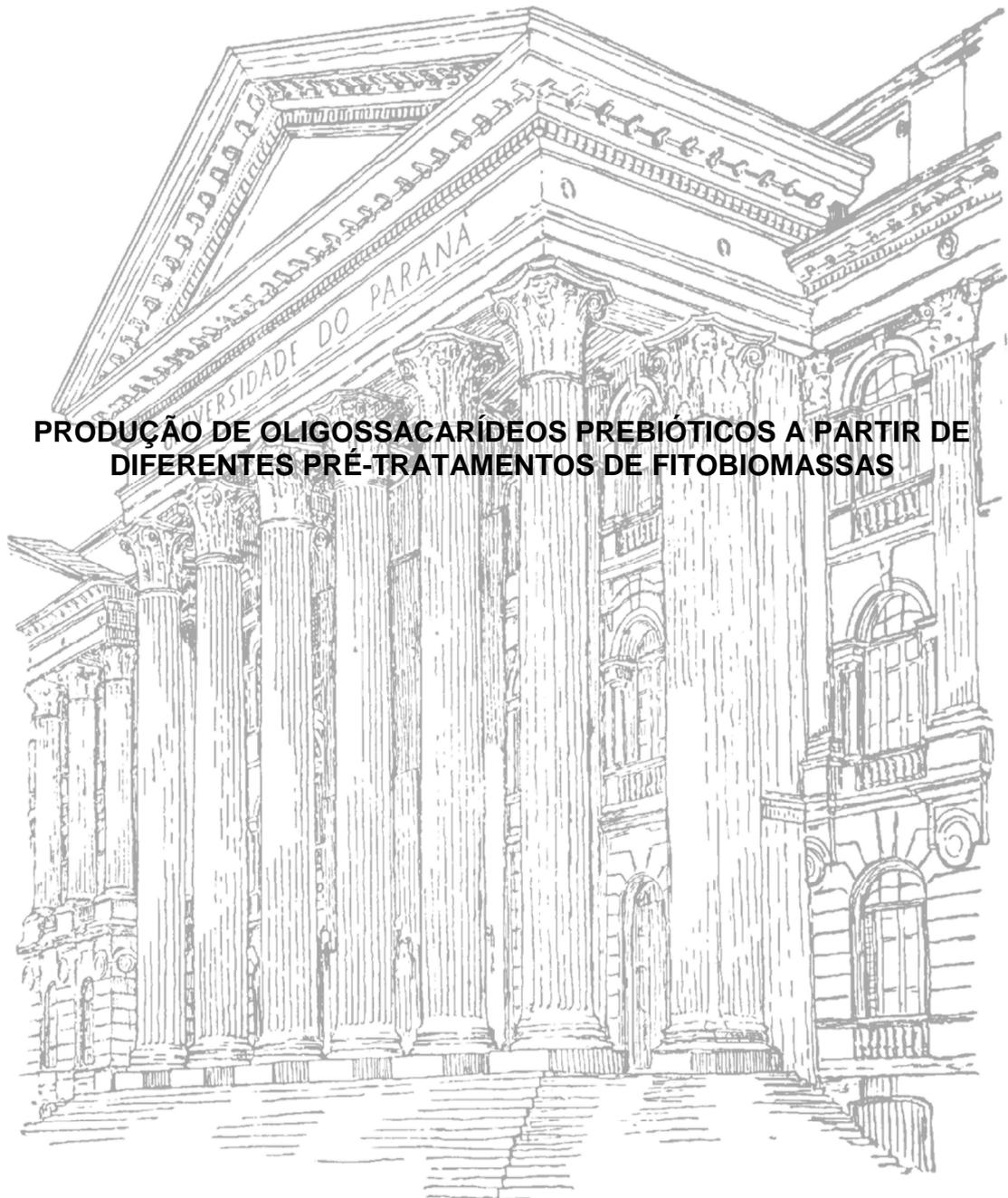


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARCELA TIBONI



**PRODUÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS PREBIÓTICOS A PARTIR DE  
DIFERENTES PRÉ-TRATAMENTOS DE FITOBIOMASSAS**

CURITIBA  
2015

MARCELA TIBONI

PRODUÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS PREBIÓTICOS A PARTIR DE  
DIFERENTES PRÉ-TRATAMENTOS DE FITOBIOMASSAS

Tese apresentada como requisito parcial à  
obtenção do grau de Doutora pelo Programa de  
Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor  
de Ciências da Saúde, Universidade Federal do  
Paraná.

Orientador: Prof. Dr. José Domingos Fontana  
Coorientadora: Dra. Adelia Grzybowski

CURITIBA  
2015

Tiboni, Marcela  
Produção de oligossacarídeos prebióticos a partir de diferentes pré-tratamentos de fitobiomassas / Marcela Tiboni. - Curitiba, 2015.  
175 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm.

Orientador: Professor Dr. José Domingos Fontana  
Coorientadora: Professora Dra. Adelia Grzybowski  
Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas,  
Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. 2015.

Inclui bibliografia

1. Hidrólise ácida e enzimática. 2. Ligno(hemi)celulósicos. 3. *Achatina fulica*.  
4. *Aspergillus niger*. 5. Probióticos. I. Fontana, José Domingos. II. Grzybowski,  
Adelia. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 615.19

# TERMO DE APROVAÇÃO

**MARCELA TIBONI**

Título: **“Produção de oligossacarídeos prebióticos a partir de diferentes pré-tratamentos de fitobiomassa”**

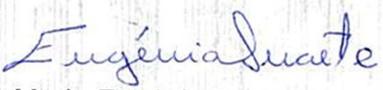
Tese aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Doutor, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, medicamentos e correlatos.



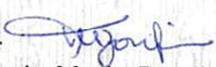
Prof. Dr. José Domingos Fontana  
Orientador



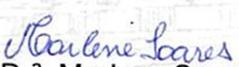
Prof. Dr. Alan Guilherme Gonçalves  
Universidade Federal do Paraná



Profª. Drª. Maria Eugênia Duarte Nosedá  
Universidade Federal do Paraná



Profª. Drª. Tania Maria Bordin Bonfim  
Universidade Federal do Paraná



Profª. Drª. Marlene Soares  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Curitiba, 06 de março de 2015.

Aos meus pais que estiveram ao meu lado não apenas nos momentos de sucesso, mas também nos momentos de fracasso, onde me ofereceram consolo e segurança os quais não encontro em qualquer outro lugar.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador José Domingos Fontana, que me iniciou na pesquisa científica ainda no mestrado e sempre me deu oportunidades de desenvolvimento profissional e pessoal e também muito me incentivou através de suas inúmeras e criativas ideias.

À minha coorientadora, Adelia Grzybowski que aceitou embarcar comigo não apenas neste, mas em diversos projetos durante toda minha estada no LQBB.

A todo grupo do LQBB, Gizele Baldo, Lucas Scremin, Heide Koop e Cassandra Krüger, pela ajuda constante, seja auxiliando nas análises, seja nos questionamentos sobre outros experimentos, sempre me dando a oportunidade de aprender com a diversidade e principalmente tornando o ambiente de trabalho cheio de companheirismo.

À minha mãe Maria Angélica que além de todo amor, me ensinou a ter valores e força de vontade para seguir em frente, sempre valorizando meus potenciais.

Ao meu pai Vanio Luiz e sua esposa Sheila, maiores incentivadores para que eu siga a carreira acadêmica, sempre me dando força e comemorando junto a cada conquista.

Ao Bruno pela paciência e compreensão. Agradeço a sua amizade, carinho e atenção que foram fundamentais para a finalização desta tese.

Às minhas irmãs Rafaele, Fernanda e Giovanna, que sempre estiveram presentes, mesmo de longe, me aconselhando e incentivando com carinho e dedicação.

Às minhas sobrinhas Manuela e Maria Luiza que mesmo tão pequenas me trouxeram muitas alegrias.

Às amigas Alessandra, Bianca, Georgia e Giovana pelo companheirismo e amizade, mesmo estando por vezes distantes.

Aos amigos João Gasparetto e Maurício Passos pelos prestimosos socorros cromatográficos.

Ao Departamento Acadêmico de Química e Biologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, bem como ao seu Programa de Pós-Graduação em

Ciência e Tecnologia Ambiental, representado principalmente pelo prof. Thomaz Aurélio Pagioro, não apenas pelo espaço físico para o desenvolvimento do projeto, mas também pela confiança prestada ao me oportunizar a chance de ministrar palestras e cursos, auxiliando na minha formação acadêmica.

Ao Wagner Spirandelli por prover através da COCAMAR (Maringá) e da CLASPAR (Curitiba) as amostras de bagaço de cana.

Aos professores Umberto Klock e Eliana Lopes da Silva do laboratório de polpa e papel da Universidade Federal do Paraná pela doação da serragem de *Pinus taeda*.

Ao Éder M. Bordin, da empresa Novozymes Latin America Ltda. - Araucária/PR, pela doação de amostras de enzimas celulolíticas.

À Dra. Marta Luciane Fischer e seu orientado biólogo Eduardo Colley da PUC-PR pelos exemplares cedidos de *Achatina fulica* e ao Sr. Paschoal Pauletti pela coleta de grande lote de moluscos.

A Capes, pelo auxílio financeiro, através das bolsas de apoio aos planos de Reestruturação e Expansão das Universidades Federais (REUNI) e Demanda Social (DS), que possibilitou a realização deste trabalho.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução desta tese de doutorado.

**Muito Obrigada!**

*“Descobrir consiste em olhar para o que todo mundo está vendo e pensar uma coisa diferente”.*

Roger Von Oech

*“O que prevemos raramente ocorre; o que menos esperamos geralmente acontece.”*

Benjamin Disraeli

*“A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez”.*

George Bernard Shaw

## RESUMO

Oligossacarídeos (OS) prebióticos, que auxiliam na promoção da saúde intestinal, foram produzidos a partir de fitobiomassa, tanto quando se utilizou a técnica de pré-processamento de ligno(hemi)celulósicos, bagaço de cana e serragem de *Pinus taeda*, por termopressurização com ácido fosfórico diluído, quanto por hidrólise de galactomananas, utilizando enzimas do suco digestivo do molusco *Achatina fulica* ou de enzimas extra e/ou intracelulares de *Aspergillus niger*, induzidas pela presença de polissacarídeos.

A hidrólise por termopressurização ocorreu com variação do pH de ácido O-fosfórico de 1,75 até 2,5, utilizando água como controle, e também das pressões de 3 atm (144 °C) até 12 atm (192 °C). Quanto à produção de OS, o bagaço propiciou os melhores rendimentos (mg/g) com maior porcentagem de pureza nas condições entre 7 e 8 atm e pH entre 2,2 e 2,5. Já com o *Pinus*, foram requeridas condições ligeiramente mais brandas, entre 5 e 7 atm e pH entre 2,3 e 2,5. Visando otimizar o processo de produção de OS, uma alteração metodológica foi avaliada, com a proporção biomassa:ácido passando de 1:6 para 1:8 (m/v) e a filtração simples por lâ de vidro alterada para funil de placa porosa associada a vácuo. Nestes ensaios o pH variou entre 1,5 e 2,5 e a pressão entre 7 atm (171 °C) e 10 atm (185 °C). Considerando as melhores respostas obtidas, a produção de OS passou de 59,21 para 100,26 mg/g para o bagaço e de 65,68 para 107,26 mg/g para *Pinus*. Entretanto houve uma redução na pureza dos hidrolisados, de cerca de 90% para 71,87% para o bagaço e 80,40% para *Pinus*. Analisado os dados através de planejamento fatorial, o pH é a variável mais significativa (do que a pressão/temperatura) para variação das respostas de produção e pureza e que para ambas as biomassas avaliadas a condição ótima foi de pH 2,5 e 2,25 a 7 atm. Os OS produzidos foram utilizados como fonte de carbono em cultivos de *Lactobacillus casei* Shirota e de *Bifidobacterium animalis* havendo biossíntese de ácidos graxos de cadeia curta (ácido láctico e/ou acético) atingindo ápice após 72 h de cultivo com pH final de 4,7 para OS de bagaço e 4,5 para OS de *Pinus*. Considerando a sacarificação enzimática da celulose residual proveniente do pré-tratamento fosfórico com celulasas industriais, comparativamente aos controles nativos, todas as condições avaliadas revelaram-se benéficas e nos melhores casos, em cinco vezes para o bagaço e três vezes para o caso de *Pinus*.

A obtenção de enzimas a partir de indução com galactomananas e pectina cítrica, realizada por cultivo em meio líquido e agitação, ocorreu de maneira satisfatória com a formação de *pellets* de *Aspergillus niger*. Foram obtidas <130 µg e <250 µg de proteínas totais/mL para as amostras extra e intracelulares, respectivamente. A coleta do suco digestivo do *Achatina fulica* (SDAf) foi realizada a partir de moluscos considerados jovens e adultos (conchas >3 cm) e mostrou alta concentração proteica, na ordem de 202 mg/mL. Testes de atividade enzimática com *P*-nitrofenil-glucosídeos indicaram alta atividade de α-galactosidase e β-glucosidase para as amostras de *A. niger* e β-manosidase e β-glucosidase para o SDAf. A porcentagem de hidrólise com polissacarídeos diversos em 24 h, 35 °C e 140 rpm (0,33 g), mostrou que as enzimas mais eficientes de *A. niger* foram as extra e intracelulares induzidas com goma de guar, respectivamente, ensaiadas com os substratos alfarroba (3,65 e 4,87%), guar (5,88 e 4,33%) e bracinga (3,83 e 3,25%) com liberação de OS. As enzimas induzidas com goma de alfarroba liberaram apenas as

unidades de  $\alpha$ -galactose das ramificações. O SDAf mostrou potencial para a hidrólise de todos os polissacarídeos avaliados, mas por conter baixa atividade  $\alpha$ -galactosidase, não conseguiu hidrolisar com eficiência galactomananas mais substituídas como as da bracinga (apenas 4,36%). Conforme o grau de substituição reduz, ocorre aumento do poder hidrolítico com goma guar (8,54%) e alfarroba (33,66%). Os OS de alfarroba, obtidos por hidrólise dom SDAf, foram capazes de promover o crescimento dos micro-organismos probióticos, com a produção dos ácidos láctico, acético e propiônico com o crescimento de *L. casei* e destes mesmos ácidos mais o ácido succínico com *B. animalis*.

Palavras-Chave: Hidrólise ácida e enzimática. Ligno(hemi)celulósicos. *Achatina fulica*. *Aspergillus niger*. Lactobacilos. Bifidobactérias.

## ABSTRACT

Prebiotic oligosaccharides (OS), which assist in the intestinal health promotion, were produced from phytobiomass, both when using sugar cane bagasse or pine sawdust ligno(hemi)celluloses thermo-pressurization pre-processing technique with diluted phosphoric acid, or galactomannans hydrolysis using the digestive juice of *Achatina fulica* or *Aspergillus niger* intra- and extra-cellular enzymes induced by polysaccharides.

The thermo-pressurization hydrolysis occurred varying the phosphoric acid pH from 1.75 to 2.5, using water as control, and pressures of 3 atm (144 °C) to 12 atm (192 °C). OS production showed best yields (mg/g) with the highest purity percentages when obtained from sugarcane bagasse hydrolysis in conditions between 7 to 8 atm and pH between 2.2 and 2.5. *Pinus taeda* required slightly milder conditions, between 5 to 7 atm and pH between 2.3 and 2.5. To optimize the production process, a methodological change was adopted with biomass: acid ratio from 1:6 to 1:8 (w/v) and the simple glass wool filtration replacement for a fritted glass funnel with vacuum. For these assays the pH ranged from 1.5 to 2.5 and the pressure of 7 atm (171 °C) and 10 atm (185 °C). OS production best responses increased from 59.21 to 100.26 mg/g for bagasse and from 65.68 to 107.26 mg/g for *Pinus*. However, there was a purity reduction of the hydrolysates from about 90% to 71.87% in the case of bagasse and 80.40% in case of *Pinus*. A factorial design analysis showed that the pH is more significant (than the pressure/temperature) for the production and purity changes for both biomass, confirming an optimal condition of pH 2.5 and 2.25 with 7 atm. Used as the sole carbon source, these OS supported the growth of *Lactobacillus casei* Shirota and *Bifidobacterium animalis*, together a peak biosynthesis of short-chain fatty acids (lactic and/or acetic acids) after 72 h cultivation with a final pH of 4.7 for bagasse and 4.5 for *Pinus*. Considering the residual cellulose, after the phosphoric pre-treatment, its subsequent enzymatic hydrolysis with industrial cellulases, in comparison with the native controls, all the evaluated conditions revealed beneficial for improved hydrolyses and, in the best cases, by factors of five times for bagasse and three times for *Pine*.

Galactomannans degrading-enzymes induction by cultivation of *Aspergillus niger* in a liquid medium under agitation was satisfactory, leading to mycelia pellets formation. It was found <130 µg and <250 µg total protein/mL for extra- and intracellular samples, respectively. Digestive juice of *Achatina fulica* (DJAf) collection was carried out in young and adults (>3 cm) molluscs, and corresponded to a high protein concentration, 202 mg/mL. Enzymatic activity assays done with *p*-nitrophenyl-glycosides, indicated high α-galactosidase and β-glucosidase activities for *A. niger* samples and the same for β-mannosidase and β-glucosidase from DJAf. The hydrolysis percentages with various polysaccharides, pursuing oligosaccharides release in 24 hours, 35 °C and 140 rpm (0.33 g) incubation conditions, showed that the most efficient extra and intracellular *A. niger* enzymes were induced with guar gum, as assayed using locust bean (3.65 and 4.87%) and guar gums (5.88 and 4.33%) and *Mimosa scabrella* galactomannans (3.83 and 3.25). Carob induced enzymes released only α-galactose from the branching points. DJAf showed hydrolysis potential for all polysaccharides tested, but contained low α-galactosidase activity and could not hydrolyze efficiently (4.36%) the more branched galactomannans, such as that from *Mimosa scabrella*. As the degree of substitution

of galactomannans reduces, the hydrolytic power increases as shown with guar (8.54%) and locust bean gums (33.66%). The locust bean OS, produced by DJAf hydrolysis, were able to promote the growth of probiotic microorganisms, leading to lactic, acetic and propionic acids production with *L.casei* and the same acids more succinic acid with *B. animalis*.

Keywords: Acid and enzymatic hydrolysis. Ligno(hemi)Cellulose. *Achatina fulica*. *Aspergillus niger*. Lactobacilli. Bifidobacteria.

## LISTA DE FIGURAS

|  |     |
|--|-----|
| FIGURA 1 - FLUXOGRAMA DE PRODUÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS .....  | 24  |
| FIGURA 2 - ESQUEMA DO TRATO GASTROINTESTINAL.....  | 34  |
| FIGURA 3 - ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA CURTA .....   | 36  |
| FIGURA 4 - REAÇÃO DE REDUÇÃO DO ÁCIDO 3,5-DINITROSALICÍLICO .....  | 46  |
| FIGURA 5 - REAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES TOTAIS PELO MÉTODO<br>FENOL SULFÚRICO .....  | 47  |
| FIGURA 6 - ESQUEMA DA ESTRUTURA DE BIOMASSA LIGNO(HEMI)CELULÓSICA ....   | 55  |
| FIGURA 7 - ESTRUTURA MOLECULAR DA CELULOSE.....  | 57  |
| FIGURA 8 - ESTRUTURA DOS ÁLCOOIS PRECURSORES E DA LIGNINA.....   | 59  |
| FIGURA 9 - MECANISMO DE AÇÃO DAS ENZIMAS CELULOLÍTICAS .....   | 63  |
| FIGURA 10 - ESQUEMA DA ARABINOXILANA .....   | 64  |
| FIGURA 11 - ESQUEMA DA GALACTOGLUCOMANANA .....  | 65  |
| FIGURA 12 - PRECIPITAÇÃO DE HEMICELULOSE TOTAL EXTRAÍDA DE BAGAÇO DE<br>CANA E SERRAGEM DE PINUS .....   | 72  |
| FIGURA 13 - CCD DA CINÉTICA DE TEMPO DA HIDROLISE COM TFA DE<br>HEMICELULOSE DE BAGAÇO DE CANA .....   | 73  |
| FIGURA 14 - CCD DAS AMOSTRAS DE BAGAÇO DE CANA HIDROLISADAS POR<br>TERMOPRESSURIZAÇÃO FOSFÓRICA.....   | 80  |
| FIGURA 15 - CCD DAS AMOSTRAS DE SERRAGEM DE <i>PINUS</i> HIDROLISADAS POR<br>TERMOPRESSURIZAÇÃO FOSFÓRICA.....   | 83  |
| FIGURA 16 - CCD DOS HIDROLISADOS POR TERMOPRESSURIZAÇÃO FOSFÓRICA DE<br>BAGAÇO DE CANA E SERRAGEM DE <i>PINUS</i> .....                                | 90  |
| FIGURA 17 - CCD DA PURIFICAÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS OBTIDOS POR<br>TERMOPRESSURIZAÇÃO FOSFÓRICA DE BAGAÇO DE CANA UTILIZANDO<br>COLUNA OU BATELADA..... | 99  |
| FIGURA 18 - ESTRUTURA GERAL DA CADEIA PRINCIPAL DA PECTINA.....  | 115 |
| FIGURA 19 - ESQUEMA DAS REGIÕES DA PECTINA.....  | 115 |
| FIGURA 20 - ESTRUTURA GERAL DAS GALACTOMANANAS .....   | 117 |
| FIGURA 21 - <i>Achatina fulica</i> .....   | 122 |
| FIGURA 22 - SISTEMA DIGESTÓRIO DO <i>Achatina fulica</i> .....   | 126 |
| FIGURA 23 - ASPECTO GERAL DO MICÉLIO ESPORULADO DE <i>Aspergillus niger</i> .....  | 131 |
| FIGURA 24 - ANÁLISE MICROSCÓPICA DO MICÉLIO DE <i>Aspergillus niger</i> .....  | 132 |
| FIGURA 25 - CCD DO PERFIL DAS GALACTOMANANAS HIDROLISADAS COM ENZIMAS<br>DIVERSAS .....  | 141 |
| FIGURA 26 - CCD DO PERFIL DA PECTINA E HEMICELULOSES DE BAGAÇO E PINUS<br>HIDROLISADAS COM ENZIMAS DIVERSAS .....                                      | 142 |
| FIGURA 27 - CCD DO PERFIL DAS GALACTOMANANAS HIDROLISADAS COM ENZIMAS<br>DE <i>Aspergillus niger</i> E <i>Achatina fulica</i> COMBINADAS .....         | 146 |

## LISTA DE GRÁFICOS

|   |    |
|---|----|
| GRÁFICO 1 - CURVAS ANALÍTICAS DE AÇÚCARES TOTAIS PARA MÉTODO FENOL SULFÚRICO.....   | 70 |
| GRÁFICO 2 - HIDRÓLISE COM TFA DA HEMICELULOSE DE BAGAÇO DE CANA .....   | 73 |
| GRÁFICO 3 - DENSITOMETRIA E SÉRIE HOMÓLOGA DE XOS DA HEMICELULOSE DE BAGAÇO DE CANA HIDROLISADA COM TFA.....  | 73 |
| GRÁFICO 4 - TERMOGRAVIMETRIA E DERIVADA DE BAGAÇO DE CANA E SERRAGEM DE <i>PINUS</i> NATIVOS E PRÉ-TRATADOS POR TERMOPRESSURIZAÇÃO FOSFÓRICA.....   | 75 |
| GRÁFICO 5 - POTENCIAL DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DOS RESÍDUOS L(H)C PRÉ-TRATADOS POR TERMOPRESSURIZAÇÃO FOSFÓRICA.....   | 77 |
| GRÁFICO 6 - HISTOGRAMA DA PORCENTAGEM DE REMOÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES DOS RESÍDUOS L(H)C DURANTE PRÉ-TRATAMENTO POR TERMOPRESSURIZAÇÃO FOSFÓRICA.....  | 79 |
| GRÁFICO 7 - CARACTERIZAÇÃO QUALI- E QUANTITATIVA DOS OLIGOSSACARÍDEOS PRODUZIDOS A PARTIR DE BAGAÇO DE CANA PRÉ-TRATADO POR TERMOPRESSURIZAÇÃO FOSFÓRICA.....   | 81 |
| GRÁFICO 8 - CONTORNO DAS CONDIÇÕES DE PRODUÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS E PUREZA PARA BAGAÇO DE CANA PRÉ-TRATADO POR TERMOPRESSURIZAÇÃO FOSFÓRICA.....   | 82 |
| GRÁFICO 9 - CARACTERIZAÇÃO DOS OLIGOSSACARÍDEOS PRODUZIDOS A PARTIR DE SERRAGEM DE <i>PINUS</i> PRÉ-TRATADA POR TERMOPRESSURIZAÇÃO FOSFÓRICA.....   | 84 |
| GRÁFICO 10 - CONTORNO DAS CONDIÇÕES DE PRODUÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS E PUREZA PARA SERRAGEM DE <i>PINUS</i> PRÉ-TRATADA POR TERMOPRESSURIZAÇÃO FOSFÓRICA.....  | 85 |
| GRÁFICO 11 - REMOÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES DA BIOMASSA CELULÓSICA RESIDUAL PRÉ-TRATADA POR TERMOPRESSURIZAÇÃO FOSFÓRICA.....  | 87 |
| GRÁFICO 12 - POTENCIAL DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DOS RESÍDUOS DE BAGAÇO DE CANA PRÉ-TRATADOS POR TERMOPRESSURIZAÇÃO FOSFÓRICA.....  | 88 |
| GRÁFICO 13 - POTENCIAL DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DOS RESÍDUOS DE SERRAGEM DE <i>PINUS</i> PRÉ-TRATADOS POR TERMOPRESSURIZAÇÃO FOSFÓRICA.....  | 88 |
| GRÁFICO 14 - MÉDIAS DE DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA PARA BAGAÇO DE CANA E SERRAGEM DE <i>PINUS</i> PRÉ-TRATADOS POR TERMOPRESSURIZAÇÃO FOSFÓRICA ANÁLISADOS POR PLANEJAMENTO FATORIAL 3 <sup>2</sup> ..... | 89 |
| GRÁFICO 15 - CARACTERIZAÇÃO DOS OLIGOSSACARÍDEOS PRODUZIDOS A PARTIR DE HIDRÓLISE TERMOFOSFÓRICA DE BAGAÇO DE CANA E SERRAGEM DE <i>PINUS</i> .....   | 91 |
| GRÁFICO 16 - PARETO PARA ANÁLISE POR PLANEJAMENTO FATORIAL 3 <sup>2</sup> DO BAGAÇO DE CANA PRÉ-TRATADO POR TERMOPRESSURIZAÇÃO FOSFÓRICA.....   | 95 |
| GRÁFICO 17 - PARETO PARA ANÁLISE POR PLANEJAMENTO FATORIAL 3 <sup>2</sup> DA SERRAGEM DE <i>PINUS</i> PRÉ TRATADA POR TERMOPRESSURIZAÇÃO FOSFÓRICA.....   | 95 |

|   |     |
|---|-----|
| GRÁFICO 18 - CONTOÑO DE PRODUÇÃO E PUREZA DE OLIGOSSACARÍDEOS PRODUZIDOS A PARTIR DE PRÉ-TRATAMENTO POR TERMOPRESSURIZAÇÃO FOSFÓRICA DE BAGAÇO DE CANA.....                             | 96  |
| GRÁFICO 19 - CONTOÑO DE PRODUÇÃO E PUREZA DE OLIGOSSACARÍDEOS PRODUZIDOS A PARTIR DE PRÉ-TRATAMENTO POR TERMOPRESSURIZAÇÃO FOSFÓRICA DE SERRAGEM DE <i>PINUS</i> .....                  | 97  |
| GRÁFICO 20 - CLAE DE AMOSTRAS CONTENDO OLIGOSSACARÍDEOS OBTIDOS ATRAVÉS DE PRÉ-TRATAMENTO POR TERMOPRESSURIZAÇÃO FOSFÓRICA DE BAGAÇO DE CANA.....                                       | 97  |
| GRÁFICO 21 - CLAE DE AMOSTRAS CONTENDO OLIGOSSACARÍDEOS OBTIDOS ATRAVÉS DE PRÉ-TRATAMENTO POR TERMOPRESSURIZAÇÃO FOSFÓRICA DE SERRAGEM DE <i>PINUS</i> .....                            | 98  |
| GRÁFICO 22 - CLAE MAX PLOT PARA AS AMOSTRAS DE BAGAÇO DE CANA E SERRAGEM DE <i>PINUS</i> HIDROLISADAS COM ÁCIDO FOSFÓRICO PH 2,25 / 7ATM.....   | 98  |
| GRÁFICO 23 - CARACTERIZAÇÃO QUALITATIVA DA AMOSTRA DE OLIGOSSACARÍDEOS OBTIDOS POR TERMOPRESSURIZAÇÃO FOSFÓRICA DE BAGAÇO DE CANA EM PROCESSO DE PURIFICAÇÃO POR COLUNA .....           | 100 |
| GRÁFICO 24 - CARACTERIZAÇÃO QUALITATIVA DA AMOSTRA DE OLIGOSSACARÍDEOS OBTIDOS POR TERMOPRESSURIZAÇÃO FOSFÓRICA DE BAGAÇO DE CANA EM PROCESSO DE PURIFICAÇÃO POR BATELADA.....          | 101 |
| GRÁFICO 25 - CARACTERIZAÇÃO QUALITATIVA COMPARATIVA DA AMOSTRA DE OLIGOSSACARÍDEOS OBTIDOS POR TERMOPRESSURIZAÇÃO FOSFÓRICA DE BAGAÇO DE CANA PURIFICADAS POR COLUNA E BATELADA.....    | 102 |
| GRÁFICO 26 - CRESCIMENTO DOS MICRO-ORGANISMOS PROBIÓTICOS UTILIZANDO OLIGOSSACARÍDEOS OBTIDOS POR TERMOPRESSURIZAÇÃO FOSFÓRICA DE BAGAÇO DE CANA E SERRAGEM DE <i>PINUS</i> .....       | 103 |
| GRÁFICO 27 - EVOLUÇÃO DO pH DURANTE O CULTIVO DE PROBIÓTICOS COM OLIGOSSACARÍDEOS DE BAGAÇO DE CANA E <i>Pinus taeda</i> .....  | 105 |
| GRÁFICO 28 - CROMATOGRAMA DO CULTIVO DE <i>Bifidobacteria animalis</i> COM OLIGOSSACARÍDEOS DE BAGAÇO DE CANA.....  | 108 |
| GRÁFICO 29 - CROMATOGRAMA DO CULTIVO DE <i>Lactobacilos casei</i> Shirota COM OLIGOSSACARÍDEOS DE BAGAÇO DE CANA.....   | 109 |
| GRÁFICO 30 - CROMATOGRAMA DO CULTIVO DE <i>Bifidobacteria animalis</i> COM OLIGOSSACARÍDEOS DE SERRAGEM DE <i>Pinus taeda</i> .....   | 110 |
| GRÁFICO 31 - CROMATOGRAMA DO CULTIVO DE <i>Lactobacilos casei</i> Shirota COM OLIGOSSACARÍDEOS DE SERRAGEM DE <i>Pinus taeda</i> .....  | 111 |
| GRÁFICO 32 - PESO SECO DE BIOMASSA DE <i>Aspergillus niger</i> POR SUBSTRATO INDUTOR .....  | 133 |
| GRÁFICO 33 - AÇÚCARES TOTAIS PRESENTES NAS AMOSTRAS DE ENZIMAS DE <i>A. niger</i> OBTIDAS ATRAVÉS DE CULTIVO COM DIFERENTES SUBSTRATOS INDUTORES. ....                                  | 135 |
| GRÁFICO 34 - VARIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM FUNÇÃO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO PARA O SUBSTRATO <i>P</i> -NITROFENIL- $\beta$ -D-GLUCOPIRANOSÍDEO COM A ENZIMA $\beta$ -GLUCOSIDASE..... | 136 |

|   |     |
|---|-----|
| GRÁFICO 35 - VARIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM FUNÇÃO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO PARA O SUBSTRATO <i>p</i> -NF- $\beta$ -D-XILOPIRANOSÍDEO COM A ENZIMA $\beta$ -GLUCOSIDASE .....             | 137 |
| GRÁFICO 36 - PORCENTAGEM DE HIDRÓLISE DAS GALACTOMANANA FRENTE À ENZIMAS DE <i>A. niger</i> E <i>Achatina fulica</i> .....  | 140 |
| GRÁFICO 37 - PORCENTAGEM DE HIDRÓLISE DAS HEMICELULOSE DE BAGAÇO DE CANA E SERRAGEM DE PINUS FRENTE A DIFERENTE ENZIMAS .....   | 143 |
| GRÁFICO 38 - PORCENTAGEM DE HIDRÓLISE DE GALACTOMANANAS FRENTE À ENZIMAS COMBINADAS DE <i>Aspergillus niger</i> .....   | 145 |
| GRÁFICO 39 - PORCENTAGEM DE HIDRÓLISE DE GALACTOMANANAS FRENTE À ENZIMAS COMBINADAS DO SUCO DIGESTIVO DE <i>Achatina fulica</i> E INDUZIDAS POR <i>Aspergillus niger</i> .....              | 145 |
| GRÁFICO 40 - CRESCIMENTO DOS MICRO-ORGANISMOS PROBIÓTICOS UTILIZANDO OLIGOSSACARÍDEOS OBTIDOS POR HIDRÓLISE DE GOMA DE ALFARROBA COM SUCO DIGESTIVO DO MOLUSCO <i>Achatina fulica</i> ..... | 147 |
| GRÁFICO 41 - EVOLUÇÃO DO pH DURANTE O CULTIVO DE PROBIÓTICOS COM OLIGOSSACARÍDEOS DE ALFARROBA .....  | 148 |
| GRÁFICO 42 - CROMATOGRAMAS DO CULTIVO DE <i>Bifidobacteria animalis</i> COM OLIGOSSACARÍDEOS DE ALFARROBA .....   | 149 |
| GRÁFICO 43 - CROMATOGRAMAS DO CULTIVO DE <i>Lactobacillus casei</i> Shirota COM OLIGOSSACARÍDEOS DE ALFARROBA .....   | 150 |
| GRÁFICO 44 - CROMATOGRAMAS DOS PADRÕES DE ÁCIDOS ORGÂNICOS .....  | 174 |
| GRÁFICO 45 - CROMATOGRAMAS DOS PADRÕES DE AÇÚCARES.....   | 175 |

## LISTA DE TABELAS

|   |     |
|---|-----|
| TABELA 1 - COMPONENTES APROVADOS PELA ANVISA PARA ALEGAÇÃO DE PROPRIEDADES FUNCIONAIS E OU DE SAÚDE.....  | 31  |
| TABELA 2 - COMPOSIÇÃO REAGENTE DINITROSALICÍLICO (DNS) .....  | 46  |
| TABELA 3 - TEMPERATURAS EM PRESSÕES DE VAPOR SATURADO D'ÁGUA.....   | 67  |
| TABELA 4 - CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO O-FOSFÓRICO CONFORME pH DESEJADO   | 67  |
| TABELA 5 - PERDAS DE MASSA OBTIDAS POR TERMOGRAVIMETRIA DE BAGAÇO DE CANA E SERRAGEM DE <i>Pinus</i> NATIVOS E PRÉ-TRATADOS POR TERMOPRESSURIZAÇÃO FOSFÓRICA..... | 75  |
| TABELA 6 - RESPOSTAS DE PRODUÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS A PARTIR DE BAGAÇO DE CANA PRÉ-TRATADO POR TERMOPRESSURIZAÇÃO FOSFÓRICA.....                                 | 81  |
| TABELA 7 - RESPOSTAS DE PRODUÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS A PARTIR DE SERRAGEM DE <i>PINUS</i> PRÉ-TRATADA POR TERMOPRESSURIZAÇÃO FOSFÓRICA.....                       | 84  |
| TABELA 8 - COMPARATIVO ENTRE PRÉ-PROCESSAMENTOS POR TEMOPRESSURIZAÇÃO FOSFÓRICA DE BAGAÇO DE CANA.....  | 92  |
| TABELA 9 - COMPARATIVO ENTRE PRÉ-PROCESSAMENTOS POR TEMOPRESSURIZAÇÃO FOSFÓRICA DE SERRAGEM DE <i>PINUS</i> .....   | 93  |
| TABELA 10 - PLANEJAMENTO FATORIAL 3 <sup>2</sup> PARA ANÁLISE DAS RESPOSTAS DA BIOMASSA PRÉ-TRATADA POR TERMOPRESSURIZAÇÃO FOSFÓRICA....                          | 94  |
| TABELA 11 - FONTES DE POLISSACARÍDEOS USUAIS .....  | 113 |
| TABELA 12 - COMPOSIÇÃO QUANTITATIVA DE GALACTOMANAS EM DIFERENTES SEMENTES.....   | 118 |
| TABELA 13 - CLASSIFICAÇÃO E CARACTERÍSTICAS DO FUNGO <i>Aspergillus niger</i> ....  | 120 |
| TABELA 14 - ENZIMAS PRODUZIDAS PELO <i>Aspergillus niger</i> .....  | 120 |
| TABELA 15 - ENZIMAS DO SUCO GASTROINTESTINAL DO MOLUSCO <i>Achatina fulica</i> .....  | 123 |
| TABELA 16 - COMPOSIÇÃO MEIO DE CULTIVO JDF .....  | 124 |
| TABELA 17 - COMPOSIÇÃO DE MEIO DE CULTIVO PARA INDUÇÃO DE ENZIMAS ....  | 125 |
| TABELA 18 - SUBSTRATOS PARA A DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE ENZIMAS ALVO.....  | 128 |
| TABELA 19 - PESO SECO E DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS.....  | 134 |
| TABELA 20 - ATIVIDADE ENZIMÁTICA PELO TESTE DO <i>P</i> -NITROFENIL-GLUCOSÍDEO .....  | 138 |
| TABELA 21 - ATIVIDADE ESPECÍFICA PELO TESTE DO <i>P</i> -NITROFENIL-GLUCOSÍDEO .....  | 138 |

## LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

|               |  |
|---------------|--|
| <b>Adp.</b>   | - Adaptado   |
| <b>AF</b>     | - Ácido <i>o</i> -fosfórico  |
| <b>AGCC</b>   | - Ácidos graxos de cadeia curta  |
| <b>AGaOS</b>  | - Oligossacarídeos de ácido galacturônico  |
| <b>ANVISA</b> | - Agência Nacional de Vigilância Sanitária   |
| <b>atm</b>    | - Atmosferas   |
| <b>BGL</b>    | - Enzima $\beta$ -glucosidase  |
| <b>CBH</b>    | - Enzimas celobiohidrolases  |
| <b>CCD</b>    | - Cromatografia em Camada Delgada  |
| <b>CG</b>     | - Cromatografia Gasosa   |
| <b>CLAE</b>   | - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência   |
| <b>DNS</b>    | - Ácido dinitrosalicílico  |
| <b>DTG</b>    | - Derivada da termogravimetria   |
| <b>DTGI</b>   | - Distúrbios do trato gastrointestinal   |
| <b>EG</b>     | - Enzima endo-glucanase  |
| <b>FDA</b>    | - <i>Food and Drug Administration</i>  |
| <b>FID</b>    | - Detector de ionização de chama   |
| <b>FM</b>     | - Fase móvel   |
| <b>FOS</b>    | - Fruto-oligossacarídeos   |
| <b>FOSHU</b>  | - <i>Food for Specified Health Uses</i> - Alimentos para usos específicos de saúde |
| <b>GABA</b>   | - Ácido $\gamma$ -aminobutírico  |
| <b>GM</b>     | - Galactomanana  |
| <b>GMOS</b>   | - Oligossacarídeos de galactomanana  |
| <b>GGMOS</b>  | - Oligossacarídeos de glucogalactomanana   |
| <b>GP</b>     | - Grau de polimerização  |
| <b>GRAS</b>   | - <i>Generally Recognized as Safe</i>  |
| <b>HC</b>     | - Hemicelulose   |
| <b>HMF</b>    | - Hidroximetilfurfural   |
| <b>IAP</b>    | - Instituto Ambiental do Paraná  |

|                          |   |
|--------------------------|---|
| <b>ICMBio</b>            | - Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade                                   |
| <b>L(h)C</b>             | - Ligno(hemi)celulósico   |
| <b>LQBB</b>              | - Laboratório de Químico/Biotecnologia de Biomassas   |
| <b>OS</b>                | - Oligossacarídeos  |
| <b>PNF</b>               | - <i>P</i> -nitrofenol / <i>P</i> -nitrofenil-...   |
| <b>Rf</b>                | - Relativo ao <i>front</i> / Fator de retenção  |
| <b>RID</b>               | - Detector de índice de refração  |
| <b>RMN</b>               | - Ressonância Magnética Nuclear   |
| <b>SDAf</b>              | - Suco digestivo de <i>Achatina fulica</i>  |
| <b>SISBIO</b>            | - Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade                                     |
| <b>TG</b>                | - Termogravimetria  |
| <b>TGI</b>               | - Trato Gastrointestinal  |
| <b>TFA</b>               | - Ácido trifloroacético   |
| <b>T<sub>onset</sub></b> | - Coeficiente de determinação da temperatura do início da perda de peso em termogravimetria |
| <b>U</b>                 | - Atividade enzimática  |
| <b>U/mg</b>              | - Atividade específica por mg de proteína   |
| <b>XOS</b>               | - Xilo-oligossacarídeos   |

## SUMÁRIO

|  |  |           |
|--|--|-----------|
| <b>1</b>   | <b>INTRODUÇÃO .....</b>                                  | <b>22</b> |
| <b>2</b>   | <b>OBJETIVOS .....</b>                                   | <b>26</b> |
| 2.1  | OBJETIVO PRINCIPAL .....                                 | 26        |
| 2.2  | OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....                              | 26        |
| <b>3</b>   | <b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>                        | <b>28</b> |
| 3.1  | NUTRACÊUTICOS E ALIMENTOS FUNCIONAIS.....                | 28        |
| 3.1.1  | <i>Legislação Brasileira.....</i>                        | <i>31</i> |
| 3.2  | TRATO GASTROINTESTINAL.....                              | 33        |
| 3.2.1  | <i>Microbiota do Trato Gastrointestinal.....</i>         | <i>35</i> |
| 3.2.2  | <i>Distúrbios do Trato Gastrointestinal.....</i>         | <i>38</i> |
| 3.3  | PROBIÓTICOS, PREBIÓTICOS E SIMBIÓTICOS.....              | 40        |
| 3.3.1  | <i>Probióticos.....</i>                                  | <i>40</i> |
| 3.3.2  | <i>Prebióticos.....</i>                                  | <i>42</i> |
| 3.3.3  | <i>Simbióticos .....</i>                                 | <i>43</i> |
| 3.4  | OLIGOSSACARÍDEOS .....                                   | 43        |
| <b>4</b>   | <b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>                           | <b>45</b> |
| 4.1  | QUANTIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS OLIGOSSACARÍDEOS ..... | 45        |
| 4.1.1  | <i>Determinação de Açúcares Redutores.....</i>           | <i>45</i> |
| 4.1.2  | <i>Determinação dos Açúcares Totais.....</i>             | <i>47</i> |
| 4.1.3  | <i>Cromatografia em Camada Delgada .....</i>             | <i>48</i> |
| 4.1.4  | <i>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....</i>     | <i>50</i> |
| 4.2  | PURIFICAÇÃO DOS OLIGOSSACARÍDEOS .....                   | 50        |
| 4.2.1  | <i>Purificação em Coluna.....</i>                        | <i>50</i> |
| 4.2.2  | <i>Purificação em Batelada.....</i>                      | <i>51</i> |
| 4.3  | CULTIVO DE PROBIÓTICOS COM OLIGOSSACARÍDEOS.....         | 51        |
| 4.3.1  | <i>Crescimento Celular.....</i>                          | <i>52</i> |
| 4.3.2  | <i>Produção de Ácidos Orgânicos .....</i>                | <i>52</i> |
| 4.4  | ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....                               | 53        |
| <b>CAPÍTULO 1: OBTENÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS PREBIÓTICOS COMO SUBPRODUTOS DO PRÉ-TRATAMENTO DE RESÍDUOS LIGNO(HEMI)CELULÓSICOS POR TERMOPRESSURIZAÇÃO COM ÁCIDO FOSFÓRICO DILUÍDO .....</b> |  | <b>54</b> |
| <b>5</b>   | <b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>                        | <b>55</b> |
| 5.1  | LIGNO(HEMI)CELULÓSICOS.....                              | 55        |
| 5.1.1  | <i>Celulose.....</i>                                     | <i>56</i> |
| 5.1.2  | <i>Hemicelulose .....</i>                                | <i>57</i> |
| 5.1.3  | <i>Lignina .....</i>                                     | <i>58</i> |
| 5.2  | PRÉ-TRATAMENTO DE RESÍDUOS L(H)C .....                   | 60        |
| 5.2.1  | <i>Enzimas celulolíticas e Bioetanol .....</i>           | <i>62</i> |
| 5.3  | BAGAÇO DE CANA .....                                     | 63        |
| 5.4  | <i>PINUS TAEDA.....</i>                                  | <i>64</i> |

|  |  |            |
|--|--|------------|
| <b>6</b>   | <b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>   | <b>66</b>  |
| 6.1  | RESÍDUOS L(H)C .....   | 66         |
| 6.2  | TERMOPRESSURIZAÇÃO COM ÁCIDO FOSFÓRICO .....   | 66         |
| 6.2.1  | <i>Ensaio Preliminar.....</i>  | 66         |
| 6.2.2  | <i>Ensaio Otimizado.....</i>   | 67         |
| 6.3  | RESÍDUOS L(H)C INSOLÚVEIS .....  | 68         |
| 6.3.1  | <i>Termogravimetria.....</i>   | 68         |
| 6.3.2  | <i>Hidrólise Enzimática .....</i>  | 68         |
| <b>7</b>   | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>  | <b>70</b>  |
| 7.1  | CURVAS ANALÍTICAS.....   | 70         |
| 7.2  | AMOSTRA DE REFERÊNCIA DE OLIGOSSACARÍDEOS.....   | 71         |
| 7.2.1  | <i>Hidrólise Ácida de Hemicelulose de Bagaço de Cana.....</i>                              | 72         |
| 7.3  | ENSAIOS PRELIMINARES .....   | 74         |
| 7.3.1  | <i>Termogravimetria.....</i>   | 74         |
| 7.3.2  | <i>Potencial Hidrolítico da Biomassa .....</i>   | 76         |
| 7.3.3  | <i>Produção de Oligossacarídeos.....</i>   | 78         |
| 7.4  | OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS.....  | 86         |
| 7.4.1  | <i>Ensaio de Sacarificação .....</i>   | 86         |
| 7.4.2  | <i>Produção de Oligossacarídeos.....</i>   | 89         |
| 7.5  | PURIFICAÇÃO DOS OLIGOSSACARÍDEOS .....   | 99         |
| 7.6  | CULTIVO COM PRÓBIOTICOS.....   | 102        |
| <b>CAPÍTULO 2 - OBTENÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS PREBIÓTICOS A PARTIR DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DIRETA DE SUBSTRATOS ORIUNDOS DE FITOBIOMASSA.....</b> |  | <b>112</b> |
| <b>8</b>   | <b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>   | <b>113</b> |
| 8.1  | POLISSACARÍDEOS.....   | 113        |
| 8.1.1  | <i>Pectinas.....</i>   | 114        |
| 8.1.2  | <i>Galactomananas.....</i>   | 116        |
| 8.2  | ENZIMAS.....   | 119        |
| 8.2.1  | <i>Aspergillus niger .....</i>   | 119        |
| 8.2.2  | <i>Achatina fulica .....</i>   | 121        |
| <b>9</b>   | <b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>   | <b>124</b> |
| 9.1  | ENZIMAS DE ASPERGILLUS NIGER.....  | 124        |
| 9.1.1  | <i>Micro-organismo .....</i>   | 124        |
| 9.1.2  | <i>Cultivo Líquido em Polissacarídeos.....</i>   | 124        |
| 9.2  | ENZIMAS DE ACHATINA FULICA.....  | 125        |
| 9.3  | CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA.....   | 127        |
| 9.3.1  | <i>Determinação de Proteínas .....</i>   | 127        |
| 9.3.2  | <i>Teste P-nitrofenil-glicosídeo de Atividade Enzimática .....</i>                         | 128        |
| 9.3.3  | <i>Método de Determinação de Atividade Enzimática com Substratos Polissacarídicos.....</i> | 129        |
| 9.3.4  | <i>Otimização da Hidrólise Enzimática para obtenção de Oligossacarídeos..</i>              | 130        |
| <b>10</b>  | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>  | <b>131</b> |
| 10.1   | ENZIMAS DE ASPERGILLUS NIGER.....  | 131        |
| 10.1.1   | <i>Cultivo Líquido em Polissacarídeos.....</i>   | 132        |
| 10.2   | CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA.....   | 133        |

|           |   |            |
|-----------|---|------------|
| 10.2.1    | <i>Determinação de Proteínas</i> .....  | 133        |
| 10.2.2    | <i>Teste cromogênico com P-nitrofenil-glicosídeos</i> .....                                 | 135        |
| 10.2.3    | <i>Método de determinação de atividade enzimática com substratos polissacarídicos</i> ..... | 140        |
| 10.2.4    | <i>Otimização da Hidrólise Enzimática para obtenção de Oligossacarídeos</i> ..              | 144        |
| 10.3      | CULTIVO COM PROBIÓTICOS .....   | 147        |
| <b>11</b> | <b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....   | <b>152</b> |
| <b>12</b> | <b>PUBLICAÇÕES</b> .....  | <b>155</b> |
| <b>13</b> | <b>SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS</b> .....  | <b>156</b> |
|           | <b>REFERÊNCIAS</b> .....  | <b>157</b> |
|           | <b>APÊNDICE</b> .....   | <b>174</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

Cada vez mais os padrões de vida da sociedade moderna estão se modificando. Hábitos alimentares inadequados, falta de atividade física e estresse, mudaram o perfil das doenças antes apresentadas pelas pessoas (KWAK, 2001a). Apesar disso, algumas populações apresentaram baixa incidência das chamadas doenças crônico-modernas e a diferença mais relevante está nos hábitos alimentares (ANJO, 2004).

Neste contexto, os alimentos funcionais fazem parte de uma nova concepção alimentar, pois além das propriedades nutricionais básicas devem possuir outras propriedades benéficas, mesmo sendo apresentados na forma convencional. Estes devem ser consumidos em dietas tradicionais, demonstrando capacidade de regular algumas funções corporais de forma a auxiliar na proteção contra doenças como hipertensão, diabetes, câncer, osteoporose e coronariopatias (MORAES, 2006; BETORET, 2011). Os alimentos funcionais podem ser produzidos através da adição de um nutriente (ex: farinha de trigo enriquecida com ferro e ácido fólico), aumento (ex: camarões de cativeiro alimentados com suplementação de astaxantina), redução (ex: alimentos hipossódicos) ou sua remoção (ex: alimentos sem glúten ou lactose), e ainda através da adição de compostos visando a melhoria da biodisponibilidade de um componente específico (ex: adição de oligossacarídeos visando melhor disponibilidade de cálcio) (DIPLOCK, 1999; ROBERFROID, 2002).

Alimentos funcionais geralmente são confundidos com nutracêuticos, pois frequentemente os contêm na sua formulação base, como, por exemplo, os carotenoides, prebióticos e/ou probióticos. Assim, o termo nutracêutico é melhor definido como “suplemento alimentar que fornece uma forma concentrada de um agente bioativo presumido de um alimento, apresentado em uma matriz de base não alimentar, e usado para melhorar a saúde em doses que excedem aquelas que poderiam ser obtidas a partir de alimentos normais” (DEFELICE, 1995; LOCKWOOD, 2007).

A diferenciação entre alimentos funcionais e nutracêuticos justifica-se devido ao pouco conhecimento destes conceitos pela população, bem como da relação entre dieta e saúde.

A dieta não contém apenas nutrientes que são absorvidos pelo intestino delgado, mas também algumas substâncias não digeríveis pelas enzimas pancreáticas. Estes compostos são os principais substratos para algumas bactérias residentes no trato gastrointestinal humano, as quais integram a microflora intestinal. Consequentemente, as diferentes dietas consumidas pelas populações influenciam diretamente na microbiota intestinal, sendo que a alimentação suplementada com prebióticos (e.g., inulina e/ou seus oligossacarídeos) e/ou probióticos (e.g., *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*) ou ainda a combinação entre eles (então ditos os simbióticos) inibem o crescimento de micro-organismos potencialmente patogênicos e estimulam as bactérias benéficas para a saúde (BLAUT, 2002; JOMAY, 2002).

Os probióticos são definidos como micro-organismos que promovem o crescimento de outros micro-organismos (LILLY, 1965). Atualmente seus maiores representantes são as bactérias produtoras de ácido lático, como os lactobacilos e bifidobactérias. Os principais benefícios associados aos probióticos são nutricionais, com a produção de vitaminas e enzimas digestivas como a  $\beta$ -galactosidase, efeitos de restauração do epitélio, redução dos níveis de colesterol, estimulação do sistema imune, aumento da motilidade intestinal, aderência e resistência à colonização de micro-organismos patogênicos e manutenção da integridade da mucosa intestinal (HOLZAPFEL, 2001; GLENN R, 2004).

Já um prebiótico é definido como ingrediente alimentício não digestível, que afeta benéficamente o hospedeiro por estimular seletivamente o crescimento e/ou a atividade de um ou mais micro-organismos do cólon intestinal. São exemplos os carboidratos resistentes de cadeia curta, chamados de oligossacarídeos e demais carboidratos pouco digeríveis (HOLZAPFEL, 2001). A fermentação dos carboidratos no cólon intestinal resulta na acidificação do conteúdo fecal pela formação de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). Estes servem como substratos para diferentes tecidos do corpo humano além de desempenharem um papel importante em vários processos de regulação celular, além da redução do pH luminal, que estimula o crescimento das bifidobactérias e lactobacilos a fim de inibir o crescimento de outras bactérias maléficas tais como as coli-enteropatogênicas (HOLZAPFEL, 2001; SHIMIZU, 2011).

Os oligossacarídeos (OS) consistem em uma cadeia curta de monossacarídeos, sendo os dissacarídeos os mais abundantes. Eles são os

principais nutrientes de crescimento para alguns micro-organismos do intestino e sua fermentação resulta na acidificação do conteúdo do cólon e na formação de AGCC (BLAUT, 2002).

Atualmente a legislação brasileira aceita apenas a utilização dos fruto-oligossacarídeos como fibras alimentares com a alegação de propriedades funcionais e ou de saúde (ANVISA, 2014). Entretanto legislações mais completas, como a japonesa, já incluem todos os oligossacarídeos como capazes de modificar as condições gastrointestinais (FOSHU, 2014). Isso serve de incentivo aos pesquisadores para buscar novas condições de produção e a comprovação de eficácia de outros oligossacarídeos (OS) ainda não aprovados no Brasil, como por exemplo, os xilo- e galacto-oligossacarídeos (BLAUT, 2002).

O trabalho desenvolvido pela equipe do Laboratório de Químico/Biotecnologia de Biomassas (LQBB), localizado na Universidade Tecnológica Federal do Paraná, visou produzir OS utilizando tanto a técnica de hidrólise ácida quanto enzimática, conforme fluxograma apresentado na figura 1.

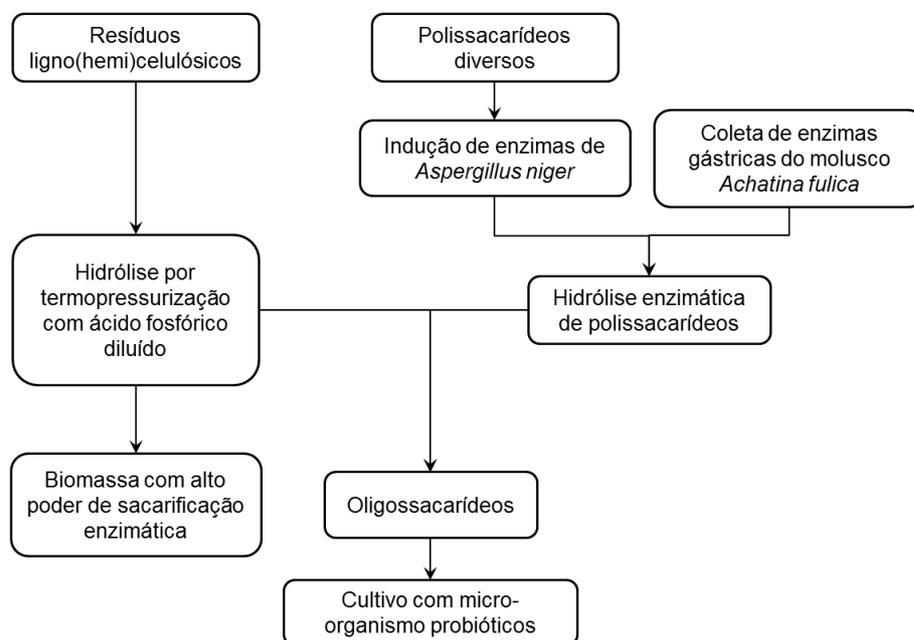


FIGURA 1 - FLUXOGRAMA DE PRODUÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS

Para a hidrólise ácida foram utilizados os resíduos industriais ligno(hemi)celulósicos bagaço de cana de açúcar e a serragem de *Pinus taeda*. Explorando a técnica de termopressurização com ácido fosfórico diluído,

desenvolvida na década de 80 pelo professor Dr. José Domingos Fontana, essa biomassa gera além dos OS provenientes da hidrólise parcial da hemicelulose, celulose com maior poder de sacarificação enzimática, podendo ser aproveitado para diversos usos, como a produção de bioetanol (FONTANA, 1984b; FONTANA, 2011).

Polissacarídeos de uso comum na indústria alimentícia, como as gomas de galactomanana (alfarroba, guar e bragatinga) e a pectina cítrica foram hidrolisados via enzimática para a produção de OS, agregando a esses compostos atividade funcional. As enzimas utilizadas foram as obtidas através de indução do fungo *Aspergillus niger* e também, por experiência prévia do professor Dr. José Domingos Fontana com o caramujo *Biomphalaria glabata*, foram utilizadas enzimas coletadas do sistema digestivo do molusco *Achatina fulica* (IACOMINI, 1980; IACOMINI, 1981).

Os diferentes OS obtidos foram utilizados como fonte de carbono em cultivos de micro-organismos probióticos comerciais, *Lactobacillus casei* Shirota (Yakult®) e *Bifidobacterium animalis* (Activia®), para comprovação e comparação de desempenho.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO PRINCIPAL

Obter oligossacarídeos funcionais, seja por hidrólise com ácido fosfórico diluído termopressurizado de resíduos ligno(hemi)celulósicos de bagaço de cana de açúcar e serragem de *Pinus taeda*, ou por hidrólise de galactomananas e pectina cítrica com enzimas extraídas do fungo *Aspergillus niger* pós-indução e/ou com suco gástrico do molusco *Achatina fulica*, e utilizá-los como de fonte de carbono, em cultivos das bactérias probióticas *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Determinar as melhores condições de pré-tratamento termo-fosfórico dos resíduos ligno(hemi)celulósicos que liberem oligossacarídeos solúveis, mensurados por determinação dos açúcares totais e redutores, e caracterizados por cromatografia em camada delgada (CCD), densitometria e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- ✓ Determinar as melhores condições de pré-tratamento por hidrólise com ácido fosfórico diluído e termopressurizado de resíduos ligno(hemi)celulósicos, bagaço de cana de açúcar e serragem de *Pinus*, afim de se obter resíduos celulósicos insolúveis de fitobiomassa, com elevado poder de sacarificação enzimática;
- ✓ Obter enzimas específicas através de cultivo de *Aspergillus niger* em meio contendo polissacarídeos indutores ou coleta direta do suco digestivo do molusco terrestre *Achatina fulica*;
- ✓ Obter oligossacarídeos de polissacarídeos diversos tais como as galactomananas e pectina cítrica, através de hidrólise enzimática e mensurá-los através de determinação dos açúcares totais e redutores, e caracteriza-los por CCD, densitometria e CLAE;

- ✓ Purificar os diferentes oligossacarídeos por adsorção/desorção em carvão ativo com gradiente alcoólico;
- ✓ Cultivar os micro-organismos probióticos, *Lactobacillus casei* Shirota e *Bifidobacterium animalis* em meio contendo os oligossacarídeos produzidos como fontes diferenciadas de carbono, avaliando o crescimento bacteriano através de análise de células totais (turbidimetria a 660 nm), perfil dos açúcares totais residuais e dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) por CLAE e de análise da variação do pH.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 NUTRACÊUTICOS E ALIMENTOS FUNCIONAIS

Estudos epidemiológicos indicam que os hábitos alimentares das populações são os que geram os maiores impactos na saúde dessas pessoas. Uma dieta pobre em gorduras e rica em frutas e verduras, por exemplo, está correlacionada com a queda da incidência das doenças chamadas ocidentais, como o câncer de cólon e a doença cardíaca coronariana (KWAK, 2001a; BLAUT, 2002). Dentro deste contexto, os alimentos funcionais fazem parte de uma nova concepção, além das propriedades nutricionais básicas, no formato convencional, os alimentos ainda devem possuir propriedades benéficas (ANJO, 2004; BETORET, 2011).

O termo alimento funcional foi primeiramente utilizado no Japão, em meados dos anos 80. Entretanto, a China e outros países asiáticos também já relacionavam alimentos com benefícios à saúde (WESTSTRATE, 2002; SIRÓ, 2008). Em 1991, o ministério da saúde japonês aprovou uma categoria específica para esses produtos relacionados com a saúde, chamada FOSHU (*Food for Specified Health Uses* - alimentos para usos específicos de saúde). Desde então o conceito de funcional foi promovido por cientistas que estudam a relação entre nutrição, sensorial, satisfação e saúde (KWAK, 2001a; SIRÓ, 2008).

Não há dúvida de que o interesse japonês em alimentos funcionais também trouxe a conscientização para a necessidade de tais produtos em lugares como no continente europeu e Estados Unidos. Esses países perceberam o consumo desse tipo de produto é capaz de reduzir custos com cuidados de saúde e do envelhecimento da população, além de aquecer o mercado da indústria alimentícia (SIRÓ, 2008).

