



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA - RENORBIO

IRANILDO JOSÉ DA CRUZ FILHO

**UTILIZAÇÃO DA BIOMASSA DA PALMA FORRAGEIRA EM BIORREFINARIAS:
INVESTIGAÇÃO SOBRE O FRACIONAMENTO E TRANSFORMAÇÃO DOS
CARBOIDRATOS POR ROTA BIOQUÍMICA**

Recife

2021

IRANILDO JOSÉ DA CRUZ FILHO

**UTILIZAÇÃO DA BIOMASSA DA PALMA FORRAGEIRA EM
BIORREFINARIAS: INVESTIGAÇÃO SOBRE O FRACIONAMENTO E
TRANSFORMAÇÃO DOS CARBOIDRATOS POR ROTA BIOQUÍMICA**

Tese de doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia - RENORBIO da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia Industrial

Orientador: Profa. Dra. Ana Maria Souto-Maior

Recife

2021

Catálogo na Fonte:
Elaine C Barroso, CRB-4/1728

Cruz Filho, Iranildo José da

Utilização da biomassa da palma forrageira em biorrefinarias: investigação sobre o fracionamento e transformação dos carboidratos por rota bioquímica / Iranildo José da Cruz Filho – 2021.

144 f. : il., fig., tab.

Orientadora: Ana Maria Souto Maior

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Recife, 2021. Inclui referências e anexo.

1. Bioenergia 2. Palma forrageira 3. Recursos naturais renováveis I. Souto Maior, Ana Maria (orient.) II. Título

577.13

CDD (22.ed)

UFPE/CB-2021-244

IRANILDO JOSÉ DA CRUZ FILHO

**UTILIZAÇÃO DA BIOMASSA DA PALMA FORRAGEIRA EM BIORREFINARIAS:
INVESTIGAÇÃO SOBRE O FRACIONAMENTO E TRANSFORMAÇÃO DOS
CARBOIDRATOS POR ROTA BIOQUÍMICA**

Tese de doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia - RENORBIO da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia Industrial

Orientador: Prof.^a Dr.^a Ana Maria Souto-Maior

Aprovado em, 24 de fevereiro de 2021.

BANCA AVALIADORA

Prof.^a Dr.^a Ana Maria Souto Maior
Universidade Federal de Pernambuco
(Orientador)

Prof. Dr. Emmanuel Damilano Dutra
Universidade Federal de Pernambuco
(Examinador externo)

Prof. Dr. George Jackson de Moraes Rocha
Centro Brasileiro de Pesquisa em Energia e Materiais
(Examinador externo)

Prof.^a Dr.^a Marcia Silva do Nascimento
Universidade Federal de Pernambuco
(Examinador externo)

Prof. Dr. Rafael Matos Ximenes
Universidade Federal de Pernambuco
(Examinador interno)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida e por tudo que conquisei.

À Orientadora Prof.^a Ana Maria Souto-Maior pela paciência, dedicação, competência na orientação do trabalho, pelo companheirismo e amizade.

Ao Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA) por gentilmente ter cedido os cladódios das palmas utilizados neste trabalho.

Um agradecimento muito especial à Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e a todos os funcionários da Central Analítica do Departamento de Química Fundamental da UFPE pelo auxílio nas análises espectroscópicas.

Ao Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste pelas análises de DRX.

Ao Laboratório de Cromatografia industrial pertencente ao Departamento de Engenharia química da UFPE, pelas análises cromatográficas.

Ao Laboratório de Tecnologia Enzimática da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) por ceder a linhagem de *Aspergillus awamori*.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela provisão da bolsa de doutorado, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - Proc. 407918/2013-2) pelo auxílio financeiro.

Ao meu grupo de pesquisa do Laboratório de Processos Biotecnológicos do Departamento de Antibióticos da UFPE.

Aos funcionários e professores do Departamento de Antibióticos da UFPE.

À professora Dr.^a Cristiane Moutinho e a todos do Laboratório de Análises Imunológicas e Antitumorais do Departamento de Antibióticos da UFPE por todo auxílio com os estudos de atividade biológica das ligninas.

Ao professor Riccardo Spaccini e ao Centro de Pesquisa Interdepartamental em Ressonância Magnética (CERMANU-Itália) pelas análises das ligninas.

E a todos que contribuíram, de forma direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

“Não podemos mudar nosso passado nem prever nosso futuro, mas temos uma coisa a nosso favor; O presente. É nele que superamos o passado e construímos um futuro.”
Kassio Murta

RESUMO

A palma é uma forrageira totalmente adaptada às condições do semiárido, que representa grande parte da área da Região Nordeste, e têm contribuição significativa para a alimentação de rebanhos nesta região em períodos de estiagens. A palma, no entanto, tem um grande potencial para a diversificação de usos, e podem, em princípio, ser utilizadas como matéria-prima em biorrefinarias. Este trabalho tem como objetivo contribuir para o estudo do fracionamento da biomassa de cladódios de palma forrageira para a obtenção de bioprodutos. Inicialmente, foi realizada a caracterização da composição química das duas espécies de palma *O. ficus-indica* (palma gigante) e *O. cochenillifera* (palma miúda) pela adaptação de método utilizado rotineiramente para a caracterização de biomassas lignocelulósicas. Os resultados de composição química para *O. ficus-indica* e *O. cochenillifera* foram, respectivamente (%): celulose ($12,70 \pm 0,01$ e $22,19 \pm 0,01$); hemicelulose ($5,14 \pm 0,01$ e $3,63 \pm 0,01$); pectina ($33,40 \pm 0,05$ e $46,46 \pm 0,04$); lignina total ($18,30 \pm 1,00$ e $7,54 \pm 0,02$); extrativos ($16,31 \pm 0,8$ e $5,22 \pm 0,05$); e cinzas ($9,50 \pm 0,20$ e $5,30 \pm 0,30$). Em seguida, foi realizado o fracionamento da biomassa em escala de bancada em 4 etapas: (1) extração aquosa, para a separação do material péctico; (2) hidrólise ácida do material lignocelulósico, para a hidrólise da hemicelulose; (3) tratamento alcalino da celulignina, para a obtenção de lignina; (4) tratamento enzimático para a hidrólise da celulose. As composições química e morfológica dos sólidos (obtidos em cada etapa do fracionamento) foram determinadas por métodos espectroscópicos e cromatográficos. Também, foram caracterizadas as frações pécticas insolúvel e solúvel (precipitadas em etanol) e as ligninas (precipitadas em H_2SO_4) presentes nas frações líquidas. As conversões enzimáticas da celulose com enzimas comerciais, para ambas as espécies, ficaram em torno de 50% após 60 horas. Em geral, as pectinas dos cladódios de ambas as espécies apresentaram baixos teores de esterificação (<50%) e baixos pesos moleculares. As pectinas solúvel e insolúvel de *O. ficus-indica* se apresentaram mais esterificadas (48,79% e 46,69%) e de menores pesos moleculares ($17 \pm 0,1$ kDa e $21 \pm 0,1$ kDa) do que as de *O. cochenillifera* (44,17% e 42,34%; $25 \pm 0,3$ kDa e $27,02 \pm$ kDa). Como esperado, essas moléculas não apresentaram toxicidade frente a células animais e baixa atividade antioxidante. As ligninas são do tipo GSH e são estruturalmente semelhantes; cladódios de *O. ficus-indica* e *O. cochenillifera* apresentam, respectivamente, em sua composição: G (44% e 45%), S (37% e 19%) e H (40% e 15%). Além disso, as ligninas apresentaram atividade antioxidante e atividade imunoestimulatória em células animais. Finalmente, o extrato aquoso (obtido na etapa 1 do fracionamento) foi utilizado para avaliar o crescimento de linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* probiótica, e o hidrolisado ácido (obtido na etapa 2) foi utilizado para investigação sobre a produção de enzimas (pectinolítica, xilanolítica e celulolítica) por *Aspergillus awamori*. A linhagem de *S. cerevisiae* não foi capaz de utilizar a pectina como substrato. O hidrolisado ácido de *O. cochenillifera* induziu a maior produção de enzimas xilanolíticas pelo *A. awamori*. Sendo assim, a palma forrageira é uma matéria-prima promissora para ser utilizada em biorrefinarias.

Palavras-chave: bioenergia; palma forrageira; recursos naturais renováveis.

ABSTRACT

The palm is a forage totally adapted to the conditions of the semi-arid, which represents a large part of the area of the Northeast Region and has a significant contribution to the feeding of herds in this region during periods of drought. The palm, however, has great potential for diversifying uses, and can, in principle, be used as a raw material in biorefineries. This work aims to contribute to the study of the fractionation of the biomass of forage palm cladodes to obtain bioproducts. Initially, the chemical composition of the two palm species *O. ficus-indica* and *O. cochenillifera* was characterized by adapting the method routinely used to characterize lignocellulosic materials. The results of chemical composition for *O. ficus-indica* and *O. cochenillifera* were, respectively (%): cellulose (12.70 ± 0.01 and 22.19 ± 0.01); hemicellulose (5.14 ± 0.01 and 3.63 ± 0.01); pectin (33.40 ± 0.05 and 46.46 ± 0.04); total lignin (18.30 ± 1.00 and 7.54 ± 0.02); extractives (16.31 ± 0.8 and 5.22 ± 0.05); and ashes (9.50 ± 0.20 and 5.30 ± 0.30). Then, the biomass was fractionated on bench scale in 4 stages: (1) aqueous extraction, for the separation of the pectic material; (2) acid hydrolysis of the lignocellulosic material, for the hydrolysis of hemicellulose; (3) alkaline treatment of cellulignin, to obtain lignin; (4) enzymatic treatment for cellulose hydrolysis. The chemical and morphological compositions of the solid fractions (obtained at each stage of fractionation) were determined by spectroscopic and chromatographic methods. Also, insoluble and soluble pectins (precipitated in ethanol) and lignins (precipitated in H_2SO_4) present in the liquid fractions were characterized. The enzymatic conversions of cellulose with commercial enzymes, for both species, were around 50% after 60 hours. In general, the pectins of the cladodes of both species showed low levels of esterification (<50%) and low molecular weights. The soluble and insoluble pectins of *O. ficus-indica* were more esterified (48.79% and 46.69%) and of lower molecular weights (17 ± 0.1 kDa and 21 ± 0.1 kDa) than those of *O. cochenillifera* (44.17% and 42.34%; 25 ± 0.3 kDa and $27.02 \pm$ kDa). As expected, these molecules showed no toxicity to animal cells and low antioxidant activity. Lignins are of the GSH type and are structurally similar; cladodes of *O. ficus-indica* and *O. cochenillifera* have, respectively, in their composition: G (44% and 45%), S (37% and 19%) and H (40% and 15%). In addition, lignins showed antioxidant and immunostimulatory activity in animal cells. Finally, the aqueous extract (obtained in step 1 of fractionation) was used to evaluate the growth of a probiotic strain of *Saccharomyces cerevisiae*, and the acid hydrolyzate (obtained in step 2) was used to investigate the production of enzymes (pectinolytic, xylanolytic and cellulolytic) by *Aspergillus awamori*. *S. cerevisiae* strain was not able to use pectin as a substrate. The acid hydrolyzate of *O. cochenillifera* induced the highest production of xylanolytic enzymes by *A. awamori*. Thus, forage palm is a promising raw material to be used in biorefineries.

Keywords: bioenergy; forage palm; renewable natural resources.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Esquema simplificado de uma biorrefinaria utilizando a biomassa renovável como matéria-prima para obtenção de diferentes produtos de alto valor agregado.	24
Figura 2-	Estrutura química da biomassa vegetal, representação dos componentes presentes na parede celular primária (A) e secundária (B).....	26
Figura 3 -	Estrutura da celulose, mostrando uma sequência de glicose (A) e os modelos antigo (B) e atual (C) da estrutura.....	26
Figura 4-	Representação das diferentes estruturas das hemiceluloses (xilanas) arabinoglucuroxilano (A) glucuronoxilano acetilado (B) glucuronoarabinoxilano acetilado (C).....	28
Figura 5 -	Representação das possíveis estruturas químicas para a pectina, evidenciando os principais monossacarídeos.....	29
Figura 6 -	Representação química da lignina, ligações químicas e unidades, guaiacila, siringila e <i>p</i> -hidroxifenila.....	30
Figura 7 -	Etapas de fracionamento da biomassa vegetal para a obtenção dos seus principais constituintes.....	33
Figura 8 -	Representação esquemática da ação catalítica do complexo enzimático (celulases) sobre celulose com geração de glicose.....	35
Figura 9 -	Estrutura química da xilana e mecanismo de hidrólise enzimática das xilanases.....	37
Figura 10 -	Modelo de ação de diferentes pectinases na hidrólise da pectícas.....	38
Figura 11 -	Espécies de <i>Opuntia ficus-indica</i> (A) e <i>Opuntia cochenillifera</i> (B), mostrando os cladódios estruturas características dessas espécies.....	43
Figura 12 -	Diferentes potencialidades dos diferentes constituintes presentes nas biomassas de <i>Opuntia</i>	45
Figura 13 -	Cladódios de <i>O. ficus-indica</i> (A) e <i>O. cochenillifera</i> (B) <i>in natura</i> e cladódios secos e moídos (C) e (D).....	46
Figura 14 -	Fluxograma geral mostrando as etapas realizadas durante o fracionamento da biomassa.....	48
Figura 15 -	Diluição seriada (A) e crescimento de leveduras em placas de Petri (B).....	60

Figura 16 -	Biorreator utilizado para produção de enzimas (New Brunswick Scientific, Bioflo 1100).	63
Figura 17-	Solubilização dos componentes dos cladódios de <i>O. ficus-indica</i> (A) e <i>O. cochenillifera</i> (B) após as etapas de fracionamento.....	76
Figura 18-	Espectros de FTIR das biomassas de <i>O. ficus-indica in natura</i> e após as etapas de fracionamento.....	77
Figura 19-	Espectros de FTIR das biomassas de <i>O. cochenillifera in natura</i> e obtidas após as etapas de fracionamento.....	77
Figura 20 -	Difratogramas de raios-X das biomassas de <i>O. ficus-indica in natura</i> e dos sólidos obtidos após as etapas de fracionamento.....	78
Figura 21-	Difratogramas de raios-X das biomassas de <i>O. cochenillifera in natura</i> e dos sólidos obtidos após as etapas de fracionamento.....	79
Figura 22-	Micrografias dos cladódios de <i>O. ficus-indica in natura</i> (A e E), e os submetidos a extração Aquosa (B e F), pré-tratamento ácido (C e G) e a deslignificação alcalina (D e H)	80
Figura 23 -	Micrografias dos cladódios de <i>O. cochenillifera in natura</i> (A e E), e os submetidos a extração Aquosa (B e F), pré-tratamento ácido (C e G) e a deslignificação alcalina (D e H)	80
Figura 24-	Perfis de concentrações de celobiose (A e B) e glicose (C e D) para as biomassas <i>in natura</i> e os sólidos obtidos durante o fracionamento de <i>O. ficus-indica</i> e <i>O. cochenillifera</i>	82
Figura 25 -	Perfis de conversão de celulose em glicose para as biomassas <i>in natura</i> das biomassas obtidas durante o fracionamento de <i>O. ficus-indica</i> (A) e <i>O. cochenillifera</i> (B).....	83
Figura 26-	Perfil de consumo de substrato, crescimento microbiano e produção de obtidos durante o processo de fermentação alcoólica de hidrolisado enzimático para os cladódios deslignificados de <i>O. ficus-indica</i> (A) e <i>O. cochenillifera</i> (B).	85
Figura 27-	Espectro de infravermelho para as amostras das frações pécticas solúvel, OFS, e insolúvel, OFI, para <i>O. ficus-indica</i> (A) e para as das frações pécticas solúvel, OCS, e insolúvel, OCI, para <i>O. cochenillifera</i> (B).....	88

Figura 28-	Espectros de RMN ¹ H para as frações pécnicas dos cladódios das espécies <i>O. ficus-indica</i> , solúvel (A) e insolúvel (B), e <i>O. cochenillifera</i> , solúvel (C) e insolúvel (D).....	90
Figura 29-	Viabilidade de esplenócitos de camundongos avaliada pela marcação com iodeto de propídio (necrose, em preto) e em cinza o controle positivo sem as pectinas, contendo DMSO 100%. Para as diferentes frações pécnicas de <i>O. ficus-indica</i> : solúvel e insolúvel (A e B) e <i>O. cochenillifera</i> : solúvel e insolúvel (C e D) respectivamente	92
Figura 30-	Índice de proliferação de esplenócitos de camundongos avaliado por coloração com CFSE. As barras brancas verticais representam células de controle negativo (células + meio de cultura) e barras verticais escuras representam os ensaios células e as frações pécnicas de <i>O. ficus-indica</i> : solúvel e insolúvel (A e B) e <i>O. cochenillifera</i> : solúvel e insolúvel (C e D).	92
Figura 31-	Avaliação da produção de enzimas pectinolíticas pela levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> UFPEDA 1015, para as frações pécnicas solúveis (A, C) e insolúveis (B, D) de <i>Opuntia ficus-indica</i> e <i>Opuntia cochenillifera</i> , respectivamente, pelo método do halo.....	93
Figura 32-	Cinética de crescimento de levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> UFPEDA 1015, utilizando a fração pécnica solúvel de <i>O. ficus-indica</i> (A) e <i>O. cochenillifera</i> (C). Representação da fase exponencial utilizando <i>O. ficus-indica</i> (A) e <i>O. cochenillifera</i> (C) respectivamente.	94
Figura 33-	Avaliação do crescimento da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> UFPEDA 1015 em diferentes condições: variação de pH (A), bile bovina (B) e em suco gástrico (C) utilizando as frações solúveis de <i>O. ficus-indica</i> (OFI) e <i>O. cochenillifera</i> (OC) e meio de cultura quimicamente definido (CD).	96
Figura 34-	Cinética de crescimento o fungo <i>Aspergillus awamori</i> , crescido me hidrolisado ácido a base de <i>O. ficus-indica</i> (A) e <i>O. cochenillifera</i> (C). Representação da fase exponencial utilizando <i>O. ficus-indica</i> (B) e <i>O. cochenillifera</i> (D) respectivamente.	97
Figura 35 -	0Produção de enzimas microbianas pelo <i>A. awamori</i> durante 96 horas de cultivo em meio a base de hidrolisado ácido de <i>O. ficus-indica</i> (A) e <i>O.</i>	

	<i>cochenillifera</i> (B) e crescimento microbiano em <i>O. ficus-indica</i> (C) e <i>O. cochenillifera</i> (B) respectivamente.	98
Figura 36-	Espectro FTIR das ligninas <i>O. ficus-indica</i> (OFI) e <i>O. cochenillifera</i> (OC).....	100
Figura 37-	Espectros de absorção UV/Vis das ligninas <i>O. ficus-indica</i> (OFI) e <i>O. cochenillifera</i> (OC) e suas respectivas curvas analíticas.....	102
Figura 38 -	Espectro de ¹³ C-CPMAS-RMN das ligninas de <i>O. ficus-indica</i> (OFI) e <i>O. cochenillifera</i> (OC).....	103
Figura 39-	- Espectro de ¹ H-RMN da lignina acetilada das ligninas <i>O. ficus-indica</i> (OFI) e <i>O. cochenillifera</i> (OC).....	105
Figura 40 -	Cromatograma de permeação em gel da coluna Sephadex G-50 das ligninas de <i>O. ficus-indica</i> (OFI) e <i>O. cochenillifera</i> (OC).....	108
Figura 41-	Gráficos de radar para comparação de ligninas de <i>O. ficus-indica</i> (OFI) e <i>O. cochenillifera</i> (OC).....	109
Figura 42-	Investigação de morte celular promovida por ligninas utilizando anexina V e coloração com iodeto de propídio. (A) - Morte celular promovida por lignina de <i>O. ficus-indica</i> e lignina de <i>O. cochenillifera</i> (B).....	111
Figura 43-	Índice de proliferação de esplenócitos de camundongos avaliado por coloração com CFSE. (A) e (B)- A lignina de <i>O. ficus-indica</i> induziu maior proliferação em linfócitos de camundongos Balb/c em 24 e 48 horas de incubação. (C) e (D).....	112
Figura 44-	Medição do estresse oxidativo promovida por ligninas de <i>O. ficus-indica</i> e <i>O. cochenillifera</i> . Produção de EROS citosólico (A) e mitocondrial (B) cálcio citosólico (D) e potencial de membrana (D).....	113
Figura 45-	Efeito das ligninas da <i>O. ficus-indica</i> (A) e <i>O. cochenillifera</i> (B) na produção de óxido nítrico (NO) em esplenócitos de camundongos em um período de 24 e 48 horas.....	115
Figura 46-	Fluxograma do fracionamento e caracterização dos constituintes da palma gigante (<i>O. ficus-indica</i>)	117
Figura 47-	Fluxograma do fracionamento e caracterização dos constituintes da palma miúda (<i>O. cochenillifera</i>)	118

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Métodos para determinação do teor dos principais constituintes presentes na biomassa vegetal.....	40
Tabela 2-	Diferentes métodos de análise por imagens que podem ser utilizados para a avaliação da estrutura de diferentes biomassas vegetais antes e após o fracionamento.....	41
Tabela 3-	Métodos analíticos para caracterização de biomassas vegetais, análise, exemplo de uso, vantagens e desvantagens.....	42
Tabela 4-	Fatores de conversão dos componentes precursores de Celulose, Hemicelulose e pectinas.....	51
Tabela 5-	Meio de esporulação.....	62
Tabela 6-	Composição do meio de preparação de inóculo.....	62
Tabela 7-	Composição química dos cladódios de <i>O. ficus-indica in natura</i> e das biomassas obtidas depois de cada etapa de fracionamento, em base seca, juntamente com o balanço dematerial.....	74
Tabela 8-	Composição química dos cladódios de <i>O. cochenillifera in natura</i> e das biomassas obtidas depois de cada etapa de fracionamento, em base seca, juntamente com o balanço de material.	74
Tabela 9 -	Índice de cristalinidade das biomassas de <i>O. ficus-indica</i> e <i>O. cochenillifera in natura</i> e obtidas após as etapas de fracionamento.....	79
Tabela 10-	Composição química dos monossacarídeos, das frações pécticas de <i>O. ficus-indica solúvel</i> (OFS) e insolúvel (OFI), e <i>O. cochenillifera</i> , solúvel (OCS) e insolúvel (OCI), obtidos durante a hidrólise em TFA.....	86
Tabela 11-	Peso molecular viscosimétrico das frações pécticas solúveis e insolúveis de <i>O. ficus-indica</i> e <i>O. cochenillifera</i>	87
Tabela 12-	Principais bandas de FTIR presentes nas frações pécticas.....	89
Tabela 13-	Valores de atividade antioxidante das frações pécticas solúveis e insolúveis de <i>O. ficus-indica</i> e <i>O. cochenillifera</i> , em comparação com antioxidantes comerciais.....	91
Tabela 14-	Composição química dos açúcares livres e pectinas presentes nas frações líquidas de <i>O. ficus-indica</i> e <i>O. cochenillifera</i>	94
Tabela 15-	Composição do hidrolisado ácido de <i>O. ficus-indica</i> (OFI) e <i>O. cochenillifera</i> (OC) antes e após hidrólise ácida com ácido sulfúrico a 4%...	96

Tabela 16-	Produção de enzimas em meio de cultura utilizando o hidrolisado ácido (Hemicelulósico).....	99
Tabela 17-	Atribuições de bandas de espectros de absorção de infravermelho, características das ligninas de <i>O. ficus-indica</i> (OFI) e <i>O. cochenillifera</i> (OC).....	101
Tabela 18 -	Distribuição relativa (%) da área do sinal nas regiões de deslocamento químico (ppm) nos espectros de RMN ¹³ C-CPMAS, de <i>O. ficus-indica</i> (OFI) e <i>O. cochenillifera</i> (OC).....	103
Tabela 19-	Atribuições de sinais no espectro de RMN ¹ H da lignina acetilada de <i>O. ficus-indica</i> e <i>Opuntia cochenillifera</i>	106
Tabela 20-	Dados da análise elementar das ligninas <i>O. ficus-indica</i> e <i>O. cochenillifera</i> e ligninas acetiladas (Act).....	106
Tabela 21-	Produtos identificados por THM para as ligninas de <i>O. ficus-indica</i> (OFI) e <i>O. cochenillifera</i> (OC).....	107
Tabela 22-	Valores de média ponderada (Mw), peso molecular médio (Mn) e a polidispersividade (Mw/Mn) das ligninas de <i>O. ficus-indica</i> e <i>O. cochenillifera</i>	109
Tabela 23-	Produção de produtos fenólicos monoméricos (Si, V e H) obtidos por oxidação com nitrobenzeno (NO) de ligninas de <i>O. ficus-indica</i> (OFI) e <i>O. cochenillifera</i> (OC).....	109
Tabela 24-	Resultados dos fenóis totais e diferentes atividades antioxidantes promovidas pelas ligninas <i>O. ficus-indica</i> e <i>O. cochenillifera</i>	110
Tabela 25-	Produção de citocinas promovida por ligninas de <i>O. ficus-indica</i> e <i>O. cochenillifera</i> a 6, 25 µg /mL por 24 e 48 horas de incubação de esplenócitos.....	114

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAT	Atividade antioxidante total
ABTS	2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
Act	Acetilado
ANOVA	Análise de variância
ATR-FTIR	Espectroscopia de reflexão total atenuada no infravermelho com transformada de Fourier
CAGR	Taxa de crescimento anual composta
CBA	Kit de determinação e quantificação de citocinas
CDCl₃	Clorofórmio deuterado
CFSE	Éster succinimidílico de diacetato de carboxifluoresceína
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CMC	Carboximetilcelulose
CTec2	Complexo enzimático celulósico comercial
$\Delta\Psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial
D₂O	Água deuterada
DE	Grau de esterificação
DHE	Dihidroetídio
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
DRX	Difratometria de raios-X
EAG	Equivalentes de ácido gálico
EROS	Espécies reativas de oxigênio
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FPU	Unidade de papel de filtro
FTIR	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
GC/MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
GPC	Cromatografia de permeação em gel
HMF	5-Hidroximetilfurfural
HTec2	Complexo enzimático celulósico comercial
IC₅₀	Concentração inibitória ou equivalente mínima do antioxidante para sequestrar 50% dos radicais iniciais.
LPB	Laboratório de Processos Biotecnológicos

μ_{\max}	Velocidade de crescimento
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
Mn	peso molecular médio numérico
Mw	peso molecular médio ponderado
Mw/Mn	Dispersibilidade
NO	Óxido nítrico
OC	<i>Opuntia cochenillifera</i>
OFI	<i>Opuntia ficus-indica</i>
PBS	Tampão fosfato-salino
PE	Ficoeritrina
PI	Iodeto de propídio
RMN CPMAS de ^{13}C	Ressonância magnética nuclear de ^{13}C com polarização cruzada e rotação no ângulo mágico
RMN de ^{13}C	Ressonância magnética nuclear de carbono
RMN de ^1H	Ressonância magnética nuclear de prótons
rpm	Rotações por minuto
THM	Termoquimólise
UI	Unidade internacional
UV/Vis	Ultravioleta/visível

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	OBJETIVOS	23
2.1	OBJETIVO GERAL.....	23
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
3.1	BIORREFINARIAS.....	24
3.2	BIOMASSA VEGETAL COMO MATÉRIA-PRIMA DAS BIORREFINARIA.....	25
3.2.1	Celulose	26
3.2.2	Hemicelulose	27
3.2.3	Pectinas	29
3.2.4	Ligninas	30
3.2.5	Extrativos, cinzas e água	31
3.3	FRACIONAMENTO DAS BIOMASSAS VEGETAIS.....	32
3.3.1	Extração Aquosa	33
3.3.2	Pré-tratamento com ácido diluído	33
3.3.3	Deslignificação Alcalina	34
3.3.4	Hidrólise enzimática da celulose	35
3.4	UTILIZAÇÃO DE ENZIMAS FÚNGICAS (PECTINASE, XILANASES E CELULASES) EM BIORREFINARIAS.....	36
3.5	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS BIOMASSAS <i>IN</i> <i>NATURA</i> E DOS SÓLIDOS OBTIDOS APÓS O FRACIONAMENTO.....	39
3.5.1	Análise composicional	39
3.5.2	Caracterização por imagem	40
3.5.3	Caracterização físico-química	41
3.6	PALMA FORRAGEIRA.....	43
4	MATERIAIS E MÉTODOS	46
4.1	BIOMASSA DE <i>OPUNTIA</i>	46
4.2	FRACIONAMENTO DA BIOMASSA DE <i>OPUNTIA</i>	46
4.3	ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA BIOMASSA (<i>IN NATURA</i> E FRACIONADA).....	48
4.3.1	Determinação do teor de extrativos dos cladódios <i>in natura</i>	49

