem e com catalisador, mostrando como a reação com catalisador possui menor energia de ativação.

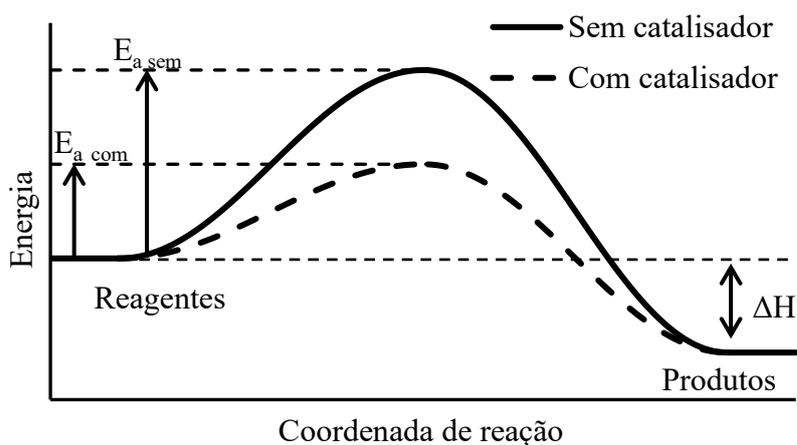


Figura 9 – Energia de ativação da reação sem e com catalisador

Fonte: elaborada pelo autor.

### 2.2.1 Imobilização enzimática

Apesar de todas as vantagens apresentadas, a utilização de enzimas ainda é limitada em processos industriais, devido principalmente: (a) à baixa estabilidade nas condições de operação, (b) ao elevado custo de obtenção da enzima (isolamento e purificação), e (c) à dificuldade de separação da enzima ao final do processo, o que praticamente descarta o uso de enzimas livres nestes processos. Uma forma de eliminar algumas das desvantagens das enzimas é torna-las insolúveis no meio reacional (MANRICH et al., 2010; ZANIN; MORAES, 2004).

A definição mais aceita para enzimas imobilizadas diz que “enzimas imobilizadas são enzimas ou sistemas enzimáticos fisicamente confinados ou localizados em uma certa região definida do espaço com retenção de suas atividades catalíticas, e que podem ser usadas repetida e continuamente”. Existem diversas formas de classificação para biocatalisadores imobilizados, sendo que alguns consideram o tipo de interação responsável pela imobilização (meios químicos e físicos, e encapsulação) e a natureza do suporte (porosos, não-porosos, orgânicos e inorgânicos) (ZANIN; MORAES, 2004).

As principais vantagens da utilização de enzimas imobilizadas, em relação às enzimas solúveis são (SHELDON; VAN PELT, 2013; ZANIN; MORAES, 2004):

- aproveitar a atividade catalítica por maior período de tempo;
- operar de forma contínua, possibilitando maior controle das variáveis do processo;
- facilitar a separação do catalisador e do produto;

- reduzir o volume do reator, pois a imobilização permite alta concentração enzimática;
- aumentar a estabilidade da enzima em relação à temperatura, pH e efeitos de inibição de substrato e produto;
- facilitar a interrupção da reação.

As vantagens da imobilização superam as limitações, de um modo geral, mas alguns fatores devem ser evitados ou prevenidos no processo, como:

- perda da atividade durante o processo de imobilização: a imobilização da enzima resulta em sua inativação parcial. Para um melhor aproveitamento da técnica deve-se oferecer uma elevada concentração de enzima em relação ao suporte. Como os métodos de imobilização envolvem ligações entre a estrutura da enzima e o suporte, haverá uma alteração na estrutura tridimensional da proteína, resultando em menor atividade. Podem ocorrer também alterações de orientação e acesso do substrato ao sítio ativo, reduzindo a especificidade da enzima. Para evitar este efeito, o sítio ativo deve ser protegido durante o processo de imobilização empregando-se uma alta concentração de substrato ou um inibidor do sítio ativo, desde que este possa ser facilmente removido ao final do processo de imobilização;
- efeitos difusionais (transferência de massa): como a enzima perde sua mobilidade, perde também parte de sua acessibilidade ao substrato, reduzindo aparentemente a atividade por efeitos de limitação de acesso do substrato ao sítio ativo. Também pode ocorrer o acúmulo de produto próximo ao sítio ativo, afetando a cinética da reação e diminuindo sua velocidade, e até alterando o pH no microambiente da enzima. Estes efeitos podem ser reduzidos pela escolha do suporte ou pelas condições de operação do reator. De modo geral, partículas pequenas do suporte reduzem a resistência à difusão interna (dentro da própria partícula), enquanto altas vazões reduzem os efeitos difusionais externos, mas estas duas soluções são geralmente incompatíveis, pois pequenas partículas causam uma grande queda de pressão no leito.
- características físicas do biocatalisador e do fluido: enzimas imobilizadas devem ser utilizadas quando o substrato é solúvel, e quando as enzimas estão retidas em matrizes porosas, estes poros devem permitir o acesso do substrato.

A imobilização enzimática pode ser realizada de diversas formas, como:

- encapsulamento em uma rede de material polimérico (como sol-gel e hidrogel), que não permite a saída da enzima, mas permite o escoamento de substrato e produtos, desde que não possuam um tamanho muito grande, o que pode gerar dificuldades de transferência de massa;
- ligação cruzada de enzima (sem suporte sólido ou polimérico), para formar agregados ou cristais insolúveis, que mantém a atividade enzimática. Como não há um suporte clássico aqui, os custos envolvidos neste processo são menores;
- imobilização em um suporte: pode ser realizada por interações fracas (como ligação de van der Waals ou hidrofóbica), como também pode ser ligação iônica ou covalente. Ligações fracas podem não ser suficientes para manter suporte e enzima ligados durante uma operação do reator, como escoamento de líquido, agitação ou alta concentração de reagentes e produtos. Ligações covalentes evitam a lixiviação de enzimas, mas com uma desvantagem: se a enzima desativar, ambos o suporte e enzima não são mais úteis, de forma que os dois componentes devem ser substituídos.

Para uma imobilização enzimática em um suporte sólido, como sílica, é necessário realizar uma modificação superficial neste suporte, de forma a adicionar grupos funcionais que então irão se ligar a grupos específicos das enzimas. Um grupo clássico de substâncias que adicionam grupos funcionais ao suporte são os derivados de silano, com alguns exemplos presentes na Figura 10.

A silanização pode ocorrer em qualquer substrato, geralmente necessitando de grupos hidroxila livres na superfície para que a reação ocorra. Alguns substratos já possuem estes grupos (como sílica, vidro e agarose), enquanto outros materiais necessitam de um pré-tratamento para a geração destes grupos. Este tratamento pode envolver soluções básicas e ácidas, solução piranha ou tratamento com plasma de oxigênio, com alguns materiais apresentando dificuldade maior ou menor para a criação destes grupos.

Uma destas substâncias é o (3-aminopropil)trietoxissilano (APTES), que possui um grupo amino em sua extremidade (estrutura apresentada na Figura 10-c), atuando como um ligante entre o suporte e a enzima, além de possuir a função de espaçador, diminuindo efeitos estéricos da imobilização (como a imobilização com o sítio ativo voltado para o suporte) (VASHIST et al., 2014).

De forma geral, o APTES é inicialmente hidrolisado em meio aquoso, liberando três moléculas de etanol para cada uma de APTES, deixando-o com grupos hidroxila (Figura 11). Como mostrado na Figura 12, o APTES pode se ligar ao substrato de três maneiras diferentes: ligação direta na superfície, formando uma camada única de ligantes; polimerização vertical, na qual moléculas de APTES reagem com outra já ligadas ao substrato; e por ligações de hidrogênio entre o grupo amino de novas moléculas de APTES com hidroxilas livres do suporte. Para concentrações de APTES acima de 10% ocorre a formação de camadas múltiplas, enquanto uma concentração de 0,5% forma uma camada única (VANDENBERG et al., 1991; VASHIST et al., 2014). Temperaturas entre 60 e 90 °C desestabilizam ligações não covalentes, diminuindo a quantidade de APTES ligado de forma fraca ao suporte, sendo que este tratamento térmico promove uma melhor uniformidade de ancoramento (VASHIST et al., 2014). O processo de silanização pode ser realizado em solventes orgânicos, como tolueno, pentano e octano, mas a reação em meio aquoso é mais simples, com a água atuando como solvente e catalisador no processo.

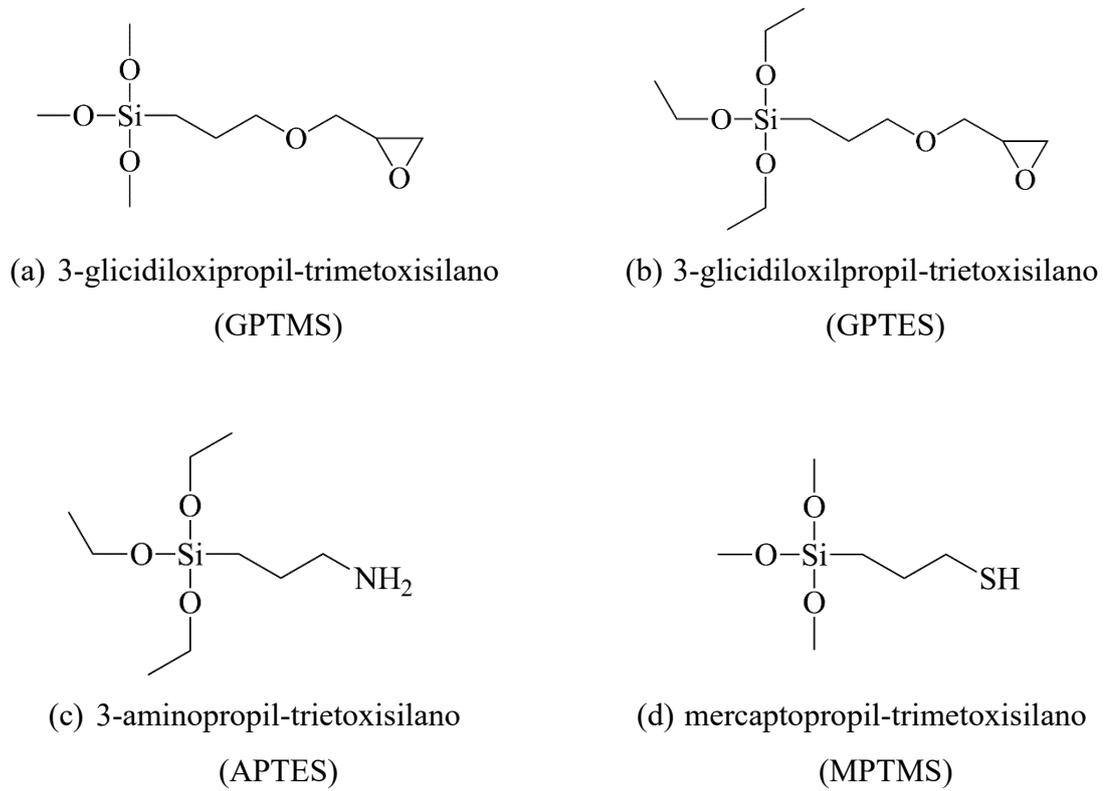


Figura 10 – Exemplos de silanos para imobilização enzimática.

Fonte: elaborada pelo autor.

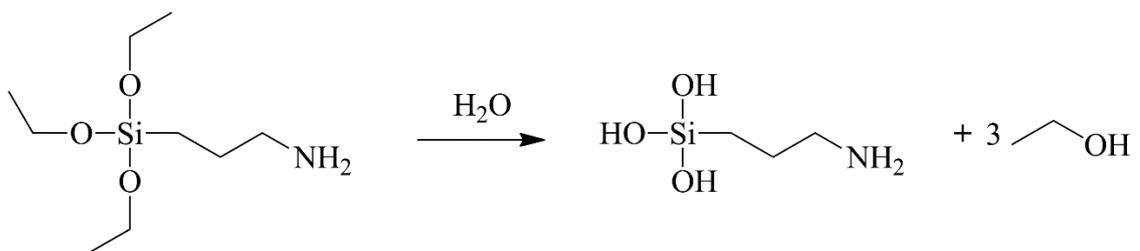


Figura 11 – Hidrólise inicial do APTES em meio aquoso.

Fonte: elaborada pelo autor.

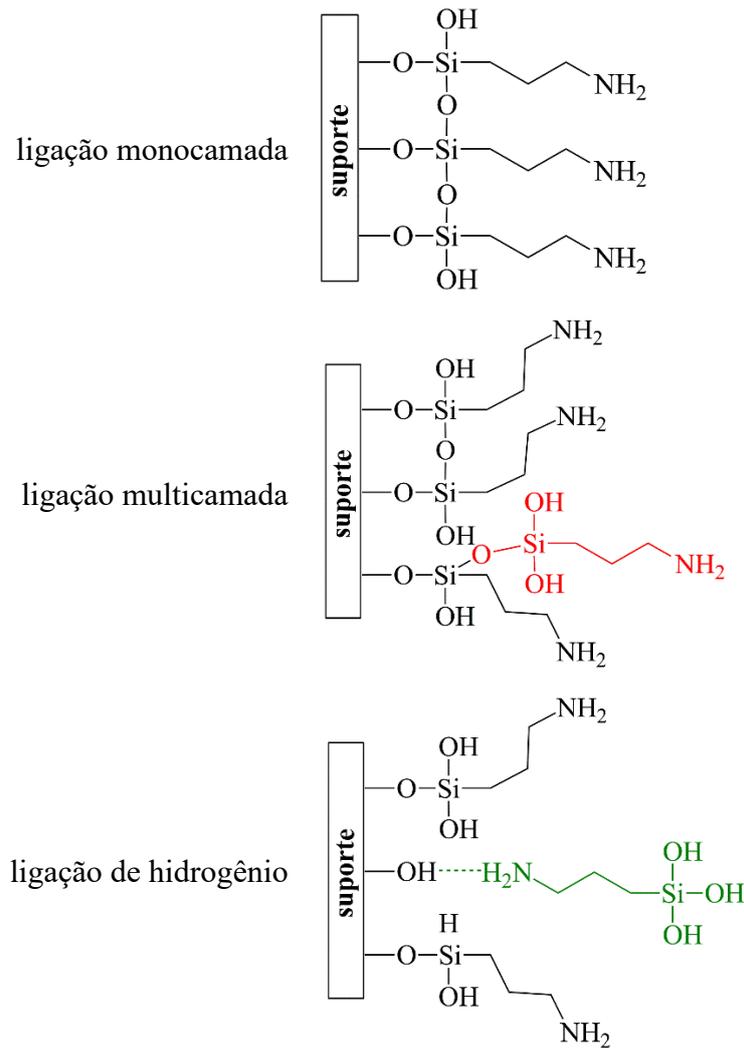


Figura 12 – Possibilidades de ancoramento do APTES ao suporte.

Fonte: elaborada pelo autor.

O grupo amino do APTES permite a ligação covalente de enzimas, utilizando uma molécula adicional de ligante. Esta substância pode ser o glutaraldeído, um agente bifuncional que liga os grupos amino do APTES com os grupos amino de enzimas. Grupos aldeído formam ligações imina com grupos amino de lisina para formar uma base de Schiff reversível (ligação imina). Se necessário, a ligação C=N pode ser reduzida para gerar uma ligação amino secundária, com a utilização de borohidreto de sódio (NaBH<sub>4</sub>), por exemplo (CARVALHO et al., 2016; LONG et al., 2014; WANG et al., 2013). O esquema geral de imobilização é apresentado na Figura 13.

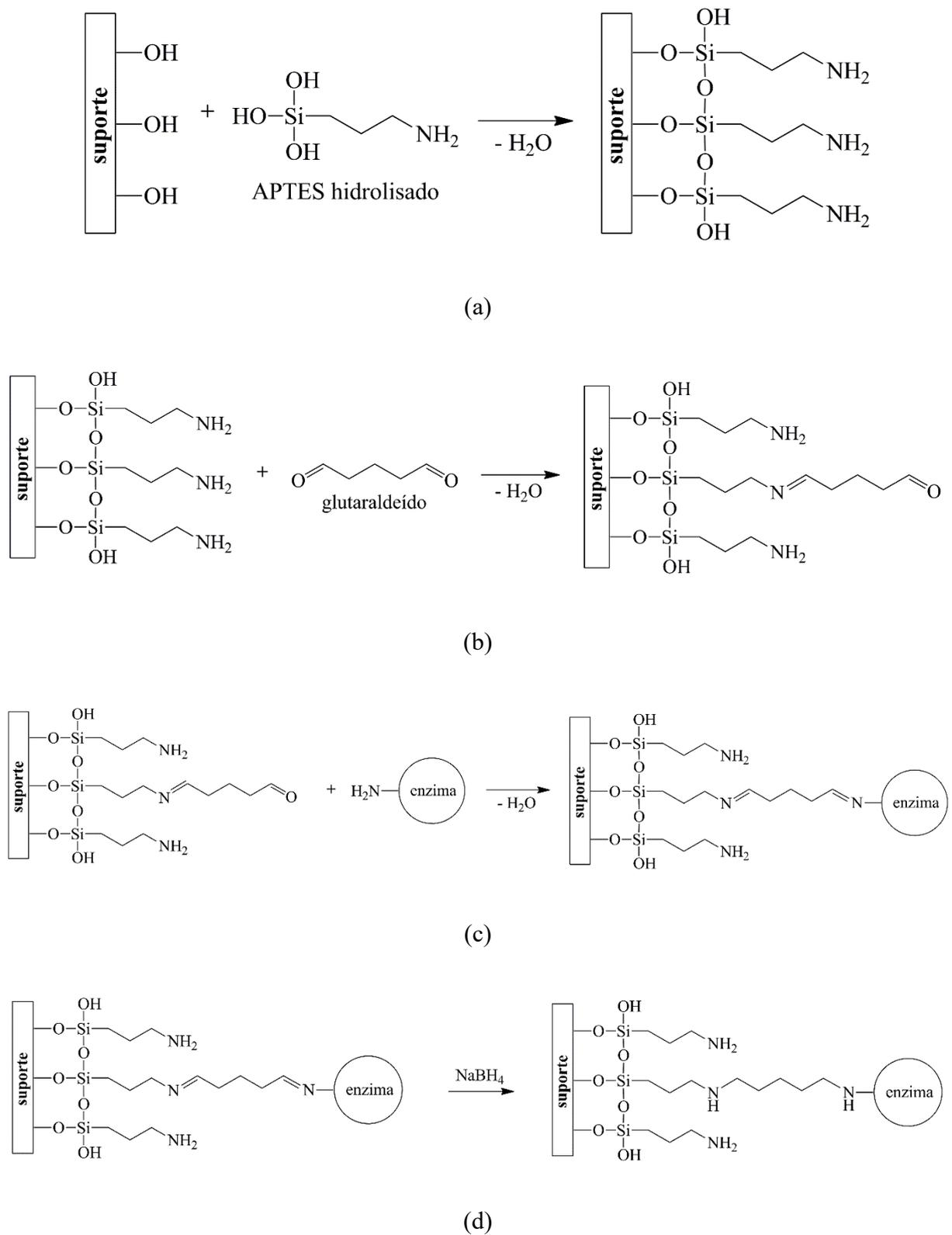


Figura 13 – Processo de imobilização enzimática: (a) ancoramento do APTES hidrolisado ao suporte; (b) ligação com glutaraldeído; (c) ligação com enzima; (d) redução da base de Schiff.

Fonte: elaborada pelo autor.

## 2.2.2 Xilanases

Como já visto nos tópicos anteriores, xilanas possuem uma estrutura química complexa, sendo que a quebra completa de suas unidades requer a ação conjunta de diversas enzimas hidrolíticas. As enzimas xilanolíticas incluem endo- $\beta$ -1,4-endoxilânase (1,4-beta-D-xilana xilanahidrolase, E.C. 3.2.1.8),  $\beta$ -D-xilosidade (1,4-D-xilosídeo xilohidrolase, E.C. 3.2.1.37),  $\alpha$ -glicuronidase (E.C. 3.2.1.139),  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase (E.C. 3.2.1.55), acetilxilana esterase (E.C. 3.1.1.72), entre outras (KANG et al., 2002; KARIN et al., 1995). A ação conjunta destas enzimas converte o xilano em seus açúcares constituintes. Dentre todas estas enzimas, xilanases e xilosidases são as mais importantes na atividade de despolimerização do xilano. As xilanases catalisam a hidrólise aleatória da xilana para a produção de xilo-oligossacarídeos, enquanto que a xilosidase libera resíduos de xilose a partir das extremidades das xilanas (e também de xilo-oligossacarídeos). As outras enzimas são necessárias para quebrar as cadeias laterais mencionadas anteriormente (MOTTA; ANDRADE; SANTANA, 2013).

Xilanases (endo-1,4-beta-D-xilanase) são definidas como enzimas capazes de realizar a hidrólise de ligações 1,4-beta-xilopiranosil de 1,4-beta-xilanas, numeradas como E. C. 3.2.1.8. (GHOSE; BISARIA, 1987). Sinônimos para estas enzimas são: endoxilânase, 1,4-beta-xilana xilanohidrolase, endo-1,4-beta-D-xilanase, beta-1,4-xilanase e beta-xilanase. Estas enzimas foram descritas inicialmente em 1955, reconhecidas em 1961, e são produzidas por diversos organismos, como bactérias, algas, fungos, protozoários, gastrópodes e artrópodes. Como o substrato da xilanase possui um grande tamanho molecular e dificilmente pode entrar na célula, a maioria das xilanases são excretadas em um ambiente extracelular (COLLINS; GERDAY; FELLER, 2005).