Os alimentos funcionais são e devem ser alimentos, não drogas, pois não possuem efeitos terapêuticos. Eles podem ser produzidos através: da adição de um nutriente visando o enriquecimento (ex: ovos contendo ômega 3) ou a melhoria da biodisponibilidade de um componente específico (ex: adição de oligossacarídeos visando melhor biodisponibilidade de cálcio) ou ainda através do aumento (ex:

produtos ricos em fibras), redução (ex: hipossódicos) ou remoção de determinados nutrientes (ex: alimentos sem glúten, lactose ou glucose) (DIPLOCK, 1999; ROBERFROID, 2002). Consumidos em dietas convencionais, mostram a capacidade de regular funções corporais de forma a auxiliar na proteção, prevenção ou redução de risco de doenças como hipertensão, diabetes, câncer, osteoporose, coronariopatias, entre outras (ANJO, 2004; MORAES, 2006). Em outros termos, os alimentos funcionais exercem profilaxia contra doenças de caráter crônico.

Inicialmente os alimentos funcionais tratavam-se de produtos enriquecidos com vitaminas e/ou minerais tais como a vitamina C, vitamina E, ácido fólico, zinco, ferro e cálcio. Posteriormente, o foco mudou o enriquecimento com micronutrientes diversos, tais como ácidos graxos ômega 3, 6 e 9, fitoesteróis e fibras solúveis. Mais recentemente, as empresas focam a pesquisa e produção em alimentos que ofereçam benefícios de saúde múltiplos (SIRÓ, 2008). No Japão, o maior apelo dos produtos funcionais são alegações sobre benefícios para o intestino enquanto nos Estados Unidos são para coronariopatias (WESTSTRATE, 2002).

Um consenso sobre os conceitos científicos que envolvem os alimentos funcionais foi criado pela Ciência dos Alimentos Funcionais na Europa (FUFOSE, *Functional Food Science in Europe*) e coordenado pelo Instituto Internacional de Ciências da Vida (ILSI, *International Life Sciences Institute*), na Europa em 1999. Através deste, os alimentos funcionais são definidos como alimentos que demonstram afetar satisfatoriamente uma ou mais funções alvo do corpo de maneira relevante para a melhoria da saúde e bem-estar ou redução de risco de doenças, além dos efeitos nutricionais adequados. Eles devem fazer parte da comida, não na forma de pílulas, comprimidos ou cápsulas, e deve demonstrar seus efeitos em quantidades normalmente consumidas na dieta. Os alimentos funcionais foram classificados em seis grandes grupos de relevância científica. Estes são: alimentos que (1) auxiliam no desenvolvimento, crescimento e diferenciação celular (2) alteram o metabolismo de um substrato, (3) agem na defesa contra espécies reativas do oxigênio, (4) auxiliam o sistema cardiovascular, (5) melhoram a fisiologia e função gastrointestinal e (6) modulam o comportamento psicológico (DIPLOCK, 1999; KWAK, 2001a).

Outra classificação divide os alimentos funcionais em três grupos. No primeiro estão aqueles considerados “bom para sua vida”, incluindo alimentos que regulam

funções estomacais e intestinas, até os que melhorariam a capacidade de aprendizado e comportamento infantil. No segundo grupo estão alimentos capazes de reduzir riscos de doenças crônicas como hipercolesterolemia e hipertensão arterial. O terceiro grupo inclui produtos que “tornam a vida mais fácil” pela exclusão de componentes que comumente causam problemas, como a lactose e o glúten (SIRÓ, 2008).

O termo alimento funcional não pode ser confundido com o nutracêutico. Esse segundo, remetendo as palavras nutrição e produtos farmacêuticos. Presumidamente há uma tentativa de neutralizar a distinção entre as duas palavras, e costuma atrair os consumidores, como já é vista com o uso nas áreas cosméticas e indústrias de bebidas dos termos cosmecêuticos e aquacêuticos, respectivamente. Entretanto, a percepção do público em geral quanto às diferenças entre alimentos funcionais e nutracêuticos são inotórias, a menos que as legislações vigentes comecem a controlar a venda já que a maioria dos nutracêuticos são embalados e rotulados como se fossem medicamentos (DEFELICE, 1995; KWAK, 2001b; ANJO, 2004; LOCKWOOD, 2007).

O termo nutracêutico foi proposto pelo Dr. Stephen De Felice, da Fundação para Inovação na Medicina (Cranford, NJ, USA), em 1976 para incentivar as pesquisas (MANNION, 1998). De Felice definiu nutracêuticos como alimentos, ou partes deles, que provêm benefícios médicos ou para a saúde, incluindo a prevenção e tratamento de doenças. Outra definição é: suplemento da dieta que contenha uma forma concentrada de um agente bioativo derivado de alimento, presente em uma matriz não alimentícia, e usada para beneficiar a saúde em dosagens enriquecidas que não poderiam ser alcançadas de alimentos normais. Este componente, de maneira purificada ou concentrada, deve ter origem animal ou vegetal (ZEISEL, 1999; LOCKWOOD, 2007).

Muito se pensa que os nutracêuticos devem ocupar uma estreita faixa entre os alimentos e os medicamentos na legislação, porém seu lugar é muito mais complexo. Nos últimos 20 anos o número de nutracêuticos disponível nas prateleiras cresceu enormemente devido à grande cobertura da mídia sobre seus efeitos benéficos para a saúde e também devido à esperança das pessoas de que esses produtos sejam efetivos no tratamento de doenças insatisfatoriamente tratadas pela farmacologia, ou que, com o consumo desses nutracêuticos, haja redução dos

efeitos adversos de alguns medicamentos (LOCKWOOD, 2007). A venda livre como suplementos alimentares também é um fator que auxilia no aumento das vendas desses produtos.

Em geral, o custo de desenvolvimento de um novo produto alimentício é estimado em 1 a 2 milhões de dólares. Entretanto, o custo para colocar em mercado um alimento funcional, enriquecido ou não por nutracêuticos, ultrapassa muito esse valor. Isso se deve aos rigorosos requisitos de comprovação científica da eficácia, estudos retrospectivos, prospectivos epidemiológicos e de intervenção em seres humanos (DEFELICE, 1995; SIRÓ, 2008).

### 3.1.1 Legislação Brasileira

No Brasil, o termo alimento funcional não é aceito pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); entretanto, existe uma regulamentação específica, a resolução ANVISA/MS 18/99, para produtos que contenham “Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde” que inclui uma avaliação de segurança e comprovação de eficácia, sendo os aprovados apresentados na tabela 1 (ANVISA, 2014). O termo nutracêutico também não é aceito, porém os alimentos com alegação de propriedade funcional aprovada podem, na maioria deles, ser vendidos na forma de cápsulas, comprimidos, tabletes e similares.

TABELA 1 - COMPONENTES APROVADOS PELA ANVISA PARA ALEGAÇÃO DE PROPRIEDADES FUNCIONAIS E OU DE SAÚDE

| <b>Classe</b> | <b>Componente</b> | <b>Alegação</b>   | <b>Observações</b>   |
|---------------|-------------------|---|--|
| Ácidos Graxos | Ômega 3           | “O consumo de ácidos graxos ômega 3 auxilia na manutenção de níveis saudáveis de triglicerídeos, desde que associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis” | Mínimo de 0,1 g na porção ou em 100 g ou mL do produto pronto para o consumo, caso a porção seja superior a 100 g ou mL. |

FONTE: (ANVISA, 2014)

Continuação Tabela 1

| <b>Classe</b>      | <b>Componente</b>  | <b>Alegação</b>  | <b>Observações</b>  |
|--------------------|--|--|---|
| Carotenoides       | Licopeno<br>Luteína<br>Zeaxantina  | “A/O (nome do carotenoide) tem ação antioxidante que protege as células contra os radicais livres. Seu consumo deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis”     | A quantidade de carotenoide contido na porção do produto pronto para consumo deve ser declarada no rótulo, próximo à alegação.  |
| Fibras Alimentares | Fibras Alimentares<br>Beta-Glucana<br>Dextrina Resistente<br>Goma Guar parcialmente hidrolisada<br>Lactulose<br>Polidextrose | “A(s) (Nome da fibra alimentar ou simplesmente fibra alimentar) auxiliam o funcionamento do intestino. Seu consumo deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis” | Mínimo de 3 g de fibra alimentar se o alimento for sólido ou 1,5 g se for líquido.  |
|                    | Fruto-oligossacarídeos<br>Inulina  | “A/O(s) (nome da fibra alimentar) contribuem para o equilíbrio da flora intestinal. Seu consumo deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis”                    | Mínimo de 3 g de fibra alimentar se o alimento for sólido ou 1,5 g se for líquido.  |
|                    | Psillium   | “O psillium auxilia na redução da absorção de gordura. Seu consumo deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis”   | Mínimo de 3 g de fibra alimentar se o alimento for sólido ou 1,5 g se for líquido.  |
|                    | Quitosana  | “A quitosana auxilia na redução da absorção de gordura e colesterol. Seu consumo deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis”                                   | Mínimo de 3 g de fibra alimentar se o alimento for sólido ou 1,5 g se for líquido.  |
| Fitoesteróis       | Fitoesteróis   | “Os fitoesteróis auxiliam na redução da absorção de colesterol. Seu consumo deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis”  | Mínimo 0,8 g de fitoesteróis livres. A recomendação diária do produto, que deve estar entre 1–3 porções/dia, garantindo a ingestão diária entre 1–3 g de fitoesteróis livres. |

FONTE: (ANVISA, 2014)

Continuação Tabela 1

| Classe           | Componente   | Alegação  | Observações   |
|------------------|--|---|---|
| Polióis          | Manitol<br>Xilitol<br>Sorbitol   | “(Nome do poliól) não produz ácidos que danificam os dentes. O consumo do produto não substitui hábitos adequados de higiene bucal e de alimentação”  | Alegação aprovada somente para gomas de mascar sem açúcar   |
| Probióticos      | <i>Lactobacillus acidophilus</i><br><i>Lactobacillus casei</i><br><i>Lactobacillus paracasei</i><br><i>Lactococcus lactis</i><br><i>Bifidobacterium bifidum</i><br><i>Bifidobacterium animalis</i><br><i>Bifidobacterium longum</i><br><i>Enterococcus faecium</i> | “O (indicar a espécie do micro-organismo) (probiótico) contribui para o equilíbrio da flora intestinal. Seu consumo deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis” | Mínimo viável na faixa de 108-109 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por dose diária de produto pronto para o consumo, conforme indicação do fabricante. Valores menores podem ser aceitos, desde que a empresa comprove sua eficácia. |
| Proteína de Soja | Proteína de Soja   | “O consumo diário de no mínimo 25 g de proteína de soja pode ajudar a reduzir o colesterol. Seu consumo deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis”             | A quantidade de proteína de soja, contida na porção do produto pronto para consumo, deve ser declarada no rótulo.   |

FONTE: (ANVISA, 2014)

### 3.2 TRATO GASTROINTESTINAL

O trato gastrointestinal (TGI) tem a função de abastecer o corpo com um suprimento contínuo de água, eletrólitos e nutrientes (figura 2). Esse processo se inicia pela ingestão dos alimentos pela boca, onde ocorre a mastigação e deglutição. Nesta etapa ocorre a liberação da saliva, contendo enzimas, principalmente  $\alpha$ -amilases, que inicia a hidrólise do amido até dextrinas e maltose (ENZYMESTUFF, 2005; SCIENCELEARN, 2011).

O bolo alimentar segue, através de movimentos peristálticos, pela faringe e esôfago até chegar ao estômago. Além de armazenamento, o estômago torna o bolo alimentar semi-líquido através da mistura com a secreção gástrica contendo ácido clorídrico, com pH entre 1,0–2,5 (EVANS, 1988). Neste momento entram em ação as

pepsinas, enzimas responsáveis pela quebra das proteínas em polipeptídeos (ENZYMESTUFF, 2005; SCIENCELEARN, 2011). A liberação do *quimo*, como o bolo alimentar passa a ser chamado, para o intestino delgado ocorre em vazão controlada de acordo com a digestão e absorção (GUYTON, 2006).

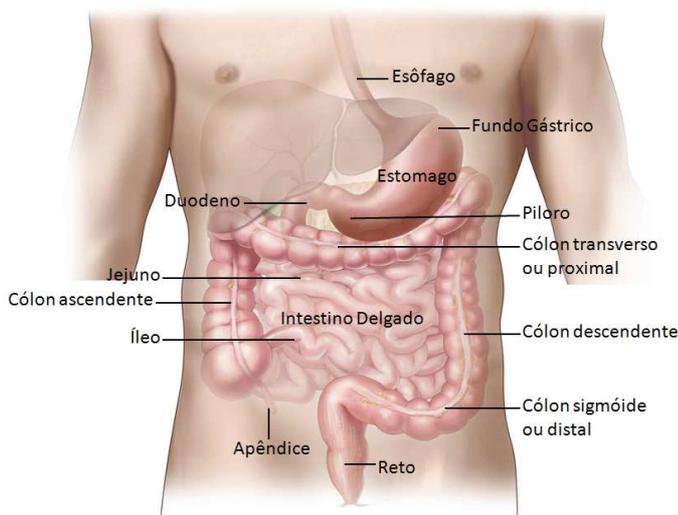


FIGURA 2 - ESQUEMA DO TRATO GASTROINTESTINAL  
FONTE: Adp. de imagem de domínio público

O intestino delgado é formado pelo duodeno, o jejuno e o íleo. Ele inicia-se com o duodeno, que tem de 25–30 cm, e conecta o píloro, porção distal do estômago, com o jejuno, e é onde o *quimo* recebe a bile (mescla de ácidos biliares e lipases), produzido pela vesícula biliar e sucos digestivos produzidos pelo pâncreas, contendo uma ampla gama de enzimas digestivas (tripsinas, quimiotripsinas, lipases, amilases, ribonucleases e desoxirribonucleases) (GUYTON, 2006). O pH médio passa de 6,6 no início do jejuno para cerca de 7,5 na porção terminal do íleo (EVANS, 1988).

Com o jejuno medindo cerca de 2–2,5 m e o íleo 4–4,5 m, o intestino delgado possui um comprimento total que varia entre 6–7 metros, fornecendo absorção de nutrientes e adesão e colonização por micro-organismos (GUYTON, 2006). A sua área absorptiva total é consideravelmente aumentada pela presença de dobras circulares, milhões de vilosidades intestinais e as microvilosidades, chegando a cerca de 200 m<sup>2</sup> para interações durante o processo digestivo (HOLZAPFEL, 2001).

No epitélio absorptivo do intestino delgado chegam diversas substâncias pré-hidrolisadas que sofrem ação de enzimas, como as dissacarídeses (lactase,

invertase e maltase) para liberação de monossacarídeos, peptidases (polipeptidases, dipeptidases e aminopeptidases) para quebra de peptídeos em aminoácidos e nucleosídeos para a liberação de bases nitrogenadas, fosfato e açúcar livre, facilitando a absorção destas substâncias (ENZYMESTUFF, 2005; SCIENCELEARN, 2011). Os substratos que escapam à ação enzimática e absorção seguem para o intestino grosso, onde serve de alimento para a microbiota intestinal.

O *quimo* passa ao ceco, primeira parte do intestino grosso, através da válvula ileocecal, que evita refluxo de conteúdo fecal para o intestino delgado. O ceco possui como única função receber o material do intestino delgado e iniciar o processo de reabsorção de água. Nele está localizado o apêndice vermiforme (GUYTON, 2006). O pH do *quimo* nessa etapa do processo digestivo cai levemente para cerca de 6,4 (EVANS, 1988).

A segunda porção do intestino grosso corresponde ao cólon, que tem a função de absorção de água e eletrólitos do *quimo*, bem como a formação e armazenamento das fezes sólidas. O *quimo* passa de líquido no ceco e cólon ascendente a semi-líquido no cólon transversal. Passa então a pastoso e semi-pastoso até chegar ao cólon descendente onde passa a ser semi-sólido. Na última porção do cólon, chamada de sigmóide, as fezes passam a ser sólidas, com o pH próximo a 7,0 (EVANS, 1988; GUYTON, 2006).

O reto passa a maior parte do tempo vazio devido a dois fatores. O primeiro é um esfíncter funcional fraco cerca de 20 cm antes do ânus, na junção do cólon sigmóide e o reto. O segundo motivo é a resistência ao enchimento do reto causada pela angulação aguda do cólon. Quando os movimentos propulsivos forçam a entrada de fezes no reto, imediatamente surge a vontade de defecar, com a contração reflexa e o relaxamento dos esfíncteres anais (GUYTON, 2006)

### 3.2.1 Microbiota do Trato Gastrointestinal

O TGI representa um ecossistema de alta complexidade. A microbiota intestinal é composta por mais de 400 espécies, incluindo diversos gêneros de micro-organismos gram-positivos e anaeróbios, a grande maioria do filo Firmicutes,

Bacteroidetes, Actinobacteria e Proteobacteria. Os principais gêneros são *Bacteroides*, *Eubacterium* e *Bifidobacterium*, predominantemente no intestino grosso. Outros grupos como clostrídias, peptostreptococos, streptococos, lactobacilos também são importantes, principalmente para a manutenção da mucosa intestinal e geração de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) (HOLZAPFEL, 2001). O metabolismo bacteriano é basicamente anaeróbico, até porque 99% das bactérias encontradas em fezes de adultos são estritamente anaeróbias (BLAUT, 2002).

A biodiversidade da microbiota intestinal é capaz de afetar o hospedeiro de diversas maneiras como, por exemplo, com a modulação do sistema imune; produção de AGCC e gases como hidrogênio, gás carbônico e metano; a transformação do ácido biliático; a formação de vitaminas; e também possuem potencial para formação de substâncias tóxicas, mutagênicas e carcinogênicas (BLAUT, 2002). Um estudo recente indica a potencial liberação de antibióticos por parte de alguns micro-organismos intestinais, como o *Lactobacillus gasseri*, que produz lactocilina, substância que mostrou ampla ação contra bactérias vaginais patogênicas (DONIA, 2014).

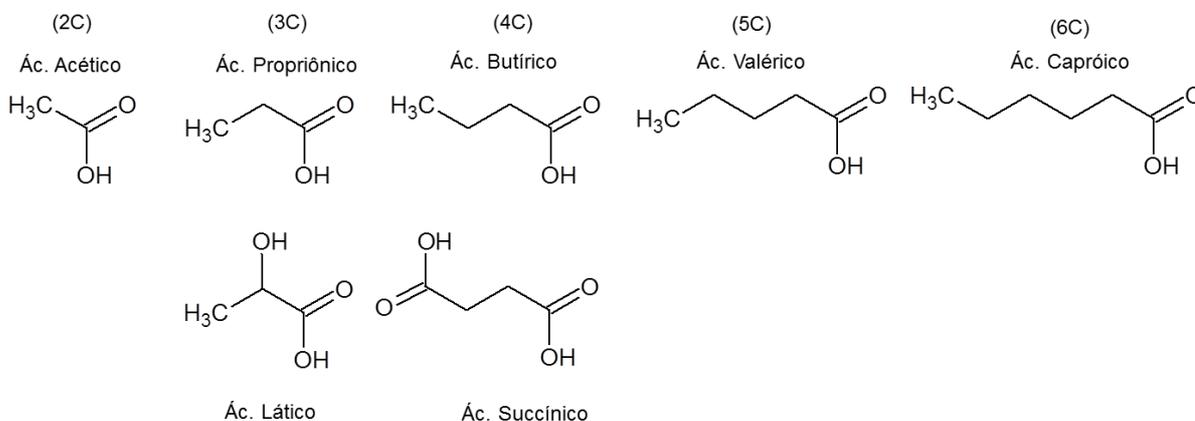


FIGURA 3 - ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA CURTA  
 FONTE: O autor.

Os carboidratos disponíveis no intestino grosso são bioquimicamente convertidos em dióxido de carbono, metano, hidrogênio e AGCC (ácidos orgânicos com cadeia menor ou igual a seis carbonos), figura 3, como os ácidos acético (2C), propiônico (3C), butírico (4C), além de gás hidrogênio e carbônico. Ácidos *iso*-butírico, valérico (*n* e *iso* - 5C) e capróico (6C) são produzidos em pequenas

quantidades. Ácidos láctico (3C) e succínico (4C) e também etanol estão presentes em pequenas quantidades, pois são intermediários durante a produção de AGCC. Enquanto o ácido acético e propiônico são absorvidos e transportados para o fígado para a gluconeogênese, o butírico é oxidado pelo epitélio do cólon, sendo ele presumido como maior regulador da proliferação e diferenciação celular (ROWE, 1992; CAMPOS, 1999; BLAUT, 2002).

O gás H<sub>2</sub> é o maior aceptor de elétrons do cólon, e sua produção está diretamente relacionada com a dieta do hospedeiro, como por exemplo, a lactose que aumenta sua formação. Apenas 10% deste gás é expelido via respiração, ou flatos, o restante é utilizado por micro-organismos metanogênicos, acetogênicos e redutores de sulfato. Os metanogênicos reduzem CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub> para metano, enquanto os organismos acetogênicos reduzem estas mesmas substâncias a acetato. Já as bactérias redutoras de sulfato utilizam H<sub>2</sub> para produzir sulfeto de hidrogênio (BLAUT, 2002).

A população microbiana do intestino também protege o hospedeiro da aderência e subsequente invasão de bactérias patogênicas. O grupo bacteriano predominante pode variar de indivíduo para indivíduo e de segmento para segmento do intestino, e isso, bem como por conta da dieta e do estado de saúde do hospedeiro, faz com que cada pessoa possua uma composição única de flora intestinal. A densidade de micro-organismos cresce à medida que vai se aproximando da porção mais distal, de cerca de 10<sup>4</sup> para 10<sup>8</sup> células/g chegando à concentração máxima de cerca de 10<sup>12</sup> células/g de conteúdo intestinal (HOLZAPFEL, 2001; BLAUT, 2002).

A saúde do epitélio está diretamente relacionada com a qualidade da flora intestinal uma vez que a composição da microbiota é intensamente afetada por uma série de fatores, dentre eles os componentes presentes na dieta, que influenciam tanto no tempo de trânsito das fezes no organismo quanto no pH do intestino (HOLZAPFEL, 2001; SCOTT, 2013). Estudos recentes associaram a microbiota intestinal saudável, através do consumo de probióticos, interligada diretamente com a saúde cerebral, prevenindo casos de encefalopatia hepática (deterioração da função cerebral causada por doença hepática) em pacientes com cirrose (LUNIA, 2014; VICTOR III, 2014).

Diversas tentativas de aumentar a população de bifidobactérias e lactobacilos no intestino, com objetivo de promover a saúde do hospedeiro, têm sido feitas, principalmente com o incentivo ao consumo de produtos como leites fermentados, que contém cepas selecionadas de micro-organismos benéficos, chamados de probióticos (VEIGA, 2014). Outra estratégia consiste em estimular o crescimento dessas bactérias que já habitam o cólon com o consumo de prebióticos, carboidratos não digestíveis originários de plantas, incluindo amidos resistentes e outros polissacarídeos como celulose, hemicelulose, pectina, inulina e oligossacarídeos. Estes substratos funcionam como fonte de carbono para os micro-organismos intestinais (BLAUT, 2002).

### 3.2.2 Distúrbios do Trato Gastrointestinal

Distúrbios do TGI (DTGI) incluem a síndrome de intestino irritável, refluxo gastroesofágico, dispepsia, úlcera péptica, gastrite, câncer de cólon, entre outras doenças menos comuns (MICHELFELDER, 2010). A dieta está direta ou indiretamente envolvida no desenvolvimento e manutenção de praticamente todas as doenças intestinais, principalmente as de caráter inflamatório (WU, 2013; FEINMAN, 2014).

Cerca de 15% da população dos Estados Unidos, Europa e Ásia possuem a síndrome do intestino irritável. Mais comuns em mulheres, é definida por uma dor abdominal crônica e recorrente, associada a crises de constipação e/ou diarreia sem motivo aparente. Ocasionalmente está associada a infecções, inflamação e/ou insensibilidade, intolerância ou alergia a algum(s) alimento(s) (MICHELFELDER, 2010).

A dispepsia é um sintoma geralmente associado a diversos DTGI, e é conhecido popularmente como indigestão. Caracteriza-se por dor no abdômen superior e pode estar acompanhada por distensão abdominal, eructações, azia e náuseas. É comum em portadores da doença do refluxo gastroesofágico, na qual ocorre a passagem do ácido estomacal pelo esfíncter esofágico de maneira crônica

levando a danos no esôfago. A dispepsia também é pode ocorrer em pacientes com gastrite e úlcera péptica (MICHELFELDER, 2010; FEINMAN, 2014).

Os DGTI que atingem mais seletivamente os intestinos, delgado e grosso, são menos comuns, porém não menos importantes. A diverticulose é uma doença que leva à alteração estrutural da parede intestinal, geralmente do cólon, formando os divertículos, projeções saculiformes da mucosa. Mais frequente em idosos, a diverticulose pode infeccionar devido ao acúmulo de impurezas e bactérias nessas bolsas, gerando um quadro de inflamação, a diverticulite. O mesmo ocorre com o apêndice, gerando apendicite, porém de maneira mais grave, a diverticulite pode envolver a inflamação de diversos divertículos (SIBILEAU, 2013).

Os focos de criptas aberrantes são grupos de pequenos poços (criptas de Lieberkühn), que se formam principalmente no epitélio do cólon intestinal. O termo “aberrantes” indica a anormalidade destas criptas, o que muitos estudos indicam ser as primeiras etapas do câncer colorretal (BIRD, 1995; OGATA, 2010).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), no ano de 2012 o câncer colorretal foi responsável pelo óbito de 694 mil pessoas, o que representa 8,5% das mortes mundiais por câncer (WHO, 2014a). No ano de 2011, dentre os países mais ricos, foi a sétima causa morte (27 casos/100 mil habitantes), e na listagem geral ocupava a 18ª posição (WHO, 2014b). A OMS acredita que nas próximas duas décadas o número de casos de câncer deve subir para um total estimado de 22 milhões de óbitos. Mantendo a proporção atual, isso representaria cerca de 2 milhões de mortos por câncer colorretal no ano de 2030 (WHO, 2014a).

A ingestão frequente de uma dieta rica em fibras solúveis (oligossacarídeos) e insolúveis (celulósicos), associado ao consumo de água, auxiliam na formação, trânsito e eliminação das fezes, além de beneficiar o crescimento dos micro-organismos probióticos, benéficos a saúde do TGI. Ademais, bons hábitos alimentares estão associados com o controle, redução de sintomas e prevenção das doenças gastrointestinais (MICHELFELDER, 2010).

### 3.3 PROBIÓTICOS, PREBIÓTICOS E SIMBIOTÍCOS

A dieta não contém apenas nutrientes que são absorvidos pelo intestino delgado, mas também algumas substâncias que escapam da digestão pelas diversas enzimas digestivas. Estes compostos são os principais substratos das bactérias residentes no trato gastrointestinal (TGI) humano. Consequentemente, as diferentes dietas consumidas pelas populações influenciam diretamente na microbiota intestinal, sendo que a alimentação suplementada com prebióticos e probióticos suprime o crescimento de micro-organismos potencialmente patogênicos (como a *Escherichia coli* enteropatogênica) e estimulam as bactérias benéficas para a saúde (BLAUT, 2002; JOMAY, 2002).

Da mesma forma que em humanos, o efeito benéfico do uso de prebióticos e/ou probióticos também é relatado em animais, sendo verificada redução da colonização intestinal por bactérias patogênicas, melhorando o sistema imune e consequentemente a mortalidade de aves, suínos entre outros (DELIA, 2003; BUDIÑO, 2006; CALLAWAY, 2012).

#### 3.3.1 Probióticos

Primeiramente, os probióticos foram definidos como micro-organismos que promovem o crescimento de outros micro-organismos (LILLY, 1965). Atualmente existe um consenso de que os probióticos se referem a micro-organismos viáveis que promovem ou apoiam o balanço benéfico da microbiota natural do TGI. Atualmente seus maiores representantes são as bactérias produtoras de ácido láctico. Algumas destas são encontradas, além de no intestino, na cavidade oral e vaginal, trazendo benefícios ao ecossistema destas regiões (HOLZAPFEL, 2001).

Os principais benefícios associados aos micro-organismos probióticos são os nutricionais com: a produção de vitaminas; a produção de enzimas digestivas, como a  $\beta$ -galactosidase; efeitos de restauração do epitélio; a redução dos níveis de colesterol; a estimulação do sistema imune; o aumento da motilidade intestinal; a

aderência e resistência à colonização de micro-organismos patogênicos; e com a manutenção da integridade da mucosa intestinal (HOLZAPFEL, 2001; GLENN R, 2004; MICHELFELDER, 2010).

Os probióticos mais utilizados e vendidos para a população, geralmente na forma de alimentos fermentados tipo iogurte, são o *Lactobacillus acidophilus*, *L. crispatus*, *L. johnsonii*, *L. casei*, *L. paracasei* e também diversas cepas de *Bifidobacterium* spp (HOLZAPFEL, 2001).

#### 3.3.1.1 *Bifidobacterium animalis*

As bactérias do gênero *Bifidobacteria* representam cerca de 20% dos micro-organismos encontrados nas fezes de adultos e até 80% nas das crianças. São bacilos gram-positivos e anaeróbios. Elas produzem tanto ácido acético quanto o lático, em uma proporção teórica de 3:2 (acetato/lactato) como metabólitos primários (BARBOSA, 2011).

A espécie *Bifidobacterium animalis*, por vezes chamada de *B. lactis*, está diretamente relacionada com a redução do tempo de transito intestinal, particularmente em mulheres com intestino preso (MARTEAU, 2002). Os efeitos desta cepa sobre a motilidade, sensibilidade e redução de inflamação também ajudam a redução dos sintomas da síndrome do intestino irritável (GUYONNET, 2007). São as mais utilizadas pela indústria alimentícia pelo fato de toleram O<sub>2</sub> na presença de CO<sub>2</sub> (BARBOSA, 2011).

#### 3.3.1.2 *Lactobacillus casei*

Um dos probióticos mais estudados, o *Lactobacillus casei* é uma espécie encontrada na boca e intestino humano. É muito usado industrialmente para a produção de laticínios, devido sua ampla capacidade adaptativa a diferentes valores de pH e temperatura, mas também devido a resistência ao ácido gástrico

(MATSUMOTO, 2010). Estudos indicam que esse micro-organismo é capaz de inibir o crescimento da bactéria *Helicobacter pylori*, presente no estômago da maioria das pessoas que sofrem com gastrite (KO, 2011).

A família Lactobacilli é uma das grandes produtoras de ácido lático como produto da fermentação de açúcares (URDANETA, 1995). São bacilos gram-positivos, não esporulados, anaeróbios, aero e ácido tolerantes. São heterofermentativos facultativos ou obrigatórios. Destaca-se a cepa *L. casei* Shirota como a mais estudada e relacionada direta ou indiretamente à redução do risco de câncer de cólon e de bexiga (BURITI, 2007).

### 3.3.2 Prebióticos

Os prebióticos são definidos como ingredientes alimentícios não digestíveis que afeta benéficamente o hospedeiro por estimular seletivamente o crescimento e/ou a atividade de um ou alguns micro-organismos do cólon intestinal. Para ser classificado como prebiótico, o substrato não pode ser absorvido pelo TGI humano ou animal, deve ser seletivo, ou limitado a um processamento bioquímico ou metabolismo diferenciado por parte do número de micro-organismos endógenos; deve alterar a composição da flora intestinal em favor de uma composição mais saudável; e induzir efeitos, seja luminal ou sistêmico, benéficos para a saúde do hospedeiro (BLAUT, 2002). São exemplos os carboidratos resistentes de cadeia curta, chamados de oligossacarídeos e demais carboidratos pouco digestíveis. A inulina e os fruto-oligossacarídeos são os mais utilizados prebióticos (HOLZAPFEL, 2001).

O potencial prebiótico está relacionado com o fato das bactérias presentes no cólon intestinal, como as bifidobactérias e lactobacilos serem estimuladas seletivamente por alguns carboidratos não digestíveis pelo TGI humano, porém fermentáveis pela microbiota intestinal (GLENN R, 2004). Eles idealmente devem ser de baixa energia (<9kJ/g); aumentar o volume das fezes; estimular a flora benéfica e inibir bactérias indesejáveis como *Clostridium* e *Bacteroides*. Desse modo ocorre a prevenção de infecções, modulação da resposta imune, prevenção do câncer

colorretal, redução dos níveis séricos de colesterol e melhora da biodisponibilidade de alguns alimentos (WALKER, 1998; HOLZAPFEL, 2001; ROBERFROID, 2002; GUARNER, 2003; HUEBNER, 2007; RUSSELL, 2011; SHIMIZU, 2011; KONDEPUDI, 2012).

A dose diária recomendada de prebióticos, para apresentar ação funcional, é entre 3–5 g (ANJO, 2004; ANVISA, 2014). No caso de consumo em doses muito elevadas, podem ocorrer efeitos indesejáveis, como por exemplo, a fermentação excessiva devido ao potencial osmótico dos oligossacarídeos, levando à formação de gases intestinais, flatulência, inchaço e dor abdominal, cólicas e até mesmo diarreia (HOLZAPFEL, 2001).

### 3.3.3 Simbióticos

Um simbiótico refere-se a combinação de probióticos com prebióticos. Geralmente se utilizam um carboidrato prebiótico que promova o crescimento do probiótico escolhido para compor a mistura. Mas a escolha pode ser feita de modo que esse simbiótico possua dois alvos diferentes do TGI, levando à sinergia dos efeitos, com benefícios extras. Um estudo mostrou uma maior redução do número de criptas aberrantes e redução da carcinogênese do cólon em ratos alimentados simbioticamente, em comparação com animais que utilizavam pre e probióticos de modo individual (HOLZAPFEL, 2001; GLENN R, 2004).

## 3.4 OLIGOSSACARÍDEOS

Os oligossacarídeos (OS) são constituídos por 2–20 unidades monossacarídicas. Os mais abundantes são os dissacarídeos como, por exemplo, a sacarose, formada por D-glucose e D-frutose (NELSON, 2006). Os formados por quitina e celulose também estão amplamente distribuídos, devido à abundância de seus polissacarídeos (RASTALL, 2002). Nas células humanas os oligossacarídeos

estão presentes geralmente na forma de glicoconjugados, com lipídios e proteínas (NELSON, 2006).

Os carboidratos que não são digeridos e absorvidos pelo intestino delgado (prebióticos) são fermentados por bactérias no cólon, processo que afeta a flora intestinal. Os OS são os principais nutrientes para o crescimento de alguns micro-organismos do intestino. A fermentação destes açúcares resulta na acidificação do conteúdo do cólon e na formação de AGCC, que servem como combustíveis para diferentes tecidos do corpo humano além de desempenharem um papel importante em vários processos de regulação celular, e estimula o crescimento das bifidobactérias e lactobacilos e inibem o crescimento de bactérias potencialmente malélicas. Os prebióticos especificamente estimulam o crescimento da população endógena de micro-organismos benéficos para saúde humana (BLAUT, 2002).

A utilização de alguns OS está relacionada com o aumento da absorção de cálcio pelo intestino, com subsequente melhora da densidade óssea. Além de também estarem relacionados com a redução do colesterol e triglicerídeos totais, os OS podem ser utilizados de modo eficiente no controle da obesidade, pois são capazes de promover saciedade, reduzindo a sensação de fome (MINEO, 2001; SIRÓ, 2008).

A legislação brasileira atual aceita a utilização com alegação de propriedades funcionais e ou de saúde dos fruto-oligossacarídeos (FOS), goma guar parcialmente hidrolisada, que gera oligossacarídeos de galactomanana (GMOS) de alta massa molar e polidextroses, que quando de cadeias curtas são os gluco-oligossacarídeos ou OS de dextrose (ANVISA, 2014). A legislação japonesa, FOSHU, a primeira e mais completa a esse respeito, já aceita todos os OS como capazes de modificar as condições gastrointestinais (FOSHU, 2014). Isso serve de incentivo aos pesquisadores para buscar condições de produção e a comprovação de eficácia de outros OS ainda não aprovados (BLAUT, 2002). A química de carboidratos poliméricos, através das inúmeras combinações de unidades monossacarídicas (homo e heteropolissacarídeos) e de ligações entre elas (2, 3, 4 ou 6-ligadas), além da anomericidade ( $\alpha$  ou  $\beta$ ), extremidade redutora e GP, antecipam o extenso leque de OS a serem obtidos, seja de forma natural ou biotecnológica (enzimas), com a possibilidade de descoberta de *neo*-oligossacarídeos de estrutura inédita.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Segue metodologias comuns utilizadas para o cumprimento dos objetivos específicos: obtenção de oligossacarídeos prebióticos tanto “como subprodutos do pré-tratamento de resíduos ligno(hemi)celulósicos por termopressurização com ácido fosfórico diluído” (capítulo 1) quanto “a partir de hidrólise enzimática direta de substratos oriundos de fitobiomassa” (capítulo 2).

### 4.1 QUANTIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS OLIGOSSACARÍDEOS

O monitoramento dos oligossacarídeos (OS) liberados durante os diferentes processos de hidrólise se deu por análise dos açúcares redutores (item 4.1.1) e totais (item 4.1.2). O perfil dos OS obtidos foi determinado preliminarmente por cromatografia em camada delgada (CCD) (item 4.1.3), seguido de análises de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (item 4.1.4).

#### 4.1.1 Determinação de Açúcares Redutores

Os açúcares redutores foram mensurados pelo método do dinitrosalicilato alcalino que tem como princípio o fato dos açúcares reduzirem o reagente DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) na presença de hidróxido de sódio, para o composto 3-amino-5-nitrosalicílico, um produto de cor laranja-avermelhado, que pode ser mensurado em 540 nm (figura 4) (MILLER, 1959). O grupo aldeído dos açúcares redutores como a glucose é oxidado para ácido carboxílico (NELSON, 2006).

Para a realização do ensaio foi necessário preparar o reagente do DNS, conforme tabela 2. As frações A e B foram levadas ao aquecimento separadamente até completa solubilização dos sais. Então, as duas frações foram homogeneizadas e o volume ajustado com água destilada para 500 mL de solução final.

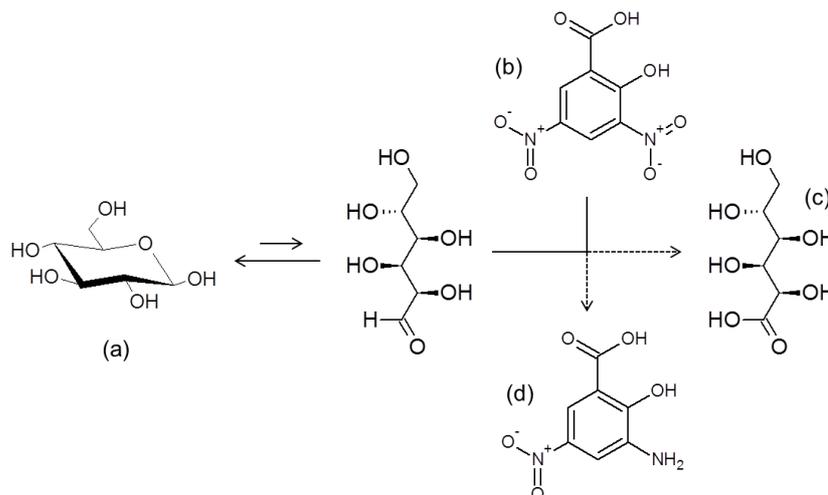


FIGURA 4 - REAÇÃO DE REDUÇÃO DO ÁCIDO 3,5-DINITROSALICÍLICO

NOTA: (a) açúcar redutor (glucose), (b) ácido 3,5-dinitrosalicílico (cor amarela); (c) ácido carboxílico do açúcar e (d) 3-amino-5-nitrosalicílico (cor laranja-avermelhada).

FONTE: O autor.

TABELA 2 - COMPOSIÇÃO REAGENTE DINITROSALICÍLICO (DNS)

|          |                                     |        |
|----------|-------------------------------------|--------|
| <b>A</b> | Ác. 3,5-Dinitrosalicílico           | 5 g    |
|          | Solução NaOH 2 mol/L                | 100 mL |
| <b>B</b> | Tartarato duplo de Sódio e Potássio | 150 mL |
|          | H <sub>2</sub> O destilada          | 300 mL |

NOTA: O volume final deve ser completado para 500 mL

As amostras foram preparadas em triplicatas contendo de 0,05–1,0 mg de açúcares redutores e foram adicionadas em água destilada q.s.p 750 µL. A seguir, foram adicionados 500 µL do reagente DNS e a mistura levada a fervura em banho-maria durante 5 minutos. Decorrido este tempo, foram adicionados 3,75 mL de água destilada e após o resfriamento foram realizadas as leituras em espectrofotômetro (Shimadzu UV-1650 PC) em 540 nm. O equipamento foi calibrado com um controle contendo apenas água e reagente DNS, processado da mesma forma que as demais amostras.

O cálculo da quantidade de açúcar redutor (mg/amostra) foi realizado a partir da equação da reta gerada por curva analítica da correlação entre a absorbância e a concentração de açúcar (mg) presente na amostra ( $R^2 > 0,99$ ), em triplicata, contendo cinco pontos, utilizando de maneira interpolada duas soluções padrão. Foram realizadas curvas para os açúcares: glucose, xilose, manose, xilose:manose (1:1; m/m), galactose e ácido galacturônico, a partir de solução 200 mg% (m/v).

Em alguns casos foi utilizada uma versão miniaturizada do método contendo 0,025–0,3 mg de açúcares redutores por amostra de q.s.p. 150 µL + 100 µL do reativo de DNS. Após 2 minutos de fervura foi adicionado 700 µL de água destilada. Os cálculos das quantidades de açúcar redutor (mg/amostra) foram realizados a partir curvas analíticas geradas nestas mesmas condições descritas anteriormente.

#### 4.1.2 Determinação dos Açúcares Totais

A determinação de açúcares totais foi realizada conforme a técnica de fenol sulfúrico (DUBOIS, 1956). Trata-se de um método colorimétrico quantitativo de micro determinação de açúcares e seus metil derivados, OS e polissacarídeos. A reação é baseada na desidratação do carboidrato na presença do ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), produzindo um aldeído (pentoses são desidratadas até furfural e hexoses até hidroximetilfurfural — HMF), que é capaz de se condensar com duas moléculas de fenol resultando em um composto de cor amarelo-alaranjado, conforme ilustrado na figura 5.

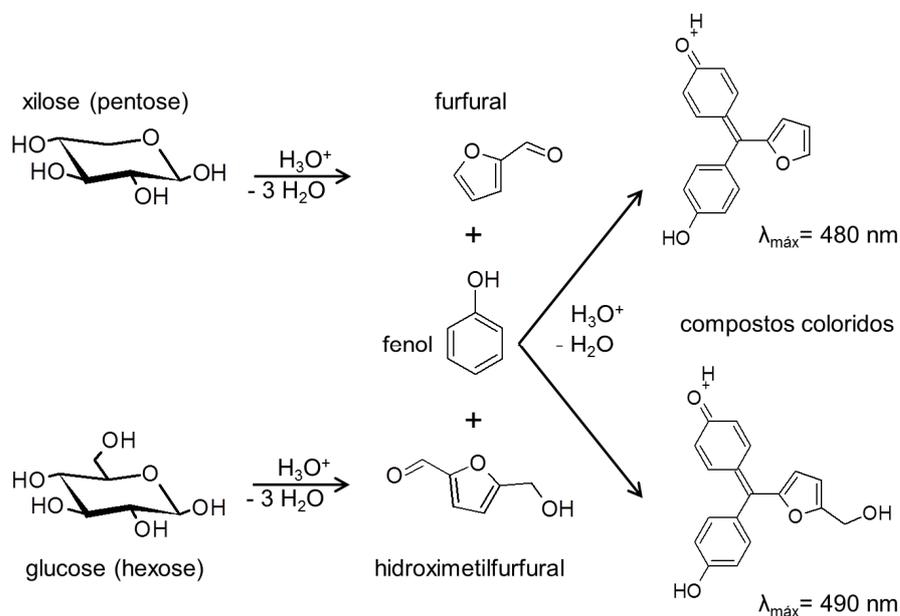


FIGURA 5 - REAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES TOTAIS PELO MÉTODO FENOL SULFÚRICO  
 FONTE: O autor.

Para a realização do ensaio foi necessário que os tubos de vidro fossem lavados exaustivamente para a remoção de quaisquer resíduos (água + detergente catiônico), evitando assim possíveis interferências nas respostas do teste. As amostras (triplicata) contendo 0,1–60 µg de açúcar foram adicionadas em água q.s.p 0,63 mL. Adicionou-se a mistura 0,4 mL de solução fenol 5% (m/v) (0,53 mol/L). Em seguida, adicionou-se de forma rápida e direta, 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado, seguido de homogeneização e repouso por 15 minutos. Em seguida foram realizadas as leituras em espectrofotômetro em 480 nm para as pentoses (xilose e xilose:manose) e 490 nm para as hexoses (glucose e manose). Para a calibração do equipamento foi utilizado um controle com água e os demais reagentes, processados da mesma maneira.

O cálculo das quantidades de açúcar total (µg/ensaio) foi realizado a partir da equação da reta gerada através de curva analítica da correlação entre a absorbância e a concentração de açúcar (µg) presente na amostra ( $R^2 > 0,99$ ), em triplicata, contendo cinco pontos, utilizando de maneira interpolada, duas soluções padrão. Foram realizadas curvas para os açúcares: glucose, xilose, manose e xilose:manose (1:1), a partir de solução 10 mg%. Para os cálculos de porcentagem, o valor da amostra total utilizado foi multiplicado pelo fator 1,1, pois durante a quebra ocorre a inserção de uma molécula de água (18 g) em cada unidade de anidro açúcar (exemplo, 162 g para hexose).

#### 4.1.3 Cromatografia em Camada Delgada

As análises por cromatografia em camada delgada (CCD) foram realizadas utilizando cromatoplasmas Merck de sílica-gel 60 utilizando como fase móvel uma mistura recém preparada de acetonitrila, isopropanol e água destilada na proporção 15:3:5 (v/v). O revelador utilizado foi o orcinol sulfúrico (250 mg de orcinol/45 mL de metanol + 2,5 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) mediante aquecimento a 100–110 °C, por alguns minutos, seletivo para carboidratos e seus produtos de degradação. Foram utilizados como padrões soluções dos monossacarídeos: xilose, arabinose, manose, galactose e glucose, e dos produtos de degradação: HMF e furfural e de OS de xilose (XOS). As

cromatoplaças foram fotografadas e densitometradas com o uso do *software* Image J 1.47v (*National Institutes of Health*, USA), para estimar a produção de OS.

#### 4.1.3.1 Amostra de Referência de Oligossacarídeos

##### 4.1.3.1.1 Extração de Hemicelulose

Foi realizada a extração das hemiceluloses (HCs), segundo metodologia adaptada (O'DWYER, 1939), do bagaço de cana e serragem de *Pinus taeda* (obtidos segundo item 6.1) em meio alcalino para posterior hidrólise ácida em condições mais brandas de temperatura para a produção de OS de referência. Foram pesados 20 g de resíduo L(h)C liofilizados que foram extraídos com 300 mL de solução aquosa de hidróxido de potássio (KOH) 20 g% (m/v) (3,5 mol/L) até fervura. Para a serragem de *Pinus* foi avaliada a adição de 4 g% (m/v) de ácido bórico ( $\text{HBO}_3$ ) ao álcali. O material foi filtrado a vácuo e a massa celulósica foi novamente extraída com mais 150 mL de KOH 20 g% (m/v) até a fervura. A HC foi precipitada com a adição de cinco volumes de etanol 95%, após acidificação até pH 5 com ácido acético glacial. Após 72 h sob refrigeração, o material foi centrifugado a 8.000 rpm (21.460 g) a 4 °C por 15 min e posteriormente a HC obtida foi liofilizada.

##### 4.1.3.1.2 Hidrólise Ácida

Para obtenção de uma amostra de referência de OS, 20 mg das HCs obtidas foram hidrolisadas com 2 mL de ácido trifluoroacético (TFA) 4 mol/L em banho-maria a 80 °C nos tempos 10, 30, 45, 60 e 180 min (ALBERSHEIM, 1967). O TFA volátil foi removido por pressão negativa sobre os frascos destampados durante 30 min e o restante do material foi liofilizado e posteriormente re-suspenso em 1 mL de água destilada. Foram determinados os açúcares redutores (item 4.1.1) e totais (item 4.1.2) e o perfil foi analisado por CCD (item 4.1.3).

#### 4.1.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

O perfil dos hidrolisados ácidos e enzimáticos foi analisado por CLAE em um equipamento Shimadzu LC-10 station com a coluna Phenomenex Luna derivatizada com grupo funcional amino  $\text{NH}_2$  ( $5\ \mu\text{m}$ ) —  $250 \times 4,6\ \text{mm}$  — mantida em forno a  $50\ ^\circ\text{C}$  (FONTANA, 2011). Foi utilizada como fase móvel (FM) a mescla de acetonitrila e água na proporção 8:2 (v/v) com pH ajustado para 8,5 com hidróxido de amônio, filtrada com membrana de politetrafluoretileno (PTFE) de  $0,45\ \mu\text{m}$  e degaseificada com sonicador e vácuo. Os cromatogramas foram obtidos a um fluxo de  $1\ \text{mL}/\text{min}$  e detector de índice de refração (RID). As amostras (*loop* de  $20\ \mu\text{L}$ ) foram convenientemente diluídas e centrifugadas a  $13.000\ \text{rpm}$  ( $14.360\ \text{g}$ ) por  $5\ \text{min}$  antes de serem injetadas.

## 4.2 PURIFICAÇÃO DOS OLIGOSSACARÍDEOS

### 4.2.1 Purificação em Coluna

Foi realizado um micro ensaio de purificação de OS utilizando colunas contendo  $200\ \text{mg}$  de carvão ativado lavado sequencialmente com os ácidos fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) e sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) (Sigma C5510) homogêinizado com  $200\ \text{mg}$  de Celite (Synth 545), previamente lavados com água. Após a montagem da coluna, foi eluído  $50\ \text{mL}$  de água destilada anteriormente a adição de  $1\ \text{mL}$  do hidrolisado de bagaço de cana em  $8,5\ \text{atm}$  pH 2,5. A eluição seguiu um gradiente hidroalcoólico,  $1\ \text{mL}$  por vez, de água destilada ( $2\ \text{mL}$ ), e etanol 5% ( $1\ \text{mL}$ ), 10% ( $1\ \text{mL}$ ) 30% ( $1\ \text{mL}$ ) e 50% ( $5\ \text{mL}$ ), totalizando 10 amostras. A eficiência da purificação foi avaliada por CCD e densitometria da cromatoplaca.

#### 4.2.2 Purificação em Batelada

A purificação em batelada se deu utilizando 200 mg de carvão ativado (lavado com  $H_3PO_4$  e  $H_2SO_4$ ) previamente lavado com água destilada. Foi adicionado 1 mL do hidrolisado de bagaço de cana em 8,5 atm pH 2,5 sob agitação magnética durante 10 min. Após a sedimentação (10 min), a porção líquida foi retirada com auxílio de uma pipeta Pasteur e centrifugada por 5 min à 13.000 rpm (14.360 g). Para a remoção dos açúcares livres e OS foram adicionados sequencialmente 1 mL por vez, água destilada (2 mL) e etanol 5% (1 mL), 10% (1 mL) 30% (1 mL) e 50% (4 mL), totalizando 10 amostras. A eficiência da purificação foi avaliada por CCD e densitometria da cromatoplaca.

#### 4.3 CULTIVO DE PROBIÓTICOS COM OLIGOSSACARÍDEOS

Para o cultivo celular foram utilizadas fontes comerciais de micro-organismos probióticos: *Lactobacillus casei* Shirota (Yakult®) e *Bifidobacterium animalis* subespécie *lactis* (Activia®). Estes micro-organismo foram previamente cultivados no produto original diluído 50% com um meio contendo 0,2% (cada) de extrato de levedura e casaminoácidos. O pH final do meio foi ajustado para 6,0 com soluções de hidróxido de sódio 1 mol/L. O cultivo se deu em ambiente de anaerobiose com atmosfera de  $CO_2$  (jarra de anaerobiose com vela) a 37 °C por três dias. Após esse período, a biomassa foi recuperada por centrifugação a 3.000 rpm (2.010 g) por 20 min e lavada por 2 vezes com tampão fosfato de potássio 75 mmol/L, pH 5,0. As células lavadas foram re-inoculadas em meio de cultivo utilizando 0,5 g% (m/v) de OS hidrolisados como fonte de carbono, em meio contendo 0,2% (m/v) de extrato de levedura e casaminoácidos (cada) com pH final ajustado para 6,0 com solução de hidróxido de sódio. O cultivo se deu em ambiente de anaerobiose com atmosfera de  $CO_2$  a 37 °C por 14 dias sendo coletadas alíquotas no tempo 0 h e a cada 24 h para posterior análise de crescimento celular (item 4.3.1), produção de ácidos orgânicos (item 4.3.2) e pH.

#### 4.3.1 Crescimento Celular

A análise do crescimento celular se deu pelo acompanhamento das células totais, realizado através de técnica de turbidimetria (TORTORA, 2012). As amostras (0,5 mL) foram centrifugadas a 13.000 rpm (14.360 g), durante 5 minutos (Eppendorf; Mini Spin Plus). Os precipitados foram ressuspensos em 1 mL de solução de salina 0,9% (m/v) estéril. As amostras foram analisadas em espectrofotômetro (Shimadzu UV-1650 PC) em 660 nm.

#### 4.3.2 Produção de Ácidos Orgânicos

A análise de produção de ácidos orgânicos se deu por CLAE em um equipamento Shimadzu LC-10 station com uma coluna Phenomenex - Rezex para ácidos orgânicos (ROA) — 300x7,8 mm — mantida em forno a 50 °C (FONTANA, 2011), utilizando como FM uma solução de ácido sulfúrico 8 mmol/L filtrada com membrana de Mistura de Estéres de 0,45 µm e degaseificada com sonicador e vácuo, com fluxo de 0,5 mL/ min e detector RID. As amostras (*loop* de 20 µL) foram convenientemente diluídas e filtradas com nylon 0,45 µm antes de serem injetadas. Os padrões avaliados estão apresentados nos gráficos 44 e 45 no apêndice. A determinação do teor dos ácidos acético e láctico foram calculados por equação da reta obtida através da curva analítica da concentração (µg/mL) e área do pico ( $R^2 = 0,99$ ).

Também foi realizado o acompanhamento da variação do pH do meio durante o cultivo através de sonda capilar InLab MicroPro (Mettler Toledo) e potenciômetro (Sartorius Docu-pH+ Meter) devidamente calibrado com soluções padrão com valores de pH, 4,01, 7,01 e 10,0.

#### 4.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todas as variáveis estudadas foram avaliadas quanto à normalidade da distribuição dos dados pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Os dados foram apresentados na forma de média  $\pm$  desvio padrão das replicatas, que foram avaliadas para coeficiente de variação menor que 5%. As diferenças entre amostras foram analisadas por teste t de Student bicaudal e em grupos por ANOVA complementado por teste Tukey. As curvas analíticas foram calculadas por teste de correlação de Pearson. Foram considerados significados valores de  $p < 0,05$ . Todas as análises foram realizadas com auxílio dos softwares Microsoft Office Excel 2010 e Statistica 10 (StatSoft, Inc. Tulsa, OK, USA).

**CAPÍTULO 1: OBTENÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS PREBIÓTICOS COMO  
SUBPRODUTOS DO PRÉ-TRATAMENTO DE RESÍDUOS  
LIGNO(HEMI)CELULÓSICOS POR TERMOPRESSURIZAÇÃO COM ÁCIDO  
FOSFÓRICO DILUÍDO**

## 5 REVISÃO DE LITERATURA

### 5.1 LIGNO(HEMI)CELULÓSICOS

Os materiais ligno(hemi)celulósicos — L(h)Cs — são a principal fonte de carbono e energia renovável do planeta. O nome se refere aos constituintes principais da parede celular vegetal, ou seja, a celulose, hemicelulose e lignina, esquematizados na figura 6, e engloba diversos resíduos agrícolas (bagaço de cana-de-açúcar, palha de milho e de arroz, sabugo de milho, resíduos de algodão, entre outros), florestais e madeiras (OGEDA, 2010; FONSECA, 2011).

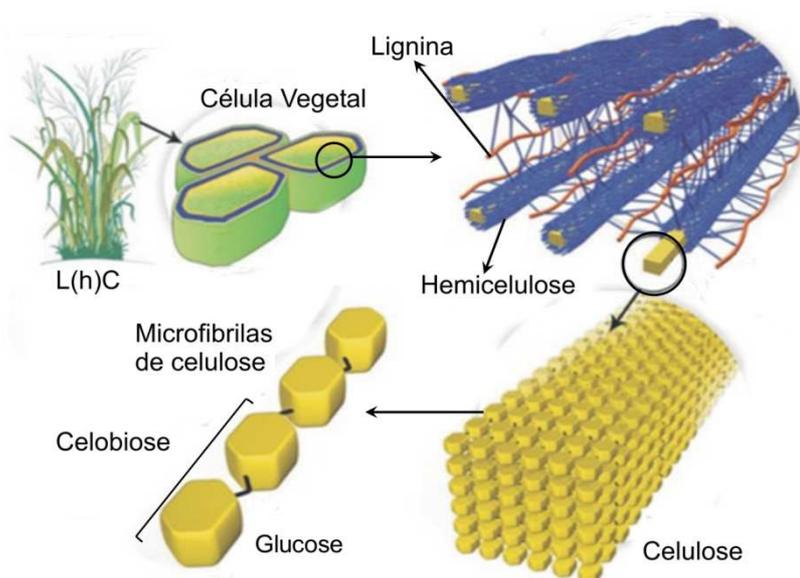


FIGURA 6 - ESQUEMA DA ESTRUTURA DE BIOMASSA LIGNO(HEMI)CELULÓSICA  
FONTE: Adp. (SANTOS, 2012).

Quanto à composição quantitativa dos L(h)Cs, ocorre variação de acordo com tipo de vegetal, angiospermas (madeiras duras), gimnospermas (madeiras moles, como as coníferas) ou gramíneas (como o bagaço de cana) e o estágio de desenvolvimento da planta em questão. De modo geral podemos dizer que apresentam entre 40–50% de celulose, 20–30% de hemicelulose, 20–25% de lignina e 5–8% de outros extrativos (FONTANA, 2013).

A utilização de biomassa L(h)C para os diversos fins é mais complexa do que quando se têm celulose pura, não só devido à composição heterogênea, mas também porque tecidos vegetais diferem enormemente no que diz respeito à armação molecular e organização supramolecular. Por exemplo, no algodão e outras plantas fibrosas, os valores de graus de polimerização (GP) dos açúcares estão na ordem de 800 a 10.000, dependendo do tratamento físico ou extrativo, enquanto no bagaço de cana esses valores são muito superiores (LYND, 2002; SILVA, 2009).

Existem ainda limitações adicionais, impostas por difusão e transporte do agente celulolítico (ácidos ou enzimas) ao local do ataque (ROEHR, 2001). Alguns tipos de células vegetais têm paredes finas, pouco lignificadas, que são mais facilmente degradadas por enzimas. Outros têm a espessura das paredes celulares e lamela média altamente lignificadas, sendo que estas paredes devem ser atacadas de dentro para fora, através da parede secundária (LYND, 2002).

O desenvolvimento de processos eficazes que aproveitem de modo integral da biomassa vegetal, transformando-as em produtos com diversas utilidades (químicos, combustíveis alternativos, remediação ambiental, nutracêuticos), são de interesse global. Entretanto, em grande parte, requer algum pré-processamento que viabilize seu uso (KUMAR, 2008), com a remoção total ou parcial, das hemiceluloses e lignina, tornando a biomassa residual celulósica mais acessível ao ataque de enzimas celulolíticas (HARMSEN, 2010; BALCU, 2011).

Na literatura existem diversos tipos de pré-tratamentos, como à base de ácidos ou bases, solventes orgânicos, líquidos iônicos, ozonólise, hidrotermais, explosão a vapor, micro-ondas, microbiológicos e métodos combinados (BALCU, 2011).

### 5.1.1 Celulose

Cerca de 40–50% dos resíduos L(h)Cs são constituídos de celulose, sendo considerado o material orgânico mais abundante da terra (LYND, 2002). A celulose é um homopolímero linear composto por milhares de unidades de  $\beta$ -D-glucopiranosose 4-ligadas (NELSON, 2006). Cada unidade de glucose tem uma orientação de 180°

em relação ao resíduo adjacente, acomodando desta forma os ângulos de ligação preferidos pelos grupos acetais em ligações de hidrogênio, formando assim a celobiose, figura 7 (SANDGREN, 2005).

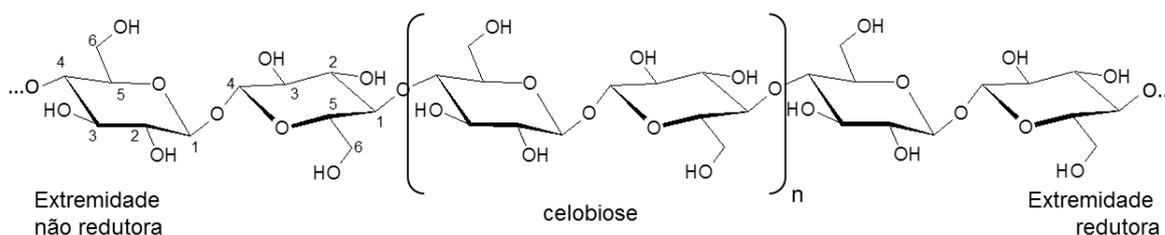


FIGURA 7 - ESTRUTURA MOLECULAR DA CELULOSE

NOTA: Cadeia linear de β-D-glucopiranosos 4-ligados. Carbonos da extremidade não-redutora numerados.

FONTE: O autor.

Na natureza, a celulose é sequencialmente sintetizada como moléculas individuais. O comprimento das cadeias depende do GP, e varia de acordo com a origem. Estas cadeias lineares de unidades de celobiose submetem-se à automontagem no local da biossíntese. Aproximadamente 30 destas moléculas individuais são fisicamente entrelaçadas em unidades maiores, as micro-fibrilas, que são estabilizadas com hemiceluloses através de múltiplas ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals, formando as fibrilas, estruturas altamente organizadas e cristalinas (LYND, 2002; FONTANA, 2004; NELSON, 2006). Essas fibras compactas garantem total insolubilidade em água, embora sejam hidratáveis (SAXENA, 2001; LYND, 2002; FONTANA, 2004). Contudo, existem regiões menos compactas e não cristalinas denominadas amorfas, que permitem o ataque de enzimas celulolíticas (ROEHR, 2001).

### 5.1.2 Hemicelulose

A hemicelulose (HC) corresponde a 20–30% dos resíduos L(h)Cs e é constituída de hetero-polissacarídeos que ocorrem associados fisicamente à celulose, formando as fibrilas através de interações parciais covalentes com as moléculas de lignina. Com isso, à parede celular apresenta-se rígida, oferecendo

proteção contra patógenos e também contra o ataque de micro-organismos hemicelulolíticos (LYND, 2002; FONTANA, 2004; SANDGREN, 2005).