4.3.2	Determinação do teor de umidade.....	49
4.3.3	Hidrólise ácida (H ₂ SO ₄ 72% v/v) das biomassas de <i>Opuntia</i>	49
4.3.4	Determinação do teor de lignina solúvel.....	50
4.3.5	Determinação de carboidratos, ácido orgânicos, HMF (5-hidroximetilfurfural) e Furfural na fração líquida.....	50
4.3.6	Determinação de lignina insolúvel em meio ácido, teor de cinzas de lignina e cinzas totais.....	51
4.3.7	Hidrólise química e quantificação dos constituintes presentes nos carboidratos não fibrosos, hemicelulose e ligninas.....	52
4.4	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS BIOMASSAS E MACROMOLÉCULAS OBTIDAS.....	53
4.4.1	Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	53
4.4.2	Espectroscopia no Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	53
4.4.3	Difração de raios-X – (DRX).....	54
4.4.4	Análises por espectroscopia de RMN (¹³ C CPMAS e ¹ H)	55
4.4.5	Análise elementar e determinação da fórmula mínima.....	56
4.4.6	Determinação do peso molecular médio (Mw).....	56
4.4.7	Espectroscopia UV-Vis.....	57
4.4.8	Determinação de guaiacila, siringila e <i>p</i> -hidroxifenila presentes na lignina por termoquimólise -gás-cromatografia-massa-espectrometria (THM-GC MS).....	57
4.4.9	Gráficos radar para a comparação das ligninas	58
4.5	PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS.....	58
4.5.1	Obtenção e manutenção das linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	58
4.5.2	Hidrólise enzimática das biomassas in natura e fracionadas e cultivo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> no hidrolisado enzimático.....	58
4.5.3	Cinética de crescimento e produção de enzimas pectinolíticas pela levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> UFPEDA 1015 em meios a base de frações pectica.....	59
4.5.4	Avaliação do crescimento da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> UFPEDA em diferentes valores de pH, concentração de bile e suco gástrico.....	61

4.5.5	Obtenção e manutenção das linhagens de <i>A. awamori</i>	62
4.5.6	Cultivos em Biorreator: Cultivos em Biorreator: produção de enzimas industriais utilizando meio a base de hidrolisado ácido (Hemicelulósico).....	62
4.5.7	Concentração de biomassa.....	63
4.5.8	Atividade Pectinolítica.....	63
4.5.9	Atividade Pectina Liase.....	64
4.5.10	Atividade Pectina Metilesterase.....	64
4.5.11	Atividade da enzima poligalacturonase.....	64
4.5.12	Atividade Xilanase.....	65
4.5.13	Atividade em carboximetilcelulose (CMCase).....	65
4.5.14	Atividade FPase.....	66
4.5.15	Atividade de β -glicosidase.....	66
4.6	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	67
4.6.1	Atividade Antioxidante por fosfomolibdênio.....	67
4.6.2	Atividade de eliminação de radicais DPPH.....	67
4.6.3	Atividade de eliminação de cátions radicais 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS)).....	68
4.6.4	Atividade de eliminação de radicais de óxido nítrico.....	68
4.6.5	Determinação de fenóis totais.....	69
4.7	ATIVIDADE BIOLÓGICA: CITOTOXICIDADE, PROLIFERAÇÃO E IMUNOESTIMULAÇÃO.....	69
4.7.1	Animais.....	69
4.7.2	Obtenção dos esplenócitos.....	70
4.7.3	Análise da viabilidade celular por Anexina V-FITC e Coloração com Iodeto de Propídio (PI).....	70
4.7.4	Análise de proliferação celular usando coloração CFSE.....	71
4.7.5	Determinação dos níveis de EROS citosólicos e mitocondriais.....	71
4.7.6	Determinação das concentrações citosólicas de Ca^{2+}	71
4.7.7	Determinação do potencial transmembrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) em esplenócitos de camundongo.....	72
4.7.8	Determinação da produção de citocinas utilizando o kit Cytometric Bead Array (CBA).....	72

4.7.9	Análise <i>in vitro</i> de nitritos presentes nos sobrenadantes de cultura dos esplenócitos de camundongos BALB/c	73
4.8	Análise estatística	73
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
5.1	ANÁLISE COMPOSICIONAL DAS BIOMASSAS <i>IN NATURA</i> DOS SÓLIDOS OBTIDOS DURANTE O FRACIONAMENTO	74
5.2	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA: ANÁLISES ESTRUTURAIS DAS BIOMASSAS <i>IN NATURA</i> E APÓS FRACIONAMENTO	76
5.2.1	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier	76
5.2.2	Difração de raios X (DRX)	78
5.2.3	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	80
5.3	ENZIMÁTICA DOS CLADÓDIOS <i>IN NATURA</i> E DAS BIOMASSAS OBTIDAS DURANTE O FRACIONAMENTO	81
5.4	CULTIVO DA LEVEDURA <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> EM HIDROLISADO ENZIMÁTICO	84
5.5	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, ATIVIDADES BIOLÓGICAS, ANTIOXIDANTE E CRESCIMENTO DE LEVEDURAS <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> DAS FRAÇÕES PÉCTICAS DE <i>OPUNTIA FICUS-INDICA</i> E <i>OPUNTIA COCHENILLIFERA</i>	86
5.5.1	Composição química: determinação dos monossacarídeos das frações pecticas	86
5.5.2	Massa molecular viscosimétrica	87
5.5.3	Espectroscopia de Absorção no Infravermelho com transformada de Fourier-(FTIR) e Espectroscopia de Ressonância Nuclear Magnética ¹H	88
5.5.4	Atividade antioxidante promovidas pelas frações pecticas	90
5.5.5	Ensaio de citotoxicidade e proliferação <i>in vitro</i> promovida pelas frações de carboidratos não fibrosos	91
5.5.6	Utilização das frações pecticas solúveis como substrato para a avaliação do crescimento da levedura <i>S. cerevisiae</i> UFPEDA 1015	93

5.6	PRODUÇÃO DE ENZIMAS INDUSTRIAIS POR <i>ASPERGILLUS AWAMORI</i> EM MEIO DE CULTIVO À BASE DE HIDROLISADO ÁCIDO (HEMICELULÓSICO) DE PALMA FORRAGEIRA.....	96
5.6.1	Composição química do hidrolisado ácido <i>Opuntia</i>	96
5.6.2	Cinética de crescimento e produção de enzimas pelo fungo <i>Aspergillus awamori</i>	97
5.7	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, CITOTÓXICA E IMUNOMODULATÓRIA DAS LIGNINAS DE <i>OPUNTIA FICUS-INDICA</i> E <i>OPUNTIA COCHENILLIFERA</i>	100
5.7.1	Análise de FTIR e UV/Visível de ligninas.....	100
5.7.2	Espectroscopia de RMN e análise elementar.....	103
5.7.3	Termoquimólise e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (THM-GC-MS).....	107
5.7.4	Peso molecular.....	108
5.7.5	Utilização da ferramenta Radar de lignina para classificação de ligninas.	109
5.7.6	Atividade antioxidante obtida das ligninas <i>Opuntia cochenillifera</i> e <i>Opuntia ficus-indica</i>	110
5.7.7	Ensaio de ativação, proliferação e produção de citocinas em esplenócitos de camundongos.....	111
5.7.8	Alterações nas EROs, nos níveis de cálcio citosólico e no potencial de membrana mitocondrial por duas ligninas em esplenócitos de camundongos.....	113
5.7.9	Produção de citocinas e liberação de NO, investigados em sobrenadantes de culturas de esplenócitos de camundongos.....	114
5.8	VISÃO GERAL DA BIORREFINARIA DE <i>OPUNTIA FICUS-INDICA</i> E <i>OPUNTIA COCHENILLIFERA</i> PROPOSTA NESTE TRABALHO.....	116
6	CONCLUSÃO.....	119
7	PERSPECTIVAS FUTURAS	120
8	REFERÊNCIAS.....	121
9	APÊNDICE I: ARTIGO PUBLICADO	144

1 INTRODUÇÃO

O crescimento contínuo da população global e o aumento da demanda por alimentos, energia e água representam um grande desafio para o mundo nas próximas décadas (CHERUBINI, 2010). Conseqüentemente, o uso de fontes renováveis tem se tornado o foco de atenção científico-industrial (PARADA; OSSEWEIJER; DUQUE, 2017). Isto porque, as matérias-primas, atualmente utilizadas, além de não serem renováveis, podem impactar negativamente o meio ambiente devido a grande quantidade de poluentes gerados durante os processos industriais (CHERUBINI, 2010).

Neste contexto, pesquisas utilizando matérias-primas renováveis para a obtenção de produtos com alto valor agregado são essenciais para diversificar o mercado global e reduzir a fabricação de produtos derivados do petróleo (ONDREY, 2006; RAGAUSKAS et al. 2006). Nos anos de 2010-2019 foram investidos em tecnologias sustentáveis US\$ 2,6 trilhões e os maiores investidores mundiais foram China, Estados Unidos e Japão (AJADI et al. 2020). Frente a versatilidade de produtos que podem ser obtidos, a biomassa vegetal tem se tornado uma matéria-prima promissora e sustentável para a substituição de produtos provenientes do petróleo (CHERUBINI, 2010; RAGAUSKAS et al. 2014).

A utilização de biomassas está condicionada ao conhecimento de sua estrutura química. Estas são constituídas por: celulose, polioses, lignina, extrativos e sais minerais onde seus teores e/ou estrutura química podem variar de acordo com a fonte, método de extração, sazonalidade e condições climáticas (FENGEL; WEGENER, 1984; CAFFAL; MOHNEN, 2009; VORAGEN et al. 2009). Visando a utilização de todos os constituintes de forma sustentável, tem-se empregado o conceito de biorrefinaria, onde a biomassa é integralmente processada ou fracionada, por diferentes rotas química, bioquímica ou termoquímica (SIQUEIRA et al. 2020). Entretanto, devido a sua complexidade estrutural, muitos dos processos de fracionamento e recuperação de seus constituintes ainda precisam ser otimizados (CHERUBINI, 2010; RAGAUSKAS et al. 2014; PARAJULI et al. 2015; SIQUEIRA et al. 2020).

O Brasil é um país em potencial para a utilização das biomassas vegetais, isto porque, apresenta vasta biodiversidade (espécies vegetais) e grande extensão territorial (SILVA et al. 2020). Além disso, é um dos maiores produtores agroindustriais, em 2018 foram produzidos aproximadamente 2 bilhões de toneladas de biomassas (SILVA et al. 2020; IBGE, 2020).

Neste cenário de utilização da biomassa vegetal, a palma forrageira vem ganhando destaque por apresentar diversas aplicações, sendo uma alternativa promissora de uso para o semiárido. As duas espécies mais cultivadas são, *Opuntia ficus-indica* (Linnaeus) Miller e *Opuntia cochenillifera* (Linnaeus) Miller, conhecidas como palma gigante e palma miúda, respectivamente (EL-MOSTAFA et al. 2014; NASCIMENTO et al. 2016; ALENCAR 2018).

Estas plantas são adaptadas a região semiárida do nordeste brasileiro e vem sendo utilizadas como alimento nos períodos de estiagem, isto porque, são ricas em água e apresentam em sua composição química fibras, vitaminas, aminoácidos e sais minerais (CHIACCHIO; MESQUITA; SANTOS, 2006; SANTOS et al. 2006; NUNES, 2011; EL-MOSTAFA et al. 2014).

A palma forrageira, no entanto, tem um grande potencial para a diversificação de usos e aplicações, necessitando de iniciativas em pesquisa básica e aplicada (CHIACCHIO et al. 2006). Trabalhos, têm sido reportados na literatura sobre a utilização da palma forrageira como matéria-prima para a produção de biocombustível (GONÇALVES et al. 2014; YANG et al. 2015; NASCIMENTO et al. 2016; SOUZA-FILHO et al. 2016), produção de enzimas (CONTRERAS-ESQUIVEL et al. 1999; TEXEIRA et al. 2000) e suplemento alimentar (FEUGANG et al. 2006; JANA, 2012; CHIVETA; WAIRANGU, 2013). Além destes produtos, os constituintes destas plantas podem apresentar atividades farmacológicas e antioxidantes (EL-MOSTAFA et al. 2014).

Mesmo se conhecendo muito sobre as diferentes espécies de palma forrageira o aproveitamento integral destas biomassas, dentro de um conceito de biorrefinaria, não foram ainda investigados, isto é, extrair e recuperar cada um de seus constituintes e investigar possíveis aplicações. Sendo assim, este trabalho, teve por objetivo fracionar as biomassas dos cladódios de *Opuntia ficus-indica* e *Opuntia cochenillifera* recuperar seus principais constituintes e realizar possíveis aplicações em um contexto de biorrefinaria de cactáceas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Utilizar os cladódios de palma forrageira das espécies *Opuntia ficus-indica* e *Opuntia cochenillifera* como matéria-prima em um conceito de biorrefinaria, em escala de laboratório, para a obtenção de produtos e suas aplicações.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

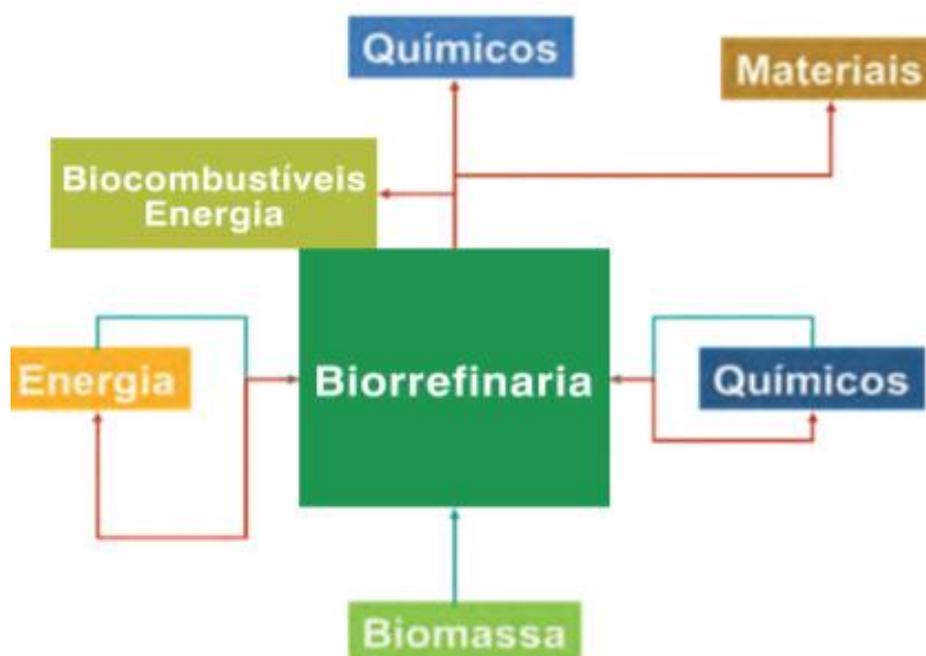
- Determinar a composição química da biomassa dos cladódios das duas espécies de palma forrageira.
- Realizar o fracionamento da biomassa dos cladódios, utilizando: extração aquosa; pré-tratamento com ácido diluído, deslignificação alcalina e hidrólise enzimática da celulose.
- Isolar, caracterizar e determinar as propriedades biológicas das frações pécticas.
- Investigar a utilização das frações pécticas para o crescimento de linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* UFPEDA 1015.
- Caracterizar o hidrolisado ácido e utilizá-lo como substrato para a produção de enzimas hidrolíticas por *Aspergillus awamori*.
- Isolar, caracterizar e determinar as propriedades biológicas das ligninas

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 BIORREFINARIAS

O desenvolvimento de biorrefinarias para converter biomassas renováveis em bioenergia, combustíveis e produtos de alto valor agregado tem sido impulsionado, em parte, pela preocupação ambiental, disponibilidade e ao custo dos combustíveis fósseis (PARAJULI et al. 2015; PARADA; OSSEWEIJER; DUQUE, 2017). Neste sentido, surge o conceito de biorrefinaria, uma instalação (ou rede de instalações) que integra diversos processos e equipamentos capazes de fracionar e converter a biomassa em diferentes produtos (CHERUBINI, 2010). A Figura 1 apresenta um esquema simplificado de uma biorrefinaria e os principais produtos obtidos.

Figura 3- Esquema simplificado de uma biorrefinaria utilizando a biomassa renovável como matéria-prima para obtenção de diferentes produtos de alto valor agregado.



Fonte: Adaptado Vaz, (2011).

O mercado mundial de produtos obtidos por biorrefinarias é bastante promissor e foi projetado em US\$ 295 bilhões para o ano de 2020. (UÇAR; ŞENGÜL; CELIKTAS, 2018). Diferentes biomassas renováveis podem ser utilizadas em uma biorrefinaria, dentre estas podem ser citadas as biomassas vegetais (RAMOS, 2003; ONDREY, 2006; RAGAUSKAS et al. 2006; CHERUBINI, 2010; RAGAUSKAS et al. 2014; PARAJULI et al. 2015; PARADA, OSSEWEIJER, DUQUE, 2017).

Uma biorrefinaria de biomassa vegetal abrange uma ampla gama de tecnologias capazes de fracionar estas biomassas (madeira, gramíneas, milho ...) em seus principais constituintes (carboidratos, proteínas, triglicerídeos, fenóis ...) e convertê-los em diversos produtos (PARADA; OSSEWEIJER; DUQUE, 2017). A vantagem da biomassa vegetal em relação a biomassa não renovável como por exemplo o petróleo, se dá pelo fato de que sua composição, apresentar menores teores de carbono e maiores quantidades de oxigênio. Sendo assim, a biomassa vegetal se torna uma opção atrativa para a produção de compostos como biopolímero, ácidos carboxílicos e produtos derivados de funções oxigenadas (CHERUBINI, 2010; RAGAUSKAS et al. 2014; PARAJULI et al. 2015).

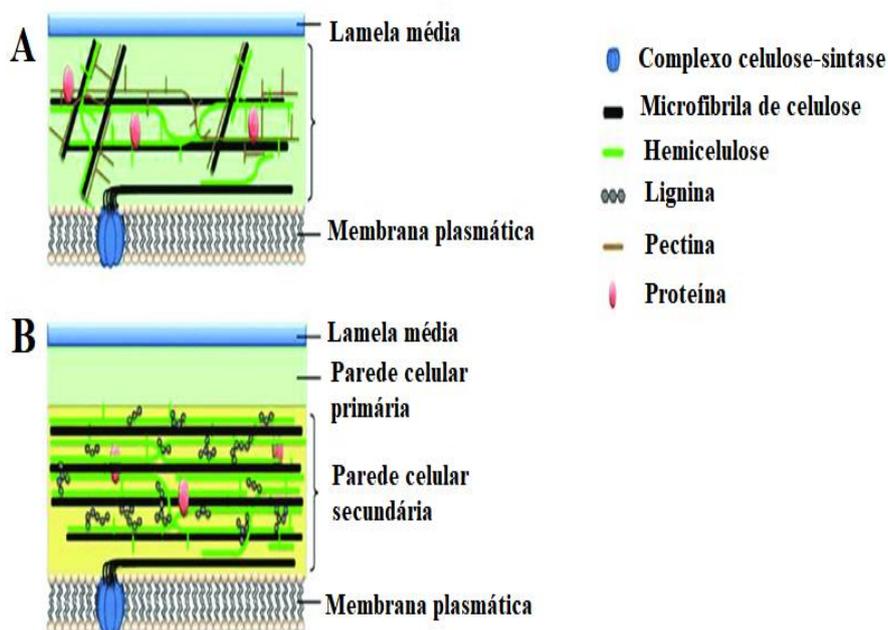
Embora, importantes avanços tenham sido feitos e várias biorrefinarias já estejam operando em larga escala, ainda são necessárias melhorias para apoiar a criação de tecnologias eficientes e economicamente viáveis (CHERUBINI, 2010; RAGAUSKAS et al. 2014; SIQUEIRA et al. 2020). Sendo assim, a integração do conhecimento interdisciplinar associado ao setor industrial se faz necessária para promover avanços e estabelecer novas biorrefinarias comerciais no futuro (CHERUBINI, 2010; RAGAUSKAS et al. 2014; PARAJULI et al. 2015; SIQUEIRA et al. 2020).

3.2 BIOMASSA VEGETAL COMO MATÉRIA-PRIMA DAS BIORREFINARIAS

A biomassa vegetal é uma fonte abundante, sustentável e que tem se tornado uma alternativa promissora para a produção de biocombustíveis, energia e produtos de maior valor agregado (RAGAUSKAS et al. 2014). Estas biomassas são constituídas quimicamente por celulose, polioses, lignina, extrativos e sais minerais, os quais são distribuídos em uma estrutura lamelar (MARRIOTT; GÓMEZ; MCQUEEN-MASON, 2016).

A celulose e a hemicelulose predominam na região da parede celular e a lignina distribui-se por toda estrutura, apresentando máxima concentração na lamela média (LOIX et al. 2017). Já os polissacarídeos pécticos são distribuídos tanto na parede celular como na lamela média das células vegetais (FENGEL; WEGENER, 1984; STREFFER, 2014). A Figura 2 ilustra uma representação da estrutura da biomassa vegetal mostrando como seus componentes: celulose, hemicelulose, pectina, lignina e proteínas.

Figura 4- Estrutura química da biomassa vegetal, representação dos componentes presentes na parede celular primária (A) e secundária (B).



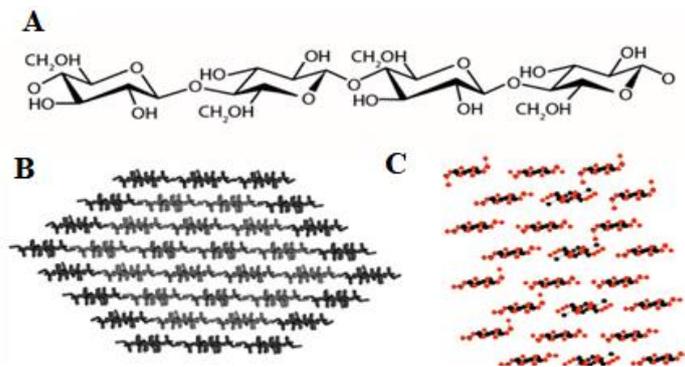
Fonte: Adaptada de Nash et al. (2019).

A seguir serão apresentados, estrutura química, distribuição e possíveis aplicações dos componentes presentes nas biomassas vegetais.

3.2.1 Celulose

A celulose (Figura 3) é um importante componente da parede celular. Estruturalmente é um biopolímero formado por longas cadeias lineares de glicose (FENGEL; WEGENER, 1984; HENDRIKS; ZEEMAN, 2009; MARRIOTT; GÓMEZ; MCQUEEN-MASON 2016).

Figura 3- Estrutura da celulose, mostrando uma sequência de glicose (A) e os modelos antigo (B) e atual (C) da estrutura.



Fonte: Marriott, Gómez e Mcqueen-Mason (2016).

Em sua estrutura, as moléculas de glicose ligam-se através dos carbonos 1 e 4, formando a celobiose (Figura 3A). A ligação 1- 4 ocorre com a hidroxila na posição β (posição equatorial), proporcionando a formação de um homopolímero linear (ARIOLI et al. 1998; KIMURA et al. 1999). Inicialmente, a estrutura da celulose era representada como um modelo de 36 cadeias de glucana (Figura 3B) as quais estavam organizadas em uma configuração hexagonal. Entretanto, estudos cristalográficos mostraram que a estrutura da celulose apresenta uma cadeia composta por 24 unidades (Figura 3C) com uma configuração retangular (MARRIOTT; GÓMEZ; MCQUEEN-MASON, 2016).

A celulose é sintetizada por um complexo de enzimas conhecido como celulose-sintase localizado na membrana plasmática (ARIOLI et al. 1998; KIMURA et al. 1999). Este complexo é responsável pela síntese simultânea de todas as cadeias de glucana em uma única microfibrila (MARRIOTT; GÓMEZ; MCQUEEN-MASON, 2016). A composição da celulose é a mesma em todas as espécies de plantas, isto é, todas apresentam apenas unidades de glicose, portanto, os fatores que afetam este componente podem ser significativos em todas as biomassas vegetais (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009; MARRIOTT; GÓMEZ; MCQUEEN-MASON, 2016).

A celulose quando inserida em uma plataforma de biorrefinaria pode ser utilizada como matéria-prima para a obtenção de diversos tipos de papel (JUNIOR; MIRANDA; JOSE, 2014; MARRIOTT; GÓMEZ; MCQUEEN-MASON, 2016). Na indústria química, pode ser utilizada como emulsificante, antiaglutinante, dispersante e espessante (JUNIOR; MIRANDA; JOSE, 2014). Quando modificada, pode gerar produtos como: triacetato de celulose, nitrocelulose, carboximetilcelulose, rayon dentre outros (SCHUCHARDT; RIBEIRO; GONÇALVES, 2001). E ainda, pode ser utilizada como substrato para a produção de enzimas celulolíticas (OGEDA; PETRI, 2010). Além desses produtos, a celulose pode ser submetida à hidrólise (química ou enzimática) para a obtenção de glicose, e esta por sua vez pode ser utilizada como matéria-prima para obtenção de produtos como: etanol, 2,5- dimetilfurano, acetato de etila, butanol, acetato butila, ácido acrílico dentre outros (KOBAYASHI; FUKUOSA, 2013).

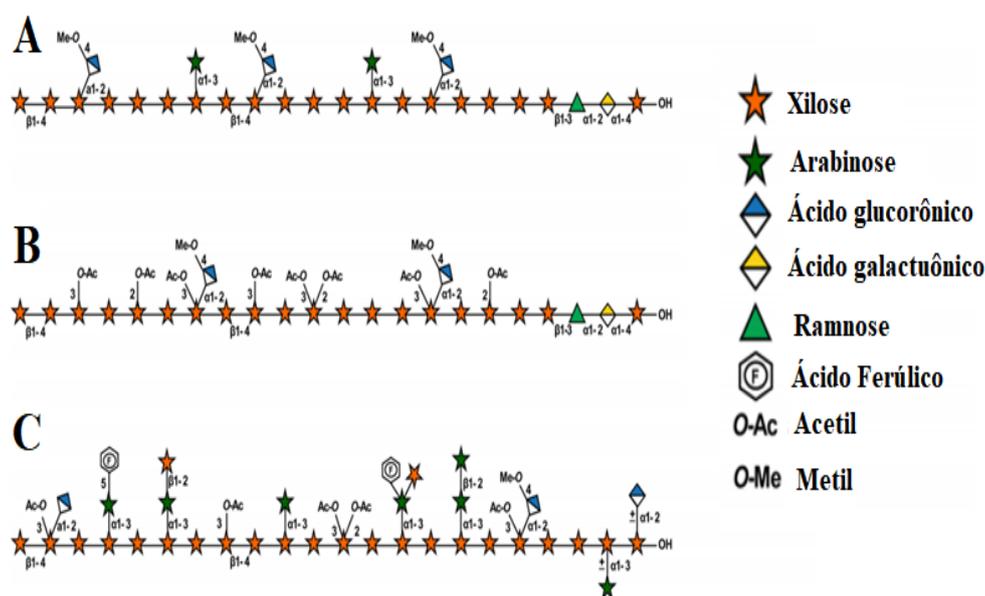
3.2.2 Hemicelulose

A natureza química das hemiceluloses ainda não se encontra devidamente esclarecida (SMITH et al. 2017). Entretanto, sabe-se que este polissacarídeo é uma macromolécula amorfa e complexa e que apresenta em sua estrutura, diversos monossacarídeos tais como: pentoses (L-arabinose, D-xilose) e hexoses (D-galactose, D-

glicose, D-manose). Além destes, também podem apresentar outros constituintes tais como: ácidos 4-O-metilglucurônico, D-galacturônico e D-glucurônico (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009). Devido a esta variação de constituintes, as hemiceluloses podem ser classificadas como xilanas, glucomananas, mananas dentre outros (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009; SMITH et al. 2017).