Devido a esta grande variedade de origens, xilanases apresentam uma grande variedade de massas molares, como as apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Exemplos de produtores e propriedades de algumas xilanases.

Microorganismo	Massa molar (kDa)	pH/temperatura ótimos
Bactérias		
<i>Bacillus altitudedinus</i>	98	8,0/50

<i>Paenibacillus barengoltzii</i>	116	6,5/60
<i>Bacillus licheniformis</i>	46	9,0/60
<i>Streptomyces thermovulgaris</i>	46	6,5/65
Fungos		
<i>Humicola insolens</i>	44	7,0/70
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	31	5,0/75
<i>Aspergillus oryzae</i>	35	5,0/25
<i>Pichia striptis</i>	32	6,0/50

Fonte: Adaptado de Bhardwaj, Kumar e Verma (2019) e Chadha et al. (2019).

A heterogeneidade e complexidade das xilanases resultou em diversas formas diferentes de xilanases, que diferem nas propriedades físico-químicas, estrutura, modo de ação e especificidade. As funções industriais mais comuns atualmente para xilanase são (BURLACU; CORNEA; ISRAEL-ROMING, 2016; MOTTA; ANDRADE; SANTANA, 2013):

- indústria de papel e polpa: xilanases são utilizadas para hidrolisar a xilana e então liberar a lignina da polpa (que possui uma cor marrom característica), que será então hidrolisada por outras enzimas, o que causa uma redução na utilização de cloro e sais para o branqueamento da polpa, diminuindo assim a geração de efluentes tóxicos. Além disso, são utilizadas enzimas livres de celulase, que preservam a estrutura da celulose da polpa, que seria degradada caso houvesse a utilização de catalisadores inorgânicos;
- conversão de lignocelulose em combustíveis: biocombustíveis de segunda geração são os principais produtos da conversão de massa lignocelulósica, sendo que não disputam materiais com fontes de alimentos e podem ser uma solução para a conversão destes resíduos. O papel da xilanase neste caso é a hidrólise da xilana para liberar unidades de xilose (juntamente com outras enzimas que atuam na celulose e lignina), que serão fermentadas por microrganismo específico para a produção de etanol de segunda geração;
- indústria farmacêutica e alimentícia: xilanases são muito utilizadas para a clarificação de sucos e cervejas, pois materiais poliméricos aumentam a turbidez destes produtos; assim como a hidrólise da xilana pode melhorar a extração de café, óleos vegetais e amido. A utilização de xilanases em indústria de ração é interessante também, pois a diminuição da viscosidade da ração no aparelho digestivo dos animais é benéfica para o ganho de massa e conversão dos alimentos.

O mecanismo catalítico das xilanases pode ser explicado por dois resíduos glutamato. Um intermediário entre enzima e substrato é formado e então hidrolisado, sendo que dois resíduos de ácidos carboxílicos localizados no sítio ativo são responsáveis pela formação do intermediário. Um resíduo atua como catalisador ácido, protonando o substrato, enquanto o segundo resíduo realiza um ataque nucleofílico, liberando uma parte do substrato e a formação de um intermediário enzima e a porção restante do substrato. Na segunda etapa, o primeiro grupo carboxilato atua como uma base desta vez, tomando um próton de uma molécula nucleofílica, que então irá atacar o átomo de carbono final (COLLINS; GERDAY; FELLER, 2005; MOTTA; ANDRADE; SANTANA, 2013).

## 2.3 REATORES E MODOS DE CONDUÇÃO DA REAÇÃO

### 2.3.1 Reator batelada

O desenvolvimento de um novo processo químico e a realização de testes é geralmente feita em um reator batelada. Além disso, este modelo de reator é utilizado para a fabricação de produtos de custo elevado e para processos que sejam difíceis de converter em operações contínuas. A maior parte dos estudos com xilanas são realizados neste sistema, assim como todas as reações encontradas de transglicosilação de xilanas, apresentadas anteriormente. Ainda assim, a realização de experimentos em batelada auxilia a obtenção de um melhor entendimento do processo e serve como comparação para os resultados obtidos com reatores contínuos.

### 2.3.2 Reator de microcanal com leito de recheio

Um reator de microcanal com leito de recheio (MPBR) é normalmente um tubo cilíndrico preenchido com partículas, que neste estudo são partículas de sílica com xilanases imobilizadas. Poucos estudos foram realizados com a hidrólise enzimática de xilanas para a produção de xilo-oligossacarídeos neste tipo de reator.

Por exemplo, Romero-Fernández et al. (2018) utilizaram um leito fixo de 12 mm de diâmetro e 70 mm de comprimento preenchido com xilanase de *S. halstedii* imobilizada em resinas. Foram utilizadas vazões entre 0,1 e 10 mL min<sup>-1</sup>, resultando em um tempo de residência entre 0,5 e 55 min., a 30 °C. Foi encontrado que, para o maior tempo de residência, a conversão da xilana foi 100%, mas com uma produção muito grande de xilose. Após a diminuição do tempo de residência, produtos com maior grau de polimerização (até xilotetraose) foram obtidos, com uma produtividade máxima de xilo-oligossacarídeos de 3453 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>.

Aragon et al. (2013) realizaram experimentos semelhantes, desta vez com xilanase de *Aspergillus versicolor*, para uma vazão de  $60 \text{ mL h}^{-1}$ , obtendo uma conversão de xilana de 56%.

Além de existirem poucos estudos em leito fixo, estes focaram apenas no escoamento contínuo, sem a comparação com outros métodos.

### 2.3.3 Microrreatores e reator de escoamento laminar

Atualmente a produção tecnológica é baseada no aumento de escala de processos desenvolvidos em laboratório. Entretanto, esta estratégia apresenta desvantagens em cada etapa da mudança de escala, pois modificações no reator resultam em mudanças no formato do equipamento e nas transferências de massa e calor, por exemplo, fazendo com que o sistema deva passar por novas otimizações em cada estágio, causando atrasos e aumentando os custos (III et al., 2017; WATTS; WILES, 2007).

Microrreatores foram propostos para que a reação seja realizada e otimizada em um único reator, e para que o aumento de escala seja realizado com múltiplos reatores em paralelo, como pode ser observado na Figura 14.

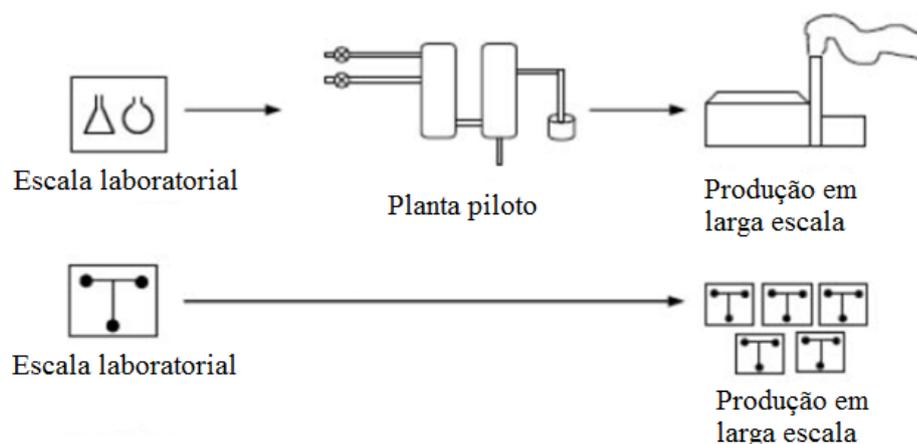


Figura 14 – Estágios de desenvolvimento de um processo convencional e um processo com microrreatores.

Fonte: Adaptado de Watts e Wiles (2007).

Microrreatores são formados por canais com diâmetros geralmente entre  $10$  e  $1000 \mu\text{m}$ , conectados em diversas geometrias possíveis, permitindo a manipulação espacial e temporal de pequenas quantidades de fluido. Em microrreatores com escoamento de fluido em um tubo sem

partículas, o perfil de velocidade é laminar, porque  $Re < 2000$ , devido ao pequeno diâmetro do tubo, de forma que apenas a difusão molecular promove a mistura do fluido no interior do microrreator (MASON et al., 2007; SURYAWANSHI et al., 2018).

Algumas vantagens dos microrreatores são (ELVIRA et al., 2013; MASON et al., 2007; WOHLGEMUTH et al., 2015):

- maior seletividade: em um reator batelada real nem todo o fluido recebe a mesma agitação, causando gradientes de concentração e deficiência na transferência de calor, diminuindo a seletividade e o rendimento da reação. Microrreatores permitem um controle preciso de temperatura e tempo de residência, o que é traduzido em uma melhor seletividade;
- maior segurança: a geração de substâncias perigosas ainda pode existir, porém, as quantidades formadas são pequenas já que a seletividade da reação pode ser controlada de forma precisa. Da mesma maneira, reações altamente exotérmicas podem ser realizadas, já que a pequena quantidade gerada de calor será retirada do sistema rapidamente;
- alta relação área/volume: comparado com os sistemas tradicionais, sistemas microfluídicos apresentam uma alta transferência de massa e calor devido à alta relação área/volume e o pequeno caminho difusional no canal;
- processamento contínuo: operações contínuas possuem benefícios de custos reduzidos, menor volume de reator, menor consumo energético e geração de resíduos, e maior facilidade de automação em relação aos processos batelada;
- plantas móveis: para sistemas microfluídicos existe a possibilidade de transportar o reator para o lugar onde os materiais estão armazenados ou onde o produto será utilizado;
- melhor controle do tempo de residência: o tempo de reação pode ser ajustado minuciosamente, o que pode ser especialmente importante para espécies reativas de vida curta, que podem ser geradas e transportadas para a próxima etapa antes de sua decomposição;
- melhor transporte de massa em sistemas multifásicos: reações multifásicas dependem muito da transferência de massa, e microrreatores possuem vantagens já descritas de melhor controle do escoamento, menores caminhos difusionais e grande área específica;

- eficiência energética: microrreatores consomem menos energia mecânica que um grande reator de leito de recheio, atingindo produtividade volumétrica equivalente;
- desenvolvimento mais rápido de processos: mais condições de reação podem ser exploradas com as mesmas quantidades de reagentes, pois experimentos em microrreatores consomem pouco material, além de que os processos são mais rápidos de se realizar.

O controle de fluidos em microrreatores é realizado principalmente com bombeamento por escoamento hidrodinâmico, causado por uma diferença de pressão entre a entrada e a saída do canal, geralmente com uma pressão positiva na entrada do canal, enquanto a saída é mantida na pressão atmosférica. Bombas de seringa ou peristálticas são equipamentos muito utilizados para a aplicação de pressão em microrreatores, mas a natureza pulsante do escoamento pode ser indesejada em vazões baixas. A vantagem deste método é que pode ser utilizado com qualquer líquido e com dispositivos de qualquer material. As desvantagens são a resistência capilar ao escoamento hidrodinâmico (que é maior com a diminuição das dimensões do canal) e o perfil de velocidade no escoamento laminar que é parabólico, e, por isso, gera uma distribuição de tempo de residência que pode modificar o rendimento e a seletividade das reações (MASON et al., 2007). Outra possível desvantagem do bombeamento mecânico é que as bombas possuem um tamanho muito maior do que o microrreator, de forma que tão somente o sistema de bombeamento já compreende a maior parte do volume total do sistema (WATTS; WILES, 2007).

Com relação ao material de construção de microrreatores, sistemas microfluídicos de vidro são os mais utilizados, com diversas técnicas de modificação da superfície e de fabricação de microestruturas. Entretanto, o alto custo de fabricação dos microrreatores de vidro torna sua utilização em larga escala proibitiva. Substratos poliméricos se tornaram interessantes pois têm fabricação rápida e com baixo custo. Entre os polímeros, o PDMS é um dos mais utilizados por seu fácil manuseio, a ser descrito no item seguinte (WU et al., 2004).

Os métodos de fabricação de microrreatores podem ser diretos ou indiretos. Em métodos diretos, o componente fabricado é utilizado diretamente, e a desvantagem é que a fabricação de um componente gera apenas um dispositivo de cada vez. Os métodos indiretos utilizam um molde mestre para transferir a geometria para um material secundário que será o dispositivo

final, com a vantagem de precisar de apenas um molde mestre para criar até centenas de cópias. (MASON et al., 2007)

A imobilização de enzimas em partículas oferece vantagens sobre a imobilização direta nas paredes do microrreator, pois o material do suporte pode ser escolhido independentemente do material do microrreator. Existe uma maior flexibilidade ao realizar as etapas de imobilização fora do sistema, além do que a imobilização não ocorrerá em zonas indesejadas do microrreator. Além disso, algumas condições de imobilização podem não ser compatíveis com o material do microrreator (BOLIVAR; NIDETZKY, 2013).

### 2.3.4 PDMS

O polidimetilsiloxano (PDMS) é um polímero orgânico baseado em silício, utilizado em diversas aplicações microfluídicas devido a sua fácil fabricação, transparência ótica (entre 240 e 1100 nm), permeabilidade gasosa, inércia química e elasticidade. Estas características permitem a exploração de diversas ideias e experimentos mesmo quando se tem pouca experiência em microfabricação, sendo que processos podem ser desenvolvidos de maneira muito mais rápida do que em outras escalas tradicionais (RAJENDRANI, 2007; ZHOU; ELLIS; VOELCKER, 2010).

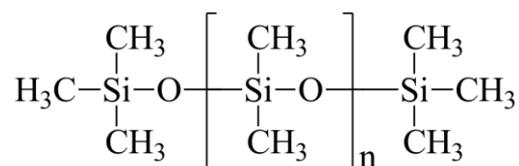


Figura 15 – Estrutura do PDMS

Fonte: Elaborado pelo autor.

Como observado, o PDMS pode ser utilizado em diversas aplicações, mas existem situações nas quais seu uso não é aconselhável. Por exemplo, o PDMS não é compatível com altas temperaturas, sendo que sua decomposição se inicia em 200 °C, mas esta limitação não atinge as reações enzimáticas, que estão situadas bem abaixo deste limite de temperatura (LIU; SUN; CHEN, 2009). O caso mais importante de incompatibilidade está relacionado com solventes orgânicos. De uma forma geral, quatro problemas estão relacionados aos solventes

orgânicos: intumescimento do polímero, extração de impurezas, partição de soluto entre polímero e solvente e reação química com o polímero (VAN DAM, 2005).

O intumescimento do PDMS ocorre quando solventes ocupam os espaços vazios da estrutura do polímero, aumentando a massa e as dimensões da peça de PDMS, podendo inclusive deformar os microcanais ou mesmo bloqueá-los completamente, podendo causar também vazamentos no sistema. Conseqüentemente, as características de escoamento e tempo de residência podem ser alterados, modificando a eficiência de reações químicas planejadas para o sistema em questão, sendo que os microcanais têm suas dimensões reduzidas, diminuindo o tempo de residência (DANGLA; GALLAIRE; BAROUD, 2010; KOH et al., 2012). Além disso, o intumescimento pode comprometer a integração com outros componentes do sistema, como membranas, detectores ou misturadores, e estas mudanças também podem comprometer a ligação entre duas camadas de PDMS ou a ligação com um substrato de vidro (LEE; PARK; WHITESIDES, 2003). Extração de impurezas (como monômeros e oligômeros não polimerizados) podem alterar algumas propriedades mecânicas do material, porém, mais importante é a contaminação do fluido, que pode interferir em uma reação química e contaminar o produto final. A partição de soluto é o efeito no qual este pode ter sua concentração dividida entre o fluido e o polímero adjacente ao fluido, alterando a concentração do soluto no fluido. A reação entre polímero e solvente pode causar diversos efeitos negativos, como o esgotamento dos reagentes na corrente, contaminação do fluido e modificação da superfície do canal (VAN DAM, 2005).

## 2.4 QUÍMICA VERDE

Atualmente é difícil imaginar como seria o bem-estar de nossa sociedade sem os inúmeros produtos das indústrias químicas e relacionadas. O contraponto deste benefício é que a maior parte destes processos foram desenvolvidos em uma época na qual a grande geração de resíduos não era uma preocupação, com os efeitos na saúde humana e na natureza de diversas substâncias mal entendida ou mesmo ignorada (CIPOLATTI et al., 2019; SHELDON, 2016).

Devido a essas características, produtos químicos e a Química são geralmente vistos como causas de diversos problemas pela população, sendo que a associação entre “produto químico” e “tóxico” ainda é muito comum (ANASTAS; EGHBALI, 2010). As principais razões para estas opiniões são preocupações sobre impactos ambientais, transporte, segurança e geração de resíduos. Um desafio atual para a indústria é o desenvolvimento de novos produtos,

processos e serviços que alcancem benefícios ambientais, econômicos e para a sociedade em geral, o que requer uma mudança dos paradigmas anteriormente baseados em conceitos tradicionais de eficiência, que muitas vezes focam somente na eficiência da reação, para uma abordagem que dá valor à substituição, por exemplo, de fontes fósseis por fontes renováveis de matéria, por exemplo (CLARK, 1999; SHELDON, 2016).

Desta maneira surgiu a Química Verde, que pode ser definida como o desenvolvimento de produtos e processos químicos que reduzem ou eliminam o uso e a produção de substâncias perigosas (CIPOLATTI et al., 2019). O objetivo da química verde é reduzir os riscos em todas as etapas de vida de um produto, e isto também se mostra economicamente viável, como simplificado na Figura 16.

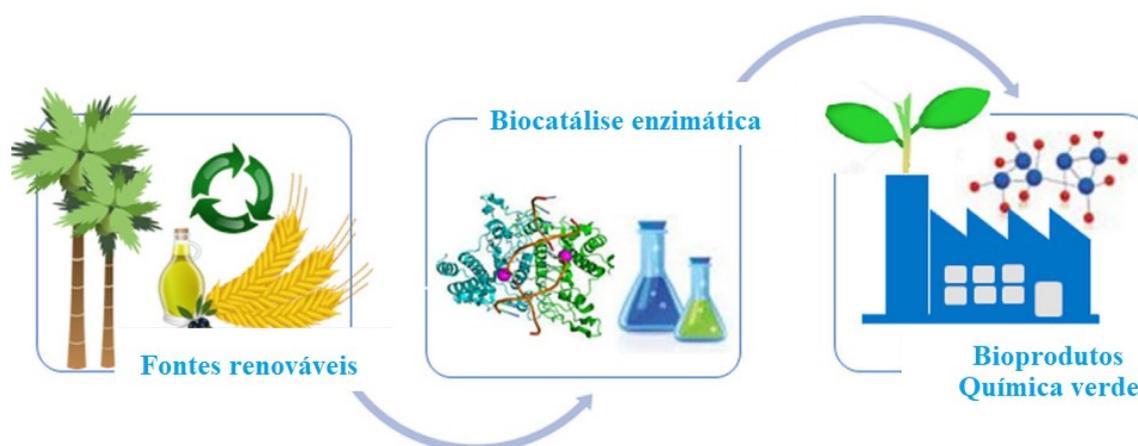


Figura 16 – Busca atual pelo caminho da química verde.

Fonte: adaptado de Cipolatti et al. (2019).

Anastas e Warner (1998) introduziram doze princípios da química verde, que são elementos importantes no desenvolvimento de novos processos. Dentre os doze princípios, dez são imediatamente alcançados na síntese enzimática de oligossacarídeos:

1. Prevenção: a geração de resíduos é minimizada devido ao uso de enzimas;
2. Economia de átomos: na reação de transglicosilação praticamente todos os átomos envolvidos estão presentes no produto desejado. Apenas moléculas de água são formadas além dos produtos de interesse;
3. Síntese mais segura: neste estudo são utilizados produtos químicos com baixo risco para a saúde humana e para o ambiente;
4. Produtos seguros: oligossacarídeos apresentam baixa toxicidade;

5. Solventes e auxiliares seguros: nas reações não são utilizados solventes nem outras substâncias auxiliares no processo, eliminando completamente este componente de risco;
6. Eficiência energética: o processo é conduzido em temperaturas e pressão próximas à condição ambiente;
7. Uso reduzido de intermediários: nesta reação não são necessárias espécies para modificações temporárias nos reagentes nem grupos de proteção, dispensando reagentes adicionais que podem gerar efluentes;
8. Catálise: catalisadores seletivos são utilizados;
9. Degradação do produto: oligossacarídeos podem ser degradados por enzimas, de forma que estes não causam danos para seres vivos nem ao ambiente;
10. Prevenção de acidentes: as substâncias utilizadas no processo possuem baixo risco de acidentes.

Os dois princípios que não são imediatamente cumpridos, mas que podem ser incluídos com algumas modificações no sistema, são:

11. Uso de matérias-primas renováveis: o glicolato de butila utilizado aqui ainda é produzido majoritariamente por processos inorgânicos e fontes fósseis, mas também pode ser extraído de fontes renováveis e síntese enzimática;
12. Análise em tempo real para prevenção de poluição: métodos analíticos devem ser incorporados ao processo.

Desta forma, pode ser observado que, além das vantagens da utilização de enzimas e microrreatores neste trabalho, a produção de oligoxilósídeos deste estudo também apresenta aspectos ambientais positivos, que são importantes para futuros processos.

## 2.5 CONSIDERAÇÕES

A revisão bibliográfica revela como a busca por processos mais eficientes e mais verdes está mudando o rumo de diversos processos químicos, com o reaproveitamento de matéria orgânica cada vez mais em destaque. Embora este trabalho explore apenas as reações para um só tipo de xilana, a ideia pode ser expandida para praticamente qualquer outra fonte vegetal, como cana-de-açúcar e espiga de milho, encontrados em abundância no Brasil.