A hemicelulose consiste de cadeias ramificadas de açúcares, de menor dimensão molecular, cujas unidades incluem principalmente aldopentoses, como xilose e arabinose, e aldohexoses, como glucose, manose, e galactose. Contém também, substituintes *O*-acetil bem como *L*-arabinofuranosil, ácido *D*-glucurônico e ácido  $\alpha$ -*D*-4-*O*-metilglucurônico ramificados (BRIENZO, 2010).

A composição das HCs é variável, dependendo da espécie considerada (OGEDA, 2010). Em plantas angiospérmicas (madeiras duras) e gramíneas ocorre a predominância de um esqueleto linear de unidades de  $\beta$ -*D*-xilopiranosose 4 ligadas, mas com variada substituição das hidroxilas dois e três por  $\alpha$ -*L*-arabinofuranose, ácido 4-*O*-metil-*D*-glucurônico (e sua base não metilada) e grupos *O*-acetil (PÉREZ, 2010). Já em plantas gimnospérmicas (madeiras moles), a estrutura predominante é baseada em um esqueleto linear de unidades de  $\beta$ -*D*-manopiranosose, intercaladas com unidades de  $\beta$ -*D*-glucopiranosose (manose > glucose), além de discretas ramificações com unidades de  $\alpha$ -*D*-galactopiranosose (FONTANA, 1984a). Ambos os tipos de HC são solubilizáveis por álcali e menos resistentes à hidrólise (ácida ou básica) do que a celulose. Entretanto a resistência à solubilização dos sacarídeos (manose > xilose > glucose > arabinose > galactose) faz com que a HC composta por cadeias de manana sejam mais resistentes do que as compostas por xilanas (HENDRIKS, 2009).

### 5.1.3 Lignina

A lignina é um polímero aromático e juntamente com a HC preenche os espaços entre as fibras de celulose, além de atuar como material ligante entre os componentes da parede celular, pois realiza, parcialmente, interação covalente com a HC e física com a celulose (BOERJAN, 2003). Existem poucas exceções a essa arquitetura tríplice formada pela celulose, HC e lignina, como o algodão e a paina com predominância absoluta da celulose (>90 e >75%, respectivamente).

Trata-se de um composto heterogêneo, de média massa molecular (entre 200–500), com estrutura irregular altamente complexa e não-uniforme. É um material hidrofóbico, altamente ramificado, podendo ser classificado como um polifenol (SILVA, 2009). É composto por três tipos de lignina, a H (hidroxifenila), G (guaiacila) e S (siringila), polímeros oxidativos dos precursores fenilpropanóides monoméricos, álcool cumárico, coniferílico e sinapílico, respectivamente (figura 8). A proporção de composição variável entre as espécies vegetais resulta em lignina com características físicas diferentes.

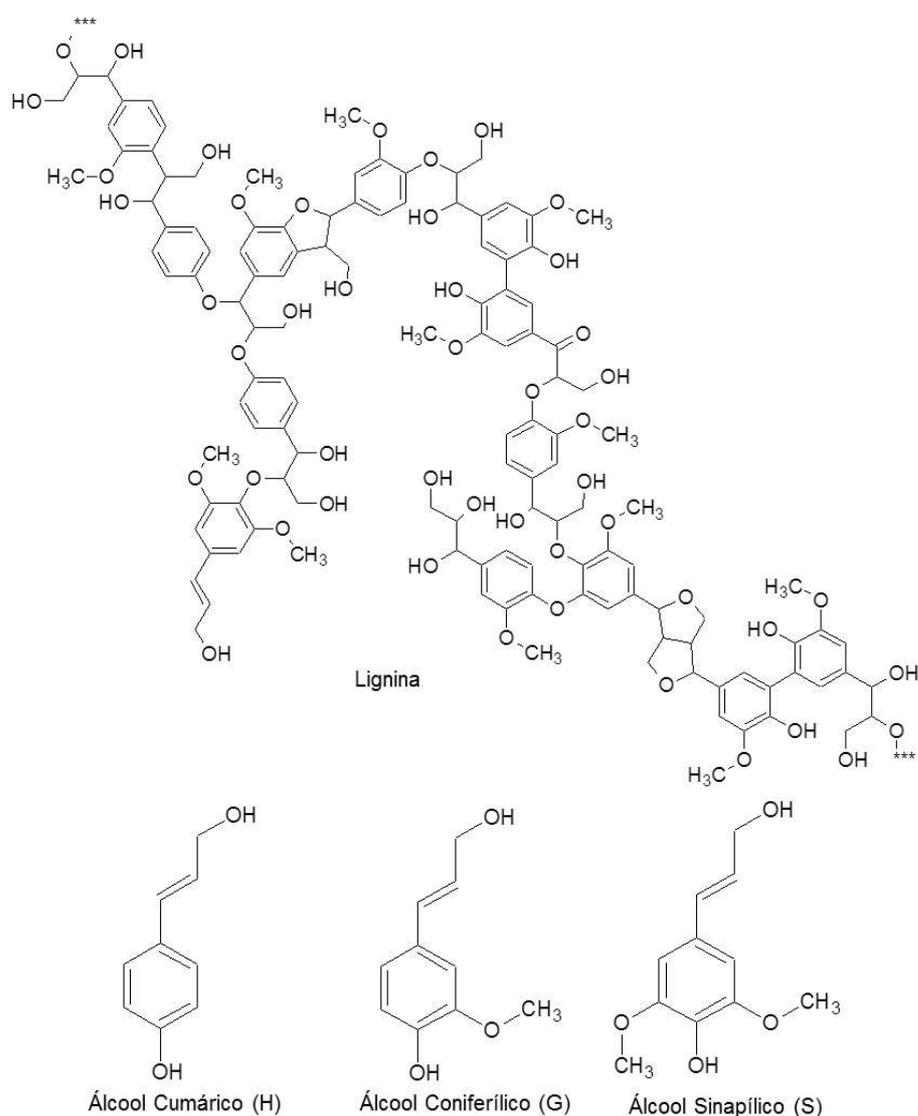


FIGURA 8 - ESTRUTURA DOS ÁLCOOIS PRECURSORES E DA LIGNINA

NOTA: A lignina é formada pela polimerização oxidativa de três precursores fenilpropanóides (alcoóis cumárico, coniferílico e sinapílico), formando ligninas dos tipos H (hidroxifenila), G (guaiacila) e S (siringila).

FONTE: O autor.

## 5.2 PRÉ-TRATAMENTO DE RESÍDUOS L(h)C

O pré-tratamento dos resíduos L(h)Cs é uma etapa essencial, e cara, chegando a 20% do custo total para a produção de bioetanol, e tem a finalidade de separar/eliminar alguns componentes e principalmente tornar a celulose mais acessível para uma posterior hidrólise até glucose, monossacarídeo fermentável. Entretanto, para que haja redução da cristalinidade da celulose e aumento na porosidade da biomassa, eventualmente ocorrem perdas (total ou parcial) de lignina e HC. Portanto, a escolha do pré-processamento deve levar em conta as características e composição da biomassa em questão, sendo que alguns materiais exigem uma combinação das diferentes técnicas (CHIARAMONTI, 2012; GAO, 2013).

Os tipos de pré-tratamento são classificados em: físicos, físico-químicos, químicos e biológicos e devem ser escolhidos de acordo com o produto final desejado (HENDRIKS, 2009; GALBE, 2012; MOOD, 2013).

O pré-tratamento físico está relacionado com a redução do tamanho médio das partículas através de uma moagem e trituração do material, chegando ao final do processo com tamanho médio de 0,2-2 mm (CHIARAMONTI, 2012; GAO, 2013). Somente isso pode aumentar o poder hidrolítico de um material em até 25% (HENDRIKS, 2009). Existem ainda técnicas que envolvem irradiação de raios gama, micro-ondas, pulso elétrico, congelamento, entre outros (CONDE-MEJÍA, 2012; MOOD, 2013).

Dentre os pré-tratamentos físico-químicos encontram-se a auto-hidrólise e a explosão a vapor. A primeira consiste em tratamento térmico (150–230 °C) associado a altas pressões, em meio aquoso onde a HC é depolimerizada em oligo- e monossacarídeos, à custa do ácido acético liberado das hemiceluloses. Já a explosão a vapor consiste também em uma hidrólise sob alta temperatura (>180 °C) e pressão de vapor que repentinamente é reduzida a zero. Essa descompressão explosiva súbita abre a estrutura da biomassa, remove entre 75–90% da HC e aumenta a acessibilidade da enzima em etapa posterior (CHIARAMONTI, 2012; CONDE-MEJÍA, 2012).

Os tratamentos químicos incluem a hidrólise em meio ácido, tratamento alcalino ou ainda com solventes. O ácido mais utilizado é o sulfúrico seguido do clorídrico e nítrico. Estas hidrólises devem ser controladas para que haja redução da geração de produtos de degradação dos monossacarídeos, em furfural, proveniente das pentoses (xilose e arabinose) e em hidroximetilfurfural (HMF) das hexoses (glucose, manose e galactose) (CHIARAMONTI, 2012; CONDE-MEJÍA, 2012). Quando utilizados ácido concentrados não é necessário aumentar a temperatura, entretanto ácidos diluídos ( $\leq 25\%$ ) requerem temperaturas mais altas (FOSTON, 2010). Uma tecnologia alternativa, com a hidrólise fosfórica diluída e termopressurizada, foi desenvolvida no LQBB já em 1984 para aplicação nos bagaços de cana e sorgo (FONTANA, 1984) e continua válida ainda hoje, sendo utilizada por universidades nacionais e estrangeiras e ainda por uma multinacional produtora de celulases.

O tratamento alcalino mais utilizado é com hidróxido de sódio, de cálcio e amônia. Ele se baseia na propriedade dos álcalis de solubilizar a lignina e a HC e promover a mercerização, celulose tipo I para tipo II pela inversão das fibras de celulose, de paralelas em antiparalelas. Ele ocorre em baixas temperaturas, entretanto com altas concentrações do álcali (GAO, 2013). A solubilização da lignina também pode ser feita por solventes orgânicos, os mais utilizados são etanol, metanol e acetona, sob altas temperaturas. Entretanto este pré-tratamento inclui a periculosidade mais acentuada e o custo com a recuperação do solvente (CHIARAMONTI, 2012; CONDE-MEJÍA, 2012).

O pré-tratamento biológico está baseado no uso de micro-organismos produtores das enzimas ligninases, hemicelulases e celulases, gerando preferencialmente os monossacarídeos, de modo seletivo. Entretanto, esse processo geralmente deve ser feito após alguns dos pré-tratamentos anteriormente descritos, pois isoladamente possui baixa eficiência (CHIARAMONTI, 2012).

### 5.2.1 Enzimas celulolíticas e Bioetanol

Os materiais L(h)C são particularmente atraentes para produção de bioetanol devido ao seu custo relativamente baixo e à oferta abundante de matéria-prima (MCMILLAN, 1997; ROEHR, 2001; LYND, 2002). Entretanto, o preço final de produção de bioetanol está mais associado com o pré-tratamento utilizado e o valor comercial das enzimas. As atuais pesquisas de grandes multinacionais, como a Novozymes® e a Genencor®, já reduziram o custo industrial das enzimas celulolíticas de US\$ 0,50 para US\$ 0,20, por galão (3,78 L) de bioetanol produzido. Mas, para se tornar competitivo, este custo deve ser de no máximo US\$ 0,04 (GOHO, 2008). Ricardo Blandy, líder de operações em biomassa da Novozymes para a América Latina, afirma que depois de descontados os investimentos iniciais, o custo de produção de um litro de etanol celulósico já é inferior ao convencional (ZAPAROLLI, 2014). De qualquer forma, a viabilização da fabricação do bioetanol a partir de resíduos lignocelulósicos, envolve altos custos de implementação, seja na produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas mais eficientes, ou durante o pré-processamento ou ainda com o desenvolvimento de processos contínuos (sacarificação e fermentação simultaneamente) (LYND, 2002; GOHO, 2008).

A classificação das enzimas celulolíticas é feita com base no modo em que cada uma catalisa a quebra das fibras de celulose, figura 9: (1) As endoglucanases (EG) clivam as ligações internas nas micro-fibrilas que se encontram nas regiões amorfas da fibra de celulose, diminuindo o comprimento das cadeias e gerando novas extremidades livres, redutoras e não-redutoras; (2) as exoglucanases ou celobiohidrolases (CBH) agem de maneira progressiva a partir das extremidades redutoras (CBH I) ou não-redutoras (CBH II) da celulose, liberando oligossacarídeos menores e principalmente celobiose; (3) já a  $\beta$ -glucosidase (BGL) atua nos fragmentos oligossacarídicos menores e mais intensamente na celobiose liberando glucose livre (KLYOSOV, 1995; LYND, 2002).

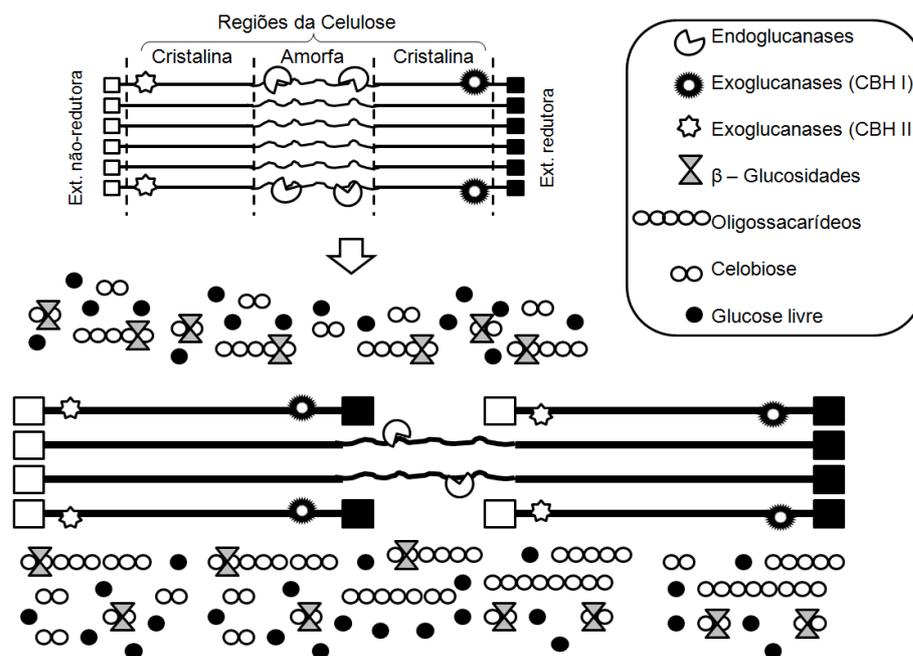


FIGURA 9 - MECANISMO DE AÇÃO DAS ENZIMAS CELULOLÍTICAS  
 FONTE: adp. (LYND, 2002)

### 5.3 BAGAÇO DE CANA

Entre os resíduos L(h)Cs, destaca-se no Brasil o bagaço da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), gerado pela indústria sucro-alcooleira (FONSECA, 2011). A produção brasileira de cana na safra 2013/2014 foi de 659,85 milhões de toneladas (CONAB, 2014). Segundo a agência Embrapa de Informação Tecnológica (AGEITEC), a quantidade de bagaço produzido depende do teor de fibra da cana, resultando em média 28% da cana processada. Sendo assim, para a safra corrente, em base úmida, cerca de 185 milhões de toneladas ou 92,5, em base seca, já que o bagaço, em média, é produzido com 50% de umidade.

O bagaço de cana-de-açúcar é uma gramínea composta por 41,90% ( $\pm 3,1$ ) de celulose em fibras com GP médio entre 800-1900 (O'HARA, 2011). A HC representa 24,9% ( $\pm 1,7$ ) sendo composta por heteroxilanas, figura 10, parcialmente substituídas por arabinose, ácidos metil-glucurônico, glucurônico e acético (PÉREZ, 2010), com GP média de 75 (RUDOLF, 2008). A lignina representa 24,8% ( $\pm 5,9$ ) e é composta por uma combinação 1:1 de guaiacila e siringila (CANILHA, 2012).

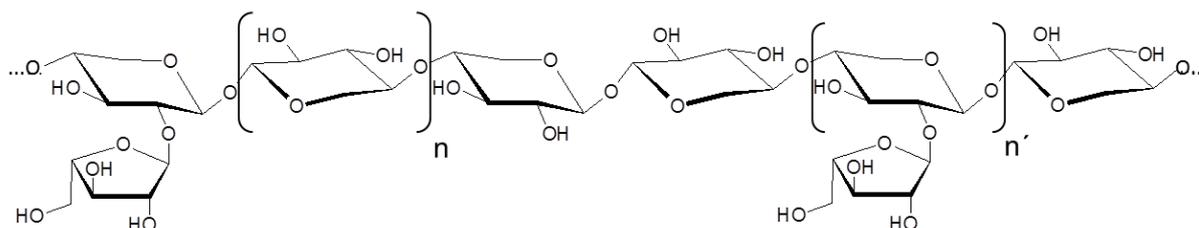


FIGURA 10 - ESQUEMA DA ARABINOXILANA

NOTA: Cadeia linear de β-D-xilopiranosose 4- ligadas com variada substituição das hidroxilas dois e três por α-L-arabinofuranose.

FONTE: O autor.

Um dos principais destinos dos resíduos da cana tem sido a queima para a geração de vapor e então de energia elétrica *in loco*, sendo uma alternativa para atender o gasto energético das usinas sucro-alcooleiras na produção de etanol combustível (MARTINELLI, 2008). Entretanto, uma mudança de cenário pode ocorrer no Brasil, uma vez que já está em fase de testes a primeira usina com capacidade de produzir etanol a partir de bagaço e palha de cana, chamada de BioFlex da GranBio, em São Miguel dos Campos, Alagoas. Em agosto de 2014 esta unidade obteve autorização da Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis para funcionar, e estima-se produção de 82 milhões de litros/ano (GRANBIO, 2014). Uma segunda unidade está sendo construída em Piracicaba, São Paulo, com capacidade para 40 milhões de litros/ano. A expectativa é que já no final de 2014 esteja em funcionamento. A GranBio tem planos de expansão por meio de associações com usinas convencionais e pretende produzir >1 bilhão de litros/ano até 2020 (ZAPAROLLI, 2014). O etanol celulósico é gerado a partir de hidrólise com celulases industriais de última geração, como as Accelerases da Genencor® e as Cellics da Novozymes® (GORGULHO, 2012).

#### 5.4 *Pinus taeda*

O pinheiro *Pinus taeda* é uma conífera da família Pinaceae distribuída principalmente nos Estados Unidos e Canadá, onde é conhecido como *loblolly pine* ou pinho amarelo resinoso ou de terras úmidas. Entretanto, por ser uma madeira de

alta qualidade e rápido desenvolvimento, entre outras espécies, é uma das escolhas para plantios de reflorestamento destinados a indústria papelreira, madeireira, entre outras, em diversas partes do mundo. O processamento da madeira gera resíduos, como a serragem, que pode ser aproveitada para diversas finalidades, como a produção de bioetanol (YOON, 2008; PRICE, 2011).

Por ser uma planta gimnospérmica (madeira mole) e possuir baixo conteúdo de pentoses, como a xilose, em sua composição, tem sido bastante pesquisada para bioconversão à bioetanol, com a vantagem de que com o pré-tratamento térmico ocorre baixa formação de furfural, que é um inibidor do posterior processo fermentativo (ZHU, 2010).

O *Pinus taeda* possui 45,2% ( $\pm 1,3$ ) de celulose, sendo composta por longas fibras com GP médio de 1500 (SWEET, 1999). A HC representa 21,2 ( $\pm 1,4$ ) da biomassa e é heterogênea. Ela é composta por 39% de cadeias de arabinoxilanas e 61% de galactoglucomananas (manose > galactose > glucose) figura 11 (FONTANA, 1984a; ZHU, 2010; PRICE, 2011; CARVALHO, 2013; TIBONI, 2014). A parede vegetal do *Pinus* é altamente lignificada, 27,9% ( $\pm 0,9$ ), composta majoritariamente por unidades guaiacil (>85%) (CANILHA, 2012). Essa característica faz dessa biomassa recalcitrante, sendo necessário muitas vezes associar vários pré-tratamentos para viabilizar seu uso (ZHU, 2010).

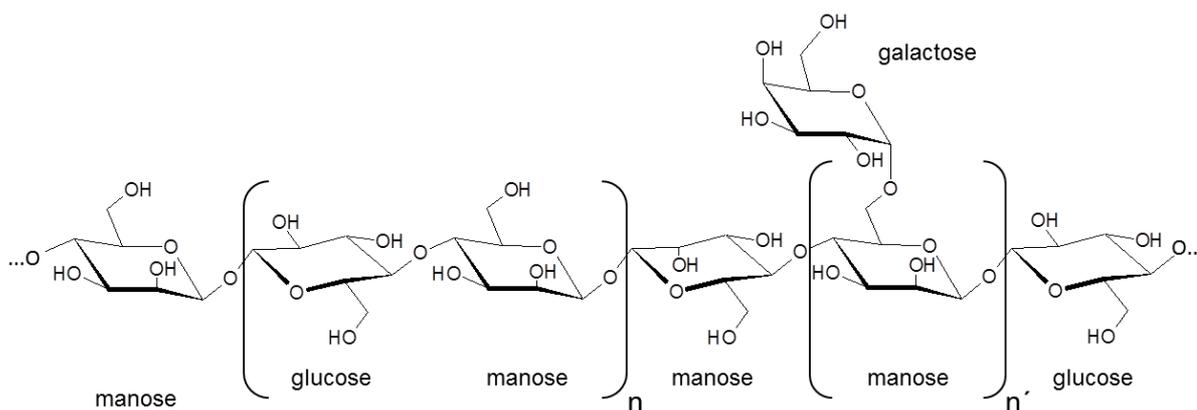


FIGURA 11 - ESQUEMA DA GALACTOGLUCOMANANA

NOTA: Cadeia linear de  $\beta$ -D-manopiranos, intercaladas com unidades de  $\beta$ -D-glicopiranos (manose > glicose) 4- ligados, além de discretas ramificações com unidades de  $\alpha$ -D-galactopiranos 6-ligados.

FONTE: O autor.

## 6 MATERIAL E MÉTODOS

### 6.1 RESÍDUOS L(H)C

O bagaço de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) foi provido pela cooperativa COCAMAR (Maringá-PR), como uma cortesia de Wagner Spirandelli (CLASPAR, Curitiba-PR). A sacarose residual, tida como 3%, foi removida com sucessivas e exaustivas lavagens com água potável, seguido de uma última lavagem com água destilada.

A serragem de pinho (*Pinus taeda*) foi doada pelos professores Umberto Klock e Eliana Lopes da Silva, do laboratório de polpa e papel da Universidade Federal do Paraná.

Ambos os resíduo L(h)Cs foram cominuídos em liquidificador comercial (Warring Blender) e coletados em fragmentos de entre 100–20 mesh (partículas de tamanho 150–850  $\mu\text{m}$ ). O conteúdo de água dos resíduos L(h)C foi normalizado por liofilização *overnight*.

### 6.2 TERMOPRESSURIZAÇÃO COM ÁCIDO FOSFÓRICO

#### 6.2.1 Ensaio Preliminar

O pré-tratamento utilizado com os resíduos L(h)C foi a termopressurização com solução aquosa diluída de ácido O-fosfórico (AF) (FONTANA, 1984b; FONTANA, 2011). Utilizou-se primeiramente uma relação de biomassa e solução ácida de 1:6 (m/v) (0,5 g/3 mL), sendo essas soluções com pH de 2,5, 2,25, 2,0 e 1,75 (tabela 4) além do controle com água destilada. As amostras permaneceram cerca de 12 h dentro do termoreator (feito sob encomenda na metalúrgica Scybiator para o Laboratório de Químio/Biotecnologia de Biomassa - LQBB em 1986), para polimerização do silicone acético termoresistente PolyStic (utilizado para um cuidado

adicional de vedação, antes do aquecimento). Foram avaliadas as pressões de 3,0, 4,5, 7,0, 8,5, 10,0 e 12,0 atmosferas, mantendo o pico máximo de temperatura (tabela 3) por 2 minutos e então desligando a fonte de aquecimento. Após o resfriamento do reator, a pressão residual foi cuidadosamente aliviada, sem explosão a vapor, e o conteúdo hidrolisado foi filtrado por lã de vidro. A porção sólida remanescente (insolúvel) foi lavada com água destilada equivalente a proporção 1:2 (m/v) (1 mL), liofilizada e analisada conforme descrito no item 6.3. A porção filtrada (solúvel) contendo os OS e seu lavado aquoso subsequente foi analisada segundo item 4.1.

TABELA 3 - TEMPERATURAS EM PRESSÕES DE VAPOR SATURADO D'ÁGUA

| Pressão (atm)*   | 3   | 4,5 | 7,0 | 8,5 | 10  | 12  |
|------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Temperatura (°C) | 144 | 156 | 171 | 178 | 185 | 192 |

NOTA: (\*) Pressão de manômetro, considerando a pressão atmosférica local igual a zero.

FONTE: (CHOCIAI, 1987)

### 6.2.2 Ensaio Otimizado

Um segundo experimento de hidrólise fosfórica termopressurizada, objetivando melhoria nas respostas obtidas, utilizou uma relação de biomassa L(h)C e solução ácida de 1:8 (m/v) (3 g/24 mL), com os mesmos valores de pH citados no item 6.2.1 além da inclusão de um ponto mais severo de pH 1,5 (tabela 4) com as pressões de 7,0, 8,5 e 10,0 atm.

TABELA 4 - CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO O-FOSFÓRICO CONFORME pH DESEJADO

| pH       | 2,5   | 2,25  | 2,0   | 1,75  | 1,5   |
|----------|-------|-------|-------|-------|-------|
| mmol/L   | 5,5   | 10,7  | 23,8  | 59,4  | 140,9 |
| g% (m/v) | 0,031 | 0,061 | 0,136 | 0,340 | 0,806 |

NOTA: Valores de mmol/L e g% obtidos de modo prático após a adição do ácido fosfórico em água até pH desejado.

O conteúdo hidrolisado foi filtrado utilizando um sistema a vácuo acoplado a um funil de Buchner com placa porosa de 4,5–5 µm. O volume recuperado foi utilizado para calcular o volume de água destilada a ser utilizada para lavagem da porção sólida, a fim de obter uma proporção final de biomassa e filtrado de 1:10 (m/v) (volume de filtrado final de 30 mL). O pH do filtrado foi mensurado antes e

após a lavagem complementar. A porção sólida retida no filtro foi lavada com 20 mL de água destilada para completa remoção de qualquer açúcar livre residual. A porção sólida remanescente no filtro (insolúvel) foi liofilizada e analisada conforme descrito no item 6.3. A porção filtrada contendo os OS solúveis foi analisada segundo item 4.1.

## 6.3 RESÍDUOS L(H)C INSOLÚVEIS

### 6.3.1 Termogravimetria

A termogravimetria, que fornece informações acerca da composição e estabilidade térmica dos compostos analisados, foi realizada em um equipamento Mettler-Toledo TGA-SDRA 851 com amostras nativas e hidrolisadas (7 atm — pH 2,25) de bagaço e *Pinus* e foi conduzida sob atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50 mL/min, com aquecimento de 20–900 °C com taxa de aquecimento linear de 20 °C/min.

### 6.3.2 Hidrólise Enzimática

#### 6.3.2.1 Enzimas

As enzimas utilizadas para as incubações foram celulases Cellic CTec 2 — VCNI0008 (EG - endoglucanases + CBH I e II - celobiohidrolases) — de *Trichoderma reesei* suplementadas com a enzima  $\beta$ -glucosidase (BGL) NS50010 — DCN00213 — concentrada de *Aspergillus niger*, na proporção 1:1 (v/v). As enzimas foram fornecidas pela empresa Novozymes Latin America Ltda., de Araucária/PR.

### 6.3.2.2 *Sacarificação dos Resíduos Celulósicos*

O ensaio de sacarificação dos resíduos celulósicos sólidos pré-tratados com ácido fosfórico foi realizado através de hidrólise enzimática da fração insolúvel liofilizada. Foram utilizados 200 mg de amostras com volume final foi de 4 mL (1:20 m/v) contendo as enzimas celulase:  $\beta$ -glucosidase (1:1; v/v) em tampão citrato de sódio 50 mmol/L, pH 5,0, em agitador-incubador na velocidade 4 (160 rpm; 0,72 g) a 50 °C. Para o ensaio de termopressurização ácida preliminar (item 6.2.1) foram utilizadas amostras hidrolisadas com água e pH 1,75 e solução enzimática 8  $\mu$ L/mL, enquanto para o ensaio otimizado (item 6.2.2) todas as amostras foram hidrolisadas com solução enzimática 16  $\mu$ L/mL. Foram coletadas amostras nos tempos 24, 48 e/ou 72 h para a determinação de açúcares redutores conforme descrito no item 4.1.1.

## 7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 7.1 CURVAS ANALÍTICAS

Foram realizadas novas curvas analíticas para cada novo lote dos reagentes para determinação de açúcares redutores (DNS) e totais (Fenol 5%) preparados, além da repetição de três pontos da curva analítica (triplicata) feitos juntamente com cada conjunto de amostras analisadas.

Devido à composição mista da HC de *Pinus*, composta tanto por arabinoxilana (pentose) quanto por galactoglucomanana (hexose), foi necessária a utilização de uma curva analítica de manose:xilose 1:1 (m/m) para a calibração dos experimentos. Porém, isso trouxe a necessidade da escolha da leitura para o método fenol sulfúrico em 480 nm (pentoses) ou 490 nm (hexoses). Para essa avaliação foram realizadas curvas dos padrões manose (Man) (490 nm), xilose (Xil) (480 nm) e manose:xilose (M:X) 1:1 (m/m) lidos em 480 e 490 nm conforme pode ser visualizado no gráfico 1.

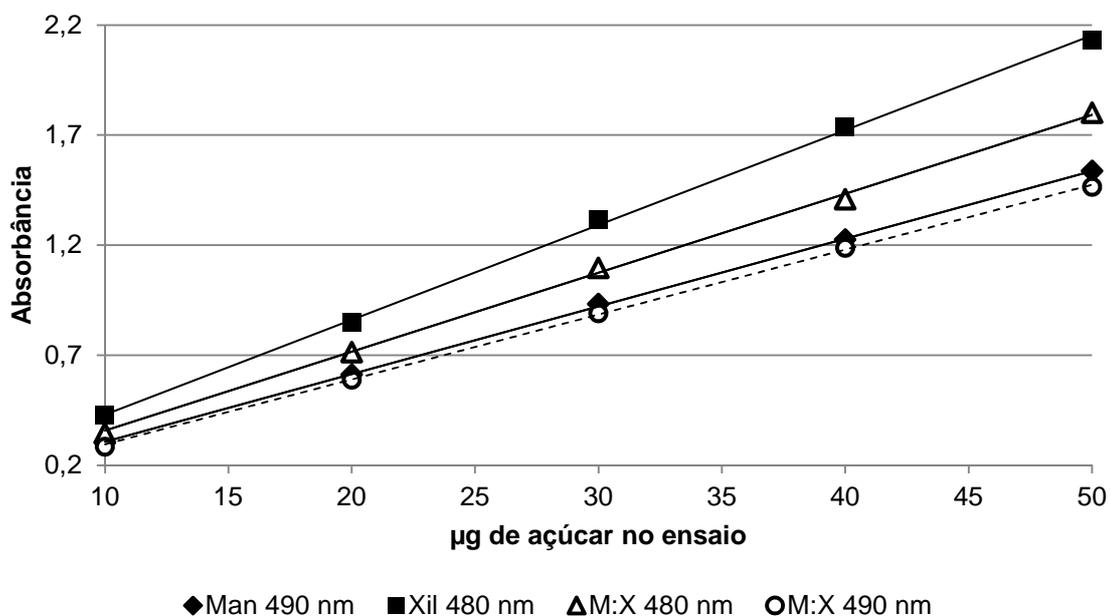


GRÁFICO 1 - CURVAS ANALÍTICAS DE AÇÚCARES TOTAIS PARA MÉTODO FENOL SULFÚRICO

A análise das curvas analíticas para o método fenol sulfúrico da combinação M:X 1:1 (m/m) lido em 490 nm ficou igual ( $p>0,20$ ) aos valores encontrado para a curva de manose 490 nm. Realizando a média de valores encontrados para os dois açúcares, manose e xilose, obteria-se uma curva analítica resultante equivalente ( $p>0,55$ ) à obtida com a curva da mistura M:X 1:1 (m/m) lida em 480 nm. Por esse motivo, os dados obtidos para os resíduos L(h)C de *Pinus* foram lidos para o método fenol sulfúrico em 480 nm utilizando uma curva de M:X 1:1 (m/m).

## 7.2 AMOSTRA DE REFERÊNCIA DE OLIGOSSACARÍDEOS

Com a dupla extração de HC total de bagaço de cana observa-se um precipitado composto de heteroxilanas que após liofilização resultou em 5,12 g ( $\pm 0,2$ ). Esta quantidade representa 25,61% dos 20 g iniciais utilizados, estando condizente com dados encontrados na literatura que indicam que essa biomassa possui 24,9% ( $\pm 1,7$ ) de HC (RUDOLF, 2008; PÉREZ, 2010; CANILHA, 2012), sendo então a metodologia empregada capaz de removê-la por completo.

Os resultados obtidos para o *Pinus* não foram satisfatórios. Pela solubilização inferior das cadeias de manose, comparativamente à das xilanas (HENDRIKS, 2009), já era esperado uma recuperação menor, motivo pelo qual o  $\text{HBO}_3$  foi avaliado como um auxiliar de solubilização alcalina, em função de sua capacidade de complexação com açúcares (hidroxilas *cis* vizinhas, como na manose) (WARD JR., 1962; FENGEL, 1989). Entretanto, não houve diferença no resultados de recuperação de HC ( $p=0,7217$ ) com a adição deste complexante, que apenas apresentou visualmente floculação e precipitação mais rápidas, como pode ser visualizado na figura 12. Após a liofilização foram obtidos 489,58 mg ( $\pm 123,77$ ) de HC. Isto representa apenas 2,45% da massa inicial utilizada, quando o esperado teórico seria 21,2% ( $\pm 1,4$ ) de heteromananas e heteroxilanas (SWEET, 1999; PRICE, 2011). Sendo assim, apenas 11,56% das HCs totais de *Pinus* foram extraídas. O desvio padrão alto também indica a baixa reprodutibilidade da técnica para esta fitobiomassa em particular.

Devido ao baixo rendimento obtido com *Pinus* apenas a HC obtida do bagaço de cana foi hidrolisada para obtenção de uma amostra de referência de OS, no caso XOS.

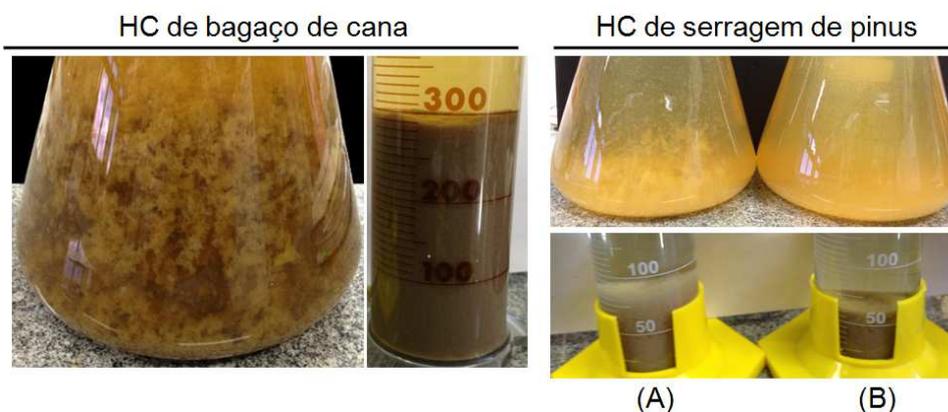


FIGURA 12 - PRECIPITAÇÃO DE HEMICELULOSE TOTAL EXTRAÍDA DE BAGAÇO DE CANA E SERRAGEM DE PINUS  
NOTA: Hemicelulose (HC) de serragem de *Pinus* com (A) KOH e  $\text{HBO}_3$  (B) apenas com KOH

### 7.2.1 Hidrólise Ácida de Hemicelulose de Bagaço de Cana

A hidrólise com o TFA a  $80^\circ\text{C}$  ocorreu de maneira progressiva como pode ser observado no gráfico 2, chegando a 60% do material, mensurados por açúcares redutores, já em 60 minutos. Nas condições experimentadas apenas em 180 min não houve produção de OS, como pode ser visto na CCD (figura 13). A cromatoplaça foi densitometrada e a condição com melhor pureza de produção, 83,3%, foi com 30 min de hidrólise. Para confirmar a série homologa de OS desta amostra, foi realizado o teste de correlação linear entre o  $\text{Log} \frac{1-R_f}{R_f}$  versus o GP (gráfico 3), onde o  $R_f$  é o fator de retenção, como descrito por (BOUVENG, 1960), obtendo coeficiente de correlação  $r = 0,999$  e de determinação  $r^2 = 0,998$  ( $p < 0,0001$ ).

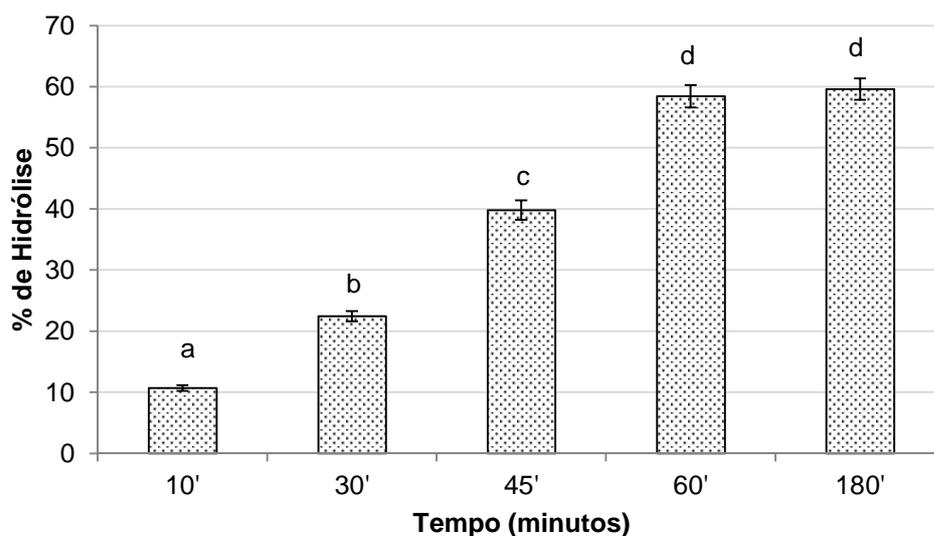


GRÁFICO 2 - HIDRÓLISE COM TFA DA HEMICELULOSE DE BAGAÇO DE CANA

Nota: Porcentagem de hidrólise mensurada por determinação de açúcares redutores. Letras sobrescritas referem-se as diferenças entre os resultados pelo teste Tukey considerando  $\alpha=0,05$ .

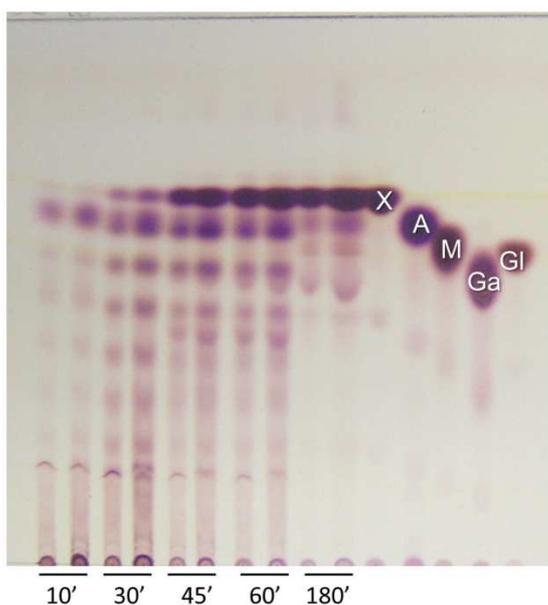


FIGURA 13 - CCD DA CINÉTICA DE TEMPO DA HIDROLISE COM TFA DE HEMICELULOSE DE BAGAÇO DE CANA

NOTA: FM: acetonitrila, isopropanol e água (15:3:5) - revelador: orcinol sulfúrico - Padrões: (A) arabinose, (Ga) galactose, (Gl) glucose, (M) manose e (X) xilose

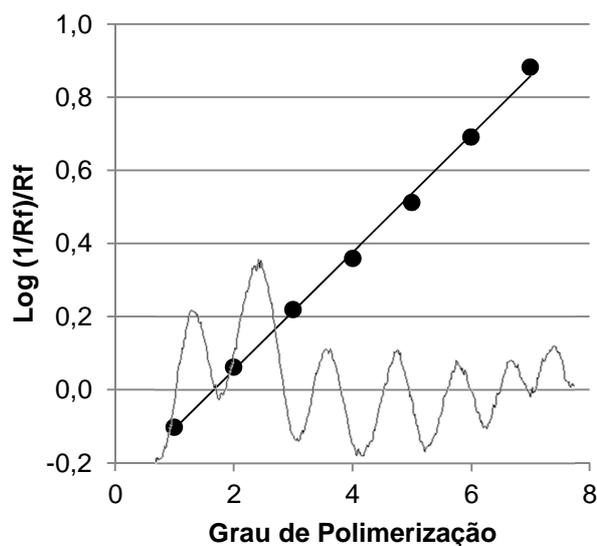


GRÁFICO 3 - DENSITOMETRIA E SÉRIE HOMÓLOGA DE XOS DA HEMICELULOSE DE BAGAÇO DE CANA HIDROLISADA COM TFA

NOTA: Hidrolisado com TFA por 30 minutos. Coeficiente de correlação linear  $r = 0,999$  e de determinação  $r^2 = 0,998$  ( $p < 0,0001$ ).

### 7.3 ENSAIOS PRELIMINARES

Durante os ensaios preliminares foram avaliados os efeitos do pH (2,5–1,75) e pressão da termopressurização (3–12 atm; 144–192 °C), tanto para o melhoramento do potencial hidrolítico da biomassa quanto para a produção de oligossacarídeos. Neste ensaio foi utilizada uma relação de biomassa e solução ácida de 1:6 (m/v) e filtração por lã de vidro. A termogravimetria foi realizada para caracterização das biomassas utilizadas e os efeitos do tratamento termofosfórico.

#### 7.3.1 Termogravimetria

As curvas de termogravimetria (TG) obtidas (gráfico 4) estão condizentes com os dados encontrados na literatura para biomassa L(h)C (KIM, 2010; POLETTO, 2011; GURGEL, 2012). Até o aquecimento de 130 °C ocorre pequena perda de massa, <10%, atribuída à perda de água. As amostras avaliadas (nativo e hidrolisado 7 atm; pH 2,5) apresentaram um platô com massa constante de 130–250 °C, período onde ocorre a despolimerização dos componentes. De 250–400 °C ocorre a maior perda de massa, e a diferenciação só é possível de ser visualizada através da curva derivada (DTG), calculada pelo  $\Delta$  da % de peso /  $\Delta$ °C. A maior diferença entre as amostras nativas e as pré-tratadas por hidrólise termo-fosfórica está na DTG entre 250–325 °C, onde ocorre a perda da HC. A perda é muito mais evidente nas amostras nativas que nas tratadas, como esperado, já que o pré-tratamento remove parte da HC. Entre 325–400 °C ocorre as maiores perdas, relacionadas com a degradação da celulose. Acima de 400 °C ocorre perda de partes da lignina.

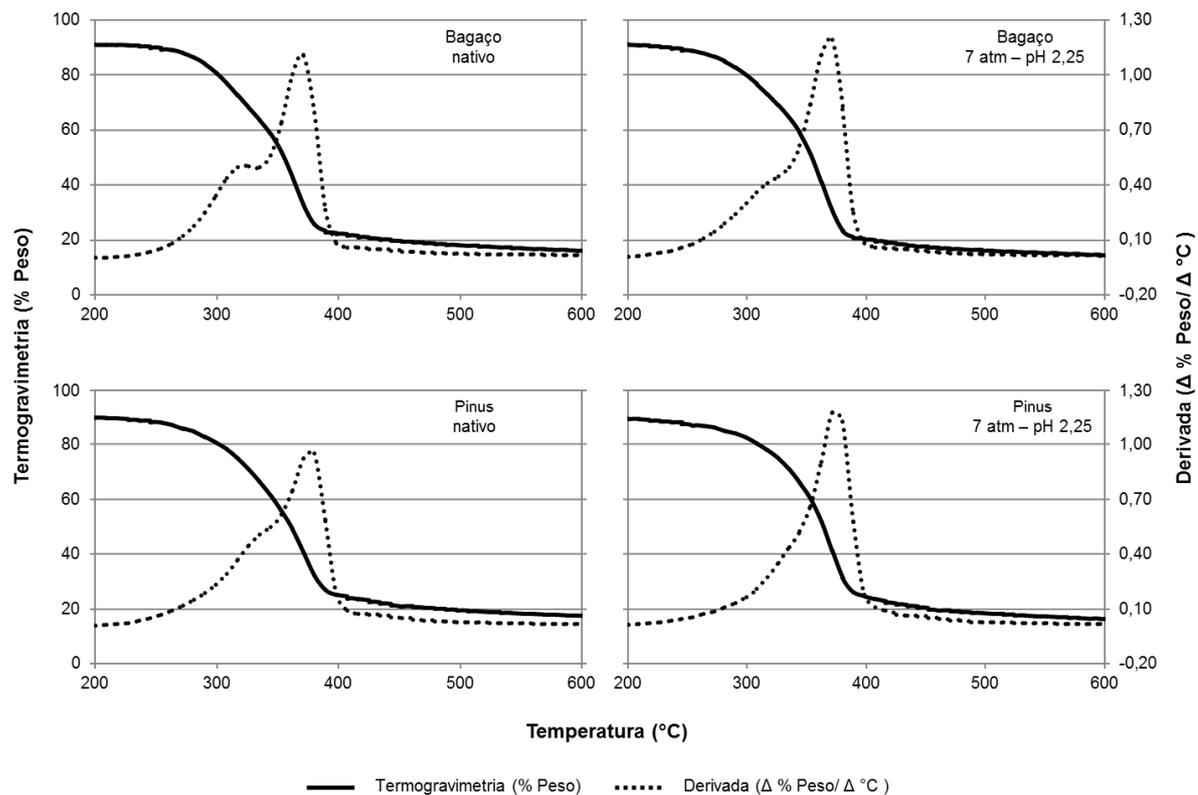


GRÁFICO 4 - TERMOGRAVIMETRIA E DERIVADA DE BAGAÇO DE CANA E SERRAGEM DE *PINUS* NATIVOS E PRÉ-TRATADOS POR TERMOPRESSURIZAÇÃO FOSFÓRICA

Analisando na tabela 5, as perdas de massa por intervalos estratégicos de temperatura ficam mais claras as diferenças entre os dados obtidos para os resíduos na forma nativa e pré-tratada. A termopressurização fosfórica remove parte da hemicelulose e lignina das amostras, fazendo com o que o balanço de massas final fique alterado. Isso fica evidente quando analisa-se a porcentagem referente a celulose, que tanto para o *Pinus* quanto para o bagaço, apresentam valores aumentados para os substratos hidrolisados com o ácido.

TABELA 5 - PERDAS DE MASSA OBTIDAS POR TERMOGRAVIMETRIA DE BAGAÇO DE CANA E SERRAGEM DE *Pinus* NATIVOS E PRÉ-TRATADOS POR TERMOPRESSURIZAÇÃO FOSFÓRICA

| Temperatura | Componente        | % de perda de massa |                |        |                |
|-------------|-------------------|---------------------|----------------|--------|----------------|
|             |                   | Bagaço              |                | Pinus  |                |
|             |                   | Nativo              | 7 atm; pH 2,25 | Nativo | 7 atm; pH 2,25 |
| 0–130 °C    | Água              | 8,52                | 8,45           | 9,69   | 10,08          |
| 130–250 °C  | ---               | 1,50                | 2,51           | 2,23   | 2,23           |
| 250–325 °C  | Hemicelulose      | 21,78               | 19,88          | 17,07  | 12,66          |
| 325–400 °C  | Celulose          | 45,59               | 48,66          | 45,64  | 50,36          |
| 400–900 °C  | Partes da lignina | 10,18               | 8,40           | 10,49  | 10,51          |
|             | Outros resíduos   | 12,43               | 12,10          | 14,88  | 14,16          |

Para a determinação da temperatura do início da perda de peso ( $T_{\text{onset}}$ ) é necessário plotar uma linha reta que melhor enquadre o platô e outra sobre a linha de perda de massa da TG. No ponto de intercessão destas duas retas obtem-se o valor teórico de  $T_{\text{onset}}$ . Para bagaço foram de 314 e 319 °C para nativo e tratado, respectivamente. Para o *Pinus* os valores foram um pouco superiores devido às características mais recalcitrantes da biomassa, sendo de 318 e 330 °C para nativo e tratado, respectivamente. Sendo assim as duas biomassas foram consideradas estáveis termicamente, mesmo após o pré-tratamento. Ressaltando que a porcentagem total de celulose é maior nos L(h)C hidrolisados, portanto isso explica o maior  $T_{\text{onset}}$  para os resíduos pré-tratados.

### 7.3.2 Potencial Hidrolítico da Biomassa

O ensaio de sacarificação durante 48 h da biomassa L(h)C residual após processo de termopressurização fosfórica deixa clara a diferença entre os resíduos de bagaço de cana e serragem de *Pinus*. Ambas as matérias-primas apresentaram aumento do potencial hidrolítico de 5,3 vezes do nativo para a melhor condição, pH 1,75 com 8,5 e 12 atm, para bagaço (de 11,51 para 61,34%;  $p < 0,0001$ ) e *Pinus* (de 3,53 para 18,77%;  $p = 0,0002$ ), respectivamente, mensurados por açúcares redutores. Entretanto a diferença entre as biomassas, observada no gráfico 5, aparenta ser maior já que bagaço de cana nativo por si só possui potencial de sacarificação 3,3 vezes maior que para o *Pinus* nativo, mesmo sem qualquer pré-tratamento. A explicação para isso pode estar relacionada com o fato que a serragem do *Pinus taeda* ser mais lignificada (27,9%) do que o bagaço (24,8%) (CANILHA, 2012), sendo, portanto uma biomassa mais recalcitrante para ação enzimática já que a lignina é tida como a barreira preponderante para tal ação (ZHU, 2010). Essa recalcitrância, ou cristalinidade acentuada dos resíduos L(h)Cs, bem como a interação com hemiceluloses e o *cross-linking* parcial com a lignina são os fatores que mais influenciam na redução da hidrólise enzimática da celulose, devido ao reduzido acesso das enzimas às cadeias polissacarídicas. Outro fator que poderia reduzir a sacarificação enzimática seria o excesso de celobiose (produzido por ação

das CBH) no meio hidrolítico (ZHANG, 2012). Entretanto, o meio foi suplementado com a enzima BGL, excluindo esse motivo, o que foi confirmado por CCD mostrando apenas glucose livre como produto de degradação.

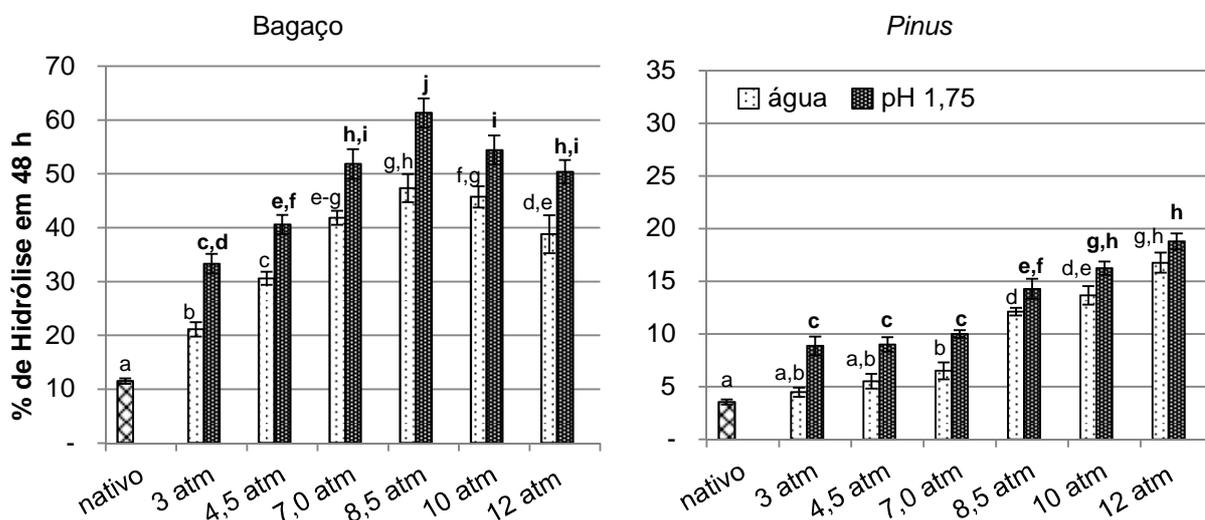


GRÁFICO 5 - POTENCIAL DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DOS RESÍDUOS L(H)C PRÉ-TRATADOS POR TERMOPRESSURIZAÇÃO FOSFÓRICA

NOTA: Porcentagem de hidrólise mensurada por determinação de açúcares redutores. Teste de Tukey foi feito separadamente para amostras do bagaço e pinus.

O resultado máximo obtido com a hidrólise de *Pinus* com AF (concentração 0,340 g%) ficou inferior a 20% abaixo do encontrado na literatura, cerca de 40% para outra espécie de pinheiro (ZHU, 2010). Entretanto, o ácido diluído utilizado foi o sulfúrico 3,7%, que possui pKa 1 = -3,0 (pKa 2 = 2,0), muito inferior ao encontrado para o AF, pKa 1 = 2,15 (pKa 2 = 7,2 e pKa 3 = 12,3), o que também justifica a maior resposta. A diferença dos dados obtidos com os encontrados na literatura também refere-se ao fato dos autores utilizarem altas cargas enzimáticas e ainda longos períodos de incubação, chegando até 7–10 dias. Neste trabalho, optou-se por um período mais curto com carga enzimática baixa para que a diferença entre os tratamentos ficasse evidenciada.

O aumento no potencial hidrolítico com o uso de ácido diluído com relação à hidrólise hidrotermal, mais evidente com o bagaço de cana, também foi verificado em outras gramíneas, entretanto novamente com o uso de ácidos mais concentrados, como o fosfórico 85% e sulfúrico 3% (TAKATA, 2013). O resultado encontrado mostra a eficácia da utilização do ácido fosfórico mesmo estando diluído,

afinal houve aumento na resposta em todas as condições passando de água para ácido ( $p < 0,05$ ). Utilizando ácido fosfórico em concentração mais moderada, 0,5 e 1%, e palha de milho como biomassa, um tratamento por 10–15 min a 160–180 °C, outros autores chegaram a 85 e 91% de hidrólise, respectivamente (AVCI, 2013). Entretanto o experimento novamente utilizou alta carga enzimática por longo período.

O pré-tratamento por termopressurização utilizando ácido fosfórico diluído foi considerado satisfatório para o aumento do potencial hidrolítico enzimático subsequente das biomassas residuais em todas as condições de pressão utilizadas, pois em 48 h com 8  $\mu\text{L}/\text{mL}$  já foram capazes de implementar a hidrólise em pelo menos 2,9 e 2,5 vezes para bagaço e *Pinus*, respectivamente, mesmo na condição de 3 atm.

### 7.3.3 Produção de Oligossacarídeos

A análise e caracterização da porção solúvel contendo os OS prebióticos foi realizada primeiramente através da determinação do conteúdo de açúcares redutores nas amostras. O histograma (gráfico 6) contendo o curso de severidade dos tratamentos com AF em porcentagem de açúcares redutores deixa claro que para ambos os resíduos, bagaço de cana e serragem de *Pinus*, a resposta aumenta conforme o pH diminui. Em 7 atm ocorre o pico de liberação médio seguido de queda nas respostas devido à maior formação de produtos de degradação como anidro açúcares, HMF e furfural, posteriormente confirmado pela CCD com migração cromatográfica mais elevada.

Outra característica interessante é o fato das respostas de açúcares redutores serem maiores ( $p < 0,05$ ) para a serragem de *Pinus* do que as encontradas para o bagaço, já que a literatura sugere que a solubilidade da HC para essa biomassa é inferior (HENDRIKS, 2009). Entretanto, isso se deve ao preparado das soluções ácidas, que foram tituladas até o pH desejado e quando adicionadas ao resíduo L(h)C sofre alterações devido à característica específica da biomassa, não obstante a manutenção da quantidade de fosfato equivalente. Para o *Pinus*, por exemplo,

ocorre um aumento do pH na ordem de 0,4–0,5 após algumas horas de contato. Já para o bagaço esse aumento é maior, cerca de 0,8 unidades de pH. Deste modo a solução final fica levemente mais ácida na presença de *Pinus* do que com o bagaço durante o processo de hidrólise termo-fosfórica. Por exemplo, o pH da água de osmose reversa utilizado estava em 6,25 e após adição do resíduos de bagaço e *Pinus*, caiu para 4,76 e 4,36 respectivamente.

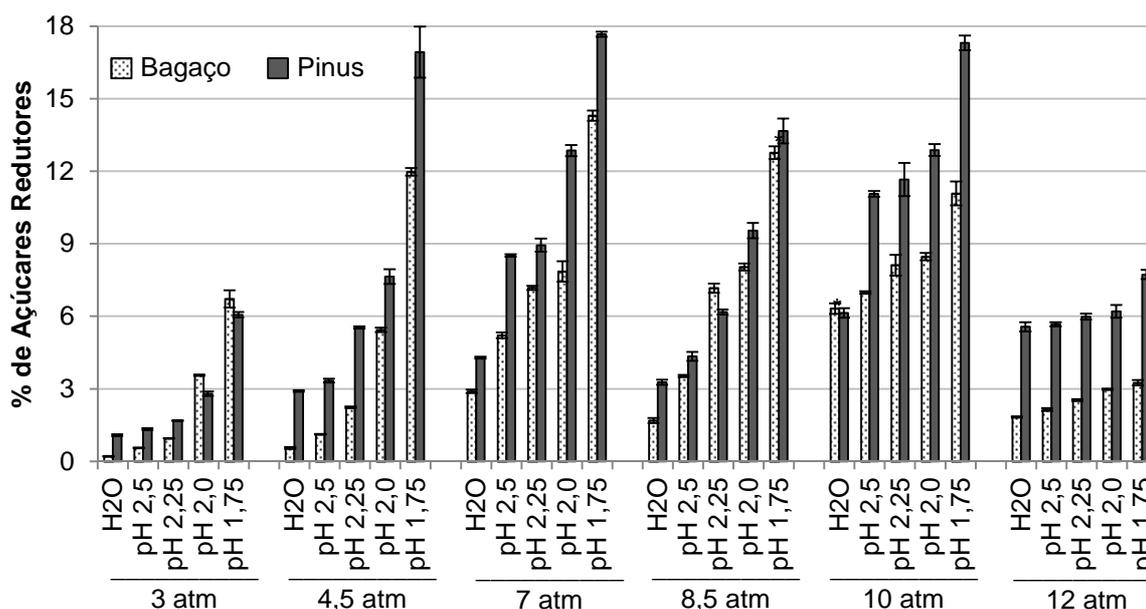


GRÁFICO 6 - HISTOGRAMA DA PORCENTAGEM DE REMOÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES DOS RESÍDUOS L(H)C DURANTE PRÉ-TRATAMENTO POR TERMOPRESSURIZAÇÃO FOSFÓRICA

NOTA: (\*) Condições em que não houve diferença estatística (Teste t de Student) entre os valores obtidos pelos diferentes resíduos ( $\alpha=0,05$ ).

A resposta em açúcares redutores isoladamente não identifica as melhores condições de produção de OS, pois para isso deve-se considerar o perfil qualitativo dos carboidratos extraídos. Levando em conta o grande número de experimentos, em um primeiro momento, essas análises foram realizadas por CCD que permitem uma rápida e usual comparação da porção solúvel obtida através da termopressurização (CHRISTIE, 2011). O revelador orcinol sulfúrico se mostrou bem sensível para a presença de carboidratos nas amostras (<5  $\mu\text{g}$ ) apresentando boa distinção de cores entre as aldohexoses (rosa/bordô), aldopentoses (violeta), cetoses (alaranjado/marrom) e os deoxi-açúcares como o furfural (esverdeado) e HMF (alaranjado escuro/vermelho) (BRÜCKNER, 1955).

Analisando as CCDs obtidas, foi possível observar a formação de OS ao menos em um dos valores de pH avaliados em todas as pressurizações, com exceção de 12 atm, condição mais severa, na qual se vê a presença majoritária de monômeros e maior produção de produtos de degradação: anidro açúcares, furfural e HMF.

Para o bagaço de cana, figura 14, a CCD deixa claro o amplo leque de experimentos capazes de liberar OS durante a hidrólise termo-fosfórica. Entretanto, nas condições mais severas como pH 1,75, em todos as pressões, ocorre liberação de xilose livre e com 7–12 atm, a liberação de glucose proveniente da quebra da celulose.