Este polissacarídeo complexo é formado por diferentes glicosiltransferases (GT43, GT8 e GT47) localizadas no complexo golgiense tipo II (RENNIE; SCHELLER, 2014). Na biomassa vegetal a hemicelulose está ligada à celulose através de ligações de hidrogênio e seus acoplamentos físicos tornam quase impossível separá-las, sem danos à celulose (MARRIOTT; GÓMEZ; MCQUEEN-MASON, 2016). A Figura 4 apresenta diferentes estruturas de xilanas (polissacarídeo formado por xilose) presentes nas hemiceluloses, com diferentes monossacarídeos ligados ao esqueleto central.

Figura 4- Representação das diferentes estruturas das hemiceluloses (xilanas) arabinoglucuroxilano (A) glucuronoxilano acetilado (B) glucuronoarabinoxilano acetilado (C).



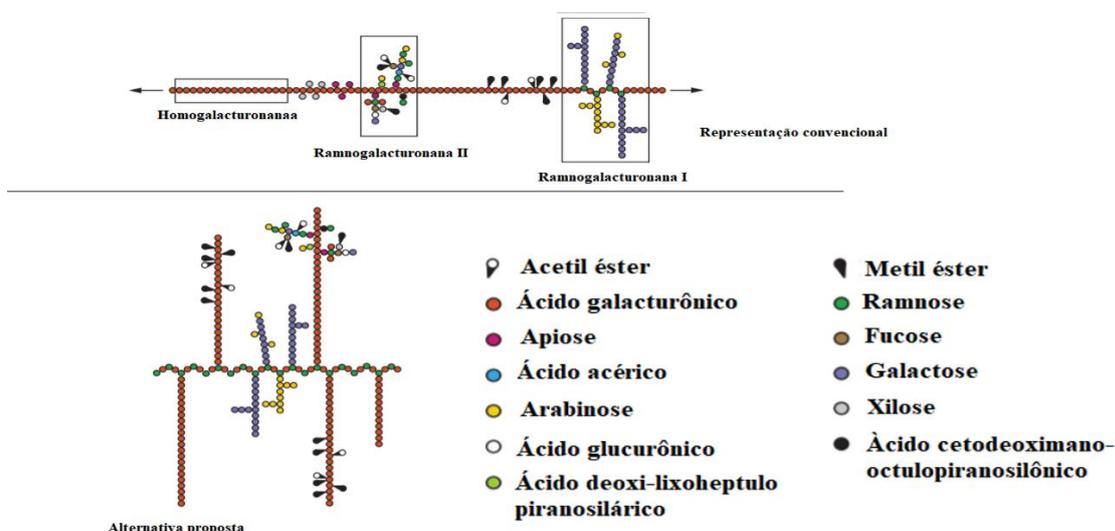
Fonte: Adaptado de Smith et al. (2017).

A hemicelulose, quando submetida a tratamentos termoquímicos, pode gerar produtos como o furfural, o qual pode formar resinas com fenol e ureia ou ainda ser hidrolisado a ácido maleico e ácido acético. Os componentes da hemicelulose também podem gerar produtos como xilitol, manitol e alguns ácidos orgânicos. Além destes podem a macromolécula por ser utilizada como substrato para produção de enzimas de interesse industrial (SCHUCHARDT; RIBEIRO; GONÇALVES, 2001; BEG et al. 2001).

3.2.3 Pectinas

As pectinas são uma classe de polissacarídeos complexos encontrados, principalmente, na parede celular primária das plantas (CANTERI et al. 2012). A Figura 5 apresenta a estrutura química das pectinas, isto é, os principais polissacarídeos que compõem a estrutura além de açúcares, ácidos e principais grupos funcionais (acetil e metil éster).

Figura 5- Representação das possíveis estruturas químicas para a pectina, evidenciando os principais monossacarídeos.



Fonte: Adaptado de Canteri et al. (2012).

A biossíntese das pectinas ocorre no complexo golgiense pela atuação de transferases (MARRIOTT; GÓMEZ; MCQUEEN-MASON, 2016). Estas macromoléculas em sua estrutura química podem apresentar diferentes polissacarídeos, sendo estes as homogalacturonana (HG), ramnogalacturonana I (RGI) e ramnogalacturonana II (RGII) (CANTERI et al. 2012). As Homogalacturonanas representam aproximadamente 60% da estrutura formada por uma cadeia linear de monômeros de ácido galacturônico ligados por ligações glicosídicas do tipo (1→4). Estas estruturas podem estar metil-esterificadas no grupo carboxílico (C-6) ou acetiladas nas posições O-2 e O-3 (FISSORE et al. 2013).

As regiões formadas por ramnogalacturonana I representam aproximadamente 20% da estrutura. É um polissacarídeo não linear sua estrutura é formada por repetições do dissacarídeo [→4) -α-D-GalA-(1→2) - α-L-Rha-(1→], cujos resíduos de ramnose (Rha) podem estar ligados na posição O-4 a cadeias laterais de açúcares neutros,

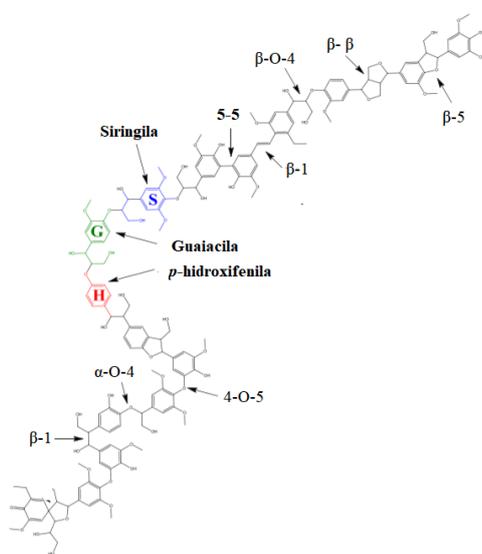
principalmente galactose a arabinose (SANTOS et al. 2013). Já as ramnogalacturonana II apresentam aproximadamente 10%. É uma estrutura também ramificada apresentando cerca de nove unidades de ácido α -D-galacturônico (1 \rightarrow 4). Estes resíduos de ácido galacturônico encontram-se ligados a quatro cadeias laterais de açúcares neutros, contendo até 12 monossacarídeos diferentes (CHRISTIAENS et al. 2011). Entretanto, estudos apresentam outros polissacarídeos, ligados ao esqueleto central das pectinas como é o caso das xilogalacturonana, arabinana, apiogalacturonana, arabinogalactana I e II (CANTERI et al. 2012).

As pectinas têm amplas aplicações; estas podem ser utilizadas como emulsificante, agente gelificante, espessante, estabilizante e substituto de gordura em alimentos de baixa caloria. Os oligossacarídeos derivados de pectina e a própria pectina podem também ser utilizados como um ingrediente importante em alimentos funcionais (prebióticos) (OLANO-MARTIN; GIBSON; RASTALL, 2002). As pectinas também podem ser utilizadas como substrato para produção de enzimas pectinolíticas, e utilizadas pela indústria farmacêutica para a produção de bioadesivos (SRIVASTAVA; MALVIYA, 2011).

3.2.4 Lignina

A lignina é a macromolécula aromática natural (fenólica), mais abundante na natureza (RAGAUSKAS et al. 2014). A Figura 6 representa a estrutura da lignina assim como suas principais unidades e ligações químicas.

Figura 6- Representação química da lignina, ligações químicas e unidades, guaiacila, siringila e *p*-hidroxifenila.



Fonte adaptado: Kärkäs et al. (2018).

De natureza amorfa, densa e complexa sua estrutura química consiste em três diferentes unidades fenilpropano: guaiacila (G), siringila (S) e *p*-hidroxifenila (H) respectivamente (MARRIOTT; GÓMEZ; MCQUEEN-MASON, 2016). Estas unidades estão ligadas pelas ligações C-C (β - β , β -5 e 5-5) e C-O (β -O-4, α -O-4 e 4-O-5) (KÄRKÄS et al. 2018).

A biossíntese das ligninas se inicia na lamela média, sendo este processo uma das últimas etapas da diferenciação de células do xilema (MARRIOTT; GÓMEZ; MCQUEEN-MASON, 2016; KÄRKÄS et al. 2018). As unidades formadoras da lignina são os fenilpropanóides álcool *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico. A formação desses monolignóis ocorre com a redução dos respectivos grupos ácidos pela molécula de fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADPH) (MARRIOTT; GÓMEZ; MCQUEEN-MASON, 2016; KÄRKÄS et al. 2018). Já a estrutura macromolecular é sintetizada nas plantas por meio de um mecanismo de polimerização desidrogenativa (mediada por enzimas) dos monolignóis dando origem às unidades G, S e H da lignina (RAGAUSKAS et al. 2014). As unidades se ligam de forma aleatória favorecendo estruturas químicas diferentes (MARRIOTT; GÓMEZ; MCQUEEN-MASON, 2016).

As ligninas apresentam diversas aplicações na indústria, podendo ser utilizadas como matéria-prima para a produção de óleos, resinas fenólicas (PINHEIRO et al. 2017), plásticos, combustíveis (RAGAUSKAS et al. 2014), dispersantes, pesticidas (PANG et al. 2016), fibras de carbono (DING et al. 2016), além de apresentarem diferentes atividades biológicas (ESPINOZA-ACOSTA et al. 2016; VINARDELL; MITJANS, 2017).

3.2.5 Extrativos, cinzas e água

Os extrativos são considerados constituintes secundários, não compoem parte da estrutura da parede celular (GUERRIERO et al. 2018). Podem apresentar caráter polar ou apolar, são de baixa massa molecular, e englobam óleos essenciais, resinas, taninos, compostos fenólicos, lipídeos, pigmentos, proteínas, vitaminas, aminoácidos, dentre outros (GUERRIERO et al. 2018). Como são de natureza distinta, podem apresentar diferentes atividades biológicas, sendo estas: antimicrobianas, anti-inflamatórias, antitumorais e antioxidantes, e podem ser utilizados como suplemento alimentar (EL-MOSTAFA et al. 2014).

As cinzas são o conteúdo inorgânico da biomassa vegetal formada por diferentes minerais: cálcio, oxalato de cálcio, magnésio, ferro, potássio, sódio, cobre, zinco, fósforo, manganês, dentre outros (EL-MOSTAFA et al. 2014; BAKARI et al. 2017). Estes

minerais são fundamentais para o crescimento das plantas, pois participam de diferentes reações durante o metabolismo. Estes podem ser utilizados pela indústria de alimentos como suplemento alimentar (MARQUES et al. 2017).

Além dos componentes estruturais, extrativos e cinzas algumas plantas apresentam a capacidade de armazenar uma quantidade significativa de água (OGBURN; EDWARDS, 2010; GRIFFITHS; MALES, 2017; GRIFFITHS; MALES, 2017). Isso porque, estas possuem maior quantidade de tecido parenquimático o qual atua como reservatório (OGBURN; EDWARDS, 2010; GRIFFITHS; MALES, 2017). Em média são armazenados volumes de água que variam entre 90 e 95% (GRIFFITHS; MALES, 2017). Esta grande quantidade de água torna a planta temporariamente independente do abastecimento externo de água (OGBURN; EDWARDS, 2010). Este tecido de armazenamento pode ser encontrado no caule, folhas ou raízes dependendo da espécie (OGBURN; EDWARDS, 2010; GRIFFITHS; MALES, 2017). A água proveniente destas plantas pode ser utilizada como uma alternativa em períodos de seca e em processos industriais podem auxiliar na diminuição de águas adicionais (GONÇALVES et al. 2014; YANG et al. 2015; NASCIMENTO et al. 2016; SOUZA-FILHO et al. 2016).

3.3 FRACIONAMENTO DAS BIOMASSAS VEGETAIS

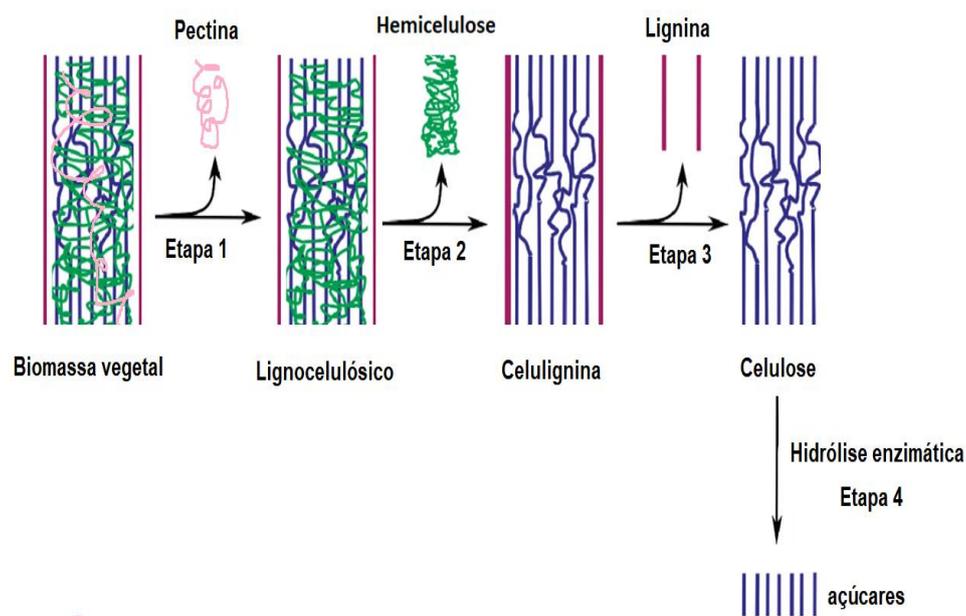
No contexto sustentável promovido pelas biorrefinarias, é importante utilizar a biomassa vegetal de forma integral, isto é, fracionando e recuperando todos os constituintes (polissacarídeos, lignina, extrativos e cinzas) (TAHERZADEH; KARIMI, 2008; ALVIRA; TOMÁS-PEJÓ; BALLESTEROS et al. 2010; AGBOR et al. 2011; RAGAUSKAS et al. 2014). Entretanto, realizar o fracionamento não é algo simples e isto é devido à complexidade estrutural destas biomassas. Sendo assim, diferentes estratégias, físicas, químicas, biológicas ou a combinação de processos (forma mais eficiente em relação a recuperação dos constituintes) vem sendo utilizadas (MOSIER et al. 2005; TAHERZADEH; KARIMI, 2008; ALVIRA; TOMÁS-PEJÓ; BALLESTEROS et al. 2010; RAGAUSKAS et al. 2014 KUCHARSKA et al. 2018).

A Figura 7 apresenta um fluxograma geral das etapas do fracionamento da biomassa para a obtenção dos principais constituintes pectina, hemicelulose, lignina e celulose, além da produção de açúcares por hidrólise enzimática.

Uma infinidade de condições experimentais, podem ser utilizadas em cada etapa de fracionamento. Neste sentido, será discutido para Etapa 1 apenas a extração aquosa (obtenção das pectinas). Na Etapa 2, pré-tratamento com ácido diluído (obtenção da

hemicelulose), na Etapa 3, deslignificação alcalina para a obtenção de lignina (fração líquida) e celulose (fração sólida) e por fim Etapa 4, obtenção de açúcares fermentescíveis por hidrólise enzimática. Esta sequência de etapas permite que fracionamento seja realizado em condições mais brandas, além de ser ter uma maior recuperação dos constituintes (BALAT, 2011).

Figura 7- Etapas de fracionamento da biomassa vegetal para a obtenção dos seus principais constituintes.



Fonte: Adaptado Ahmed, et al (2019).

3.3.1 Extração aquosa

Em geral, as pectinas são extraídas com ácido diluído quente seguido de recuperação por precipitação em álcool (SANTOS et al. 2013). No entanto, a utilização de ácidos pode ser prejudicial (ácidos fortes) para o ambiente, além de aumentarem o custo do processo pois requerem etapas adicionais para remover elementos tóxicos (CANTERI et al. 2012; SANTOS et al. 2013; WANG; CHEN; LÜ, 2014). Sendo assim, metodologias que utilizam água como agente de extração vêm ganhando destaque, por não apresentar custos adicionais com purificação da amostra, além de não precisarem de etapas de neutralização (SANTOS et al. 2013). Na extração aquosa assim como no ácido diluído a cadeias de ácido poligalacturônico, com grupos carboxila variavelmente esterificados com metanol, são solúveis em água e insolúveis em etanol o que permite a recuperação da macromolécula (CANTERI et al. 2012; WANG; CHEN; LÜ, 2014).

3.3.2 Pré-tratamento com ácido diluído

O pré-tratamento com ácido diluído é provavelmente o método mais aplicado para a remoção de hemicelulose da biomassa lignocelulósica e pode ser realizado em diferentes condições de temperatura, relação sólido-líquido, concentração de ácido e tempo de reação (SUN; CHENG, 2002; BALAT, 2011). Durante o pré-tratamento, ocorre a quebra das ligações glicosídicas do polissacarídeo, promovendo a liberação de monossacarídeos e a formação de produtos de degradação tais como furfural, 5-hidroximetilfurfural (HMF), ácido acético dentre outros (RAMOS, 2003; ALVIRA; TOMÁS-PEJÓ; BALLESTEROS et al. 2010; MOON; LIU, 2012).

Diferentes ácidos podem ser utilizados: ácido sulfúrico, ácido clorídrico, ácido acético, ácido fosfórico, dentre outros (NAIR et al. 2017). Dentre os ácidos citados, o fosfórico vem sendo alvo de estudos, isto porque, o hidrolisado ácido resultante do processo pode ser neutralizado com hidróxido de sódio originado fosfato de sódio (UM et al. 2003). Sais de fosfato quando presentes no hidrolisado pode ser utilizado como nutriente pelos micro-organismos (GÁMEZ et al. 2006; VASCONCELOS, 2012; VASCONCELOS et al. 2013). Outra vantagem no uso de ácido fosfórico no processo de pré-tratamento, ocorre devido a não exigência de ligas especiais para a construção dos reatores (GEDDES et al. 2010; GEDDES; NIEVES; INGRAM, 2011).

3.3.3 Deslignificação alcalina

Por fim, após ser realizar a etapa de pré-tratamento com ácido diluído, pode-se realizar a etapa de deslignificação alcalina na celulignina para obtenção da lignina (ZHENG; PAN; ZHANG, 2009). As bases mais utilizadas nestes processos são: hidróxido de sódio, hidróxido de potássio, hidróxido de cálcio, amônia, ureia dentre outras (SHAH, 2018). Assim como o pré-tratamento com ácido diluído, fatores como a concentração de álcali, temperatura, pressão e tempo de exposição da biomassa influenciam na eficiência do processo (ZHENG; PAN; ZHANG, 2009; CRUZ-FILHO, 2016; SHAH, 2018).

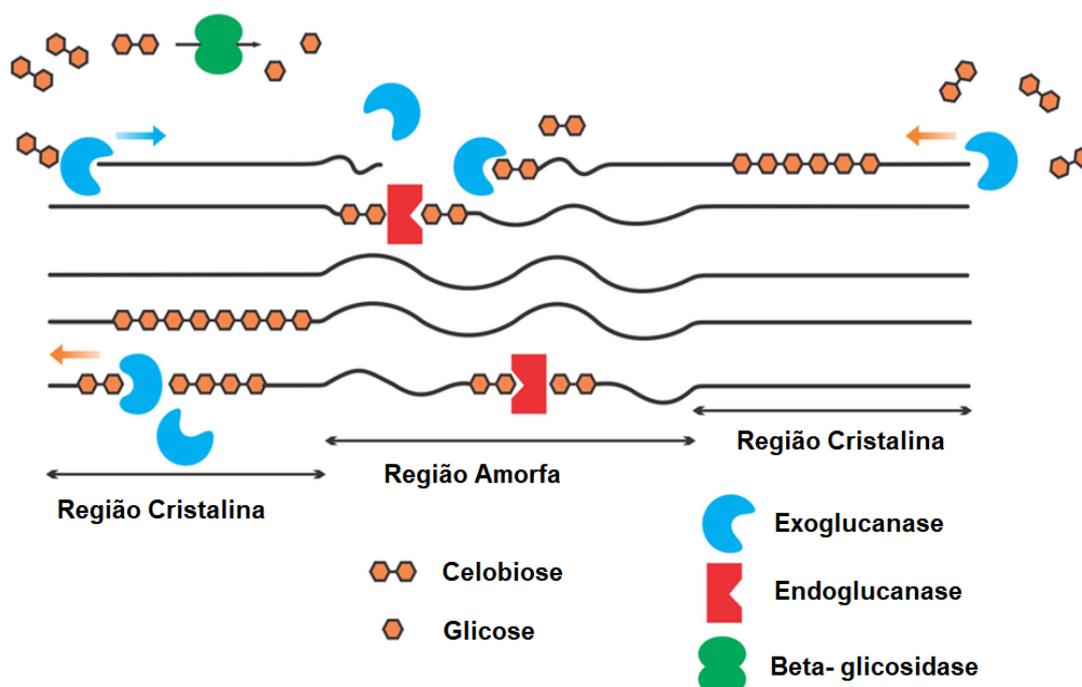
Na deslignificação alcalina são utilizadas condições de processos mais brandas, quando comparadas aos processos ácidos, entretanto, demandam um longo tempo de residência podendo variar de horas até dias (BALAT et al. 2011; CRUZ-FILHO, 2016). O mecanismo de remoção das ligninas durante a deslignificação está relacionado com a saponificação de ésteres de ligações intramoleculares entre a lignina e outros componentes (ZHENG; PANZHANG, 2009). A fração líquida conhecida como licor negro é acidificada para a precipitação da lignina sólida (CRUZ-FILHO, 2016).

3.3.4 Hidrólise enzimática da celulose

Após as etapas de fracionamento a celulose está mais acessível a hidrólise enzimática. As enzimas celulolíticas ou celulases consistem em três principais grupos de enzimas: exo-1,4- β -D-glucanases (EC 3.2.1.91), endo-1,4- β -D-glucanases (EC 3.2.1.4) e β -glicosidases (EC 3.1.1.21) (OGEDA; PETRI, 2010). As exoglucanases hidrolisam unidades de celobiose fora das cadeias de celulose. Elas são divididas em duas formas: celobiohidrolase I (CBH I) e II (CBH II). O CBH I hidrolisa a cadeia de celulose a partir da extremidade redutora e o CBH II a extremidade não redutora (OGEDA; PETRI, 2010; ALVIRA; TOMÁS-PEJÓ; BALLESTEROS et al. 2010). As endoglucanases hidrolisam aleatoriamente ligações *o*-glicosídicas internas em cadeias de celulose, resultando em oligômeros de diferentes comprimentos. As β -glicosidases hidrolisam a celobiose para produzir glicose (ALVIRA; TOMÁS-PEJÓ; BALLESTEROS et al. 2010; TALEBNIA; KARAKASHEV; ANGELIDAKI, 2010).

A hidrólise enzimática por estas enzimas consiste em três mecanismos: adsorção da enzima celulase na superfície da celulose (I), hidrólise das ligações para a produção de açúcares (II) e por fim a desorção da enzima celulolítica da superfície da celulose (III) (TALEBNIA; KARAKASHEV; ANGELIDAKI, 2010). A Figura 8, apresenta o mecanismo geral da atuação sinérgica das enzimas celulolíticas.

Figura 5- Representação esquemática da ação catalítica do complexo enzimático (celulases) sobre celulose com geração de glicose.



Fonte adaptado Akhtar et al (2016).

Os principais fatores que afetam a hidrólise enzimática da celulose estão relacionados a enzima, ao substrato ou a ambos (ALVIRA; TOMÁS-PEJÓ; BALLESTEROS et al. 2010). Em relação ao substrato (celulose), a cristalinidade da celulose e o grau de polimerização e a quantidade de lignina são propriedades importantes para que se possa determinar a taxa de hidrólise (ALVIRA; TOMÁS-PEJÓ; BALLESTEROS et al. 2010).

3.4 UTILIZAÇÃO DE ENZIMAS FÚNGICAS (PECTINASE, XILANASES E CELULASES) EM BIORREFINARIAS

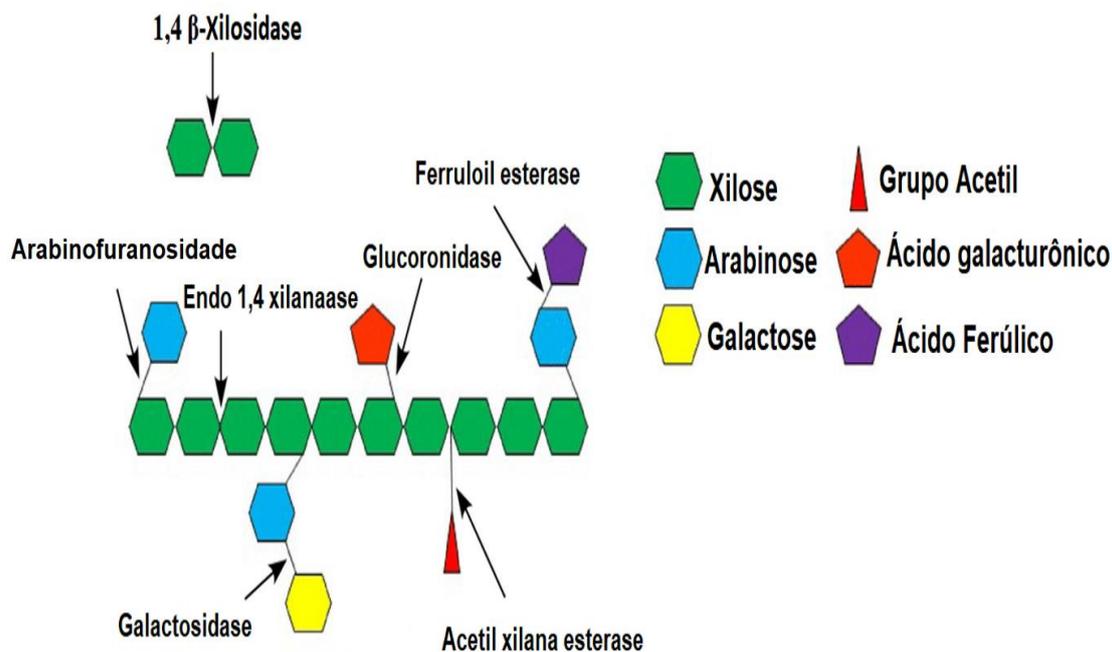
Os carboidratos obtidos durante o fracionamento (celulose, hemiceluloses e pectinas) podem ser utilizados para produção de enzimas (GARG et al. 2016; IMRAN et al. 2019; BHARDWAJ; KUMAR; VERMA, 2019). O mercado global de enzimas industriais foi estimado em US\$ 4,2 bilhões em 2014 e apresentou uma taxa de crescimento anual composta (CAGR) de aproximadamente 7% no período de 2015 a 2020 alcançando quase US \$ 6,2 bilhões (SINGH et al. 2016; GARG et al. 2016; IMRAN et al. 2019; BHARDWAJ; KUMAR; VERMA, 2019).

Diversos micro-organismos são produtores de enzimas industriais, entretanto os fungos filamentosos do gênero *Aspergillus*, têm apresentado grande potencialidade, devido à sua capacidade de produzir um amplo espectro de enzimas hidrolíticas (pectinases, xilanases e celulases dentre outras) (STRICKER; MACH; GRAAFF, 2008; MRUDULA, MURUGAMMAL, 2011). Estas enzimas são capazes de degradar os polissacarídeos obtidos durante a etapa de fracionamento da biomassa (STRICKER; MACH; GRAAFF, 2008; MRUDULA, MURUGAMMAL, 2011). Dentre as espécies o fungo *Aspergillus awamori* é um produtor eficiente de muitas enzimas hidrolíticas, dentre as hidrolases tem-se as xilanases (STRICKER; MACH; GRAAFF, 2008; MRUDULA; MURUGAMMAL, 2011).