Portanto, as informações consideradas relevantes e apresentadas nos tópicos enfatizados na Revisão Bibliográfica serão reunidas neste trabalho, como ilustra a Figura 17, visando à valorização de matéria orgânica e à produção de substâncias de interesse econômico, renováveis e seguras, utilizando microrreatores de microcanais, catalisadores enzimáticos e reações em condições brandas de temperatura e pressão.

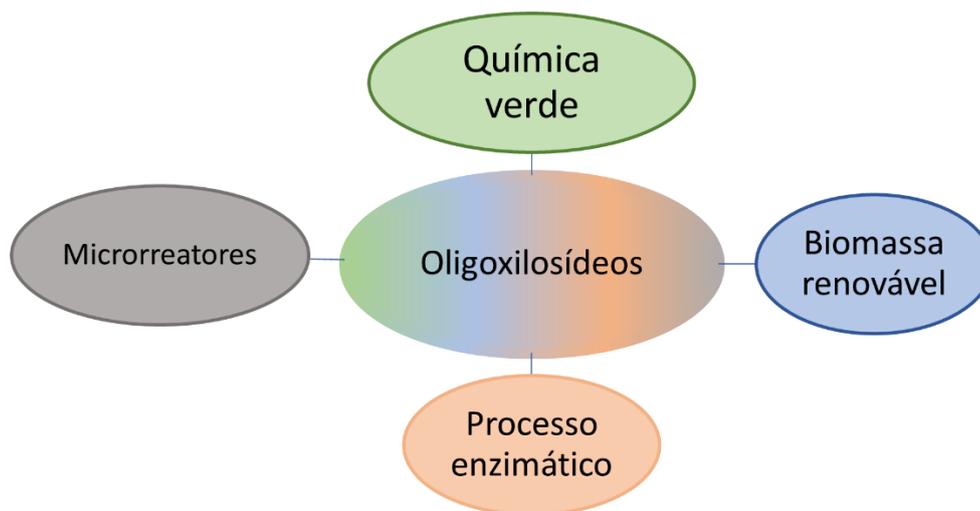


Figura 17 – União dos tópicos que formam este trabalho.

Fonte: elaborada pelo autor.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAIS

Os reagentes utilizados neste trabalho foram:

- água destilada;
- azul brilhante de Comassie G 250 (Sigma, EUA);
- albumina de soro bovino 66 kDa 98% (Sigma, EUA);
- etanol P.A. (Química Moderna, Brasil);
- ácido fosfórico 85% (% m/m) P.A. (Synth, Brasil);
- xilana de bétula, >90% de xilose, <10% de ácido 4-O-metilglucurônico e ácido acético; um substituinte de ácido 4-O-metilglucurônico a cada 15 unidades de xilose, massa molar média de 8000 g mol<sup>-1</sup>, grau de polimerização aproximadamente 50 (HURLBERT; III, 2001; TELEMANN et al., 2002) (*birchwood xylan*, Sigma, EUA);
- glicolato de butila, grau técnico >90% (Sigma, EUA);
- ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) P.A. (Dinâmica, Brasil);
- hidróxido de sódio P.A. (Dinâmica, Brasil);
- ácido cítrico anidro P.A. (Synth, Brasil);
- ácido clorídrico P.A. (37% m/m, Synth, Brasil)
- citrato de sódio dihidratado P.A. (Synth, Brasil);
- fenol P.A. (Synth, Brasil);
- tartarato de sódio e potássio P.A. (KNaC<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub>·4H<sub>2</sub>O, Synth, Brasil);
- bissulfito de sódio P.A. (NaHSO<sub>3</sub>, Exodo Científica, Brasil);
- plástico ABS (acrilonitrila-butadieno-estireno, 3DFila, Brasil);
- elastômero de silicone Sylgard 184 polidimetilsiloxano (PDMS, Dow Corning, EUA);
- sílica gel esférica, 200 µm de diâmetro, área específica de 430 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>, volume de poros de 0,83 cm<sup>3</sup> g<sup>-1</sup>, densidade de empacotamento de 0,473 g cm<sup>-3</sup>, tamanho de poros de 15 nm (Tokyo Chemical Industry, Japão);
- 3-aminopropiltriétoxissilano (APTES) 99% (Sigma, EUA);
- glutaraldeído 25% v/v em água (Sigma);
- borohidreto de sódio >98% (Sigma).

Equipamentos:

- Banho-Maria Q-218 (Quimis, Brasil);
- Bomba de seringa (construção própria);
- Impressora 3D modelo Stella 3D (Boa Impressão, Brasil);
- Impressora 3D modelo S3 (Sethi, Brasil)
- Banho termostático TE-184 (Tecnal);
- Cromatógrafo líquido Varian LC-920, com coluna Bio-Rad Aminex HPX-87H;
- Espectrofotômetro UVmini-1240 (Shimadzu).

As enzimas utilizadas neste trabalho foram (todas da Novozymes):

- NS 50030 (Xilanase 1): uma endo-xilanase de *Aspergillus oryzae*. Possui um intervalo ótimo de temperatura entre 35 e 55 °C, pH entre 4,5 e 6,0, um aspecto amarelado e densidade de 1,1 g mL<sup>-1</sup>.
- NS 50014 (Xilanase 2): uma endo-xilanase de alta temperatura de *Aspergillus oryzae*. Possui um intervalo ótimo de temperatura entre 45 e 70 °C, pH entre 5 e 8, um aspecto amarelado e densidade de 1,1 g mL<sup>-1</sup>.
- NS 22002 (Xilanase 3): produzida em fermentação submersa por uma cepa de *Humicola insolens*. Possui um intervalo ótimo de temperatura entre 40 e 60 °C, pH entre 5 e 6,5, um aspecto marrom e densidade de 1,2 g mL<sup>-1</sup>.

## 3.2 MÉTODOS

### 3.2.1 Medida do teor de proteína das xilanases

Para medir o teor de proteína das xilanases estudadas neste trabalho, utilizou-se o método de Bradford (1976). Para tanto, foi preparado 1 litro da solução de Bradford pesando-se 0,1 g de azul brilhante de Comassie, que foi dissolvido com 50 mL de etanol 95%. Depois, acrescentou-se 100 mL de ácido fosfórico 85% e completou-se para 1 litro com água destilada. Esta solução foi então filtrada com filtro qualitativo e armazenada em frasco âmbar. A curva padrão desta solução foi realizada com uma solução de albumina de soro bovino de 0,1 g L<sup>-1</sup>, diluída apropriadamente para gerar uma curva com 11 pontos. Para a leitura das amostras, misturou-se em um tubo de ensaio 0,3 mL de amostra com 3 mL da solução de Bradford. Após dois minutos a amostra foi lida em um espectrofotômetro a 595 nm, sendo a cor estável por 1

h, sendo os testes realizados em duplicata. A curva padrão obtida para a solução de Bradford utilizada neste trabalho é mostrada no Apêndice 1 (Figura 41).

### 3.2.2 Medida da atividade enzimática das xilanases

A atividade enzimática das xilanases estudadas neste trabalho foi obtida baseando-se no método de Bailey, Biely e Poutanen (1992), que realiza a hidrólise da xilana e a posterior leitura dos açúcares redutores com a solução de DNS.

Para preparar um litro da solução de DNS, dissolveram-se 24 g de NaOH em aproximadamente 200 mL de água destilada, com agitação magnética (Solução 1). Em outro frasco, dissolveram-se 8 g de DNS em aproximadamente 500 mL de água destilada (Solução 2). Em um terceiro frasco, dissolveram-se 5 g de fenol em aproximadamente 80 mL de água, utilizando banho-maria (50 °C) para facilitar a dissolução do fenol (Solução 3).

Adicionaram-se 15 mL da Solução 1 na Solução 3 (formando a Solução 4), e depois o restante da Solução 1 na Solução 2 (obtendo-se a Solução 5).

Adicionaram-se 200 g de tartarato de sódio e potássio na Solução 5, dissolvendo até não observar liberação de bolhas de gás (Solução 6); e adicionaram-se 5 g de bissulfito de sódio (ou 6,1 g de sulfito de sódio,  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ) na Solução 4 (solução de fenol), misturando até dissolver (Solução 7).

Misturaram-se as Soluções 6 e 7, completando o volume para um litro. Esta solução foi filtrada em funil de vidro de fundo sinterizado e, então, adicionaram-se mais 5 g de bissulfito de sódio, misturando até dissolver. Esta solução foi armazenada em frasco de vidro âmbar, protegido da luz até o momento de uso.

Para a curva padrão, foi preparada uma solução inicial de 1%  $\text{m v}^{-1}$  de xilana em tampão citrato pH 5 0,1  $\text{mol L}^{-1}$  (1 g de xilana em 100 mL de tampão). Este preparo foi mantido sob agitação magnética por 1 h para a completa dissolução. Realizou-se um processo de diluição para a obtenção de onze tubos de ensaio, com concentrações igualmente espaçadas entre zero e 1  $\text{g L}^{-1}$ .

Foi adicionado um volume 0,9 mL desta solução em um tubo de ensaio, que foi mantido em um banho a 50 °C. Após o equilíbrio da temperatura, foi adicionado um volume de 0,1 mL

de xilanase apropriadamente diluída, calculada de acordo com o teor de proteína de cada xilanase, obtida de acordo com o item anterior. Para a medida de atividade das xilanases imobilizadas, adicionaram-se ao tubo 20 mg de sílica com xilanase.

O tubo foi agitado e incubado a 50 °C por 5 min. Foi tomado 0,5 mL desta mistura para outro tubo, sendo adicionados também 2,5 mL do reagente DNS, que é então colocado em uma temperatura de 100 °C, por 10 min. Após isto, os tubos foram colocados em um banho de água em temperatura ambiente.

Após o equilíbrio da temperatura, 3 mL de água foram adicionados ao tubo, diluindo-se a mistura pela metade. A leitura da absorbância da amostra foi realizada em um espectrofotômetro com comprimento de onda de 600 nm, lembrando que a cor das amostras é estável por 30 min. A amostra de branco seguiu o mesmo procedimento acima, mas na etapa da adição da xilanase diluída, foram adicionados somente 0,1 mL de água. A curva padrão para o método está apresentada do Apêndice 2.

Além da temperatura padrão de 50 °C para as medidas de atividade, outras temperaturas também foram testadas, no intervalo entre 30 e 90 °C. Uma unidade de atividade “U” foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1  $\mu\text{mol}$  de xilose, de xilana de bétula, em um minuto.

Foi avaliado também a atividade enzimática em relação ao pH, para a temperatura padrão fixa de 50 °C, sendo o intervalo de pH testado entre 3 e 11. O mesmo procedimento experimental foi utilizado. Estes testes foram realizados em duplicata.

### **3.2.3 Reação em reator batelada**

As reações realizadas em reator batelada foram conduzidas em reatores de vidro com 30 mL de volume, encamisados, e com agitação magnética a 600 rpm.

Inicialmente, foram introduzidos no reator 0,8 mL de glicolato de butila e 0,6 g de xilana, completados para 30 mL com tampão citrato pH 5 0,05 mol L<sup>-1</sup>. Estes reagentes foram incubados na agitação e temperatura desejadas (40, 50 ou 60 °C). Para dar início à reação adicionou-se um volume de enzima equivalente a 100 U na temperatura do experimento, sendo os volumes necessários descritos na Tabela 2.

Tabela 2 – Volume de solução enzimática equivalente a 100 U em função da temperatura.

Enzima	Temperatura (°C)		
	40	50	60
Xilanase 1 (NS 50030)	63,8 µL	36,3 µL	33,1 µL
Xilanase 2 (NS 50014)	125,6 µL	78,6 µL	67,1 µL
Xilanase 3 (NS 22002)	344,3 µL	96,3 µL	73,1 µL

O glicolato de butila foi escolhido para a reação de transglicosilação com a xilana, pois este obviamente possui um grupo hidroxila que é necessário para que ocorra esta reação, além de conter outros dois átomos de oxigênio que podem ser utilizados para posteriores modificações nos produtos formados. O esquema da reação de interesse deste trabalho é apresentado na Figura 18.

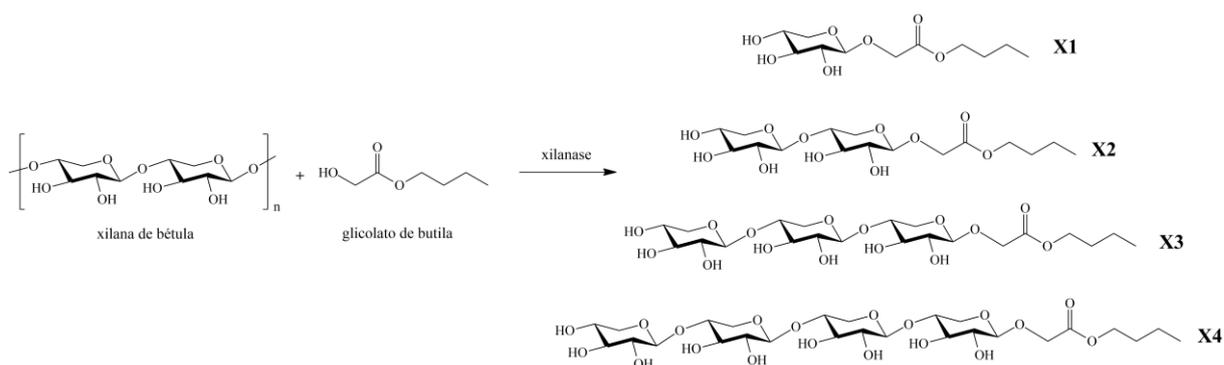


Figura 18 – Reação de transglicosilação entre xilana e glicolato de butila.

Fonte: elaborada pelo autor.

Os reagentes dessa reação de transglicosilação são a xilana de bétula, com um alto grau de polimerização, e o glicolato de butila. Como a xilanase quebra as ligações da xilana em posições aleatórias, são gerados produtos com diferentes graus de polimerização (relacionados ao número de unidades de xilose). Dessa forma, o produto contendo uma unidade de xilose foi denominado X1, seguindo até o produto com quatro unidades de xilose (X4). Moléculas com um maior número de unidades de xilose não foram consideradas neste trabalho.

Além da amostra inicial, foram retiradas amostras da reação nos instantes de 1, 2, 5, 10, 15 e 30 min; e 1, 2, 3, 6, 12, 24, 48 e 72 h, com um volume de 0,7 mL cada. Imediatamente

após a coleta, cada amostra era fervida por 10 min para desativar a enzima e, então, congeladas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 3.2.4 Produção do reator de microcanal de PDMS

A produção do reator de microcanal em PDMS foi baseado no método de Saggiomo e Velders (2015). O ponto de partida do método é um carretel de plástico para impressora 3D, composto pelo polímero ABS (acrilonitrila-butadieno-estireno), cuja estrutura está ilustrada na Figura 19. O diâmetro deste fio é de 1,75 mm, o que é grande para a construção do microcanal pretendido, de forma que ele deve ser modificado para a obtenção do diâmetro necessário. Isto pode ser feito pelo método de extrusão, utilizando-se a própria impressora 3D.

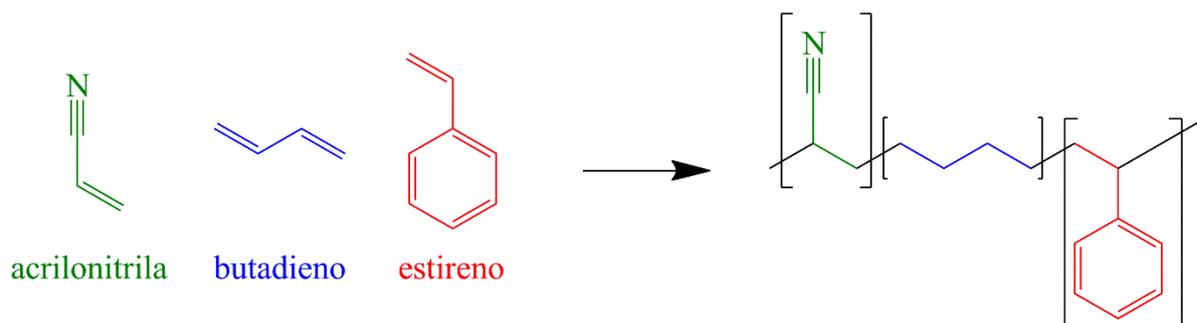


Figura 19 – Estrutura do ABS.

Fonte: elaborada pelo autor.

Impressoras 3D possuem um bico aquecido com um orifício geralmente de 0,4 mm de diâmetro. Este bico pode ser substituído por outros modelos de diâmetros diferentes, que geralmente variam entre 0,1 e 1,2 mm. Como desejava-se um microcanal com 0,6 mm de diâmetro, um bico com este mesmo valor foi instalado na impressora 3D. O bico foi aquecido a uma temperatura de  $210\text{ }^{\circ}\text{C}$  e realizou-se a extrusão de um fio reto de ABS com 0,6 mm de diâmetro com um comprimento necessário para posterior fabricação do reator. Um esquema simplificado deste processo está mostrado na Figura 20.

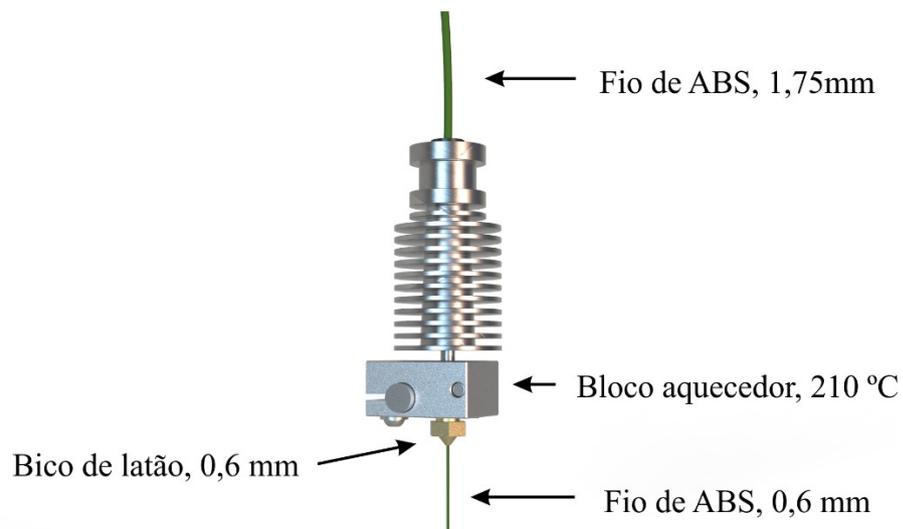


Figura 20 – Obtenção do fio fino de ABS.

Fonte: elaborada pelo autor.

Como um reator de microcanal pode possuir vários metros de comprimento, é desejável acomodar este canal em um formato que economize espaço. O fio de ABS foi aquecido a 100 °C, para que se tornasse levemente maleável, e enrolado em uma barra rosqueada de 5 mm de diâmetro externo (padrão M5), obtendo-se então um fio em formato espiral. Neste formato, um metro de microcanal é compactado em uma espiral de apenas seis centímetros de comprimento.

Nesta configuração, o reator de microcanal possui uma entrada e uma saída. Para adicionar uma outra entrada, tomou-se um pequeno fio de ABS (do mesmo diâmetro que o fio inicial) e soldou-se junto ao início da espiral, com o auxílio de uma pequena quantidade de acetona (que dissolve o ABS), criando assim duas entradas no reator. Na Figura 21 é mostrado o modelo tridimensional da espiral de ABS, utilizado para cálculos de comprimento e volume.



Figura 21 – Modelo tridimensional de uma espiral de ABS com 1 m de comprimento.

Fonte: elaborada pelo autor.

Com a espiral pronta, esta foi montada no interior de um recipiente que irá receber o PDMS, que então definirá as dimensões externas do bloco do reator. Foi desenvolvido um molde desmontável de acrílico para este fim, podendo ser reutilizado inúmeras vezes, conforme mostrado na Figura 22. Este aparato é montado de forma que a espiral não toque o fundo nem as laterais do recipiente, para que o canal não fique deformado e apresente vazamentos posteriormente.



Figura 22 – Molde de acrílico para a moldagem do reator de PDMS: (a) modelo CAD; (b) peça real.

Fonte: elaborada pelo autor.

Preparou-se então a mistura de PDMS com o agente de cura, na proporção recomendada de 10 partes de monômero e 1 parte de catalisador, em massa. A mistura foi colocada em uma câmara de vácuo para retirar as bolhas formadas na agitação. Após aproximadamente 15 min de vácuo, o PDMS ainda líquido foi vertido no molde de acrílico contendo a espiral, cobrindo-a completamente. Este conjunto foi levado à estufa a 60 °C, por 2 h, para ocorrer a cura do PDMS.

Após a cura do polímero, o reator de microcanais foi retirado do molde de acrílico e deixado submerso em acetona, por 48 h, para que o fio de ABS fosse dissolvido. Após este período, lavou-se o microcanal com mais acetona com o auxílio de uma seringa, e, após a evaporação da acetona, o reator de microcanais ficou pronto para utilização (Figura 23). Para

tanto, bastou-se conectar uma seringa a cada entrada do reator e, então, utilizar uma bomba de seringa para iniciar a reação. O reator utilizado não possuía nenhum misturador na junção das duas entradas, como visto na Figura 21, sendo apenas a difusão como responsável pela transferência de massa no sistema.



Figura 23 – Reator de PDMS pronto para uso.

Fonte: elaborada pelo autor.