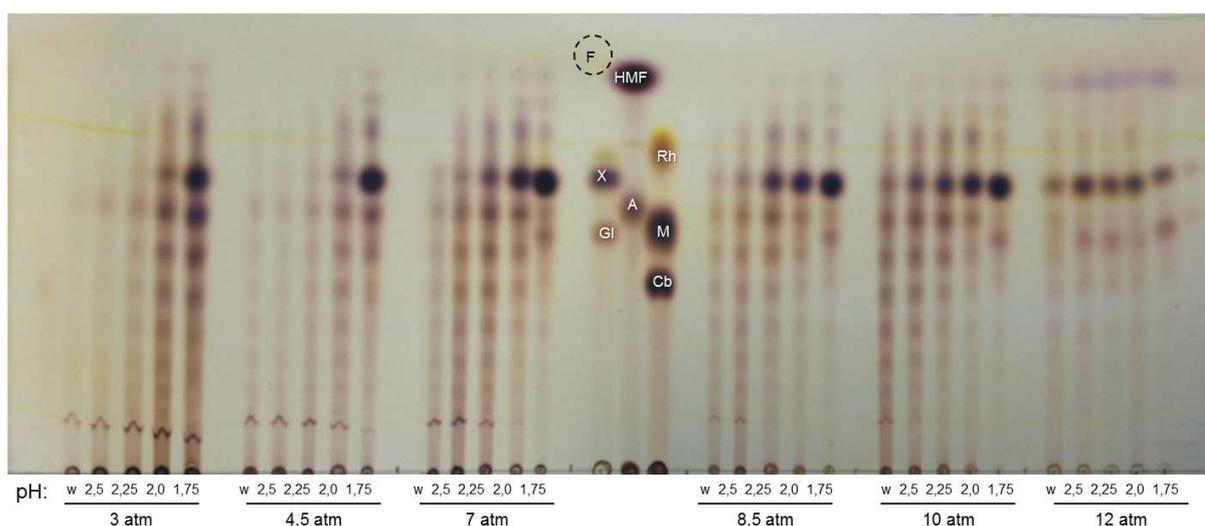


FIGURA 14 - CCD DAS AMOSTRAS DE BAGAÇO DE CANA HIDROLISADAS POR TERMOPRESSURIZAÇÃO FOSFÓRICA

NOTA: FM: acetoneitrila isopropanol e água (15:3:5) – revelador: orcinol sulfúrico – Amostra (w) controle com água. Padrões: (A) arabinose, (Cb) celobiose, (F) furfural, (Gl) glucose, (HMF) hidroximetilfurfural, (M) manose, (Rh) ramnose e (X) xilose.

Para uma análise mais apurada, é necessário avaliar além do perfil cromatográfico, também o perfil de açúcares totais extraídos (mg/g de biomassa). Dessa forma pode-se avaliar não somente a produção qualitativa, mas estimar a produção de OS em cada tratamento. No gráfico 7 vê-se o histograma dos açúcares totais extraídos onde as barras apresentam perfil qualitativo obtido através da densitometria da CCD.

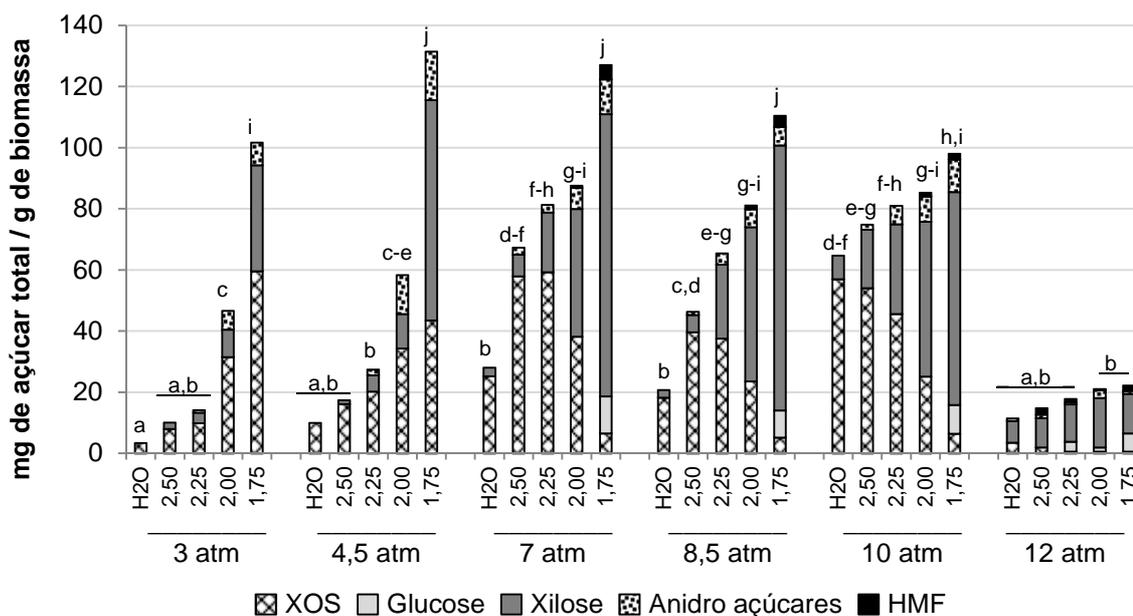


GRÁFICO 7 - CARACTERIZAÇÃO QUALI- E QUANTITATIVA DOS OLIGOSSACARÍDEOS PRODUZIDOS A PARTIR DE BAGAÇO DE CANA PRÉ-TRATADO POR TERMOPRESSURIZAÇÃO FOSFÓRICA

NOTA: Letras sobrescritas referem-se as diferenças entre os resultados pelo teste Tukey considerando o valor total de açúcares obtido pelo método fenol sulfúrico e perfil qualitativo obtido por densitometria da CCD.

Foram padronizados como parâmetros para determinar as melhores condições de produção de OS de biomassa L(h)C, a quantidade de OS ser >30 mg/g e a pureza (porcentagem de OS em relação aos açúcares totais), ser maior de 50%. Foi o caso dos experimentos marcados com asterisco em negrito apresentados na tabela 6:

TABELA 6 - RESPOSTAS DE PRODUÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS A PARTIR DE BAGAÇO DE CANA PRÉ-TRATADO POR TERMOPRESSURIZAÇÃO FOSFÓRICA

| Pressão (atm) | pH            | Açúcares Totais (mg/g)                | OS totais (mg/g)                    | % de Pureza do hidrolisado        |
|---------------|---------------|---------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|
| 3             | Água          | 3,36 (± 0,40) <sup>a</sup>            | 3,36 (± 0,40) <sup>a</sup>          | 100,00 (± 2,97) <sup>k</sup>      |
|               | 2,50          | 10,02 (± 0,95) <sup>a</sup>           | 7,96 (± 0,75) <sup>a-c</sup>        | 79,41 (± 2,38) <sup>h</sup>       |
|               | 2,25          | 14,16 (± 2,95) <sup>a</sup>           | 9,90 (± 2,06) <sup>a-d</sup>        | 69,91 (± 2,10) <sup>f,g</sup>     |
|               | <b>2,00 *</b> | <b>46,59 (± 2,23)<sup>c,d</sup></b>   | <b>31,51 (± 1,51)<sup>f-h</sup></b> | <b>67,63 (± 2,03)<sup>f</sup></b> |
|               | <b>1,75 *</b> | <b>101,70 (± 16,42)<sup>h-j</sup></b> | <b>59,54 (± 9,61)<sup>i</sup></b>   | <b>58,55 (± 1,76)<sup>e</sup></b> |
| 4,5           | Água          | 10,00 (± 0,80) <sup>a</sup>           | 10,00 (± 0,80) <sup>a-d</sup>       | 100,00 (± 3,04) <sup>k</sup>      |
|               | 2,50          | 17,40 (± 1,88) <sup>a</sup>           | 16,15 (± 1,75) <sup>b-e</sup>       | 92,83 (± 2,78) <sup>j</sup>       |
|               | 2,25          | 27,40 (± 0,94) <sup>a-c</sup>         | 20,20 (± 0,69) <sup>d-f</sup>       | 73,71 (± 2,21) <sup>g,h</sup>     |
|               | <b>2,00 *</b> | <b>58,27 (± 5,09)<sup>d,e</sup></b>   | <b>34,25 (± 2,99)<sup>g-i</sup></b> | <b>58,77 (± 1,76)<sup>e</sup></b> |
|               | 1,75          | 131,45 (± 9,12) <sup>k</sup>          | 43,47 (± 3,02) <sup>ij</sup>        | 33,07 (± 0,99) <sup>c</sup>       |

Continuação Tabela 6

| Pressão (atm) | pH     | Açúcares Totais (mg/g)          | XOS totais (mg/g)              | % de Pureza do hidrolisado    |
|---------------|--------|---------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| 7             | Água   | 28,00 (± 2,40) <sup>a-c</sup>   | 25,20 (± 2,16) <sup>e-g</sup>  | 90,00 (± 2,70) <sup>ij</sup>  |
|               | 2,50 * | 67,26 (± 1,62) <sup>d-f</sup>   | 57,92 (± 1,39) <sup>l</sup>    | 86,12 (± 2,58) <sup>i</sup>   |
|               | 2,25 * | 81,29 (± 11,87) <sup>e-h</sup>  | 59,21 (± 8,65) <sup>l</sup>    | 72,84 (± 2,19) <sup>f,g</sup> |
|               | 2,00   | 87,57 (± 6,31) <sup>f-i</sup>   | 38,19 (± 2,75) <sup>h,i</sup>  | 43,61 (± 1,31) <sup>d</sup>   |
|               | 1,75   | 127,03 (± 28,74) <sup>i,k</sup> | 6,48 (± 1,47) <sup>a,b</sup>   | 5,10 (± 0,15) <sup>a</sup>    |
| 8,5           | Água   | 20,71 (± 3,77) <sup>a</sup>     | 18,23 (± 3,31) <sup>c-e</sup>  | 88,01 (± 2,64) <sup>ij</sup>  |
|               | 2,50 * | 46,28 (± 0,77) <sup>b-d</sup>   | 39,57 (± 0,66) <sup>h,i</sup>  | 85,51 (± 2,57) <sup>i</sup>   |
|               | 2,25 * | 65,43 (± 4,14) <sup>d-f</sup>   | 37,54 (± 2,38) <sup>h,i</sup>  | 57,37 (± 1,72) <sup>e</sup>   |
|               | 2,00   | 81,10 (± 2,94) <sup>e-h</sup>   | 23,56 (± 0,85) <sup>e-g</sup>  | 29,05 (± 0,87) <sup>c</sup>   |
|               | 1,75   | 110,47 (± 6,78) <sup>i-k</sup>  | 5,18 (± 0,32) <sup>a,b</sup>   | 4,69 (± 0,14) <sup>a</sup>    |
| 10            | Água * | 64,72 (± 12,29) <sup>d-f</sup>  | 56,93 (± 10,81) <sup>k,l</sup> | 87,96 (± 2,64) <sup>ij</sup>  |
|               | 2,50 * | 74,78 (± 6,27) <sup>e-g</sup>   | 54,09 (± 4,53) <sup>i-l</sup>  | 72,33 (± 2,17) <sup>f,g</sup> |
|               | 2,25 * | 80,94 (± 0,89) <sup>e-h</sup>   | 45,61 (± 0,50) <sup>i-k</sup>  | 56,35 (± 1,69) <sup>e</sup>   |
|               | 2,00   | 85,31 (± 8,10) <sup>f-i</sup>   | 25,14 (± 2,39) <sup>e-g</sup>  | 29,47 (± 0,88) <sup>c</sup>   |
|               | 1,75   | 97,95 (± 10,47) <sup>g-i</sup>  | 6,41 (± 0,68) <sup>a,b</sup>   | 6,54 (± 0,20) <sup>a</sup>    |
| 12            | Água   | 11,44 (± 0,37) <sup>a</sup>     | 3,52 (± 0,11) <sup>a</sup>     | 30,75 (± 0,92) <sup>c</sup>   |
|               | 2,50   | 14,72 (± 0,57) <sup>a</sup>     | 1,92 (± 0,07) <sup>a</sup>     | 13,02 (± 0,39) <sup>b</sup>   |
|               | 2,25   | 17,75 (± 0,07) <sup>a</sup>     | 0,58 (± 0,01) <sup>a</sup>     | 3,25 (± 0,10) <sup>a</sup>    |
|               | 2,00   | 20,99 (± 0,32) <sup>a,b</sup>   | 0,58 (± 0,01) <sup>a</sup>     | 2,77 (± 0,08) <sup>a</sup>    |
|               | 1,75   | 22,20 (± 2,37) <sup>a-c</sup>   | 0,53 (± 0,06) <sup>a</sup>     | 2,40 (± 0,07) <sup>a</sup>    |

NOTA: (\*) Condições nas quais os resultados de porcentagem de XOS é superior a 50% e com quantidade de OS maior de 30 mg/g. As letras sobrescritas indicam as diferenças por teste Tukey ( $\alpha=0,05$ ) entre as variáveis.

Plotando os resultados de produção de OS na forma de gráfico de contornos (gráfico 8) fica mais claro que para a produção com alto rendimento mantendo também alta pureza, a condição ideal fica próxima de 7–8 atm (178 a 177 °C) com pH entre 2,3 e 2,5, para o resíduo L(h)C bagaço de cana.

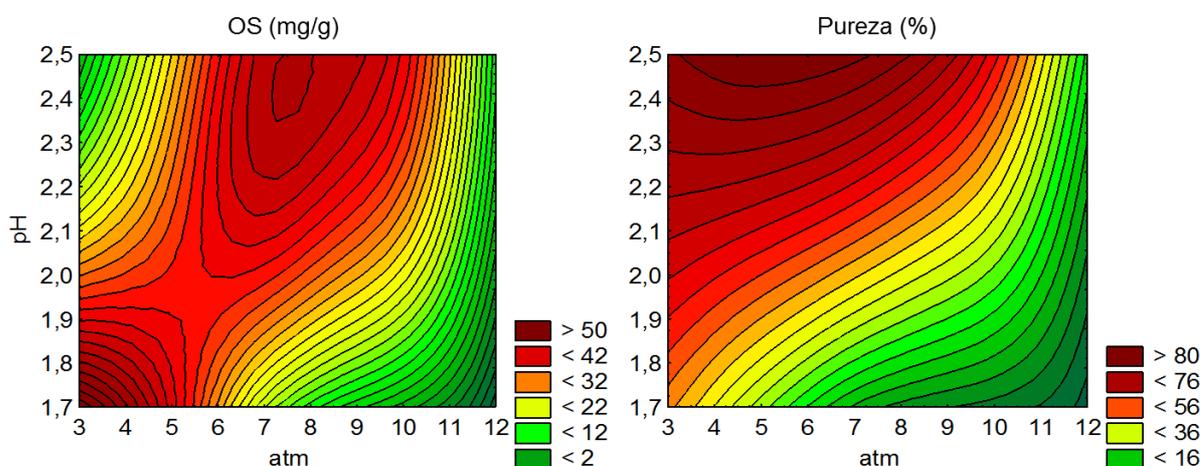


GRÁFICO 8 - CONTORNO DAS CONDIÇÕES DE PRODUÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS E PUREZA PARA BAGAÇO DE CANA PRÉ-TRATADO POR TERMOPRESSURIZAÇÃO FOSFÓRICA  
 NOTA: Gráfico de contornos gerado através das distâncias médias ponderadas.

Fazendo a mesma análise para a serragem de *Pinus taeda*, a CCD, figura 15, mostra a liberação qualitativa de monossacarídeos de forma mais intensa que o visto para o bagaço. Também se vê que existe um teor menor de anidro açúcares, porém maior de HMF, devido à degradação das hexoses. A primeira vista, o *Pinus* precisa de condições mais brandas de hidrólise para a produção de OS, os quais aparentam ser compostos exclusivamente por XOS, não ficando evidente a fragmentação das heteromananas em OS, e sim apenas a formação de produtos de degradação. Esse fato é explicado devido as  $\beta$ -xilanas (pentoses) 4-ligadas serem mais lábeis do que as  $\beta$ -mananas (hexoses) 4-ligadas, fazendo com que o primeiro açúcar tenha maior solubilidade em meio ácido do que o segundo (HENDRIKS, 2009; BALCU, 2011). É possível observar a presença de glucose, galactose e principalmente de manose livre em condições mais severas de pH e pressão.

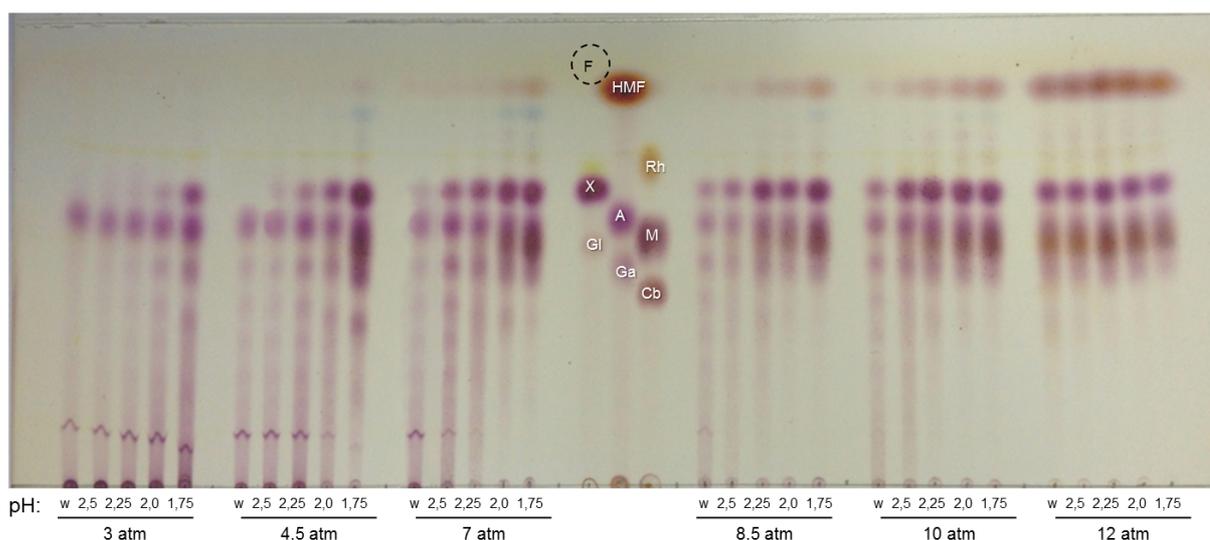


FIGURA 15 - CCD DAS AMOSTRAS DE SERRAGEM DE *PINUS* HIDROLISADAS POR TERMOPRESSURIZAÇÃO FOSFÓRICA

NOTA: FM: acetonitrila isopropanol e água (15:3:5) - revelador: orcinol sulfúrico - Amostra (w) controle com água. Padrões: (A) arabinose, (Cb) celobiose, (F) furfural, (Ga) galactose, (Gl) glucose, (HMF) hidroximetilfurfural, (M) manose, (R) ramnose e (X) xilose.

Com o histograma composto no gráfico 9, a análise do perfil quali e quantitativo fica ainda mais evidente a diferença de comportamento e resposta entre o bagaço e o *Pinus*. Apesar das condições mais brandas serem necessárias para o segundo, houve mais experimentos com produção de XOS acima de 30 mg/g e pureza >50%, apresentadas na tabela 7.

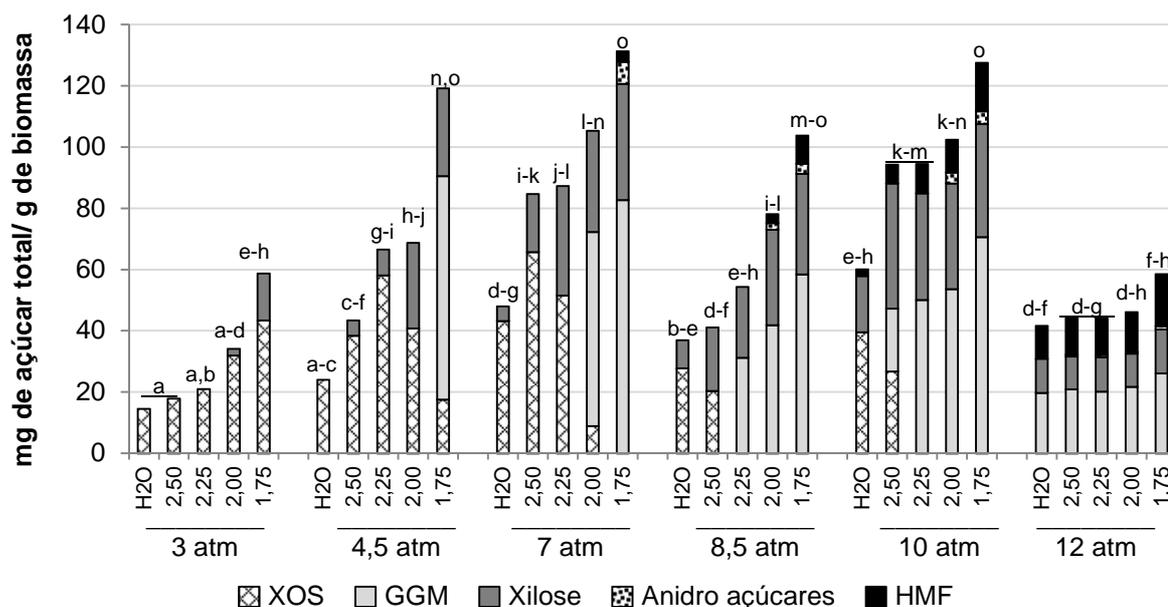


GRÁFICO 9 - CARACTERIZAÇÃO DOS OLIGOSSACARÍDEOS PRODUZIDOS A PARTIR DE SERRAGEM DE *PINUS* PRÉ-TRATADA POR TERMOPRESSURIZAÇÃO FOSFÓRICA

NOTA: Letras sobrescritas referem-se as diferenças entre os resultados pelo teste Tukey considerando o valor total de açúcares obtido pelo método fenol sulfúrico e perfil qualitativo obtido por densitometria da CCD. (\*) GGM refere-se ao somatório dos açúcares glicose, galactose e manose, pois não é possível diferenciá-los através da densitometria.

TABELA 7 - RESPOSTAS DE PRODUÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS A PARTIR DE SERRAGEM DE *PINUS* PRÉ-TRATADA POR TERMOPRESSURIZAÇÃO FOSFÓRICA

| Pressão (atm) | pH            | Açúcares Totais (mg/g)              | XOS totais (mg/g)                 | % de Pureza do hidrolisado          |
|---------------|---------------|-------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|
| 3             | Água          | 14,52 (± 0,29) <sup>a</sup>         | 14,52 (± 0,29) <sup>a,b</sup>     | 100,00 (± 3,10) <sup>g</sup>        |
|               | 2,50          | 17,84 (± 0,37) <sup>a</sup>         | 17,84 (± 0,37) <sup>b,c</sup>     | 100,00 (± 3,05) <sup>g</sup>        |
|               | 2,25          | 20,94 (± 0,41) <sup>a</sup>         | 20,94 (± 0,41) <sup>c-e</sup>     | 100,00 (± 2,96) <sup>g</sup>        |
|               | <b>2,00 *</b> | <b>34,11 (± 2,59)<sup>b,c</sup></b> | <b>31,93 (± 2,42)<sup>g</sup></b> | <b>93,59 (± 2,81)<sup>f,g</sup></b> |
|               | <b>1,75 *</b> | <b>58,67 (± 6,29)<sup>f-h</sup></b> | <b>43,43 (± 4,66)<sup>h</sup></b> | <b>74,02 (± 2,22)<sup>e</sup></b>   |
| 4,5           | Água          | 24,00 (± 0,40) <sup>a,b</sup>       | 24,00 (± 0,40) <sup>d-f</sup>     | 100,00 (± 3,00) <sup>g</sup>        |
|               | <b>2,50 *</b> | <b>43,41 (± 0,24)<sup>c-e</sup></b> | <b>38,43 (± 0,21)<sup>h</sup></b> | <b>88,54 (± 2,66)<sup>f</sup></b>   |
|               | <b>2,25 *</b> | <b>66,52 (± 2,64)<sup>h,i</sup></b> | <b>58,06 (± 2,30)<sup>j</sup></b> | <b>87,29 (± 2,62)<sup>f</sup></b>   |
|               | <b>2,00 *</b> | <b>68,74 (± 2,17)<sup>h,i</sup></b> | <b>40,73 (± 1,29)<sup>h</sup></b> | <b>59,26 (± 1,78)<sup>d</sup></b>   |
|               | 1,75          | 119,14 (± 10,24) <sup>m</sup>       | 17,57 (± 1,51) <sup>b,c</sup>     | 14,74 (± 0,44) <sup>a</sup>         |
| 7             | <b>Água *</b> | <b>48,00 (± 0,40)<sup>d-f</sup></b> | <b>43,20 (± 0,36)<sup>h</sup></b> | <b>90,00 (± 2,70)<sup>f</sup></b>   |
|               | <b>2,50 *</b> | <b>84,66 (± 4,80)<sup>j,k</sup></b> | <b>65,68 (± 3,72)<sup>k</sup></b> | <b>77,58 (± 2,33)<sup>e</sup></b>   |
|               | <b>2,25 *</b> | <b>87,27 (± 5,31)<sup>j,k</sup></b> | <b>51,56 (± 3,14)<sup>i</sup></b> | <b>59,07 (± 1,77)<sup>d</sup></b>   |
|               | 2,00          | 105,32 (± 5,30) <sup>l</sup>        | 8,87 (± 0,45) <sup>a</sup>        | 8,42 (± 0,25) <sup>a</sup>          |
|               | 1,75          | 131,28 (± 2,17) <sup>n</sup>        | ---                               | ---                                 |
| 8,5           | Água          | 36,91 (± 0,55) <sup>c,d</sup>       | 27,78 (± 0,41) <sup>f,g</sup>     | 75,25 (± 2,26) <sup>e</sup>         |
|               | 2,50          | 41,04 (± 2,40) <sup>c,d</sup>       | 20,39 (± 1,19) <sup>b-d</sup>     | 49,68 (± 1,49) <sup>c</sup>         |
|               | 2,25          | 54,31 (± 4,81) <sup>e-g</sup>       | ---                               | ---                                 |
|               | 2,00          | 78,09 (± 1,85) <sup>ij</sup>        | ---                               | ---                                 |
|               | 1,75          | 103,77 (± 5,66) <sup>l</sup>        | ---                               | ---                                 |

Continuação Tabela 7

| Pressão (atm) | pH     | Açúcares Totais (mg/g)         | XOS totais (mg/g)             | % de Pureza do Hidrolisado  |
|---------------|--------|--------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|
| 10            | Água*  | 60,11 (± 2,34) <sup>B,h</sup>  | 39,53 (± 1,54) <sup>h</sup>   | 65,77 (± 1,97) <sup>d</sup> |
|               | 2,50 * | 94,25 (± 5,61) <sup>k,l</sup>  | 26,75 (± 1,59) <sup>e-g</sup> | 28,39 (± 0,85) <sup>b</sup> |
|               | 2,25   | 94,49 (± 5,18) <sup>k,l</sup>  | ---                           | ---                         |
|               | 2,00   | 102,35 (± 0,82) <sup>l</sup>   | ---                           | ---                         |
|               | 1,75   | 127,51 (± 1,21) <sup>m,n</sup> | ---                           | ---                         |
| 12            | Água   | 41,62 (± 1,82) <sup>c,d</sup>  | ---                           | ---                         |
|               | 2,50   | 44,08 (± 2,51) <sup>c-e</sup>  | ---                           | ---                         |
|               | 2,25   | 44,04 (± 4,15) <sup>c-e</sup>  | ---                           | ---                         |
|               | 2,00   | 46,12 (± 2,58) <sup>d,e</sup>  | ---                           | ---                         |
|               | 1,75   | 58,50 (± 1,11) <sup>f-h</sup>  | ---                           | ---                         |

NOTA: (\*) Condições nas quais os resultados de porcentagem de XOS é superior a 50% e com quantidade de OS maior de 30 mg/g. As letras sobrescritas indicam as diferenças por teste Tukey ( $\alpha=0,05$ ) entre as variáveis.

Da mesma forma com que foi realizado para o bagaço de cana, os resultados de produção de OS e suas purezas (%) foram plotados para *Pinus* em forma de gráfico de contornos (gráfico 10). O resultado deixa claro que as melhores condições de produção com alta pureza estão entre 5–7 atm (158 a 171 °C) com pH de 2,3 a 2,5, sendo ligeiramente mais brandas, portanto, do que as condições para o bagaço de cana.

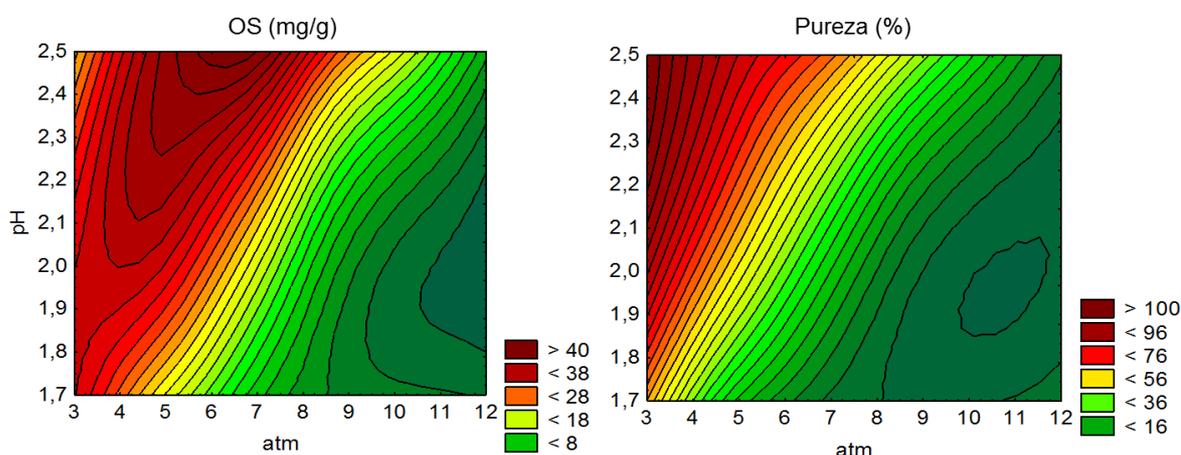


GRÁFICO 10 - CONTORNO DAS CONDIÇÕES DE PRODUÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS E PUREZA PARA SERRAGEM DE *PINUS* PRÉ-TRATADA POR TERMOPRESSURIZAÇÃO FOSFÓRICA

NOTA: Gráfico de contornos gerado através das distâncias médias ponderadas.

A produção de OS concomitante com a melhoria da sacarificação dos resíduos L(h)C durante o pré-tratamento fosfórico não possui resposta única. Para o bagaço, todas as 30 condições avaliadas foram capazes de aumentar o poder

hidrolítico da biomassa, inclusive nos controles hidrolisados apenas com água, entretanto apenas dez foram capazes de produzir OS de maneira eficiente. Já para o *Pinus* também houve melhora do poder hidrolítico, e assim como ocorreu para o bagaço, houve dez experimentos capazes de produzir OS.

Esses resultados quali- e quantitativos deixam claro que a diminuição do pH aumenta a quantidade produzida de OS, porém com maior liberação de monômeros ou OS de baixo GP, bem como maior quantidade de produtos de degradação. Por outro lado a hidrólise apenas com água possui rendimentos mais baixos. Sendo assim, condições de pH mais brandas aliadas com condições medianas temperatura e pressão são as escolhas mais interessantes para um experimento idealizado que concilie a melhoria da produção de OS associada à melhora da sacarificação dos resíduo L(h)C, ou seja, a celulose bruta residual, sendo assim aproveitando ao máximo os resíduos L(h)C, gerando um subproduto de alto valor agregado, além do já consolidado uso para produção de bioetanol.

#### 7.4 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS

A fim de melhorar a produtividade de oligossacarídeos, um segundo ensaio de termopressurização com ácido fosfórico foi realizado utilizando uma proporção de biomassa L(h)C e solução ácida de 1:8 (m/v), pressões intermediárias de 7,0 (171 °C), 8,5 (178 °C), 10,0 atm (185 °C) e filtração com sistema à vácuo e placa porosa de vidro de 4,5-5 µm.

##### 7.4.1 Ensaio de Sacarificação

Após a filtração dos resíduos sólidos e a reconstituição do volume final para a proporção biomassa L(h)C: solução ácida de 1:10 (m/v), os resíduos foram lavados por duas vezes com 10 mL de água purificada por osmose reversa em cada lavagem. Alguns destes filtrados foram analisados quanto à presença de açúcares

reduzidos. Os resultados podem ser vistos no gráfico 11 onde fica clara a eficácia da remoção de eventuais açúcares livres restando cerca de 0,2 mg/mL no filtrado. Dessa forma o resíduo sólido foi considerado sem interferentes para o posterior processo de sacarificação após a liofilização.

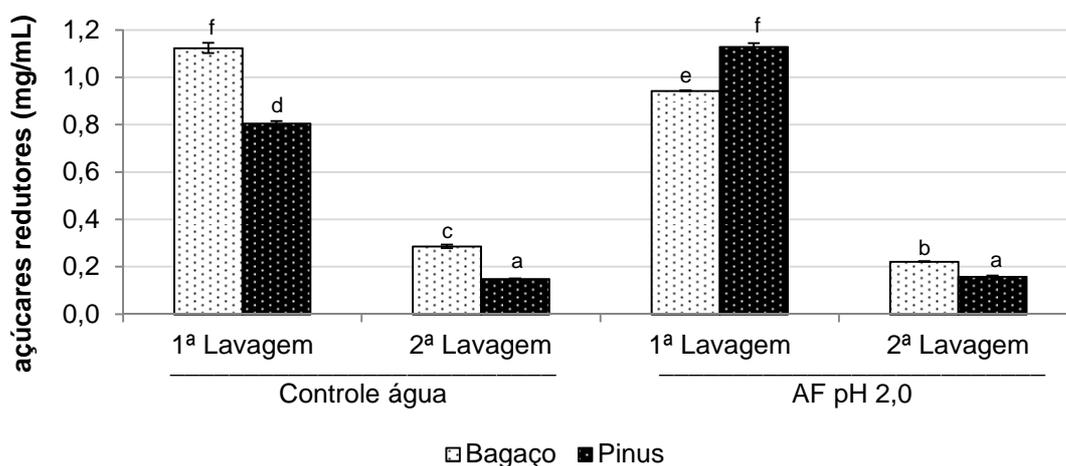


GRÁFICO 11 - REMOÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES DA BIOMASSA CELULÓSICA RESIDUAL PRÉ-TRATADA POR TERMOPRESSURIZAÇÃO FOSFÓRICA

NOTA: (AF) ácido fosfórico. As letras sobrescritas indicam as diferenças por teste Tukey ( $\alpha=0,05$ ) entre as amostras.

O ensaio de sacarificação para os resíduos obtidos (celulose residual) através do processo otimizado de produção de OS foi realizado durante 72 h, utilizando 16  $\mu\text{L/mL}$  de solução enzimática de EG+CBH: BGL (1:1; v/v), o dobro do utilizado anteriormente, devido a um problema de aquecimento durante a estocagem das enzimas comerciais (pane do refrigerador acompanhada de um sobreaquecimento), o que levou a uma redução da atividade celulolítica. Esse motivo inviabiliza qualquer comparação com as hidrólises anteriormente apresentadas. A filtração adequada com vácuo e a subsequente lavagem dos resíduos sólidos dos L(h)C, a princípio, não deveriam alterar o perfil de hidrólise da biomassa. Entretanto, as HCs solubilizadas, principalmente na forma de OS, são inibidoras mais fortes da ação das enzimas celulolíticas em comparação com as xilanas e xilose livre (ZHANG, 2012), o que confirma a necessidade de uma etapa de remoção eficaz desta fração antes da sacarificação enzimática celulolítica. Já com a alteração da proporção de biomassa e solução ácida, de 1:6 para 1:8 (m/v), esperava-se que a melhora do processo hidrolítico enzimático dos resíduos pré-hidrolisados com ácido fosfórico diluído.

Comparando o potencial hidrolítico do nativo contra os pré-tratados, novamente foi observado aumento da resposta, de 4,1 e 2,3 vezes com relação à melhor condição, pH 1,5 e 8,5 atm (178 °C) para bagaço (de 15,84 para 65,89 %;  $p < 0,0001$ ) e pH 1,5 e 10 atm (185 °C) para *Pinus* (de 7,65 para 17,69 %;  $p < 0,0001$ ), respectivamente. Observando todos os valores obtidos, apresentados nos gráficos 12 e 13, para bagaço e *Pinus*, respectivamente, novamente observa-se a maior recalcitrância da biomassa serragem de *Pinus*, que é mais lignificada e, portanto de mais difícil hidrólise (ZHU, 2010; CANILHA, 2012).

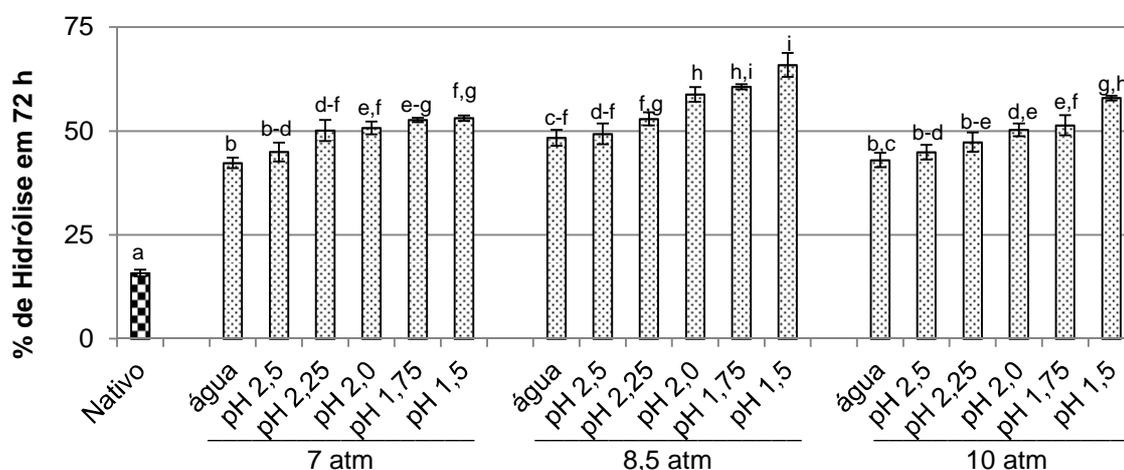


GRÁFICO 12 - POTENCIAL DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DOS RESÍDUOS DE BAGAÇO DE CANA PRÉ-TRATADOS POR TERMOPRESSURIZAÇÃO FOSFÓRICA

NOTA: Porcentagem de hidrólise mensurado por determinação de açúcares redutores. As letras sobrescritas indicam as diferenças por teste Tukey ( $\alpha=0,05$ ) entre as amostras.

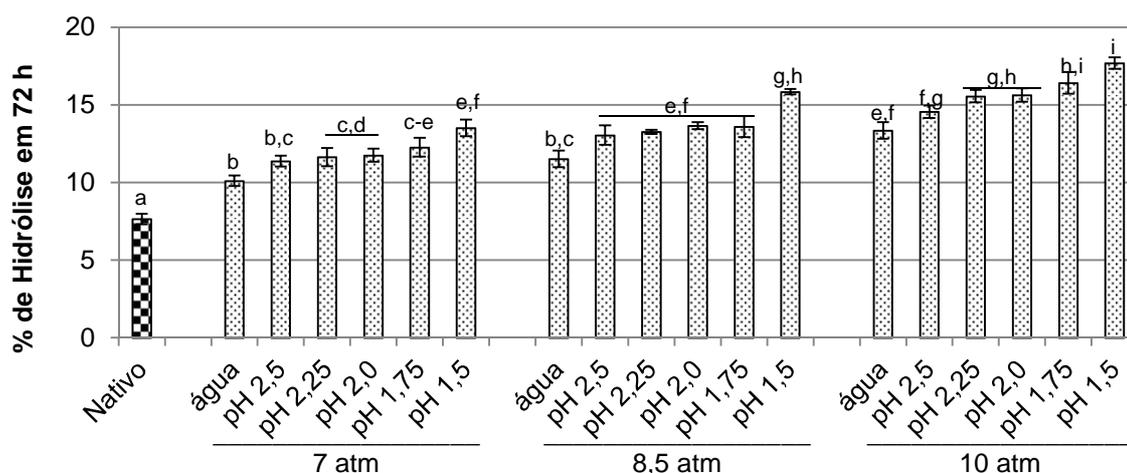


GRÁFICO 13 - POTENCIAL DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DOS RESÍDUOS DE SERRAGEM DE *PINUS* PRÉ-TRATADOS POR TERMOPRESSURIZAÇÃO FOSFÓRICA

NOTA: Porcentagem de hidrólise mensurado por determinação de açúcares redutores. As letras sobrescritas indicam as diferenças por teste Tukey ( $\alpha=0,05$ ) entre as amostras.

Os dados foram analisados na forma de planejamento fatorial  $3^2$ , com as variáveis pH (2,5(-), 2,0(0) e 1,5(+)) e a pressão (7(-), 8,5(0) e 10(+)) atm), tabela 9, para ambas as biomassas, portanto, o nível (-) com as condições mais brandas e o nível (+) com as mais severas.

A variação do pH, de 2,5 (-) para 1,5 (+), ocorreu de forma linear, tanto para o resíduo de bagaço quanto para o de *Pinus*, e os efeitos foram na ordem de 12,58 e 2,49% respectivamente ( $p < 0,0001$ ). Já a variação da pressão não seguiu o mesmo comportamento entre os L(h)Cs. Para o bagaço de cana, essa variável tem comportamento quadrático, enquanto para o *Pinus* é linear. Essas diferenças de comportamento ficam claramente evidenciadas quando observa-se o gráfico 14 das médias. O aumento da pressão de 7 (-) para 10 (+) atm tem efeito de melhorar a sacarificação em 7,68 e 3,74% para o bagaço e *Pinus*, respectivamente.

Independente da condição testada o tratamento termo-fosfórico se mostrou eficaz para melhoria do poder hidrolítico de resíduos L(h)Cs no que tange à celulólise subsequente.

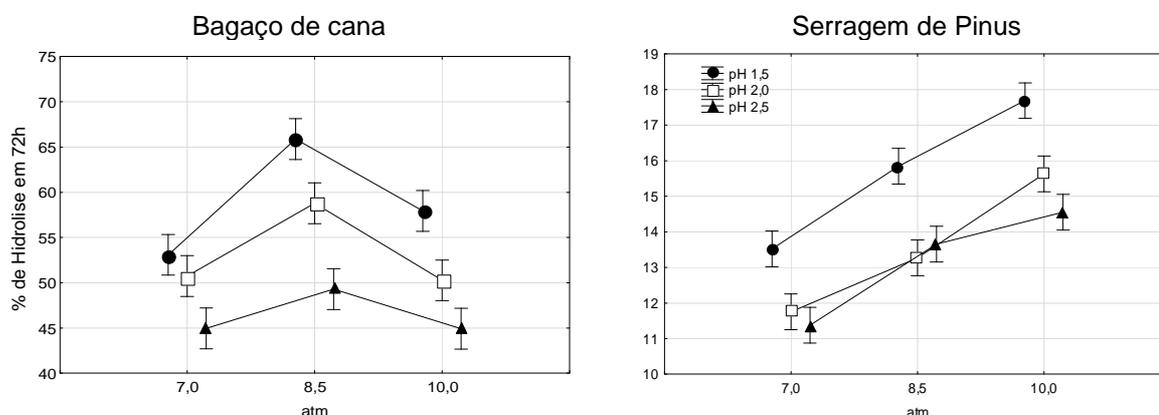


GRÁFICO 14 - MÉDIAS DE DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA PARA BAGAÇO DE CANA E SERRAGEM DE PINUS PRÉ-TRATADOS POR TERMOPRESSURIZAÇÃO FOSFÓRICA ANÁLISADOS POR PLANEJAMENTO FATORIAL  $3^2$

#### 7.4.2 Produção de Oligossacarídeos

Analisando o perfil cromatográfico dos hidrolisados ácidos, figura 16, obtidos através de hidrólise termo-fosfórica com proporção biomassa:AF de 1:8 (m/v) e filtrados à vácuo, a primeira diferença que chama a atenção foi um aumento na

liberação de produtos de degradação (anidro açúcares e HMF), e novamente o *Pinus* apresenta quantidade superior a visualizada para o bagaço de cana. Como dito anteriormente, isso se deve ao pH final no início da hidrólise estar cerca de 0,5 abaixo daquele observado com bagaço. Nos demais aspectos a CCD isoladamente não é suficiente para visualizar mais diferenças com relação à metodologia anteriormente avaliada.

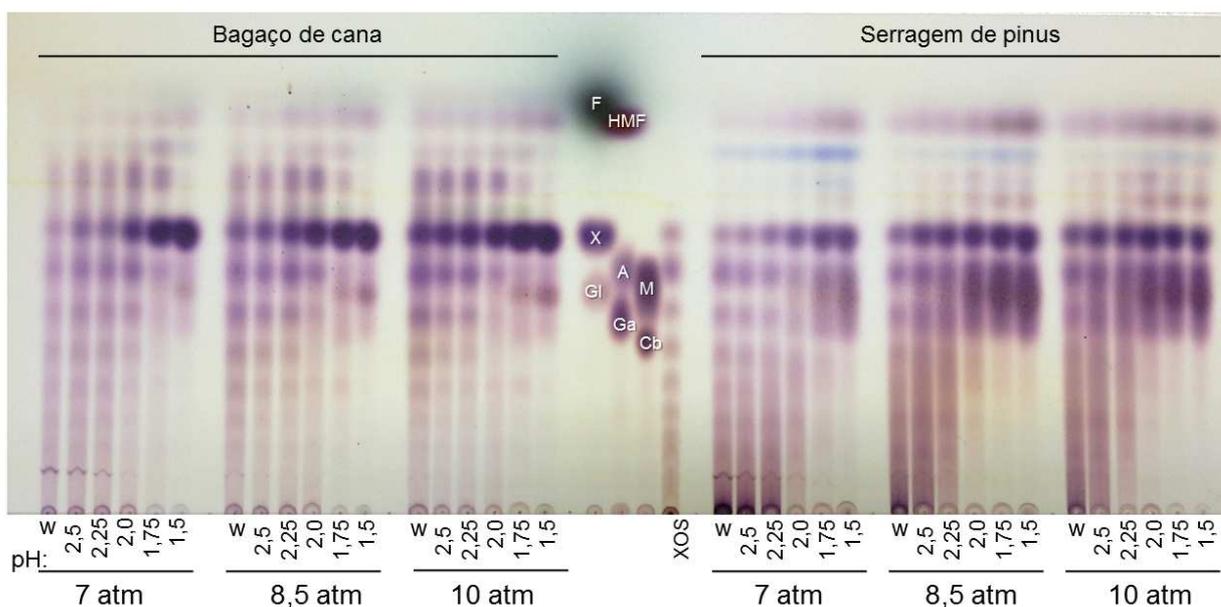


FIGURA 16 - CCD DOS HIDROLISADOS POR TERMOPRESSURIZAÇÃO FOSFÓRICA DE BAGAÇO DE CANA E SERRAGEM DE *PINUS*

NOTA: FM: acetonitrila isopropanol e água (15:3:5) - revelador: orcinol sulfúrico - Amostra (w) controle com água. Padrões: (A) arabinose, (Cb) celobiose, (F) furfural, (Ga) galactose, (Gl) glucose, (HMF) hidroximetilfurfural, (M) manose, (X) xilose e (XOS) xilo-oligossacarídeos.

Quando se analisa os açúcares totais extraídos plotados com o perfil qualitativo obtido através da densitometria da CCD, apresentados no gráfico 15, a diferença no processo metodológico para obtenção dos OS explorando volume de biomassa: ácido (de 1:6 para 1:8, m/v) e processo de filtração (lã de vidro para funil de placa porosa a vácuo), as diferenças nas respostas podem ser visualizadas. A primeira grande mudança foi com relação ao esperado aumento da quantidade de OS liberados mg/g de biomassa processada, juntamente com maior quantidade de açúcares livres e produtos de degradação.

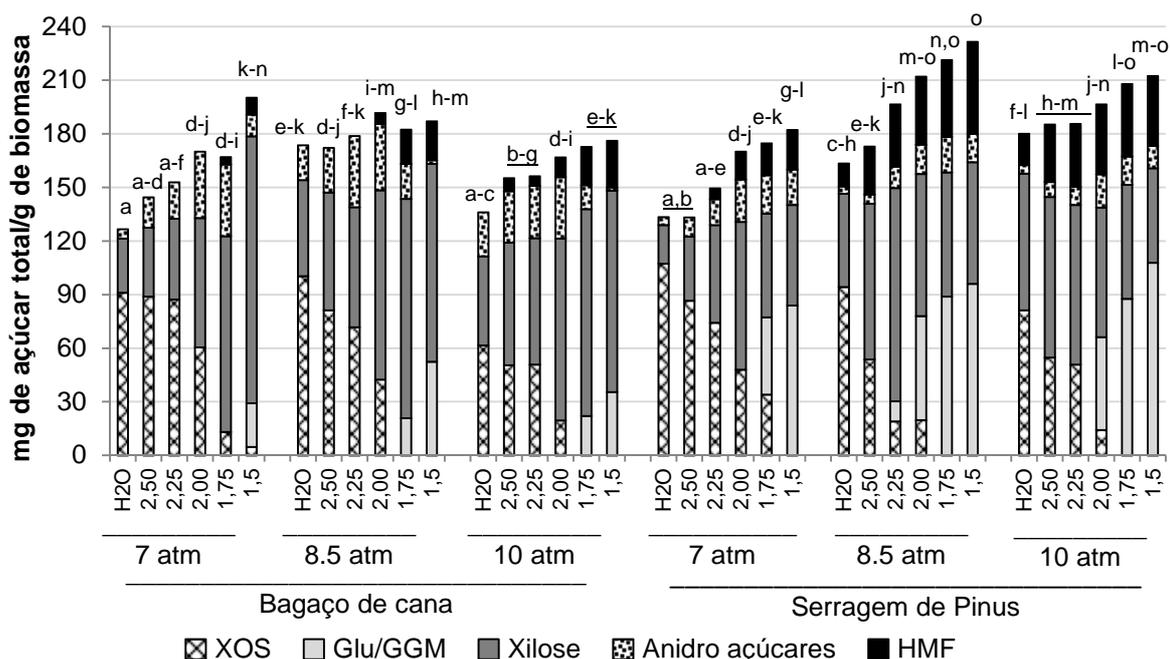


GRÁFICO 15 - CARACTERIZAÇÃO DOS OLIGOSSACARÍDEOS PRODUZIDOS A PARTIR DE HIDRÓLISE TERMOFOSFÓRICA DE BAGAÇO DE CANA E SERRAGEM DE *PINUS*

NOTA: Letras sobrescritas referem-se às diferenças entre os resultados pelo teste Tukey considerando o valor total de açúcares obtido pelo método fenol sulfúrico e perfil qualitativo obtido por densitometria da CCD. (\*) Glu/GMM: Para o bagaço de cana refere-se ao conteúdo total de glicose. Para a serragem de *Pinus* refere-se ao somatório dos açúcares glicose, galactose e manose, os quais não são possíveis de diferenciar através da densitometria.

Além da confirmação das diferenças observadas através da cromatoplaca, nas tabelas 8 e 9, se vê que o aumento da extração de açúcares totais foi de cerca de 1,5 vezes, ou seja, de 127,03 para 200,26 mg/g ( $p=0,0143$ ) para o bagaço e de 131,28 para 231,53 mg/g ( $p=0,0004$ ) para o *Pinus*, nos experimentos com maior resposta. Quanto à produção de OS também houve um aumento significativo em cerca de 2 vezes, ou seja, de 59,21 para 100,26 mg/g ( $p=0,0013$ ) no bagaço e de 65,68 para 107,26 mg/g ( $p=0,0002$ ) para o *Pinus*. Entretanto, a pureza dos hidrolisados em relação aos OS, foram significativamente mais baixas, de 90% para 71,87% ( $p=0,0008$ ) para o bagaço e menos intensamente pelo *Pinus* para 80,40% ( $p=0,0498$ ). Por esse motivo, foram consideradas como as melhores respostas as condições em que obtivemos pureza superior a 50%.

TABELA 8 - COMPARATIVO ENTRE PRÉ-PROCESSAMENTOS POR TEMOPRESSURIZAÇÃO FOSFÓRICA DE BAGAÇO DE CANA

| Pressão (atm) | pH   | Açúcares Totais (mg/g)        |                         |        | Oligossacarídeos Totais (mg/g) |                         |        | Pureza de hidrolisado para OS (%) |                         |        |
|---------------|------|-------------------------------|-------------------------|--------|--------------------------------|-------------------------|--------|-----------------------------------|-------------------------|--------|
|               |      | Hid. 1:6 (m/v)<br>Lã de vidro | Hid. 1:8 (m/v)<br>vácuo | p      | Hid. 1:6 (m/v)<br>Lã de vidro  | Hid. 1:8 (m/v)<br>vácuo | p      | Hid. 1:6 (m/v)<br>Lã de vidro     | Hid. 1:8 (m/v)<br>vácuo | p      |
| 7             | Água | 28,00 (± 2,40)                | 126,61 (± 3,43)         | 0,0000 | 25,20 (± 2,16)                 | <b>91,00 (± 2,47)</b>   | 0,0000 | 90,00 (± 2,70)                    | <b>71,87 (± 2,16)</b>   | 0,0008 |
|               | 2,50 | <b>67,26 (± 1,62)</b>         | <b>144,52 (± 2,59)</b>  | 0,0000 | <b>57,92 (± 1,39)</b>          | <b>88,86 (± 1,59)</b>   | 0,0000 | <b>86,12 (± 2,58)</b>             | <b>61,49 (± 1,84)</b>   | 0,0002 |
|               | 2,25 | <b>81,29 (± 11,87)</b>        | <b>152,94 (± 2,86)</b>  | 0,0005 | <b>59,21 (± 8,65)</b>          | <b>87,33 (± 1,63)</b>   | 0,0052 | <b>72,84 (± 2,19)</b>             | <b>57,10 (± 1,71)</b>   | 0,0006 |
|               | 2,00 | 87,57 (± 6,31)                | 169,94 (± 3,12)         | 0,0000 | 38,19 (± 2,75)                 | 60,44 (± 1,11)          | 0,0002 | 43,61 (± 1,31)                    | 35,56 (± 1,07)          | 0,0012 |
|               | 1,75 | 127,03 (± 28,74)              | 167,02 (± 2,84)         | 0,0745 | 6,48 (± 1,47)                  | 13,01 (± 0,22)          | 0,0016 | 5,10 (± 0,15)                     | 7,79 (± 0,23)           | 0,0001 |
|               | 1,50 | ---                           | 200,26 (± 10,44)        | ---    | ---                            | 4,75 (± 0,25)           | ---    | ---                               | 2,37 (± 0,07)           | ---    |
| 8,5           | Água | 20,71 (± 3,77)                | <b>173,53 (± 2,40)</b>  | 0,0000 | 18,23 (± 3,31)                 | <b>100,26 (± 1,38)</b>  | 0,0000 | 88,01 (± 2,64)                    | <b>57,78 (± 1,73)</b>   | 0,0001 |
|               | 2,50 | <b>46,28 (± 0,77)</b>         | 172,11 (± 2,70)         | 0,0000 | <b>39,57 (± 0,66)</b>          | 81,16 (± 1,27)          | 0,0000 | <b>85,51 (± 2,57)</b>             | 47,16 (± 1,41)          | 0,0000 |
|               | 2,25 | <b>65,43 (± 4,14)</b>         | 178,77 (± 6,08)         | 0,0000 | <b>37,54 (± 2,38)</b>          | 71,76 (± 2,44)          | 0,0001 | <b>57,37 (± 1,72)</b>             | 40,14 (± 1,20)          | 0,0001 |
|               | 2,00 | 81,10 (± 2,94)                | 191,68 (± 5,90)         | 0,0000 | 23,56 (± 0,85)                 | 42,49 (± 1,31)          | 0,0000 | 29,05 (± 0,87)                    | 22,17 (± 0,66)          | 0,0004 |
|               | 1,75 | 110,47 (± 6,78)               | 182,28 (± 4,88)         | 0,0001 | 5,18 (± 0,32)                  | ---                     | ---    | 4,69 (± 0,14)                     | ---                     | ---    |
|               | 1,50 | ---                           | 187,01 (± 3,98)         | ---    | ---                            | ---                     | ---    | ---                               | ---                     | ---    |
| 10            | Água | <b>64,72 (± 12,29)</b>        | 136,00 (± 9,39)         | 0,0013 | <b>56,93 (± 10,81)</b>         | 61,55 (± 4,25)          | 0,5284 | <b>87,96 (± 2,64)</b>             | 45,26 (± 1,36)          | 0,0000 |
|               | 2,50 | <b>74,78 (± 6,27)</b>         | 155,25 (± 3,19)         | 0,0000 | <b>54,09 (± 4,53)</b>          | 50,41 (± 1,04)          | 0,2427 | <b>72,33 (± 2,17)</b>             | 32,47 (± 0,97)          | 0,0000 |
|               | 2,25 | <b>80,94 (± 0,89)</b>         | 156,21 (± 13,80)        | 0,0007 | <b>45,61 (± 0,50)</b>          | 50,77 (± 4,49)          | 0,1186 | <b>56,35 (± 1,69)</b>             | 32,50 (± 0,98)          | 0,0000 |
|               | 2,00 | 85,31 (± 8,10)                | 166,87 (± 2,98)         | 0,0001 | 25,14 (± 2,39)                 | 19,45 (± 0,35)          | 0,0150 | 29,47 (± 0,88)                    | 11,66 (± 0,35)          | 0,0000 |
|               | 1,75 | 97,95 (± 10,47)               | 172,64 (± 4,05)         | 0,0003 | 6,41 (± 0,68)                  | ---                     | ---    | 6,54 (± 0,20)                     | ---                     | ---    |
|               | 1,50 | ---                           | 176,11 (± 2,51)         | ---    | ---                            | ---                     | ---    | ---                               | ---                     | ---    |

NOTA: As condições consideradas satisfatórias (pureza ≥ 50% e produção de OS ≥ 30 mg/g) estão em negrito.

TABELA 9 - COMPARATIVO ENTRE PRÉ-PROCESSAMENTOS POR TEMOPRESSURIZAÇÃO FOSFÓRICA DE SERRAGEM DE *PINUS*

| Pressão (atm) | pH   | Açúcares Totais (mg/g)        |                         |        | Oligossacarídeos Totais (mg/g) |                         |        | Pureza de hidrolisado para OS (%) |                         |        |
|---------------|------|-------------------------------|-------------------------|--------|--------------------------------|-------------------------|--------|-----------------------------------|-------------------------|--------|
|               |      | Hid. 1:6 (m/v)<br>Lã de vidro | Hid. 1:8 (m/v)<br>vácuo | p      | Hid. 1:6 (m/v)<br>Lã de vidro  | Hid. 1:8 (m/v)<br>vácuo | p      | Hid. 1:6 (m/v)<br>Lã de vidro     | Hid. 1:8 (m/v)<br>vácuo | p      |
| 7             | Água | <b>48,00 (± 0,40)</b>         | 133,42 (± 5,43)         | 0,0000 | <b>43,20 (± 0,36)</b>          | <b>107,26 (± 4,37)</b>  | 0,0000 | <b>90,00 (± 2,70)</b>             | <b>80,40 (± 2,41)</b>   | 0,0101 |
|               | 2,50 | <b>84,66 (± 4,80)</b>         | <b>133,23 (± 4,47)</b>  | 0,0002 | <b>65,68 (± 3,72)</b>          | <b>86,63 (± 2,90)</b>   | 0,0015 | <b>77,58 (± 2,33)</b>             | <b>65,02 (± 1,95)</b>   | 0,0020 |
|               | 2,25 | <b>87,27 (± 5,31)</b>         | <b>149,39 (± 3,56)</b>  | 0,0001 | <b>51,56 (± 3,14)</b>          | <b>74,30 (± 1,77)</b>   | 0,0004 | <b>59,07 (± 1,77)</b>             | <b>49,74 (± 1,49)</b>   | 0,0022 |
|               | 2,00 | 105,32 (± 5,30)               | 169,96 (± 5,09)         | 0,0001 | 8,87 (± 0,45)                  | 47,94 (± 1,44)          | 0,0000 | 8,42 (± 0,25)                     | 28,21 (± 0,85)          | 0,000  |
|               | 1,75 | 131,28 (± 2,17)               | 174,74 (± 4,74)         | 0,0001 | ---                            | 33,94 (± 0,92)          | ---    | ---                               | 19,42 (± 0,58)          | ---    |
|               | 1,50 | ---                           | 182,10 (± 5,16)         | ---    | ---                            | ---                     | ---    | ---                               | ---                     | ---    |
| 8,5           | Água | 36,91 (± 0,55)                | <b>163,44 (± 13,27)</b> | 0,0001 | 27,78 (± 0,41)                 | <b>94,29 (± 7,66)</b>   | 0,0001 | <b>75,25 (± 2,26)</b>             | 57,69 (± 1,73)          | 0,0004 |
|               | 2,50 | 41,04 (± 2,40)                | 172,91 (± 15,01)        | 0,0001 | 20,39 (± 1,19)                 | 53,73 (± 4,66)          | 0,0003 | 49,68 (± 1,49)                    | 31,07 (± 0,93)          | 0,0001 |
|               | 2,25 | 54,31 (± 4,81)                | 196,56 (± 5,36)         | 0,0000 | ---                            | 18,98 (± 0,52)          | ---    | ---                               | 9,66 (± 0,29)           | ---    |
|               | 2,00 | 78,09 (± 1,85)                | 212,06 (± 17,27)        | 0,0002 | ---                            | 19,67 (± 1,60)          | ---    | ---                               | 9,28 (± 0,28)           | ---    |
|               | 1,75 | 103,77 (± 5,66)               | 221,31 (± 17,70)        | 0,0004 | ---                            | ---                     | ---    | ---                               | ---                     | ---    |
|               | 1,50 | ---                           | 231,53 (± 16,24)        | ---    | ---                            | ---                     | ---    | ---                               | ---                     | ---    |
| 10            | Água | <b>60,11 (± 2,34)</b>         | 180,05 (± 4,43)         | 0,0000 | <b>39,53 (± 1,54)</b>          | 81,19 (± 2,00)          | 0,0000 | <b>65,77 (± 1,97)</b>             | 45,09 (± 1,35)          | 0,0001 |
|               | 2,50 | 94,25 (± 5,61)                | 185,13 (± 4,63)         | 0,0000 | 26,75 (± 1,59)                 | 54,74 (± 1,37)          | 0,0000 | 28,39 (± 0,85)                    | 29,57 (± 0,89)          | 0,1715 |
|               | 2,25 | 94,49 (± 5,18)                | 185,59 (± 3,70)         | 0,0000 | ---                            | 50,83 (± 1,01)          | ---    | ---                               | 27,39 (± 0,82)          | ---    |
|               | 2,00 | 102,35 (± 0,82)               | 196,41 (± 5,86)         | 0,0000 | ---                            | 14,09 (± 0,42)          | ---    | ---                               | 7,18 (± 0,22)           | ---    |
|               | 1,75 | 127,51 (± 1,21)               | 207,83 (± 3,81)         | 0,0000 | ---                            | ---                     | ---    | ---                               | ---                     | ---    |
|               | 1,50 | ---                           | 212,31 (± 21,99)        | ---    | ---                            | ---                     | ---    | ---                               | ---                     | ---    |

NOTA: As condições consideradas satisfatórias (pureza ≥ 50% e produção de OS ≥ 30 mg/g) estão em negrito.