As xilanases são produzidas quando o micro-organismo em contato com as xilanas (KOBAKHIDZE et al., 2016). Neste momento, pequenas proporções de xilanases constitutivas são secretadas hidrolisando a xilana (STRICKER; MACH; GRAAFF, 2008). O resultando da hidrólise são xilooligossacarídeos e xilobiose que uma vez absorvidas pela célula funcionam como indutores (STRICKER; MACH; GRAAFF, 2008; KOBAKHIDZE et al., 2016). Em seguida tem-se a ativação dos genes da transcrição de xilanases extracelulares, como xlnA, xlnD e XlnR (STRICKER; MACH; GRAAFF, 2008). Ao longo da hidrólise enzimática os produtos se acumulam e podem

atuar como repressores da produção da enzima, por repressão catabólica (KOBAKHIDZE et al. 2016). O mecanismo de hidrólise enzimática da xilana é apresentado na Figura 9.

Figura 6- Estrutura química da xilana e mecanismo de hidrólise enzimática das xilanases.



Fonte: Polikovsky; Ben-Jacob; Finkelshtein, (2015).

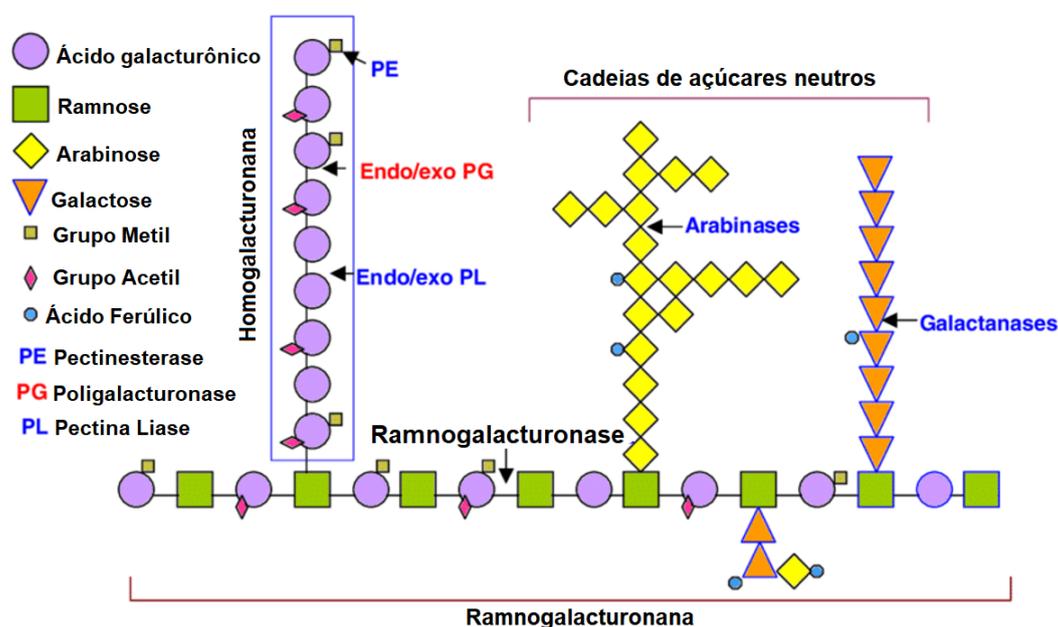
As xilanases são formadas por um complexo formado por endoxilanasas enzimas que promovem a hidrólise das ligações glicosídicas do tipo β -1,4 (dentro da cadeia das xilanas) formando xilo-oligossacarídeos que são degradados em xilose pela atuação de enzima β -xilosidase (KIRIKYALI; CONNERTON, 2015). Além disso, enzimas acessórias também atuam em outras regiões do polímero como, por exemplo, as arabinofuranosidas que hidrolisam a ligação entre o resíduo lateral de arabinofuranose e a xilose da cadeia central (BEG et al 2001; KIRIKYALI; CONNERTON, 2015). As β -glucuronidasas que clivam a ligação glicosídicas do tipo α -1,2 entre o ácido galacturônico lateral e a xilose da cadeia central (SUNNA; ANTRANIKIAN, 1997). A acetil xilana esterase que clivam as ligações entre o ácido acético. Enzimas como as ferruloil esterases e galactosidase que promove à remoção do ácido ferúlico e da galactose das cadeias laterais respectivamente (BEG et al 2001; POLIKOVSKY; BEN-JACOB; FINKELSHTEIN, 2015).

Estas enzimas atuam sinergisticamente (em conjunto) para converter a xilana em unidades de xilose (SUNNA; ANTRANIKIAN, 1997; BEG et al 2001). Estes biocatalizadores podem ser empregados para produção de combustíveis para produção de

bioetanol, na indústria de alimentos utilizada digestibilidade na alimentação animal, produção de adoçantes e em formulações de complexos celulolíticos para melhorar o rendimento de hidrólise de biomassas vegetais (HARRIS; RAMALINGAM, 2010; KUMAR et al. 2017). Ao longo da hidrólise enzimática os produtos se acumulam e podem atuar como repressores da produção da enzima, por repressão catabólica (KOBAKHIDZE et al. 2016).

Outro grupo de enzimas hidrolíticas são as pectinases, a expressão dessas enzimas é controlada pelo ativador GaaR e induzida por 2-ceto-3-desoxi-L-galactonato, um intermediário da via catabólica do ácido D-galacturônico (JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005; BALADHANDAYUTHAM; THANGAVELU, 2011; KOWALCZYK et al. 2017). A maioria dos genes dependentes de GaaR codifica enzimas necessárias para a decomposição de homogalacturonanas, como exo-poligalacturonases (pgaX, pgxA, pgxB, pgxC), endo-poligalacturonases (pgaI, pgaC, pgaE), pectina metil esterase (pmeA, pmeB, pmeC) e pectina liase (pelA, pelD, pelF) (KOWALCZYK et al. 2017). A Figura 10 apresenta o mecanismo de hidrólise enzimática das enzimas pectinolíticas.

Figura 7: Modelo de ação de diferentes pectinases na hidrólise da pectíca.



Fonte: Adaptado de Niture, (2008).

Dentre estas enzimas estão a pectina esterase que catalisa a remoção dos grupos metil/etil éster produzindo metanol/etanol (JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005; BALADHANDAYUTHAM; THANGAVELU, 2011). As poligalacturonases catalisam a quebra das ligações da cadeia de ácido galacturônico outra enzima é a pectina liase que degrada a pectina diretamente pelo mecanismo de β -eliminação clivando as ligações

glicosídicas em C-4 e, simultaneamente, eliminando H⁺ de C-5, resultando na formação de 4,5 oligogalacturonatos insaturados (JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005; UENOJO; PASTORE, 2007).

Por fim, nas celulasas o XLNR é fator de transcrição chave na expressão dessas enzimas devido ao seu importante papel na ativação de um grupo significativo de genes envolvidos na degradação de xilana e celulose (GARG et al. 2016; IMRAN et al. 2019; BHARDWAJ; KUMAR; VERMA, 2019). Outros fatores de transcrição como CLR1 e CLR2 também são essenciais para regulação dos genes codificadores de celulasas e hemicelulasas, sendo induzidos por celulose (STRICKER; MACH; GRAAFF, 2008). As enzimas liberadas no meio extracelular que degradam a celulose pelo mecanismo descrito no item 3.3.4.

A hidrólise enzimática de carboidratos representa uma rota atraente para a fabricação de produtos químicos industriais a partir de recursos renováveis (STRICKER; MACH; GRAAFF, 2008). Estas enzimas podem ser aplicadas (melhorando o processo, na obtenção e/ou aumentando a qualidade do produto) nas indústrias têxtil, de papel e celulose, químicas, farmacêutica, alimentícia e para produção de biocombustíveis (GARG et al. 2016; IMRAN et al. 2019; BHARDWAJ; KUMAR; VERMA, 2019).

3.5 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS BIOMASSAS *IN NATURA* E DOS SÓLIDOS OBTIDOS APÓS O FRACIONAMENTO

3.5.1 Análise composicional

Determinar a composição química das biomassas vegetais (teores em porcentagem de celulose, hemicelulose, pectina, lignina, extrativos e cinzas) é uma etapa importante para sua possível utilização em biorrefinarias (SLUITER et al. 2010; RAGAUSKAS et al. 2014). Pesquisadores do Laboratório Nacional de Energia Renovável (NREL), publicaram no ano de 2008, diferentes coletâneas de métodos voltados para caracterização de biomassas vegetais (SLUITER et al. 2010). No Brasil, Gouveia et al. (2009) realizaram experimentos de caracterização química do bagaço de cana tratados por explosão a vapor. Estes experimentos foram validados no Laboratório de processos biotecnológicos do Departamento de Antibióticos da UFPE em conjunto com os laboratórios do Departamento de Biotecnologia da Escola de Engenharia de Lorena. Com isto, foi proposta metodologia de caracterização química para a determinação dos teores de celulose, hemicelulose, lignina e cinzas. Estes métodos são

utilizados até hoje por grupos de pesquisa caracterizando diferentes biomassas vegetais. Entretanto, devido à complexidade da biomassa vegetal outras etapas de caracterização e adaptações vêm sendo desenvolvidas tanto para a quantificação de polissacarídeos (hemicelulose e pectinas) quanto para os extrativos.

A Tabela 1 apresenta os principais métodos para a análise da composição dos principais constituintes da biomassa vegetal.

Tabela 1- Métodos para determinação do teor dos principais constituintes presentes na biomassa vegetal.

Constituintes	Procedimentos	Métodos de quantificação	Referências
Extrativos	Exaustão ou por extração em Soxhlet. Diferentes solventes polares e apolares ou o conjunto destes podem ser utilizados.	A quantificação do teor de extrativos totais é feita por gravimetria. A identificação e quantificação dos constituintes dos extrativos pode ser feita por métodos colorimétricos ou por análises cromatográficas.	Sluiter et al. (2005) Hames, Scarlata, Sluiter, (2008)
Pectinas e Monossacarídeos livres	Extração (água ou ácido diluído), em temperaturas entre 60°C e 100°C.	Identificação e quantificação: cromatografia líquida ou gasosa acoplada ou não a espectrometria de massas.	Habibi, Mahrouz e Vignon (2005)
Celulose e Hemicelulose	Hidrólise ácida (ácido sulfúrico a 72%) a 121°C por 30 minutos. A fase líquida submetida a outra hidrólise (ácido sulfúrico a 4%) a 121°C por 30 minutos.	Identificação e quantificação: cromatografia líquida ou gasosa acoplada ou não a espectrometria de massas.	Gouveia et al. (2009)
Lignina Total (Solúvel e insolúvel)	Hidrólise ácida (ácido sulfúrico a 72%) a 121°C por 30 minutos. A fração sólida lignina de Klason. A fração líquida solubilizada em NaOH.	Lignina solúvel: UV-Visível e métodos cromatográficos Lignina insolúvel: gravimetria	Gouveia et al. (2009)
Cinzas totais	Combustão de biomassa em um forno em temperaturas maiores que 250°C.	Gravimetria	Gouveia et al. (2009)

Fonte: autor, (2019).

3.5.2 Caracterização por imagem

A análise composicional não é suficiente para investigar os efeitos do fracionamento nos tecidos vegetais (SANT'ANNA; SOUZA, 2012). Para isso, se faz necessário utilizar diferentes análises de imagem para avaliar de forma qualitativa a morfologia da biomassa antes e depois do pré-tratamento (SANT'ANNA; SOUZA, 2012).

Diferentes técnicas de microscopia podem ser utilizadas para esta finalidade, dentre estas podem ser citadas: microscopia eletrônica de varredura (análise da superfície da biomassa), microscopia eletrônica de transmissão (visualização interna da estrutura) e

de força atômica (investiga as propriedades topográficas) (SANT'ANNA; SOUZA, 2012; KARIMI; TAHERZADEH, 2016). Outras técnicas como, por exemplo, microscopia confocal de varredura a laser e microscopia eletrônica, também são ferramentas usadas para visualizar a estrutura das biomassas, porém são menos usadas para avaliar o efeito do fracionamento (DONALDSON; LAUSBERG, 1998; KARIMI; TAHERZADEH, 2016).

A Tabela 2 mostra os principais métodos de análise por imagem para diferentes biomassas vegetais.

Tabela 2-Diferentes métodos de análise por imagens que podem ser utilizados para a avaliação da estrutura de diferentes biomassas vegetais antes e após o fracionamento.

Técnica	Pré-tratamento	Resultados	Referência
MEV	Biomassa: cavacos de eucalipto Pré-tratamento: ácido diluído seguido de deslignificação alcalina	Mudança estrutural da biomassa	Cruz-Filho, (2016)
	Biomassa: Bagaço de cana Pré-tratamento: ácido fosfórico	Mudança estrutural da biomassa	Vasconcelos, (2012)
MET	Biomassa: palha de milho Pré-tratamento: ácido diluído (2,0% em peso de H ₂ SO ₄ , 160°C, 5 min).	Delaminação (formação de espaços) na parede celular promovida pelo pré-tratamento.	Ciesielski et al. 2014
	Biomassa: casca de milho Pré-tratamento: ácido diluído H ₂ SO ₄ a 0,8% durante 20 min	As ligninas migram para ambientes vazios, formando discos achatados ou derivações esféricas.	Karp et al. (2014)
Força atômica	Biomassa: Palha de cevada Pré-tratamento: NaOH (0,5% a 2%) 105°C por 10 min.	Feito do pré-tratamento causou mudanças topográficas no material.	Azizul et al. (2012)
	Biomassa: Bagaço de cana Branqueamento NaCl 0,7% (1:50 m/v) pH4,0 100°C por 5h	Fornecem detalhes da topografia e o contraste entre macio e rígido	Mandal; Chakrabarty, (2011)
Microscopia confocal e Microscopia convencional	Biomassa: Amostras de madeira	Análises da estrutura da planta <i>in natura</i>	Donaldson; Lausberg, (1998)

Fonte autor, (2019).

3.5.3 Caracterização físico-química

A caracterização físico-química tem a finalidade de elucidar a estrutura química dos constituintes. Na literatura são encontradas diferentes análises físico-químicas para a caracterização estrutural da biomassa vegetal (LUPOI, et al. 2014). A Tabela 3 sumariza algumas dessas análises, mostrando sua aplicação, vantagens e desvantagens de cada método.

Tabela 3- Métodos analíticos para caracterização de biomassas vegetais, análise, exemplo de uso, vantagens e desvantagens.

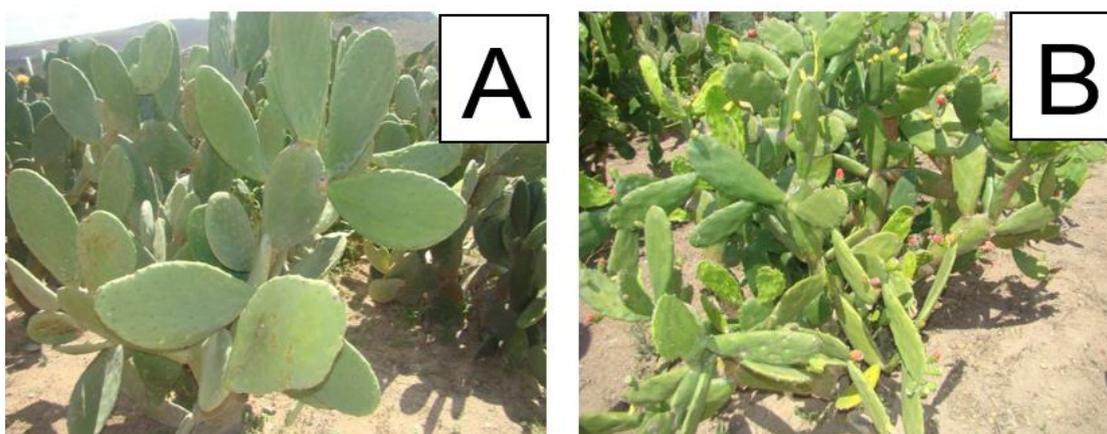
Técnica	Exemplo do uso	Vantagens	Desvantagens	Referencias
Espectroscopia de infravermelho	Identificação de grupos funcionais	Análise de fácil manuseio e rápido resultado	Baixa resolução para compostos com os mesmos grupos funcionais	Xu et al. (2013)
Difratometria de raios X	Determinação do índice de cristalinidade	Informações físicas importantes para uso de fibras naturais e polímeros	Tempo de aquisição longo (hora ou dia) para controle de processo	Park et al. (2010)
Ressonância magnética nuclear	Identificação estrutural biomassa	Resolução de estruturas moleculares complexas	Tempo de aquisição longo (hora ou dia) para controle de processo, exceto sob uma alta concentração de o analito	Park et al. (2009)
Cromatografia de permeação em gel	Identificação do peso molecular	Utilizada como método de fracionamento. Informações sobre a distribuição de massa molar.	Amostras com tamanhos similares não são separados Exemplo: isômeros	Kanaujia et al. (2014)
Cromatografia líquida de alta eficiência	Determinação de monossacarídeos	Diversas configurações de separação e polaridades moleculares Não destrutivo; pode coletar frações Separação de não volátil ou termicamente Moléculas instáveis	Tempos de análise longos Pode exigir purificação das amostras	Karimi, Taherzadeh, (2016)
Cromatografia gasosa	Determinação de monossacarídeos, gorduras etc.	Analisar seletivamente apenas espécies voláteis	Destrutivo	Karimi e Taherzadeh (2016)
Espectrometria de massas	Determinação do peso molar e identificação de monômeros presentes na biomassa.	Pode ser usado para determinação de peso molecular Análise rápida Seletividade Sensibilidade	Destrutiva	Agblevor Evans, Johnson, 1994
Pirólise	Pirólise em biomassas vegetais para quantificação de compostos e cinzas.	Elimina a necessidade de isolamento de compostos. Amostra facilmente preparadas caracterização estrutural detalhada de produtos de pirólise Pequenos volumes de amostra	Destrutivo Análise de dados potencialmente complexa (isto é, quais fragmentos devem ser incluídos na quantificação de monômeros)	González-Vila et al. (2001)
Espectroscopia UV/Vis	Determinação do comprimento de onda máximo de moléculas presentes nas biomassas.	Instrumentos baratos e simples. Seletivo e sensível.	Dificuldade em determinar o coeficiente de extinção para a quantificação de lignina A absorbância de moléculas estranhas (sobreposição de sinal)	Lupoi et al. (2014)

Fonte autor, (2019).

3.6 PALMA FORRAGEIRA

A palma forrageira das espécies *Opuntia ficus-indica* (palma gigante) (Figura 11A) e *Opuntia cochenillifera* (palma miúda) (Figura 11B) são cactáceas, pertencentes à divisão: *Embryophyta*; subdivisão: *Angiospermea*; classe: *Dicotyledoneae*; subclasse: *Archiclamideae*; ordem: *Opuntiales*, família: *Cactaceae* e gênero *Opuntia*. Estas são espécies adaptadas a regiões áridas e semiáridas, podendo ser encontradas no México, América Latina, África do Sul, Europa e Mediterrâneo (SANTOS et al. 2006; EL-MOSTAFA et al. 2014; REALINI et al. 2015).

Figura 11- Espécies de *Opuntia ficus-indica* (A) e *Opuntia cochenillifera* (B), mostrando os cladódios estruturas características dessas espécies.



Fonte: Autor (2019).

São plantas arbustivas, suculentas, ramificadas e segmentadas. Uma característica marcante destas espécies é a presença de cladódios, um tipo de modificação caulinar verde e suculenta; além disso, apresentam frutos e flores (NUNES, 2011). Quimicamente, apresentam em sua composição, vitaminas, minerais, proteínas, constituintes fenólicos, além de serem ricas em água e em carboidratos (EL-MOSTAFA et al. 2014).

Por serem de espécies diferentes apresentam características próprias. Os cladódios da espécie *O. ficus-indica* apresentam forma oval-elíptica ou sub-ovalada podendo pesar aproximadamente de 1 kg e comprimento de até 50 cm de comprimento (SANTOS et al. 2006; NUNES, 2011). Suas flores apresentam coloração amarela brilhante e seus frutos em formato de baga de coloração amarela, passando à roxa quando maduros (SANTOS et al. 2006; EL-MOSTAFA et al. 2014).

A espécie *O. cochenillifera* é de menor porte, seus cladódios podem pesar aproximadamente 350 g e apresentarem comprimento de até 25 cm estas também apresentam formato também ovalado (SANTOS et al. 2006; NUNES, 2011). Suas flores

são vermelhas e seus frutos também são em formato de baga de coloração roxa (SANTOS et al. 2006). Esta espécie quando comparada a espécie *O. ficus-indica* é a mais nutritiva e apreciada pelo gado (palatável), porém apresenta menor resistência à seca e produtividade (SANTOS et al. 2006; VASCONCELOS et al 2009; EL-MOSTAFA et al. 2014; REALINI et al. 2015).

A palma forrageira foi introduzida no Brasil provavelmente por volta de 1877 e cultivada nos estados de Alagoas, Pernambuco e Paraíba com o objetivo de ser utilizada como matéria-prima para a produção do corante carmim produzido pela cochonilha do carmim, entretanto, esta utilização não prosperou devido substituição dos corantes naturais por corantes sintéticos produzidos pela indústria do petróleo e seus derivados (SANTOS et al. 2001; SANTOS et al. 2006). Logo em seguida passou a ser utilizada como planta ornamental e somente no início do século XX, foi utilizada como planta forrageira com a finalidade de diminuir o impacto provocado pela seca que assolava a região nordeste (VASCONCELOS et al. 2009; SANTOS et al. 2001).

O Brasil é um dos grandes produtores de palma forrageira do mundo. Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística- IBGE de 2017, são produzidas no país 2.875.034 toneladas com área de colheita de 96.900 hectares. A região semiárida é responsável pela produção nacional, esta compreende os estados: Ceará, Rio Grande do Norte, a maior parte da Paraíba e Pernambuco, Sudeste do Piauí, Oeste de Alagoas e Sergipe, região central da Bahia e uma faixa que se estende em Minas Gerais. O estado da Bahia possui a maior produção 1.303.149 toneladas como uma área de colheita de 47.893 hectares. Pernambuco é o segundo maior produtor tendo produção de 468.826 toneladas em uma área de colheita de 17.237 hectares estando concentrada no agreste e no sertão do estado (IBGE, 2020).

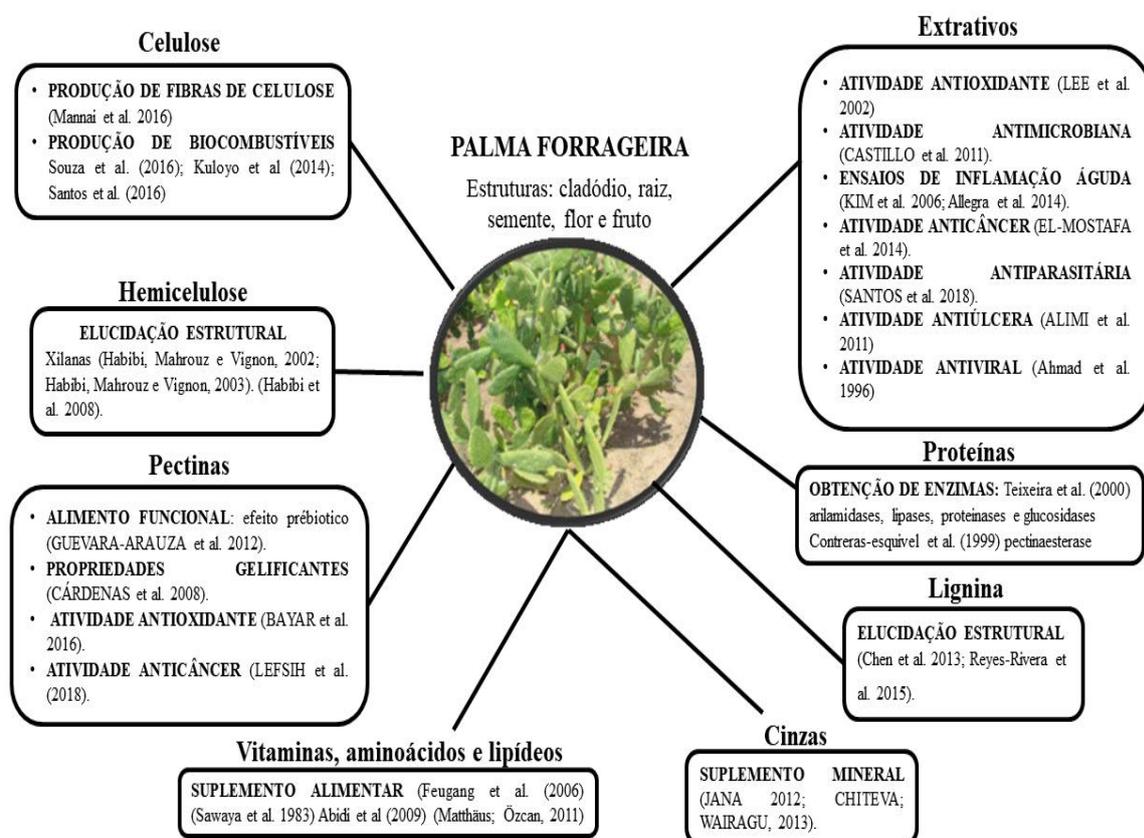
Por serem plantas adaptadas ao clima das regiões semiáridas, apresentam alto valor nutricional e produtividade em massa. Estas são utilizadas como alimento animal e humano e promovem diferentes benefícios à saúde (CHACCHIO; MESQUITA; SANTOS, 2006; SANTOS et al. 2006; NUNES, 2011). Entretanto, existem outras possibilidades de utilizações, seus constituintes incorporados em formulações alimentares (GUEVARA-ARAUZA et al. 2012), utilizadas para produção de enzimas industriais (TEIXEIRA et al. 2000; MELO 2015), biocombustíveis (SANTOS et al. 2016), produtos químicos (GUEVARA-ARAUZA et al. 2012), biocombustíveis dentre outros (GONÇALVES et al. 2014; YANG et al. 2015; NASCIMENTO et al. 2016; SOUZA-

FILHO et al. 2016). A Figura 12 sumariza algumas aplicações obtidas pelos constituintes presentes nas espécies de *Opuntia*.

Mesmo se conhecendo muito sobre a palma forrageira e seu potencial como alimento (humano e animal) e benefícios voltados a saúde, até o momento, não foi reportado nenhum estudo utilizando as espécies *O. ficus-indica* e *O. cochenillifera* como matéria-prima em uma biorrefinaria (SANTOS et al. 2006; NUNES, 2011; EL-MOSTAFA et al. 2014). Isto é, explorando em conjunto seus constituintes estruturais, celulose polioses, lignina, extrativos e cinzas com a finalidade de se obter produtos de alto valor agregado (PARADA; OSSEWEIJER; DUQUE, 2017).

A biorrefinaria de cactáceas ainda é um desafio, visto que muitos dos processos de fracionamento ainda precisam ser otimizados ou desenvolvidos. Além disso, muitos constituintes presentes nestas biomassas ainda não foram nem caracterizados quimicamente. Este trabalho, traz como inovação a utilização como matéria-prima duas espécies de palma forrageira, onde foi realizado o fracionamento, recuperação das macromoléculas e utilização destas. A obtenção de produtos derivados da palma forrageira pode vir a movimentar a economia da região.

Figura 12- Diferentes potencialidades dos diferentes constituintes presentes nas biomassas de *Opuntia*.



Fonte: Autor, (2019).