### 3.2.5 Reação no MLFR (reator de microcanal com escoamento laminar)

O reator de microcanal de PDMS foi utilizado como um reator de escoamento laminar (MLFR, *microchannel laminar flow reactor*, ou seja, reator de microcanal com escoamento laminar). Este reator foi construído com duas entradas, porque duas soluções diferentes seriam então bombeadas conjuntamente na entrada do microcanal, para reagir em seu interior, durante o escoamento. A soma destes dois meios possuía uma concentração idêntica ao caso do reator batelada. A primeira mistura foi composta por 0,26 mL de glicolato de butila e 0,2 g de xilana, completada para 5 mL com tampão citrato, pH 5  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , e agitada para homogeneizar a mistura. A segunda mistura era composta por 5 mL de tampão citrato e 33,3 U de enzima, adicionada de acordo com os volumes apresentados na Tabela 3. A temperatura para este modo de reação foi controlada por um banho termostaticado, sendo que o reator ficou submerso.

Tabela 3 – Volume de solução enzimática equivalente à 33,3 U em função da temperatura.

Enzima	Temperatura (°C)		
	40	50	40
Xilanase 1 (NS 50030)	21,3 µL	12,1 µL	11,1 µL
Xilanase 2 (NS 50014)	41,9 µL	26,2 µL	22,4 µL
Xilanase 3 (NS 22002)	114,8 µL	32,1 µL	24,4 µL

Cada uma das duas misturas foi carregada em uma seringa de vidro de 5 mL e ligadas às duas entradas do microcanal. A bomba de seringa que operou as duas seringas foi programada para uma vazão de 1 mL h<sup>-1</sup> para cada seringa, totalizando então uma vazão de 2 mL h<sup>-1</sup> no microcanal. O controle do tempo de residência no microcanal se deu pela variação do comprimento do microcanal, calculado para coincidir com os instantes de amostragem do reator batelada, como pode ser observado na Tabela 4.

Tabela 4 – Relação entre tempo de residência e comprimento do microcanal para o reator de PDMS.

Tempo de residência (min)	Comprimento do microcanal (mm)
1	4,2
3	12,7
5	21,2
10	42,4
15	63,7
30	127,3
60	254,6
120	509,3
180	763,9
360	1527,9
720	3055,8
1440	6111,5
2880	12223,0
4320	18334,6

No caso dos três últimos comprimentos, correspondentes aos maiores tempos de residência, trocou-se o reator de PDMS por uma mangueira de silicone de mesmo diâmetro, como será detalhado na seção 3.2.9, de resultados do MPPR (reator de microcanal de leito de recheio).

Após o acúmulo de cerca de 1 mL de amostra na saída do reator, esta foi fervida por 10 min e congelada, assim como no caso das amostras do reator batelada.

### **3.2.6 Construção da bomba de seringa**

Para os experimentos em escoamento contínuo deste trabalho, foi construída uma bomba de seringa a partir de materiais de baixo custo, mas que apresentasse um desempenho satisfatório. De forma simplificada, uma bomba de seringa consiste de uma estrutura (para manter a rigidez do sistema e realizar a movimentação da seringa), um motor para realizar os movimentos e um sistema eletrônico para controlar seus movimentos. No princípio as montagens foram baseadas no trabalho de Wijnen et al. (2014), com algumas modificações ao longo da construção.

A estrutura da bomba de seringa foi construída com placas de acrílico cortadas a laser, que apresentavam uma boa precisão dimensional e boa rigidez, além de proporcionar uma boa aparência à montagem. Todas as placas foram unidas por parafusos e dois eixos de aço, que também delimitava o movimento das partes móveis do equipamento. A bomba finalizada é mostrada na Figura 24.

Para a parte de movimentação foi utilizado um motor de passo NEMA 17, que apresenta torque e precisão suficientes para o projeto. O controle eletrônico do motor foi realizado por meio de um placa Arduino Uno, que após uma calibração inicial acionava a seringa na vazão especificada. A resolução linear máxima da bomba era de 0,0025 mm e uma vazão de 0,1 mL h<sup>-1</sup> podia ser atingida sem dificuldades.

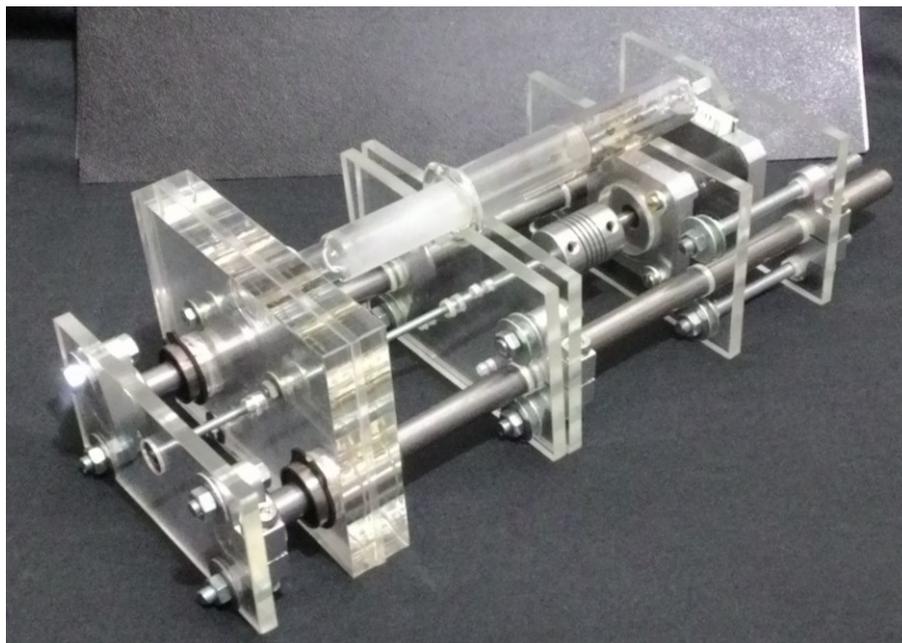


Figura 24 – Bomba de seringa construída para este trabalho.

Fonte: elaborada pelo autor.

### 3.2.7 Imobilização das xilanases em sílica

O método de imobilização de xilanase em sílica foi adaptado de Nagar et al. (2012) e Pal e Khanum (2011).

A sílica, mesmo teoricamente apresentando grupos hidroxila em sua superfície, passou por um tratamento ácido para garantir uma maior concentração deste grupo. A quantia de 20 g de sílica foram adicionadas a 300 mL de uma solução de ácido clorídrico  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ , a  $80 \text{ }^\circ\text{C}$ , deixando-a em agitação magnética por 12 h. A sílica então foi filtrada com água em abundância para a remoção do ácido e deixada secar em estufa a  $105 \text{ }^\circ\text{C}$ , por 24 h.

Na etapa seguinte, 20 g de sílica seca foram adicionados a 100 mL de uma solução aquosa de APTES  $2\% \text{ v v}^{-1}$  pH neutro (20 mL de APTES por litro de solução), por 12 h, em temperatura ambiente, com agitação suave. As partículas foram então filtradas com água, eliminando-se o APTES não ancorado à sílica, e depois foram secas em estufa a  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ , por 12 h.

As partículas de sílica, agora modificadas com APTES, foram reagidas com glutaraldeído, em uma proporção de 1 g de sílica para 20 mL de solução aquosa de glutaraldeído 4 mL L<sup>-1</sup>, pH neutro, por uma hora, a temperatura ambiente, com agitação suave. Após a reação as partículas foram filtradas com água, eliminando-se o glutaraldeído não reagido e, então, secadas mais uma vez a 50 °C, por 12 h.

A imobilização da xilanase prosseguiu adicionando-se 1 g de sílica modificada com 100 U de xilanase, em tampão citrato pH 5 0,05 mol L<sup>-1</sup>, temperatura ambiente e agitação suave, por um período de duas horas. A sílica então foi lavada com o mesmo tampão até não ser detectada proteína nas lavagens. O procedimento foi repetido igualmente para cada uma das três xilanases.

O rendimento de imobilização foi calculado como a relação entre a quantidade de proteína da solução de enzima imobilizada na sílica e a quantidade inicial oferecida durante a imobilização, como apresentado na Equação (3-1).

$$\begin{aligned} \text{Rendimento (\%)} &= 100 \cdot \frac{\text{quantidade imobilizada}}{\text{quantidade oferecida}} \\ &= 100 \cdot \frac{(\text{quantidade oferecida} - \text{quantidade da lavagem})}{\text{atividade oferecida}} \end{aligned} \quad (3-1)$$

Foi calculada também a eficiência de imobilização, sendo definida como a relação entre a atividade observada e a atividade imobilizada, de acordo com a Equação (3-2). Este cálculo é interessante, pois pode ocorrer que uma imobilização apresente rendimento de 100%, com toda a enzima estando ligada ao suporte, mas com uma eficiência de 0%, pois nenhuma atividade foi encontrada no imobilizado, já que a enzima pode ter sido desnaturada ou inativada por algum outro fenômeno.

$$\text{Eficiência (\%)} = 100 \cdot \frac{\text{atividade observada após imob.}}{\text{atividade imobilizada}} \quad (3-2)$$

A atividade imobilizada é calculada multiplicando-se a atividade específica da enzima, pela quantidade de massa de proteína imobilizada. Observe-se que nesta definição de atividade imobilizada e conseqüentemente também da eficiência, assume-se de forma subjacente, que na etapa de imobilização não há partição de proteínas entre a solução de enzima e o suporte de imobilização. Como se sabe, esta solução é uma mistura de diferentes proteínas presentes no

caldo de fermentação obtido na produção da enzima, cuja composição depende do método de fabricação utilizado, e de qualquer purificação que tenha sido empregada.

Finalmente, foi calculada a atividade recuperada, sendo a relação entre a atividade observada e a atividade inicial, de acordo com a Equação (3-3).

$$\begin{aligned} \text{Atividade recuperada (\%)} &= 100 \cdot \frac{\text{atividade observada}}{\text{atividade oferecida}} & (3-3) \\ &= \text{Rendimento} \cdot \text{Eficiência} \end{aligned}$$

A validade da última parte da Equação (3-3) está sujeita à mesma consideração apresentada no parágrafo abaixo da Equação (3-2).

### **3.2.8 Preparo do microcanal com leito de recheio**

Como o microcanal de PDMS fabricado permanece neste formato de espiral, a criação de um canal com leito de recheio, usando-se sílica neste caso, se torna difícil. Portanto, reações em leito de recheio foram realizadas em uma mangueira de silicone com 1 mm de diâmetro interno.

O preparo do microcanal com leito de recheio foi iniciado inserindo um pequeno pedaço de espuma em uma das extremidades da mangueira, para delimitar uma das extremidades do microcanal. Com o auxílio de um pequeno funil (ou ponteiros de pipeta automática) a sílica foi vertida no interior do canal até atingir o comprimento necessário, e mais um pedaço de espuma foi inserido por nesta extremidade, delimitando a outra extremidade.

Como a mangueira de silicone era muito maleável, criou-se um suporte para mantê-la em um formato fixo durante os experimentos. Este suporte foi primeiro criado como um modelo 3D no computador e, então, foi impresso em ABS na impressora 3D.



Figura 25 – Modelo tridimensional para o suporte do canal de silicone.

Diferentemente do microcanal de ABS, que necessitava de duas entradas, o microcanal com leito de recheio necessitou de apenas uma entrada, já que a enzima já se encontrava imobilizada nas partículas de sílica, de forma que a xilana e o glicolato de butila podiam ser alimentados juntamente, numa única solução.

### 3.2.9 Reação no MPBR (reator de microcanal com leito de recheio)

O microcanal com leito de recheio foi operado como um MPBR (*microchannel packed bed reactor*, ou seja, reator de microcanal com leito de recheio). O mesmo meio reacional da reação em reator batelada foi utilizado neste caso, excluindo-se a enzima, que já se encontrava no interior do reator. Para tanto, agitou-se 0,26 mL de glicolato de butila e 0,2 g de xilana, e completou-se o volume para 10 mL de solução com tampão citrato, pH 5 0,05 mol L<sup>-1</sup>. Uma seringa de 5 mL foi carregada com essa solução e ligada na bomba de seringa para iniciar a reação. Foi descartada uma alíquota inicial da reação de cerca de 1 mL, considerando que havia um regime transiente no início do experimento.

Após o acúmulo de cerca de 1 mL de amostra ao final do reator, esta foi fervida por 10 min e congelada, assim como no caso das amostras do reator batelada. O maior tempo de residência para o reator de microcanal com leito de recheio foi de seis horas, para um comprimento de três metros.

### 3.2.10 Análise dos produtos da reação

O preparo das amostras iniciou-se com a centrifugação das mesmas, para retirar a xilana não reagida da solução. Por meio de experimentos preliminares, foi determinada qual a diluição

deveria ser usada, em uma proporção adequada com a fase móvel, para possibilitar a aplicação do método cromatográfico.

Os produtos da reação foram analisados por meio de cromatografia líquida de alta eficiência, com uma coluna Aminex HPX-87H. A fase móvel utilizada foi a recomendada pelo fabricante: água ultrapura com 5 mmol L<sup>-1</sup> de ácido sulfúrico. As análises foram realizadas com uma vazão de 0,5 mL min<sup>-1</sup> e temperatura da coluna de 60 °C, com a temperatura do detector por índice de refração de 50 °C.

Os picos dos produtos observados foram comparados com outros trabalhos da literatura, que utilizaram o mesmo método com a mesma reação, a fim de identificar a espécie correspondente a cada pico (KAPOOR; KUHAD, 2007; REDDY; KRISHNAN, 2016; ZHANG; XU; YU, 2017). Os tempos de retenção obtidos estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5 – Tempos de retenção para a análise cromatográfica dos produtos da reação.

Espécie	Tempo de retenção (min)
X1	11,9
X2	9,1
X3	8,1
X4	7,3

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA DAS XILANASES

As concentrações de proteínas das xilanases utilizadas neste trabalho são mostrados na Tabela 6. Como pode ser observado, as Xilanases 1 e 3 apresentam um teor próximo de  $10 \text{ g L}^{-1}$ , enquanto que a Xilanase 2 possui um valor cerca de dez vezes menor.

Tabela 6 – Concentração de proteína para as xilanases estudadas.

Enzima	Concentração ( $\text{g L}^{-1}$ )
Xilanase 1 (NS 50030)	$8,67 \pm 0,61$
Xilanase 2 (NS 50014)	$0,83 \pm 0,05$
Xilanase 3 (NS 22002)	$10,03 \pm 0,24$

### 4.2 ATIVIDADE DAS XILANASES

Além da temperatura padrão de  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  geralmente utilizada nos testes de atividade de xilanases, outras temperaturas também foram usadas, como indicado na Figura 26.

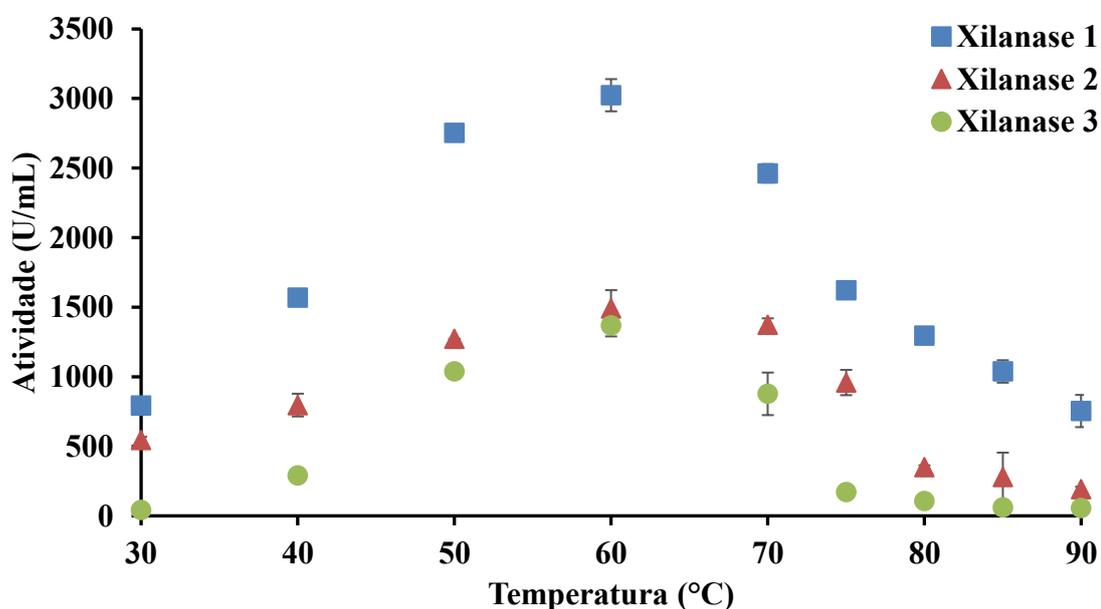


Figura 26 – Atividade de hidrólise, em  $\text{U mL}^{-1}$ , em função da temperatura, em  $^\circ\text{C}$ , para as xilanases estudadas.

Por meio do gráfico, pode-se observar que a Xilanase 1 apresentou uma atividade máxima duas vezes maior que ambas as Xilanases 2 e Xilanase 3. As atividades máximas ocorrem em aproximadamente  $60 \text{ }^\circ\text{C}$ . As temperaturas ótimas encontradas, após o ajuste de

uma função, estão listadas na Tabela 7. Os valores estão de acordo com os encontrados por Manrich et al. (2010).

Tabela 7 – Temperatura ótima para as xilanases estudadas.

Enzima	Temperatura ótima (°C)
Xilanase 1	59,7
Xilanase 2	59,4
Xilanase 3	64,6

Apesar do gráfico apresentar uma grande atividade para a Xilanase 1, cada frasco da solução enzimática possuía uma concentração diferente de proteína, calculada anteriormente pelo método de Bradford e apresentadas na Tabela 6. Na Figura 27 está apresentada a atividade específica das xilanases, em unidades por miligrama de proteína.

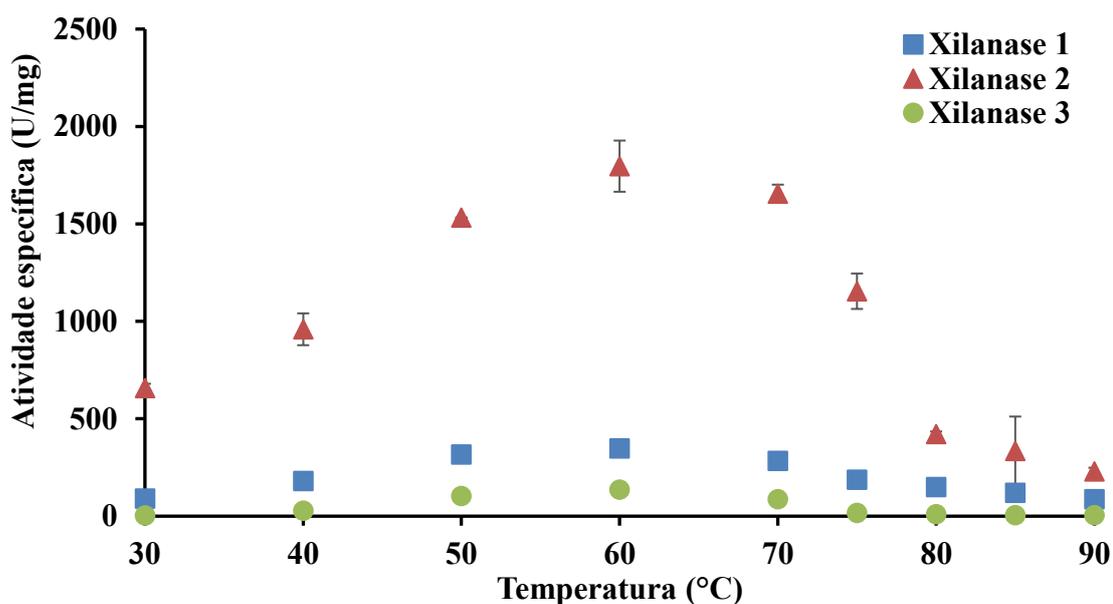


Figura 27 – Atividade de hidrólise de xilana, em  $\text{U mg}^{-1}$ , em função da temperatura, em  $^{\circ}\text{C}$ , para as xilanases estudadas.

Pode-se notar agora que a Xilanase 2 possui uma atividade específica até cinco vezes maior que as outras xilanases, de forma que seu menor teor de proteína no frasco original acaba por aproximar as atividades das três xilanases em termos de  $\text{U mL}^{-1}$ .

A influência do pH na atividade das xilanases pode ser vista na Figura 28 e na Tabela 8 é indicado o pH ótimo calculado, a partir do ajuste de uma função matemática aos dados obtidos.