Devido à queda no percentual de pureza dos hidrolisados, as condições consideradas satisfatórias (pureza e produção de OS superiores à 50% e 30 mg/g, respectivamente), para o bagaço de cana, passaram de 7 para 4, embora a produção de OS tenha aumentado significativamente. Considerando as condições que nos dois ensaios aparecem como satisfatórias, 7 atm (171 °C); pH 2,50 e 2,25, o aumento ficou na ordem de 53,4 e 47,5%, respectivamente. As melhores condições para produção de OS foram, para bagaço: 7 atm; água, pH 2,5 e 2,25 e em 8,5 atm (178 °C) com água.

Assim como para o bagaço, as melhores respostas para o *Pinus* também foram 7 atm (171 °C) com água e AF pH 2,5 e 2,25 e a 8,5 atm (178 °C) com água. As condições consideradas satisfatórias permaneceram quatro, entretanto não necessariamente as mesmas anteriormente obtidas. Em 7 atm, pHs 2,5 e 2,25 o aumento na produção de OS ficou na faixa de 31,9 e 44,1% respectivamente.

Analisando por planejamento fatorial  $3^2$ , tabela 10, parte dos hidrolisados fosfóricos, obtidos através de hidrólise por termopressurização fosfórica com proporção biomassa:AF 1:8 (m/v) e filtrados à vácuo, para as respostas produção de OS (mg/g) e porcentagem de pureza, tanto para bagaço como para *Pinus*, vemos primeiramente, analisando a ANOVA, que todas as variáveis foram significativas, com  $p < 0,0001$ , para modelo linear com  $R^2$  superior a 90% para o *Pinus* e a 97% para bagaço.

TABELA 10 - PLANEJAMENTO FATORIAL  $3^2$  PARA ANÁLISE DAS RESPOSTAS DA BIOMASSA PRÉ-TRATADA POR TERMOPRESSURIZAÇÃO FOSFÓRICA

| Variáveis     | Níveis |     |     |
|---------------|--------|-----|-----|
|               | (-)    | (0) | (+) |
| Pressão (atm) | 7      | 8,5 | 10  |
| pH            | 2,5    | 2,0 | 1,5 |

Quanto a análise dos efeitos das variáveis, também foram todos significativos ( $p < 0,0001$ ), inclusive quando analisando os efeitos de interação (secundários) entre as variáveis pH e pressão em atm, conforme pode ser visto nos gráficos de pareto 16 e 17 para bagaço e *Pinus*, respectivamente.

Para ambas as respostas a variável mais significativa foi a alteração do pH do nível (-) 2,5 (mais brando) para o nível (+) 1,5 (mais severo), com redução nas respostas. Ou seja, pHs mais brandos são mais interessantes tanto para o aumento

de produção de OS (mg/g), quanto para a qualidade dos mesmos (% de pureza). Lembrando que mesmo realizando as hidrólises com água houve respostas satisfatórias, entretanto a sacarificação da biomassa residual (celulólise enzimática) fica prejudicada. A intensificação do pH foi responsável por reduzir a produção em 71,89 e 65,02 mg/g e a pureza em 46,24 e 41,88% para bagaço e *Pinus*, respectivamente.

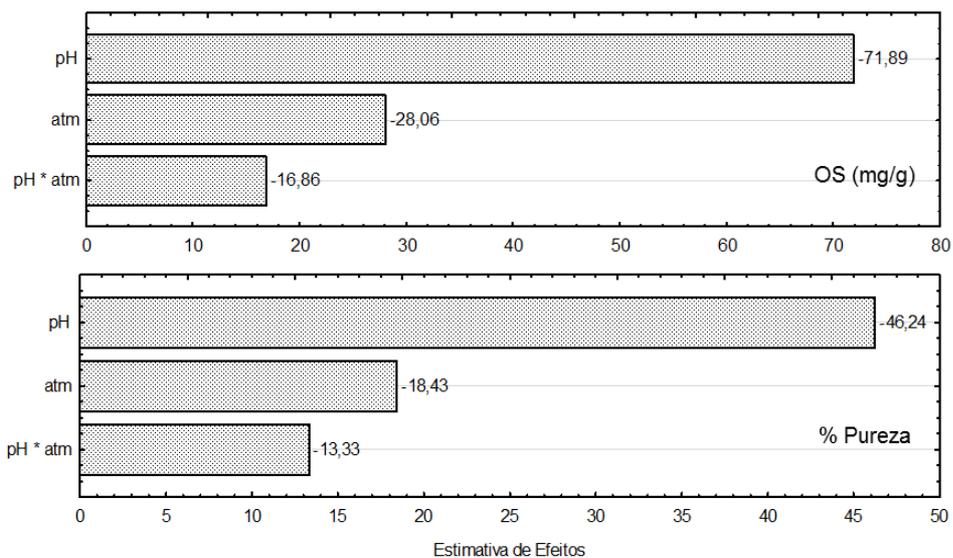


GRÁFICO 16 - PARETO PARA ANÁLISE POR PLANEJAMENTO FATORIAL 3<sup>2</sup> DO BAGAÇO DE CANA PRÉ-TRATADO POR TERMOPRESSURIZAÇÃO FOSFÓRICA

NOTA: Todos os efeitos considerando o modelo linear, foram significativos ( $p < 0,0001$ ).

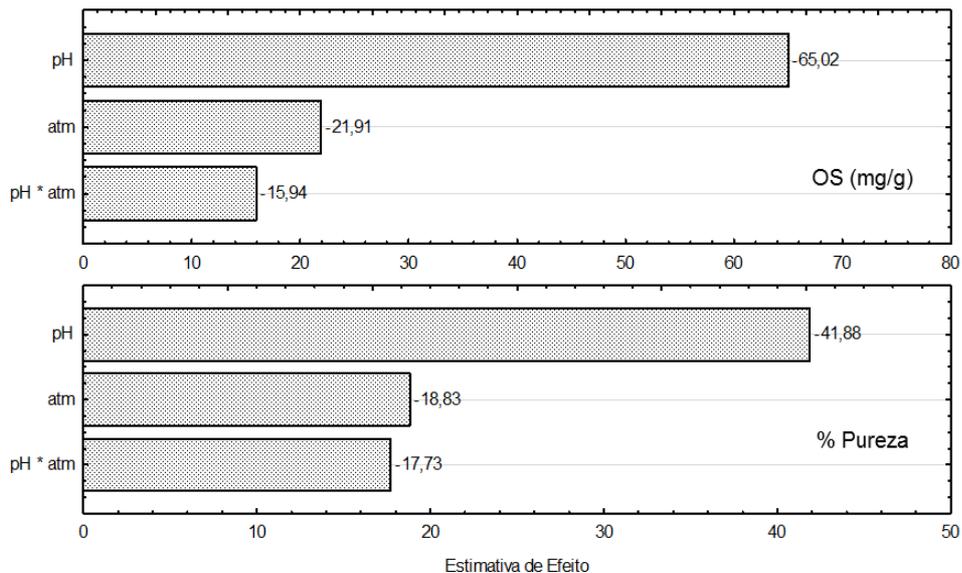


GRÁFICO 17 - PARETO PARA ANÁLISE POR PLANEJAMENTO FATORIAL 3<sup>2</sup> DA SERRAGEM DE *PINUS* PRÉ TRATADA POR TERMOPRESSURIZAÇÃO FOSFÓRICA

NOTA: Todos os efeitos considerando o modelo linear, foram significativos ( $p < 0,0001$ ).

Analisando a variável pressão (atm) também vê-se um efeito negativo sobre as respostas quando passamos do nível (-) 7atm (171 °C) para o nível (+) 10 atm (185 °C). Isso já era esperado pelo aumento da formação de produtos de degradação. Este resultado deixa claro que as condições mais brandas de temperatura e pressão são mais interessantes tanto para produção de OS (mg/g), quanto para sua qualidade (% de pureza). O aumento da pressão foi responsável pela redução da resposta de produção em 28,06 e 21,91 mg/g e a pureza caiu na proporção de 18,43 e 18,83% para bagaço e *Pinus*, respectivamente.

Os efeitos de interação, assim como as variáveis individualmente, são negativos quando passa-se simultaneamente das condições de pressão e pH mais brandas (-) para as mais severas (+). Para produção de OS (mg/g) a redução da resposta ficou na ordem de 16,86 e 15,94 e para pureza de 13,33 e 17,73 para bagaço e *Pinus*, respectivamente. Essa alteração nos resultados fica mais clara quando observa-se os gráfico 18 e 19 com os contornos das médias. Através deles vê-se que, tanto para bagaço quanto para *Pinus*, os melhores resultados de produção coincidem com as condições ideais para as melhores purezas, com valores de pH maiores de 2,2 e pressão abaixo de 8 atm (177 °C).

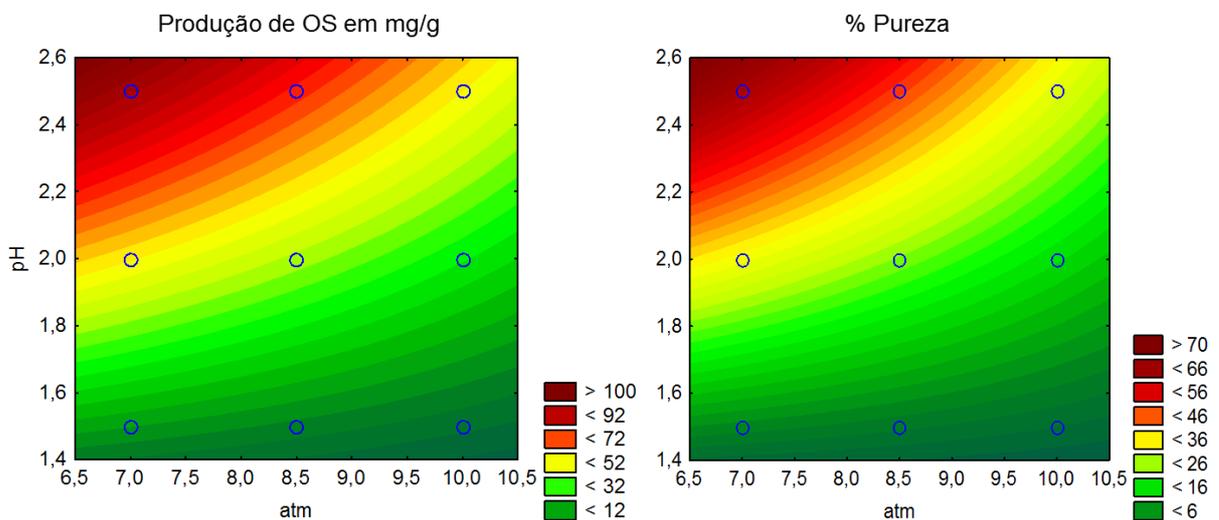


GRÁFICO 18 - CONTORNO DE PRODUÇÃO E PUREZA DE OLIGOSSACARÍDEOS PRODUZIDOS A PARTIR DE PRÉ-TRATAMENTO POR TERMOPRESSURIZAÇÃO FOSFÓRICA DE BAGAÇO DE CANA

NOTA: Gráficos de contorno gerados através de equação linear das respostas.

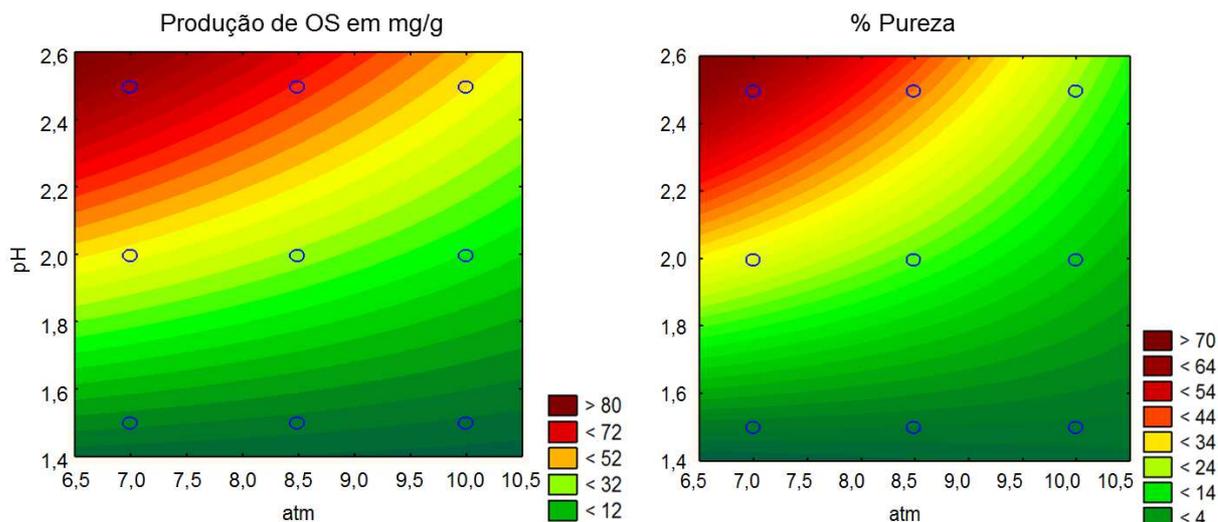


GRÁFICO 19 - CONTORNO DE PRODUÇÃO E PUREZA DE OLIGOSSACARÍDEOS PRODUZIDOS A PARTIR DE PRÉ-TRATAMENTO POR TERMOPRESSURIZAÇÃO FOSFÓRICA DE SERRAGEM DE *PINUS*

NOTA: Gráficos de contorno gerados através de equação linear das respostas.

Quanto às análises do perfil dos hidrolisados termo-fosfóricos por CLAE, não foi obtida uma boa resolução dos OS com os diferentes GPs. Enquanto na CCD é possível observar com auxílio da densitometria até GP = 8, com a CLAE não passou de GP = 4, como pode ser observado nos gráficos 20 e 21.

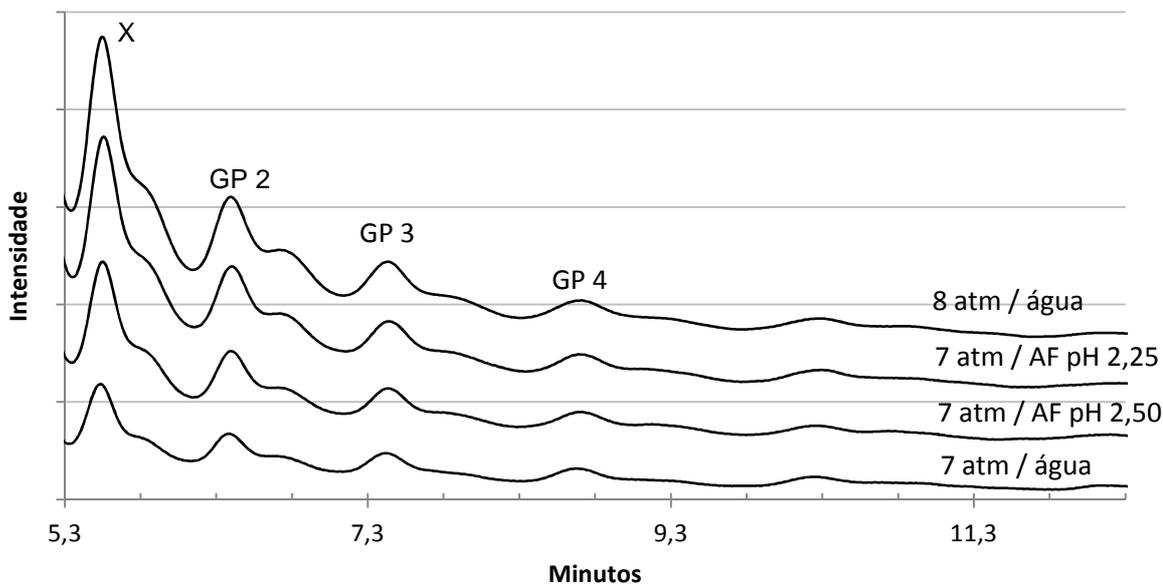


GRÁFICO 20 - CLAE DE AMOSTRAS CONTENDO OLIGOSSACARÍDEOS OBTIDOS ATRAVÉS DE PRÉ-TRATAMENTO POR TERMOPRESSURIZAÇÃO FOSFÓRICA DE BAGAÇO DE CANA  
 NOTA: Coluna  $\text{NH}_2$  (5  $\mu$ ), FM: acetonitrila:água 8:2 (v/v) pH 8,5  $\text{NH}_4\text{OH}$ . Fluxo de 1 mL/ min e detector de índice de refração (RID).

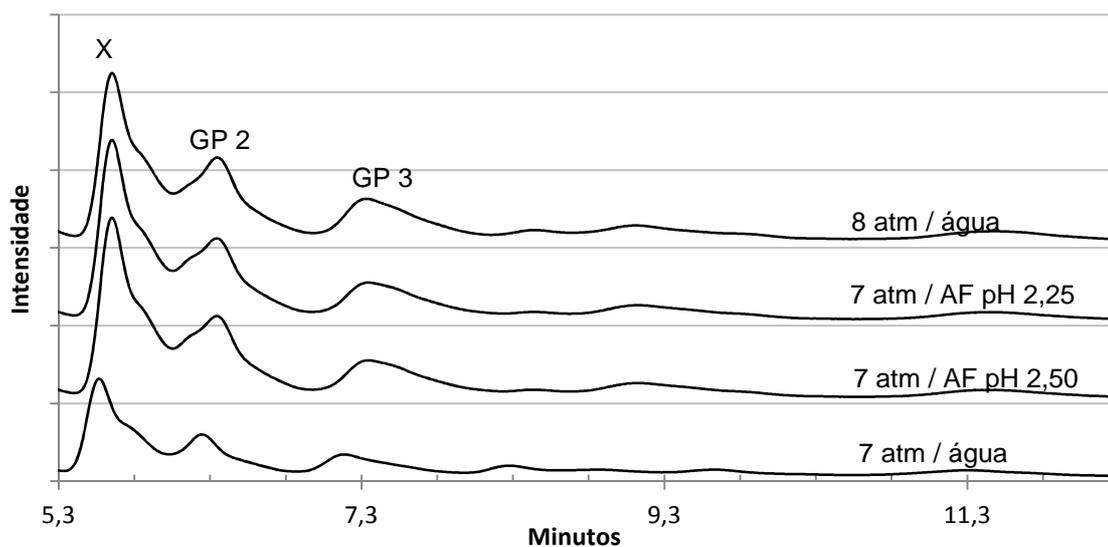


GRÁFICO 21 - CLAE DE AMOSTRAS CONTENDO OLIGOSSACARÍDEOS OBTIDOS ATRAVÉS DE PRÉ-TRATAMENTO POR TERMOPRESSURIZAÇÃO FOSFÓRICA DE SERRAGEM DE *PINUS*  
 NOTA: Coluna  $\text{NH}_2$  ( $5 \mu$ ), FM: acetonitrila:água 8:2 (v/v) pH 8,5  $\text{NH}_4\text{OH}$ . Fluxo de 1 mL/min e detector de índice de refração (RID).

Observando o gráfico 22 gerado com os valores máximos de absorvância, fica patente uma diferença entre as amostras de bagaço e *Pinus*, principalmente na região de 23 minutos de retenção, onde o hidrolisado de bagaço apresenta pico máximo em 275 nm. Essa diferença pode ser explicada pela lignina, mais abundante de *Pinus* ser formada principalmente pelo tipo Guaiacil (>85%), enquanto o bagaço é menos recalcitrante e possui uma mistura 1:1 de Guaiacil:Siringil (CANILHA, 2012).

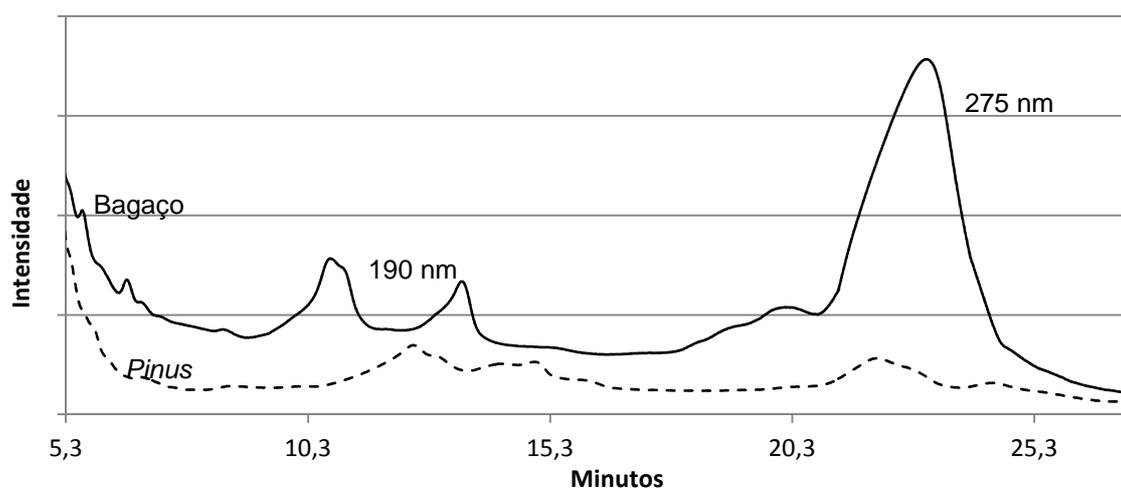


GRÁFICO 22 - CLAE MAX PLOT PARA AS AMOSTRAS DE BAGAÇO DE CANA E SERRAGEM DE *PINUS* HIDROLISADAS COM ÁCIDO FOSFÓRICO PH 2,25 / 7ATM  
 NOTA: Coluna  $\text{NH}_2$  ( $5 \mu$ ), FM: acetonitrila:água 8:2 (v/v) pH 8,5  $\text{NH}_4\text{OH}$ . Fluxo de 1 mL/min e detector de UV no comprimento de onda máximo.

## 7.5 PURIFICAÇÃO DOS OLIGOSSACARÍDEOS

Para o teste de purificação dos OS foi utilizado o hidrolisado de bagaço de cana 8,5 atm; pH 2,5, o qual continha 47,16% ( $\pm 1,41$ ) de OS. Analisando o perfil das CCDs, figura 17, das amostras coletadas, tanto para coluna, quanto para batelada, vê-se uma a progressiva liberação de OS a partir do momento que se inicia o gradiente alcoólico.

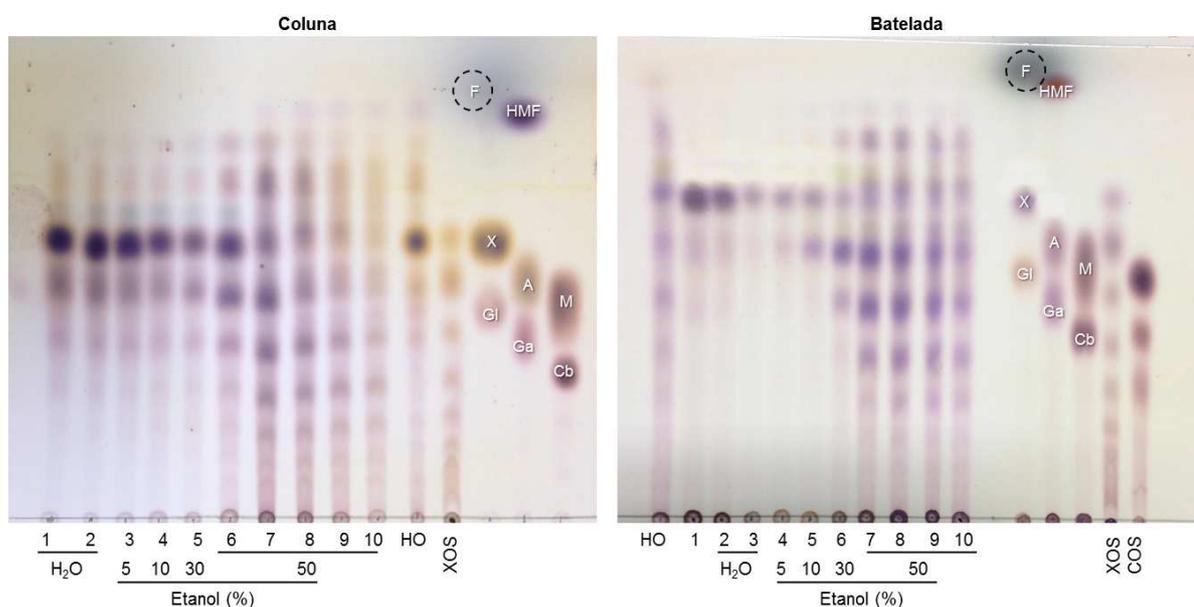


FIGURA 17 - CCD DA PURIFICAÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS OBTIDOS POR TERMOPRESSURIZAÇÃO FOSFÓRICA DE BAGAÇO DE CANA UTILIZANDO COLUNA OU BATELADA

NOTA: FM: acetoneitrila isopropanol e água (15:3:5) - revelador: orcinol sulfúrico - Amostra (HO) de hidrolisado original 8,5 atm, pH 2,5, e padrões: (A) arabinose, (Cb) celobiose, (COS) celooligosacarídeos, (F) furfural, (Ga) galactose, (Gl) glucose, (M) manose, (X) xilose e (XOS) xilooligosacarídeos.

A adição do Celite visou melhorar o fluxo da coluna, e por ser polar assim como os eluentes água e etanol, não influenciou no processo de adsorção/dessorção do carvão ativado. Por coluna, ocorreu a liberação de OS de baixo GP (2, 3 e 4) durante a eluição com água, onde se esperava remover apenas os açúcares livres (monossacarídeos), como pode ser visto na figura 17 da esquerda. Isso pode ter ocorrido devido a uma possível saturação da coluna com a amostra utilizada. A dessorção dos OS com GP>4 se dá assim que se inicia a eluição com etanol 50%, de modo progressivo. Entretanto no mesmo momento

ocorre a liberação dos anidro açúcares provenientes da degradação dos monossacarídeos. A amostra 10 chegou a apresentar pureza de 80%, como pode ser visto no gráfico 23.

Analisando a purificação por batelada, processo bem mais longo, por exigir a decantação, coleta e centrifugação das amostras, vê-se na amostra 1, que representa a coleta do sobrenadante aquoso do próprio hidrolisado original após 10 min sob agitação magnética, não foram visualizados OS com GP $\geq$ 4 (figura 17 da direita). Os OS com GP 2 e 3, da mesma forma do que ocorreu com a coluna, mas de maneira menos evidente, pode ter ocorrido saturação do carvão ativado. Durante o processo de dessorção com água e etanol a 5 e 10% ocorre a liberação apenas de dissacarídeos, sendo que OS com GP $\geq$ 3 começam a ser liberados apenas com etanol 30%. Da mesma forma que ocorreu na coluna, a partir do uso do etanol 50% além da liberação dos OS ocorre a liberação dos anidro açúcares. As amostras 8, 9 e 10 apresentaram pureza de cerca de 70%, como pode ser visto no gráfico 24.

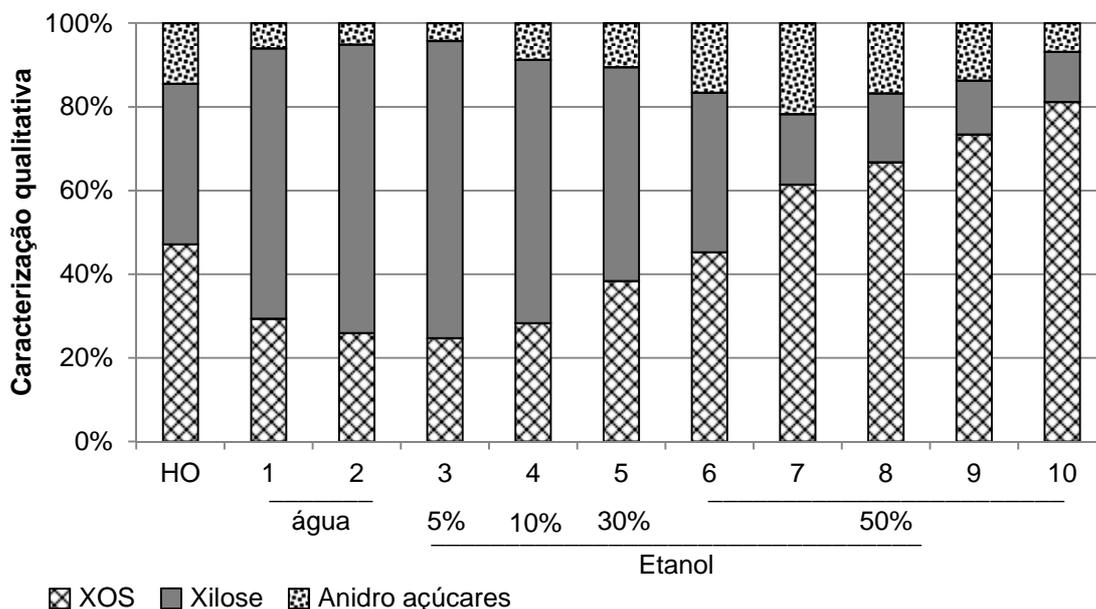


GRÁFICO 23 - CARACTERIZAÇÃO QUALITATIVA DA AMOSTRA DE OLIGOSSACARÍDEOS OBTIDOS POR TERMOPRESSURIZAÇÃO FOSFÓRICA DE BAGAÇO DE CANA EM PROCESSO DE PURIFICAÇÃO POR COLUNA

NOTA: (HO) hidrolisado original; pH 2,5, 8,5 atm.

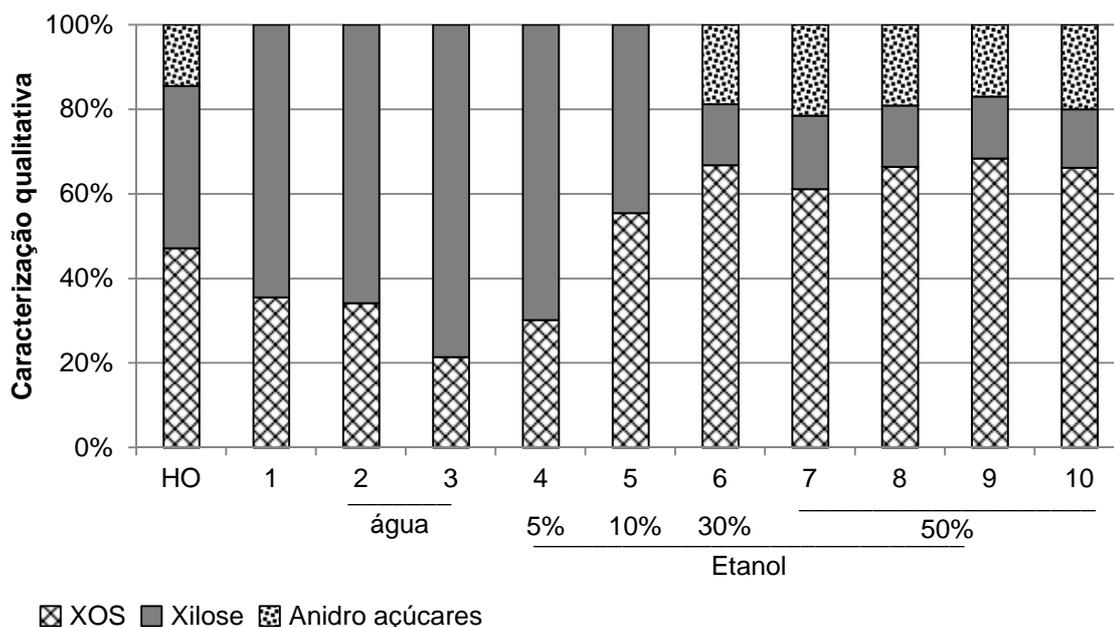


GRÁFICO 24 - CARACTERIZAÇÃO QUALITATIVA DA AMOSTRA DE OLIGOSSACARÍDEOS OBTIDOS POR TERMOPRESSURIZAÇÃO FOSFÓRICA DE BAGAÇO DE CANA EM PROCESSO DE PURIFICAÇÃO POR BATELADA  
 NOTA: (HO) hidrolisado original; pH 2,5, 8,5 atm.

Fazendo a média dos valores de porcentagem de OS para as amostras coletadas, gráfico 25, após dessorção com água, etanol <50% e etanol 50% foram analisadas comparativamente com a caracterização qualitativa do hidrolisado original, 8,5 atm e pH 2,5 que tinha 47,16% de OS. A pureza final das amostras dessorvidas com etanol 50% foi de 66,44 e 65,66% para coluna e batelada, respectivamente. Apesar dos resultados finais serem equivalentes ( $p= 0,6549$ ), o processo em batelada parece mais adequado por não haver grandes perdas de OS com  $GP \leq 4$ . A mesma equivalência ocorreu entre os métodos quando consideradas as recuperações de açúcares totais, dosadas por fenol sulfúrico, após a purificação ( $p=0,1142$ ), que foram superiores a 90%.

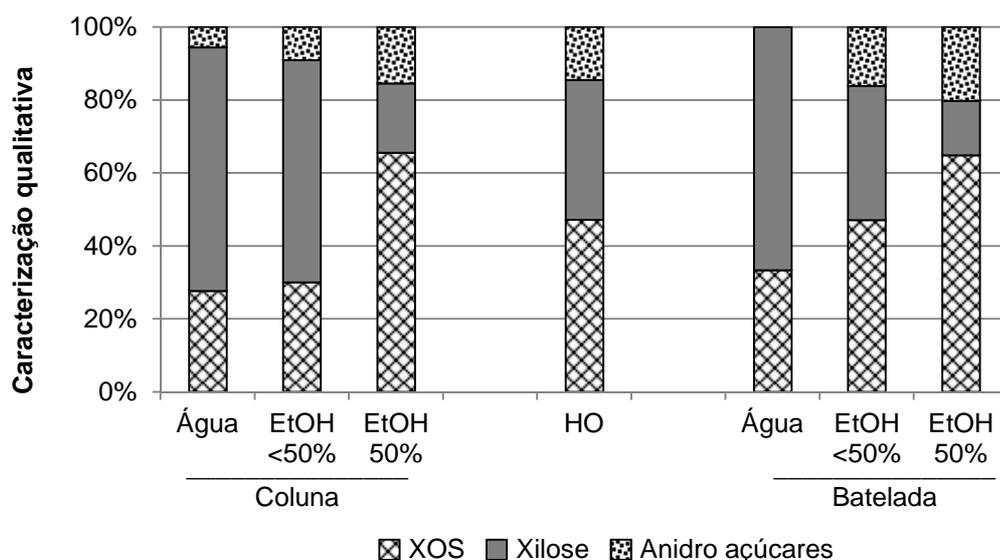


GRÁFICO 25 - CARACTERIZAÇÃO QUALITATIVA COMPARATIVA DA AMOSTRA DE OLIGOSSACARÍDEOS OBTIDOS POR TERMOPRESSURIZAÇÃO FOSFÓRICA DE BAGAÇO DE CANA PURIFICADAS POR COLUNA E BATELADA

NOTA: (HO) hidrolisado original; pH 2,5, 8,5 atm.

## 7.6 CULTIVO COM PRÓBIÓTICOS

Os cultivos com os micro-organismos probióticos, *Lactobacillus casei* Shirota (Yakult®) e o *Bifidobacterium animalis* (Activia®), foram realizados utilizando os OS originais (sem purificação) de resíduos L(h)C como fonte de carbono. Foram escolhidos os hidrolisados obtidos após o pré-processamento fosfórico otimizado, porém utilizando uma mistura 1:1 (v/v) de 7 atm, pHs 2,50 e 2,25. Essa mistura se deu para que houvesse uma equivalência ( $p=0,2554$ ) da pureza dos hidrolisados para bagaço (59,29%) e *Pinus* (57,40%), permitindo assim posterior comparação entre as diferentes biomassas. Esses hidrolisados também foram escolhidos pela quantidade reduzida de produtos de degradação, compostos principalmente por anidro açúcares (<10%).

Em um teste preliminar, com uma mescla de micro-organismos (*L. gasseri*, *L. acidophilus* e *B. bifidum*, *B. longum* e *B. animalis*) obtidos na forma de comprimidos para suplementação probiótica, foram avaliados os efeitos dos produtos de degradação no meio. Não houve diferenças de crescimento entre os cultivos com os OS nativos e os hidrolisados que passaram por carvão ativado (com a concentração

dos produtos de degradação). Entretanto esses resultados não serão apresentados, pois não foram realizados seguindo condições de temperatura e oxigenação que simulassem o intestino humano.

O experimento realizado em condição de anaerobiose e 37 °C durante 14 dias, com os probióticos *L. casei* Shirota e *B. animalis*, utilizou inóculo padronizado e monitorado por absorvância relativa em 660 nm. A fase de adaptação dos micro-organismos durou 24 h, período no qual foram utilizados os açúcares livres, no caso, a xilose. Houve diferenças de crescimento entre as fontes de biomassa e as bactérias utilizadas, como pode ser visto no gráfico 26.

Analisando o micro-organismo *B. animalis*, foi observado crescimento tanto utilizando os OS de bagaço ( $p=0,0008$ ) quanto de *Pinus* ( $p=0,0024$ ). Entretanto a produção de biomassa foi 3 vezes maior para o bagaço considerando os 14 dias de cultivo. Quanto o *L. casei*, também houve crescimento tanto com bagaço ( $p=0,0041$ ) quanto com OS de *Pinus* ( $p=0,0001$ ). Porém, diferente do ocorrido com o *B. animalis*, o lactobacilo produziu 2,25 vezes mais biomassa com o hidrolisado de serragem de *Pinus*.

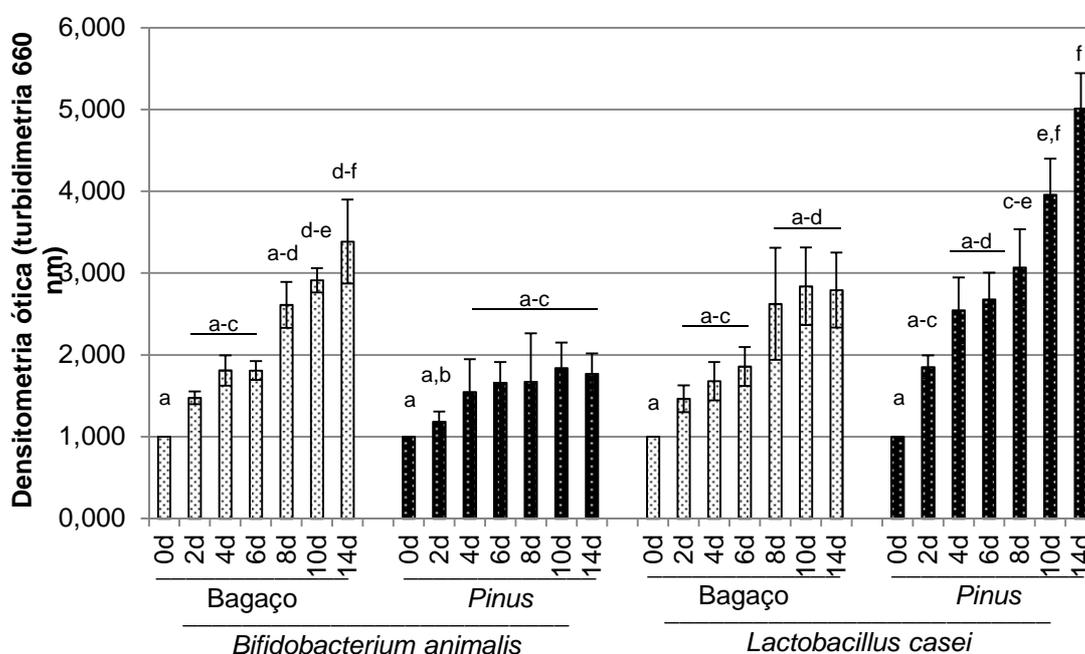


GRÁFICO 26 - CRESCIMENTO DOS MICRO-ORGANISMOS PROBIÓTICOS UTILIZANDO OLIGOSSACARÍDEOS OBTIDOS POR TERMOPRESSURIZAÇÃO FOSFÓRICA DE BAGAÇO DE CANA E SERRAGEM DE *PINUS*

NOTA: Foi utilizado hidrolisados 7 atm, pHs 2,50 e 2,25. As letras sobrescritas indicam as diferenças por teste Tukey ( $\alpha=0,05$ ) entre as amostras.

Analisando por fonte L(h)C, vê-se que até o oitavo dia de cultivo não existem diferenças de crescimento entre os probióticos avaliados com OS de bagaço de cana, formados exclusivamente por XOS. Entretanto, quando se analisa o *Pinus*, o mesmo não ocorreu. Houve um crescimento quatro vezes maior com o lactobacilo do que com a bifidobactéria, indicando que a presença de GGMOs, mesmo em pequenas quantidades, seria capaz de gerar um efeito sinérgico para o *L. casei* e antagônico para *B. animalis*.

Considerando a produção de biomassa, estudos avaliando a composição e volume fecal de ratos frente a diferentes OS, mostrou que os XOS são capazes de aumentar o volume de fezes bem como a quantidade de bactérias anaeróbicas, principalmente do gênero *Bifidobacterium*, como observado com os OS de bagaço. Entretanto, o tratamento com OS, de modo geral, reduziu ou apenas manteve a quantidade de bactérias aeróbicas, a exemplo dos *Lactobacilli* que não foram alterados com as diferentes dietas (CAMPBELL, 1997). Entretanto, foi observado crescimento diferencial dos lactobacilos quando utilizado OS de *Pinus* como fonte de carbono, contendo XOS e GGMOs.

Somente o aumento no número de células de micro-organismos probióticos no TGI, como os lactobacilos e as bifidobactérias, já pode apresentar efeitos sistêmicos, como é o caso quando associados ao realçador de sabor glutamato monossódico. Essa combinação resulta na produção do ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), principal neurotransmissor inibidor do sistema nervoso central, estaria associado a efeitos relaxantes, anti-ansiolíticos e anticonvulsivantes (BARRETT, 2012). Entretanto, este composto está presente principalmente em alimentos tipo *fast food* e industrializados, geralmente ricos também em gorduras e sódio. Outros estudos relacionam o consumo de probióticos como um fator associado com a melhoria do humor e bem estar geral, não estando relacionado apenas com a melhora do trânsito intestinal, mas sim com o aumento do número de micro-organismos benéficos no intestino (BENTON, 2007; TILLISCH, 2013).

Além do aumento no número de células dos probióticos, ocorre a fermentação dos OS no cólon intestinal, com a produção de AGCC, que não só reduzem o pH mas o estabilizam, prevenindo desta forma o crescimento de micro-organismo patogênicos e putrefativos (NUGENT, 2001; CARVALHO, 2013).

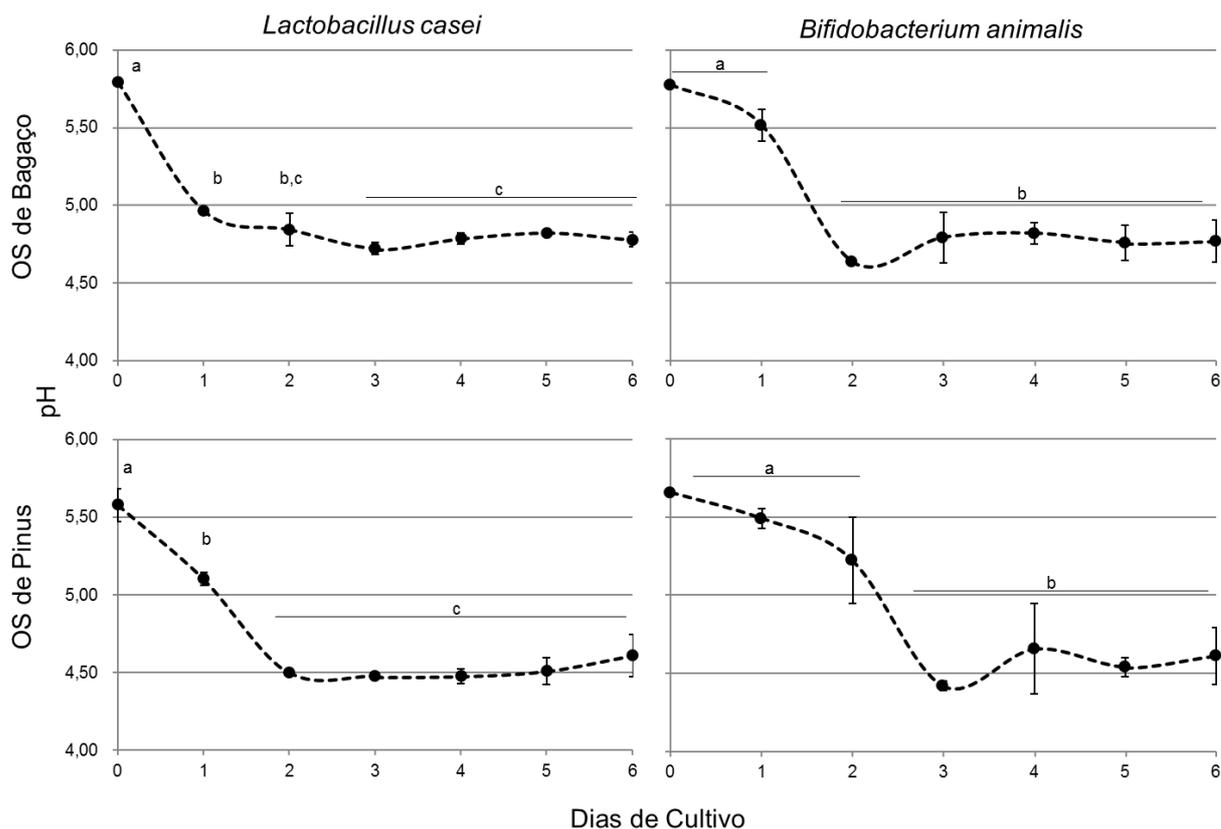


GRÁFICO 27 - EVOLUÇÃO DO pH DURANTE O CULTIVO DE PROBIÓTICOS COM OLIGOSSACARÍDEOS DE BAGAÇO DE CANA E *Pinus taeda*  
 NOTA: As letras sobrescritas indicam as diferenças por teste Tukey ( $\alpha=0,05$ ) entre as amostras.

O curso do experimento fermentativo mediante análise potenciométrica, gráfico 27, indica que em todos os cultivos ocorreu redução do pH ( $p \leq 0,0025$ ), chegando ao nível mínimo já a partir do terceiro dia de incubação, havendo uma manutenção de valores em torno de 4,76 ( $\pm 0,10$ ) e 4,78 ( $\pm 0,03$ ) para os OS de bagaço e 4,56 ( $\pm 0,14$ ) e 4,51 ( $\pm 0,06$ ) para os OS de *Pinus*, considerando os microorganismos bifidobacterias e lactobacilos, respectivamente. Essa capacidade da microbiota benéfica em produzir AGCC a partir da fermentação de carboidratos, sejam eles mono ou OS, está diretamente relacionado com a saúde intestinal, uma vez que a redução do pH, além de garantir o crescimento e manutenção da colônia, pode reduzir o risco de desordens intestinais, câncer e até mesmo doenças cardiovasculares (HSU, 2004; CARVALHO, 2013; HUGENHOLTZ, 2013). A concentração dos AGCCs normalmente é maior no colón proximal, de 70 a 150 mmol/L, e tende a decair à medida que se aproxima do cólon distal para cerca de 20 a 70 mmol/L, já que ocorre diminuição dos substratos disponíveis para a fermentação. Os simbióticos auxiliam para que essa queda seja menos intensa,

proporcionando melhor saúde em todos os segmentos intestinais (CAMPOS, 1999; RUSSELL, 2011).

A produção de AGCC foi analisada para todas as amostras obtidas (0-14 dias) por CLAE utilizando uma coluna para ácidos orgânicos (ROA - *Rezex organic acids*). Os gráficos 28 e 29 referem-se respectivamente aos cultivos de *B. animalis* e *L. casei* com OS de obtidos por hidrólise de bagaço de cana de açúcar, XOS. Primeiramente observa-se a presença de ácido acético em ambos os cultivos já no dia zero, na ordem de 157,83 e 131,47 µg/mL, sendo oriundos da hidrólise da biomassa, já que a hemicelulose presente no bagaço de cana, composta majoritariamente por arabinoxilanas, possui unidades O-acetil na sua composição (PÉREZ, 2010). O ácido acético, como seu ânion acetato, é absorvido e tem circulação periférica, como ação principalmente nos tecidos periféricos. Além da capacidade de reduzir o pH, assim como o ácido láctico, o ácido acético é capaz de aumentar a solubilidade dos sais biliares e absorção de minerais bem como reduzir a absorção de amônia e o crescimento de bactérias patogênicas (HUGENHOLTZ, 2013).

A produção de AGCCs fica evidente em 48 h para ambos os cultivos com bifidobactérias e já em 24 h para os cultivos com Lactobacilos. A partir do terceiro dia de cultivo o pH atingiu seu nível mínimo com uma quantidade de 255,60 e 216,81 µg/mL de ácido acético. A produção majoritária de ácido láctico era esperada, principalmente para os cultivos de *L. casei* (RUSSELL, 2011), passando de 51,55 e 22,11 µg/mL no tempo zero para 420,10 e 632,36 µg/mL em três dias, para o *B. animalis* e *L. casei*, respectivamente. O ácido láctico inicial refere-se possivelmente aos resíduos dos produtos comerciais utilizados como fonte dos probióticos.

Os gráficos 30 e 31 referem-se aos resultados obtidos com os hidrolisados de serragem de *Pinus taeda* e seguiram o mesmo perfil anteriormente visto. O ácido acético passou de 68,89 e 83,05 µg/mL no dia zero para 110,75 e 85,67 µg/mL no terceiro dia para *B. animalis* e *L. casei*, respectivamente. A produção de ácido láctico foi mais intensa, passando de 10,33 e 21,37 µg/mL para 407,78 e 403,56 µg/mL, respectivamente.

Um dado prático observado, foi o fato que com o passar do tempo, ocorre redução na quantidade de AGCCs no meio fermentativo devido ao consumo destes como fonte de energia para o próprio micro-organismo (HUGENHOLTZ, 2013), ao

invés da utilização dos OS de alto GP. Entretanto isso não resulta em prejuízo do poder nutracêutico, já que todo processo de digestão dura de 3–5 dias, com eliminação não apenas das fezes, mas também dos micro-organismos presentes no TGI. Outra observação foi a presença de ácido *n*-butírico a partir do nono dia de cultivo. Este AGCC já foi relatado no tratamento de colite ulcerativa em pacientes que não haviam respondido ao tratamento convencional havendo redução dos sintomas e da inflamação. Também existem estudos associando os derivados butíricos como agentes antineoplásicos (ROWE, 1992).

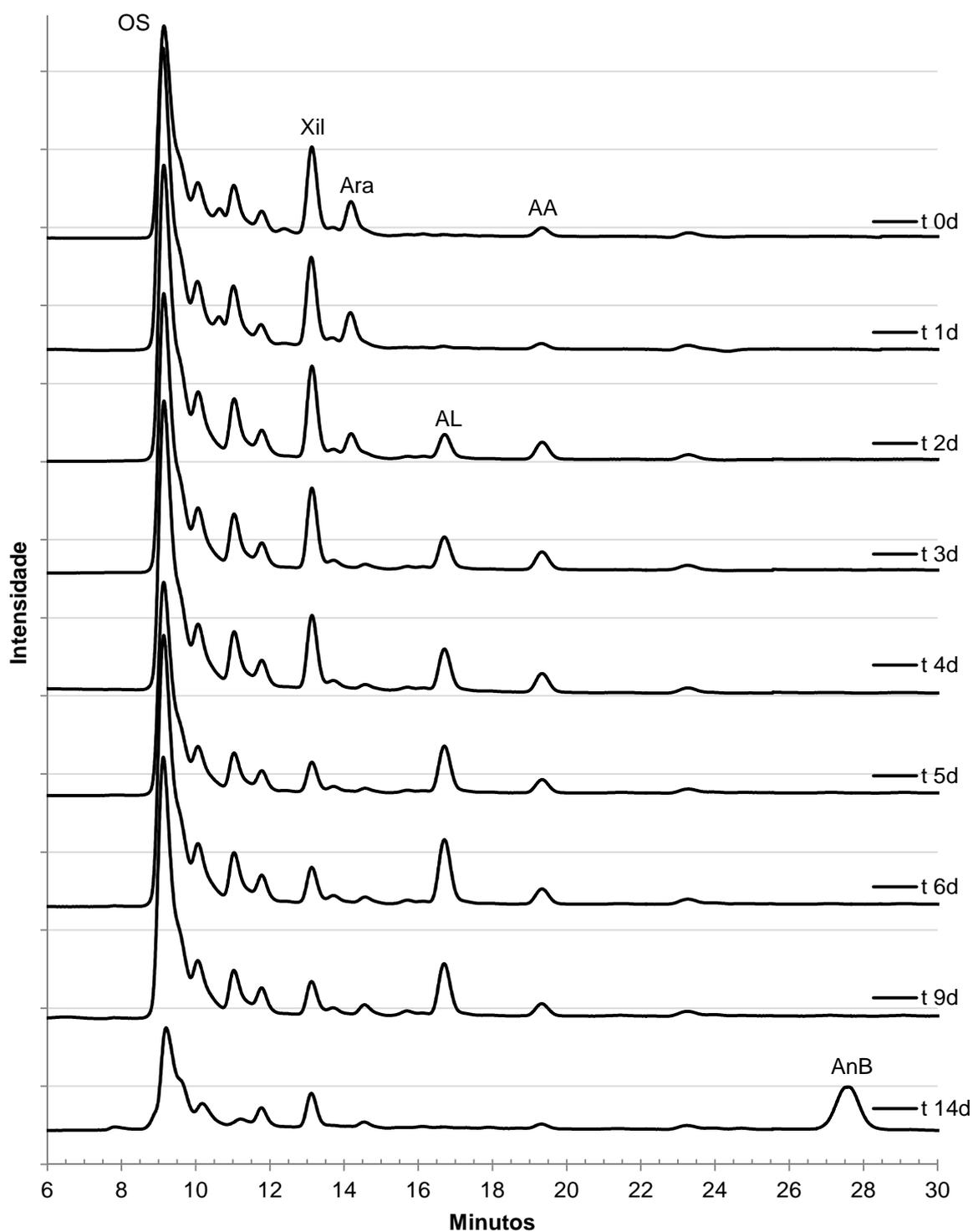


GRÁFICO 28 - CROMATOGRAMA DO CULTIVO DE *Bifidobacteria animalis* COM OLIGOSSACARÍDEOS DE BAGAÇO DE CANA

NOTA: Coluna ROA, FM: ácido sulfúrico 8 mmol — Fluxo 0,5 mL/min — Detector RID. Amostras contendo (OS) oligossacarídeos, (Xil) xilose e (Ara) arabinose e os ácidos orgânicos: (AL) lático, (AA) ácido e (AnB) n-butírico.

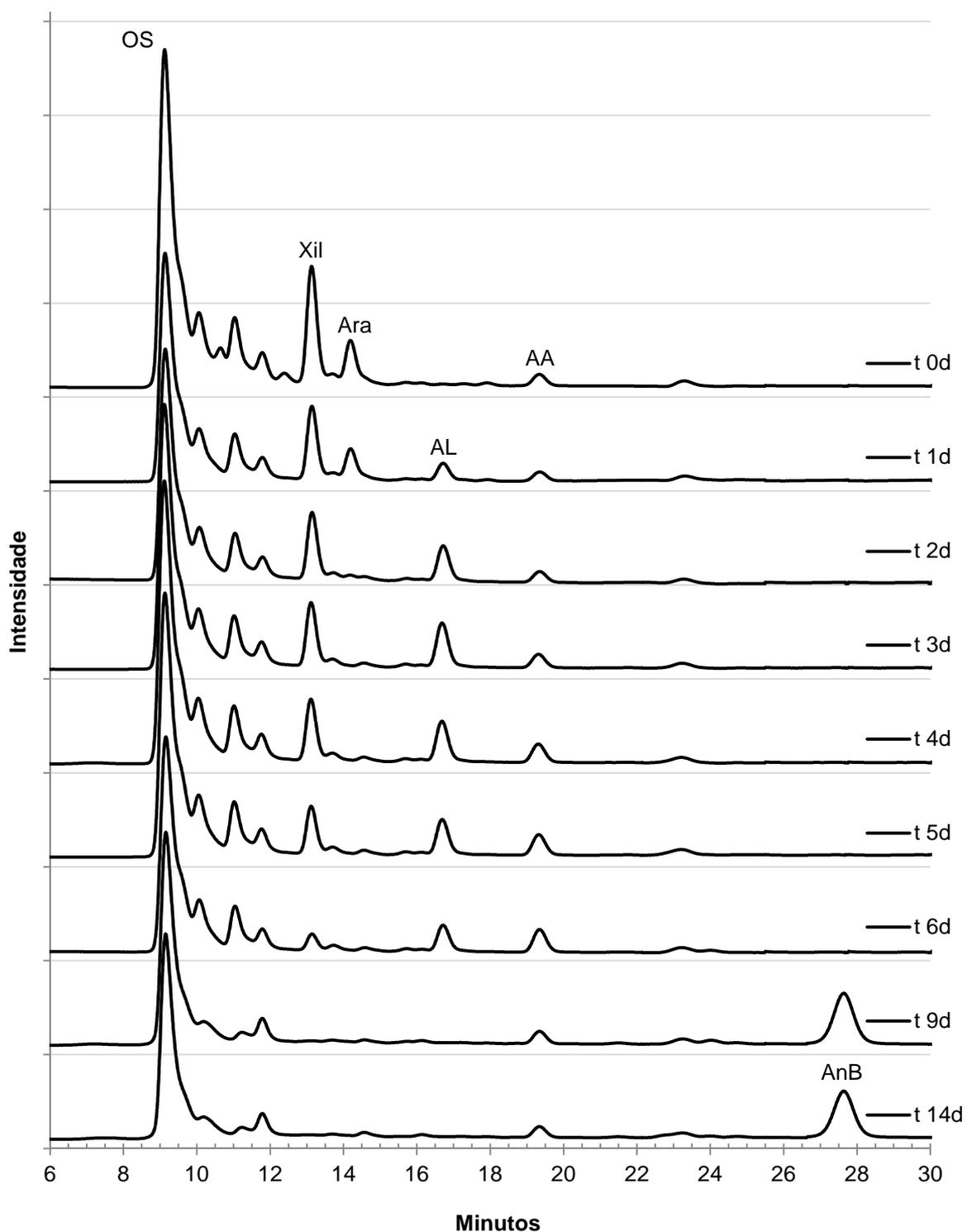


GRÁFICO 29 - CROMATOGRAMA DO CULTIVO DE *Lactobacilos casei* Shirota COM OLIGOSSACARÍDEOS DE BAGAÇO DE CANA

NOTA: Coluna ROA, FM: ácido sulfúrico 8 mmol — Fluxo 0,5 mL/min — Detector RID. Amostras contendo (OS) oligossacarídeos, (Xil) xilose e (Ara) arabinose e os ácidos orgânicos: (AL) láctico, (AA) ácido e (AnB) n-butírico.

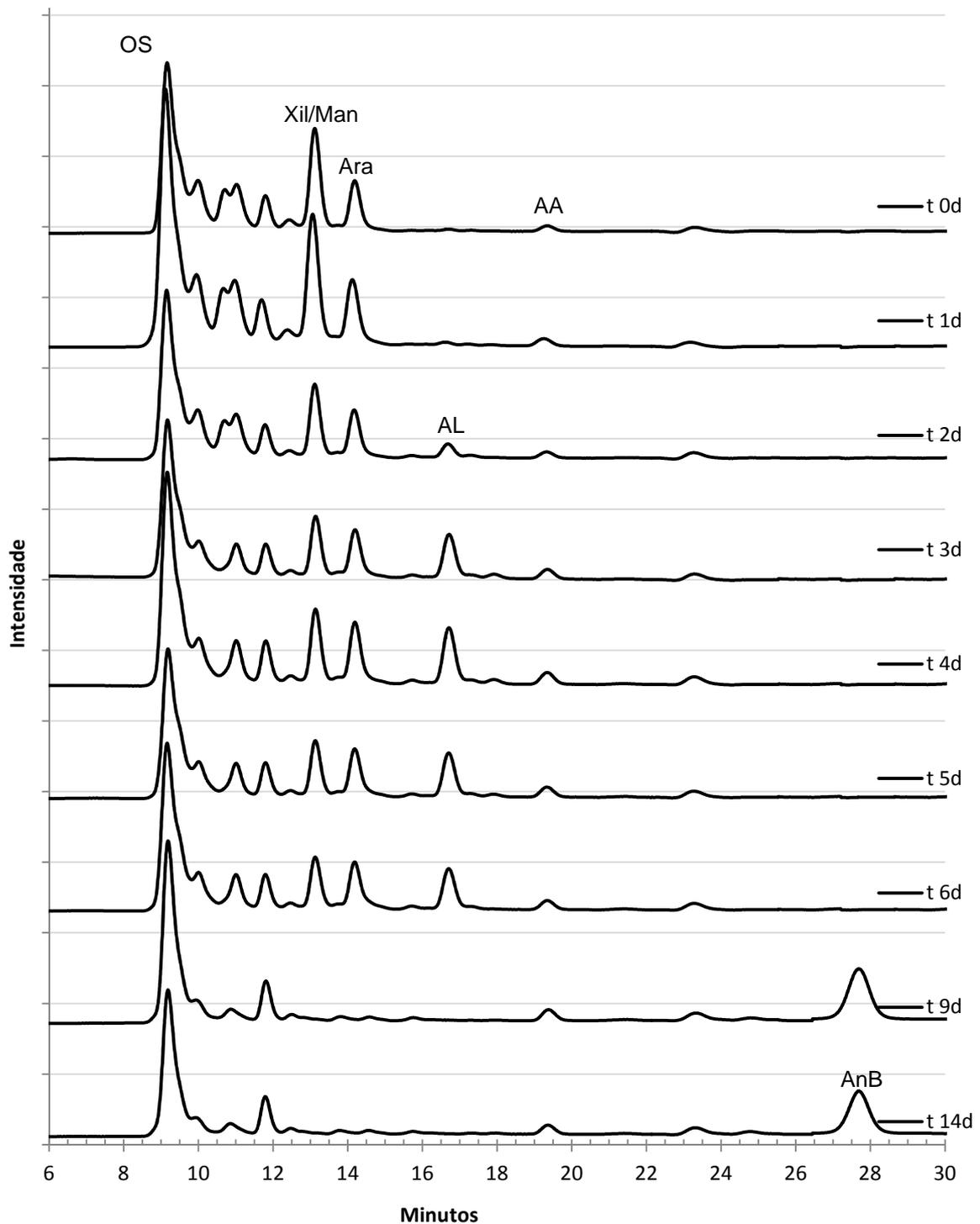


GRÁFICO 30 - CROMATOGRAMA DO CULTIVO DE *Bifidobacteria animalis* COM OLIGOSSACARÍDEOS DE SERRAGEM DE *Pinus taeda*  
 NOTA: Coluna ROA, FM: ácido sulfúrico 8 mmol — Fluxo 0,5 mL/min — Detector RID.  
 Amostras contendo (OS) oligossacarídeos, (Xil/Man) xilose e/ou manose e (Ara) arabinose e os ácidos orgânicos: (AL) láctico, (AA) ácido e (AnB) n-butírico.