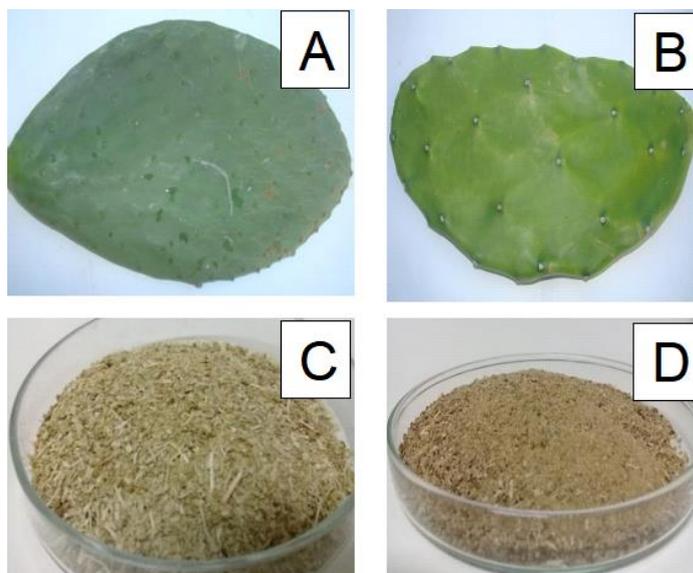
4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 BIOMASSA DE *OPUNTIA*

Cladódios das espécies *O. ficus-indica* (L.) Mill. (Clone IPA-20, número de registro 05165) e *O. cochenillifera* (L.) Mill. (IPA 100004, número de registro 27851) (Figura 13 A e B) com quatro anos de idade, foram fornecidos pelo Instituto Agrônômico de Pernambuco (IPA) <http://www.ipa.br/novo/>. A Estação Experimental Arcoverde-PE IPA está localizada no sertão pernambucano, com altitude de 664 metros, latitude 8°26'60" sul e longitude 37°03'15" oeste. A região apresenta precipitação média de 680 mm, temperatura anual de 23,7°C com variações de 13°C a 35°C de junho/julho a dezembro/janeiro, respectivamente.

Os cladódios foram secos em estufa por 48 h a 65 °C. Em seguida, foram então moídos em um moinho de facas (Fritsch-pulverisette 14) e tamisados numa granulação de 100 µm (Figura 13C e D).

Figura 13- Cladódios de *O. ficus-indica* (A) e *O. cochenillifera* (B) *in natura* e cladódios secos e moídos (C) e (D).



Fonte: Autor, (2019).

4.2 FRACIONAMENTO DA BIOMASSA DE *OPUNTIA*

O fracionamento da biomassa foi realizado em escala de laboratório (bancada) em 4 etapas, em condições já previamente otimizadas por outros autores para diferentes biomassas. Os cladódios (300 g) de *O. ficus-indica* e *O. cochenillifera* foram submetidos separadamente, a uma extração aquosa (Etapa 1), em proporções (g/L) 1:1,5 para *O. ficus-*

indica e *O. cochenillifera*, em tanque agitado de 2 L, a 60 °C e 1200 rpm, durante 1 h (SEPÚLVEDA et al. 2007; CAI et al. 2008). Após a extração, o material foi centrifugado 3600 rpm por 10 min e foi obtido três frações uma líquida, uma gelatinosa e outra contendo o material lignocelulósico. A fração líquida foi submetida à outra centrifugação a 11000 rpm, para separar as partes sólidas ainda presentes (COLONETTI, 2012). Em seguida, foram precipitadas com etanol (1:2). O precipitado foi então separado por centrifugação a 11000 rpm por 10 min. A fração gelatinosa, foi separada do sólido lignocelulósico por espátula. A fração gelatinosa e o precipitado em etanol foram secos a 80 °C por 48h (COLONETTI, 2012).

Feita a separação das frações pécticas (líquida e gelatinosa) o material lignocelulósico foi submetido a hidrólise ácida (Etapa 2) com H₃PO₄ a 1% em autoclave a 121°C durante 1 h, relação sólido: líquido 1:10 para obtenção de um hidrolisado ácido (VASCONCELOS, 2012). Após a reação o hidrolisado ácido foi separado da celulignina por filtração.

A celulignina (Etapa 3) foi então submetida à deslignificação alcalina com NaOH a 1%, sob as mesmas condições que a hidrólise ácida (CRUZ-FILHO, 2016). Após a deslignificação, o licor negro contendo as ligninas foi separado da polpa celulósica por filtração. Em seguida o licor foi acidificado com H₂SO₄ para pH 2 a 30°C e mantido sem agitação durante 12 h. Ao término da precipitação o sistema foi filtrado em papel de filtro e cuidadosamente lavado até ser neutralizado. A lignina sólida e a sólido (celulose) foram secos a 70 ± 1°C por aproximadamente 72 h (ROCHA et al. 2012).

A celulose obtida foi submetida a tratamento enzimático (Etapa 4) por enzimas celulolíticas comerciais. Nas seguintes condições: pH 4,8, sob agitação de 150 rpm, temperatura de 50 ± 2°C e relação sólido: líquido 2% (m/v) com as biomassas em granulação de 100 µm, por 96 h. As atividades enzimáticas utilizadas foram de 15 FPU/g substrato (Celluclast 1.5 L) e 10UI/g substrato (Novozym 188) (VASCONCELOS et al. 2013; CRUZ-FILHO, 2016).

Os cladódios *in natura* e as frações obtidas depois de cada etapa de fracionamento, foram submetidas à análise da composição, caracterização físico-química e a hidrólise enzimática. As frações pécticas, o hidrolisado ácido e o licor negro obtidos foram inicialmente, submetidos a caracterização física e química. Após caracterização as frações pécticas foram utilizadas como substrato para crescimento de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* UFPEDA 1015. O hidrolisado ácido foi utilizado para produção de enzimas industriais. Com os açúcares obtidos da hidrólise enzimática da celulose foram realizados

ensaios de fermentação com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* UFPEDA 1015. Por fim com as ligninas foram realizados estudos em células animais respectivamente. Na Figura 14 está apresentado o fluxograma geral de todas as etapas realizadas neste trabalho.

Figura 14- Fluxograma geral mostrando as etapas realizadas durante o fracionamento da biomassa.



Fonte: Autor, (2020).

4.3 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA BIOMASSA (IN NATURA E FRACIONADA)

A composição química das biomassas de *Opuntia in natura* e dos sólidos obtidos durante o fracionamento (Figura 14) foi determinada através de adaptação de técnica validada e utilizada no Laboratório de Processos Biotecnológicos da UFPE para análise de biomassas de cana-de-açúcar (GOUVEIA et al. 2009).

A adaptação do método à análise se deu em relação aos solventes extratores utilizados, para permitir a extração e fracionamento do material pécico, baseando-se em

metodologia de extração de polissacarídeos pécnicos de Habibi, Mahrouz e Vignon (2005) e a granulação da biomassa foi de 80 mesh. Os teores de extrativos foram determinados apenas para os cladódios *in natura*.

4.3.1 Determinação do teor de extrativos dos cladódios *in natura*

Para a determinação do teor de extrativos foi realizada uma extração em um aparelho de Soxhlet, utilizando como solvente extrator o sistema tolueno: etanol 38:62 (v/v) por 8 h, segundo Habibi, Mahrouz e Vignon (2005). Ao final da extração, o sólido obtido foi seco em estufa (Tecnal, TE-393/1) a 105 ± 2 °C, até peso constante. O teor de extrativos em percentual foi calculado por diferença de massa através da Equação 1 (SLUITER et al. 2005).

$$\%Ext = \left(\frac{M_{ce} - M_{le}}{M_a} \right) * 100 \quad (1)$$

Sendo: M_{ce} = massa da amostra com extrativos (g); M_{le} = massa da amostra livre de extrativos (g); M_a = massa da amostra inicial seca (g).

4.3.2 Determinação do teor de umidade

Para a determinação da umidade, se utilizou a metodologia do peso constante. Onde 2,0 g de biomassa foram levados à estufa (Tecnal, TE-393/1), a 105 ± 2 °C e pesada em intervalos regulares de tempo, até peso constante. A umidade foi determinada pela Equação 2 (SLUITER et al. 2005).

$$\%U = \left(1 - \frac{M_{seca}}{M_{úmida}} \right) * 100 \quad (2)$$

Onde: %U = Percentual de umidade; M_{seca} = Massa seca; $M_{úmida}$ = Massa úmida.

4.3.3 Hidrólise ácida (H_2SO_4 72% v/v) das biomassas de *Opuntia*

Amostras de 2,0 g dos cladódios secos *in natura* e os obtidos durante as etapas de fracionamento, foram transferidas para um béquer de 100 mL e tratadas com 12 mL de H_2SO_4 72% (v/v), sob agitação durante 8 minutos, a uma temperatura de 45 ± 3 °C em banho termostático (Tecnal, TE-2005). Em seguida foi adicionado 50 mL de água destilada. Transferiram-se as amostras para frascos de Erlenmeyer de 500 mL e adicionou-se 225 mL de água destilada. O sistema foi levado à autoclave durante 30 min

a 121°C (1,05 atm) e resfriado a 25°C. O material hidrolisado foi filtrado por filtração simples em papel de filtro previamente seco e pesado. O hidrolisado foi recolhido em balão volumétrico de 500 mL e o sólido (lignina insolúvel mais cinzas da lignina) contido no papel de filtro, foi lavado com porções de 50 mL de água destilada até completar o volume do balão.

Após a separação do hidrolisado, o sólido retido no papel de filtro, foi lavado com 1500 mL de água destilada para a remoção de ânions sulfato o qual foi utilizado para a quantificação de lignina insolúvel e cinzas (GOUVEIA et al. 2009; ROCHA et al. 2011).

4.3.4 Determinação do teor de lignina solúvel

Para a determinação da lignina solúvel, uma alíquota de 5 mL do hidrolisado foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL e corrigida com 1,5 mL de uma solução de NaOH 6 M para obter solução com pH 12. Completou-se o volume do balão com água destilada obtendo assim uma diluição de 1:20. Em seguida foi realizada a leitura de absorbância do hidrolisado em espectrofotômetro (Hewlett-Packard, modelo 8453) a 280 nm, tendo água como branco. A concentração da lignina solúvel foi obtida pelas Equações 3 e 4 (ROCHA et al. 2011).

$$Con. LigS = [4,187 \cdot 10^{-2}(A_{t280} - A_{pd280}) - 3,279 \cdot 10^{-4}] \quad (3)$$

$$A_{pd280} = [(C_{Furf} \cdot \epsilon_{Furf}) + (C_{HMF} \cdot \epsilon_{HMF})] \quad (4)$$

Onde: A_{t280} : Absorbância da solução de lignina junto com os produtos de degradação em 280 nm; A_{pd280} : Absorbância, em 280 nm, dos produtos de decomposição dos açúcares (furfural e 5-hidroximetilfurfural), cujas concentrações C_{Furf} e C_{HMF} foram determinadas previamente por CLAE; ϵ_{Furf} e ϵ_{HMF} são absortividades foram obtidas experimentalmente.

4.3.5 Determinação de carboidratos, ácido orgânicos, HMF (5-hidroximetilfurfural) e furfural na fração líquida.

A identificação e quantificação dos compostos presentes no hidrolisado, obtido a partir da hidrólise com H₂SO₄ 72% (v/v), foi realizada em cromatógrafo líquido de alta eficiência (Agilent, série 1100), coluna Aminex HPX87H (Bio-Rad), temperatura de 60°C, fase móvel: H₂SO₄ 5 mM, fluxo de 0,6 mL/min e detector (IR) índice de refração para a identificação e quantificação dos componentes (celobiose, glicose, xilose,

arabinose, ácido fórmico, ácido acético e ácido galacturônico).

A concentração de furfural e HMF foi determinada utilizando-se uma coluna de fase reversa (C-18) (Agilent Technologies), com uma fase móvel composta por uma solução de acetonitrila-água 1:8% contendo 1% de ácido acético, utilizando-se um detector de UV/Vis (274 nm) a 25 °C. Foi utilizado o método padrão externo com concentrações de 0,050 a 6 g/L (GOUVEIA et al. 2009). As amostras foram filtradas em membrana 0,22 µm antes do procedimento analítico. Para a determinação da quantidade final dos polissacarídeos (celulose (C), hemicelulose (H) e pectinas (P)), utilizou uma correção através dos fatores de conversão (ROCHA, 2000; GOUVEIA et al. 2009) encontrados na Tabela 4.

Tabela 4- Fatores de conversão dos componentes precursores de Celulose, Hemicelulose e pectinas.

Componentes	Fator de Conversão
Celobiose (C)	0,95
Glicose (C)	0,90
Xilose (H)	0,88
Arabinose (H)	0,88
Ácido galacturônico (P)	0,91
Ácido Acético (H)	0,72
Ácido Fórmico (C)	3,52
Furfural (H)	1,37
5-Hidroximetilfurfural (C)	1,29

Fonte: Rocha, (2000) e Gouveia et al. (2009).

4.3.6 Determinação de lignina insolúvel em meio ácido, teor de cinzas de lignina e cinzas totais.

O material insolúvel retido no papel de filtro, proveniente da etapa de hidrólise ácida, após lavagem com 1500 mL de água destilada, foi seco em estufa (Tecnal, TE-393/1) a 105 ± 2 °C até massa constante. Em seguida, o material seco foi transferido quantitativamente para cadinhos de porcelana, previamente secos e pesados. Posteriormente, as amostras foram calcinadas a 300 °C por aproximadamente 1 h e em seguida, a 800 °C por 2 h. Ao final do processo, os cadinhos, contendo as cinzas, foram resfriados em dessecador e a massa de cinzas, presente na lignina insolúvel (Equação 5), foi quantificada em balança analítica (Ohaus, PA214CP) (GOUVEIA et al. 2009; ROCHA et al. 2011).

$$\text{Cinzas I (g)} = M_{cc} - M_{cd} \quad (5)$$

Sendo: M_{cc} : Massa de cinzas + o cadinho; M_{cd} : Massa do cadinho tarado.

A porcentagem de lignina insolúvel em meio ácido foi calculada pela equação em relação à biomassa seca, subtraindo-se a massa de cinzas presente na lignina (GOUVEIA et al. 2009; ROCHA et al. 2011). O teor de lignina insolúvel em meio ácido é dado pela Equação 6:

$$LigI(\%) = \left[\frac{M_{pr} - (M_c + M_{fp})}{M_a} \right] \cdot 100\% \quad (6)$$

Sendo: LigI (%) = Porcentagem de lignina insolúvel; M_{pr} = Massa do papel de filtro com os resíduos sólidos + cinzas; M_c = Massa de cinzas insolúveis em meio ácido; M_{fp} = Massa do papel de filtro; M_a = Massa da amostra inicial seca.

Para determinação do teor de cinzas totais (em triplicata), foram pesados aproximadamente 2 g de cladódio seco em cadinhos de porcelana previamente secos e tarados. Estes materiais foram inicialmente calcinados a 300 °C por aproximadamente 1 h e então a 800 °C por 2 h. Após a calcinação os cadinhos foram resfriados em dessecador e a massa de cinzas determinada em balança analítica (Ohaus, PA214CP) (GOUVEIA et al. 2009; ROCHA et al. 2011).

4.3.7 Hidrólise química e quantificação por CLAE dos constituintes presentes nas frações pécnicas, hemicelulose e ligninas.

As frações pécnicas foram submetidas à hidrólise ácida segundo condições obtidas por Lefsih et al. (2016) com modificações. Foi realizada uma hidrólise ácida a 100 ± 5 °C em banho termostaticado (Nova Instruments – NI 1246) utilizando 2,5 mL de Ácido Trifluoroacético-TFA (2 M) para 25 mg de cada fração pécnica durante 6 horas.

O hidrolisado hemicelulósico também foi submetido a uma pós-hidrólise, empregando-se H_2SO_4 4%. Foram adicionadas partes iguais de hidrolisado e de ácido (diluição de 1:1), a 121 °C (1,05 atm), em autoclave, durante 1 h para hidrólise de oligossacarídeos resultantes (ÖHGREN et al. 2007). Parte das amostras foram neutralizadas com 2,5 mL de hidróxido de amônio (NH_4OH – 2M), completadas para 10 mL com água destilada e outra parte não (de acordo com o método cromatográfico) e foram filtradas em membrana microporosa (0,22 μm).

Para determinar a composição monomérica, as ligninas foram oxidadas com nitrobenzeno pelo método descrito por Iiyama e Lam (1990) com modificações. Onde 50 mg dessas moléculas foram colocadas em uma ampola contendo 1 mL de NaOH 2M e 100 µL de nitrobenzeno. A ampola foi selada e aquecida a 170 °C durante 2,5 h com agitação na metade do tempo de reação. Após oxidação, a amostra foi lavada duas vezes com clorofórmio, acidificada com HCl 5M e extraída duas vezes com clorofórmio. Os extratos orgânicos foram combinados, secos e ressuspensos em metanol.

A identificação e quantificação dos carboidratos, ácidos orgânicos e produtos de degradação foi realizada de com o item 4.3.5. A concentração de galactose e xilose foi determinada utilizando água ultrapura como fase móvel, fluxo de 0,2 mL·min⁻¹), coluna HC-75 Pb²⁺ (Hamilton) a 80 °C. Estes monossacarídeos foram quantificados em CLAE (Agilent, série 1100), empregando um detector por índice de refração (IR). A quantificação dos componentes *p*-hidroxibenzaldeído (Hy) vanilina (V) e siringaldeído (Sy) presentes nas ligninas foi realizada em uma coluna de fase reversa (C-18) (Agilent Technologies) usando um detector UV/Vis (290 nm) a 25 °C tendo vanilina como padrão interno. As amostras foram filtradas em membrana 0,22 µm antes do procedimento analítico.

4.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS BIOMASSAS E MACROMOLÉCULAS OBTIDAS DURANTE O FRACIONAMENTO.

4.4.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Para verificar as mudanças na superfície dos sólidos obtidos durante o fracionamento quando comparadas a *in natura*, foi empregada a técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV). As amostras foram previamente cobertas com 20 nm de ouro no metalizador JFC-1100 (Jeol, Tokyo, Japan) e foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura JEOL T-200 (Jeol, Tokyo, Japan).

4.4.2 Espectroscopia no Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).

Para visualização dos grupos funcionais foi empregada a técnica de Espectroscopia no Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) em infravermelho (Bruker IFS66). Pastilhas de KBr foram preparadas, a partir de maceração de 200 mg de KBr e 2 mg de amostra, em um almofariz Gral de ágata. Em seguida, a mistura foi colocada em um molde pastilhador de aço inoxidável, o qual foi submetido a vácuo

durante 5 min e pressionado até 15 kgf.cm⁻², para a formação da pastilha. Os espectros foram obtidos na região de 4000 a 400 cm⁻¹.

Apenas para as frações pécnicas foi determinado o grau de esterificação (DE) integrando as bandas no espectro de infravermelho foi proposta por Monsoor, Kalapathy e Proctor (2001). Seus estudos compararam a determinação do grau de esterificação por cromatografia gasosa com resultados obtidos pela integração das áreas das bandas de grupos carboxílicos esterificados (entre 1844 ± 29,8 cm⁻¹ e 1682 ± 12,3 cm⁻¹), atribuídos à deformação axial do grupo carbonila, C=O, e grupos carboxílicos não esterificados, atribuídos a deformação axial dos íons carboxilato, COO⁻, (entre 1682 ± 12,3 cm⁻¹ e 1532 ± 20,2 cm⁻¹) no espectro de infravermelho através da Equação 7:

$$DE = \left(\frac{A_{est}}{A_{nest} + A_{est}} \right) * 100\% \quad (7)$$

Sendo: DE é o grau de esterificação (%); A_{est}, a área dos picos dos grupos carboxílicos esterificados; A_{nest}, a área dos picos dos grupos carboxílicos não esterificados. Os valores das áreas sob as curvas foram determinados utilizando o software Spectrus Processor (ACD LABS).

4.4.3 Difração de raios-X – (DRX)

Com o objetivo de se avaliar as alterações nos cristais de celulose nas biomassas de *Opuntia in natura* comparado aos sólidos obtidos durante o fracionamento. Empregou-se a técnica de DRX, para isto, utilizou-se um difratômetro de raios- X (XRD-6000/Shimadzu), pertencente ao CETENE. As condições aplicadas foram: 40 kV, intervalo angular 4° a 60° (ângulo de Bragg-2θ), variação angular 0,05° e tempo de contagem de 1s. O índice de cristalinidade (IC) foi determinado pela Equação 8 (SEGAL et al 1959).

$$\%IC = \left[\left(\frac{I_{002} - I_{am}}{I_{002}} \right) \right] . 100\% \quad (8)$$

Onde: %IC: Índice de cristalinidade; I₀₀₂: Intensidade no pico cristalino a aproximadamente 2θ; I_{am}: Intensidade relativa à região amorfa

4.4.4 Análises por espectroscopia de RMN (^{13}C CPMAS e ^1H)

As ligninas foram caracterizadas por Ressonância Magnética Nuclear em estado sólido (^{13}C CPMAS RMN). As amostras foram secas, homogeneizadas, pulverizadas e peneiradas a 0,5 mm. Os espectros de RMN foram registados num Bruker AV-300 equipado com uma sonda, MAS com um furo de 4 mm de largura, com os seguintes parâmetros de aquisição: 13.000 Hz de velocidade de rotação do rotor; 2 s de tempo de reciclagem; ^1H -power para CP 92.16 W; ^1H 90° de pulso 2,85 μs ; ^{13}C de potência para CP 150, 4 W; 1 ms de tempo de contato; 30 ms de tempo de aquisição; 4000 scans. As amostras foram acondicionadas em rotores de zircônio de 4 mm com tampa Kel-F. A sequência de pulsos de polarização cruzada foi aplicada com um pulso de “rampa” de formato composto no canal ^1H para explicar a falta de homogeneidade da condição de Hartmann-Hann na alta frequência de rotação do rotor. A transformada de Fourier foi realizada com um ponto de dados de 4k e uma apodização exponencial de 100 Hz de ampliação de linha.

Para a interpretação dos espectros de RMN ^{13}C -CPMAS, o intervalo global de alterações químicas foi dividido nas seguintes regiões de ressonância principais (MARTINEZ-BALMORI et al. 2014): alquil-C (0-45 ppm); metoxil-C e N-alkil-C (45-60 ppm); O-alkil-C (60-110 ppm); aromáticos C não substituídos e alquil-substituídos (110-145 ppm); O-substituído aromático-C (145-160 ppm); carboxila e carbonila-C (160-200 ppm). A área de cada região espectral (Riabs) foi dividida pela soma de todas as áreas espectrais, para obter uma quantidade relativa (software MestreNova 6.2.0, Mestre-lab Research, 2010).

A acetilação da lignina foi realizada com o objetivo de analisar a molécula em ^1H RMN o método foi realizado segundo Rocha et al. (2014). Cerca de 50 mg de lignina, obtidas, foram dissolvidas em 5 mL de piridina e 5 mL de anidrido acético. A mistura foi borbulhada por 15 min com nitrogênio e o frasco selado. O sistema foi deixado a temperatura ambiente no escuro durante 50 h. Ao término da reação o excesso de anidrido acético foi removido pela adição de metanol. Os solventes foram evaporados sob pressão reduzida, com o auxílio da formação de azeótropo com tolueno e etanol. Finalmente as amostras foram completamente secas por três dias a vácuo.

As análises de ^1H RMN foram realizadas com ligninas acetiladas (20 mg dissolvidas em CDCl_3). Para as frações pécicas (20 mg dissolvidas em D_2O aquecido a 60°C) (MZOUGHFI et al. 2018). As amostras foram submetidas à análise de ressonância

magnética nuclear de ^1H em um espectrômetro Bruker Avance 300 operando a 400MHz de frequência, com sonda de 5mm

4.4.5 Análise elementar e determinação da fórmula mínima

Os teores de carbono, hidrogênio e oxigênio das ligninas foram determinados por analisador de elementos (CE EA 1110). A fórmula mínima fórmula mínima foi determinada utilizando as expressões descritas por Gonçalves et al. (2000).

4.4.6 Determinação do peso molecular médio (Mw)

O peso molecular médio das frações pecticas em diferentes concentrações (1,0 a 9,0 g/L) foi estimado através da viscosidade dessas frações em água usa-se o viscosímetro de Ostwald aplicando as seguintes Equações 9, 10, 11, 12 e 13 (ARSLAN, 1995). As frações foram dissolvidas em água aquecida a 60 °C (MZOUGHJI et al. 2018).

$$\text{Viscosidade Relativa} \quad \eta_{\text{rel}} = \frac{t}{t_0} \text{ (adimensional)} \quad (9)$$

$$\text{Viscosidade específica} \quad \eta_{\text{esp}} = \eta_{\text{rel}} - 1 = \frac{(t - t_0)}{t_0} \quad (10)$$

$$\text{Viscosidade específica reduzida} \quad \eta_{\text{esp red}} = \frac{\eta_{\text{esp}}}{c} \quad (11)$$

$$\text{Viscosidade inerente} \quad \eta_{\text{iner}} = \frac{\ln(\eta_{\text{rel}})}{c} \quad (12)$$

$$\text{Viscosidade Intrínseca} \quad [\eta] = K(\overline{M}_v)^a \quad (13)$$

Onde: t = tempo de escoamento da solução; no viscosímetro; t_0 = tempo de escoamento do solvente puro; no viscosímetro c = concentração das frações em (g/L); K e a são constantes que dependem do polímero, do solvente e da temperatura. No caso da pectina: $a = 1,34$ e $K = 1,4 \cdot 10^{-6}$ (CHEREMISINOFF, 1989).

Para as ligninas a distribuição da massa molecular foi determinada de acordo com Rocha et al. (2014) usando um sistema de cromatografia com uma coluna de vidro (57 x 1,8 cm) preenchida com uma suspensão de Sephadex G-50 em NaOH 0,5 M. A fase móvel utilizada foi 0,5 M NaOH em um fluxo de 0,4 mL/min. Recolheram-se frações de 4 mL e a absorbância de cada fração foi lida a 280 nm. O volume de amostra injetada foi de 0,4 mL e sua concentração de 2,0 mg/mL. A coluna cromatográfica foi previamente calibrada com proteínas e uma lignina de bagaço de cana de peso molecular conhecido

(albumina de 66 kDa; anidrase carbónica de 29 kDa; citocromo C de 12,4k Da e aprotinina de 6,5 kDa e lignina de bagaço de cana 2,0 kDa). Com isto foram determinados os valores do peso molecular médio numérico (Mn), do peso molecular médio ponderado (Mw) e do Mw/Mn (dispersibilidade).

4.4.7 Espectroscopia UV-Vis

Para análises de espectroscopia UV-Vis, a metodologia de Rocha et al. (2014) com modificações foi utilizado. Preparou-se uma solução de ligninas a 0,1 g/L em NaOH 0,01 mol/L. A partir desta solução, foram realizadas diluições de 0,01 a 0,05 g/L, as quais foram utilizadas para obter uma curva analítica a 280 nm. A solução contendo 0,03 g/L de lignina foi usada para obter os espectros, espalhando entre 250 e 400 nm em um espectrofotômetro da Hewlett-Packard, modelo 8453. O branco das análises foi realizado com solução de NaOH 0,01 mol/L.

4.4.8 Determinação de guaiacila, siringila e *p*-hidroxifenila presentes na lignina por Termoquimólise-gás-cromatografia-massa-espectrometria (THM-GC-MS).

Para a linha off-line-THM-GC-MS, cerca de 100 mg de cladódios das espécies *O. ficus-indica* e *O. cochenillifera* foram colocados em barcas de quartzo e umedecidos com 0,5 mL de solução de hidróxido de tetrametilamônio (25% em metanol). Depois da mistura ter secado sob uma corrente de nitrogênio durante cerca de 10 min, a amostra foi introduzida num reator tubular Pyrex (50 cm x 3,5 cm d.i.) e aquecida a 400 °C durante 30 minutos num forno. Os produtos liberados pela termoquimólise foram continuamente arrastados por um fluxo de hélio (20 mL/min) em duas armadilhas sucessivas de clorofórmio (50 mL) mantidas em um banho de sal gelado. As soluções de clorofórmio foram combinadas num frasco redondo e concentradas por evaporação rotativa sob pressão reduzida. O resíduo foi redissolvido em 1 mL de clorofórmio e transferido para um frasco de vidro para anise de GC-MS. Duas réplicas de termoquimólise foram realizadas para cada amostra de ácido húmico. Os produtos da termoquimólise foram analisados por GC-MS. As amostras foram analisadas em um cromatógrafo GC-MS QP2010 Plus (Shimadzu, Tóquio, Japão). A coluna utilizada foi de 30 m x 0,25 mm id, 0,25 µm, Rtx-5MS WCOT.