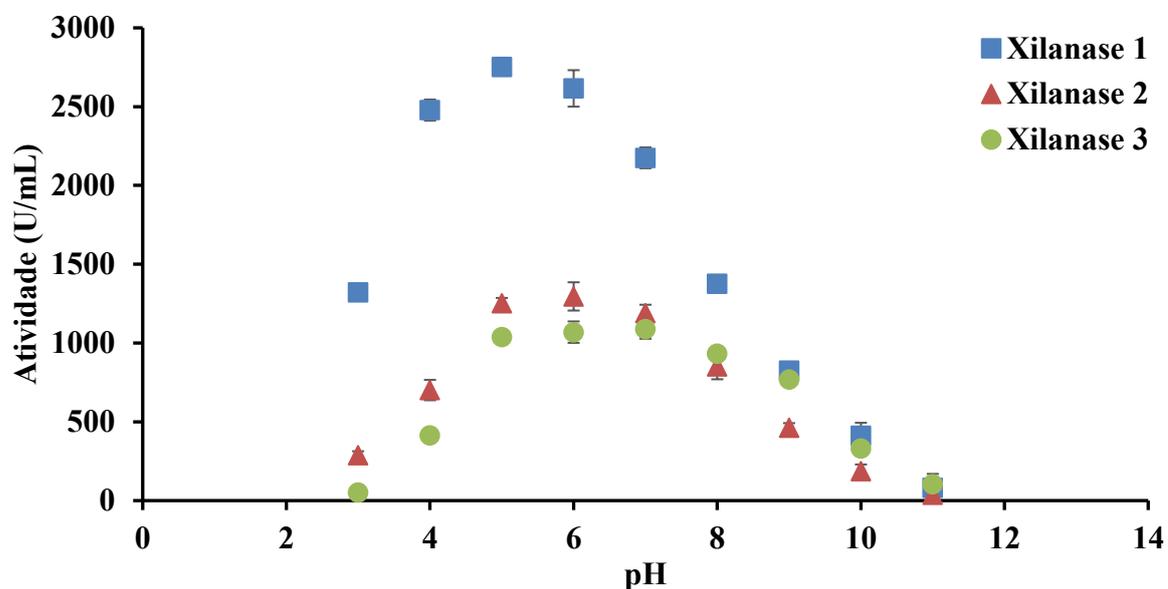


Figura 28 – Atividade de hidrólise em função do pH, em U mL<sup>-1</sup>, para as xilanases estudadas

Tabela 8 – pH ótimo para as xilanases estudadas.

Enzima	pH ótimo
Xilanase 1	5,1
Xilanase 2	5,9
Xilanase 3	6,5

Observou-se que o pH ótimo das xilanases foi levemente ácido, se enquadrando-se nas informações especificadas fornecidas pela fabricante e outros estudos com as mesmas xilanases (MANRICH et al., 2010).

#### 4.3 IMOBILIZAÇÃO DAS XILANASES

Como pode ser observado a partir dos dados da Tabela 9, o rendimento da imobilização das Xilanases 1 e 2 se situou em torno de 85%, significando que 15% da xilanase fornecida não se ligou ao suporte e foi perdida. Para a Xilanase 3, a perda foi um pouco maior, 25%. Como a sílica modificada era a mesma, a diferença dos resultados é devida às características das xilanases. Como o método de imobilização é baseado na ligação do glutaraldeído com grupos amino da enzima (provenientes do aminoácido lisina), é de se esperar que a quantidade e a

orientação dos grupos influenciem o grau de imobilização enzimática. Portanto, pode-se dizer que a Xilanase 3 apresentou uma quantidade menor de lisina disponível para imobilização, de forma que seu rendimento foi o menor das xilanases testadas.

Por outro lado, a análise do rendimento somente não é suficiente para estudar os resultados da imobilização, já que a enzima pode ter sua atividade modificada no processo da imobilização, podendo até ser completamente desativada em alguns casos (SHELDON; VAN PELT, 2013). Efeitos negativos podem surgir na enzima imobilizada quando há algum grupo amino próximo ao sítio ativo, a imobilização pode ocorrer por este ponto e o acesso do substrato ao sítio ativo estará comprometido, mesmo com o conjunto APTES+glutaraldeído atuando como espaçadores entre a xilanase e a sílica. Também, pode haver a distorção do sítio ativo da enzima com as novas ligações formadas, diminuindo sua atividade. Assim, apesar da Xilanase 3 ter apresentado o menor rendimento, sua eficiência foi a mais alta dentre as xilanases avaliadas, de forma que as Xilanases 1 e 2 sofreram uma maior perda de atividade durante a imobilização. A atividade específica do biocatalisador, em  $U\ g^{-1}$ , foi numericamente igual a atividade recuperada, de forma que a atividade específica se situou entre 60 e 70  $U\ g^{-1}$ .

A queda na atividade pode ser também explicada pela característica porosa da sílica utilizada e o tamanho da xilana, que pode causar dificuldade na transferência de massa dentro dos poros, subutilizando aquelas enzimas imobilizadas dentro dos poros.

Tabela 9 – Resultados da imobilização das xilanases em sílica.

<b>Enzima</b>	<b>Rendimento (%)</b>	<b>Eficiência (%)</b>	<b>Atividade recuperada (%)</b>	<b><math>U\ g^{-1}</math></b>
Xilanase 1	85	75	64	64
Xilanase 2	88	79	69	69
Xilanase 3	74	85	63	63

Da Tabela 10 pode-se observar outros estudos referentes à imobilização de xilanases focados com métodos de APTES e/ou glutaraldeído. Notou-se que a literatura apresenta uma grande variação de rendimento e eficiência de imobilização, e que os resultados deste trabalho se encontraram dentro da faixa dos resultados obtidos anteriormente.

Tabela 10 – Resultados de outros estudos com imobilização de xilanases.

Enzima	Rendimento (%)	Eficiência (%)	Atividade recuperada (%)	Referência
Xilanase NS 50014 (Novozymes), imobilizada em quitosana-glutaraldeído	86	101	87	MANRICH et al., 2010
Xilanase de <i>B. subtilis</i> imobilizada em quitosana-glutaraldeído	100	14	14	MILESSI et al., 2016
Xilanase de <i>B. pumilus</i> imobilizada em resina hidrofóbica com glutaraldeído	18	42	7	KAPOOR; KUHAD, 2007
Xilanase de <i>B. pumilus</i> imobilizada em óxido de ferro com glut+APTES	84	62	52	NAGAR et al., 2012

#### 4.4 REAÇÃO EM REATOR BATELADA

##### 4.4.1 Xilanase 1

Os perfis de concentração dos produtos da reação em batelada catalisada pela Xilanase 1 são mostrados na Figura 29, para as três temperaturas estudadas: 40; 50; e 60 °C. Neste caso, uma tendência geral observada é uma geração muito rápida de X4 no primeiro minuto de reação, seguida por um consumo igualmente rápido nos instantes seguintes, para então sua concentração começar a estabilizar a partir de duas ou três horas de reação. Então, se fosse

desejado um produto com alta concentração apenas de X4, um tempo de residência pequeno, menor ou igual a um minuto, seria adequado.

Para a concentração de X3, pode-se observar claramente seu comportamento de intermediário de reação, com sua concentração aumentando até um tempo de uma hora, e depois caindo e mantendo uma estabilidade. Para a concentração de X2 observou-se seu aumento contínuo até o final da reação, como era esperado. Apesar da ausência de informações específicas desta enzima, xilanases utilizam cadeias maiores de xilana como substrato, sendo uma molécula de X2 (com apenas duas unidades de xilose) muito pequena, então esta não é consumida, sendo, por isso, acumulada durante a reação. Finalmente, há uma pequena produção de X1 durante a reação, o que é indesejado na produção de oligossacarídeos, sendo que esta concentração dependerá muito da xilanase utilizada e da forma de condução da reação.

Com relação à temperatura, pode-se observar que para 40 °C a reação acontece de forma gradual, com as concentrações das substâncias analisadas variando até o final das 72 h de reação, enquanto que para as temperaturas mais altas a reação ocorre de forma mais rápida até 6 h, desacelerando até 24 h, com as concentrações se mantendo aproximadamente constantes depois deste instante.

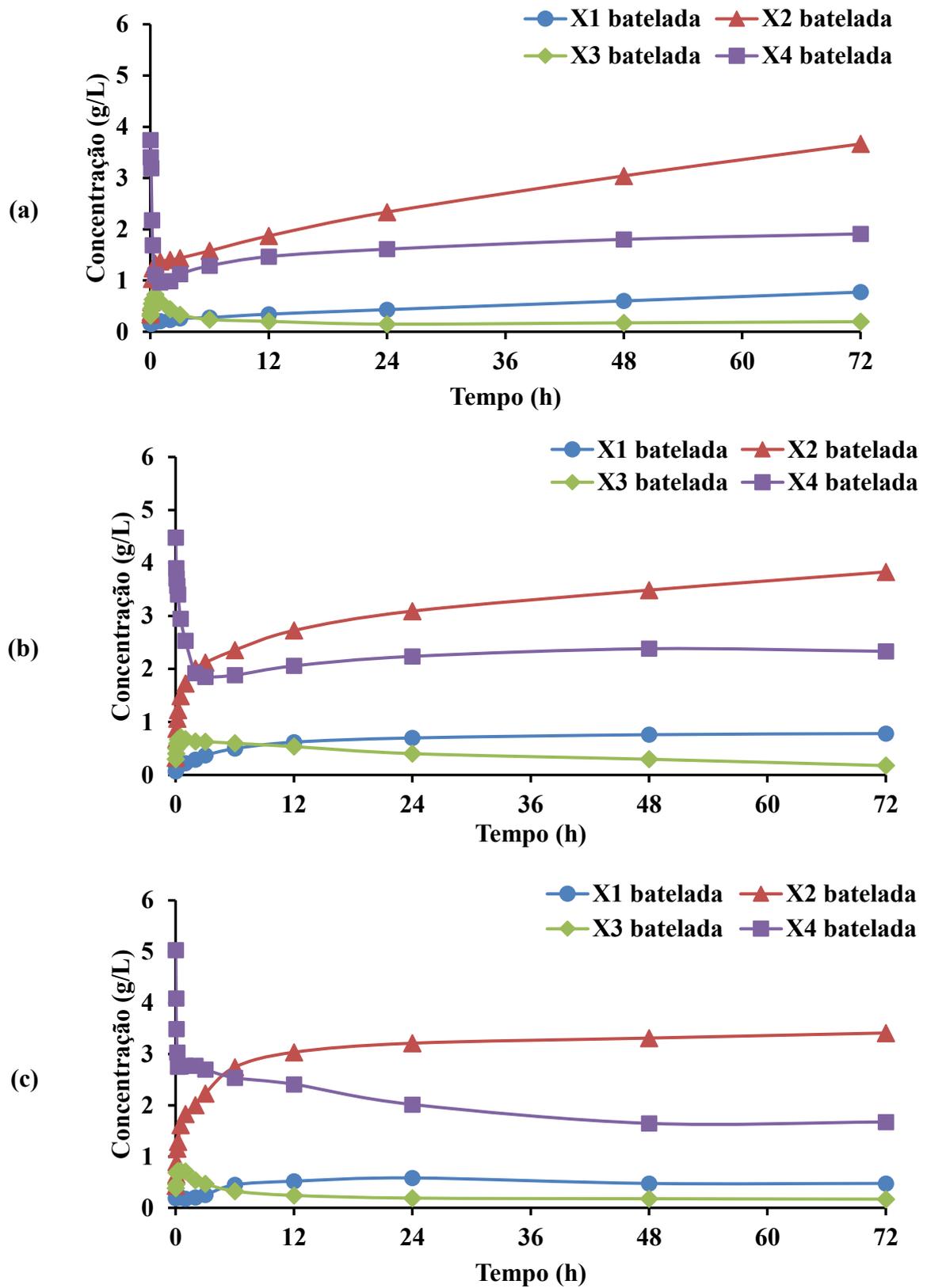


Figura 29 – Perfil de concentração dos produtos para a reação em batelada com a Xilanase 1: (a) 40 °C, (b) 50 °C, (c) 60 °C.

#### 4.4.2 Xilanase 2

Como pode ser visto por meio dos gráficos da Figura 30, os perfis de concentração para a reação catalisada pela Xilanase 2 são ligeiramente diferentes do caso do item anterior. Notou-se que, apesar da rápida produção de X4 no instante inicial da reação, seu consumo posterior não é tão pronunciado como no caso da Xilanase 1, de forma que sua concentração foi a maior dos produtos analisados. A concentração de X3 aqui também apresentou um perfil de intermediário, com um pico na concentração próximo de 3 h de reação, seguido por um lento consumo. Notou-se também que a produção de X3 foi maior que no caso da Xilanase 1, chegando a apresentar uma concentração cinco vezes maior que o caso anterior, mas que ainda assim é o produto da reação com menor concentração.

Para a concentração de X2, observou-se uma produção consideravelmente menor que no caso da Xilanase 1, sendo entre 40 e 60% menor. Finalmente, observou-se uma maior produção de X1, que pode ser uma característica da Xilanase 2.

Com relação à temperatura, notou-se uma perda de atividade enzimática mais pronunciada que a Xilanase 1, de forma que as reações a 40 e 50 °C apresentaram concentrações finais dos quatro produtos muito próximas, apesar da diferente velocidade inicial de reação. Para a temperatura de 60 °C observou-se uma rápida desativação, com a reação prosseguindo até aproximadamente 6 h, sendo que depois desse instante praticamente não há alterações nos perfis dos produtos.

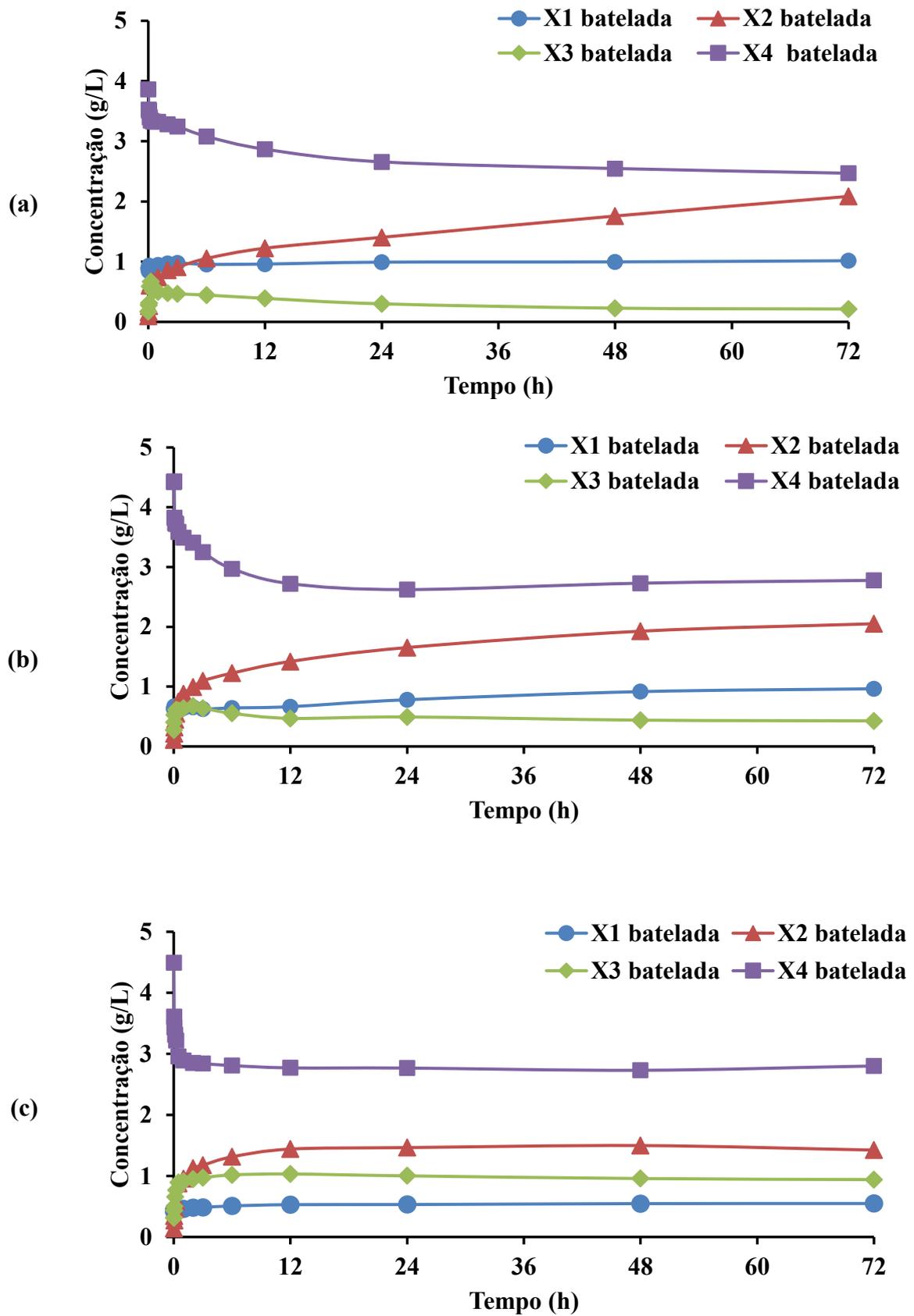


Figura 30 – Perfil de concentração dos produtos para a reação em batelada com a Xilanase 2: (a) 40 °C, (b) 50 °C, (c) 60 °C.

### 4.4.3 Xilanase 3

Com esta última xilanase, observou-se um esperado terceiro comportamento para os perfis de concentração dos produtos analisados. Para os perfis de X4 e X3 notou-se um comportamento semelhante aos casos anteriores, com uma rápida variação no início da reação e uma estabilização posterior. Uma diferença importante é observada para a curva de X2, na qual percebeu-se o consumo desta produto após 24 h de reação, o que não havia ocorrido nos experimentos anteriores. Este resultado não seria compatível com o comportamento padrão de xilanasas, que geralmente não consomem moléculas menores que três unidades de xilose. Uma possibilidade é que a Xilanase 3 esteja com uma pequena contaminação por xilosidase, que é uma enzima que atua somente nas extremidades da cadeia de xilanas, liberando então moléculas com apenas uma unidade de xilose. Este comportamento leva ao aumento da concentração de X1, que aumenta até o final da reação, podendo ser gerado não somente pelo consumo de X2, mas também por um provável consumo de X3 e X4.

Com relação à temperatura, observou-se que a Xilanase 3 foi um pouco menos impactada com o aumento da temperatura, sendo observado apenas para a temperatura de 60 °C a ocorrência de uma desativação significativa e um equilíbrio por volta de 24 h de reação. Para 60 °C, a concentração de X1 não foi tão elevada quanto em temperaturas menores, que provavelmente foi causada pela desativação prematura da enzima, pois se a reação não prosseguiu, também não houve a produção de X1.

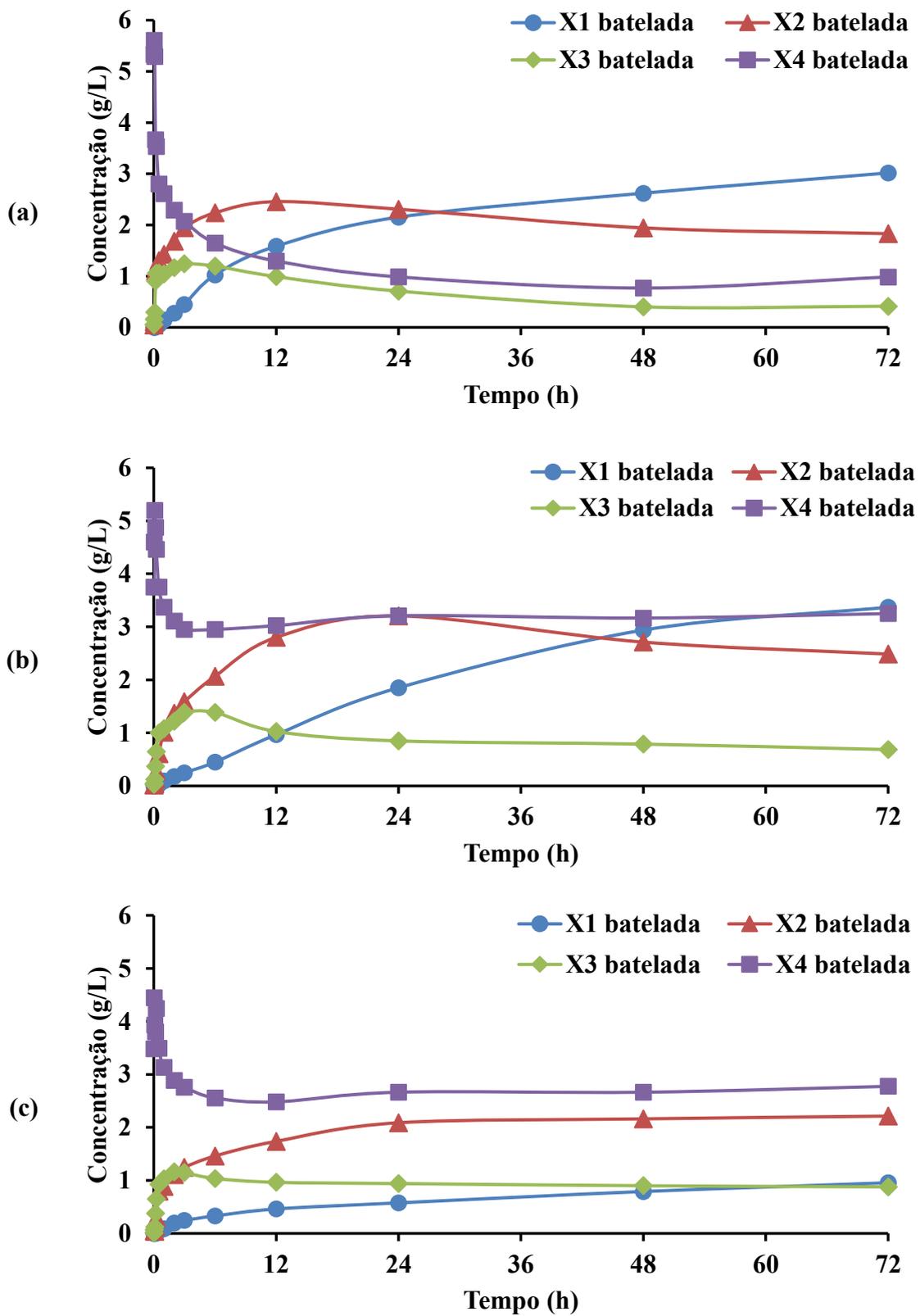


Figura 31 – Perfil de concentração dos produtos para a reação em batelada com a Xilanase 3: (a) 40 °C, (b) 50 °C, (c) 60 °C.