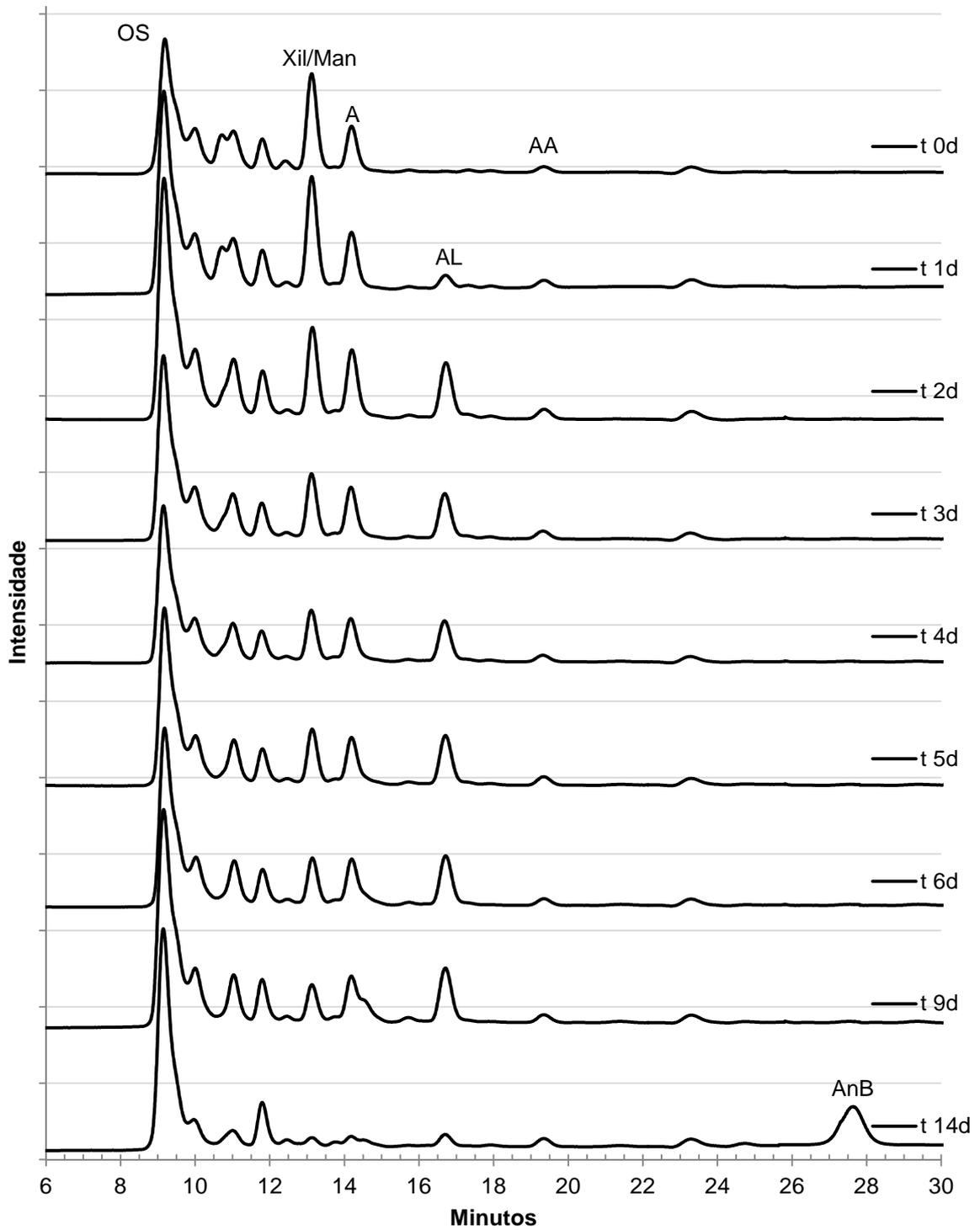


GRÁFICO 31 - CROMATOGRAMA DO CULTIVO DE *Lactobacilos casei* Shirota COM OLIGOSSACARÍDEOS DE SERRAGEM DE *Pinus taeda*  
 NOTA: Coluna ROA, FM: ácido sulfúrico 8 mmol — Fluxo 0,5 mL/min — Detector RID.  
 Amostras contendo (OS) oligossacarídeos, (Xil/Man) xilose e/ou manose e (Ara) arabinose e os ácidos orgânicos: (AL) láctico, (AA) ácido e (AnB) n-butírico.

**CAPÍTULO 2 - OBTENÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS PREBIÓTICOS A  
PARTIR DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DIRETA DE SUBSTRATOS  
ORIUNDOS DE FITOBIOMASSA**

## 8 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 8.1 POLISSACARÍDEOS

Os polissacarídeos são polímeros naturais, os quais podem ser constituídos de um único (homopolissacarídeo) ou de diferentes (heteropolissacarídeo) monossacarídeos. Muitos possuem aplicação industrial, como os representados na tabela 11, extraídos de algas, plantas superiores (casca, exsudatos, sementes, frutos e tubérculos), fungos, bactérias e diversos animais (CUNHA, 2009).

TABELA 11 - FONTES DE POLISSACARÍDEOS USUAIS

| <b>Origem</b>      |                  | <b>Polissacarídeo</b>       | <b>Exemplo de Fonte</b>  |
|--------------------|------------------|-----------------------------|--|
| Algas              | Pardas           | Alginato                    | <i>Macrocystis</i><br><i>Ascophyllum</i><br><i>Laminaria</i><br><i>Ecklonia</i><br><i>Sargassum.</i> |
|                    | Vermelhas        | Agaranas                    | <i>Gracilaria</i><br><i>Gelidium</i><br><i>Pterocladias.</i>   |
|                    |                  | Carragenas                  | <i>Soliera</i><br><i>Eucheuma</i><br><i>Meristiella</i>  |
| Plantas Superiores | Exsudato         | Goma Arábica                | <i>Acacia</i> sp   |
|                    |                  | Goma Ghati                  | <i>Anogeissus latifolia</i>  |
|                    |                  | Tragacante                  | <i>Astragalus</i> sp   |
|                    | Sementes         | Galactomanana               | <i>Cyamopsis tetragonolobus</i><br><i>Ceratonia siliqua</i><br><i>T. indica</i>                      |
|                    |                  | Xiloglucana                 |  |
|                    | Frutos           | Pectina                     | Maças, laranjas  |
| Tubérculos         | Amido            | Milho, batata, trigo        |  |
|                    | Inulina          | Chicória, alcachofra, dália |  |
| Casca              | Celulose         | Plantas em geral            |  |
|                    | Hemicelulose     | Plantas em geral            |  |
| Micro-organismos   | Fungos           | Glucanas                    | <i>Agaricus blazei</i>   |
|                    | Bactérias        | Xantana                     | <i>Xanthomonas</i> ssp   |
| Dextranas          |                  | <i>Leuconostoc</i> spp      |  |
| Gelanas            |                  | <i>Sphingomonas elodea</i>  |  |
|                    |                  |                             |  |
| Invertebrados      | Crustáceos       | Quitina                     | Carapaças de crustáceos  |
|                    |                  | Quitosana                   | Carapaças de crustáceos  |
| Animais superiores | Bovinos e outros | Ácido Hialurônico           | Humor vítreo de bovinos<br>Cristas de galináceos   |
|                    |                  | Heparina                    | Pulmão de bovinos<br>Intestino de porcos   |

FONTE: Adp. (CUNHA, 2009)

A parede celular das plantas superiores possui estruturas altamente complexas e dinâmicas e constituídas majoritariamente de polissacarídeos. Ela varia de acordo com o vegetal e seu grau de desenvolvimento e pode ser classificada em primária e secundária, contendo, em ambas, celulose e hemicelulose. A primária também contém pectinas, além de outras proteínas estruturais. A secundária é formada através do depósito de lignina, indicando a finalização do crescimento vegetal. Entretanto, a parede celular de alguns cotilédones e sementes podem apresentar pouca celulose e nenhuma lignina. Elas são formadas por depósitos de polissacarídeos que são digeridos durante a germinação, e são chamados de polissacarídeos de reserva, que geralmente são compostos por manose, galactose, xilose e glucose (BENTO, 2013). Os mais usuais são as xiloglucanas e galactomananas (CUNHA, 2009).

#### 8.1.1 Pectinas

As pectinas encontram-se nos espaços intercelulares centrais dos tecidos vegetais, sendo que em tecidos jovens, especialmente de frutas, apresentam-se em grande quantidade. As principais matérias-primas para a produção de pectina comercial são bagaço de maçã e casca de frutas cítricas, sendo extraídas industrialmente através de solubilização em condições ácidas e altas temperaturas (WANG, 2014).

Em função de seu caráter hidrofílico, as pectinas se constituem de um colóide por excelência, já que a presença de grupos polares é capaz de propiciar a absorção de uma grande quantidade de água, produzindo soluções viscosas. Essa capacidade da pectina é amplamente utilizada no preparo de geléias, doces de frutas, produtos de confeitaria, sucos de frutas e em outros ramos da indústria de alimentos. As pectinas também são utilizadas como espessantes, texturizantes, emulsificantes ou estabilizantes na indústria de modo geral (WANG, 2014).

Quimicamente, as pectinas são polissacarídeos naturais comuns, compostos de 150 a 500 unidades de ácido galacturônico (proveniente da oxidação do carbono 6 da galactose), parcialmente esterificados com grupos metoxílicos, unidos por

ligação glicosídica  $\alpha(1\rightarrow4)$  (figura 18). Algumas plantas podem possuir acetilação parcial dos carbonos 2 ou 3 do ácido glucurônico (RIDLEY, 2001).

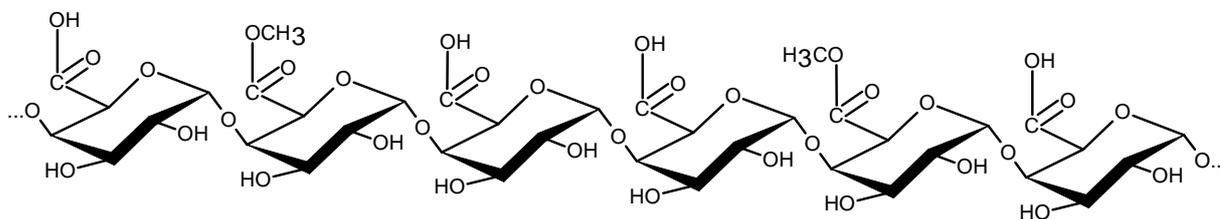


FIGURA 18 - ESTRUTURA GERAL DA CADEIA PRINCIPAL DA PECTINA

NOTA: Unidades de ácido  $\alpha$ -galacturônico 4-ligados, parcialmente esterificados com grupos metoxílicos

FONTE: O autor.

Na cadeia principal de ácido galacturônico (homogalacturônico), podem existir regiões ramificadas, figura 19, principalmente por unidades de ramnose (ramnogalacturônico II) e outras regiões onde a cadeia principal passa a ser formada por um dissacarídeo formado por uma unidade de ácido glucurônico e uma ramnose, também sendo ramificada (ramnogalacturônico I) (RIDLEY, 2001; CUNHA, 2009; HOLCK, 2011). Nas ramificações estão presentes açúcares neutros, como a galactose, ramnose e arabinose (WANG, 2014).

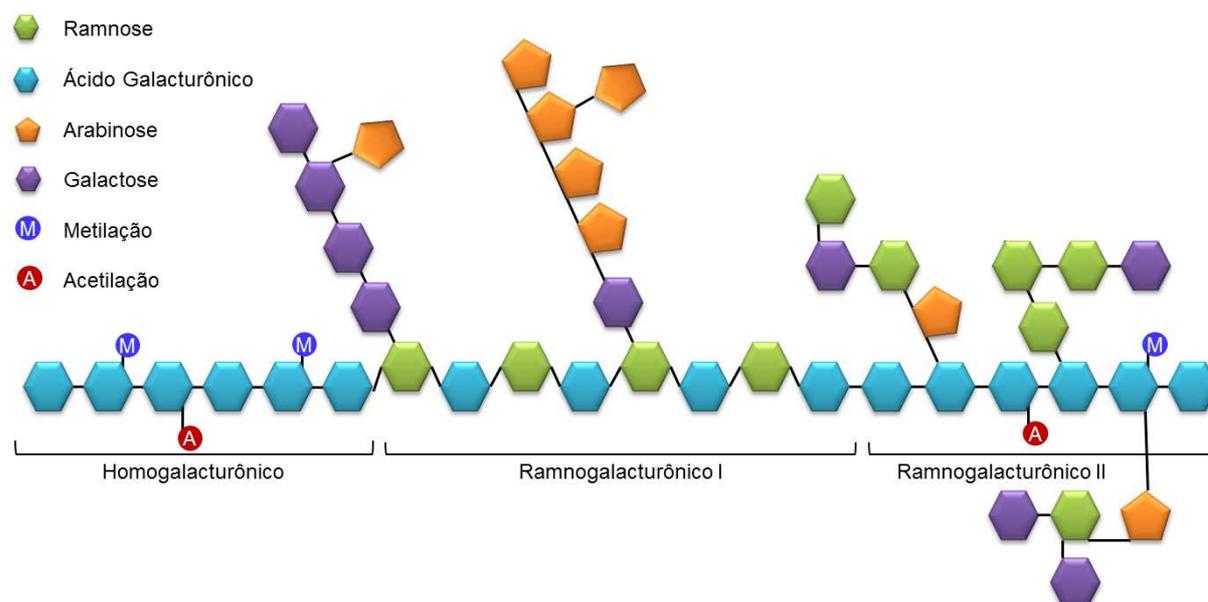


FIGURA 19 - ESQUEMA DAS REGIÕES DA PECTINA

FONTE: Adp. (RIDLEY, 2001; HOLCK, 2011)

O grau de metoxilação e as proporções entre as regiões da pectina são determinantes para as propriedades reológicas deste polímero. Acima de 50% de esterificação, as chamadas de pectinas de alta metoxilação, são capazes de formar géis após aquecimento, mesmo em soluções de alta concentração de açúcares e pH baixo. Já quando esta taxa de metoxilação é inferior a 50%, a formação de géis depende da presença de cátions divalentes como o cálcio, podendo formar géis mesmo na ausência de sacarídeos, sendo explorado em produtos alimentícios do tipo *diet* (KJØNIKSEN, 2005). Isto é compreensível já que o sítio de ligação, tanto do metanol (éster) quanto do cálcio (ponte entre cadeias), é a carboxila em C6 do ácido galacturônico da cadeia principal.

Em frutos imaturos, as pectinas estão presentes na forma de protopectinas, ligadas ao cálcio das paredes celulares formando o pectato de cálcio, o qual é insolúvel em água. Durante o subsequente amadurecimento, a protopectina é hidrolisada por ação de enzimas como a poligalacturonase gerando os ácidos pectínicos, cadeias mais curtas e coloidais, não necessariamente solúveis em água. Outra enzima é a pectinametilesterase que, durante o amadurecimento, promove a remoção dos grupos metílicos dando origem às substâncias pécticas que não formam gel (RIDLEY, 2001; CONCHA OLMOS, 2012).

Os ácidos pectínicos, gerados pela ação da poligalacturonase, são uma forma natural de oligossacarídeos, sendo estes compostos mais frequentemente formados por cadeias homogalacturônicas. Além de uma função de defesa da planta (RIDLEY, 2001), os oligossacarídeos de ácido galacturônico (AGaOS) também estão relacionados com funções biológicas e fisiológicas, pois seriam capazes de (da mesma forma que outros OS) reduzir o colesterol sérico, atrasar o esvaziamento gástrico, modular o sistema imune e induzir a apoptose de células de câncer colorretal (WANG, 2014).

### 8.1.2 Galactomananas

Galactomanana (GM) é o carboidrato polimérico encontrado como reserva energética de sementes em leguminosas. O polissacarídeo consiste de uma cadeia

de unidades de  $\beta$ -D-manopirranose 4-ligados contendo unidades de  $\alpha$ -D-galactopirranose 6-ligados (figura 20) (BULPIN, 1990; BUCKERIDGE, 2000).

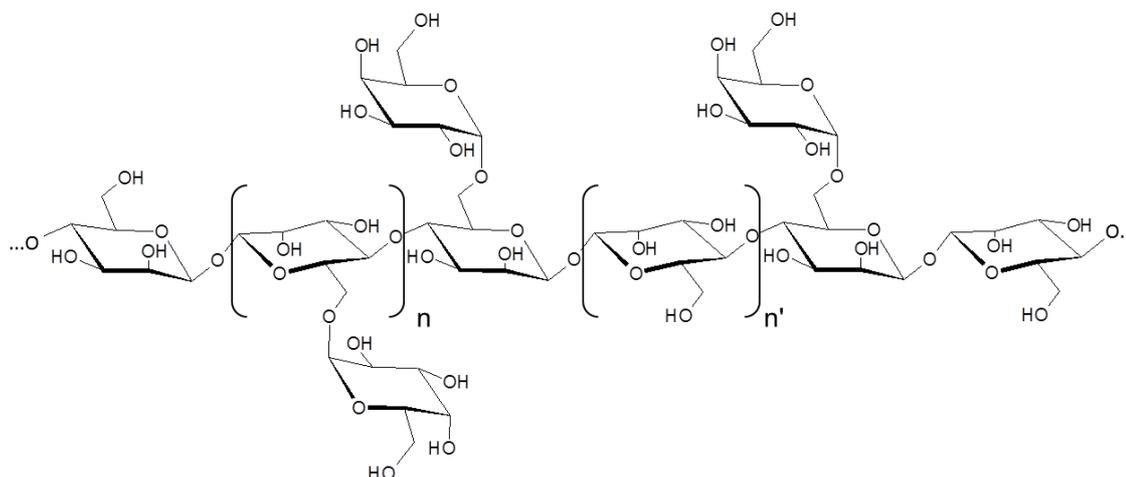


FIGURA 20 - ESTRUTURA GERAL DAS GALACTOMANANAS

NOTA: Cadeia de unidades de  $\beta$ -manopirranose 4-ligadas, contendo unidades de  $\alpha$ -galactopirranose 6-ligadas.

FONTE: O autor.

A proporção manose:galactose (Man:Gal), tabela 12, depende da fonte botânica e da técnica de extração, variando de 50:50, ou seja, completa substituição das unidades de manose, para 85:15 indicando substituição parcial, que pode ser homo ou heterogênea (BULPIN, 1990). As propriedades físico-químicas da GM são fortemente influenciadas pelo conteúdo Man:Gal bem como pela distribuição das unidades de galactose na cadeia de manose (KOOP, 2012). As proporções, bem como rendimentos são altamente afetados pela idade da semente, pois a deposição desse polissacarídeo de reserva nem sempre é constante e também há o consumo durante a germinação (BUCKERIDGE, 2000).

Particularmente abundantes no endosperma de sementes de leguminosas, as famílias Ceratoniinae, Gleditsia e Cercidinae são as que apresentam os maiores rendimentos (com relação ao peso seco de semente) de GM e maior relação Man:Ga (menor substituição). Nas famílias Caesalpinioideae e Mimosoidease possuem maior grau de substituição, com menor proporções Man:Gal (BUCKERIDGE, 2000).

TABELA 12 - COMPOSIÇÃO QUANTITATIVA DE GALACTOMANAS EM DIFERENTES SEMENTES

| Nome            |                                 | % GM na semente seca | Composição (%) |           | Relação Man:Gal |
|-----------------|---------------------------------|----------------------|----------------|-----------|-----------------|
|                 |                                 |                      | Manose         | Galactose |                 |
| Alfarroba       | <i>Ceratonia siliqua</i>        | 38                   | 81             | 19        | 3,6–5,7         |
| Pata-de-vaca    | <i>Bauhinia holophylla</i>      | 14                   | 76             | 24        | 3,2             |
| Cássia Imperial | <i>Cassia fistula</i>           | 27                   | 76             | 24        | 3,0– 3,3        |
| Mangerioba      | <i>Senna alata</i>              | 32–33                | 75             | 25        | 2,7–3,5         |
| Flor de pavão   | <i>Caesalpinia pulcherrima</i>  | 24–31                | 73             | 27        | 2,7–3,0         |
| Tojo-gatanho    | <i>Gleditsia triacanthos</i>    | 11–27                | 73             | 27        | 2,4–3,2         |
| Crotalária      | <i>Crotalaria juncea</i>        | 9–25                 | 66             | 34        | 1,5–2,5         |
| Guar            | <i>Cyamopsis tetragonolobus</i> | 21–35                | 62             | 38        | 1,5– 1,8        |
| Sene            | <i>Cassia angustifolia</i>      | 34                   | 60             | 40        | 1,5             |
| Anileira        | <i>Indigofera suffruticosa</i>  | 18–25                | 58             | 42        | 1,1–1,7         |
| Leucena         | <i>Leucaena glauca</i>          | 25                   | 56             | 44        | 1,3             |
| Bracatinga      | <i>Mimosa scabrella</i>         | 27                   | 50             | 50        | 1,0–1,1         |
| Alfafa          | <i>Medicago sativa</i>          | 5–10                 | 47             | 53        | 0,5–1,3         |

Fonte: (BULPIN, 1990; BUCKERIDGE, 2000).

Comercialmente, existem duas principais fontes de GM utilizadas em grandes quantidades pela indústria alimentícia. São elas a goma de sementes de guar (*Cyamopsis tetragonolobus*) com proporção Man:Gal de 62:38 e a goma de sementes de alfarroba (*Ceratonia siliqua*), também muito conhecida por *Locust Bean Gum* (LBG) com proporção variando de 77:23 a 81:19. Por questões econômicas, a goma guar tende a ser a opção mais utilizada. Estudos utilizando enzimas  $\alpha$ -galactosidase isoladas de sementes em germinação estão sendo utilizadas para produzir LBG de maneira industrial a partir de goma guar (BULPIN, 1990).

Investigando as espécies nativas brasileiras, uma de amplo interesse é a bracatinga (*Mimosa scabrella*), uma árvore nativa da região sul do Brasil, muito abundante no Paraná, que possui diversos usos como lenha, construção e mobiliário, pois tem rápido crescimento, além de se adaptar a solos relativamente pobres. Cada árvore produz anualmente cerca de 1 kg de sementes que geralmente são desperdiçadas (GANTER, 1997) Essas sementes são ricas em GM (cerca de 30% em peso seco) com proporção Man:Gal de 50:50 (KOOP, 2009), o que traz a essa GM características únicas como menor viscosidade específica (GANTER, 1992).

As propriedades comerciais, como a solubilidade em água e a capacidade de formar géis, das GM são derivadas de sua estrutura (relação Man:Gal). A cadeia principal formada de  $\beta$ -manose (4-ligadas) é relativamente rígida, conduzindo a soluções aquosas de elevada viscosidade. Quando a proporção de galactose é inferior a 30%, como na alfarroba, existe a formação de géis elásticos,

principalmente quando combinados com outros polissacarídeos como ágar e goma xantana, por exemplo. Esta propriedade também é utilizada para estabilizar sistemas multi-fases congelados, como sorvetes (BULPIN, 1990; KOOP, 2012). Entretanto a capacidade de elevar a viscosidade de soluções aquosas, explorada principalmente na indústria alimentícia, também é aproveitada pelas indústrias cosmética e farmacêutica, por promover estabilidade, textura e ainda atividade de controle de liberação de ativos (GANTER, 1992).

Para a produção de OS de galactomanana (GMOS) utiliza-se geralmente a enzima  $\beta$ -mananase isoladamente ou em combinação com a  $\alpha$ -galactosidase, dependendo do grau de substituição (MCCLEARY, 1983). Pode ainda ser utilizada a enzima específica galactomananase produzida por cepas de *Aspergillus niger* (CHANG, 2006). A hidrólise enzimática produz oligossacarídeos com GP variando entre 2–6, além dos monossacarídeos galactose e manose. Estudos iniciais mostram que a galactose está ligada a manobiose pela extremidade não redutora, enquanto na manotriose além de na extremidade não redutora, na unidade de manose central. Geralmente não se encontram unidades de galactose em manotetraose ou oligossacarídeos maiores (MCCLEARY, 1983).

## 8.2 ENZIMAS

### 8.2.1 *Aspergillus niger*

O fungo filamentosso *Aspergillus niger* é um dos mais importantes microorganismos utilizados na área biotecnológica. Seu uso está relacionado com a sua ampla capacidade de produção de diversas enzimas extracelulares e dos ácidos cítrico, glucônico e fumárico. A FDA (*Food and Drug Administration*) classifica o uso destes produtos de *A. niger* como GRAS (*Generally Recognized as Safe*), uma vez que dentre os fungos filamentosos ele geralmente não apresenta problemas com alergias e micopatologias, embora 3–10% das cepas possam produzir ocratoxina, relacionada com nefropatias (SCHUSTER, 2002).

Como outros fungos filamentosos, o *A. niger* pode ser encontrado no solo e em material orgânico em decomposição. É um organismos aeróbio que cresce em ampla faixa de temperatura (6–47 °C) e pH (1,4–9,8) além de baixa quantidade de água. A ampla distribuição da espécie está relacionada com a farta produção de esporos que são facilmente dissipados pelo ar (SCHUSTER, 2002). A tabela 13 traz a classificação deste micro-organismo.

TABELA 13 - CLASSIFICAÇÃO E CARACTERÍSTICAS DO FUNGO *Aspergillus niger*

| Classificação |                          | Características   |
|---------------|--------------------------|---|
| Reino         | Fungi                    |   |
| Filo          | Deuteromycota            | - Tipicamente micelar   |
| Classe        | Eurotimycetes            | - Talo micelal e septado ou unicelular  |
| Ordem         | Eurotiales               | - Produção de conídios em hifas separadas ou agregadas  |
| Família       | Trichomaceae             | - Micélio hialino contendo conidióforos livres  |
| Gênero        | <i>Aspergillus</i>       | - Conidióforos solitário e livres   |
| Espécie       | <i>Aspergillus niger</i> | - Micélio septado. Conidióforo ereto com terminais globosos dos quais emergem fiálides com conídios arredondados unicelulares de coloração negra, esverdeada ou amarela.<br>- Conídios globulosos de aspecto rugoso, com equinulações verdadeiras, coloração negra e medindo de 4-5 um de diâmetro. |

FONTÉ: (ROCHA, 2010)

O primeiro uso industrial do micro-organismo *A. niger* data de 1919, com a fermentação para produção de ácido cítrico, importante acidulante da indústria alimentícia além de diversos usos nas indústrias farmacêutica e cosmética (SCHUSTER, 2002).

A produção de enzimas por *A. niger*, tabela 14, também é bastante explorada e está relacionada com os substratos utilizados no meio de cultivo, sendo necessárias condições próximas às encontradas naturalmente no solo, ambiente nativo, para maiores produções, como por exemplo, cultivo em meio sólido (CASTILHO, 2000). A adição de silicatos em meio líquidos também mostra eficiência no aumento da produção de enzimas (DRIOUCH, 2010).

TABELA 14 - ENZIMAS PRODUZIDAS PELO *Aspergillus niger*

| Classe   | Enzima                                   | Substrato Primário | Produto            |
|----------|--|--------------------|--------------------|
| Lipases  | Fosfolipase                              | Fosfolipídeo       | Ácido Araquidónico |
| Celulase | Endo-Glucanase                           | Celulose           | Celodextrinas      |
|          | Exo-Glucanase ou Celobiohidrolase I e II | Celodextrinas      | Celobiose          |
|          | β - Glucosidase                          | Celobiose          | Glucose            |

Continuação Tabela 14

| Classe        | Enzima                                     | Substrato Primário               | Produto                           |
|---------------|--|----------------------------------|-----------------------------------|
| Proteases     | Peptidases                                 | Proteínas                        | ---                               |
| Hemicelulases | $\beta$ -Xilosidase                        | Xilobiose e XOS                  | Xilose                            |
|               | $\beta$ -Xilanase                          | Xilanas                          | xilose                            |
| Ligninase     | Lignina Peroxidase                         | Lignina                          | ---                               |
| Amilase       | Amiloglucosidase ou $\alpha$ -Glucoamilase | Amido (extremidade não redutora) | Glucose                           |
|               | $\alpha$ - Amilase                         | Amilopectina                     | Maltose e Dextrinas               |
| Pectinases    | Pectinesterases                            | Pectina                          | Pectato e metanol                 |
|               | Poli-galacturoases                         | Galacturonano                    | Ácido Galacturônico               |
|               | Pectoliase                                 | Galacturonano                    | Oligossacarídeos de Galacturonano |
| Carboidratos  | Arabinosidase                              | Arabinosídeos                    | Arabinose                         |
|               | $\beta$ -Glucanase                         | Glucana                          | Glucose                           |
|               | Galactosidase                              | Galacteosídeos                   | Galactose                         |
|               | Invertase                                  | Sacarose                         | Glucose e Frutose                 |
|               | Lactase                                    | Lactose                          | Glucose e Galactose               |
|               | Mannanase                                  | Mananas                          | Manose                            |
|               | Ramnosidade                                | Naringina                        | Ramnose                           |
|               | Catalase                                   | Peróxido de Hidrogênio           | Água e Oxigênio                   |
|               | Estearases                                 | Ésteres                          | álcool                            |
|               | Fitase                                     | Fitato                           | Mio-inositol e ácido ortofosfato  |
|               | Glucose oxidase                            | Glucose                          | Ácido Glucônico                   |
|               | $\alpha$ -Glucuronidases                   | Glucuronosídeo                   | Glucuronato e Álcool              |
|               | Tanase                                     | Taninos                          | Ácidos                            |

FONTE: (SCHUSTER, 2002; KANG, 2004; CHANG, 2006; NAGANAGOUDA, 2009; ROCHA, 2010; LI, 2012; DÍAZ-MALVÁEZ, 2013).

### 8.2.2 *Achatina fulica*

Conhecido erroneamente como caramujo gigante africano, o *Achatina fulica* Bowdich 1822, figura 21, é um molusco pulmonado terrestre, um caracol, enquanto os caramujos são moluscos aquáticos e respiram através de brânquias. O adulto tem cerca de 8 cm podendo atingir até 18 cm de concha, sendo esta marrom hachurada com tons mais claros, que variam de acordo com a dieta. É possível notar que as conchas geralmente possuem enrolamento dextral (sentido horário) (VAN WEEL, 1959; LEPAROUX, 1994; MAEDA, 1996).

Originário de margens de florestas no leste da África, *A. fulica* foi introduzido ilegalmente no Brasil, em 1988, no estado do Paraná em uma feira de Curitiba, visando fins culinários, como *escargot*. A falta de hábito do brasileiro no consumo deste alimento fez com que os criadores se desfizessem dos moluscos soltando-os

na natureza, sendo que em 1994 houve o primeiro registro de animais livres na região de Morretes e Antonina (Paraná). Por ser uma espécie exótica e não apresentar um predador natural no Brasil, *Achatina fulica* apresentou vantagem em relação às espécies locais, gerando um grave quadro de desequilíbrio ecológico. Em 2002 o molusco já havia se disseminado para todo litoral paranaense (FISCHER, 2008). Atualmente está presente em 24 estados trazendo impacto direto para biodiversidade local e riscos a saúde pública (FIOCRUZ, 2011).



FIGURA 21 - *Achatina fulica*  
FONTE: Adp. de imagens de domínio público

O molusco terrestre *A. fulica* se tornou uma espécie invasora e é considerada uma praga agrícola, pois possui hábitos alimentares generalistas, aliados ao elevado potencial reprodutivo e ao grande porte dos adultos, o que favorece a colonização em diferentes ambientes (COLLEY, 2009). Por esse motivo, um parecer técnico publicado pelo Ibama e pelo Ministério da Agricultura em 2003, 003/03, que trata sobre o controle e erradicação do molusco, considera ilegal a criação e comercialização da espécie (NEVES, 2003), reforçando a Portaria 102/98 do IBAMA de 1998, que regulamenta os criadouros de fauna exótica (IBAMA, 1998).

Quanto à saúde pública, a disseminação deste molusco é preocupante, pois ele é hospedeiro natural do parasita *Angiostrongylus cantonensis* que pode causar meningite eosinofílica, conhecida também por angiostrongilíase cerebral (GRAEFF-TEIXEIRA, 2007). Segundo levantamento do Instituto Oswaldo Cruz, a doença foi registrada pela primeira vez no Brasil em 2006 e desde então foram totalizados 34 casos, nos estados do Pernambuco, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul, sendo que um paciente foi a óbito. Por possuir sintomas similares aos apresentados pelos pacientes com meningites bacterianas ou virais, e possuir apenas tratamentos sintomático, o número de casos de meningite eosinofílica pode estar sendo sub-diagnosticados. Ainda neste levantamento,

verificou-se a presença de caracóis infectados em 11 estados, o que traz preocupação para as autoridades de saúde (MENEZES, 2014).

Dentre os métodos de controle e tentativa de erradicação do *Achatina fulica*, o mais eficaz é o controle físico, através da coleta manual dos moluscos (COLLEY, 2012). A opção popular para eliminar o caracol após a coleta é sal, entretanto, não é o adequado, porque seu uso em excesso prejudica o solo. O recomendado pelo IBAMA é que os moluscos devem ser esmagados, cobertos com cal virgem e enterrados. Outras opções são água fervente ou incineração, entretanto todas estas medidas devem ser feitas com segurança (THIENGO, 2007).

Apesar de todo problema causado e as inúmeras tentativas de conter a invasão do *A. fulica*, o conteúdo gastrointestinal pode ser aproveitado, pois é de extremo interesse biotecnológico por ser onde se encontram as diversas enzimas produzidas por este animal, tabela 15 (EZERONYE, 2001). Assim como ocorre com *A. niger*, *A. fulica* também expressa as enzimas de acordo com as condições de alimentação impostas (VAN WEEL, 1959; LEPAROUX, 1994). A ampla capacidade de produção enzimática permite o caracol alimentar-se de resíduos orgânicos diversos, como papel, papelão, isopor e plástico (FISCHER, 2008).

TABELA 15 - ENZIMAS DO SUCO GASTROINTESTINAL DO MOLUSCO *Achatina fulica*

| <b>Produto de Hidrólise</b> | <b>Enzima</b>                         |
|-----------------------------|---------------------------------------|
| N-acetil-D-Galactosamina    | $\beta$ - N - Acetilgalactosaminidase |
| N-acetil-D-Glucosamina      | $\beta$ - N - Acetilglucosaminidase   |
| Ácido Galacturônico         | Galacturonase                         |
| Ácido Glucurônico           | $\beta$ - Glucuronidase               |
| Arabionose                  | $\alpha$ - Arabinofuranosidase        |
| Celodextrinas               | Endo-Glucanase                        |
| Celobiose                   | Celobiohidrolase I e II               |
| Chitosana                   | chitosanase                           |
| Frutose                     | $\beta$ - Frutosidase                 |
| Fucose                      | $\beta$ - Fucosidase                  |
| Galactose                   | $\alpha$ - Galactosidase              |
|                             | $\beta$ - Galactosidase               |
| Glucose                     | $\beta$ - Glucanase                   |
|                             | $\alpha$ - Glucosidase                |
|                             | $\beta$ - Glucosidase                 |
| Manose                      | $\alpha$ - Manosidase                 |
|                             | $\beta$ - Manosidase                  |
| Ramnose                     | $\alpha$ - Ramnosidase                |
| Xilose                      | $\beta$ - Xilosidase                  |

FONTE: (LEPAROUX, 1994; MAEDA, 1996; EZERONYE, 2001; CARDOSO, 2012; SUN, 2012).

## 9 MATERIAL E MÉTODOS

### 9.1 ENZIMAS DE *Aspergillus niger*

#### 9.1.1 Micro-organismo

A cepa de *Aspergillus niger* ATCC® 1004 Lote T18/8B foi mantida em meio alternativo chamado de JDF (tabela 16) tendo o pH final ajustado para 5,5 com hidróxido de sódio ou ácido fosfórico. Após a esporulação a 30 °C, os tubos e placas foram mantidos em câmara fria (8 °C). A colônia foi mantida ativa através de repiques a cada 4 meses utilizando tampão fosfato de potássio 75 mmol pH 7,0 estéril como veículo.

TABELA 16 - COMPOSIÇÃO MEIO DE CULTIVO JDF

|   |                           |             |
|---|---------------------------|-------------|
| A | Ágar                      | 2% (m/v)    |
|   | Casaminoácidos            | 0,2% (m/v)  |
|   | Extrato de Levedura       | 0,1% (m/v)  |
| B | Fosfato diácido de amônio | 0,1% (m/v)  |
|   | Nitrato de Sódio          | 0,02% (m/v) |
|   | Sulfato de Potássio       | 0,02% (m/v) |
| C | Glucose                   | 2% (m/v)    |

Paralelamente *A. niger* foi cultivado em meio JDF substituindo glucose 2% (m/v) pelas seguintes fontes de carbono a 0,5% (m/v): pectina de laranja e cítrica, xiloglucana de tamarindo, hemicelulose total de bagaço de cana-de-açúcar e as gomas de alfarroba, guar, bracinga, karaya, gelana, arábica e xantana. O objetivo foi estimular a cepa a produzir enzimas específicas.

#### 9.1.2 Cultivo Líquido em Polissacarídeos

O cultivo para produção de enzimas se deu em 250 mL de meio líquido, descrito na tabela 17, utilizando como fonte de carbono os polissacarídeos de

interesse (gomas de alfarroba e guar, galactomanana de bracinga e pectina cítrica). Para evitar contaminação bacteriana, foi adicionado ao meio 30 mg/L (m/v) de amoxicilina. Foi utilizada uma solução de esporos em tampão fosfato de potássio 75 mmol/L como inóculo. O cultivo se deu durante 120 h a 35 °C em agitador-incubador na velocidade de 140 rpm (0,33 g) (*Gyrotory Water Bath Shaker; G76*). O meio total foi centrifugado a 8.000 rpm (21.460 g) por 30 min. O sobrenadante foi dialisado (membranas Spectra/Por® com poros de 3,5 µm), em água destilada gelada por 1 h, depois a água foi trocada e as amostras permaneceram mais 15 min. O material retido no saco de diálise foi então congelado, liofilizado e concentrado para testes posteriores das enzimas extracelulares. O micélio centrifugado foi re-suspenso em 50 mL de água destilada gelada e submetido a três turnos de 15 segundos de ultrassom com intervalos de um minuto entre cada. O material foi novamente centrifugado e o sobrenadante após liofilização foi utilizado para a avaliação de enzimas intracelulares.

TABELA 17 - COMPOSIÇÃO DE MEIO DE CULTIVO PARA INDUÇÃO DE ENZIMAS

|   |                           |             |
|---|---------------------------|-------------|
| A | Fonte de Carbono          | 0,25% (m/v) |
|   | Extrato de Malte          | 0,1% (m/v)  |
|   | Extrato de Levedura       | 0,2% (m/v)  |
| B | Casaminoácidos            | 0,2% (m/v)  |
|   | Fosfato diácido de amônio | 0,1% (m/v)  |
|   | Sulfato de Potássio       | 0,02% (m/v) |

Foi avaliada a alteração da produção enzimática com a adição de 8 g/L de silicato de magnésio (MgSiO<sub>3</sub>) com tamanho de partícula < 44 µm (mesh 325) no meio básico de cultivo utilizando a goma guar como fonte de carbono (DRIOUCH, 2010).

## 9.2 ENZIMAS DE *Achatina fulica*

Inicialmente alguns exemplares do molusco foram cedidos pela Dra. Marta Luciane Fischer e seu orientado, o biólogo Eduardo Colley (PUC-PR). Um lote mais volumoso de exemplares foi coletado nos arredores de Guaratuba-PR pelo Sr. Paschoal Pauletti (autorização de coleta do Sistema de Autorização e Informação

em Biodiversidade, SISBIO, do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade/ ICMBio nº 47576-1 bem como autorização alternativa expedida pelo Instituto Ambiental do Paraná/ IAP nº 13.473.491-4, ambas de Janeiro de 2015). Os caracóis foram alimentados *ad libitum* com alface molhada com solução de galactomananas 1% (m/v), durante 12 h com posterior jejum de 12 h. Após uma lavagem das carapaças calcáreas os moluscos foram classificados de acordo com o tamanho e a enzima bruta, do suco digestivo (SDAf), coletada dos animais considerados jovens (entre 3–6 cm) e adultos (>6 cm), mediante punção gastro-estomacal com uma seringa hipodérmica de agulha fina, figura 22. Após a sucção, todo conteúdo é imediatamente armazenado sob refrigeração.

Por se tratar de um invertebrado, não se faz necessária a aprovação da Comissão de Ética para uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

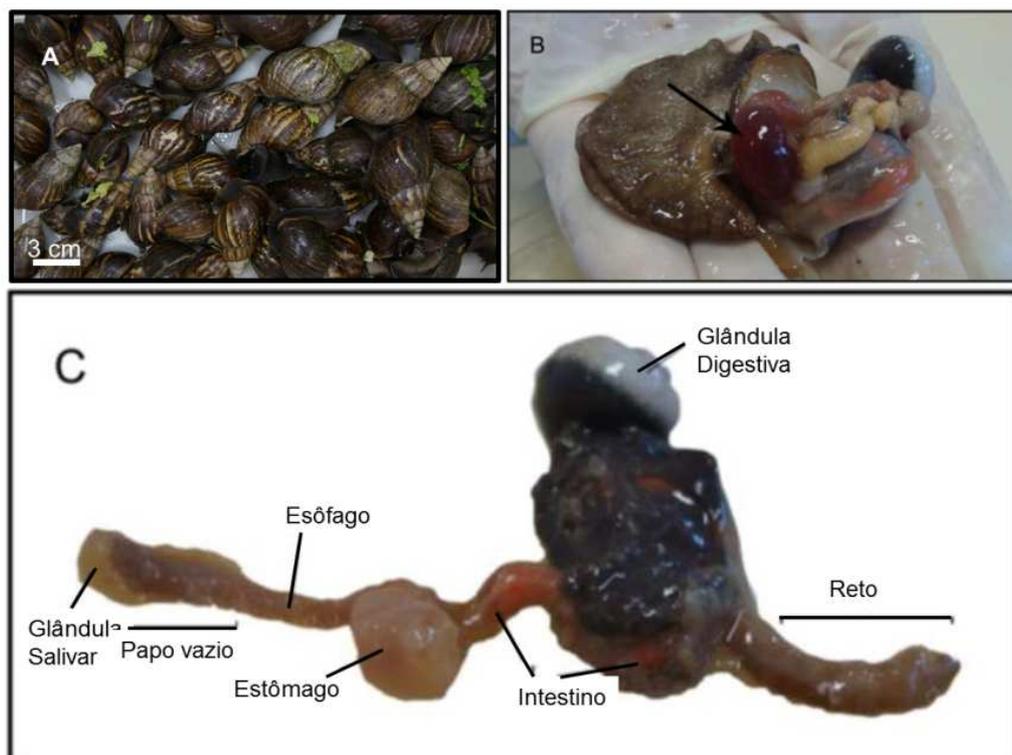


FIGURA 22 - SISTEMA DIGESTÓRIO DO *Achatina fulica*

NOTA: (A) *Achatina fulica*, (B) Sistema digestivo completo. A seta mostra o papo cheio. (C) Sistema Digestivo completo dissecado com as partes identificadas.

FONTE: (A) O autor, (B) e (C) (CARDOSO, 2012)

## 9.3 CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA

### 9.3.1 Determinação de Proteínas

A determinação de proteínas totais foi realizada pelo Método de Lowry (Folin-fenol Ciocalteau) (LOWRY, 1951). Em 200 µL de amostra adicionando 1 mL do reativo de Lowry que consiste na mistura recém preparada 50:1 (v/v) de uma solução de carbonato de sódio 2% (m/v) em hidróxido de sódio 0,1 mol/L e a solução de sulfato de cobre pentahidratado 0,5% (m/v) com tartarato de sódio e potássio 1% (m/v) em água destilada. Após agitação vigorosa e descanso de 15 minutos em temperatura ambiente, adiciona-se 100 uL da solução de Folin-fenol Ciocalteau 2 N/L recém diluída 1:1 (v/v) com água destilada, agita-se vigorosamente e após 30 minutos lê-se a absorbância em 750 nm. Como as amostras continham interferentes, como o restante dos polissacarídeos não consumidos, foi necessário realizar a precipitação das proteínas para o teste de Lowry. A amostra foi diluída 1:1 (v/v) com ácido tricloroacético (TCA) 20%, agitada vigorosamente e centrifugada por 15 minutos à 13.000 rpm (14.360 g). O precipitado foi ressuspenso no volume original da amostra e o sobrenadante foi re-precipitado com 8–10 volumes de acetona sob forte refrigeração (-20 °C) durante 2 h. As amostras foram centrifugadas por 30 min a 3.000 rpm (2.010 g), o sobrenadante contendo acetona foi descartado e o precipitado foi deixado sob ventilação para completa remoção da acetona residual. Após esse processo, as amostras foram ressuspenso em água destilada equivalente ao volume original utilizado. A determinação de proteínas foi realizada em ambos os precipitados separadamente e a quantidade de proteínas totais foi a somatória dos resultados.

O cálculo para a quantidade proteínas (µg/mL) foi realizado a partir da equação da reta gerada através de curva analítica da correlação entre a absorbância e os µg/mL de proteína presente na amostra, em triplicata, contendo treze pontos de padrão de albumina bovina (10–1500 ug/mL), com  $R^2 > 0,99$ .

### 9.3.2 Teste *P*-nitrofenil-glicosídeo de Atividade Enzimática

Para a determinação da atividade enzimática nas amostras foi utilizado 0–175 µL destas com 125 µL de solução 4 mmol/L de *p*-nitrofenil-glicosídeo, conforme tabela 18. Foi adicionada 200 µL de tampão acetato 100 mmol/L, pH 4,5, e o volume final foi acertado para 500 µL com água destilada. Após 10 minutos na temperatura de 50 °C a reação foi interrompida com a adição de 500 µL de carbonato de sódio 100 mmol/L.

A determinação da atividade enzimática se dá por leitura em espectrofotômetro para o *P*-nitrofenol (*PNF*) liberado, mensurado em 410 nm. Os valores de absorvância foram comparados com uma curva padrão de *PNF*, onde uma unidade de atividade enzimática (*U*) é definida como a quantidade da enzima necessária para liberar 1 µmol de *PNF* por minuto (GÜRKÖK, 2010; COURA, 2012). Já a atividade específica (*U*/mg) das enzimas é definida como a quantidade de µmol de *PNF* liberado por mg de proteínas totais.

TABELA 18 - SUBSTRATOS PARA A DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE ENZIMAS ALVO

| <b>Enzima Alvo</b> | <b><i>P</i>-nitrofenil-glicosídeo</b>      |
|--------------------|--|
| α - Arabinosidase  | <i>P</i> -nitrofenil-α-L-Arabinofuranose   |
| α - Galactosidase  | <i>P</i> -nitrofenil-α-D-Galactopiranosose |
| β - Glucosidase    | <i>P</i> -nitrofenil-β-D-Glucopiranosose   |
| β - Manosidase     | <i>P</i> -nitrofenil-β-D-Manopiranosose    |
| β - Xilosidase     | <i>P</i> -nitrofenil-β-D-Xilopiranosose    |

O valor de *U* pode ser calculado pela lei de Lambert-Beer, que leva em conta o coeficiente de absorvância molar da substância, por pode ser obtido pela leitura da absorvância de uma amostra com concentração conhecida (CUSTODIO, 2000).

$$A = \varepsilon . l . c$$

#### EQUAÇÃO 1 - LEI DE LAMBERT- BEER

Nota: onde (*A*) é a absorvância, ( $\varepsilon$ ) é o coeficiente de absorvância molar (µmol/cm), (*l*) é a distância que a luz atravessa pela cubeta (cm), (*c*) é a concentração da substância absorvente no meio (µmol/L)

Isolando a concentração e adaptando a fórmula para incluir a diluição da amostra original e o tempo de incubação, pode-se calcular o U das amostras pela seguinte fórmula.

$$U = \frac{A \cdot \frac{1}{v}}{\varepsilon \cdot l \cdot t}$$

EQUAÇÃO 2 - EQUAÇÃO DE LAMBERT- BEER ADAPTADA PARA CÁLCULO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA

NOTA: onde ( $v$ ) é o volume da amostra (mL) e o ( $t$ ) o tempo de incubação (min).

### 9.3.3 Método de Determinação de Atividade Enzimática com Substratos Polissacarídicos

Para a determinação da atividade enzimática frente a polissacarídeos, as amostras contendo enzimas foram avaliadas quanto ao poder hidrolítico frente aos substratos: gomas de alfarroba e guar, galactomanas de bracinga, pectina cítrica e hemiceluloses de bagaço de cana e *Pinus Taeda*. A hidrólise ocorreu por 24 h (35 °C/ 140 rpm; 0,33 g), contendo 800 µL de substrato 6,25 mg/mL, 25 µL de tampão citrato 1 mol/L pH 5,0 e quantidade de enzima equivalente a 200 µg de proteínas. O volume final foi acertado para 1 mL com água destilada.

Foram coletados 100 µL de amostra nos tempos 2, 8 e 24 h, as quais foi adicionados 400 µL de etanol absoluto, agitado vigorosamente e centrifugada por 15 min a 13.000 rpm (14.360 g). Do sobrenadante, foi coletado 400 µL que foram secos em concentrador de amostras (Labconco CentriVap Concentrator) a 40 °C sob vácuo por 2:30 h. As amostras foram re-suspensas em 40 µL de solução etanol:água 1:1 (v/v), as quais foram utilizadas para realização da CCD segundo item 4.1.3, utilizando volume conhecido de amostras.

Com o restante do hidrolisado de 24 h, foi realizada a determinação dos açúcares redutores, segundo método do DSN miniaturizado, explicado no item 4.1.1

#### 9.3.4 Otimização da Hidrólise Enzimática para obtenção de Oligossacarídeos

Para a produção otimizada de oligossacarídeos foram realizadas hidrólises enzimáticas utilizando substratos polissacarídicos (gomas de alfarroba e guar, galactomanas de bracinga) nas mesmas condições anteriormente utilizadas (24 h/ 35 °C/ 140 rpm; 0,33 g) utilizando 200 µg de proteínas das enzimas de *A. niger* induzidas por goma guar (extracelular) ou o SDAf, suplementadas com 25, 50 ou 75% de enzimas de *A. niger* induzidas por alfarroba (extracelular). As amostras foram coletadas nos tempos 2, 8 e 24 h e foram processadas conforme descrito no item 9.3.3.

## 10 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 10.1 ENZIMAS DE *Aspergillus niger*

O cultivo do *Aspergillus niger* ATCC 1004 realizado em meio JDF mostrou esporulação em até 96 h, como pode ser visto na figura 23.

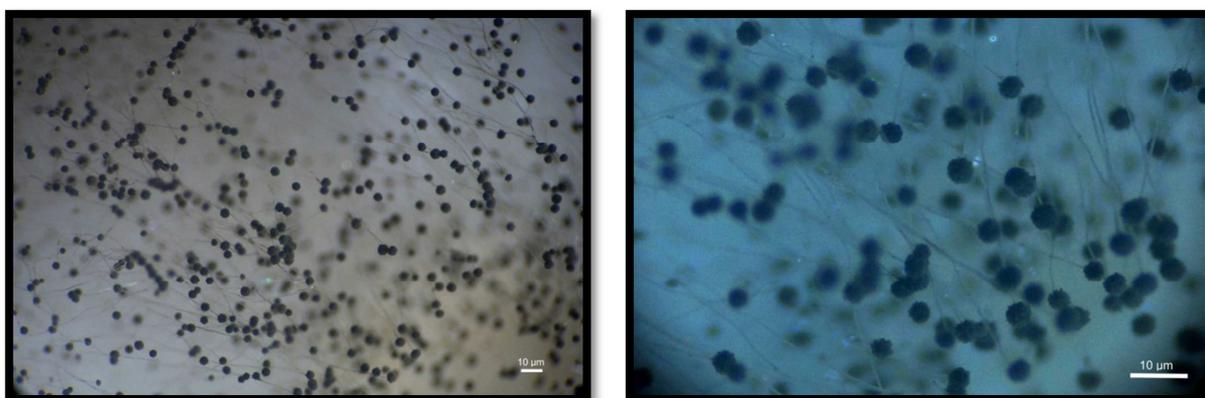


FIGURA 23 - ASPECTO GERAL DO MICÉLIO ESPORULADO DE *Aspergillus niger*  
NOTA: Micélio crescido em meio padrão JDF.

Com objetivo de buscar enzimas para a produção de OS, *A. niger* foi cultivado em meios contendo pectina de laranja e cítrica, xiloglucana de tamarindo, hemicelulose total de bagaço de cana-de-açúcar e as gomas de alfarroba, guar, karaya, gelana, arábica e xantana. Houve crescimento em todas as fontes alternativas de carbono, sendo que em 96h os que apresentaram maior quantidade aparente de esporos foram: pectina cítrica e de laranja, goma karaya e xiloglucana de tamarindo. A formação de esporos, que segue à maturação da massa micelial, indicou o crescimento fúngico nestes substratos polissacarídicos por sua vez a produção das enzimas necessárias à hidrólise, no caso as pectinases, mananases, galactases, hemicelulases, entre outras.

Essa seleção de substratos serviu como pré-adaptação do micro-organismo já que *A. niger* mostrou possuir ampla capacidade de sintetizar enzimas de interesse capazes de clivar os mais diversos polissacarídeos para a produção de oligossacarídeos a partir de diversas destas fontes.

### 10.1.1 Cultivo Líquido em Polissacarídeos

No cultivo para produção de enzimas, primeiramente foi verificada a pureza do micro-organismo através de análise microscópica do micélio obtido, como pode ser observado na figura 24, para amostras utilizando como fonte de carbono goma guar, com e sem a adição do  $MgSiO_3$ .

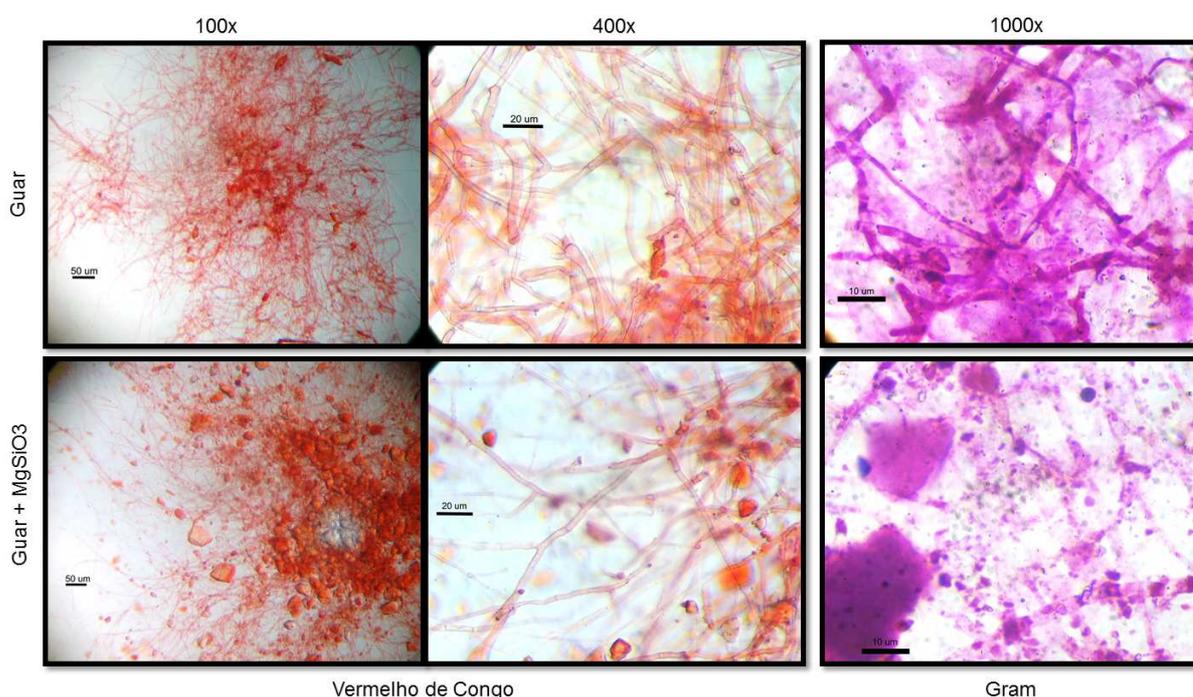


FIGURA 24 - ANÁLISE MICROSCÓPICA DO MICÉLIO DE *Aspergillus niger*

NOTA: O aumento utilizado está descrito sobre as imagens enquanto os corantes utilizados estão indicados abaixo.

Como descrito por diversos autores, *A. niger*, cultivado em meio líquido com agitação, cresce formando *pellets* de hifas (massa micelial emaranhada), como pode ser visualizado no menor aumento (100x) da figura 24, independente da presença do silicato. O tamanho e densidade de hifas por *pellet* está diretamente relacionado com a velocidade de agitação, que pode reduzir o crescimento celular e a produção de enzimas caso seja muito extrema (AMANULLAH, 2000; AMADI, 2013).

A utilização de  $MgSiO_3$  visa a redução da densidade dos *pellets*, propiciando o aumento na produção enzimática (DRIOUCH, 2010). Entretanto aeradores nos sistemas podem funcionar com o mesmo objetivo (KRULL, 2013).

O cultivo, a 150 rpm (0,38 g), mostrou a formação de *pellets* pequenos de 150–200  $\mu\text{m}$  e aparentando baixa densidade, tanto que a adição do silicato não modificou o tamanho médio dos agregados de hifas. Pelo contrário, analisando o peso seco das células liofilizadas após ultrassom e centrifugação, observando o gráfico 32, observou-se que o menor crescimento se deu com a adição do silicato, enquanto a goma de Guar apresentou o segundo maior crescimento, ficando atrás somente da pectina cítrica.

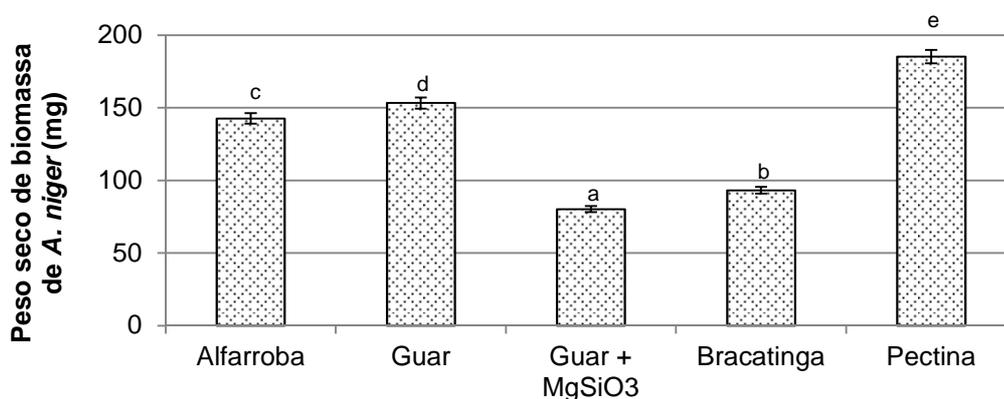


GRÁFICO 32 - PESO SECO DE BIOMASSA DE *Aspergillus niger* POR SUBSTRATO INDUTOR  
NOTA: As letras sobrescritas indicam as diferenças por teste Tukey ( $\alpha=0,05$ ) entre as amostras.

## 10.2 CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA

### 10.2.1 Determinação de Proteínas

A determinação de proteínas foi realizada pelo método de Lowry (Folin-fenol Ciocalteu) (LOWRY, 1951), devido às vantagens obtidas com essa técnica. O teste com biureto é pouco sensível e requer grande quantidade de amostras, enquanto o teste de Bradford é capaz de detectar proteínas com mais de nove ligações peptídicas (o método de Lowry detecta a partir de três ligações). Entretanto, por conta do risco de falso positivo dada a presença de carboidratos (MIWA, 2003), optou-se por realizar a dupla precipitação, primeiramente com ácido TCA 20% (m/v): amostra 1:1 (v/v) e centrifugação, e segunda precipitação com o sobrenadante

adicionado de 8-10 volumes de acetona e frio intenso por ao menos 2 h. Os resultados estão apresentados na tabela 19, juntamente com o peso seco (mg/mL) dos meio liofilizados após centrifugação das células.