A separação cromatográfica foi conseguida com o seguinte programa de temperatura: 60 °C durante 1 min (isotérmico) aumentada a 7°C/min até 100 °C e, depois, a 4°C/min a 320 °C, seguido de 10 min a 320°C (isotérmico). O gás de arraste foi hélio a

1,90 mL/min, temperatura do injetor 250 °C e o modo de injeção dividida com 30 mL/min. Os espectros de massa foram obtidos no modo EI (70 eV), e a varredura estava na faixa m/z 45–650 com um tempo de ciclo de 1s. A identificação do composto foi baseada na comparação de espectros de massa com o banco de dados da biblioteca NIST, espectros publicados e padrões reais (MARTINEZ-BALMORI et al. 2013).

4.4.9 Gráficos radar para comparação das ligninas

O uso de gráficos de radar permite uma classificação direta das diferentes ligninas por comparação dos parâmetros-chave. Os parâmetros selecionados para a elaboração dos gráficos foram: conteúdo de ligações β -O-4, unidades não condensadas (NCS), unidades S e G (obtidas por THM-GC-MS), e rendimento de vanilina (V) e Siringaldeído (Si) (obtido por NO). Foi utilizado o software Origin Lab 9.0 para confecção dos gráficos.

4.5 PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS

4.5.1 Obtenção e manutenção das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*

A linhagem *Saccharomyces cerevisiae* UFPEDA 1015, foi repicada em placas de Petri contendo meio de Sabouraud composto por: peptona de carne (5,0 g/L), peptona de caseína (5,0g/L), glicose (20,0 g/L) ágar (15,0 g/L) e pH 5,6 os micro-organismos foram incubados em estufa a 35°C por 3 dias e depois estocado sob refrigeração.

4.5.2 Hidrólise enzimática das biomassas *in natura* e fracionadas e cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* no hidrolisado enzimático.

A hidrólise enzimática dos cladódios de *O. ficus-indica* e *O. cochenillifera in natura*, após as etapas de fracionamento foi realizada nas seguintes condições: tampão citrato de sódio 0,05 mol/L, pH 4,8, sob agitação de 150 rpm, temperatura de $50 \pm 2^\circ\text{C}$ e relação sólido: líquido 2% (m/v) com as biomassas por 96 h. As atividades enzimáticas utilizadas foram de 15 FPU/g do substrato (Celluclast 1.5 L) e 10UI/g do substrato (Novozym 188) (VASCONCELOS et al. 2013; CRUZ-FILHO, 2016). Os ensaios conduzidos foram realizados em frascos de Erlenmeyer com volume útil de 500 mL.

Amostras foram retiradas nos tempos de hidrólise durante 96 h. As amostras foram submetidas a um banho em ebulição por 5 min e logo após em um banho de gelo para inativação das enzimas e por fim foram centrifugadas, filtradas em membranas 0,22 μm e posteriormente analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) nas seguintes condições: coluna HPX87H (Bio-Rad), temperatura de 60 °C, fase móvel:

H₂SO₄ 5 mM, e fluxo de 0,6 mL/min, detector índice de refração (IR) onde foram determinados celobiose e glicose. A porcentagem de conversão de celulose em glicose é calculada pela Equação 14.

$$CC\% = \left[\frac{Massa_{glicose} \cdot F_h}{Massa_{inicial} \cdot Y_i} \right] \cdot 100\% \quad (14)$$

Onde: CC%: Conversão enzimática da celulose; M_{glicose}: Massa de glicose presente no hidrolisado (g); M_{inicial}: Massa seca antes da etapa de hidrólise; Y_i: Teor de celulose na biomassa; F_h: Fator de hidrólise da celulose = 0,9.

Ao final do processo (96 h) foi realizada a fermentação do hidrolisado sem a separação das frações sólida e líquida (hidrolisado enzimático obtido apenas do material deslignificado). Uma linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* UFPEDA 1015, cedida pela Coleção de Micro-organismos do Departamento de Antibióticos da UFPE, foi utilizada para a produção de etanol. Para a realização deste experimento foi utilizada a metodologia proposta por Vasconcelos, (2012) com modificações. Antes da inoculação da levedura, a temperatura do sistema reacional foi reduzida para 35°C, sem agitação. Alcançada a temperatura de 35 °C, foram adicionados 20 mL de meio de enriquecimento, composto por 10 g/L de extrato de levedura e 20 g/L de peptona.

O inóculo foi cultivado em mesa agitadora, a 35 °C, sem agitação, durante 20 horas, em meio contendo: glicose (20 g/L), extrato de levedura (10 g/L) e peptona (20 g/L). Ao hidrolisado enzimático, já acrescido com o meio de enriquecimento, foi adicionado 5% (v/v) do inóculo. Essa concentração foi equivalente a 10⁶ UFC/mL. A concentração da biomassa foi determinada pelo método de diluição seriada (10⁻¹ a 10⁻⁶), a determinação do substrato e do etanol por CLAE, como descrito no item 4.3.5.

4.5.3 Cinética de crescimento e produção de enzimas pectinolíticas pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* UFPEDA 1015 em meios a base de frações pécticas.

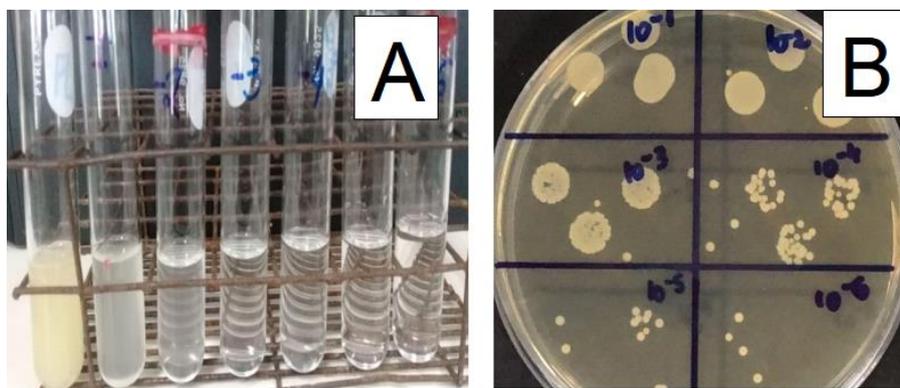
A metodologia para a verificação da produção enzimática utilizada foi modificada de Hankin, Anagnostakis, (1975) e Uenojo, Pastore, (2007). Os ensaios de para verificar se as leveduras em estudo são produtoras de pectinases apresentou meio de cultura com a seguinte formulação: (i) KH₂PO₄; (4,0 g/L); (NH₄)₂SO₄ (2,0g/L) Na₂HPO₄ (6,0 g/L); Extrato de Levedura (1,0 g/L) e Ágar (15 g/L). (ii) A este sistema foi adicionado 2,0 mL

de cada um dos elementos: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1,0g/L); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1,0 g/L); CaCl_2 (1,0g/L), H_3BO_3 (0,1 g/L); MnSO_4 (0,1g/L) ZnSO_4 (0,07g/L) CuSO_4 (0,05g/L), MoO_3 (0,01g/L).

Com estes dois sistemas foram utilizadas diferentes fontes de carbono as quais promoveram a formulação de quatro meios sendo estes com as pectinas solúveis e insolúveis das palmas numa concentração de 10 g/L. Todos os meios foram esterilizados em autoclave a 121°C por 15 min. A produção de enzimas foi verificada com uma solução de vermelho de rutênio a 0,05%.

O crescimento celular foi realizado a partir de 10% de inóculo em frascos de Erlenmeyer (1L) tendo como meio de cultura apenas as frações de pectina solúvel (200mL) de *O. ficus-indica* e *O. cochenillifera* nas seguintes condições: 250 rpm 35 °C e pH 6,5. Nos intervalos regulares de 0 a 48 horas, alíquotas foram retiradas e diluídas de 10^{-1} a 10^{-6} , em tubos contendo água destilada esterilizada (Figura 15A). Em seguida, alíquotas 10 μL foram plaqueadas em placas de Petri contendo meio de Sabouraud (Peptona de carne 5,0 g/L, Peptona de caseína 5,0 g/L, Glicose 20 g/L e Agar 15 g/L e pH 6,5) solidificado e foram incubadas a 35°C por 24 h (Figura 15B). Além disso, alíquotas foram separadas para a verificação da produção de enzimas pectinolíticas no caldo.

Figura 15- Diluição seriada (A) e crescimento de leveduras em placas de Petri (B).



Fonte: Autor, (2019)

A partir da enumeração das células viáveis, foi plotado um gráfico que representou o crescimento microbiano expresso pelo Log_{10} das UFC/mL em função do tempo, em horas. Através desses dados foi possível calcular a velocidade máxima de crescimento específico (μ_{max}) (Equação 15) e o tempo de geração (tg) (Equação 16) da população microbiana (LULDEKING, 1967).

$$\ln \frac{X}{X_0} = \mu_{max} \cdot t \quad (15)$$

$$t_g = \frac{\ln 2}{\mu_{max}} \quad (16)$$

Onde: X = Concentração de micro-organismos no final da fase logarítmica, UFC/mL; X₀= concentração de micro-organismos no início da fase logarítmica, UFC/mL; t= tempo (h); μ_{max}= velocidade de crescimento específico durante a fase logarítmica (h⁻¹); ln 2 = 0,69 quando X/X₀ = 2; t_g= tempo de geração.

4.5.4 Avaliação do crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* UFPEDA em diferentes valores de pH, concentração de bile e suco gástrico.

Foi utilizado um meio de cultivo quimicamente definido (CD) composto por: (NH₄)₂SO₄ (5,0 g/L), MgSO₄.7H₂O (0,5 g/L), KH₂PO₄ (3,0 g/L) tendo como fonte de carbono glicose (20 g/L). A este sistema foi adicionado 1 mL da solução de vitaminas (pantotenato de cálcio (1,0 g/L), nicotinamida (1,0 g/L), mio-inositol (25 g/L), tiamina.HCl (1,0 g/L), piridoxina.HCl (1,0 g/L) e para-aminobenzoico (0,2 g/L) e 1,0 mL da solução de elementos traços (MnCl₂.2H₂O (0,01g/L), CoCl₂.6H₂O(0,003g/L), CuSO₄.5H₂O(0,003g/L), Na₂MoO₄.2H₂O(0,045g/L) FeSO₄.7H₂O (0,03g/L), H₃BO₃(0,01g/L), KI(0,01 g/L) e ZnSO₄.7H₂O (0,045g/L)). E outros dois meios utilizando apenas a fração líquida de *O. ficus-indica* e *O. cochenillifera*.

Para a padronização do inóculo as leveduras foram crescidas durante 24 h a 35 °C em regime estático no meio quimicamente definido. Após o crescimento o sistema foi centrifugado a 11000 rpm por 10 min o sobrenadante foi descartado e a massa celular foi ressuspensa em água esterilizada fim de obter uma concentração de inóculo de 10⁸ UFC/mL. Os ensaios de crescimento em condições ácidas, bile bovina em solução simulada de suco gástrico foram realizados segundo Psomas et al. (2001) com modificações.

O crescimento a pH baixo foi estimado por inoculação de 10% de culturas padronizadas em frascos Erlenmeyer contendo meio CD e as frações pécticas de *O. ficus-indica* e *O. cochenillifera* em diferentes pH (1,0, 2,0, 3,0) ajustados com 3M de ácido clorídrico com 3M. As condições de ensaio foram: 250 rpm, 35 °C por 8 h. Ao final do processo o sistema foi centrifugado a 11000rpm por 5minuto e o sobrenadante foi descartado. O crescimento em bile bovina foi estimado por inoculação de 10% de culturas

padronizadas em frascos Erlenmeyer contendo meio CD e as frações pécticas de *O. ficus-indica* e *O. cochenillifera* em diferentes concentrações de bile (1,0, 2,0, 3,0%). As condições de ensaio foram: 250 rpm, 35 °C por 8 h. O crescimento das leveduras em solução gástrica sintética foi estimado por inoculação de 10% de culturas padronizadas em tubos de ensaio contendo 2,0 mL de uma solução de pepsina (3g/L), NaCl (5g/L) e pH ajustado para 2,0 utilizando HCl 1M. Sistema foi mantido a 35 °C por 8 minutos, em seguida o sistema foi centrifugado a 11000rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado.

Ao final de cada ensaio o sistema foi centrifugado a 11000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. A massa celular foi suspendida em uma solução salina (0,85% NaCl) e uma alíquota foi retirada, diluída, plaqueada e incubada a 37 °C por 48 horas.

4.5.5 Obtenção e manutenção das linhagens de *A. awamori*

O micro-organismo utilizado para a produção de enzimas foi uma linhagem de *A. awamori* cedida pelo Laboratório de Tecnologia Enzimática da UFRJ. Os meios de cultivo utilizados para esporulação, preparação de inóculo e produção de enzimas estão descritos nas Tabela 5 e Tabela 6, respectivamente.

A composição do meio de fermentação para produção de enzimas continha apenas o hidrolisado ácido do cladódio da palma forrageira.

Tabela 5- Meio de esporulação.

Componentes	Concentração (g/L)
Batata	200
Glicose	20
Ágar	20

Fonte: Autor, (2019).

Tabela 6- Composição do meio de preparação de inóculo.

Componentes	Concentração (g/L)
Glicose	10
(NH ₄) ₂ SO ₄	3
KH ₂ PO ₄	1
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,1
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,05
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,05
CuSO ₄ · 7H ₂ O	0,005
MnSO ₄ · 4H ₂ O	0,005
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,005
Extrato de levedura	12

Fonte: Autor, (2019).

4.5.6 Cultivos em Biorreator: produção de enzimas industriais utilizando meio a base de hidrolisado ácido (Hemicelulósico)

Os cultivos foram realizados em biorreator de bancada (New Brunswick Scientific, Bioflo 1100) (Figura 16). As condições utilizadas foram: volumes de trabalho de 2,0 L, 30 °C, agitação de 1000 rpm, aeração de 1 vvm, pH 5 e 10% de inóculo. Os inóculos foram cultivados em frascos Erlenmeyer em mesa agitadora a 250 rpm e 30 °C por 48 horas em meio à base de glicose (Tabela 7). Amostras foram retiradas durante o processo para o acompanhamento do crescimento, do consumo de substrato e da produção de enzimas. O cultivo foi entorno de 96 h. O pH foi controlado com adição automatizada de soluções de H₂SO₄ 3 M e NaOH 3 M. Para controlar espuma, foi adicionado polipropilenoglicol P2000 (Fluka) de forma automática.

Figura 16- Biorreator utilizado para produção de enzimas (New Brunswick Scientific, Bioflo 1100).



Fonte: Autor, (2019).

4.5.7 Concentração de biomassa

Amostras foram coletadas em diferentes intervalos de tempo e assim foram filtradas em membranas (0,45 µm) previamente pesadas em balança analítica, e secadas em estufa até peso constante (80 °C, por 24 horas). A velocidade máxima de crescimento específico (μ_{\max}) foi determinada pela Equação 15. O líquido filtrado foi utilizado para a determinação das atividades enzimáticas.

4.5.8 Atividade Pectinolítica

Uma alíquota de 0,25 mL da amostra foi adicionada a uma solução contendo 1 mL de pectina cítrica 1%, em tampão de acetato de sódio (pH 4,8). O controle foi formulado a partir de 1 mL de tampão de acetato de sódio (pH 4,8) adicionado de 0,25 mL da amostra. O branco continha 1,25 mL da solução de pectina cítrica 1%. As soluções

foram aquecidas a 40 °C, durante 30 minutos, em banho termostatizado (Tecnal, TE-2005). Ao final dessa etapa, foram adicionados 0,5 mL de DNS e as soluções foram mantidas a 100 °C por 5 minutos e, em seguida, resfriadas em banho de gelo. Finalmente, adicionou-se 6,5 mL de água destilada. Realizou a leitura da absorbância em espectrofotômetro, a 540 nm. A concentração de ácido β -galacturônico foi determinada a partir da curva padrão de ácido β -galacturônico (BALADHANDAYUTHAM; THANGAVELU, 2011).

4.5.9 Atividade Pectina Liase

A determinação da atividade de pectina liase foi baseada no aumento da absorbância decorrente da formação de produtos urônicos 4,5 insaturados, conforme proposto por Albersheim (1966). O coeficiente de extinção molar dos produtos insaturados $\varepsilon_{235} = 5550 M^{-1}cm^{-1}$ foi utilizado para o cálculo de atividade UA = $(\Delta A/\varepsilon_{235}) \cdot 10^{-6}$ ($\mu\text{mol/mL/min}$), onde ΔA é a diferença de absorbância. A reação foi conduzida com 0,1 mL da enzima e 2 mL de pectina (0,5% m/v) previamente solubilizada em tampão citrato fosfato pH 5,5. As absorbâncias foram medidas em espectrômetro em comprimento de onda de 235 nm.

4.5.10 Atividade Pectina Metil esterase

A atividade metil esterase foi determinada por titulação de grupos carboxílicos, de acordo com o método descrito por Jen e Robinson (1984). Pectina cítrica 1,0% (m/v) foi dissolvida em NaCl 0,1 M. A solução foi usada como substrato e a reação realizada à temperatura ambiente e NaOH 0,01M foi utilizado como titulante. Em 10 mL de solução de pectina cítrica foi adicionado 50 μL do sobrenadante e a reação acompanhada por 10 minutos. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como sendo a capacidade da enzima de catalisar a desmetilação da pectina correspondente a 1 μmol de NaOH por minuto, sob as condições do ensaio. O pH foi mantido constante ao longo da reação.

4.5.11 Atividade da enzima poligalacturonase

O método para determinação da atividade enzimática foi proposto por Maldonado e Saad, (1998). Uma mistura contendo 0,2 mL da preparação enzimática (sobrenadante livre de células) e 0,8 mL de solução de ácido poligalacturônico a 0,5% dissolvida em tampão fosfato (50 mM, pH 7,0) foi incubada a 70 °C por 10 minutos. Após esse período, a reação foi paralisada pela adição de 1,0 mL de ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) à

mistura, que foi rapidamente resfriada em água gelada. Em seguida, esta mistura foi colocada em água em ebulição por 10 minutos e resfriada em banho de gelo. A coloração desenvolvida foi medida por meio de espectrofotômetro (Hewlett-Packard, modelo 8453), utilizando comprimento de onda de 540 nm. O mesmo procedimento foi realizado com o controle, exceto que o reagente de Miller foi adicionado juntamente com a enzima à solução de ácido poligalacturônico 0,5%, e esta mistura foi colocada em água em ebulição como descrito anteriormente. Uma unidade de poligalacturonase foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μmol de ácido galacturônico por minuto a partir do ácido poligalacturônico nas condições do ensaio.

4.5.12 Atividade Xilanase

O método para determinação da atividade xilanase foi de Bailey, Biely e Poutanen (1991). Para isto, 1 mL de uma solução Xilana a 1% em tampão de acetato de sódio 50 mM (pH 5,0), foi adicionado em tubos contendo 0,5 mL de cada amostra, sendo a mistura incubada a 50°C por 5 minutos. Nos controles foram adicionados 0,5 mL do tampão e 0,5 mL da amostra, e no branco continha apenas 0,5 mL da solução de xilana 1%. Para a determinação dos açúcares redutores, também foram transferidos 0,5 mL das soluções para tubos contendo 0,5 mL de DNS, os quais foram submetidos à fervura por 5 minutos e resfriados em banho de gelo. A leitura foi realizada a 540 nm após completarem-se os volumes com água destilada para 7,5 mL. A atividade foi expressa em Unidade Internacional (U), quantidade de enzima capaz de forma 1 μmol de xilose por minuto.

4.5.13 Atividade carboximetilcelulase (CMCase)

A determinação da atividade CMCase é baseada na hidrólise de carboximetilcelulose (CMC) foi realizada segundo Vasconcelos, (2012). Neste caso, o meio reacional foi composto por 0,25 mL de uma solução de CMC 4% (p/v) e 0,25 mL da amostra. Para o controle da enzima, aos tubos de ensaios foram adicionados apenas 0,25 mL da amostra e 0,25 mL de tampão citrato de sódio 50 mM. O branco, utilizado para zerar o espectrofotômetro, foi preparado pela adição de 0,25 mL da solução de CMC 4% e 0,25 mL de tampão citrato de sódio 50 mM. Todos os tubos, contendo o meio reacional, o controle da enzima e o branco, foram incubados a 50 °C, em banho termostático (TECNAL, TE-2005), durante 10 minutos. Ao final deste tempo, a reação foi interrompida pela adição de 0,5 mL de DNSA.

Os tubos foram submetidos a um banho em água a 100 °C, durante 5 minutos. Em seguida, os tubos foram resfriados até a temperatura ambiente. As amostras foram diluídas com 6,5 mL de água destilada e, em seguida, procedeu-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro (Hewlett-Packard, modelo 8453), a 540 nm, sendo a determinação da concentração de glicose liberada em cada ensaio enzimático realizada através da utilização de uma curva padrão de glicose.

4.5.14 Atividade FPase

O ensaio enzimático foi realizado segundo Vasconcelos, (2012). Tiras de papel de filtro Whatman nº 1, medindo 1 cm x 6 cm (aproximadamente 50 mg) em formas de espiral, foram colocadas em tubos de ensaio, aos quais se adicionou 1,0 mL de tampão citrato de sódio 50 mM. Os tubos foram colocados em banho termostático (TECNAL, TE-2005) a 50 °C, por 1 minuto, antes de se adicionar a enzima, para que ocorresse o equilíbrio da temperatura. Após 1 minuto, adicionou-se 0,5 mL de enzima, em cada tubo, agitando-se cuidadosamente. No ensaio para controle da enzima, foi adicionado 1,0 mL de tampão citrato de sódio 50 mM e 0,5 mL de enzima em tubos de ensaio, sem a adição do substrato (papel de filtro). O branco foi utilizado para zerar o espectrofotômetro, utilizando-se 1,5 mL de tampão citrato de sódio 50 mM.

As reações foram conduzidas a 50 °C, em banho termostático, durante 60 minutos. Ao final deste tempo, as reações foram interrompidas pela adição de 3,0 mL de DNSA (ácido 3,5-dinitro salicílico). Todos os tubos foram submetidos a um banho em água a 100 °C, durante 5 minutos, e, em seguida, resfriados até a temperatura ambiente. As amostras foram diluídas com 20 mL de água destilada, procedendo-se, então, à leitura da absorbância em espectrofotômetro (Hewlett-Packard, modelo 8453), a 540 nm. A determinação da concentração de glicose liberada em cada ensaio enzimático foi realizada através da utilização de uma curva padrão de glicose previamente preparada

4.5.15 Atividade de β -glicosidase

O ensaio enzimático foi realizado segundo Vasconcelos, (2012). Para isto, 0,5 mL de amostra e 0,5 mL de uma solução de celobiose 15 mM. Para o controle, foram adicionados aos tubos de ensaio 0,5 mL de tampão citrato de sódio 50 mM (pH 4,8) e 0,5 mL da amostra de enzima. O branco foi formado por 1,0 mL do reagente GOD-POD, o qual foi utilizado para zerar o espectrofotômetro. Todos os tubos, contendo a amostra de enzima e substrato, o controle e o branco, foram incubados a 50 °C, durante 30 minutos.

Após este tempo, os tubos foram submetidos a um banho a 100 °C por 5 minutos, para a finalização das reações. Em seguida, foram transferidos para um banho em água fria, até atingir a temperatura ambiente. Em uma segunda etapa, a glicose produzida foi determinada pela adição de 0,01 mL da mistura reacional em tubos contendo 1,0 mL do reagente GOD-POD. Os tubos foram incubados em banho termostático a 37 °C, durante 15 minutos.

As leituras das absorvâncias foram feitas em espectrofotômetro a 505 nm. A determinação da concentração de glicose liberada em cada reação enzimática foi realizada através da utilização de uma curva padrão de glicose.

4.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

4.6.1 Atividade Antioxidante: ensaio de redução do complexo fosfomolibdênio

As atividades antioxidantes por fosfomolibdênio segundo metodologia proposta por Mzoughi et al. (2018) e Aadil et al. (2014) com modificações. As ligninas e as frações pécticas (0,5mL) em diferentes concentrações (3,1; 6,2; 12,5; 25; 50; 100; 200 e 400 µg/mL) foram adicionadas a 1 mL de solução de fosfomolibdênio. Estas misturas foram incubadas em água a 95 °C durante 90 minutos e em seguida foram resfriadas a temperatura ambiente. As absorvâncias foram medidas em espectrofotômetro (Hewlett-Packard, modelo 8453) a 695 nm contra um branco (1 mL de solução e 0,1 mL de água). O padrão utilizado foi o ácido ascórbico e o hidroxitolueno butilado. A atividade antioxidante total foi calculada pela fórmula $ATT (\%) = [(As - Ab)/(Aaa - Ab)] \times 100$, onde: Ab = Absorvância do branco, As = Absorvância da amostra e Aaa = Absorvância do Ácido Ascórbico.

A determinação da IC₅₀ (Concentração Inibitória de 50%) foi obtida por regressão linear dos pontos plotados graficamente e através da equação da reta obtido os valores de IC₅₀.

4.6.2 Atividade de eliminação de radicais DPPH

A capacidade de sequestro do radical estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), foi determinada por metodologia descrita por Ro et al. (2013) e Jiang et al. (2018) com modificações. Para isto, um volume 0,32 mL de lignina e das frações pécticas em diferentes concentrações (3,1; 6,2; 12,5; 25; 50; 100; 200 e 400 µg/mL) foi adicionado a 2,0 mL da solução de metanol DPPH a 1 mM. O sistema foi incubado na ausência de luz por um período de 25 minutos em temperatura ambiente. As Absorvâncias foram

determinadas a 517 nm em espectrofotômetro (Hewlett-Packard, modelo 8453). Foi utilizado como controle a solução de DPPH em metanol, o branco foi metanol. O padrão experimental utilizado foi o ácido ascórbico e o hidroxitolueno butilado. Os ensaios foram realizados em quintuplicata. O sequestro de radicais DPPH foi calculado pela fórmula: efeito de eliminação (%) = $[(Ac-As)/(Ac)] \times 100$. Ac = Controle de Absorbância; As como Absorção de Amostra.

Para o cálculo do IC₅₀ foi utilizada a equação da reta, substituindo o valor de y por 50 para obtenção da concentração da amostra com capacidade de reduzir 50% do DPPH.

4.6.3 Atividade de eliminação de cátions radicais 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS))

A atividade de eliminação de cátions radicais ABTS foi realizada usando o método relatado por Wang, Chen e Lü, (2014) e Jiang et al. (2018) com ligeiras modificações. Resumidamente, preparou-se uma solução estoque de ABTS (7 mM) em etanol e uma solução de persulfato de potássio (140 mM). O radical ABTS foi preparado a partir da reação de 5 mL da solução estoque de ABTS com 88 µL da solução de persulfato de potássio. A mistura foi mantida no escuro à temperatura ambiente durante 16 horas. Em seguida, diluiu-se 1 mL desta mistura em álcool etílico para uma Absorbância de 0,70 nm ± 0,05 nm a 734 nm em espectrofotômetro (Hewlett-Packard, modelo 8453). Usando 30 µL de diferentes concentrações das ligninas e frações pécnicas (3,1, 6,2, 12,5, 25, 50, 100, 200 e 400 µg/mL) e 3,0 mL de solução ABTS o sistema foi incubado na ausência de luz em uma temperatura de 35°C por 5 minutos. Foi utilizado como controle a solução ABTS. O branco utilizado foi etanol. O padrão experimental utilizado foi o ácido ascórbico e o hidroxitolueno butilado. A percentagem de inibição foi calculada de acordo com a Equação: efeito de eliminação (%) = $[(Ac-As)/(Ac)] \times 100$. Ac = Absorbância de solução ABTS sem amostra, As = Absorbância da amostra.

Para o cálculo do IC₅₀ foi utilizada a equação da reta, substituindo o valor de y por 50 para obtenção da concentração da amostra com capacidade de reduzir 50% do ABTS.