As concentrações para o tempo final de cada uma das reações estão apresentadas na Figura 32, a partir da qual pode ser realizada com mais clareza a comparação entre as três xilanases e temperaturas utilizadas nas reações batelada. Como pode ser inicialmente observado, as três xilanases apresentaram uma produção similar, já que a mesma atividade enzimática foi fornecida para cada um dos experimentos. Aqui observa-se facilmente para qual produto cada xilanase é mais específica; a Xilanase 1 produz mais X2 e uma quantidade menor de X4; a Xilanase 2 produz uma quantidade maior de X4, mas também uma maior quantidade de X1; e a Xilanase 3 acaba produzindo uma quantidade muito alta de X1, de forma que se esta concentração fosse ignorada no gráfico, sua produtividade seria menor entre as xilanases utilizadas, além de uma produção considerável de X4. Dessa maneira, a Tabela 11 apresenta as maiores concentrações de cada xilosídeo, relacionando com o experimento batelada respectivo. Assim, observou-se que cada xilanase apresentou seletividade específica para a produção de um xilosídeo de tamanho de cadeia dado, de forma que as condições reacionais necessárias para a maior ou menor produção de um xilosídeo, poderiam ser determinadas a partir do perfil de concentração obtido. Por exemplo, se uma baixa concentração de X1 fosse requerida, existiriam duas opções de condições: Xilanase 1 a 60 °C, com um foco maior em X2; e Xilanase 2, também a 60 °C, com um foco maior em X4.

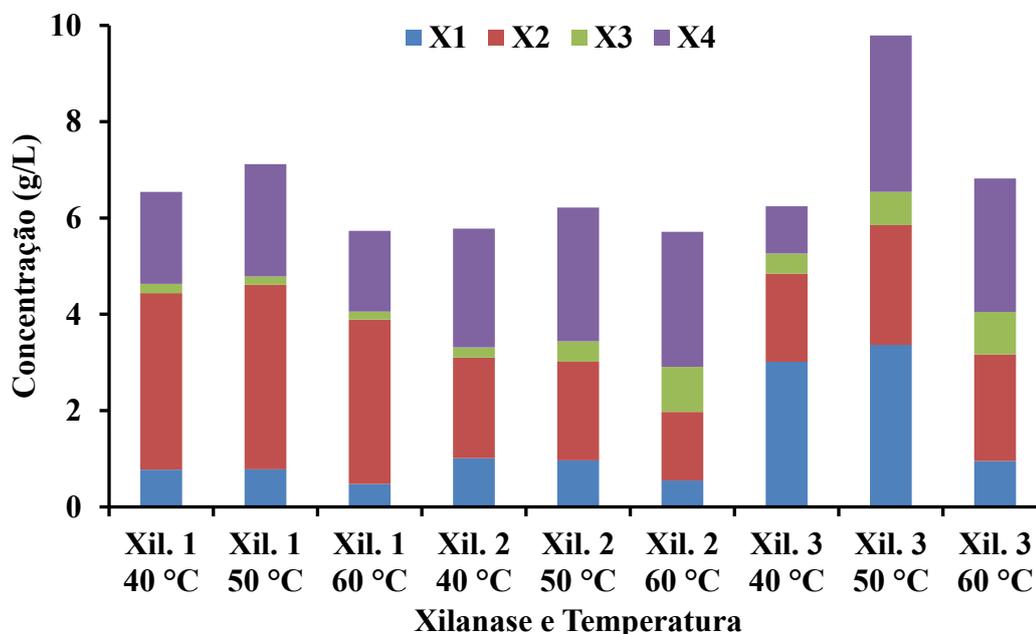


Figura 32 – Concentrações finais dos produtos para as reações batelada, após 72 h de reação.

Tabela 11 – Maior concentração de cada xilosídeo nas reações batelada.

Xilosídeo	Maior concentração
X1	3,37 g L <sup>-1</sup> ; Xilanase 3 50 °C
X2	3,83 g L <sup>-1</sup> ; Xilanase 1 50°C
X3	0,93 g L <sup>-1</sup> ; Xilanase 2 60 °C
X4	3,24 g L <sup>-1</sup> ; Xilanase 3 50 °C

#### 4.5 REAÇÃO EM MLFR (REATOR DE MICROCANAL COM ESCOAMETO LAMINAR)

##### 4.5.1 Xilanase 1

Para as reações em MLFR foram utilizadas as mesmas condições do modo batelada, com o intuito de realizar uma comparação direta entre os métodos. Para a Xilanase 1 observou-se um perfil de concentração similar ao modo batelada, mas com algumas diferenças importantes, como a produção de X1 que em nenhum momento foi maior que aquelas obtidas nas respectivas reações em batelada. Outro ponto interessante foi que as concentrações de X2, X3 e X4 foram maiores. Como temperatura, atividade enzimática e concentração de reagentes foram as mesmas, pode-se sugerir que esta diferença é devida apenas ao modo de reação, na qual a seletividade apenas para X1 foi reduzida e o rendimento dos outros produtos aumentou. Considerando os quatro produtos da reação, a produção do modo MLFR foi entre 30% maior em relação ao reator batelada, e considerando apenas os três xilosídeos o aumento foi de 40 %, justificando sua utilização.

Observou-se também que o efeito da temperatura na velocidade de reação foi similar àquele encontrado no modo batelada, com a temperatura de 50 °C aquela que apresentou a maior produção de xilosídeos, mesmo que na temperatura de 60 °C a velocidade inicial da reação tenha sido maior.

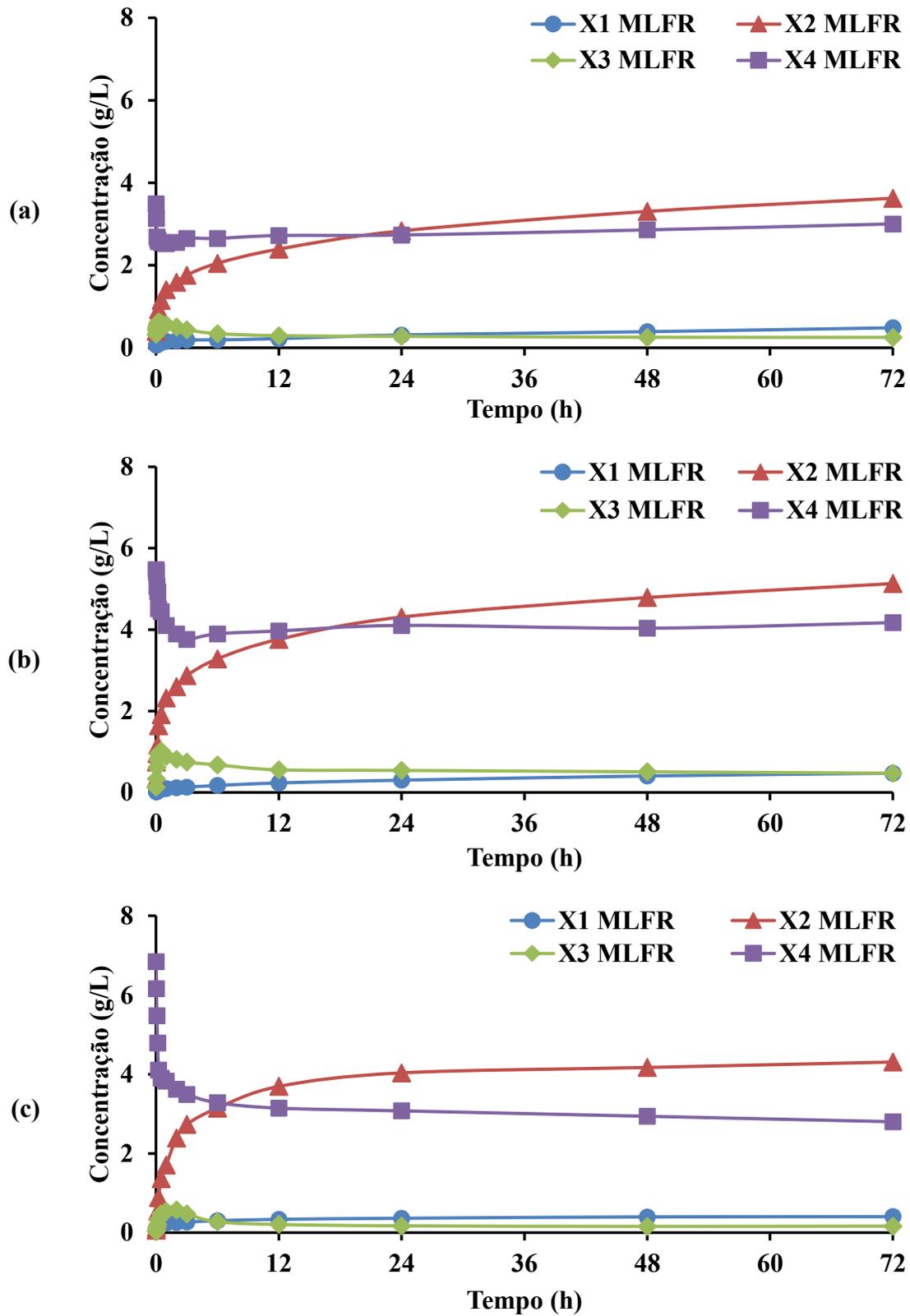


Figura 33 – Perfil de concentração dos produtos para a reação em MLFR com a Xilanase 1: (a) 40 °C, (b) 50 °C, (c) 60 °C.

#### **4.5.2 Xilanase 2**

Diferentemente dos resultados para a Xilanase 1, aqui os perfis de concentração dos produtos foram muito similares ao respectivo modo batelada, com ganhos gerais de produção na casa de 7% (considerando os quatro produtos) e de 12% (considerando apenas os oligoxilósídeos), de forma que houve um menor ganho significativo na reação por este modo MLFR de condução. Os perfis de concentração são mostrados na Figura 34.

#### **4.5.3 Xilanase 3**

Para a Xilanase 3 o resultado foi semelhante ao item anterior, com um aumento na produção total de 6% e aumento de oligoxilósídeos de 16%, como visto na Figura 35. Os perfis de concentração variaram mais com a temperatura, com uma produção grande de X1.

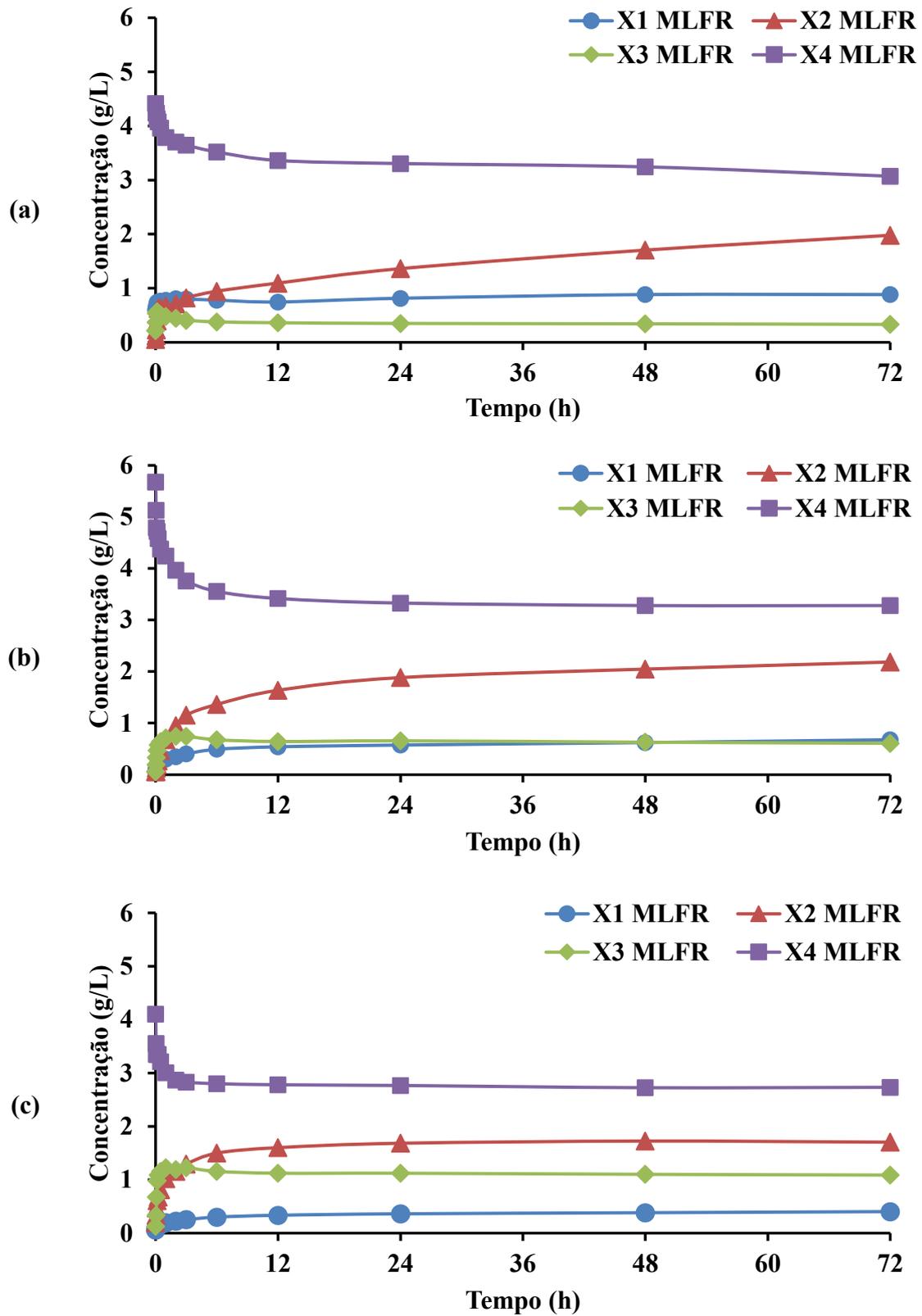


Figura 34 – Perfil de concentração dos produtos para a reação em MLFR com a Xilanasase 2:

(a) 40 °C, (b) 50 °C, (c) 60 °C.

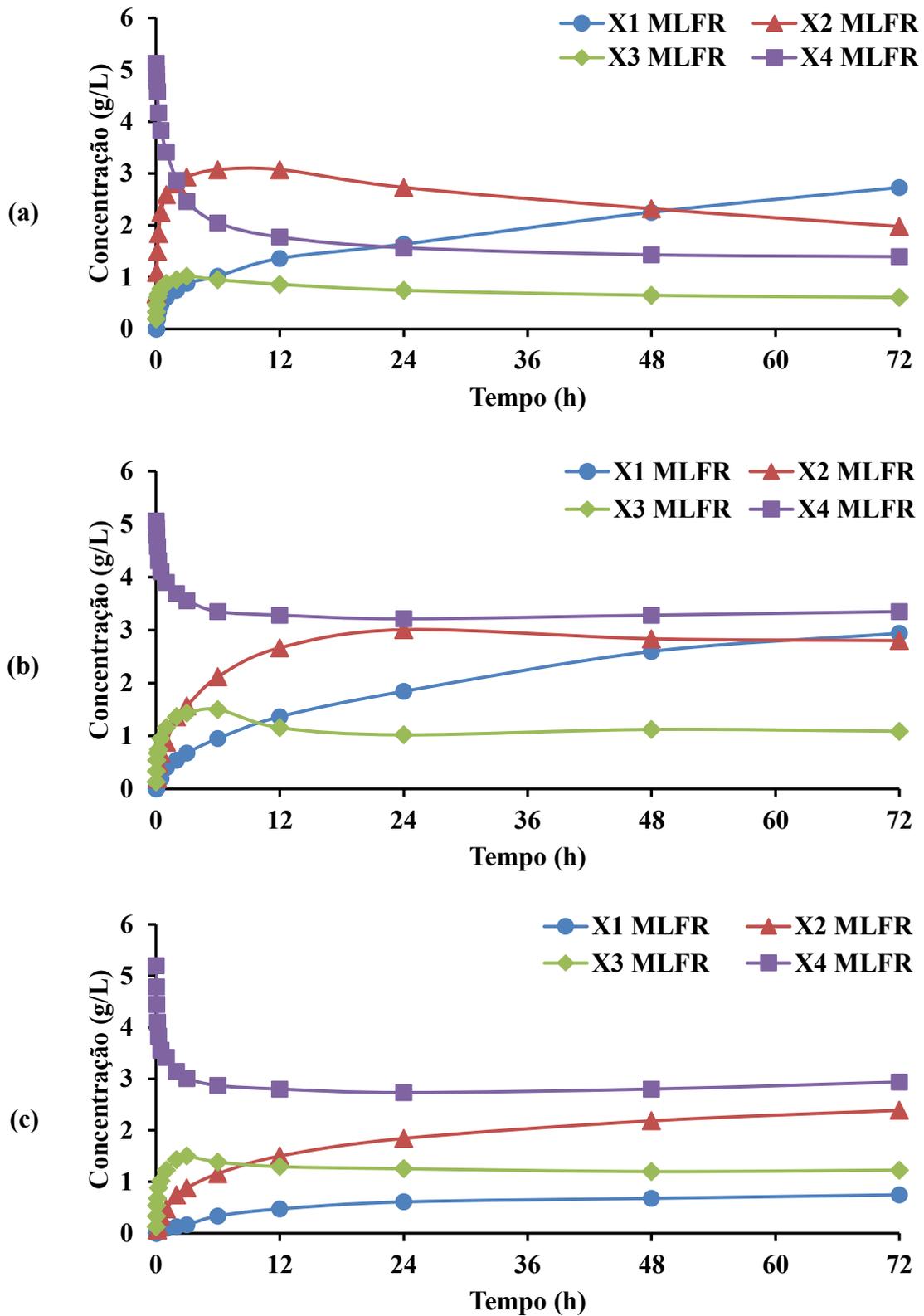


Figura 35 – Perfil de concentração dos produtos para a reação em MLFR com a Xilanasase 3:

(a) 40 °C, (b) 50 °C, (c) 60 °C.

Como pode ser visto na Figura 36, a maior produção para todos os casos ocorreu para a temperatura de 50 °C, sendo que temperaturas de 40 e 60 °C apresentaram produções totais semelhantes, com apenas algumas variações na proporção de cada produto. Por exemplo, para as Xilanases 2 e 3 há uma maior produção de X3 e menor de X1 na temperatura de 60 °C.

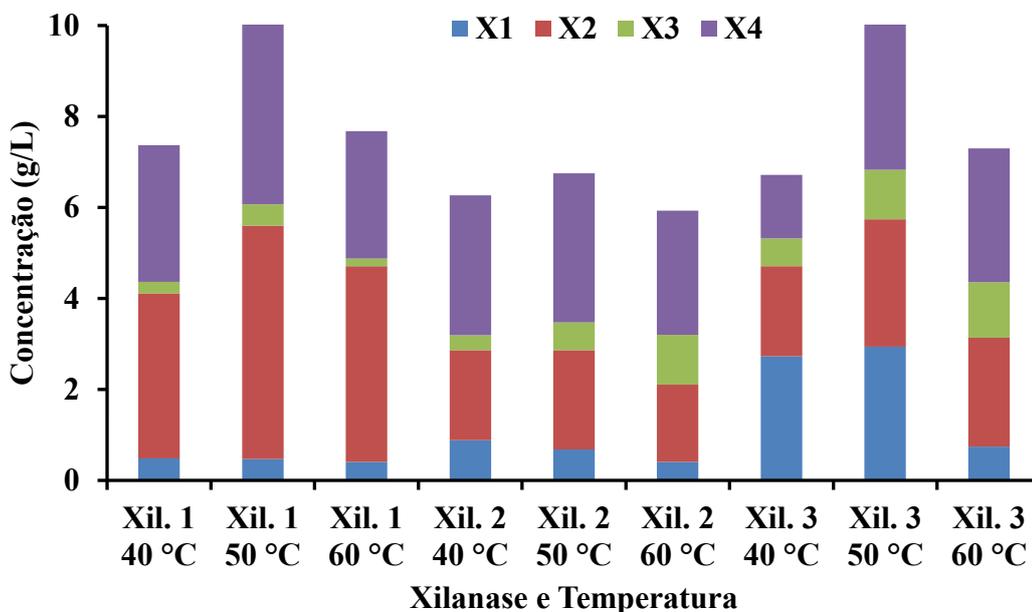


Figura 36 – Concentrações finais dos produtos para as reações em MLFR, após 72 h de reação.

A Tabela 12 apresenta as maiores concentrações de cada xilosídeo, relacionando com o experimento MLFR respectivo. A Xilanase 3 foi superior apenas na produção de X1, o que não é vantajoso em relação aos oligossacarídeos. A condição específica com Xilanase 2 a 50 °C foi superior para os produtos X2 e X4.

Tabela 12 – Maior concentração de cada xilosídeo nas reações em escoamento laminar.

Xilosídeo	Maior concentração
X1	2,94 g L <sup>-1</sup> ; Xilanase 3 50 °C
X2	5,13 g L <sup>-1</sup> ; Xilanase 1 50°C
X3	1,08 g L <sup>-1</sup> ; Xilanase 2 60 °C
X4	4,17 g L <sup>-1</sup> ; Xilanase 1 50 °C

As informações trazidas na Tabela 13 foram calculadas dividindo-se a produção no reator MLFR pela produção da batelada nas mesmas condições. Pode-se observar que em todos os casos houve um aumento na produção total (X1+X2+X3+X4), em menor grau para as Xilanases 2 e 3, e em uma maior escala para a Xilanase 1, que alcançou em um aumento máximo

de 44% para a temperatura de 50 °C. Além disso, pode-se observar que refazendo o cálculo excluindo-se a concentração de X1, para obter apenas o aumento na produção de oligoxilosídeos, o rendimento aumenta. Isto mostra que, mesmo que ocorra um aumento na produção de X1, o aumento das outras espécies é maior ainda. Cabe ressaltar que para a Xilanase 1 a 50 °C, o percentual de aumento saltou para 54% em oligoxilosídeos.