TABELA 19 - PESO SECO E DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS

|   | Amostras     | Peso seco<br>mg/mL        | µg/mL de proteína                     |  | Total                                 | % proteína<br>(peso seco)   |       |
|---|--------------|---------------------------|---------------------------------------|--|---------------------------------------|-----------------------------|-------|
|   |              |                           | TCA 20%                               | Acetona + frio                         |                                       |                             |       |
| Enzimas de <i>A. niger</i> induzidas por: | Extracelular | Alfarroba                 | 2,60 (±0,07) <sup>g</sup>             | 31,63 (±3,06) <sup>a</sup>             | 98,08 (2,22) <sup>d</sup>             | 129,71 (±2,4) <sup>d</sup>  | 4,99  |
|   |              | Guar                      | 2,30 (±0,06) <sup>f</sup>             | 28,11 (±2,18) <sup>a</sup>             | 71,17 (3,26) <sup>c</sup>             | 99,28 (±2,9) <sup>b</sup>   | 4,32  |
|   |              | Guar + MgSiO <sub>3</sub> | 3,32 (±0,08) <sup>h</sup>             | 33,75 (±9,39) <sup>a</sup>             | 74,88 (5,68) <sup>c</sup>             | 108,64 (±6,8) <sup>c</sup>  | 3,27  |
|   |              | Bracatinga                | 2,26 (±0,06) <sup>f</sup>             | 23,92 (±1,33) <sup>a</sup>             | 71,57 (0,53) <sup>c</sup>             | 95,49 (±0,7) <sup>a,b</sup> | 4,23  |
|   |              | Pectina                   | 6,00 (±0,03) <sup>i</sup>             | 32,13 (±4,69) <sup>a</sup>             | 56,53 (±2,10) <sup>b</sup>            | 88,67 (±3,0) <sup>a</sup>   | 7,39  |
|   | Intracelular | Alfarroba                 | 0,73 (±0,02) <sup>b</sup>             | 126,11 (2,55) <sup>d</sup>             | 59,17 (8,25) <sup>b</sup>             | 185,28 (4,4) <sup>f</sup>   | 25,38 |
|   |              | Guar                      | 1,47 (±0,01) <sup>e</sup>             | 160,00 (2,50) <sup>e</sup>             | 59,58 (0,59) <sup>b</sup>             | 219,58 (2,0) <sup>h</sup>   | 14,94 |
|   |              | Guar + MgSiO <sub>3</sub> | 0,55 (±0,04) <sup>a</sup>             | 73,33 (1,44) <sup>b</sup>              | 25,42 (1,27) <sup>a</sup>             | 98,75 (1,4) <sup>b</sup>    | 17,96 |
|   |              | Bracatinga                | 1,10 (±0,02) <sup>d</sup>             | 91,39 (5,36) <sup>c</sup>              | 52,08 (0,59) <sup>b</sup>             | 143,47 (3,6) <sup>e</sup>   | 13,40 |
|   |              | Pectina                   | 0,87 (±0,01) <sup>c</sup>             | 169,72 (3,47) <sup>e</sup>             | 32,50 (3,54) <sup>a</sup>             | 202,22 (3,5) <sup>g</sup>   | 23,24 |
|   | SDAf**       | ---                       | 63.055,56<br>(±6.028,48) <sup>f</sup> | 139.166,67<br>(±6.548,43) <sup>e</sup> | 202.222,22<br>(±6.386,3) <sup>i</sup> | ---                         |       |

\*\* SDAf – Suco Digestivo do *Achatina fulica*

NOTA: Cultivo com volume total de 250 mL, sendo as enzimas extracelulares com volume total de 250 mL de meio e as intracelulares de 50 mL. Letras sobrescritas indicam diferença estatística das amostras segundo teste Tukey ( $\alpha=0,05$ ) por coluna

Houve diferenças nos valores de proteínas quando considera-se a inclusão no meio de cultivo do silicato de magnésio (MgSiO<sub>3</sub>). Segundo a literatura, pequenas unidades na quantidade de até 10 g/L seriam capazes de aumentar a liberação de enzimas (DRIOUCH, 2010). Ao considerar a resposta em porcentagem de proteína presente no peso seco do meio de cultivo, é uma verdade, pois para as enzimas extracelulares o aumento foi de 0,96% ( $p=0,0032$ ) e para as intracelulares foi de 3,02% ( $p=0,0110$ ). Entretanto se considerarmos o total de proteínas por mL do cultivo original, por teste t de *student* houve equivalência ( $p=0,0948$ ) para os valores das enzimas extracelulares e para as intracelulares o silicato pareceu prejudicar a liberação das enzimas, pois houve queda na produção ( $p<0,0001$ ), não correspondendo à expectativa.

A alta taxa de precipitação de proteínas na segunda etapa da purificação, com a acetona, principalmente para as enzimas de origem extracelular, pode ser explicada pela presença de glicoproteínas, mais solúveis, portanto não precipitando na presença do TCA 20% (m/v). Para confirmação foi realizado o teste do fenol

sulfúrico (item 4.1.2) para determinação de açúcares totais. No gráfico 33 estão apresentados os resultados e se vê claramente que os maiores resultados ( $\mu\text{g/mL}$ ) (calculados com uma curva analítica mista de hexose, manose, e pentose, xilose, com amostras lidas em absorvância 480 nm), estão nas amostras de enzimas extracelulares precipitadas com acetona, confirmando a presença das glicoproteínas.

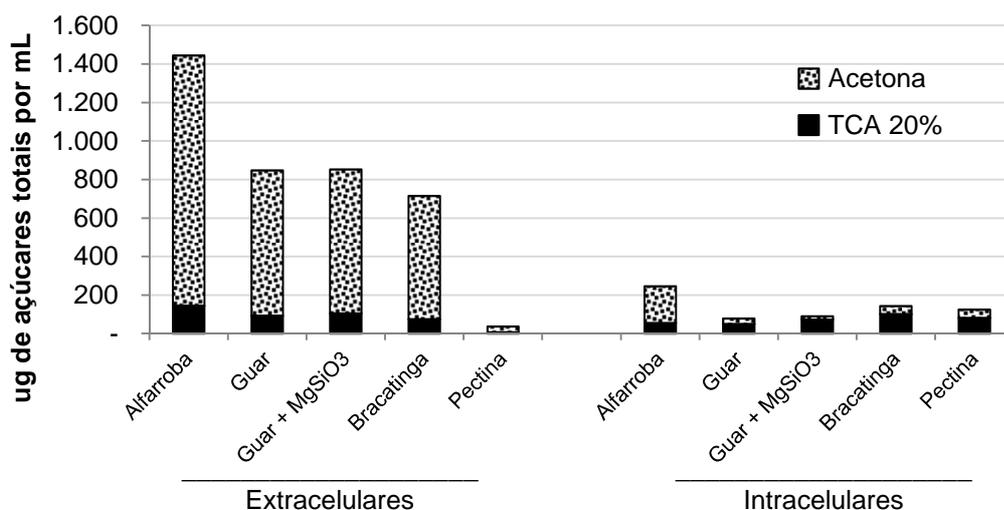


GRÁFICO 33 - AÇÚCARES TOTAIS PRESENTES NAS AMOSTRAS DE ENZIMAS DE *A. niger* OBTIDAS ATRAVÉS DE CULTIVO COM DIFERENTES SUBSTRATOS INDUTORES.

NOTA: Valor de açúcares totais nas amostras precipitadas para a determinação de proteínas.

Do mesmo modo ocorreu com o SDAf, entretanto este apresentou 25,51 ( $\pm 2,28$ ) mg/mL de ácucares totais. Porém, por possuir também alta concentração proteica, houve a necessidade da utilização destas amostras em altas diluições (1:100-1:1000), enquanto para as enzimas de *A. niger*, o material teve de ser concentrado.

#### 10.2.2 Teste cromogênico com *P*-nitrofenil-glicosídeos

Em um primeiro momento, foi avaliado se o tempo de incubação sugerido na literatura (GÜRKÖK, 2010; COURA, 2012), era adequado para que a resposta obtida ainda não estivesse na região de platô, quando o esgotamento do substrato já

está limitando a reação. Essa avaliação foi feita devido ao tempo interferir diretamente no cálculo da atividade enzimática (U), e foi realizada com os substratos *PNF-β-D-glucopiranosose* (gráfico 34) e *PNF-β-D-xilopiranosose* (gráfico 35) utilizando a enzima  $\beta$ -glucosidase (BGL) comercial. Esses substratos foram os escolhidos por possuírem, respectivamente, alta e baixa atividade com a enzima avaliada e possuírem uma hexose e pentose, respectivamente nas respectivas porções glicona.

Para o substrato *PNF-β-D-glucopiranosose*, gráfico 34, a atividade enzimática da enzima BGL comercial é muito alta, cerca de  $550 \times 10^3$  U, já que sua atividade específica é hidrolisar celobiose em glucose livre. Dessa forma, percebe-se que o substrato passa a ser limitante e a partir de 17 min ocorre a formação de um platô dos valores de absorbância, enquanto os valores de U caem bruscamente à medida que o tempo aumenta (Já que o valor de U leva em conta o tempo de hidrólise).

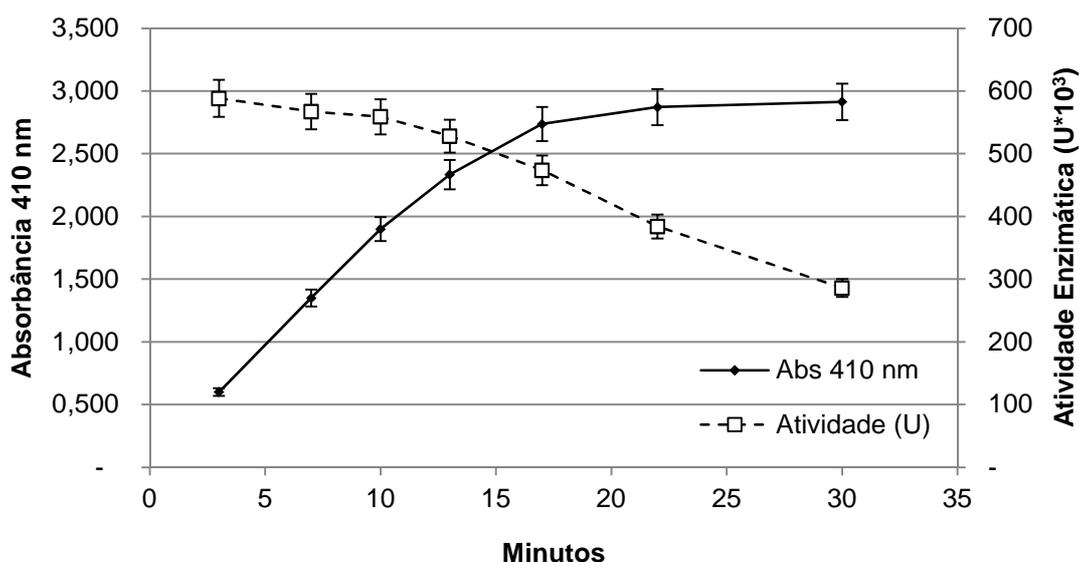


GRÁFICO 34 - VARIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM FUNÇÃO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO PARA O SUBSTRATO *P-NITROFENIL-β-D-GLUCOPIRANOSÍDEO* COM A ENZIMA  $\beta$ -GLUCOSIDASE

Já para o substrato *PNF-β-D-xilopiranosose*, gráfico 35, a atividade enzimática da enzima BGL comercial é baixa, cerca de  $6,5 \times 10^3$  U, portanto o substrato não se torna limitante. A não ocorrência de um platô também indica que a temperatura de incubação (50 °C) não está desnaturando as proteínas e reduzindo a atividade enzimática em função do tempo. É interessante observar que em tempo muito curtos de incubação, de 3 e 7 minutos a leitura de absorbância < 0,2 poderia estar

prejudicando os cálculos posteriores, indicando estar fora que a o *PNF* liberado pode estar em quantidade inferior a sensibilidade do método.

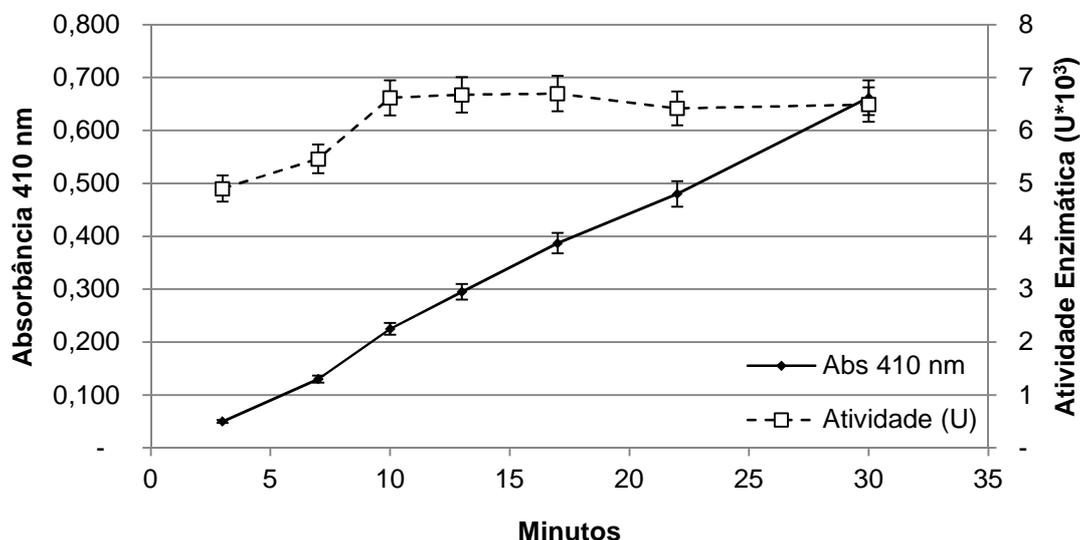


GRÁFICO 35 - VARIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM FUNÇÃO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO PARA O SUBSTRATO *p*-NF- $\beta$ -D-XILOPIRANOSÍDEO COM A ENZIMA  $\beta$ -GLUCOSIDASE

Com base nestes resultados o tempo de incubação sugerido na literatura, de 10 min, foi aceito como o de escolha, bem como a temperatura de 50 °C. Também foram utilizadas soluções das enzimas teste suficiente para que durante a realização dos testes, a leitura final de absorbância fosse maior que 0,2.

Foram testados adicionalmente os substratos: *PNF*- $\alpha$ -L-arabinofuranose, *PNF*- $\alpha$ -D-galactopiranosídeo, *PNF*- $\beta$ -D-glucopiranosídeo, *PNF*- $\beta$ -D-manopiranosídeo e *PNF*- $\beta$ -D-xilopiranosídeo. Os testes utilizando estes *PNF*-glicosídeos para a caracterização de amostras desconhecidas indica a atividade principalmente de enzimas capazes de hidrolisar dissacarídeos, não sendo excludente a posterior atividade frente a polissacarídeos no caso resultados com baixa atividade enzimática. Portanto, foram avaliadas as atividades:  $\alpha$ -arabinosidase,  $\alpha$ -galactosidase,  $\beta$ -glucosidase,  $\beta$ -manosidase e  $\beta$ -xilosidase, respectivamente.

Na tabela 20 estão apresentadas as respostas de atividade enzimática em U/mL do meio, no caso das enzimas extracelulares (volume total = 250 mL) e das enzimas intracelulares (volume total = 50 mL). O SDAf foi avaliado na sua forma nativa, um *pool* de enzimas coletado diretamente do TGI do molusco *A. fulica*.

TABELA 20 - ATIVIDADE ENZIMÁTICA PELO TESTE DO P-NITROFENIL-GLUCOSÍDEO

|   | Amostra      | Atividade Enzimática (U/mL)            |                                       |   |  |                                       |                                    |
|---|--------------|--|---------------------------------------|---|--|---------------------------------------|------------------------------------|
|   |              | $\alpha$ - Arabinosidase               | $\alpha$ - Galactosidase              | $\beta$ - Glucosidase                     | $\beta$ - Manosidase                       | $\beta$ - Xilosidase                  |                                    |
| Enzimas de <i>A. niger</i> induzidas por: | Extracelular | Alfarroba                              | 4,71 ( $\pm 0,21$ ) <sup>d</sup>      | 365,84 ( $\pm 7,23$ ) <sup>i</sup>        | 205,42 ( $\pm 10,67$ ) <sup>b</sup>        | 7,97 ( $\pm 0,39$ ) <sup>f</sup>      | 6,74 ( $\pm 0,19$ ) <sup>c,d</sup> |
|   |              | Guar                                   | 8,50 ( $\pm 0,31$ ) <sup>e</sup>      | 235,32 ( $\pm 2,16$ ) <sup>c</sup>        | 179,97 ( $\pm 1,46$ ) <sup>a</sup>         | 4,85 ( $\pm 0,14$ ) <sup>d</sup>      | 7,00 ( $\pm 0,18$ ) <sup>d</sup>   |
|   |              | Guar + MgSiO <sub>3</sub>              | 2,84 ( $\pm 0,13$ ) <sup>a,c</sup>    | 257,59 ( $\pm 10,50$ ) <sup>c,d</sup>     | 216,56 ( $\pm 7,80$ ) <sup>b</sup>         | 3,72 ( $\pm 0,16$ ) <sup>c</sup>      | 4,29 ( $\pm 0,10$ ) <sup>a</sup>   |
|   |              | Bracatinga                             | 2,07 ( $\pm 0,06$ ) <sup>a,b</sup>    | 152,75 ( $\pm 8,08$ ) <sup>a</sup>        | 174,95 ( $\pm 2,77$ ) <sup>a</sup>         | 2,77 ( $\pm 0,04$ ) <sup>a</sup>      | 5,48 ( $\pm 0,20$ ) <sup>b</sup>   |
|   |              | Pectina                                | 14,49 ( $\pm 0,33$ ) <sup>g</sup>     | 182,40 ( $\pm 1,84$ ) <sup>b</sup>        | 357,84 ( $\pm 3,96$ ) <sup>d</sup>         | 4,37 ( $\pm 0,15$ ) <sup>d</sup>      | 7,97 ( $\pm 0,19$ ) <sup>e</sup>   |
|   | Intracelular | Alfarroba                              | 3,10 ( $\pm 0,15$ ) <sup>c</sup>      | 330,35 ( $\pm 7,99$ ) <sup>e</sup>        | 215,29 ( $\pm 5,06$ ) <sup>b</sup>         | 6,10 ( $\pm 0,19$ ) <sup>e</sup>      | 5,97 ( $\pm 0,54$ ) <sup>b,c</sup> |
|   |              | Guar                                   | 10,39 ( $\pm 0,20$ ) <sup>f</sup>     | 310,35 ( $\pm 12,98$ ) <sup>e</sup>       | 303,69 ( $\pm 6,76$ ) <sup>c</sup>         | 9,71 ( $\pm 0,03$ ) <sup>g</sup>      | 10,69 ( $\pm 0,22$ ) <sup>f</sup>  |
|   |              | Guar + MgSiO <sub>3</sub>              | 1,61 ( $\pm 0,09$ ) <sup>a</sup>      | 468,39 ( $\pm 3,19$ ) <sup>g</sup>        | 298,20 ( $\pm 11,34$ ) <sup>c</sup>        | 3,14 ( $\pm 0,05$ ) <sup>a,b</sup>    | 5,76 ( $\pm 0,25$ ) <sup>b</sup>   |
|   |              | Bracatinga                             | 2,67 ( $\pm 0,02$ ) <sup>a,c</sup>    | 180,71 ( $\pm 4,08$ ) <sup>b</sup>        | 209,73 ( $\pm 5,11$ ) <sup>b</sup>         | 3,36 ( $\pm 0,10$ ) <sup>b,c</sup>    | 5,96 ( $\pm 0,10$ ) <sup>b</sup>   |
|   |              | Pectina                                | 15,15 ( $\pm 0,68$ ) <sup>g</sup>     | 277,41 ( $\pm 13,31$ ) <sup>d</sup>       | 511,29 ( $\pm 15,64$ ) <sup>e</sup>        | 6,45 ( $\pm 0,30$ ) <sup>e</sup>      | 11,48 ( $\pm 0,37$ ) <sup>g</sup>  |
| SDAf**                                    |              | 2.345,10 ( $\pm 106,75$ ) <sup>h</sup> | 3.294,12 ( $\pm 58,22$ ) <sup>h</sup> | 66.143,79 ( $\pm 2.678,56$ ) <sup>f</sup> | 113.647,06 ( $\pm 3.529,41$ ) <sup>h</sup> | 2.341,74 ( $\pm 77,63$ ) <sup>h</sup> |                                    |

\* Letras sobrescritas indicam diferença estatística das amostras segundo teste Tukey ( $\alpha=0,05$ ) por atividade enzimática. \*\* SDAf – Suco Digestivo do *Achatina fulica*

TABELA 21 - ATIVIDADE ESPECÍFICA PELO TESTE DO P-NITROFENIL-GLUCOSÍDEO

|   | Amostra                             | Atividade Específica (U/ mg de proteína)  |                                     |                                       |   |                                     |                                     |
|---|-------------------------------------|---|-------------------------------------|---------------------------------------|---|-------------------------------------|-------------------------------------|
|   |                                     | $\alpha$ - Arabinosidase                  | $\alpha$ - Galactosidase            | $\beta$ - Glucosidase                 | $\beta$ - Manosidase                    | $\beta$ - Xilosidase                |                                     |
| Enzimas de <i>A. niger</i> induzidas por: | Extracelular                        | Alfarroba                                 | 36,32 ( $\pm 1,60$ ) <sup>d</sup>   | 2.820,39 ( $\pm 55,75$ ) <sup>g</sup> | 1.583,65 ( $\pm 82,24$ ) <sup>d</sup>   | 61,45 ( $\pm 3,03$ ) <sup>f</sup>   | 51,92 ( $\pm 1,50$ ) <sup>d,e</sup> |
|   |                                     | Guar                                      | 85,58 ( $\pm 3,08$ ) <sup>g</sup>   | 2.370,20 ( $\pm 21,73$ ) <sup>f</sup> | 1.812,70 ( $\pm 14,69$ ) <sup>e</sup>   | 48,85 ( $\pm 1,44$ ) <sup>e</sup>   | 70,55 ( $\pm 1,80$ ) <sup>g</sup>   |
|   |                                     | Guar + MgSiO <sub>3</sub>                 | 26,19 ( $\pm 1,20$ ) <sup>c</sup>   | 2.371,12 ( $\pm 96,67$ ) <sup>f</sup> | 1.993,41 ( $\pm 71,76$ ) <sup>f</sup>   | 34,24 ( $\pm 1,51$ ) <sup>c</sup>   | 39,51 ( $\pm 0,93$ ) <sup>c</sup>   |
|   |                                     | Bracatinga                                | 21,67 ( $\pm 0,63$ ) <sup>b,c</sup> | 1.599,72 ( $\pm 84,67$ ) <sup>c</sup> | 1.832,23 ( $\pm 29,00$ ) <sup>e,f</sup> | 29,01 ( $\pm 0,37$ ) <sup>b</sup>   | 57,44 ( $\pm 2,10$ ) <sup>f</sup>   |
|   |                                     | Pectina                                   | 163,41 ( $\pm 3,78$ ) <sup>h</sup>  | 2.057,14 ( $\pm 20,70$ ) <sup>e</sup> | 4.035,74 ( $\pm 44,62$ ) <sup>i</sup>   | 49,28 ( $\pm 1,74$ ) <sup>e</sup>   | 89,92 ( $\pm 2,11$ ) <sup>h</sup>   |
|   |                                     | Enzimas de <i>A. niger</i> induzidas por: | Intracelular                        | Alfarroba                             | 16,75 ( $\pm 0,82$ ) <sup>a,b</sup>     | 1.782,99 (43,10) <sup>d</sup>       | 1.161,99 (27,33) <sup>b</sup>       |
| Guar                                      | 47,30 ( $\pm 0,93$ ) <sup>e</sup>   |   |                                     | 1.413,39 (59,10) <sup>b</sup>         | 1.383,03 (30,80) <sup>c</sup>           | 44,24 (0,15) <sup>d</sup>           | 48,68 (1,00) <sup>d</sup>           |
| Guar + MgSiO <sub>3</sub>                 | 16,34 ( $\pm 0,90$ ) <sup>a,b</sup> |   |                                     | 4.743,21 (32,35) <sup>h</sup>         | 3.019,71 (114,87) <sup>h</sup>          | 31,77 (0,52) <sup>b,c</sup>         | 58,32 (2,58) <sup>f</sup>           |
| Bracatinga                                | 18,59 ( $\pm 0,14$ ) <sup>b</sup>   |   |                                     | 1.259,54 (28,45) <sup>b</sup>         | 1.461,81 (35,64) <sup>c,d</sup>         | 23,43 (0,70) <sup>a</sup>           | 41,55 (0,72) <sup>c</sup>           |
| Pectina                                   | 74,91 ( $\pm 3,36$ ) <sup>f</sup>   |   |                                     | 1.371,83 (65,82) <sup>b</sup>         | 2.528,41 (77,34) <sup>g</sup>           | 31,91 (1,48) <sup>b,c</sup>         | 56,79 (1,84) <sup>e,f</sup>         |
| SDAf**                                    |                                     |   |                                     | 11,60 ( $\pm 0,53$ ) <sup>a</sup>     | 16,29 ( $\pm 0,29$ ) <sup>a</sup>       | 327,08 ( $\pm 13,25$ ) <sup>a</sup> | 561,99 ( $\pm 17,45$ ) <sup>g</sup> |

\* Letras sobrescritas indicam diferença estatística das amostras segundo teste Tukey ( $\alpha=0,05$ ) por atividade enzimática. \*\* SDAf – Suco Digestivo do *Achatina fulica*

Comparando os resultados, vê-se que as atividades do SDAf são muito superiores aos resultados encontrados para as enzimas de *A. niger*.

Entretanto, quando é analisada a atividade específica, U/mg de proteína, tabela 21, as atividades se mostram mais baixas do que as demais amostras, exceto para atividade  $\beta$ -manosidase. Essa diferença se deve ao fato do SDAf possuir alta concentração de proteínas, mais precisamente 202,22 mg/mL, enquanto as enzimas de *A. niger* possuem resultados na ordem de 1000x inferiores, < 250  $\mu$ g/mL. O SDAf mostrou, entretanto, altas atividades específicas para  $\beta$ -glucosidase e  $\beta$ -manosidase, indicando possuir potencial hidrolítico para cadeias de manose e glucose, interessante para substratos polissacarídicos como as hemiceluloses ricas em galactoglucomananas e xiloglucanas.

As enzimas excretadas por *A. niger* frente aos substratos indutores diversos apresentaram diferentes perfis de atividade. De modo geral, todas apresentaram melhores respostas em termos de  $\alpha$ -galactosidase e  $\beta$ -glucosidase, indicando serem capazes de remover as ramificações das galactoglucomananas ou das gomas de galactomananas, e ainda exibiram potencial de hidrolisar polissacarídeos contendo cadeias  $\beta$ -glicosídicas 4-ligadas. Entretanto essas atividades devem ser testadas diretamente frente aos polissacarídeos de interesse, como as galactomananas.

Quanto às respostas obtidas por este teste preliminar para os cultivos de *A. niger* com goma guar, a adição do silicato mostra uma diferença no perfil das enzimas obtidas. Quando considera-se as enzimas fúngicas com baixa atividade,  $\alpha$ -arabinosidase,  $\beta$ -manosidase e  $\beta$ -xilosidase, houve redução da atividade enzimática (U/mL) e específica (U/mg) quando o silicato foi adicionado. Entretanto, quando considera-se as amostras com as atividades  $\alpha$ -galactosidase e  $\beta$ -glucosidase mais altas, nos casos em que as respostas não foram equivalentes, o silicato conduziu a um aumento das atividades. Esses resultados sinalizam que as enzimas produzidas com e sem a adição do  $MgSiO_3$  possuem parâmetros comportamentais diferentes e talvez mais além da circunstância de glicosilação para o processo excretório.

### 10.2.3 Método de determinação de atividade enzimática com substratos polissacarídicos

A determinação de atividade enzimática se deu frente à exposição das enzimas teste aos polissacarídeos: gomas de alfarroba e guar, galactomanana de bracinga, pectina cítrica e hemiceluloses de bagaço de cana e serragem de *Pinus*. O ensaio foi realizado com 5 mg/mL de substrato e enzima equivalente a 200 µg de proteína/mL.

Os substratos gomas de alfarroba, guar e as galactomananas de bracinga obtiveram baixo potencial hidrolítico (<6%) conforme visualizado no gráfico 36, para as enzimas de *A. niger*, facultando melhores resultados com as enzimas obtidas por indução com guar, seja elas extracelulares, como também as intracelulares, liberando OS de manose. Já as enzimas induzidas por alfarroba (extra e intracelular) confirmaram a maior atividade  $\alpha$ -galactosidase, liberando no meio hidrolítico as unidades de  $\alpha$ -galactose, presentes nas ramificações originais das galactomananas, conforme pode ser visualizado na CCD apresentada na figura 25.

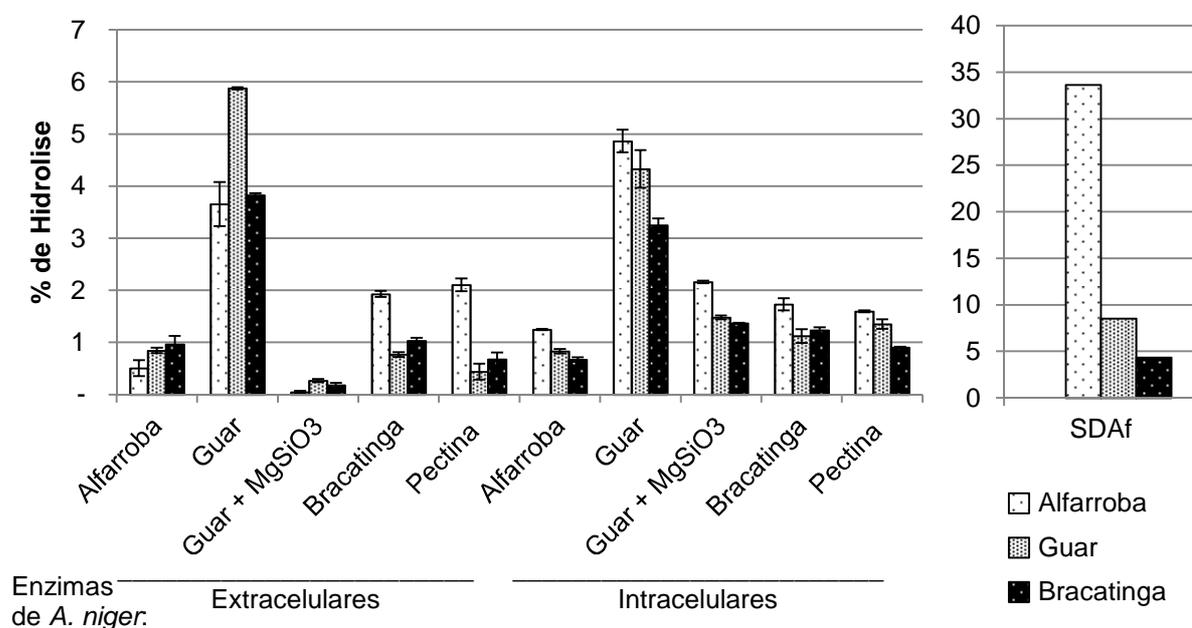


GRÁFICO 36 - PORCENTAGEM DE HIDRÓLISE DAS GALACTOMANANA FRENTE À ENZIMAS DE *A. niger* E *Achatina fulica*

NOTA: Porcentagem de hidrólise mensurada por determinação de açúcares redutores.

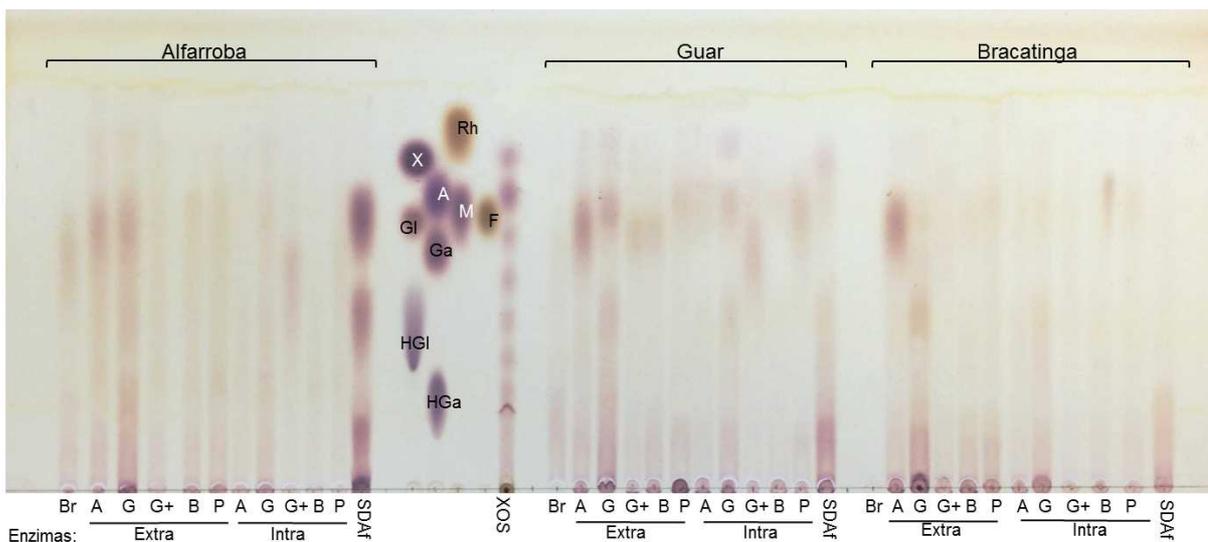


FIGURA 25 - CCD DO PERFIL DAS GALACTOMANANAS HIDROLISADAS COM ENZIMAS DIVERSAS

NOTA: FM: acetonitrila isopropanol e água (15:3:5) – revelador: orcinol sulfúrico – Padrões: (A) arabinose, (F) frutose, (Ga) galactose, (Gl) glucose, (HGa) ácido galacturônico, (HGl) ácido glucurônico, (M) manose, (Rh) ramnose, (X) xilose e (XOS) xilo-oligossacarídeos. Quanto os hidrolisado de 24 h são com as enzimas: (Br) branco, (A) alfarroba, (G) guar, (G+) guar +  $MgSiO_3$ , (B) bracatinga, (P) pectina cítrica e (SDAf) suco digestivo de *Achatina fulica*. Todas as amostras foram padronizadas em 6  $\mu L$ , com exceção da goma de alfarroba hidrolisada com SDAf, com 2  $\mu L$ .

As enzimas produzidas por *A. niger* por indução da goma de guar, sem e com o silicato de magnésio ( $MgSiO_3$ ) apresentaram muitas diferenças. De modo geral houve redução na hidrólise total dos substratos experimentados com enzimas induzidas na presença do silicato, de 3,65% ( $\pm 0,42$ ) para 0,05% ( $\pm 0,03$ ), de 5,88% ( $\pm 0,02$ ) para 0,27% ( $\pm 0,03$ ) e de 3,83% ( $\pm 0,04$ ) para 0,18% ( $\pm 0,04$ );  $p < 0,0001$ , para as enzimas extracelulares e de 4,87% ( $\pm 0,22$ ) para 2,16% ( $\pm 0,02$ ), de 4,33% ( $\pm 0,36$ ) para 1,48% ( $\pm 0,04$ ) e de 3,25% ( $\pm 0,13$ ) para 1,37% ( $\pm 0,01$ );  $p < 0,0002$ , para as enzimas intracelulares induzidas com alfarroba, guar e bracatinga, respectivamente.

Conforme indicado pelo teste do PNF-glicosídeo, o SDAf possui a maior atividade  $\beta$ -manosidase específica indicando a presença de enzimas capazes de clivar cadeias longas de  $\beta$ -mananas em OS mais curtos, o que ocorreu para o substrato alfarroba, cuja relação Man:Gal é de 77:23 (gráfico 36). Quando essa relação passa para 62:38 para o guar (BULPIN, 1990), ou seja, mais substituída, a hidrólise cai de 33,66% ( $\pm 2,06$ ) para 8,54% ( $\pm 0,06$ );  $p < 0,0001$ . Aumentando ainda mais o grau de substituição, desta vez para proporção 50:50 (KOOP, 2009), caso da galactomanana de bracatinga, a porcentagem de hidrólise passa a apenas 4,36% ( $\pm 0,05$ );  $p < 0,0001$ . O aumento da substituição da cadeia  $\beta$ -mananase das

galactomananas faz com que ação hidrolítica caia, provavelmente devido a impedimento estérico sobre a enzima pela presença da  $\alpha$ -galactose da ramificação. Isso é confirmado pelo fato de que o SDAf possui baixa atividade  $\alpha$ -galactosidase, visualizado no ensaio ante ao PNF-glicosídeo.

Quanto à pectina cítrica, a CCD, apresentada na figura 26, mostrou que o substrato utilizado estava altamente contaminado com frutose e frutobiose livres, o que não era esperado e foi apenas detectado através da CCD pós-incubação. Todas as enzimas de *A. niger* foram capazes de quebrar este último dissacarídeo em açúcar livre em até 24 h, indicando ação  $\beta$ -frutofuranosídásica. O SDAf mostrou possuir atividade de agregar as frutoses livres em frutobioses, atividade transfrutossilante, confirmado com a redução na quantidade de açúcares redutores na amostra, do substrato nativo 26,36% ( $\pm 0,48$ ) para 17,41% ( $\pm 0,27$ );  $p < 0,0001$ , visualizado na CCD. As enzimas extra e intracelulares obtidas por indução de *A. niger* com pectina cítrica mostraram alguma atividade  $\alpha$ -galactosidase, bem como o SDAf, pois nestas amostra a CCD mostra a liberação de ácido galacturônico.

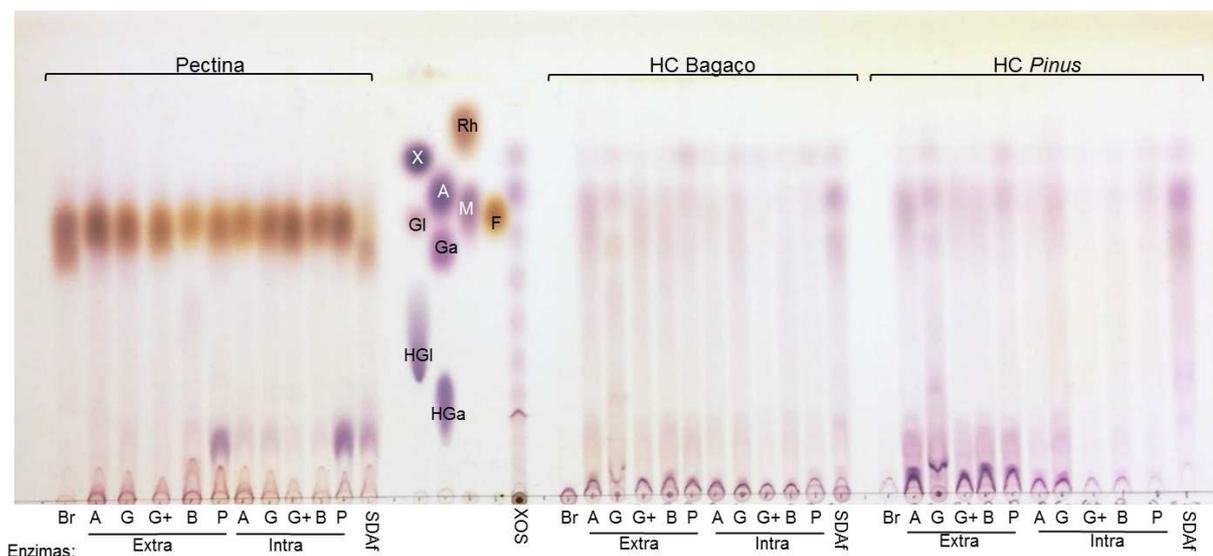


FIGURA 26 - CCD DO PERFIL DA PECTINA E HEMICELULOSES DE BAGAÇO E PINUS HIDROLISADAS COM ENZIMAS DIVERSAS

NOTA: FM: acetonitrila isopropanol e água (15:3:5) — revelador: orcinol sulfúrico — Padrões: (A) arabinose, (F) frutose, (Ga) galactose, (Gl) glucose, (HGa) ácido galacturônico, (HGl) ácido glucurônico, (M) manose, (Rh) ramnose, (X) xilose e (XOS) xilo-oligossacarídeos. Quanto os hidrolisado de 24 h são com as enzimas: (Br) branco, (A) alfarroba, (G) guar, (G+) guar +  $MgSiO_3$ , (B) bracatinga, (P) pectina cítrica e (SDAf) suco digestivo de *Achatina fulica*. Todas as amostras foram padronizadas em 2  $\mu$ L.

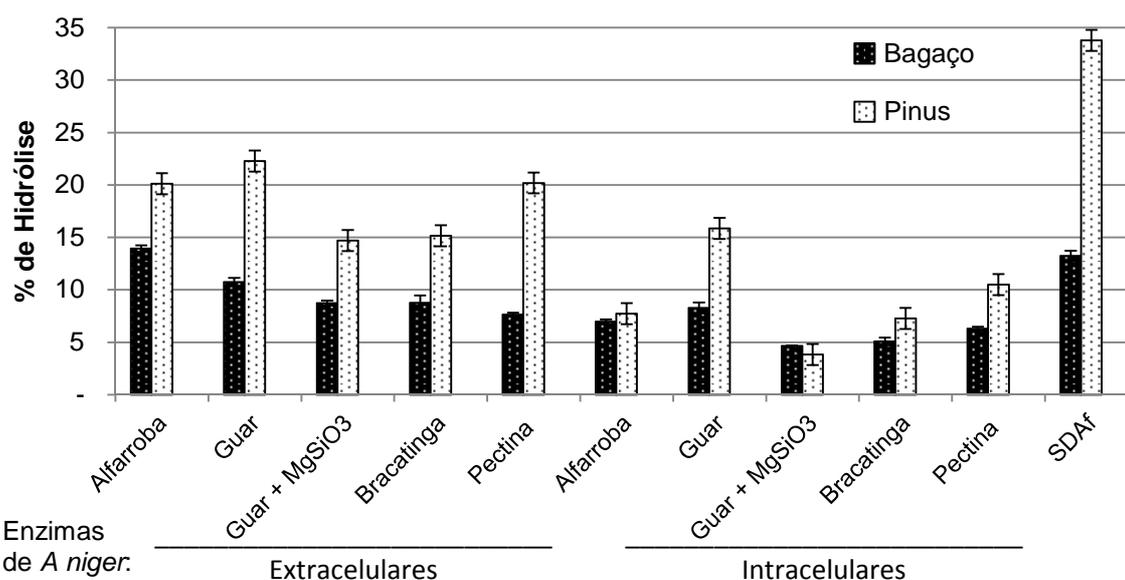


GRÁFICO 37 - PORCENTAGEM DE HIDRÓLISE DAS HEMICELULOSE DE BAGAÇO DE CANA E SERRAGEM DE PINUS FRENTE A DIFERENTE ENZIMAS  
 NOTA: Porcentagem de hidrólise mensurada por determinação de açúcares redutores.

As HCs de bagaço e *Pinus* obtiveram respostas de porcentagem de hidrólise superiores às obtidas com as galactomananas, gráfico 37, indicando alta atividade  $\beta$ -xilanase dos extratos. O perfil obtido dos açúcares na TCL, figura 26, não deixa clara a atividade enzimática frente a fração galactoglucomananas da HC de *Pinus*, para as enzimas de *A. niger*, que possui baixa atividade  $\beta$ -mananase. Já com o SDAf existem indícios que houve a quebra desta fração já que ocorreu alta hidrólise com essa enzima, 33,77% ( $\pm 0,58$ ), e o fato, de comprovadamente possuir a maior atividade  $\beta$ -mananase dentre as enzimas testadas.

O SDAf e a enzima de *A. niger* induzida por alfarroba, extracelular, deram resultados de hidrólise equivalentes ( $p=1011$ ) de 13,24% ( $\pm 0,48$ ) e 13,94% ( $\pm 0,31$ ), respectivamente, e foram as maiores respostas de hidrólise para a hemicelulose de bagaço de cana, seguido para a enzima induzida por guar, extracelular, com 10,73% ( $\pm 0,70$ ) de hidrólise.

Para a HC de *Pinus* a maior hidrólise se deu com o SDAf, que possui atividade  $\beta$ -mananase e foi capaz de hidrolisar a porção galactoglucomanana, como resposta de 33,77% ( $\pm 0,58$ ). Seguem como melhores respostas as enzimas extracelulares de *A. niger* induzidas por guar, pectina e alfarroba com 22,28% ( $\pm 0,14$ ), 20,19% ( $\pm 0,75$ ) e 20,12% ( $\pm 0,36$ ), respectivamente.

Quando compara-se a presença do  $MgSiO_3$  durante a indução de *A. niger* com goma guar, para esses substratos também houve redução da resposta para ambas as HCs em pelo menos 20% tanto para as enzimas extracelulares quanto para as intracelulares.

Os resultados obtidos em todas as hidrólises com as enzimas de *A. niger* induzidas por pectina cítrica não foram os esperados já que o substrato estava altamente contaminado com açúcares livres, não estimulando o micro-organismo a produzir as enzimas de interesse esperadas, como as pectinases.

#### 10.2.4 Otimização da Hidrólise Enzimática para obtenção de Oligossacarídeos

A partir dos resultados obtidos, a produção de OS via hidrólise enzimática se deu com a combinação de enzimas extracelulares obtidas por indução de *A. niger* com alfarroba, com atividade  $\alpha$ -galactosidase, em quantidade crescente de 25, 50 e 75% (adição de 50, 100 e 150  $\mu$ g de proteínas), com 200  $\mu$ g de proteínas das enzimas extracelulares de *A. niger* induzidas como a goma de guar ou com o SDAf, utilizando como substratos as gomas de alfarroba e guar e galactomananas de bracinga.

Para a enzima extracelular de *A. niger* induzidas como a goma de guar a adição de qualquer quantidade da enzima induzida por alfarroba ( $\alpha$ -galactosidase) foi capaz de aumentar a resposta em açúcares redutores no meio (porcentagem de hidrólise), como pode ser visualizado no gráfico 38. Para todos os substratos o maior aumento foi quando realizada a adição de 25% da  $\alpha$ -galactosidase com aumento na resposta em 4,36, 2,29 e 3,25 vezes ( $p < 0,0001$ ) respectivamente para as gomas de alfarroba e guar e as galactomananas de bracinga. O aumento na quantidade de enzima suplementada de 25% para 50 ou 75% causou uma redução na porcentagem de hidrólise. Entretanto, as respostas foram maiores que as encontradas para a enzima extracelular de *A. niger* induzida por guar isoladamente.

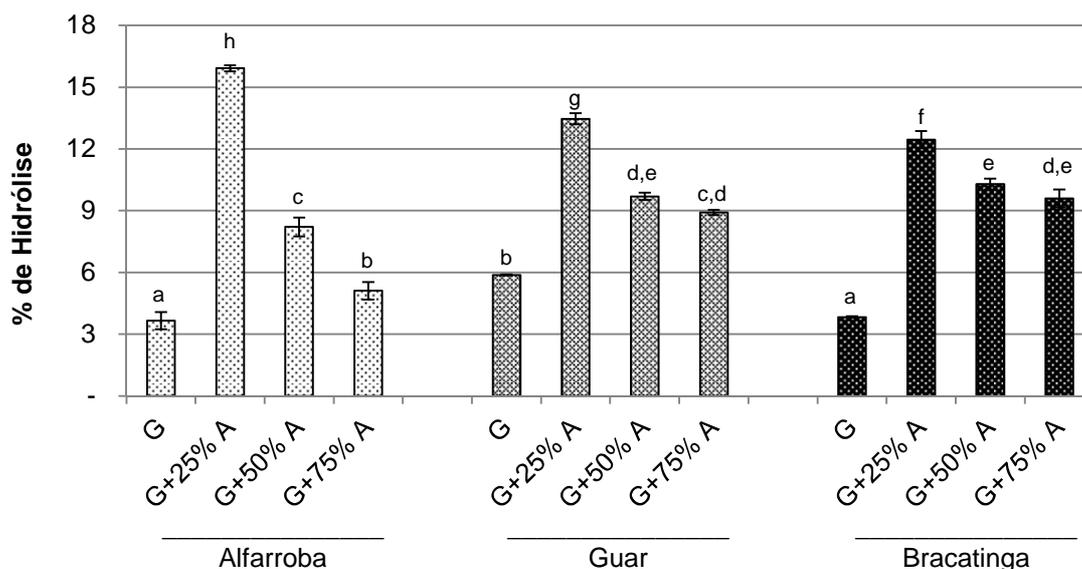


GRÁFICO 38 - PORCENTAGEM DE HIDRÓLISE DE GALACTOMANANAS FRENTE À ENZIMAS COMBINADAS DE *Aspergillus niger*  
 NOTA: Porcentagem de hidrólise mensurada por determinação de açúcares redutores. As enzimas utilizadas foram as extracelulares de *Aspergillus niger* induzidas por goma (G) guar e suplementadas com a induzida por goma de (A) alfarroba. As letras sobrescritas indicam as diferenças por teste Tukey ( $\alpha=0,05$ ) entre as amostras.

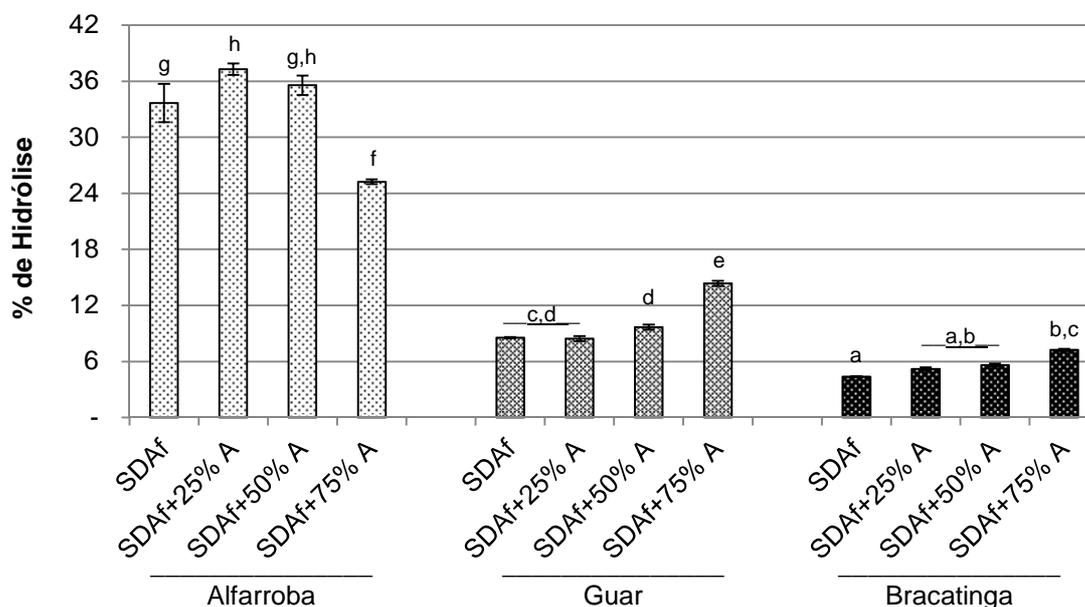


GRÁFICO 39 - PORCENTAGEM DE HIDRÓLISE DE GALACTOMANANAS FRENTE À ENZIMAS COMBINADAS DO SUCO DIGESTIVO DE *Achatina fulica* E INDUZIDAS POR *Aspergillus niger*  
 NOTA: Porcentagem de hidrólise mensurada por determinação de açúcares redutores. As enzimas utilizadas foram o suco digestivo de *Achatina fulica* (SDAf) suplementado com a enzima extracelular de *Aspergillus niger* induzida por goma de (A) alfarroba. As letras sobrescritas indicam as diferenças por teste Tukey ( $\alpha=0,05$ ) entre as amostras.

Já a suplementação das enzimas do SDAf com a  $\alpha$ -galactosidase da enzima extracelular de *A. niger* induzida com alfarroba, gráfico 39, não apresentou o mesmo

comportamento. Para o substrato goma de alfarroba a melhor combinação foi com a adição de 25%, que levou ao aumento da resposta em 1,11 vezes. Os aumentos de 1,68 e 1,66 vezes ( $p < 0,0001$ ) foram obtidos com a suplementação com 75% de enzimas de *A. niger* para os substratos guar e bracatinga.

Na CCD apresentada na figura 27, o perfil dos OS produzidos deixa claro que a presença de açúcares, inclusive OS nas enzimas de *A. niger*. Isso ocorre devido a estar sendo utilizado o meio de cultivo centrifugado e concentrado, contendo açúcares solúveis que não foram consumidos pelo fungo. Isso prejudica a visualização das demais amostras com baixas porcentagens de hidrólise.

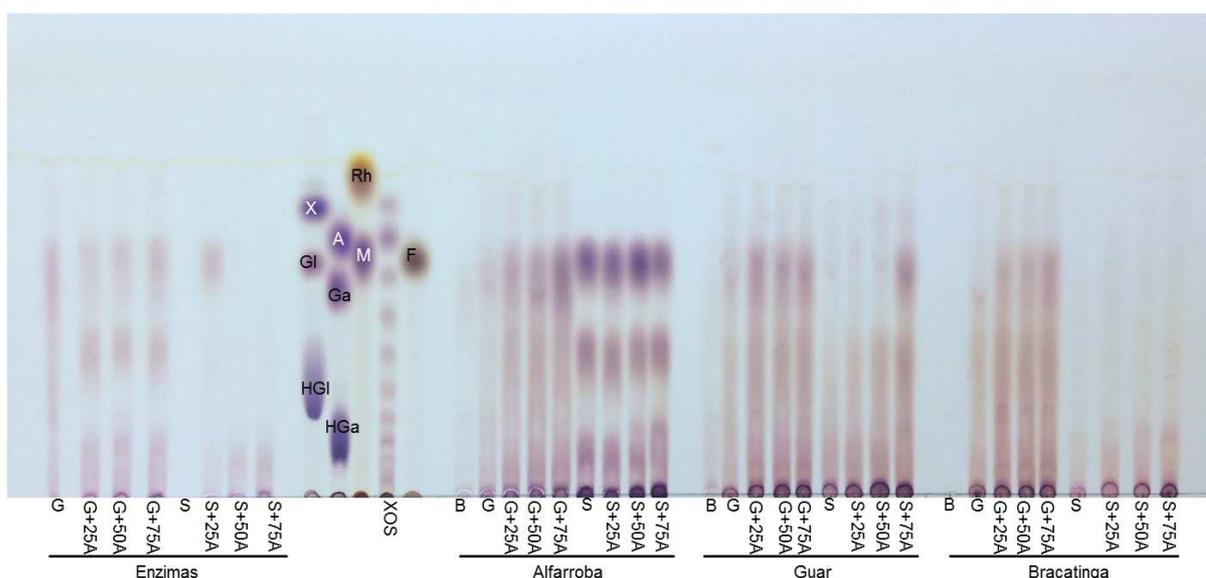


FIGURA 27 - CCD DO PERFIL DAS GALACTOMANANAS HIDROLISADAS COM ENZIMAS DE *Aspergillus niger* E *Achatina fulica* COMBINADAS

NOTA: FM: acetonitrila isopropanol e água (15:3:5) — revelador: orcinol sulfúrico — Padrões: (A) arabinose, (F) frutose, (Ga) galactose, (Gl) glucose, (HGa) ácido galacturônico, (HGl) ácido glucurônico, (M) manose, (Rh) ramnose, (X) xilose e (XOS) xilo-oligossacarídeos. Quanto os hidrolisado de 24 h são com as enzimas: (B) branco; (G) *A. niger* induzido com goma guar; (S) suco digestivo de *Achatina fulica*. A combinação ocorreu com a adição de 25, 50 ou 75% de enzimas de *A. niger* induzidas por goma de alfarroba (A). Todas as amostras foram padronizadas em 6  $\mu$ L, com exceção da goma de alfarroba hidrolisada com SDAf, com 2  $\mu$ L.

Considerando os resultados de hidrólise enzimática com polissacarídeos e a CCD foi decidida a utilização do SDAf na sua forma nativa, sem qualquer suplementação, para a produção de OS em maior quantidade, para os testes com os probióticos *Bifidobacterium animalis* (Activia®) e *Lactobacillus casei* Shirota (Yakult®).

### 10.3 CULTIVO COM PROBIÓTICOS

Foram utilizados OS de alfarroba hidrolisados com enzimas do SDAf como fonte de carbono para os micro-organismos probióticos avaliados. Após a hidrólise foi realizado um processo para remoção dos OS do restante dos polissacarídeos não hidrolisados através da adição de 5 volumes de etanol. O material foi vigorosamente agitado e posteriormente centrifugado a 8.000 rpm (21.460 g), 5 °C por 15 minutos. O sobrenadante etanólico foi seco e os OS ressuspensos em água. Foi realizada uma análise de açúcares totais para cálculos posteriores para a produção do meio de cultivo contendo 0,5 g%(p/v).

O experimento se deu em condição de anaerobiose, 37 °C durante 14 dias, com monitoramento do crescimento celular por absorbância relativa em 660 nm, análise de pH e produção de ácidos orgânicos. Houve crescimento celular equivalente para os probióticos no 14º dia, entretanto até o quinto dia, as bifidobactérias apresentaram crescimento mais acentuado com os OS de alfarroba que os lactobacilos, como pode ser observado no gráfico 40.

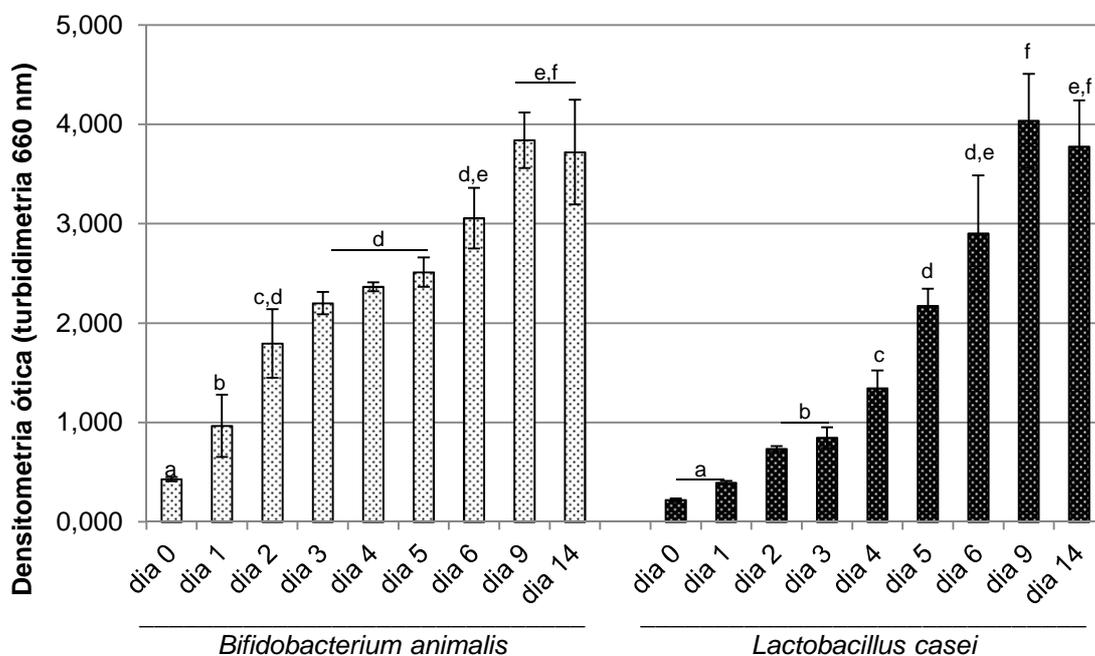


GRÁFICO 40 - CRESCIMENTO DOS MICRO-ORGANISMOS PROBIÓTICOS UTILIZANDO OLIGOSSACARÍDEOS OBTIDOS POR HIDRÓLISE DE GOMA DE ALFARROBA COM SUCO DIGESTIVO DO MOLUSCO *Achatina fulica*

NOTA: As letras sobrescritas indicam as diferenças por teste Tukey ( $\alpha=0,05$ ) entre as amostras.

Diferente do ocorrido com os OS produzidos por termopressurização fosfórica, os OS de alfarroba não foram capazes de reduzir o pH do meio, como pode ser observado no gráfico 41, ocorrendo inclusive um aumento neste valor a partir do quinto dia de cultivo. Este fato pode ter ocorrido pela presença dos sais do tampão acetato do meio hidrolítico onde os OS foram produzidos, que por serem solúveis no etanol, meio onde foi concentrado os açúcares, também foram concentrados, não permitindo assim a acidificação do pH do meio de cultivo.

Apesar de não ter havido a redução do pH, apenas o crescimento celular dos micro-organismo probióticos já é considerado benéfico para saúde humana (CAMPBELL, 1997). Apesar disso, a análise dos ácidos orgânicos detectou a presença de produção dos ácidos láctico, acético e propiônico (ROWE, 1992), com o crescimento do *L.casei* e destes mesmos ácidos mais o ácido succínico com o *B. animalis*, como pode ser visualizado nos cromatogramas apresentados nos gráficos 42 e 43. Este último ácido geralmente é produzido em quantidades muito pequenas (<1 mmol/L), porém sua presença contribui com a regeneração do NAD<sup>+</sup> (doador de elétrons para produção de energia celular) através da produção de ácido láctico e etanol (MEULEN, 2006).

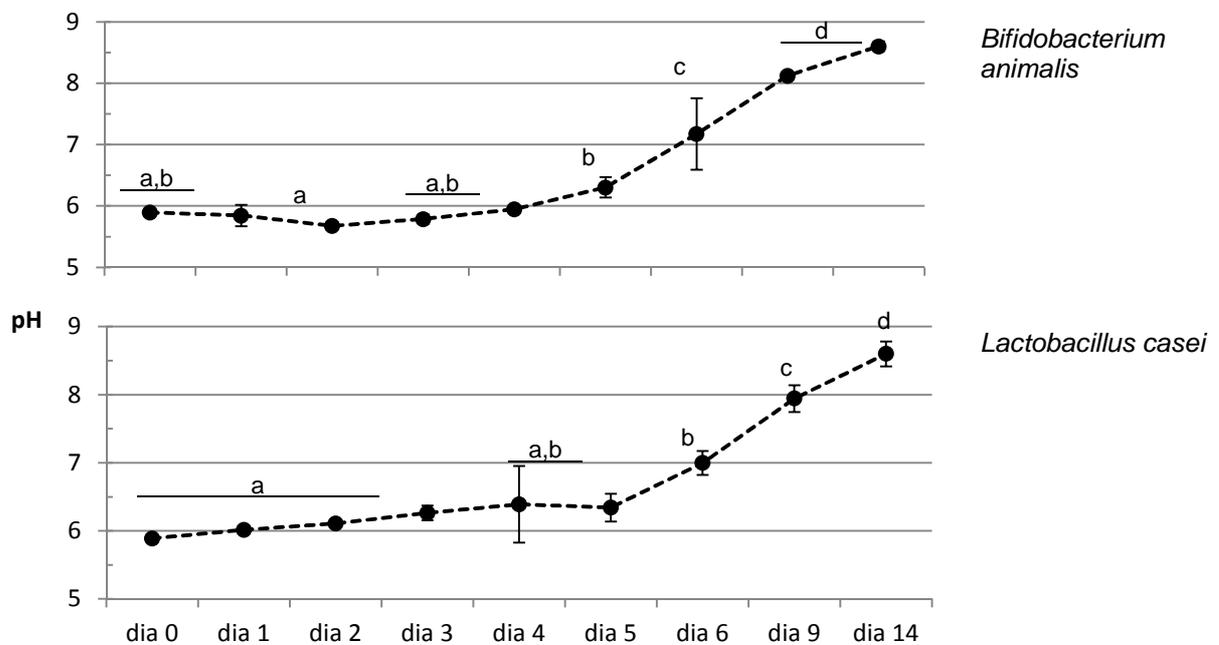


GRÁFICO 41 - EVOLUÇÃO DO pH DURANTE O CULTIVO DE PROBIÓTICOS COM OLIGOSSACARÍDEOS DE ALFARROBA

NOTA: As letras sobrescritas indicam as diferenças por teste Tukey ( $\alpha=0,05$ ) entre as amostras.