4.6.4 Atividade de eliminação de radicais de óxido nítrico

O ensaio de eliminação de radicais de óxido nítrico foi realizado pelo método de Barapatre et al. (2016). As ligninas de *Opuntia ficus-indica* e *Opuntia cochenillifera* foram diluídas em concentrações (3,1; 6,2; 12,5; 25; 50; 100; 200 e 400 µg /mL) e submetidas à análise de nitrito pelo método colorimétrico de Griess. A concentração de

NO foi estimada usando uma curva padrão (3,12 - 400,0 μM) sob leitura de 595 nm em um espectrofotômetro de microplacas (Thermo Scientific Multiskan GoW/Curvette, Waltham). A equação obtida foi $Y = 0,0065x + 0,046$ $R^2 = 0,9946$. O branco utilizado foi uma solução de 10% de DMSO ou água destilada. O controle foi o reagente de Griess com solução de nitrato. A percentagem de inibição foi calculada de acordo com a fórmula: $\text{ATT (\%)} = [(As-Ac)/(An-Ac)] \cdot 100$, onde: Ac = Absorbância em branco, As = Absorbância da amostra e An = Absorbância da solução de nitrito

4.6.5 Determinação de fenóis totais

O teor dos fenóis totais foi determinado pelo método descrito por Jiang et al. (2018) com poucas modificações. Um total de 2,0 mL de Folin solução (1:10 v/v) foi adicionada a 4,0 mL de lignina (1 mg/mL). Após a incubação, os ensaios foram protegidos da luz por 3 min e 1,6 mL de Na_2CO_3 (7,5%) foi adicionado. Então os sistemas foram novamente incubados e protegido da luz a 25 °C por 120 min. Após o tempo de incubação foram analisados em espectrofotômetro (Hewlett-Packard, modelo 8453) a 765 nm. Água destilada foi usada como solução em branco. Foi construída uma curva de analítica absorbância em função da concentração de ácido gálico (0 a 500 $\mu\text{g/mL}$) e apresentou a seguinte equação $Y = 0,0048x + 0,0016$, $R^2 = 0,9999$. Os fenóis foram indicados em equivalente de ácido gálico (mg GAE / g de lignina).

4.7 ATIVIDADE BIOLÓGICA: CITOTOXICIDADE, PROLIFERAÇÃO E IMUNOESTIMULAÇÃO

4.7.1 Animais

Camundongos fêmeas Balb/c (5 animais com idade de 6 a 8 semanas) foram criados e mantidos nas instalações de animais do Laboratório de Imunologia de Keizo Asami - LIKA, localizado na Universidade Federal de Pernambuco, Brasil. Os camundongos foram mantidos em condições laboratoriais padrão (20-22 °C e 12 h ciclo diurno e noturno) com acesso gratuito a uma dieta padrão (Labina/Purina, Campinas, Brasil) e água. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com o Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Pernambuco (número de protocolo: 0048/2016).

4.7.2 Obtenção dos esplenócitos

Este procedimento foi realizado de acordo com Melo et al. (2011). Os camundongos foram anestesiados com 10 mg/Kg de xilazina e 115mg/Kg de quetamina, seguido de deslocamento cervical e remoção asséptica dos baços. Os baços foram colocados em um tubo de centrifuga contendo RPMI 1640 com soro fetal bovino (meio completo). Em uma Cabine de Segurança Biológica, os baços foram macerados em um homogeneizador do tipo dounce. As células do baço foram transferidas para tubos de centrifuga contendo aproximadamente 10 mL de meio RPMI 1640 com soro fetal bovino (meio completo). Os homogenatos foram sobrepostos numa camada de FicollPaque TM PLUS e centrifugados a 2500 x g à temperatura a 30 °C durante 25 min. A camada celular de interface contendo células imunológicas foi recuperada por pipeta Pasteur, lavada duas vezes em solução salina tamponada com fosfato (PBS 1X) e centrifugada duas vezes a 500 x g durante 10 min para obtenção do sedimento celular. As células foram contadas em câmara de Neubauer, e a viabilidade celular foi determinada pelo método de exclusão do azul de Tripán. As células foram usadas apenas quando a viabilidade foi > 95%.

4.7.3 Análise da viabilidade celular por Anexina V-FITC e Coloração com Iodeto de Propídio (PI)

Os esplenócitos dos camundongos (10^6 células) foram tratados com as ligninas e frações pécticas isoladas de *O. ficus-indica* e *O. cochenillifera* em concentrações que variaram de 3 a 50 µg/mL. Os ensaios de viabilidade celular foram realizados em placas de 24 poços onde as células foram incubadas por um período de 24 e 48 horas para as ligninas e apenas 24 horas para as frações pécticas. O controle utilizado foi meio de cultura e células. Após o tempo de incubação, os esplenócitos foram centrifugados a 2000 rpm a 25 °C por 10 min. Após descartar o sobrenadante, 1 mL de PBS 1X foi adicionado ao precipitado e centrifugado nas mesmas condições experimentais anteriormente citadas. Ao final da centrifugação o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspensão em uma solução tampão do kit de viabilidade celular (Becton Dickinson Biosciences), contendo Anexina V conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) e Iodeto de Propídio. Os ensaios foram analisados em citômetro de fluxo FACS Calibur (Becton Dickinson Biosciences).

Os resultados da análise foram analisados por gráficos de pontos (Dotplot). As células positivas para AnexinaV-FITC e negativas para iodeto de propídio, foram consideradas apoptóticas. As células negativas para AnexinaV-FITC e positivas para

iodeto de propídio foram consideradas necróticas e células duplamente negativas para AnexinaV-FITC e iodeto de propídio foram consideradas viáveis.

4.7.4 Análise de proliferação celular usando coloração CFSE

os ensaios de proliferação celular foram realizados nas mesmas condições que os ensaios de viabilidade, entretanto ao invés de se adicionar AnexinaV-FITC e iodeto de propídio como marcado foi adicionado ester succinimidílico de diacetato de carboxifluoresceína (CFSE) numa concentração de 5 mM. Os resultados de proliferação foram analisados pelo decaimento da fluorescência, quanto menor maior a proliferação.

4.7.5 Determinação dos níveis de EROS citosólicos e mitocondriais

Os níveis de espécies reativas de oxigênio (EROS) citosólicos e mitocondriais foram determinados por citometria de fluxo, utilizando sondas Dihidroetídio (DHE) (Sigma Aldrich-USA) e MitoSox Red (Thermo Fisher Scientific-USA), respectivamente, conforme descrito por Melo et al. (2010). Estes experimentos foram realizados apenas para as ligninas. Em incubadora de CO₂ umidificada (5% CO₂) por 24 horas, os esplenócitos (10⁶ células/mL) foram incubados em placas (24 poços) com meio RPMI 1640 e ligninas numa concentração de 6,25 µg/mL. O controle experimental foi as células crescidas em meio de cultura. Após incubação as células foram suspensas em PBS 1X e centrifugadas a 2000 rpm por 5 minutos. As células foram novamente inseridas em novas placas (24 poços) e incubadas com 5µM de DHE (40 minutos) ou com 5µM de MitoSox Red (10 minutos) em incubadora de CO₂. Após o tempo de incubação as células foram centrifugadas com PBS 1X (2000 rpm/5 min) e transferidas para tubos de citômetro e analisadas em citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences-USA) com excitação a 488 nm e emissão a 620 nm. Um mínimo de 10.000 eventos foram coletados.

4.7.6 Determinação das Concentrações citosólicas de Ca²⁺

As alterações nas concentrações de Ca²⁺ citosólico ([Ca²⁺]_{cit}) foram determinadas nas mesmas condições experimentais utilizadas na determinação dos níveis de EROS. Entretanto para este ensaio as células foram incubadas com a sonda fluo-3AM (5 µM) (Thermo Fisher Scientific-USA), contendo 1 µM de ácido plurônico F-127 (Sigma Aldrich-USA) e 30 µg/mL de BSA (Sigma Aldrich- EUA). Após o tempo de incubação, as células foram centrifugadas com PBS (2000 rpm/5 min) e transferidas para tubos do citômetro. A fluorescência máxima foi medida usando tubos com células incubadas com

ionomicina (1 μM) por 2 min e fluorescência mínima foi medida usando tubos com células incubadas com EDTA (8mM) também em 2 min de incubação. A intensidade de fluorescência foi analisada usando um citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences-USA) com excitação a 395 nm e emissão a 525 nm. Um mínimo de 10.000 eventos foram coletados. $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ foi calculado pela Equação: $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}} = \text{Kd} (F_{\text{amostra}} - F_{\text{mínima}}) / (F_{\text{Máxima}} - F_{\text{amostra}})$, onde F max e Fmin fluorescência máxima e mínima. F amostra: Fluorescência sem o estímulo e o valor de Kd é 390 nM (MELO et al. 2010; TSIEN 1988; DEGASPERI et al. 2006).

4.7.7 Determinação do potencial transmembrana mitocondrial ($\Delta\Psi\text{m}$) em esplenócitos de camundongo

Mudanças no potencial transmembrana mitocondrial ($\Delta\Psi\text{m}$) foram medidas através da sonda MitoStatus (BD Biosciences-USA). Nas mesmas condições experimentais anteriormente citadas. O sedimento de células foi inserido em novas placas (24 poços) e as células foram incubadas com 100 nM de MitoStatus numa incubadora de CO_2 (5% de CO_2) a 37 durante 30 min. Após o tempo de incubação, as células foram centrifugadas com PBS 1X (2000 rpm/5 min) e transferidas para tubos de citometria. A intensidade de fluorescência foi analisada usando um citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences-USA) com excitação a 488 nm e emissão a 620 nm. Um mínimo de 10.000 eventos foram coletados.

4.7.8 Produção de citocinas utilizando o kit Cytometric Bead Array (CBA)

Os sobrenadantes das culturas tratadas com 6,25 $\mu\text{g/mL}$ de ligninas durante 24h, assim como as células do controle experimental, foram coletados para a determinação de citocinas e óxido nítrico. A avaliação das citocinas foi realizada utilizando as citocinas Th1/Th2/Th17 de camundongos (Becton Dickinson Biosciences, EUA) para a detecção simultânea das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, fator de necrose tumoral alfa ($\text{TNF-}\alpha$) e interferon gama ($\text{IFN-}\gamma$). Resumidamente, as amostras de teste (50 μL) e anticorpo de detecção de ficoeritrina foram incubadas com as beads de captura e reagente de detecção durante 2h no escuro à temperatura ambiente. Todos os anticorpos não ligados foram lavados (1,0 mL de tampão de lavagem) e ressuspensos em 300 μL de tampão de fixação antes da aquisição de dados na plataforma FACSCalibur. Cada citocina tinha um pico único e bem separado, e sete curvas padrão de citocinas individuais (0-5000 pg/mL) foram executadas em cada ensaio.

4.7.9 Análise *in vitro* de nitritos presentes nos sobrenadantes de cultura dos esplenócitos de camundongos BALB/c

Os sobrenadantes de culturas de células incubadas ou não com 6,25 µg/mL de ligninas, durante 24 e 48 horas foram utilizados para análise de nitrito pelo método colorimétrico de Griess (DING et al. 1988). A concentração de óxido nítrico foi estimada usando uma curva padrão (3,12-100 µmol/mL) de nitrato de sódio. A leitura foi realizada num espectrofotômetro (Bio-Rad 3550, Hercules, CA) a 595 nm.

4.8 Análise estatística

O teste de análise de variância (ANOVA) foi aplicado para avaliar diferenças estatísticas entre os grupos. Todos os resultados foram expressos como valores médios dos grupos ± desvio padrão e foram analisados considerando o valor de $p < 0,05$ como estatisticamente significativo.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISE COMPOSICIONAL DAS BIOMASSAS *IN NATURA* DOS SÓLIDOS OBTIDOS DURANTE O FRACIONAMENTO

As Tabelas 7 e 8 apresentam os resultados da composição química dos cladódios de *O. ficus-indica* (OFI) e *O. cochenillifera* (OC) *in natura* e dos sólidos obtidos durante o fracionamento

Tabela 7- Composição química dos cladódios de *O. ficus-indica in natura* e das biomassas obtidas depois de cada etapa de fracionamento, em base seca, juntamente com o balanço de material.

Componentes (%)	<i>in natura</i>	Extração aquosa	Pré-tratamento ácido H ₃ PO ₄ 1%	Deslignificação alcalina NaOH 1%
Celulose	12,7 ± 0,01	25,7 ± 1,6	32,03 ± 0,0	62,82 ± 0,5
Hemicelulose	5,14 ± 0,01	10,09 ± 0,4	7,30 ± 0,5	4,3 ± 0,1
Polissacarídeos pécticos	32,4 ± 0,05	18,08 ± 1,0	11,1 ± 1,3	6,9 ± 0,2
Lignina Total	18,3 ± 1,00	34,01 ± 0,1	38,0 ± 1,0	13,7 ± 0,2
Extrativos	20,6 ± 1,60	-	-	-
Cinzas	11,5 ± 0,10	9,32 ± 0,0	9,0 ± 0,1	8,5 ± 0,0
Massa Total (%)	100	97,2	97,4	96,2
Rendimento (%)	100	40,1	68,3	44,8

Média ± Desvio. Fonte: Autor, (2019).

Tabela 8- Composição química dos cladódios de *O. cochenillifera in natura* e das biomassas obtidas depois de cada etapa de fracionamento, em base seca, juntamente com o balanço de material.

Componentes (%)	<i>in natura</i>	Extração aquosa	Pré-tratamento ácido H ₃ PO ₄ 1%	Deslignificação alcalina NaOH 1%
Celulose	22,19 ± 0,01	34,71 ± 0,20	45,03 ± 0,13	65,45 ± 0,51
Hemicelulose	3,63 ± 0,01	6,75 ± 0,38	0,33 ± 0,01	0,0 ± 0,0
Polissacarídeos pécticos	40,46 ± 0,04	30,74 ± 0,01	20,67 ± 0,1	13,65 ± 0,04
Lignina Total	7,54 ± 0,02	13,5 ± 0,08	20,75 ± 0,02	10,4 ± 0,01
Extrativos	14,58 ± 0,02	-	-	-
Cinzas	10,20 ± 0,30	10,0 ± 0,70	9,20 ± 0,90	9,10 ± 0,30
Massa Total (%)	98,6	95,7	96	97,5
Rendimento (%)	100	53,3	45,32	47,89

Média ± Desvio. Fonte: Autor, (2019).

Os resultados da composição *in natura* mostram que *O. cochenillifera* apresentou maiores teores em percentual de polissacarídeos pécticos, celulose e proteína do que *O. ficus-indica*, que por sua vez, apresentou teor de lignina, hemicelulose e extrativos, bem maior.

A literatura apresenta variação nos resultados de composição para essas palmas. Para *O. ficus-indica* o teor de polissacarídeos pécticos variou de 5,6 a 48,64%, celulose 2,42-34,9%, hemicelulose 4,51-20,0%, lignina 2,51-20,52%, extrativos 1,94-34,9% e

cinzas 6,0-24,07% (MCITEKA, 2008; YANG et al. 2015; SOUZA-FILHO et al. 2016; ALENCAR et al. 2018). Já para os cladódios de *O. cochenillifera* o teor de polissacarídeos pécnicos variou de 5,4-46,46% %, celulose 22,19-31,6%, hemicelulose 3,63-17,1%, lignina 5,77-10,3%, extrativos 14,54-30,73% % e cinzas 5,4-11,65% (SOUZA-FILHO et al. 2016; ALENCAR et al. 2018). A seguir apresentaremos de forma um pouco mais detalhada alguns fatores que influenciam nos resultados de composição.

A variação teores de hemicelulose, celulose e lignina, está relacionada com a idade das espécies cladódios, isto é, as mais jovens apresentam menores valores desses componentes na parede celular (PEÑA-VALDIVIA et al. 2012). O teor de pectinas está relacionado ao clima, isto é, em períodos mais secos, as espécies apresentam menores teores de carboidratos solúveis (CHITEVA; WAIRAGU, 2013).

Os extrativos também variam de acordo com as condições ambientais, mas sua principal diferença está frequentemente relacionada ao solvente usado em sua quantificação. Mciteka, (2008) utilizou éter de petróleo para quantificar os extratos apolares, já neste trabalho foi utilizado um sistema de extração binária composto de tolueno e etanol que promoveu maior extração de compostos tanto polares quanto não polares.

Esta variação está diretamente relacionada às condições de cultivo, clima, idade e parte da planta, tipo de solo, clima, região, técnicas de colheita e principalmente ao método de quantificação (KRUSE et al. 2008).

Os resultados da composição química dos sólidos durante o fracionamento mostraram, percentuais de solubilização de polissacarídeos pécnicos maiores que 60%. Este fato pode estar relacionado com a estrutura química complexa formada por cadeias de ácido poligalacturônico, durante a extração grupos carboxila esterificados, são solubilizados (WANG; CHEN; LÜ, 2014; CANTERI et al. 2012). A composição lignocelulósica: não é removida durante esse processo.

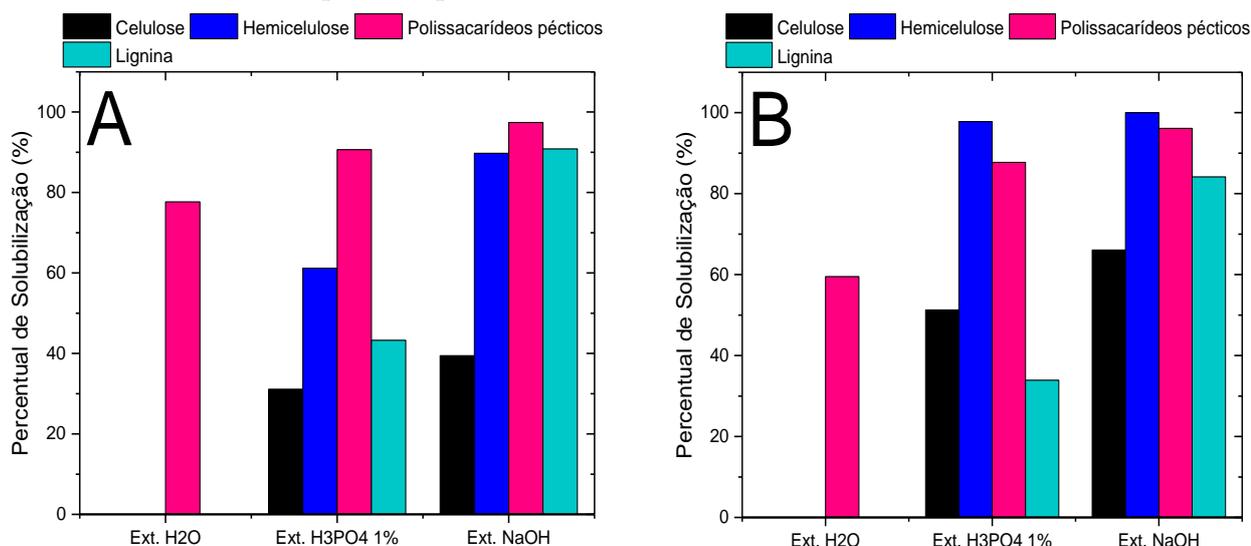
Já o pré-tratamento com H_3PO_4 a 1% promoveu maior solubilização da hemicelulose devido à quebra das ligações glicosídicas do polissacarídeo, promovendo a liberação de monossacarídeos e a formação de produtos de degradação tais como furfural, 5-hidroximetilfurfural (HMF), ácido acético dentre outros (VASCONCELOS et al. 2013)

Ao final da deslignificação alcalina obteve-se um licor negro, rico em ligninas apresentando valores de solubilização maiores que 90%. Essa solubilização pode estar relacionada com a saponificação de ésteres de ligações intramoleculares entre a lignina e outros compostos Zheng, Pan e Zhang (2009). Segundo Fengel e Wegener (1984) e

Saeman (1945), o processo de pré-tratamento ácido não é seletivo apenas para hemicelulose, assim como a deslignificação alcalina também não é seletivo apenas para a lignina, podendo ocorrer à degradação da celulose durante o processo.

A Figura 17 apresenta os resultados de solubilização dos componentes macromoleculares (celulose, hemicelulose, polissacarídeos pécicos e lignina) para as duas espécies durante as etapas do fracionamento.

Figura 17- Solubilização dos componentes dos cladódios de *O. ficus-indica* (A) e *O. cochenillifera* (B) após as etapas de fracionamento.



Fonte: Autor, (2019).

As frações pécicas (solúveis e insolúveis), o hidrolisado ácido (hemicelulósico) e o licor negro contendo a lignina, foram caracterizados e seus resultados foram apresentados nas seções 5.5, 5.6 e 5.7 respectivamente.

5.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA: ANÁLISES ESTRUTURAIS DAS BIOMASSAS *IN NATURA* E APÓS FRACIONAMENTO

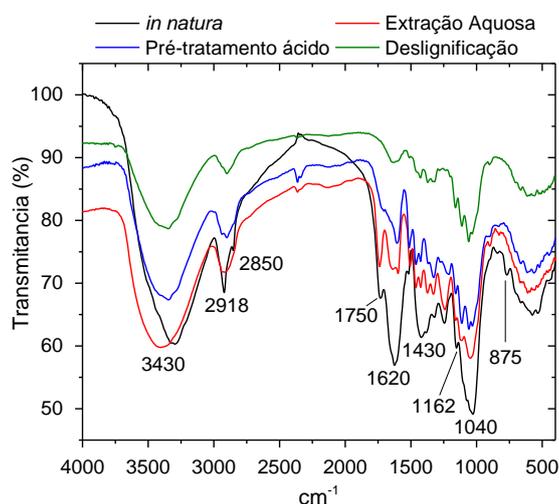
5.2.1 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

A análise por espectroscopia no infravermelho foi realizada com objetivo de obter informações sobre os grupos químicos presentes nos cladódios *in natura* e dos sólidos obtidos em cada etapa de fracionamento. Os espectros de FTIR na região entre 4000 e 400 cm⁻¹ são apresentados nas Figuras 18 e 19.

Observando os espectros de FTIR várias bandas podem ser observadas nas biomassas *in natura* e dos sólidos obtidos durante o fracionamento. As bandas foram determinadas segundo Zhang, et al. (2012), Monsoor; Kalapathy; Proctor, (2001),

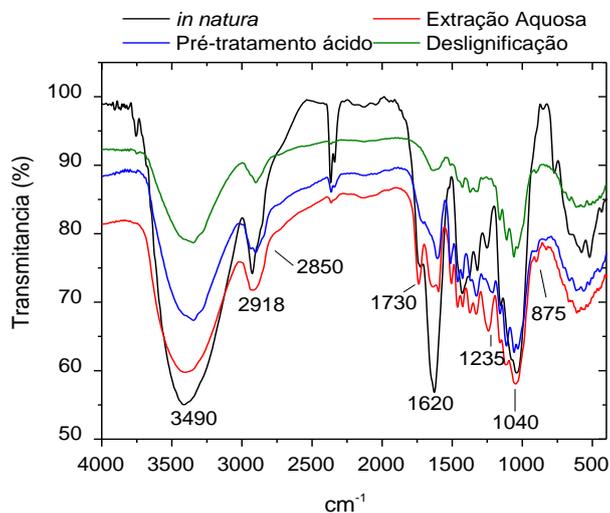
Monfregola et al. (2011), Xu et al. (2013) e Reyes-Rivera et al. (2015). As análises da intensidade das bandas foram realizadas de forma qualitativa. Isto é foi avaliado apenas a diminuição da intensidade da banda no espectro (INANCIE; MONIRUZZAMAN; UEMURA, 2016).

Figura 18- Espectros de FTIR das biomassas de *O. ficus-indica in natura* e após as etapas de fracionamento.



Fonte: Autor, (2019).

Figura 19- Espectros de FTIR das biomassas de *O. cochenillifera in natura* e obtidas após as etapas de fracionamento.



Fonte: Autor, (2019).

A banda em torno de 3490 cm^{-1} pode ser atribuída à deformação do grupo (O-H), que está relacionado com a presença de álcoois e fenóis com ligações de hidrogênio. A banda registrada em 2918 cm^{-1} é atribuída a estiramentos (CH_2) apresentou maior intensidade no espectro cladódios *in natura*, quando comparados aos obtidos durante o fracionamento. Este fato, pode estar associado à presença das frações alifáticas representada pelos extrativos que são removidos ao longo do fracionamento (ZHANG et

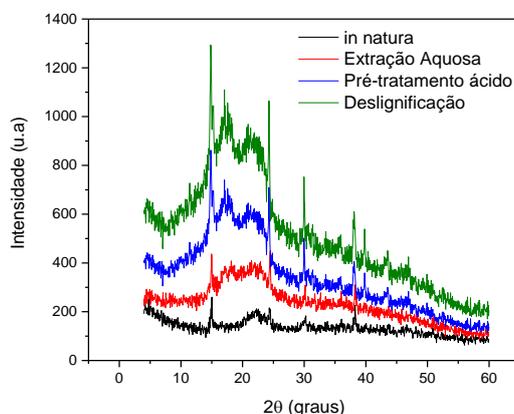
al. 2012). Na etapa de extração aquosa as bandas relacionadas aos polissacarídeos pécnicos apresentaram redução nas intensidades sendo estas: as bandas em 2848 cm^{-1} e 2850 cm^{-1} correspondem às vibrações de estiramento do grupo CH do éster metílico do ácido galacturônico. A banda em torno de 1620 cm^{-1} representa a deformação axial dos íons carboxilatos, COO^- , da carboxila livre e são atribuídos aos grupos não esterificados (MONSOOR; KALAPATHY; PROCTOR, 2001). As bandas em 1440 cm^{-1} e 1430 cm^{-1} também estão relacionadas ao COO^- de grupos carboxílicos não esterificados, porém em fraca intensidade (MONFREGOLA et al. 2011).

As bandas relacionadas à hemicelulose apresentam-se reduzidas, principalmente aquelas entre 875 referentes à ligação glicosídica, 1040 cm^{-1} estiramento C-O do álcool, C-C, C-O-C, 1162 cm^{-1} estiramento vibracional do anel C–O–C do acoplamento (1,4) – glicosídico, 1245 cm^{-1} estiramento C-C + C-O e 1750 cm^{-1} relacionado a deformações axial de grupos carbonilas (XU et al. 2013). As bandas relacionadas com as ligninas apresentam-se bastante reduzidas principalmente às vibrações do anel aromático mais estiramento C=O em 1540 cm^{-1} , deformação do grupamento C-H em 1472 cm^{-1} , C-O do anel siringila em 1324 cm^{-1} , estiramento C-C + C-O em 1235 cm^{-1} e em 1270 cm^{-1} (vibrações C-O-C do anel Guaicílico) (REYES-RIVERA et al. 2015

5.2.2 Difração de raios X (DRX)

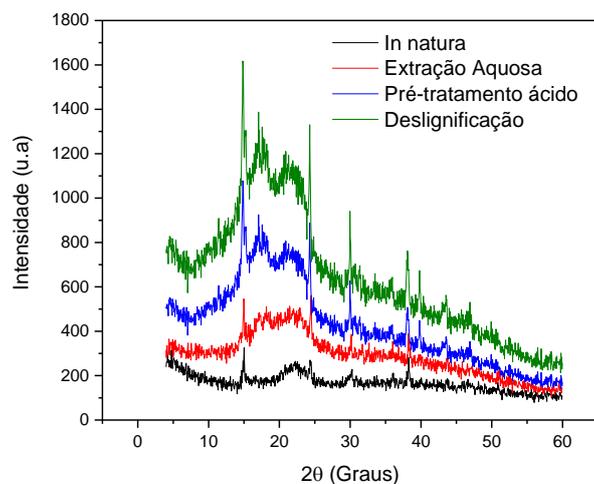
O índice de cristalinidade das amostras foi determinado por difração de raios-X onde se podem avaliar mudanças ocorridas na celulose durante o fracionamento. Os difratogramas obtidos para a biomassa *in natura* e para os sólidos obtidos durante o fracionamento estão apresentados na Figura 20 e 21.

Figura 20- Difratogramas de raios-X das biomassas de *O. ficus-indica in natura* e dos sólidos obtidos após as etapas de fracionamento.



Fonte: Autor, (2019).

Figura 21- Difratomogramas de raios-X das biomassas de *O. cochenillifera in natura* e dos sólidos obtidos após as etapas de fracionamento.



Fonte: Autor, (2019).

A Tabela 9 apresenta os índices de cristalinidade para cada biomassa *in natura* e dos sólidos obtidos pós fracionamento. A celulose encontrada em biomassas vegetais pode apresentar dois tipos de organização estrutural, uma cristalina e uma amorfa (SARKO et al. 1986).