Tabela 13 – Aumento na produção para o reator MLFR, comparado com o reator batelada.

<b>Enzima e Temperatura</b>	<b>Aumento na produção total (%)</b>	<b>Aumento na produção de oligoxilosídeos (%)</b>
Xilanase 1, 40 °C	12,5	19,2
Xilanase 1, 50 °C	43,8	54,1
Xilanase 1, 60 °C	33,8	38,3
Xilanase 2, 40 °C	8,3	12,9
Xilanase 2, 50 °C	8,5	15,5
Xilanase 2, 60 °C	3,7	6,9
Xilanase 3, 40 °C	7,6	23,5
Xilanase 3, 50 °C	3,9	12,7
Xilanase 3, 60 °C	6,9	11,7

#### 4.6 REAÇÃO EM MPBR (REATOR DE MICROCANAL COM LEITO DE RECHEIO)

Para a sílica e a mangueira de silicone utilizada no MPBR, os seguintes parâmetros de empacotamento para um metro de reator foram mensurados:

$$\text{Volume total interno} = V_{\text{total}} = 3,14 \frac{\text{cm}^3}{\text{m de reator}}$$

$$\text{Massa de sílica} = 1,48 \frac{\text{g}}{\text{m de reator}}$$

Desta maneira, pode-se calcular a quantidade de xilanase para um comprimento de reator, baseando-se na atividade recuperada obtida na imobilização:

$$\text{Xilanase 1: Atividade} = 94,8 \frac{\text{U}}{\text{m de reator}}$$

$$\text{Xilanase 2: Atividade} = 102,1 \frac{\text{U}}{\text{m de reator}}$$

$$\text{Xilanase 3: Atividade} = 93,2 \frac{U}{\text{m de reator}}$$

Experimentos mostraram que, para uma vazão de  $1 \text{ mL h}^{-1}$ , que foi utilizada na alimentação do reator MPBR, o tempo de residência real para um metro de reator foi de 2 h. Com este tempo é possível calcular o volume livre ( $V_{\text{vazios}}$ ) para o escoamento do fluido, partindo da equação de tempo de residência:

$$\text{tempo de residência real} = \frac{\text{volume de vazios do reator}}{\text{vazão}} \rightarrow \tau_{\text{real}} = \frac{V_{\text{vazios}}}{v}$$

$$V_{\text{vazios}} = \tau_{\text{real}} \cdot v = 2 \text{ h} \cdot 1 \frac{\text{cm}^3}{\text{h}} = 2 \text{ cm}^3$$

Como a sílica ocupa um volume dentro do reator, o tempo de residência é menor; assim, é possível calcular a fração de vazios (espaço ocupado pelo líquido) para este sistema:

$$\varepsilon = \frac{\text{volume de vazios}}{\text{volume total do leito}} = \frac{V_{\text{vazios}}}{V_{\text{total}}} = \frac{2 \text{ cm}^3}{3,14 \text{ cm}^3} = 0,637$$

Assim, observa-se que mesmo com a adição da sílica, 63,7% do volume original do reator ainda está disponível para o escoamento da mistura reacional.

#### 4.6.1 Xilanase 1

Foi observada uma diferença muito significativa para a condução da reação em um reator de microcanal com leito de recheio. Primeiramente, as concentrações de X4 foram maiores que no caso batelada, sendo a concentração entre duas e cinco vezes maior. O perfil para X2 apresentou um aumento de desempenho semelhante, com uma concentração até quatro vezes maior que a obtida no caso batelada.

Outra mudança também altamente significativa em relação ao caso batelada foi a queda na concentração de X1 e X3, com uma diminuição de até dez vezes. Este efeito também foi observado para as outras duas xilanases imobilizadas, de forma que possivelmente é o modo de operação e a própria imobilização que causaram este efeito, alterando a seletividade da reação.

Com relação à temperatura, observou-se novamente como a reação prosseguiu em menor extensão com o aumento da temperatura.

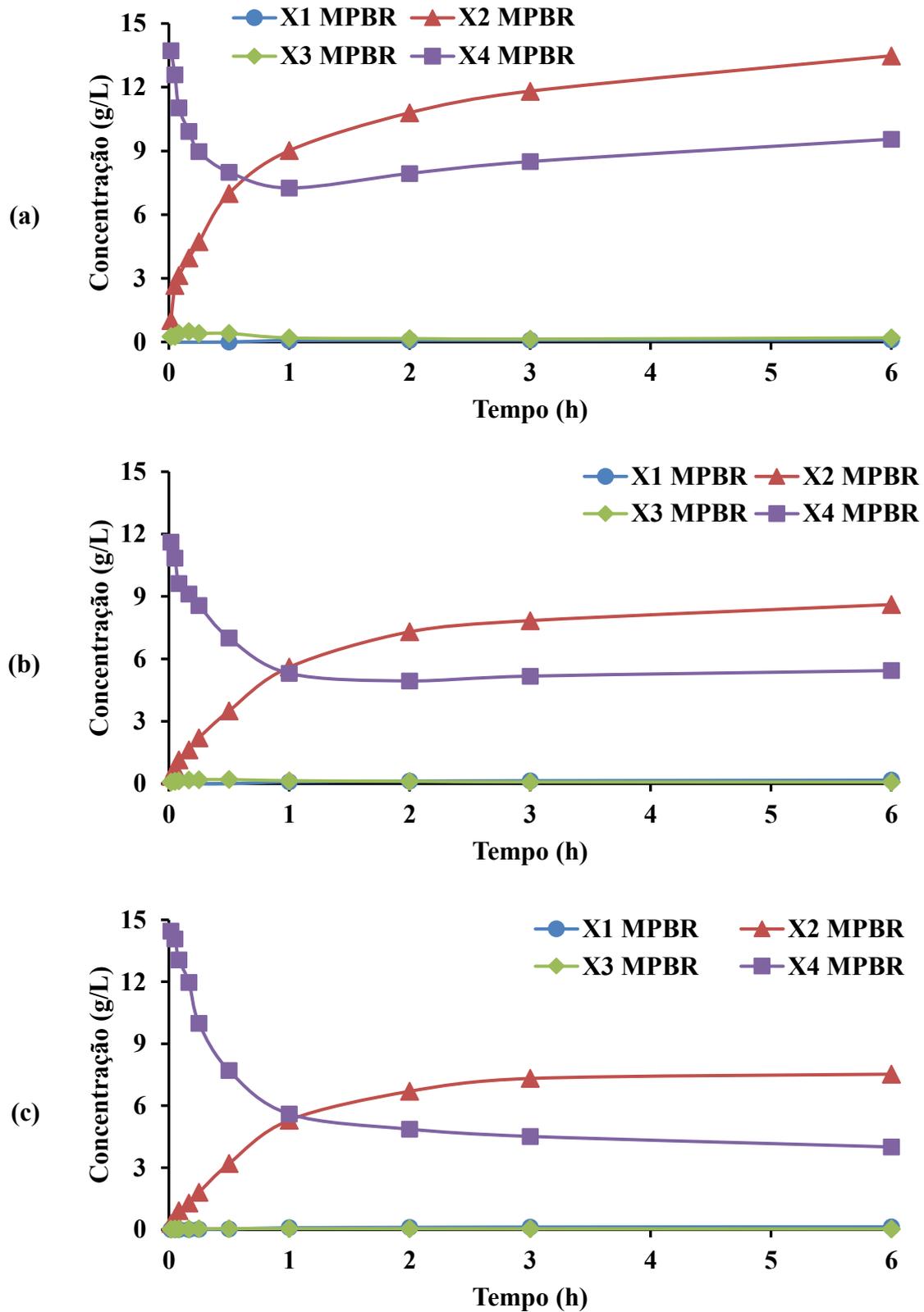


Figura 37 – Perfil de concentração dos produtos para a reação em MPBR com a Xilanase 1: (a) 40 °C, (b) 50 °C, (c) 60 °C.

#### **4.6.2 Xilanase 2**

Para a Xilanase 2 os efeitos do modo MPBR da reação foram um pouco menos pronunciados que para a Xilanase 1. De uma forma geral, as concentrações de X2 e X4 foram entre duas e três vezes maiores que o modo batelada, enquanto que as concentrações de X1 e X3 sofreram uma queda de até cinco vezes. Os perfis correspondentes estão apresentados na Figura 38.

#### **4.6.3 Xilanase 3**

Da mesma forma que para o item anterior, as concentrações para X2 e X4 foram duas vezes maior que o modo batelada, enquanto que as concentrações de X1 e X3 foram cerca de quatro vezes menores. Pode-se observar ainda um consumo de X2 após 12 h de reação, mas de forma mais atenuada que o caso batelada. Os perfis correspondentes estão apresentados na Figura 39.

Como a Xilanase 3 poderia estar com contaminação com xilosidades, o processo de imobilização enzimática pode ter influenciado na minimização desta contaminação, de forma que a produção de X1 foi menor que nos outros modos de conduzir a reação.

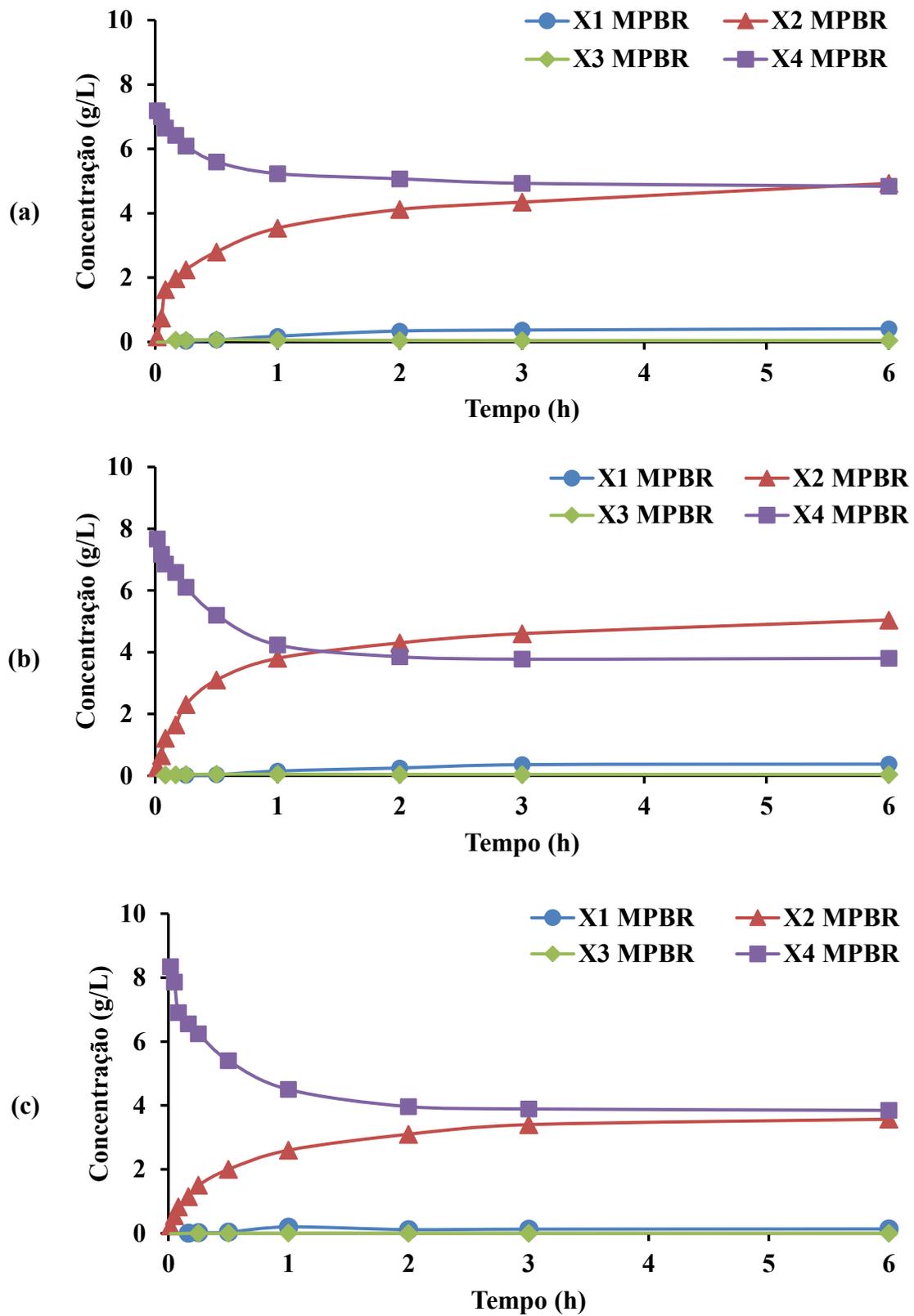


Figura 38 – Perfil de concentração dos produtos para a reação em MPBR com a Xilanase 2: (a) 40 °C, (b) 50 °C, (c) 60 °C.

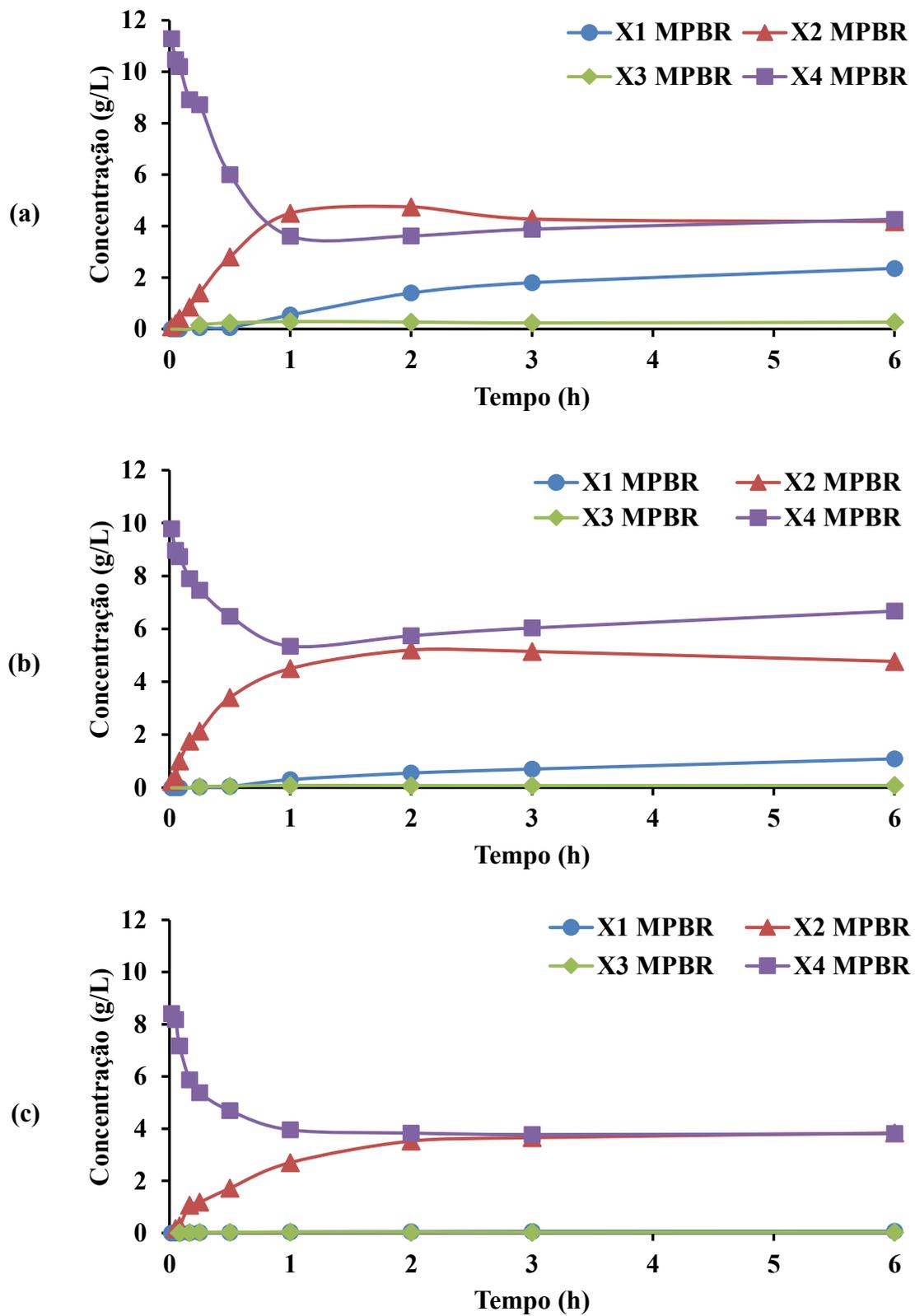


Figura 39 – Perfil de concentração dos produtos para a reação em MPBR com a Xilanase 3:

(a) 40 °C, (b) 50 °C, (c) 60 °C.

A Tabela 14 apresenta as maiores concentrações de cada xilosídeo, relacionando com o experimento MPBR respectivo. Aqui a Xilanase 2 não foi responsável por nenhuma concentração máxima dos produtos, enquanto que a Xilanase 1 apresentou picos de X2 e X4, e a Xilanase 3 apresentou picos de X1 e X3, de forma que a enzima poderia ser escolhida de acordo com o produto desejado.

Tabela 14 – Maior concentração de cada xilosídeo nas reações em leito fixo.

Xilosídeo	Maior concentração
X1	2,35 g L <sup>-1</sup> ; Xilanase 3 40 °C
X2	13,51 g L <sup>-1</sup> ; Xilanase 1 40°C
X3	0,26 g L <sup>-1</sup> ; Xilanase 3 40 °C
X4	9,55 g L <sup>-1</sup> ; Xilanase 1 40 °C

As concentrações para o tempo final de cada uma das reações em leito fixo estão apresentadas na Figura 40. Observou-se para a Xilanase 1 uma forte influência da temperatura, sendo que a 60 °C a produção de oligoxilosídeos foi aproximadamente metade daquela vista a 40 °C, sempre com uma seletividade um pouco maior de X2. Em todos os casos houve uma produção muito pequena de X3; e mesmo a Xilanase 3, que produzia muito X1, produziu uma quantidade relativamente menor deste produto, principalmente para as maiores temperaturas.

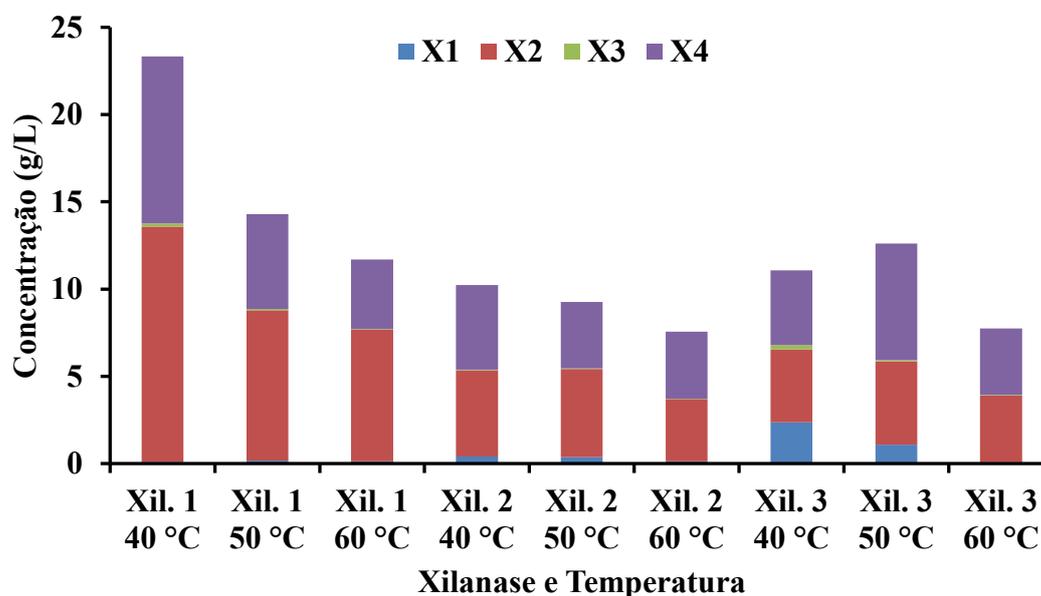


Figura 40 – Concentrações finais dos produtos para as reações em leito fixo, após 6 h de reação.

Foi calculado também para os reatores MPBR o aumento na produção em relação ao reator batelada. Na Tabela 15 pode-se observar que a produção aumentou de forma significativa, com destaque para a Xilanase 1, a qual apresenta uma distribuição de produtos favorável à obtenção de oligoxilosídeos.

Este resultado ressalta o potencial dos reatores de microcanais empacotados na síntese enzimática de oligoxilosídeos.

Tabela 15 – Aumento na produção para o reator MPBR, comparado com o reator batelada.

<b>Enzima e Temperatura</b>	<b>Aumento na produção total (%)</b>	<b>Aumento na produção de oligoxilosídeos (%)</b>
Xilanase 1, 40 °C	256,5	302,6
Xilanase 1, 50 °C	100,6	122,7
Xilanase 1, 60 °C	104,2	119,9
Xilanase 2, 40 °C	76,8	105,9
Xilanase 2, 50 °C	48,9	69,1
Xilanase 2, 60 °C	32,2	43,6
Xilanase 3, 40 °C	77,2	169,9
Xilanase 3, 50 °C	28,8	79,4
Xilanase 3, 60 °C	13,5	30,8

## 5 CONCLUSÕES

Neste trabalho foi realizado um estudo experimental da transglicosilação de xilanas de bétula com diferentes xilanases, em três modos diferentes de reação, sendo os reatores dos tipos batelada, de microcanal com escoamento laminar, e de microcanal com leito de recheio. A partir dos resultados obtidos, é possível destacar algumas conclusões sobre o processo e as diferenças encontradas entre os modos diferentes de reação.