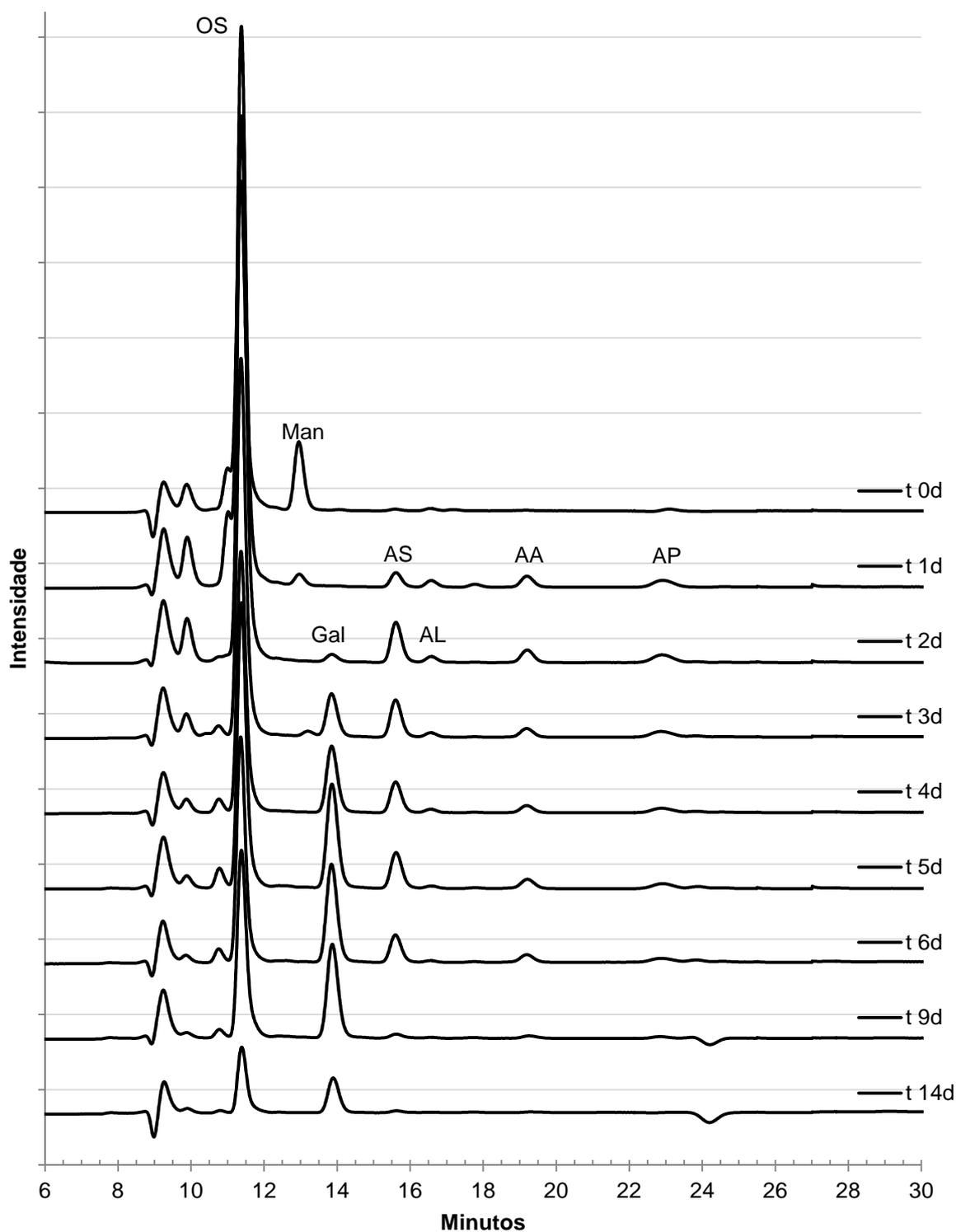


GRÁFICO 42 - CROMATOGRAMAS DO CULTIVO DE *Bifidobacteria animalis* COM OLIGOSSACARÍDEOS DE ALFARROBA

NOTA: Coluna ROA, FM ácido sulfúrico 8 mmol — Fluxo 0,5 mL/min — Detector RID. Amostras contendo (OS) oligossacarídeos, (Man) manose, (Gal) galactose e os ácidos orgânicos: (AS) succínico, (AL) ácido láctico, (AA) ácido acético e (AP) propiônico.

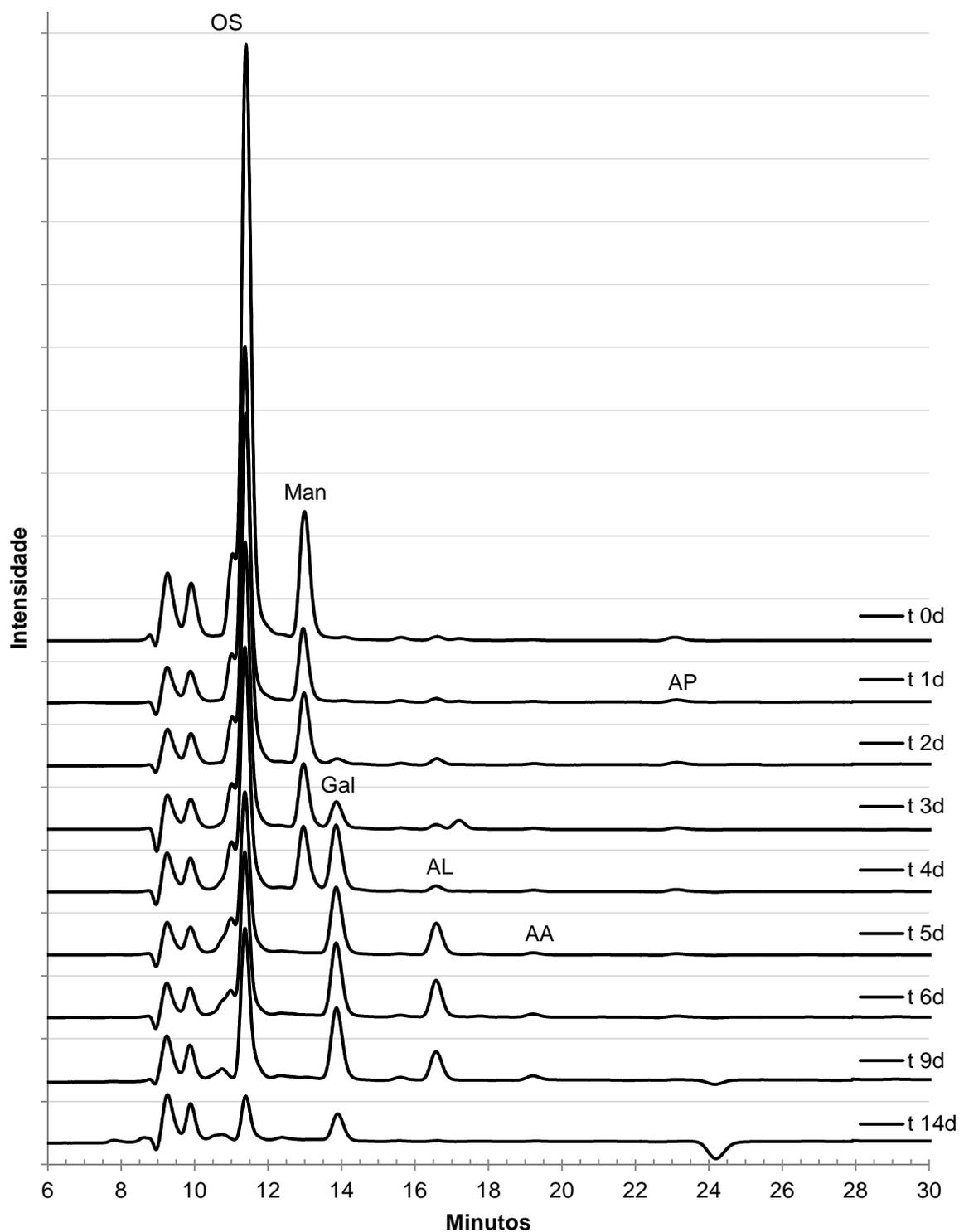


GRÁFICO 43 - CROMATOGRAMAS DO CULTIVO DE *Lactobacillus casei* Shirota COM OLIGOSSACARÍDEOS DE ALFARROBA  
 NOTA: Coluna ROA, FM ácido sulfúrico 8 mmol — Fluxo 0,5 mL/min — Detector RID. Amostras contendo (OS) oligossacarídeos, (Man) manose, (Gal) galactose e os ácidos orgânicos: (AL) ácido láctico, (AA) ácido acético e (AP) propiônico.

A quantificação dos ácidos láctico e acético para as bifidobactérias foi de 77,85 para 177,11 e 23,90 e 319,92 µg/mL para os dias zero e três dias, respectivamente. Enquanto para os lactobacilos foi de 84,09 e 189,09 para 1.339,76 e 22,89 para 57,48 para 117,43 nos tempos zero, três e seis dias, respectivamente.

Do mesmo modo que anteriormente observado com os cultivos com OS de bagaço de cana e *Pinus taeda*, ocorre primeiramente a quebra dos OS de alto GP, gerando OS menores e ao final do cultivo o consumo dos ácidos orgânicos gerados como fonte de carbono. O fato da dieta ser capaz de alterar a composição da flora intestinal em 24 h (DAVID, 2014), e a eliminação dos resíduos não absorvidos se dar entre 3–5 dias, o consumo dos AGCC não influencia o poder prebiótico dos OS em geral, já que estes devem ser consumidos diariamente, associado à ingestão de água, através dos diversos alimentos funcionais ou nutracêuticos disponíveis à venda.

## 11 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- ✓ Durante o desenvolvimento do trabalho foi possível obter oligossacarídeos prebióticos para fins nutracêuticos a partir de diversas fontes vegetais através de hidrólises ácidas e/ou enzimáticas.
- ✓ O processo de pré-tratamento por termopressurização com ácido O-fosfórico diluído se mostrou eficaz, comparativamente com o controle com água, para a produção concomitante de oligossacarídeos prebióticos com maior rendimento tanto de bagaço de cana quanto de serragem de *Pinus*, cogerao ainda uma celulose residual mais suscetível ao posterior processo de sacarificação enzimática com celulasas industriais.
- ✓ O bagaço de cana é um resíduo L(h)C com maior poder de sacarificação enzimática do que a serragem de *Pinus*, até mesmo quando consideramos amostras nativas sem qualquer pré-tratamento (3,3 vezes).
- ✓ Foram produzidos oligossacarídeos nas condições de 3–10 atm (144 °C e 185 °C) para ambos os resíduos L(h)C — bagaço e *Pinus* — diferindo os rendimentos obtidos e também a pureza dos hidrolisados. Condições de pH mais brandas, como 2,5 e 2,25, em pressurização média de 7 atm (171 °C), são eficazes para melhora da sacarificação enzimática posterior da biomassa celulósica bem como produção de OS com grau de pureza superior a 50%.
- ✓ A alteração metodológica no processo de filtração passando de lã de vidro para funil de placa porosa de vidro e vácuo, bem como o aumento na proporção biomassa:ácido de 1:6 para 1:8 (m/v) proporcionaram aumento na quantidade total de OS extraídos durante o pré-tratamento na ordem de 35 e 50% para bagaço e *Pinus*, respectivamente. Entretanto o aumento foi acompanhado de uma redução na pureza dos hidrolisados de ao menos 10%.

- ✓ O cultivo de bactérias probióticas utilizando OS de bagaço de cana e serragem de *Pinus*, obtidos via hidrólise fosfórica, como fontes exclusivas de carbono, foi satisfatório com produção dos ácidos graxos de cadeia curta já em três dias de cultivo. *Lactobacillus casei* cresceu preferencialmente em meio contendo OS de *Pinus*, produzindo ácido láctico, enquanto *Bifidobacterium animalis* teve maior crescimento com OS de bagaço de cana, produzindo os ácidos láctico e acético.
- ✓ O cultivo do *Aspergillus niger* contendo polissacarídeos diversos (gomas de alfarroba e guar, galactomananas de bracinga e pectina cítrica) como indutores da biossíntese de enzimas-chave se mostrou eficaz para a produção de enzimas extracelulares e intracelulares diversas com produção de proteínas < 250 µg/mL, e atividade específica mais elevada para α-galactosidase e β-glucosidase. No que tange as enzimas hidrolíticas do suco digestivo do molusco *Achatina fulica* (SDAf), estas ocorrem em elevada concentração proteica (202,2 mg/mL) além de possuir atividade frente um amplo elenco de polissacarídeos e as mesmas incluem marcada ação β-glucosidase e β-manosidase.
- ✓ A adição de silicato de magnésio juntamente com o indutor goma de guar reduziu a atividade enzimática (U/mL) e específica (U/mg) de α-arabinosidase, β-manosidase e β-xilosidase. Entretanto, manteve equivalente ou aumentou as atividades α-galactosidase e β-glucosidase, sinalizando que as enzimas produzidas com e sem a adição do MgSiO<sub>3</sub> possuem perfis diferentes. Considerando a atividade enzimática frente aos polissacarídeos avaliados, em todas houve redução do potencial hidrolítico.
- ✓ As enzimas produzidas por indução de *A. niger* com goma guar, bem como o SDAf, se mostraram as mais interessantes, já que hidrolisaram os substratos goma de alfarroba e as hemiceluloses de bagaço e *Pinus* com produção de OS de interesse nutracêutico. Entretanto as enzimas extracelulares de *A. niger* induzidas por alfarroba possuem alta atividade α-galactosidase, sendo interessante para o uso combinado com aquelas do SDAf para produção de OS

de galactomananas mais substituídas, como aquela presente nas sementes de bracatinga.

- ✓ Apesar da liberação de ácido galacturônico da pectina, as enzimas de *A. niger* induzidas por esse mesmo substrato apresentaram maior atividade  $\beta$ -frutofuranosidásica, devido a uma contaminação do substrato por frutossacarídeos.
- ✓ A combinação das enzimas de *A. niger* extracelulares induzidas por alfarroba com as induzidas por goma guar resultaram no aumento do poder hidrolítico dos substratos alfarroba, guar e bracatinga em todas as proporções testadas, sendo 25% de adição responsável pelo aumento na porcentagem de hidrólise em 4,36, 2,29 e 3,25 vezes respectivamente. Já a combinação com o SDAf melhorou a hidrólise da alfarroba com a adição de 25% da primeira enzima, em cerca de 1,11 vezes e com a adição de 75%, um aumento de 1,68 e 1,66 para os substratos guar e bracatinga, respectivamente.
- ✓ O cultivo de bactérias probióticas utilizando OS de alfarroba, obtidos via hidrólise com enzimas de SDAf, como fontes exclusivas de carbono, foi satisfatório com produção dos ácidos graxos de cadeia curta já em três dias de cultivo. *Lactobacillus casei* cresceu produzindo os ácidos láctico, acético e propiônico enquanto o *Bifidobacterium animalis* produziu além deste o ácido succínico.

## 12 PUBLICAÇÕES

Artigo: Tiboni, M.; Grzybowski, A.; Baldo, G.R.; Dias, E.F.; Tanner, R.D.; Kornfield, J.A.; Fontana, J.D. **“Thermopressurized diluted phosphoric acid pretreatment of ligno(hemi)cellulose to make free sugars and nutraceutical oligosaccharides”**. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, v. 41, p. 957-964, 2014.

Capítulo de Livro: Fontana, J.D.; Tiboni, M.; Grzybowski, A.; Palacio Cortes, A.M.; Baldo, G.R.. **“Chapter 4 - The diluted thermopressurized aqueous phosphoric pretreatment of ligno(hemi)cellulosics”**. In: J.D. Fontana, M. Tiboni, A. Grzybowski. (Org.). Cellulose and Other Naturally Occurring Polymers. 1 ed. Keraka-India: Research Signpost, v. 1, p. 33-39, 2014.

Anais de Congresso:

- Fontana, J.D.; Tiboni, M.; Grzybowski, A.; Scremin, L.B.. **“Nutraceutical Oligosaccharides from sugar cane bagasse and pine sawdust ligno(hemi)celluloses through thermopressurized diluted phosphoric acid for Lactobacillus and Bifidobacterium probiotic bacteria growth”**. In: 14th International Nutrition & Diagnostics Conference (INDC) — Praga, República Tcheca, 2014.
- Grzybowski, A.; Tiboni, M.; Koop, H.S.; Fontana, J.D. **“Comparative enzymatic hydrolyses of seed gum galactomannans with *Achatina fulica* snail gut or *Aspergillus niger* - induced enzymes regarding nutraceutical oligosaccharides”**. In: 14th International Nutrition & Diagnostics Conference (INDC) — Praga, República Tcheca, 2014.
- Fontana, J.D.; Palacio-Cortes, A.M. ; Tiboni, M.; Baldo, G.R.; Dias Junior, E. F.; Grzybowski, A.; Tanner, R. D.; Kornfield, J. A. **“Diluted thermopressurized phosphoric acid as a gentle proton donor for the hydrolysis of polysaccharides from several phytobiomass models: softwood heteromannans as target”**. In: 35th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals — Portland, USA, 2013.

### **13 SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS**

- ✓ Produção de oligossacarídeos a partir de outros resíduos polissacarídicos diversos, como xiloglucanas.
- ✓ Produção/coleta de enzimas a partir de outros organismos.
- ✓ Avaliação da eficiência dos oligossacarídeos em bioensaios com roedores.
- ✓ Verificar a aditividade de mesclas de oligossacarídeos derivados de diferentes polissacarídeos.
- ✓ Formulação de alimentos explorando o potencial simbiótico, bem como as propriedades organolépticas dos componentes isolados.

## REFERÊNCIAS

ALBERSHEIM, P., NEVINS, D. J., ENGLISH, P. D., *et al.* **A method for the analysis of sugars in plant cell-wall polysaccharides by gas-liquid chromatography.** Carbohydrate Research, vol. 5 (3): p. 340-345, 1967.

AMADI, O. C. e OKOLO, B. N. **Influence of stirrer speed on the morphology of *Aspergillus carbonarius* var (Bainier) Thom IMI 366159 during raw starch digesting amylase production.** Journal of Biological Sciences, vol. 6 (2): p. 84-95, 2013.

AMANULLAH, A., JÜSTEN, P., DAVIES, A., *et al.* **Agitation induced mycelial fragmentation of *Aspergillus oryzae* and *Penicillium chrysogenum*.** Biochemical Engineering Journal, vol. 5 (2): p. 109-114, 2000.

ANJO, D. F. C. **Functional foods in angiology and vascular surgery.** Journal Vascular Brasileiro, vol. 3 (2): p. 145-154, 2004.

ANVISA. **Alimentos Com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde.** Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/>. (2014). Acesso em: 20 de fevereiro, 2014.

AVCI, A., SAHA, B. C., DIEN, B. S., *et al.* **Response surface optimization of corn stover pretreatment using dilute phosphoric acid for enzymatic hydrolysis and ethanol production.** Bioresource Technology, vol. 130 (0): p. 603-612, 2013.

BALCU, I., MACARIE, C. A., SEGNEANU, A.-E., *et al.* **Combined Microwave-Acid Pretreatment of the Biomass** InTech. p. 223-239, 2011.

BARBOSA, F. H. F., SILVA, A. M. D., LIMA, L. P. J. D., *et al.* **O gênero *Bifidobacterium*: Dominância à favor da vida.** Ciência Equatorial, vol. 1 (2): p. 15-25, 2011.

BARRETT, E., ROSS, R. P., O'TOOLE, P. W., *et al.*  **$\gamma$ -Aminobutyric acid production by culturable bacteria from the human intestine.** Journal of Applied Microbiology, vol. 113 (2): p. 411-417, 2012.

BENTO, J. F., MAZZARO, I., SILVA, L. M. D. A., *et al.* **Diverse patterns of cell wall mannan/galactomannan occurrence in seeds of the Leguminosae.** Carbohydrate Polymers, vol. 92 p. 192-199, 2013.

BENTON, D., WILLIAMS, C. e BROWN, A. **Impact of consuming a milk drink containing a probiotic on mood and cognition.** Eur J Clin Nutr, vol. 61 (3): p. 355-361, 2007.

BETORET, E., BETORET, N., VIDAL, D., *et al.* **Functional foods development: Trends and technologies.** Trends in Food Science & Technology, vol. 22 (9): p. 498-508, 2011.

BIRD, R. P. **Role of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer.** Cancer Letters, vol. 93 (1): p. 55-71, 1995.

BLAUT, M. **Relationship of prebiotics and food to intestinal microflora.** European Journal of Nutrition, vol. 41 (suppl 1): p. I/11- I/16, 2002.

BOERJAN, W., RALPH, J. e BAUCHER, M. **Lignin biosynthesis.** Annual Review Of Plant Biology, vol. 54 p. 519-546, 2003.

BOUVENG, H. O. e LINDBERG, B. **Methods in structural polysaccharide chemistry.** Advances in Carbohydrate Chemistry, vol. 15 p. 53-89, 1960.

BRIENZO, M. **Extração de hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar para produção de xilo-oligossacarídeos.** Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Microbiologia Aplicada, Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2010.

BRÜCKNER, J. **Estimation of Monosaccharides by the Orcinol-Sulphuric Acid Reaction.** Biochemical Journal, vol. 60 (2): p. 200-205, 1955.

BUCKERIDGE, M. S., DIETRICH, S. M. C. e LIMA, D. U. D. **Galactomannans as the reserve carbohydrate in legume seeds.** Elsevier Science. p. 283-316, 2000.

BUDIÑO, F. E. L., THOMAZ, M. C., KRONKA, R. N., *et al.* **Efeito da adição de probiótico e/ou prebiótico em dietas de leitões desmamados sobre o desempenho, incidência de diarreia e contagem de coliformes totais.** Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, vol. (43): p. 59-67, 2006.

BULPIN, P. V., GIDLEY, M. J., JEFFCOAT, R., *et al.* **Development of a biotechnological process for the modification of galactomannan polymers with plant alfa-galactosidase.** Carbohydrate Polymers, vol. 12 (2): p. 155-168, 1990.

BURITI, F. C. A. e SAAD, S. M. I. **Bactérias do grupo *Lactobacillus casei*: caracterização, viabilidade como probióticos em alimentos e sua importância para a saúde humana.** Archivos Latinoamericanos de Nutrición, vol. 57 (4): p. 373-380, 2007.

CALLAWAY, T. R., EDRINGTON, T. S., HARVEY, R. B., *et al.* **Prebiotics in food animals, a potential to reduce foodborne pathogens and disease.** Romanian Biotechnological Letters, vol. 17 (6): p. 7808-7816, 2012.

CAMPBELL, J. M., JR., G. C. F. e WOLF, B. W. **Selected Indigestible Oligosaccharides Affect Large Bowel Mass, Cecal and Fecal Short-Chain Fatty Acids, pH and Microflora in Rats.** The Journal of Nutrition, vol. 127 (1): p. 130-136, 1997.

CAMPOS, F. G. C. M. D., HABR-GAMA, A., PLOPPER, C., *et al.* **Ácidos Graxos de Cadeia Curta e Doenças Colorretais.** Revista Brasileira de Coloproctologia, vol. 19 (1): p. 11-16, 1999.

CANILHA, L., CHANDEL, A. K., MILESSI, T. S. D. S., *et al.* **Bioconversion of sugarcane biomass into ethanol: an overview about composition, pretreatment methods, detoxification of hydrolysates, enzymatic saccharification, and ethanol fermentation.** Journal of Biomedicine and Biotechnology, vol. 2012 p. 2012.

CARDOSO, A. M., CAVALCANTE, J. J. V., CANTÃO, M. E., *et al.* **Metagenomic analysis of the microbiota from the crop of an invasive snail reveals a rich Reservoir of novel Genes.** Plos One, vol. 7 (11): p. 1-12, 2012.

CARVALHO, A. F. A., NETO, P. D. O., DA SILVA, D. F., *et al.* **Xylo-oligosaccharides from lignocellulosic materials: Chemical structure, health benefits and production by chemical and enzymatic hydrolysis.** FOOD RESEARCH INTERNATIONAL, vol. 51 (1): p. 75-85, 2013.

CASTILHO, L. R., MEDRONHO, R. A. e ALVES, T. L. M. **Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*.** Bioresource Technology, vol. 71 (1): p. 45-50, 2000.

CHANG, Y.-T., CHEN, Y.-S., LIN, K.-T., *et al.* **Characteristics of galactomannanase for degrading konjac gel.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, vol. 43 (1-4): p. 153-157, 2006.

CHIARAMONTI, D., PRUSSI, M., FERRERO, S., *et al.* **Review of pretreatment processes for lignocellulosic ethanol production, and development of an innovative method.** Biomass and Bioenergy, vol. 46 (0): p. 25-35, 2012.

CHOCIAI, M. B. **Pré-tratamento fosfórico de fitobiomassa residual e bioconversão de pentoses.** Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná. 1987.

CHRISTIE, W. W. **Thin-layer chromatography of lipids.** Disponível em: <http://lipidlibrary.aocs.org/topics/tlc/index.htm>. (2011). Acesso em: January 15, 2013.

COLLEY, E. **O manejo e controle do caramujo gigante africano: qual o melhor método?** Disponível em: <http://www.conexaocaramujo.com.br/2012/05/o-manejo-e-controle-do-caramujo-gigante.html>. (2012). Acesso em: 13 jan, 2015.

COLLEY, E. e FISCHER, M. L. **Avaliação dos problemas enfrentados no manejo do caramujo gigante africano *Achatina fulica* (Gastropoda: Pulmonata) no Brasil.** Zoologia, vol. 26 (4): p. 674-683, 2009.

CONAB. **Acompanhamento da Safra Brasileira - Cana de Açúcar.** Disponível em: [http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13\\_12\\_20\\_10\\_56\\_08\\_boletim\\_cana\\_portugues\\_-\\_dez\\_2013\\_3o\\_lev\\_-\\_original.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_12_20_10_56_08_boletim_cana_portugues_-_dez_2013_3o_lev_-_original.pdf). (2014). Acesso em: 25 de fevereiro, 2014.

CONCHA OLMOS, J. e ZÚÑIGA HANSEN, M. E. **Enzymatic depolymerization of sugar beet pulp: Production and characterization of pectin and pectic-oligosaccharides as a potential source for functional carbohydrates.** Chemical Engineering Journal, vol. 192 (0): p. 29-36, 2012.

CONDE-MEJÍA, C., JIMÉNEZ-GUTIÉRREZ, A. e EL-HALWAGI, M. **A comparison of pretreatment methods for bioethanol production from lignocellulosic materials.** Process Safety and Environmental Protection, vol. 90 (3): p. 189-202, 2012.

COURA, R. R. **Purificação e caracterização de uma beta-xilosidase do fungo fitopatogênico *Ceratocystis fimbriata* RM 35.** Pós graduação em Bioquímica Agrícola, Universidade Federal de Viçosa. Minas Gerais, 2012.

CUNHA, P. L. R. D., PAULA, R. C. M. D. e FEITOSA, J. P. A. **Polissacarídeos da biodiversidade brasileira: uma oportunidade de transformar conhecimento em valor econômico.** Química Nova, vol. 32 p. 649-660, 2009.

CUSTODIO, R., KUBOTA, L. T. e ANDRADE, J. C. D. **Leis dos processos de absorção da radiação**. Disponível em: <http://chemkeys.com/br>. (2000). Acesso em: 10 de março de 2011,

DAVID, L. A., MAURICE, C. F., CARMODY, R. N., *et al.* **Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome**. *Nature*, vol. 505 (7484): p. 559-563, 2014.

DEFELICE, S. L. **The nutraceutical revolution: its impact on food industry** *Trends in Food Science & Technology*, vol. 6 (2): p. 59-61, 1995.

DELIA, E. **Efficiency of probiotics and prebiotics in farm animals**. *Lucrări Științifice - Seria Zootehnie*, vol. 54 p. 274-279, 2003.

DÍAZ-MALVÁEZ, F. I., GARCÍA-ALMENDÁREZ, B. E., HERNÁNDEZ-ARANA, A., *et al.* **Isolation and properties of  $\beta$ -xylosidase from *Aspergillus niger* GS1 using corn pericarp upon solid state fermentation**. *Process Biochemistry*, vol. 48 (7): p. 1018-1024, 2013.

DIPLOCK, A., AGGETT, P., ASHWELL, M., *et al.* **Scientific Concerts of Functional Foods in Europe: Consensus Document**. *British Journal of Nutrition*, vol. 81 (Suppl.1): p. S1-28, 1999.

DONIA, M. S., CIMERMANCIC, P., SCHULZE, C. J., *et al.* **A Systematic Analysis of Biosynthetic Gene Clusters in the Human Microbiome Reveals a Common Family of Antibiotics**. *Cell*, vol. 158 (6): p. 1402-1414, 2014.

DRIOUCH, H., SOMMER, B. e WITTMANN, C. **Morphology engineering of *Aspergillus niger* for improved enzyme production**. *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 105 (6): p. 1058-1068, 2010.

DUBOIS, M., GILLES, K. A., HAMILTON, J. K., *et al.* **Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances**. *Analytical Chemistry*, vol. 28 (3): p. 350-356, 1956.

ENZYMESTUFF. **Enzyme Stuff - Digestion and Enzymes**. Disponível em: <http://www.enzymestuff.com/digestion.htm>. (2005). Acesso em: 16 de setembro, 2014.

EVANS, D. F., PYE, G., BRAMLEY, R., *et al.* **Measurement of gastrointestinal pH profiles in normal ambulant humansubjects**. *Gut*, vol. 29 (8): p. 1035-1041, 1988.

EZERONYE, O. U. e OKERENTUGBA, P. O. **Optimum conditions for yeast protoplast release and regeneration in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida tropicalis* using gut enzymes of the giant African snail *Achatina achatina*.** Letters in Applied Microbiology, vol. 32 p. 190-193, 2001.

FEINMAN, M. e HAUT, E. R. **Upper Gastrointestinal Bleeding.** Surgical Clinics of North America, vol. 94 (1): p. 43-53, 2014.

FENGEL, D. e WEGENER, G. **Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions.** Germany: University of Munich. vol. p. 1989.

FIOCRUZ. **Aumenta a proliferação dos caramujos africanos.** Disponível em: <https://portal.fiocruz.br/pt-br/node/3945>. (2011). Acesso em: 13 jan, 2015.

FISCHER, M. L., COSTA, L. C. M. e NERING, I. S. **Use of alimentary resources present in the anthropic environment by the giant African snail *Achatina fulica* Bowdich, 1822: background information for management.** Bioikos, vol. 22 (2): p. 91-100, 2008.

FONSECA, B., MOUTTA, R. D., FERRAZ, F. D., *et al.* **Biological detoxification of different hemicellulosic hydrolysates using *Issatchenkia occidentalis* CCTCC M 206097 yeast.** Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, vol. 38 (1): p. 199-207, 2011.

FONTANA, J. D. **Celulose 1 - Algodão em alta.** Curitiba: p. 2004.

FONTANA, J. D., CORREA, J. B. C. e DUARTE, J. H. **Aqueous phosphoric acid hydrolysis of hemicelluloses from sugarcane and sorghum bagasses.** Biotechnology and Bioengineering Symp., vol. 14 p. 175-186, 1984a.

FONTANA, J. D., CORREA, J. B. C., DUARTE, J. H., *et al.* **Aqueous phosphoric acid hydrolysis of hemicelluloses from sugarcane and sorghum bagasses.** Sixth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, vol. (14): p. 175-186, 1984b.

FONTANA, J. D., GRZYBOWSKI, A., TIBONI, M., *et al.* **Fructo-oligosaccharides production from inulin through partial citric or phosphoric acid hydrolyses.** Journal of Medicinal Food, vol. 14 p. 1425-1430, 2011.

FONTANA, J. D., PALACIO, A. M., TIBONI, M., *et al.* **Diluted thermopressurized phosphoric acid as a gentle proton donor for the hydrolysis of polysaccharides**

**from several phytobiomass models: softwood heteromannans as target.** Portland-OR-USA: ppt 10-04: p. 2013.

FOSHU. **Food for Specified Health Uses.** Disponível em: <http://www.mhlw.go.jp/english/topics/foodsafety/fhc/02.html>. (2014). Acesso em: 21 de fevereiro, 2014.

FOSTON, M. e RAGAUSKAS, A. J. **Changes in lignocellulosic supramolecular and ultrastructure during dilute acid pretreatment of Populus and switchgrass.** Biomass and Bioenergy, vol. 34 (12): p. 1885-1895, 2010.

GALBE, M. e ZACCHI, G. **Pretreatment: The key to efficient utilization of lignocellulosic materials.** Biomass and Bioenergy, vol. 46 (0): p. 70-78, 2012.

GANTER, J. L. M. S., CARDOSO, A. T. M., KAMINSKI, M., *et al.* **Galactomannan from the seeds of *Mimosa scabrella*: a scale-up process.** International Journal of Biological Macromolecules, vol. 21 (1-2): p. 137-140, 1997.

GANTER, J. L. M. S., MILAS, M., CORRÊA, J. B. C., *et al.* **Study of solution properties of galactomannan from the seeds of *Mimosa scabrella*.** Carbohydrate Polymers, vol. 17 (3): p. 171-175, 1992.

GAO, Y., XU, J., ZHANG, Y., *et al.* **Effects of different pretreatment methods on chemical composition of sugarcane bagasse and enzymatic hydrolysis.** Bioresource Technology, vol. 144 (0): p. 396-400, 2013.

GLENN R, G. **Fibre and effects on probiotics (the prebiotic concept).** Clinical Nutrition Supplements, vol. 1 (2): p. 25-31, 2004.

GOHO, A. M. **Cellulolytic Enzymes.** Disponível em: <http://www2.technologyreview.com/article/409591/tr10-cellulolytic-enzymes/>. (2008). Acesso em: 21 de fevereiro, 2014.

GORGULHO, G. **Primeira Usina de etanol celulósico do Brasil deve iniciar operações em 2013.** Disponível em: <http://www.inovacao.unicamp.br/recortes/primeira-usina-de-etanol-celulosico-do-brasil-deve-iniciar-operacoes-em-2013>. (2012). Acesso em: 25 de fevereiro, 2014.

GRAEFF-TEIXEIRA, C. **Expansion of *Achatina fulica* in Brazil and potential increased risk for angiostrongyliasis.** Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, vol. 101 (8): p. 743-744, 2007.

GRANBIO. **Primeira usina de etanol celulósico do Brasil já pode começar a operar.** Disponível em: <http://www.novacana.com/n/etanol/2-geracao-celulose/usina-etanol-celulosico-brasil-operar-270814/>. (2014). Acesso em: 16 de setembro, 2014.

GUARNER, F. e MALAGELADA, J.-R. **Gut flora in health and disease.** The Lancet, vol. 361 (9356): p. 512-519, 2003.

GURGEL, L. V. A., MARABEZI, K., RAMOS, L. A., *et al.* **Characterization of depolymerized residues from extremely low acid hydrolysis (ELA) of sugarcane bagasse cellulose: Effects of degree of polymerization, crystallinity and crystallite size on thermal decomposition.** Industrial Crops and Products, vol. 36 (1): p. 560-571, 2012.

GÜRKÖK, S., SÖYLER, B., BIELY, P., *et al.* **Cloning and heterologous expression of the extracellular alpha-galactosidase from *Aspergillus fumigatus* in *Aspergillus sojae* under the control of *gpdA* promoter.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, vol. 64 p. 146-149, 2010.

GUYONNET, D., CHASSANY, O., DUCROTTE, P., *et al.* **Effect of a fermented milk containing *Bifidobacterium animalis* DN-173 010 on the health-related quality of life and symptoms in irritable bowel syndrome in adults in primary care: a multicentre, randomized, double-blind, controlled trial.** Alimentary Pharmacology & Therapeutics, vol. 26 (3): p. 475-486, 2007.

GUYTON, A. C. e HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica.** Rio de Janeiro: Elsevier. vol. p. 1128, 2006.

HARMSSEN, P. F. H., HUIJGEN, W. J. J., BERMÚDEZ-LÓPEZ, L. M., *et al.* **Literature Review of Physical and Chemical Pretreatment Process for Lignocellulosic Biomass.** Netherlands: Food & Biobased Research Wageningen. p. 2010.

HENDRIKS, A. T. W. M. e ZEEMAN, G. **Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass.** Bioresource Technology, vol. 100 (1): p. 10-18, 2009.

HOLCK, J., HJERNØ, K., LORENTZEN, A., *et al.* **Tailored enzymatic production of oligosaccharides from sugar beet pectin and evidence of differential effects of a single DP chain length difference on human faecal microbiota composition after in vitro fermentation.** Process Biochemistry, vol. 46 (5): p. 1039-1049, 2011.

HOLZAPFEL, W. H. e SCHILLINGER, U. **Introduction to pre- and probiotics.** Food Research International, vol. 35 p. 109-116, 2001.

HSU, C.-K., LIAO, J.-W., CHUNG, Y.-C., *et al.* **Xylooligosaccharides and Fructooligosaccharides Affect the Intestinal Microbiota and Precancerous Colonic Lesion Development in Rats.** Journal of Nutrition, vol. 134 (6): p. 1523-1528, 2004.

HUEBNER, J., WEHLING, R. L. e HUTKINS, R. W. **Functional activity of commercial prebiotics.** International Dairy Journal, vol. 17 (7): p. 770-775, 2007.

HUGENHOLTZ, F., MULLANEY, J. A., KLEEREBEZEM, M., *et al.* **Modulation of the microbial fermentation in the gut by fermentable carbohydrates.** Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre, vol. 2 (2): p. 133-142, 2013.

IACOMINI, M., DUARTE, G. R. e FONTANA, J. D. **Structural study on snail galactans from the genus *Biomphalaria*.** Agricultural and Biological Chemistry, vol. 45 (1373): p. 1380-1390, 1981.

IACOMINI, M., DUARTE, H. S., DUARTE, M. E. R., *et al.* **Degradation of the egg masses galactan during the embryonic development of the snail *Biomphalaria Glabrata*.** Brazilian Archives of Biology and Technology, vol. 23 (3): p. 329-335, 1980.

IBAMA. **Portaria nº 102/98 de 15 de julho de 1998.** Disponível em: [http://www.ibama.gov.br/fauna/legislacao/port\\_102\\_98.pdf](http://www.ibama.gov.br/fauna/legislacao/port_102_98.pdf). (1998). Acesso em: 10 de março, 2014.

JOMAY, C. **Probiotics and prebiotics: A brief overview.** Journal of Renal Nutrition, vol. 12 (2): p. 76-86, 2002.

KANG, S. W., PARK, Y. S., LEE, J. S., *et al.* **Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass.** Bioresource Technology, vol. 91 (2): p. 153-156, 2004.

KIM, U.-J., EOM, S. H. e WADA, M. **Thermal decomposition of native cellulose: Influence on crystallite size.** Polymer Degradation and Stability, vol. 95 (5): p. 778-781, 2010.

KJØNIKSEN, A.-L., HIORTH, M. e NYSTRÖM, B. **Association under shear flow in aqueous solutions of pectin.** European Polymer Journal, vol. 41 (4): p. 761-770, 2005.

KLYOSOV, A. A. **Industrial Enzyme Engineering**. Harvard Medical School. vol. p. 1995.

KO, J. A., LIM, H. J. e PARK, H. J. **Effect of microencapsulated precipitants of *Lactobacillus casei* ATCC 393 on *Helicobacter pylori* eradication**. *Process Biochemistry*, vol. 46 (3): p. 631-635, 2011.

KONDEPUDI, K. K., AMBALAM, P., NILSSON, I., *et al.* **Prebiotic-non-digestible oligosaccharides preference of probiotic bifidobacteria and antimicrobial activity against *Clostridium difficile***. *Anaerobe*, vol. 18 (5): p. 489-497, 2012.

KOOP, H. S., DA-LOZZO, E. J., DE FREITAS, R. A., *et al.* **Rheological characterization of a xanthan–galactomannan hydrogel loaded with lipophilic substances**. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 101 (7): p. 2457-2467, 2012.

KOOP, H. S., PRAES, C. E. D. O., REICHER, F., *et al.* **Rheological behavior of gel of xanthan with seed galactomannan: Effect of hydroalcoholic–ascorbic acid**. *Materials Science and Engineering: C*, vol. 29 (2): p. 559-563, 2009.

KRULL, R., WUCHERPFENNIG, T., ESFANDABADI, M. E., *et al.* **Characterization and control of fungal morphology for improved production performance in biotechnology**. *Journal of Biotechnology*, vol. 163 (2): p. 112-123, 2013.

KUMAR, R., SINGH, S. e SINGH, O. **Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives**. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, vol. 35 (5): p. 377-391, 2008.

KWAK, N.-S. e JUKES, D. J. **Functional foods. Part 1: the development of a regulatory concept**. *Food Control*, vol. 12 p. 99-107, 2001a.

KWAK, N.-S. e JUKES, D. J. **Functional foods. Part 2: the impact on current regulatory terminology**. *Food Control*, vol. 12 p. 109-117, 2001b.

LEPAROUX, S. e COLAS, B. **Digestive juice of *Achatina fulica* as a potential source of transglycosylation enzymes**. *International Journal of Biochemistry*, vol. 26 (2): p. 247-254, 1994.

LI, S., YANG, X., YANG, S., *et al.* **Technology Prospecting on Enzymes: Application, Marketing and Engineering**. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, vol. 2 (3): p. 2012.

LILLY, D. M. e STILLWELL, R. H. **Probiotics: Growth-Promoting Factors Produced by Microorganisms**. Science, vol. 147 (3659): p. 747-748, 1965.

LOCKWOOD, B. **Nutraceuticals**. London, UK: Pharmaceutical Press. vol. p. 426, 2007.

LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L., *et al.* **Protein measurement with the Folin Phenol reagent**. The Journal of Biological Chemistry, vol. 193 p. 265-275, 1951.

LUNIA, M. K., SHARMA, B. C., SHARMA, P., *et al.* **Probiotics Prevent Hepatic Encephalopathy in Patients With Cirrhosis: A Randomized Controlled Trial**. Clinical Gastroenterology and Hepatology, vol. 12 (6): p. 1003-1008.e1001, 2014.

LYND, L. R., WEIMER, P. J., ZYL, W. H. V., *et al.* **Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology**. Microbiology and Molecular Biology Reviews, vol. 66 (3): p. 506-577, 2002.

MAEDA, I., SHIMOHIGASHI, Y., KIHARA, H., *et al.* **Purification and Characterization of a Cellulose from the Giant Snail *Achatina fulica***. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, vol. 60 (1): p. 122-124, 1996.

MANNION, M. **Nutraceutical Revolution Continues at Foundation for Innovation in Medicine Conference**. American Journal of Natural Medicine, vol. 5 p. 30-33, 1998.

MARTEAU, P., CUILLERIER, E., MEANCE, S., *et al.* ***Bifidobacterium animalis* strain DN-173 010 shortens the colonic transit time in healthy women: a double-blind, randomized, controlled study**. Alimentary Pharmacology & Therapeutics, vol. 16 (3): p. 587-593, 2002.

MARTINELLI, L. A. e FILOSO, S. **Expansion of Sugarcane Ethanol Production in Brazil: Environmental and Social Challenges**. Ecological Applications, vol. 18 (4): p. 885-898, 2008.

MCCLEARY, B. V., NURTHEN, E., TARAVEL, F. R., *et al.* **Characterisation of the oligosaccharides produced on hydrolysis of galactomannan with beta-d-mannase**. Carbohydrate Research, vol. 118 (0): p. 91-109, 1983.

MCMILLAN, J. D. **Bioethanol production: Status and prospects**. Renewable Energy, vol. 10 (2-3): p. 295-302, 1997.

MENEZES, M. **Casos de meningite transmitida por caramujo se espalham por seis estados de três regiões.** Disponível em: <http://www.agencia.fiocruz.br/casos-de-meningite-transmitida-por-caramujo-se-espalham-por-seis-estados-de-tr%C3%AAs-regi%C3%B5es>. (2014). Acesso em: 13 jan, 2015.

MEULEN, R. V. D., ADRIANY, T., VERBRUGGHE, K., *et al.* **Kinetic Analysis of Bifidobacterial Metabolism Reveals a Minor Role for Succinic Acid in the Regeneration of NAD<sup>+</sup> through Its Growth-Associated Production.** Applied and Environmental Microbiology, vol. 72 (8): p. 5204-5210, 2006.

MICHELFEJLDER, A. J., LEE, K. C. e BADING, E. M. **Integrative Medicine and Gastrointestinal Disease.** Primary Care: Clinics in Office Practice, vol. 37 (2): p. 255-267, 2010.

MILLER, G. L. **Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar.** Analytical Chemistry, vol. 31 (3): p. 426-428, 1959.

MINEO, H., HARA, H., KIKUCHI, H., *et al.* **Various Indigestible Saccharides Enhance Net Calcium Transport from the Epithelium of the Small and Large Intestine of Rats In Vitro.** The Journal of Nutrition, vol. 131 (12): p. 3243-3246, 2001.

MIWA, A. C. P. **Comparação e avaliação dos métodos colorimétricos utilizados para determinação de proteínas em lagoas de estabilização.** Mestrado em Hidráulica e Saneamento, Universidade de São Paulo - Escola de Engenharia de São Carlos. 2003.

MOOD, S. H., GOLFESHAN, A. H., TABATABAEI, M., *et al.* **Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment.** Renewable and Sustainable Energy Reviews, vol. 27 (0): p. 77-93, 2013.

MORAES, F. P. e COLLA, L. M. **Alimentos Funcionais e Nutracêuticos: Definição, Legislação e Benefícios à Saúde.** 3: p. 109-122, 2006.

NAGANAGOUDA, K., SALIMATH, P. V. e MULIMANI, V. H. **Purification and Characterization of Endo- $\beta$ -1,4 Mannanase from *Aspergillus niger* for Application in Food Processing Industry.** Journal of Microbiology and Biotechnology, vol. 19 (10): p. 1184-1190, 2009.

NELSON, D. L. e COX, M. M. **Lehninger, Princípios de Bioquímica.** São Paulo: Sarvier. vol. p. 1009, 2006.

NEVES, L. O. D. Q. **Parecer Técnico DPC/PPP/ DDIV – nº: 003/03: Controle e erradicação do molusco exótico *Achatina fulica***. Disponível em: [http://www.institutohorus.org.br/download/marcos\\_legais/Parecer\\_0032003\\_DPC.pdf](http://www.institutohorus.org.br/download/marcos_legais/Parecer_0032003_DPC.pdf) . (2003). Acesso em: 10 de março, 2014.

NUGENT, S. G., KUMAR, D. e D.S., R. **Intestinal luminal pH in inflammatory bowel disease: possible determinants and implications for therapy with aminosalicylates and other drugs**. Gut, vol. 48 p. 571-577, 2001.

O'HARA, I. M. **Cellulosic ethanol from sugarcane bagasse in Australia: exploring industry feasibility through systems analysis, techno-economic assessment and pilot plant development**. PhD thesis, Queensland University of Technology. 2011.

O'DWYER, M. H. **The Structure of Hemicellulose B**. p. 149-152, 1939.

OGATA, D. C., GRECA, F. H., LUZ, M. D. A., *et al.* **Foco de criptas aberrantes e câncer da junção colorretal: análise da presença de lesões precoces microscópicas na periferia do câncer colorretal e correlação com a expressão da  $\beta$ -catenina e Ki-67**. Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões, vol. 37 p. 114-120, 2010.

OGEDA, T. L. e PETRI, D. F. S. **Hidrólise Enzimática de Biomassa**. Química Nova, vol. 33 p. 1549-1558, 2010.

PÉREZ, S. e SAMAIN, D. **Structure and Engineering of Celluloses**. Academic Press. Volume 64: p. 25-116, 2010.

POLETTO, M., PISTOR, V., ZENI, M., *et al.* **Crystalline properties and decomposition kinetics of cellulose fibers in wood pulp obtained by two pulping processes**. Polymer Degradation and Stability, vol. 96 (4): p. 679-685, 2011.

PRICE, N. P. J., HARTMAN, T. M., FABER, T. A., *et al.* **Galactoglucomannan Oligosaccharides (GGMO) from a Molasses Byproduct of Pine (*Pinus taeda*) Fiberboard Production**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 59 (5): p. 1854-1861, 2011.

RASTALL, B., HOTCHKISS, A., HUTKINS, B., *et al.* **Report from the Second Generation Prebiotics Working Group**. ISAPP Meeting. p. 2002.

RIDLEY, B. L., O'NEILL, M. A. e MOHNEN, D. **Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling**. *Phytochemistry*, vol. 57 (6): p. 929-967, 2001.

ROBERFROID, M. **Functional food concept and its application to prebiotics**. *Digestive and Liver Disease*, vol. 34, Supplement 2 p. S105-S110, 2002.

ROCHA, C. P. **Otimização da produção de enzimas po *Aspergillus niger* em fermentação em estado sólido**. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia. 2010.

ROEHR, M., KOSARIC, N., VARDAR-SUKAN, F., *et al.* **The Biotechnology of Ethanol: Classical and Future Applications**. Weinheim, Alemanha: WILEY-VCH. vol. p. 2001.

ROWE, W. A. e BAYLESS, T. M. **Colonic short-chain fatty acids: Fuel from the lumen?** *Gastroenterology*, vol. 103 (1): p. 336-338, 1992.

RUDOLF, A., BAUDEL, H., ZACCHI, G., *et al.* **Simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated bagasse using *Saccharomyces cerevisiae* TMB3400 and *Pichia stipitis* CBS6054**. *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 99 (4): p. 783-790, 2008.

RUSSELL, D. A., ROSS, R. P., FITZGERALD, G. F., *et al.* **Metabolic activities and probiotic potential of bifidobacteria**. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 149 (1): p. 88-105, 2011.

SANDGREN, M., STÅHLBERG, J. e MITCHINSON, C. **Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases: improved thermal stability, and ligand complexes**. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, vol. 89 (3): p. 246-291, 2005.

SANTOS, F. A., QUEIRÓZ, J. H. D., COLODETTE, J. L., *et al.* **Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol**. *Química Nova*, vol. 35 p. 1004-1010, 2012.

SAXENA, I. M., BROWN JR, R. M., NORIYUKI, M., *et al.* **Biosynthesis of cellulose**. Elsevier. Volume 18: p. 69-76, 2001.

SCHUSTER, E., DUNN-COLEMAN, N. e FRISVAD, J. C. **On the safety of *Aspergillus niger* - a review**. Applied and Microbiological Biotechnology, vol. 59 p. 426-435, 2002.

SCIENCELEARN. **Science Learning - Digestive enzymes**. Disponível em: <http://www.sciencelearn.org.nz/>. (2011). Acesso em: 16 de setembro, 2014.

SCOTT, K. P., GRATZ, S. W., SHERIDAN, P. O., *et al.* **The influence of diet on the gut microbiota**. Pharmacological Research, vol. 69 (1): p. 52-60, 2013.

SHIMIZU, M. e HACHIMURA, S. **Gut as a target for functional food**. Trends in Food Science & Technology, vol. 22 (12): p. 646-650, 2011.

SIBILEAU, E., BOULAY-COLETTA, I., JULLÈS, M. C., *et al.* **Appendicitis and diverticulitis of the colon: Misleading forms**. Diagnostic and Interventional Imaging, vol. 94 (7-8): p. 771-792, 2013.

SILVA, C., MATAMÁ, T., CAVACO-PAULO, A., *et al.* **Biotransformation of Synthetic Fibers**. John Wiley & Sons, Inc. p. 2009.

SIRÓ, I., KÁPOLNA, E., KÁPOLNA, B., *et al.* **Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance: A review**. Appetite, vol. 51 (3): p. 456-467, 2008.

SUN, M.-Z., ZHU, Y., GUO, C., *et al.* **A chitosanase purified from the snail of *Achatina fulica***. African Journal of Biotechnology, vol. 11 (44): p. 10242-10247, 2012.

SWEET, M. S. e WINANDY, J. E. **Influence of Degree of Polymerization of Cellulose and Hemicellulose on Strength of Treated Southern Pine**. Holzforschung, vol. 53 p. 311-317, 1999.

TAKATA, E., TSUTSUMI, K., TSUTSUMI, Y., *et al.* **Production of monosaccharides from napier grass by hydrothermal process with phosphoric acid**. Bioresource Technology, vol. 143 (0): p. 53-58, 2013.

THIENGO, S. **Caramujo africano: quais os reais riscos para a população?** Disponível em: [http://www.ioc.fiocruz.br/pages/informerede/corpo/informeemail/2007/1503/mat\\_01\\_15\\_03.htm](http://www.ioc.fiocruz.br/pages/informerede/corpo/informeemail/2007/1503/mat_01_15_03.htm). (2007). Acesso em: 13 jan, 2015.

TIBONI, M., GRZYBOWSKI, A., BALDO, G., *et al.* **Thermopressurized diluted phosphoric acid pretreatment of ligno(hemi)cellulose to make free sugars and nutraceutical oligosaccharides.** Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, vol. 41 (6): p. 957-964, 2014.

TILLISCH, K., LABUS, J., KILPATRICK, L., *et al.* **Consumption of Fermented Milk Product With Probiotic Modulates Brain Activity.** Gastroenterology, vol. 144 (7): p. 1394-1401, 2013.

TORTORA, G. J., FUNKE, B. R. e CASE, C. L. **Microbiologia.** Porto Alegre: Artmed. vol. p. 2012.

URDANETA, D., RAFFE, D., FERRER, A., *et al.* **Short-chain organic acids produced on glucose, lactose, and citrate media by Enterococcus faecalis, Lactobacillus casei, and Enterobacter aerogenes strains.** Bioresource Technology, vol. 54 (2): p. 99-103, 1995.

VAN WEEL, P. B. **The effect of special diets on the digestion processes (enzyme production and resorption) in the african giant snail, *Achatina fulica* Bowdich.** Zeitschrift für vergleichende Physiologie, vol. 42 p. 433-448, 1959.

VEIGA, P., PONS, N., AGRAWAL, A., *et al.* **Changes of the human gut microbiome induced by a fermented milk product.** Sci. Rep., vol. 4 p. 2014.

VICTOR III, D. W. e QUIGLEY, E. M. M. **Hepatic Encephalopathy Involves Interactions Among the Microbiota, Gut, Brain.** Clinical Gastroenterology and Hepatology, vol. 12 (6): p. 1009-1011, 2014.

WALKER, W. A. e DUFFY, L. C. **Diet and bacterial colonization: role of probiotics and prebiotics.** The Journal of Nutritional Biochemistry, vol. 9 (12): p. 668-675, 1998.

WANG, X., CHEN, Q. e LÜ, X. **Pectin extracted from apple pomace and citrus peel by subcritical water.** Food Hydrocolloids, vol. 38 (0): p. 129-137, 2014.

WARD JR., K. e MORAK, A. J. **Fractional Extraction and Properties of Hemicellulose.** Disponível em: <http://pac.iupac.org/publications/pac/pdf/1962/pdf/0501x0077.pdf>. (1962). Acesso em: 27 de fevereiro, 2014.

WESTSTRATE, J. A., POPPEL, G. V. e VERSCHUREN, P. M. **Functional foods, trends and future**. British Journal of Nutrition, vol. 88 (Suppl. 2): p. S233-S235, 2002.

WHO. **World Health Organization - Cancer Report**. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>. (2014a). Acesso em: 21 de fevereiro, 2014.

WHO. **World Health Organization - The top 10 causes of death**. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>. (2014b). Acesso em: 21 de fevereiro, 2014.

WU, G. D., BUSHMAN, F. D. e LEWIS, J. D. **Diet, the human gut microbiota, and IBD**. Anaerobe, vol. 24 (0): p. 117-120, 2013.

YOON, S.-H., MACEWAN, K. e VAN-HEININGEN, A. **Hot-water pre-extraction from loblolly pine (*Pinus Taeda*) in an integrated Forest products biorefinery**. Tappi, vol. p. 27-31, 2008.

ZAPAROLLI, D. **GranBio - Duas usinas de etanol celulósico entrarão em operação este ano no Brasil**. Disponível em: <http://www.novacana.com/n/etanol/2-geracao-celulose/usinas-etanol-celulosico-operacao-brasil-280414/>. (2014). Acesso em: 16 de setembro, 2014.

ZEISEL, S. H. **Regulation of Nutraceuticals**. Science, vol. 285 (5435): p. 1853-1858, 1999.

ZHANG, Z., DONALDSON, A. A. e MA, X. **Advancements and future directions in enzyme technology for biomass conversion**. Biotechnology Advances, vol. 30 (4): p. 913-919, 2012.

ZHU, J. Y. e PAN, X. J. **Woody biomass pretreatment for cellulosic ethanol production: Technology and energy consumption evaluation**. Bioresource Technology, vol. 101 (13): p. 4992-5002, 2010.

## APÊNDICE

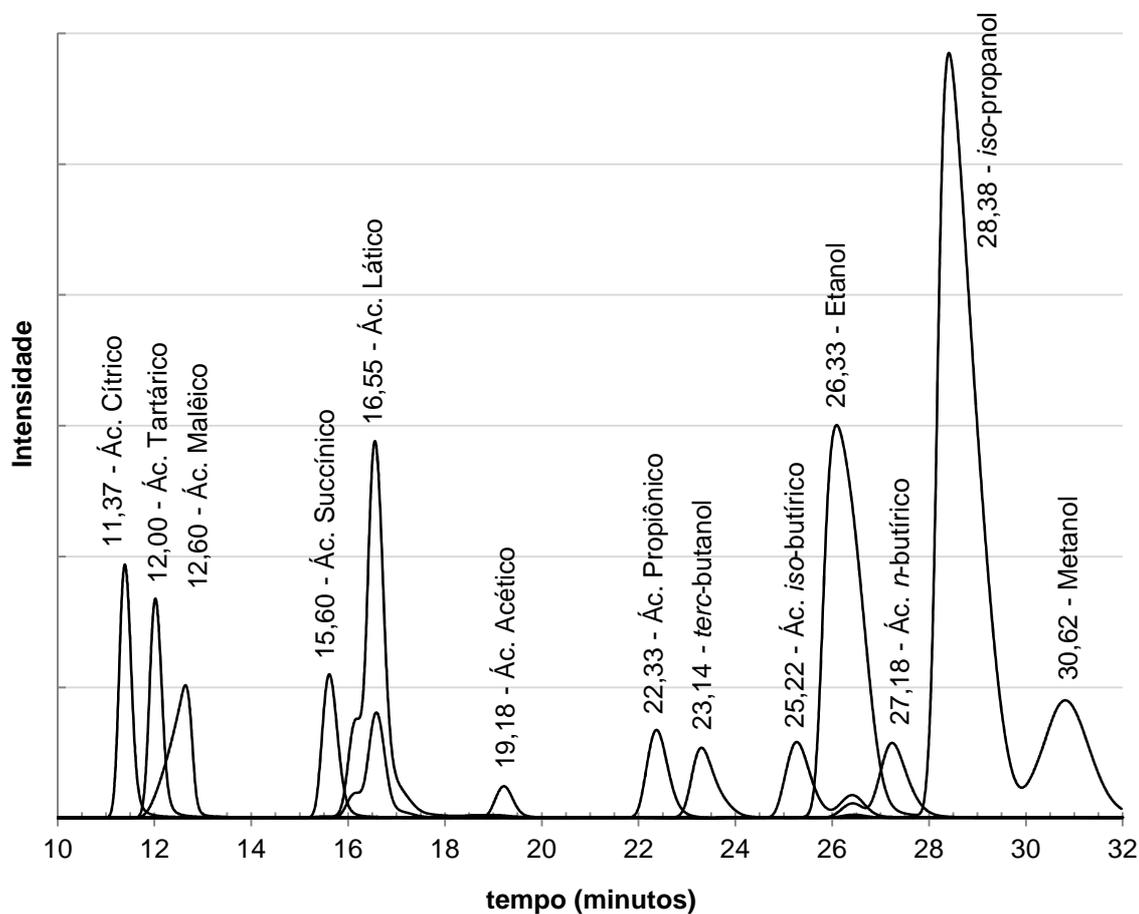


GRÁFICO 44 - CROMATOGRAMAS DOS PADRÕES DE ÁCIDOS ORGÂNICOS  
NOTA: Coluna ROA, FM ácido sulfúrico 8 mmol — Fluxo 0,5 mL/min — Detector RID.

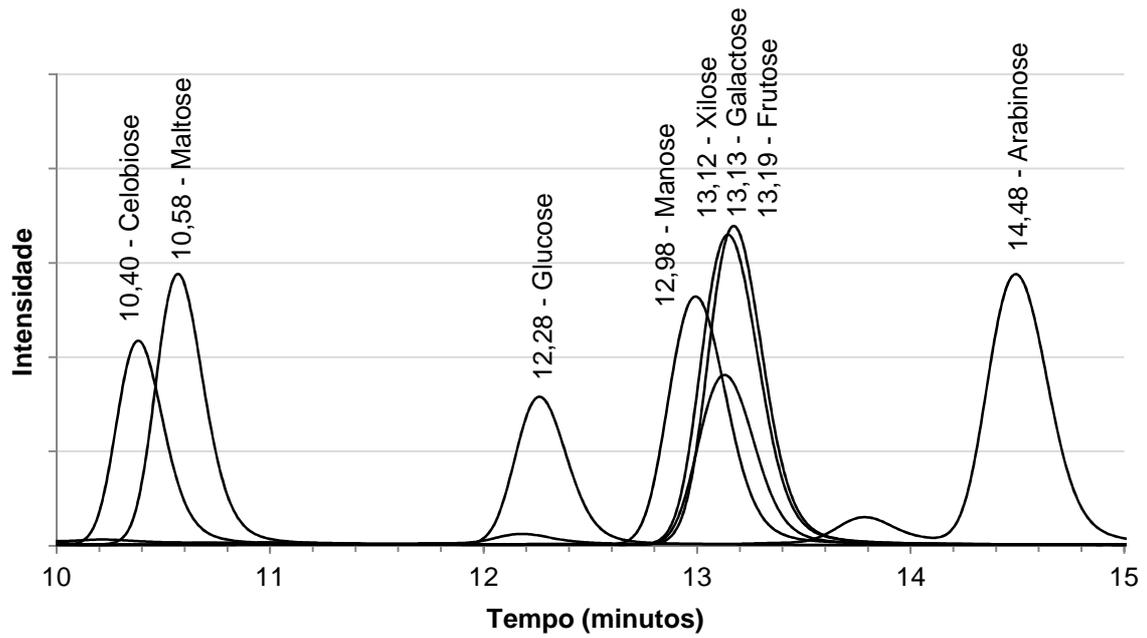


GRÁFICO 45 - CROMATOGRAMAS DOS PADRÕES DE AÇÚCARES

NOTA: Coluna ROA, FM ácido sulfúrico 8 mmol — Fluxo 0,5 mL/min — Detector RID.