Inicialmente foi encontrado que a imobilização das xilanases em sílica, utilizando a metodologia do APTES com glutaraldeído, apresentou resultados condizentes com a literatura, sendo obtida no final uma atividade enzimática de aproximadamente 100 unidades por grama de sílica. Por serem xilanases comerciais, não se tinham informações mais aprofundadas sobre suas características e grupos funcionais, que poderiam ser utilizados em imobilizações mais complexas.

Para as reações batelada, foi observado que as diferentes xilanases apresentaram resultados distintos de produção e seletividade, o que já seria esperado. Por exemplo, a Xilanase 3 apresentou uma produção equivalente às outras, mas com uma seletividade grande para o produto X1, com uma unidade de xilose, o que não seria desejado em um estudo sobre oligossacarídeos. Encontrou-se também que para todos os experimentos o produto X3 apresentou uma concentração baixa, possível características das xilanases utilizadas.

As reações em escoamento laminar foram realizadas em um reator em espiral fabricado em PDMS, com as mesmas condições operacionais das reações em batelada. Foi encontrado que o reator de microcanal com escoamento laminar foi superior ao reator batelada em todos os casos, com um percentual entre 4 e 44% maior, o que por si já é um resultado muito interessante. Adicionalmente, observou-se que o aumento percentual na produção de oligossacarídeos foi maior que o percentual geral, de forma que a seletividade para estas espécies foi melhorada, o que é um bom resultado para este estudo.

Para o reator de microcanal com leito de recheio com xilanase imobilizada em sílica, observou-se uma produção maior para uma mesma quantidade de atividade enzimática, além de uma mudança de seletividade da reação, com pouca prioridade para os produtos X1 e X3, possivelmente causada pelo processo de imobilização. O aumento na produção de oligossacarídeos extremamente elevado, alcançando 302%, para a Xilanase 1 a 40 °C.

Portanto, por meio destes resultados, pode-se observar que apenas alterando o modo de operação do reator, uma maior produtividade pode ser obtida. Além disso, a realização de experimentos com microrreator promove uma economia grande de reagentes, sendo que uma pequena quantidade de cada um destes foi utilizada durante o trabalho.

## 5.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Este trabalho teve como intuito iniciar os estudos com microcanais no grupo de pesquisa, de forma que pode ser continuado abordando novos enfoques:

- explorar os tempos de reação muito curtos com apenas poucos minutos de tempo de residência, período em que predomina a produção de X4, que um resultado altamente interessante do ponto de vista da aplicação dos produtos da reação;
- utilizar xilanas de outras fontes: neste trabalho foi usada xilana de bétula, uma árvore sem relação com nosso cotidiano, sendo que não está mais disponível comercialmente. Poderia ser utilizada uma xilana de cana-de-açúcar ou sabugo de milho, que já apresentam um maior envolvimento com o cenário brasileiro;
- modificar os substituintes na reação de transglicosilação: este trabalho utilizou glicolato de butila como substituinte, e vários outros trabalhos da literatura utilizaram álcoois. Poderiam ser utilizadas outras substâncias para adicionar cadeias diferentes ao xilo-oligossacarídeos;
- isolar e purificar os compostos, utilizando-os em reações subsequentes: utilizando técnicas apropriadas de separação, pode-se isolar os compostos produzidos e estudar individualmente suas propriedades, ainda com a possibilidade da realização de reações subsequentes para a produção de novos compostos.

## 6 REFERÊNCIAS

ÁLVAREZ, C. et al. Optimized use of hemicellulose within a biorefinery for processing high value-added xylooligosaccharides. **Industrial Crops and Products**, v. 99, p. 41–48, 2017.

ANASTAS, P.; EGHBALI, N. Green Chemistry: Principles and Practice. **Chem. Soc. Rev.**, v. 39, n. 1, p. 301–312, 2010.

ANASTAS, P. T.; WARNER, J. C. **Green Chemistry: theory and practice**. New York: Oxford University Press, 1998.

ARAGON, C. C. et al. Continuous production of xylooligosaccharides in a packed bed reactor with immobilized-stabilized biocatalysts of xylanase from *Aspergillus versicolor*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 98, p. 8–14, 2013.

BAILEY, M. J.; BIELY, P.; POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **Journal of Biotechnology**, v. 23, n. 3, p. 257–270, 1992.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Biochemistry**. 5th editio ed. [s.l.] W. H. Freeman and Company, 2002.

BHARDWAJ, N.; KUMAR, B.; VERMA, P. A detailed overview of xylanases: an emerging biomolecule for current and future prospective. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 6, n. 1, 2019.

BOLIVAR, J. M.; NIDETZKY, B. Smart enzyme immobilization in microstructured reactors. **Chimica Oggi/Chemistry Today**, v. 31, n. 3, p. 50–54, 2013.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.

BROEKER, J. et al. The hemicellulose-degrading enzyme system of the thermophilic bacterium *Clostridium stercorarium*: Comparative characterisation and addition of new hemicellulolytic glycoside hydrolases. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, n. 1, p. 1–18, 2018.

BRUSA, C. et al. Chemoenzymatic synthesis of “click” xylosides and xylobiosides from

lignocellulosic biomass. **RSC Advances**, v. 4, n. 18, p. 9330–9338, 2014.

BURLACU, A.; CORNEA, C. P.; ISRAEL-ROMING, F. Microbial xylanase: a review. **Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies**, v. 20, p. 335–342, 2016.

CARVALHO, F. et al. An integrated approach for the detailed characterization of an immobilized enzyme. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 125, p. 64–74, 2016.

CHADHA, B. S. et al. Thermostable xylanases from thermophilic fungi and bacteria: Current perspective. **Bioresource Technology**, v. 277, n. November 2018, p. 195–203, 2019.

CHANG, S. et al. An efficient production of high-pure xylooligosaccharides from corncob with affinity adsorption-enzymatic reaction integrated approach. **Bioresource Technology**, v. 241, p. 1043–1049, 2017.

CHAPLA, D.; PANDIT, P.; SHAH, A. Bioresource Technology Production of xylooligosaccharides from corncob xylan by fungal xylanase and their utilization by probiotics. **Bioresource Technology**, v. 115, p. 215–221, 2012.

CIPOLATTI, E. P. et al. Enzymes in Green Chemistry: The State of the Art in Chemical Transformations. **Advances in Enzyme Technology**, p. 137–151, 2019.

CLARK, J. H. Green chemistry : challenges and opportunities. **Green Chemistry**, v. 1, n. February, p. 1–8, 1999.

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

DANGLA, R.; GALLAIRE, F.; BAROUD, C. N. Microchannel deformations due to solvent-induced PDMS swelling. **Lab on a chip**, v. 10, n. 21, p. 2972–2978, 2010.

DOS SANTOS, A. C. et al. Lignin–Enzyme Interactions in the Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass. **Trends in Biotechnology**, v. 37, n. 5, p. 518–531, 2019.

ELVIRA, K. S. et al. The past, present and potential for microfluidic reactor technology in chemical synthesis. **Nature chemistry**, v. 5, n. 11, p. 905–915, 2013.

GATARD, S. et al. Preparation of new  $\beta$ -D-xyloside- and  $\beta$ -D-xylobioside-based ionic liquids through chemical and/or enzymatic reactions. **Carbohydrate Research**, v. 451, p. 72–80, 2017.

GHOSE, T. K.; BISARIA, V. S. Measurement of hemicellulase activities: Part I Xylanases. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, n. 12, p. 1739–1752, 1987.

HURLBERT, J. C.; III, J. F. P. Functional Characterization of a Novel Xylanase from a Corn Strain of. **Society**, v. 183, n. 6, p. 2093–2100, 2001.

III, D. I. W. et al. Enabling Microfluidics : from Clean Rooms to Makerspaces. **Trends in Biotechnology**, v. 35, n. 5, p. 383–392, 2017.

JEDVERT, K.; HEINZE, T. Cellulose modification and shaping - A review. **Journal of Polymer Engineering**, v. 37, n. 9, p. 845–860, 2017.

JIANG, Z. et al. Transglycosylation reaction of xylanase B from the hyperthermophilic *Thermotoga maritima* with the ability of synthesis of tertiary alkyl  $\beta$ -D-xylobiosides and xylosides. **Journal of Biotechnology**, v. 114, n. 1–2, p. 125–134, 2004.

KANG, S. C. et al. Surface immobilization on silica of endoxylanase produced from recombinant *Bacillus subtilis*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 12, n. 5, p. 766–772, 2002.

KAPOOR, M.; KUHAD, R. C. Immobilization of xylanase from *Bacillus pumilus* strain MK001 and its application in production of xylo-oligosaccharides. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 142, n. 2, p. 125–138, 2007.

KARIN, B. et al.  $\alpha$ -D-Glucuronidases from the xylanolytic thermophiles *Clostridium stercorarium* and *Thermoanaerobacterium saccharoyticum*. n. 1995, p. 2033–2040, 1995.

KOH, K. S. et al. Quantitative studies on PDMS-PDMS interface bonding with piranha solution and its swelling effect. **Micromachines**, v. 3, n. 2, p. 427–441, 2012.

LEE, J. N.; PARK, C.; WHITESIDES, G. M. Solvent Compatibility of Poly(dimethylsiloxane)-Based Microfluidic Devices. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 23, p. 6544–6554, 2003.

LIN, Q. et al. Production of xylooligosaccharides by microwave-induced, organic acid-catalyzed hydrolysis of different xylan-type hemicelluloses: Optimization by response surface methodology. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 214–225, 2017.

LIU, M.; SUN, J.; CHEN, Q. Influences of heating temperature on mechanical properties of polydimethylsiloxane. **Sensors and Actuators, A: Physical**, v. 151, n. 1, p. 42–45, 2009.

LIU, X. et al. Hemicellulose from Plant Biomass in Medical and Pharmaceutical Application: A Critical Review. **Current Medicinal Chemistry**, v. 24, p. 1–21, 2018.

LONG, J. et al. A novel method for pullulanase immobilized onto magnetic chitosan/Fe 3O4 composite nanoparticles by in situ preparation and evaluation of the enzyme stability. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 109, p. 53–61, 2014.

MADIGAN, M. T. et al. **Brock Biology of Microorganisms**. 13th editi ed. San Francisco: Pearson Education, 2012.

MANRICH, A. et al. Immobilization and Stabilization of Xylanase by Multipoint Covalent Attachment on Agarose and on Chitosan Supports. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 161, p. 455–467, 2010.

MASON, B. P. et al. Greener approaches to organic synthesis using microreactor technology. **Chemical Reviews**, v. 107, n. 6, p. 2300–2318, 2007.

MATSUMURA, S. et al. Surface Activity, Antimicrobial Properties and Biodegradability of n-Alkyl Xylosides, Xylobiosides, and Xylotriosides. **Journal of Japan Oil Chemists' Society**, v. 47, n. 3, p. 247- 255,291, 1998.

MATSUMURA, S.; SAKIYAMA, K.; TOSHIMA, K. Preparation of octyl-B-D-xylobioside ad xyloside by xylanase catalyzed direct transglycosylation reaction of xylan and octanol. **Biotechnology Letters**, v. 21, p. 17–22, 1999.

MILESSI, T. S. S. et al. Immobilization and stabilization of an endoxylanase from *Bacillus subtilis* (XynA) for xylooligosaccharides (XOs) production. **Catalysis Today**, v. 259, p. 130–139, 2016.

MOTTA, F. L.; ANDRADE, C. C. P.; SANTANA, M. H. A. A Review of Xylanase Production by the Fermentation of Xylan: Classification, Characterization and Applications. In: CHANDEL, A. K.; SILVA, S. S. (Eds.). . **Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization**. 1. ed. Rijeka: IntechOpen, 2013. p. 275.

NAGAR, S. et al. Immobilization of xylanase on glutaraldehyde activated aluminum oxide pellets for increasing digestibility of poultry feed. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 9, p. 1402–1410, 2012.

NAIDU, D. S.; HLANGOTHI, S. P.; JOHN, M. J. Bio-based products from xylan: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 179, n. 1, p. 28–41, 2018.

NAKAMURA, T.; TOSHIMA, K.; MATSUMURA, S. One-step synthesis of n -octyl  $\beta$  - D -xylotrioside , xylobioside and xyloside from xylan and n- octanol using acetone powder of *Aureobasidium pullulans* in supercritical fluids. n. 1996, p. 1183–1189, 2000.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger's Principles of Biochemistry**. 5th editio ed. New York: W. H. Freeman and Company, 2008.

OCHS, M. et al. Enzymatic synthesis of alkyl  $\beta$ -d-xylosides and oligoxylosides from xylans and from hydrothermally pretreated wheat bran. **Green Chemistry**, v. 13, n. 9, p. 2380, 2011.

PAL, A.; KHANUM, F. Covalent immobilization of xylanase on glutaraldehyde activated alginate beads using response surface methodology: Characterization of immobilized enzyme. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 6, p. 1315–1322, 2011.

PETZOLD-WELCKE, K. et al. Xylan derivatives and their application potential - Mini-review of own results. **Carbohydrate Polymers**, v. 100, p. 80–88, 2014.

RAJENDRANI, M. When PDMS isn't the best. **Analytical Chemistry**, n. 1, p. 1–5, 2007.

RAVINDRAN, R.; JAISWAL, A. K. A comprehensive review on pre-treatment strategy for lignocellulosic food industry waste: Challenges and opportunities. **Bioresource**

**Technology**, v. 199, p. 92–102, 2016.

REDDY, S. S.; KRISHNAN, C. Production of high-pure xylooligosaccharides from sugarcane bagasse using crude  $\beta$ -xylosidase-free xylanase of *Bacillus subtilis* KCX006 and their biogenic function. **LWT - Food Science and Technology**, v. 65, p. 237–245, 2016.

ROMERO-FERNÁNDEZ, M. et al. Designing continuous flow reaction of xylan hydrolysis for xylooligosaccharides production in packed-bed reactors using xylanase immobilized on methacrylic polymer-based supports. **Bioresource Technology**, v. 266, n. May, p. 249–258, 2018.

SAGGIOMO, V.; VELDERS, A. H. Simple 3D Printed Scaffold-Removal Method for the Fabrication of Intricate Microfluidic Devices. **Advanced Science**, v. 2, n. 9, p. 1–5, 2015.

SHELDON, R. A. Engineering a more sustainable world through catalysis and green chemistry. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 13, n. 116, p. 1–7, 2016.

SHELDON, R. A.; VAN PELT, S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. **Chem. Soc. Rev.**, v. 42, n. 15, p. 6223–6235, 2013.

SUHAS et al. Cellulose: A review as natural, modified and activated carbon adsorbent. **Bioresource Technology**, v. 216, p. 1066–1076, 2016.

SURYAWANSHI, P. L. et al. A review on microreactors: Reactor fabrication, design, and cutting-edge applications. **Chemical Engineering Science**, v. 189, p. 431–448, 2018.

TELEMAN, A. et al. Characterization of O-acetyl-(4-O-methylglucurono)xylan isolated from birch and beech. **Carbohydrate Research**, v. 337, n. 4, p. 373–377, 2002.

UPTON, B. M.; KASKO, A. M. Strategies for the Conversion of Lignin to High-Value Polymeric Materials: Review and Perspective. **Chemical reviews**, v. 116, n. 4, p. 2275–306, 2016.

VAN DAM, R. M. **Solvent-Resistant Elastomeric Microfluidic Devices and Applications**. [s.l.] California Institute of Technology, 2005.

VANDENBERG, E. T. et al. Structure of 3-aminopropyl triethoxy silane on silicon

oxide. **Journal of Colloid And Interface Science**, v. 147, n. 1, p. 103–118, 1991.

VASHIST, S. K. et al. Immobilization of antibodies and enzymes on 3-aminopropyltriethoxysilane-functionalized bioanalytical platforms for biosensors and diagnostics. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 21, p. 11083–11130, 2014.

WANG, S. et al. Magnetic nanoparticles coated with immobilized alkaline phosphatase for enzymolysis and enzyme inhibition assays. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 1, n. 12, p. 1749–1754, 2013.

WATTS, P.; WILES, C. Micro reactors: a new tool for the synthetic chemist. **Organic & biomolecular chemistry**, v. 5, n. 5, p. 727–32, 2007.

WIJNEN, B. et al. Open-source syringe pump library. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, p. 1–8, 2014.

WOHLGEMUTH, R. et al. Microscale technology and biocatalytic processes: opportunities and challenges for synthesis. **Trends in Biotechnology**, v. 33, n. 5, p. 302–314, 2015.

WU, H. et al. Microfluidic enzymatic-reactors for peptide mapping: strategy, characterization, and performance. **Lab on a chip**, v. 4, n. 6, p. 588–97, 2004.

WU, H. et al. Heterologous Expression of a New Acetyl Xylan Esterase from *Aspergillus niger* BE-2 and its Synergistic Action with Xylan-Degrading Enzymes in the Hydrolysis of Bamboo Biomass. **BioResources**, v. 12, n. 1, p. 434–447, 2016.

ZANIN, G. M.; MORAES, F. F. DE. Enzimas Imobilizadas. In: SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. (Eds.). **Enzimas como Agentes Biotecnológicos**. 1. ed. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004. p. 35–85.

ZHANG, H.; XU, Y.; YU, S. Co-production of functional xylooligosaccharides and fermentable sugars from corncob with effective acetic acid prehydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 234, p. 343–349, 2017.

ZHOU, J.; ELLIS, A. V.; VOELCKER, N. H. Recent developments in PDMS surface modification for microfluidic devices. **Electrophoresis**, v. 31, n. 1, p. 2–16, 2010.

ZHOU, X. et al. A critical review on hemicellulose pyrolysis. **Energy Technology**, v. 5, n. 1, p. 52–79, 2017.

APÊNDICE 1 – Curva padrão para a solução de Bradford.

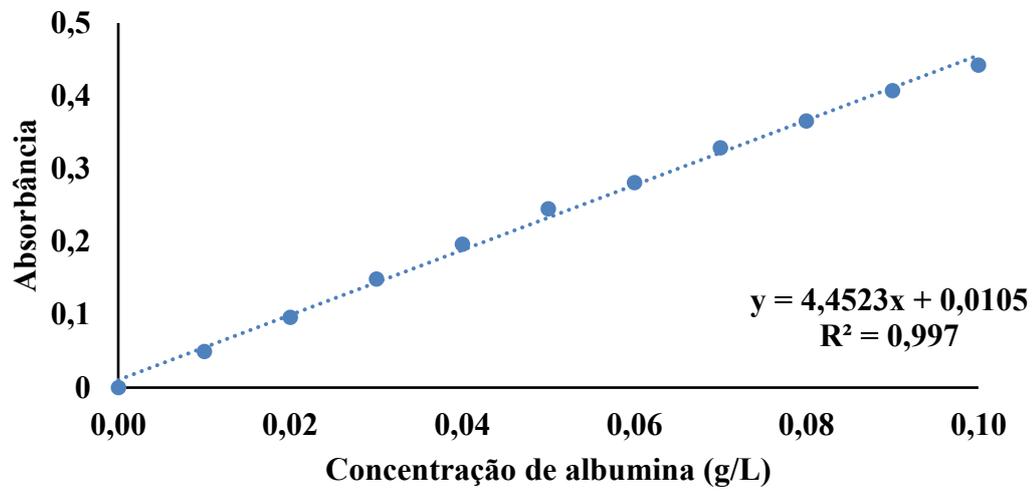


Figura 41 – Curva padrão para a solução de Bradford.

APÊNDICE 2 – Curva padrão para o método DNS.

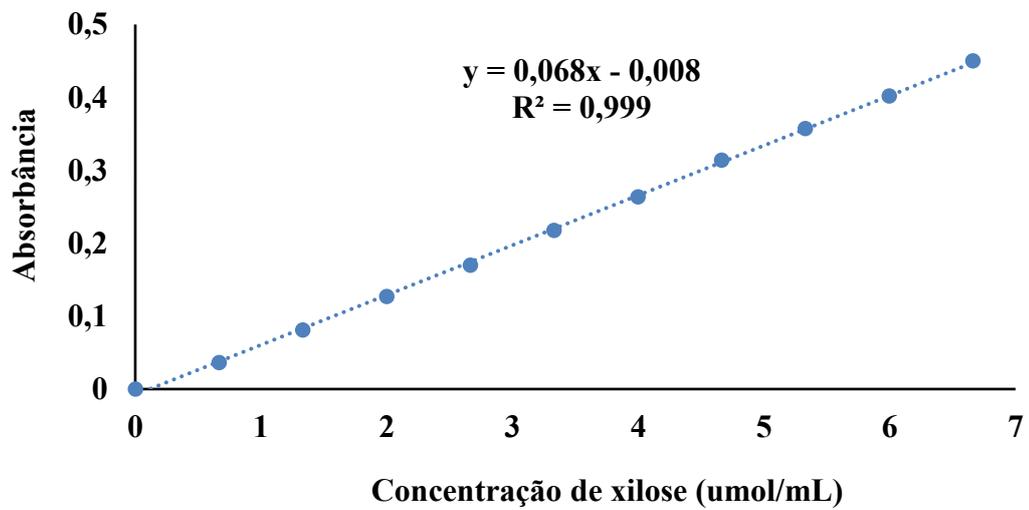


Figura 42 – Curva padrão para o método DNS.