Tabela 9 -Índice de cristalinidade das biomassas de *O. ficus-indica* e *O. cochenillifera in natura* e obtidas após as etapas de fracionamento.

Biomassas	<i>O. ficus-indica</i> (% IC)	<i>O. cochenillifera</i> (% IC)
<i>In natura</i>	30,0 ± 0,2	40,0 ± 0,3
Extração Aquosa	33,4 ± 0,1	48,0 ± 0,1
Pré-tratamento ácido	57,0 ± 0,2	55,0 ± 3,0
Deslignificação	58,0 ± 04	57,0 ± 1,2

* Média ± Desvio padrão Fonte: Autor, (2019).

De acordo com os resultados obtidos na Tabela 9, o índice de cristalinidade aumentou ao longo do fracionamento da biomassa. Outros autores realizando diferentes estratégias de fracionamento obtiveram resultados próximos ao deste estudo.

Souza-Filho et al. (2016), realizando diferentes estratégias e de deslignificação nos cladódios das espécies de *O. ficus-indica* e *O. cochenillifera*, obtiveram índice de cristalinidade 46,9 e 58,8% utilizando peróxido de hidrogênio alcalino, 50,0 e 50,7% em meio alcalino NaOH e 56,8 e 57,1% utilizando ácido usando H₂SO₄ seguido de deslignificação alcalina com NaOH respectivamente.

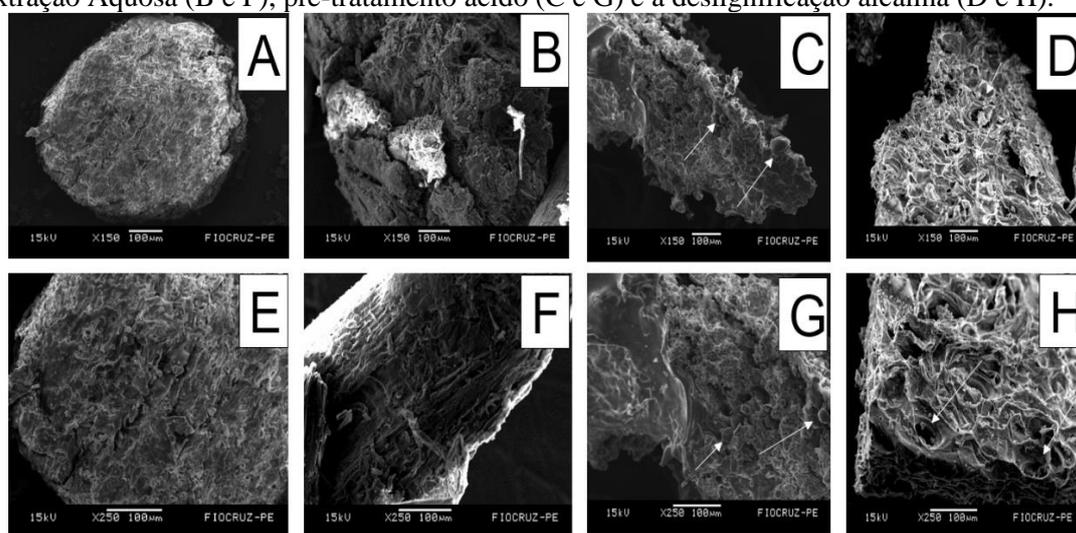
Gonçalves et al. (2014) também utilizaram diferentes estratégias de deslignificação (peróxido de hidrogênio alcalino e peróxido de hidrogênio alcalino seguido de deslignificação alcalina com NaOH) em biomassa de cactos obteve para os processos índices de cristalinidade 46,1% e 48,4% respectivamente. Sendo assim, as

análises de FTIR e DRX corroboram com os resultados de composição química das biomassas *in natura* com as frações obtidas durante o fracionamento.

5.2.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

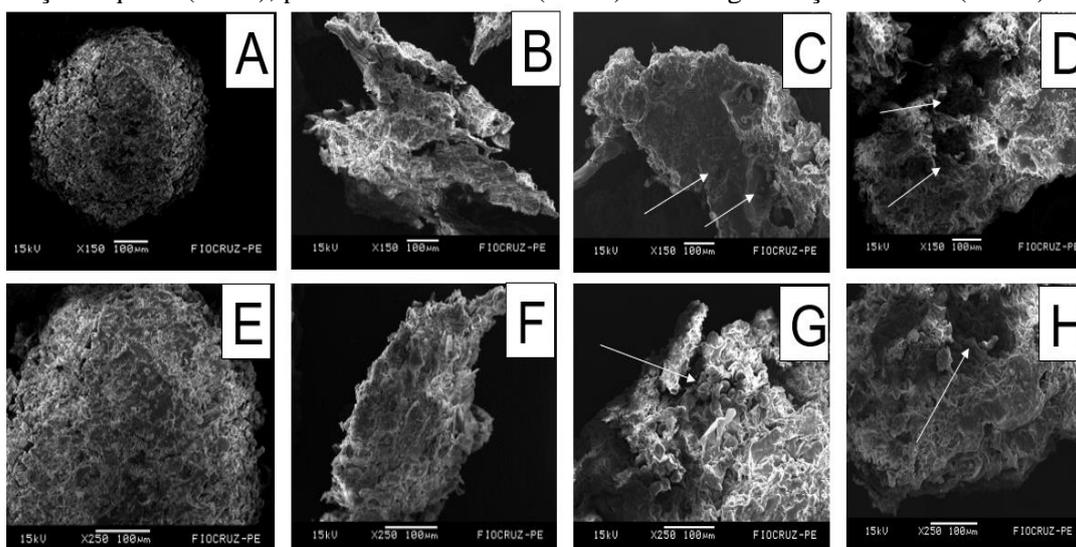
A microscopia eletrônica de varredura é uma técnica comumente utilizada para descrever mudanças estruturais e degradação da biomassa durante o fracionamento (VASCONCELOS, 2012; CRUZ-FILHO, 2016). As Figuras 22 e 23 apresentam as micrografias para a biomassa *in natura* e as obtidas durante o fracionamento para *O. ficus-indica* e *O. cochenillifera* respectivamente.

Figura 22- Micrografias dos cladódios de *O. ficus-indica* *in natura* (A e E), e os submetidos a extração Aquosa (B e F), pré-tratamento ácido (C e G) e a deslignificação alcalina (D e H).



Fonte: Autor, (2019).

Figura 23- Micrografias dos cladódios de *O. cochenillifera* *in natura* (A e E), e os submetidos a extração Aquosa (B e F), pré-tratamento ácido (C e G) e a deslignificação alcalina (D e H).



Fonte: Autor, (2019).

Os cladódios *in natura* (Figura 22 A e E; Figura 23 A e E) e os obtidos após

extração aquosa (Figura 22 B e F; Figura 23 B e F) apresentaram aspecto homogêneo constituído por um tecido fibroso e medular de aparência regular e compacta. Esta morfologia compacta também foi observada por Malainine et al. (2003) avaliando *O. ficus-indica*. Os sólidos obtidos após pré-tratamento ácido (Figura 22 C e G; Figura 23 C e G) apresentaram superfícies irregulares, ásperas e grande quantidade de fissuras. Além disso foi verificada a presença de gotículas de lignina na sua superfície. A deslignificação alcalina promoveu a quebra do complexo de celulignina (Figura 22 D e H; Figura 23 D e H). Com isto, ocorreu aumento na porosidade superficial, além disso, a celulose se encontrou mais exposta para hidrólise enzimática (WU et al. 2016).

Esses resultados se assemelham aos obtidos para Souza-Filho et al. (2016) realizando diferentes tipos de pré-tratamento nos cladódios das espécies de *O. ficus-indica* e *O. cochenillifera*, foi observado a mudança na superfície da biomassa durante o fracionamento. Gonçalves et al. (2014) também utilizando diferentes pré-tratamentos em biomassa de cactos observou que durante o processo ocorre mudança na superfície da biomassa.

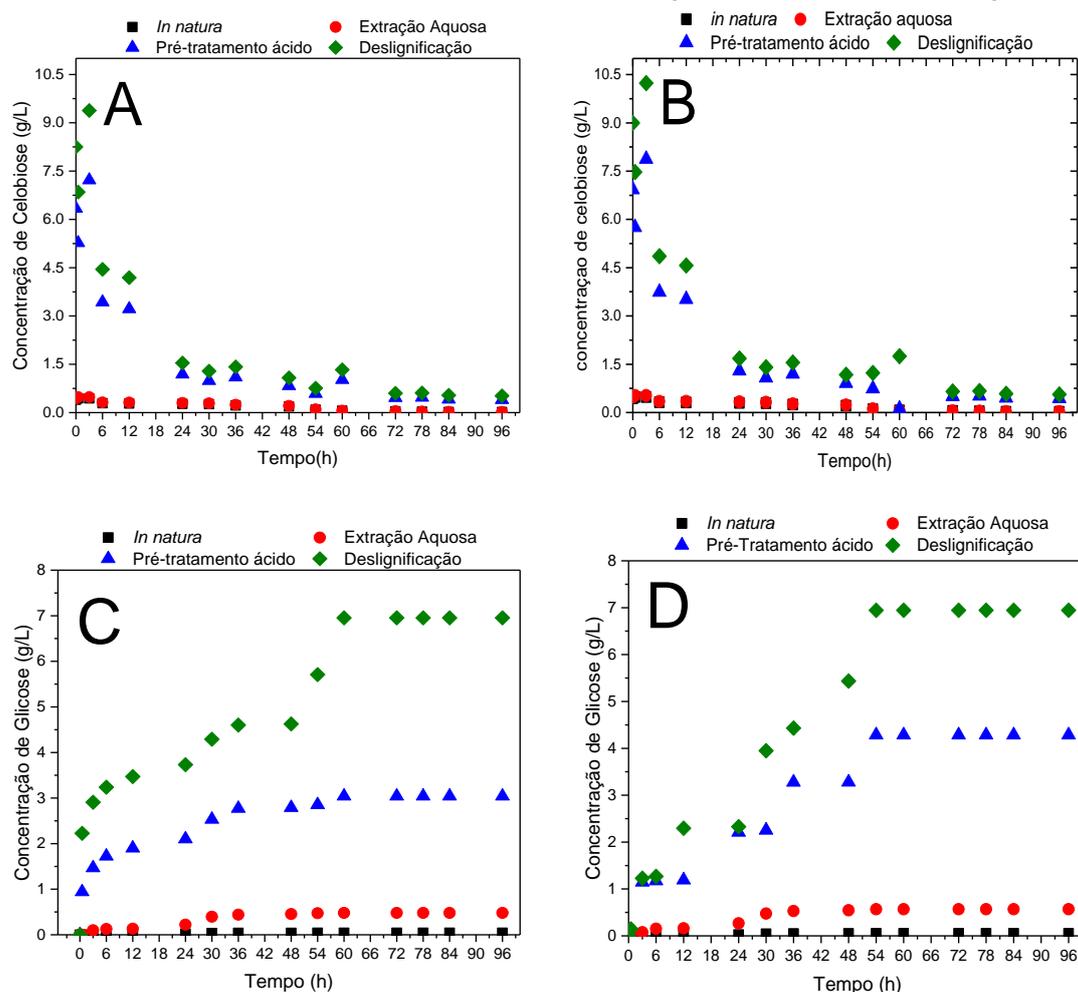
5.3 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DOS BIOMASSAS IN NATURA E DOS SÓLIDOS OBTIDOS DURANTE O FRACIONAMENTO

Os perfis de concentrações de celobiose e glicose, obtidas durante o processo de hidrólise enzimática das biomassas, estão apresentados na Figura 24.

A concentração de celobiose (Figura 24 A e B) obtida durante a hidrólise enzimática das biomassas de *O. ficus-indica* e *O. cochenillifera in natura* atingiu a maior concentração 0,44 e 0,48 g/L respectivamente nas primeiras 3 h. A partir de 6 h de hidrólise a concentração de celobiose foi sendo reduzida, chegando a 0,02 g/L para as biomassas. A concentração de glicose liberada (Figura 24 C e D) para estas biomassas aumentou com o tempo de hidrólise, alcançando 0,04 g/L em 30 h. Em relação ao sólido obtido da extração aquosa os resultados foram bem semelhantes aos obtidos pela hidrólise das biomassas *in natura*. A concentração de celobiose máxima foi de 0,48 g/L em 3h e a concentração máxima de glicose foi de 0,48 e 0,57 g/L em 60 h.

Estes baixos teores de sacarificação estão relacionados à estrutura química da biomassa, isso porque, componentes como pectina, lignina e hemicelulose formam barreiras física, o que impede a atuação do complexo enzimático (OGEDA; PETRI, 2010). Por esta razão, é preciso que a biomassa seja submetida a um pré-tratamento para separar a matriz de polioses e lignina (OGEDA; PETRI, 2010).

Figura 248- Perfis de concentrações de celobiose (A e B) e glicose (C e D) para as biomassas *in natura* e os sólidos obtidos durante o fracionamento de *O. ficus-indica* e *O. cochenillifera*.



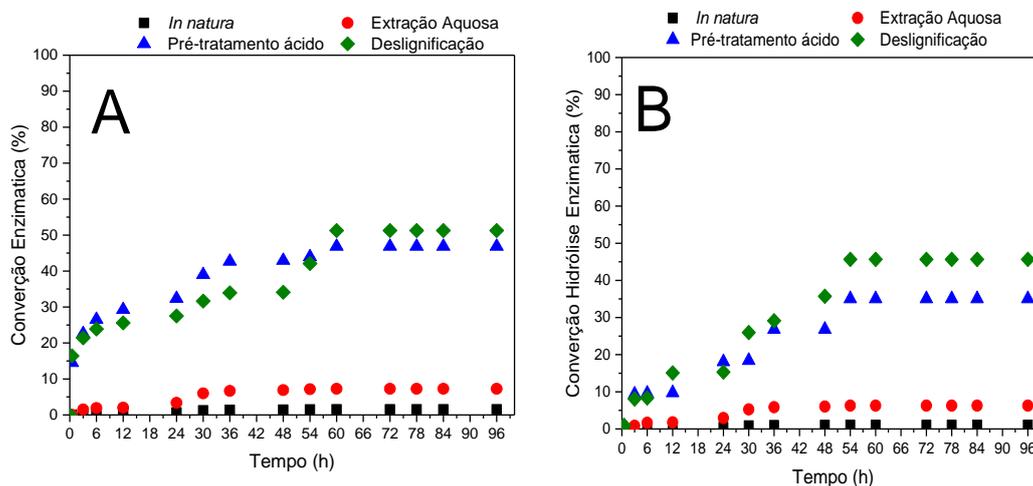
Fonte: Autor, (2019).

A celobiose (Figura 24 A e B) liberada da biomassa submetida o pré-tratamento ácido apresentou máximo de concentração em 7,22 e 7,83 g/L nas primeiras 3 h. A partir de 6 h, a concentração de celobiose foi sendo reduzida, chegando a 0,40 e 0,44 g/L no tempo final de hidrólise em 96 h. A concentração de glicose (Figura 24 C e D) liberada alcançou 3,04 e 4,29 g/L em 60 h. Alencar et al. (2018) também encontraram o mesmo perfil de concentração de glicose durante a hidrólise enzimática para os cladódios fracionados com H₂SO₄ 1% de *O. ficus-indica* e *O. cochenillifera* e observaram aumento da concentração durante o tempo.

Por fim, as biomassas deslignificadas apresentaram maiores concentrações de celobiose 9,38 e 10,24 g/L (Figura 24 A e B) quando comparados às outras etapas de extração nas primeiras 3 h. A concentração de glicose (Figura 24 C e D) liberada aumentou com o tempo de hidrólise, alcançando 6,95 e 4,29 g/L em 72 h. Gonçalves et al. (2014) também estudando cactos, observaram que a biomassa submetida a

deslignificação alcalina é mais suscetível à hidrólise enzimática. Este fato, está relacionado com a maior exposição da celulose e diminuição da barreira formada por pectina, lignina e hemicelulose (ALVIRA; TOMÁS-PEJÓ; BALLESTEROS et al. 2010). O perfil de conversão de celulose em glicose encontra-se apresentando na Figura 25.

Figura 25- Perfis de conversão de celulose em glicose para as biomassas *in natura* das biomassas obtidas durante o fracionamento de *O. ficus-indica* (A) e *O. cochenillifera* (B).



Fonte: Autor, (2019).

A Figura 25 mostra o aumento contínuo da conversão, chegando a 50 e 48 % no tempo de 60 h para os cladódios deslignificados de *O. ficus-indica* e *O. cochenillifera* respectivamente. Esse valor de conversão em torno de 50% pode estar associado a diminuição da atividade celulolítica durante a hidrólise, fato este promovido pela adsorção irreversível da enzima sobre a celulose, fazendo com que a enzima não hidrólise 100% a celulose. Além disso, estas podem sofrer inibição pelo produto (TALEBNIA; KARAKASHEV; ANGELIDAKI, 2010).

A literatura apresenta outros autores que também estudaram hidrólise enzimática em espécies de *Opuntia*. Alencar et al. (2018) encontraram conversão de 60% após 48 h de hidrólise enzimática para os cladódios de *O. ficus-indica* e *O. cochenillifera* submetidos a pré-tratamento com H₂SO₄ 1% (v/v), nas seguintes condições: relação sólido: líquido (12.5% m/v) 150 rpm a 50 °C por 3 h. A biomassa foi submetida à hidrólise enzimática nas seguintes condições: tampão citrato de sódio 50 mM; temperatura 50°C; pH 4,8; rotação de 150 rpm; relação sólido: líquido 30% (m/v); concentração enzimática de 10FPU/g (CelluclastTM 1.5L - Novozymes) por 48h.

Gonçalves et al. (2014), encontraram conversão de 68,48% entorno de 60 h de hidrólise enzimática em cactos obtidos de agroindústria submetidos a deslignificação com peróxido de hidrogênio alcalino seguido de deslignificação alcalina com NaOH. A

biomassa foi submetida à hidrólise enzimática nas seguintes condições: tampão citrato de sódio 50 mM; temperatura 50°C; pH 4,8; rotação de 150 rpm; relação sólido: líquido 4% (m/v); 0,02% de azida sódica (m/v); concentração enzimática de 30 FPU, 75 CBU e 130 IU dos complexos Cellic CTec2 e HTec2 por 96 h.

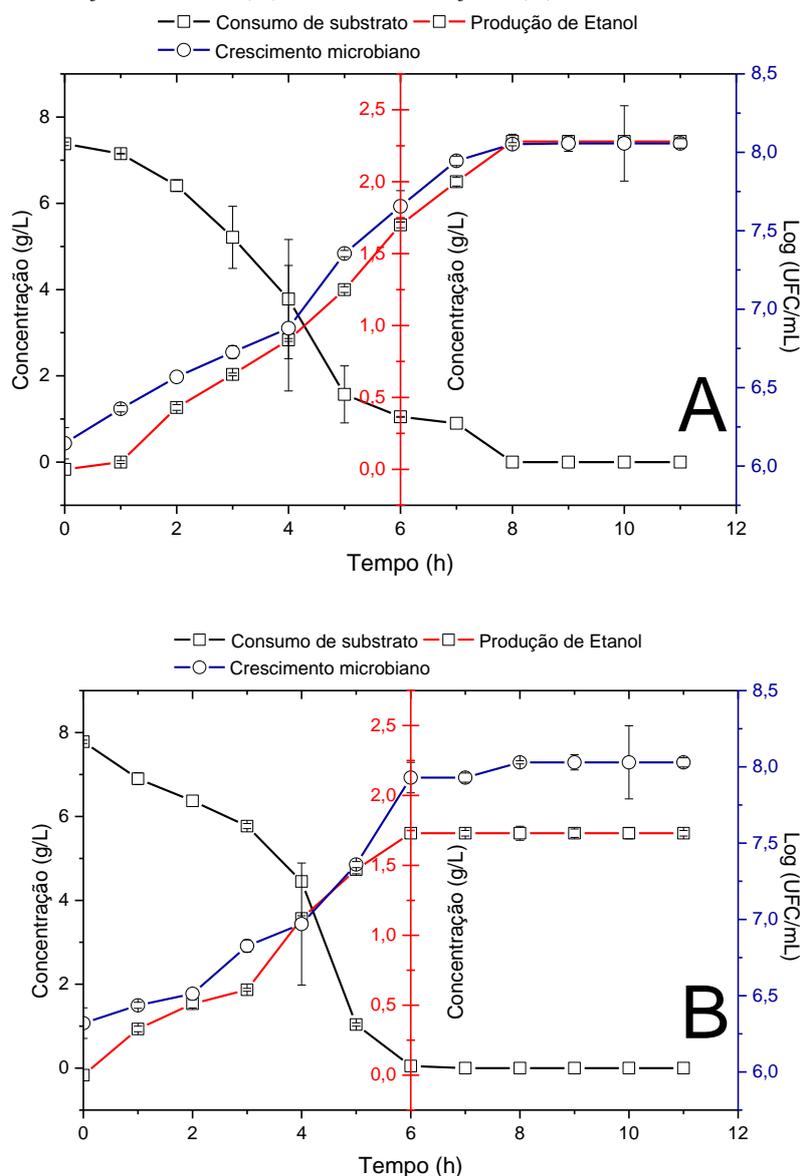
Souza-Filho et al. (2016) submetendo os cladódios de *O. ficus-indica* e *O. cochenillifera* pré-tratados usando três estratégias diferentes: peróxido de hidrogênio alcalino, alcalino usando NaOH, e ácido usando H₂SO₄ seguido de deslignificação alcalina com NaOH a hidrólise enzimática nas seguintes condições: tampão citrato de sódio 50 mM; temperatura 50°C; pH 4,8; rotação de 150 rpm; relação sólido: líquido 10% (m/v); concentração enzimática de 10FPU/g (ACCELLERASE® 1500, cedida pela GENENCOR) por 48h. Obtiveram conversão de celulose em glicose para os três pré-tratamentos respectivamente 22,4 ± 3,4%; 19,8 ± 3,0% e 48,2 ± 1,6% para *O. ficus-indica* e 23,4 ± 0,5%; 59,1 ± 7,5%; 82,8 ± 3,4% para *O. cochenillifera*.

5.4 CULTIVO DA LEVEDURA *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* EM HIDROLISADO ENZIMÁTICO

Ao final de 60 horas de hidrólise enzimática, todo o material contido no biorreator (hidrolisado enzimático mais o sólido remanescente) foi submetido ao processo de fermentação alcoólica, utilizando-se a linhagem *S. cerevisiae* UFPEDA 1015. A fermentação foi conduzida sob as condições descritas no item 4.3.5. Os perfis de concentrações de glicose e etanol estão apresentados na Figura 26.

O perfil de crescimento microbiano, consumo de substrato e produção de etanol por *S. cerevisiae* UFPEDA 1015 obtidos durante o processo de fermentação alcoólica de hidrolisado enzimático para os cladódios deslignificados de *O. ficus-indica* (A) e *O. cochenillifera* (B) respectivamente.

Figura 26- Perfil de consumo de substrato, crescimento microbiano e produção de obtidos durante o processo de fermentação alcoólica de hidrolisado enzimático para os cladódios deslignificados de *O. ficus-indica* (A) e *O. cochenillifera* (B).



Fonte: Autor, (2019).

A fermentação utilizando cladódios de *O. cochenillifera* (Figura 26 B) apresentou perfil de consumo de glicose semelhante (quando comparada à de *O. ficus-indica*), no entanto o processo durou 6h sendo toda glicose consumida. A concentração de etanol obtida neste tempo foi de 1,73 g/L. O fator de conversão de glicose em etanol alcançou, em 4h horas de fermentação, um valor de 0,25 $\text{g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{glicose}}$ o que corresponde 54,8 % do máximo teórico. A produtividade em etanol em 4h foi igual a 0,28 g/L.h. A velocidade de crescimento microbiano foi de 0,31 h^{-1} .

Esses resultados de fator de conversão são menores aos obtidos por Kuloyo et al. (2014), que utilizado um hidrolisado obtido por pré-tratamento ácido diluído obtido dos

O. ficus-indica obtiveram em 36h de processo rendimento em torno de 0,31 g_{etanol}/g_{glicose}. A produtividade em etanol foi igual a 3,28 g/L.h correspondendo a uma eficiência de fermentação de 60 %. E por Souza et al. (2016), que utilizando o hidrolisado obtido por tratamento térmico (121°C por 15 minutos) nos cladódios de *O. ficus-indica in natura*, obtiveram em 18h de processo rendimento em torno de 0,47 g_{etanol}/g_{glicose}, o que corresponde a 92% do máximo teórico.

Essa diferença entre os parâmetros cinéticos em diferentes trabalhos pode estar associada a condições de processo, tais como quantidade de monossacarídeos, produtos de inibição, tipo de micro-organismos, dentre outros (CHIARAMONTI et al. 2012).

5.5 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, ATIVIDADES BIOLÓGICAS, ANTIOXIDANTE E CRESCIMENTO DE LEVEDURAS *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* DAS FRAÇÕES PÉCTICAS DE *O. FICUS-INDICA* E *O. COCHENILIFERA*

5.5.1 Composição química: determinação dos monossacarídeos presentes nas frações pécticas

A composição química relativa dos monossacarídeos, presentes nas frações pécticas solúveis e insolúveis de *O. ficus-indica* e *O. cochenillifera* obtidas por hidrólise ácida são apresentados na Tabelas 10.

Tabela 10- Composição química dos monossacarídeos, das frações pécticas de *O. ficus-indica* solúvel (OFS) e insolúvel (OFI), e *O. cochenillifera*, solúvel (OCS) e insolúvel (OCI), obtidos durante a hidrólise em ácido trifluoroacético (TFA).

Composição	OFS (%)	OFI (%)	OCS (%)	OCI (%)
Glicose	-	23,0 ± 0,9	-	43,0 ± 1,4
Xilose	18,0 ± 0,1	14,0 ± 0,4	24,0 ± 1,1	13,0 ± 1,0
Ácido galacturônico	47,0 ± 0,1	49,0 ± 0,7	12,0 ± 0,5	13,0 ± 0,9
Arabinose	16,0 ± 0,2	-	34,0 ± 1,0	12,0 ± 0,5
Galactose	15,0 ± 0,1	13 ± 0,2	31,0 ± 0,1	27,0 ± 1,1

* Média ± Desvio padrão; *% Rendimento Massa/Massa Fonte: Autor, (2019).

Os resultados apresentados na Tabela 10 mostraram que as frações solúveis (OFS e OCS) não apresentaram glicose em sua estrutura, foi constatada também a presença de xilose, galactose e ácido galacturônico em todas as frações estudadas. Este perfil de monossacarídeos também foi observado por Lefsih et al. (2016) e Bayar, Friji e Kammoun (2017) os quais também estudaram pectinas de *Opuntia*. Em relação à fração insolúvel para as duas espécies de *Opuntia* foram verificadas a presença de glicose que pode ser encontrada nas estruturas ramificadas de substâncias pécticas (GOYCOOLEA; CÁRDENAS, 2003). Além disso, a fração OFI não apresentou arabinose e este fato pode

estar relacionado com a formação de furfural durante a hidrólise ácida (MOON; LIU, 2012).

Essas pectinas são consideradas como homogalacturonanas devido à ausência de ramnose e a presença de ácido galacturônico na estrutura (ALBA; LAWS; KONTOGIORGOS, 2015). As variações apresentadas estão relacionadas à diferença entre as espécies e a fração extraída (LEFSIH et al. 2016),

5.5.2 Massa molecular viscosimétrica das frações pécticas

As pectinas são altamente heterogêneas em relação ao seu peso molecular. As frações pécticas de *O. ficus-indica* e *O. cochenillifera* apresentaram massa molar de acordo com a Tabela 11.

Tabela 11- Peso molecular viscosimétrico das frações pécticas solúveis e insolúveis de *O. ficus-indica* e *O. cochenillifera*.

Frações pécticas	Massa Molecular (kDa)
<i>O. ficus-indica</i> solúvel	17,0 ± 0,1
<i>O. ficus-indica</i> insolúvel	21,0 ± 0,1
<i>O. cochenillifera</i> solúvel	25,0 ± 0,3
<i>O. cochenillifera</i> insolúvel	27,0 ± 0,2

* Média ± Desvio padrão, Fonte: Autor, (2019).

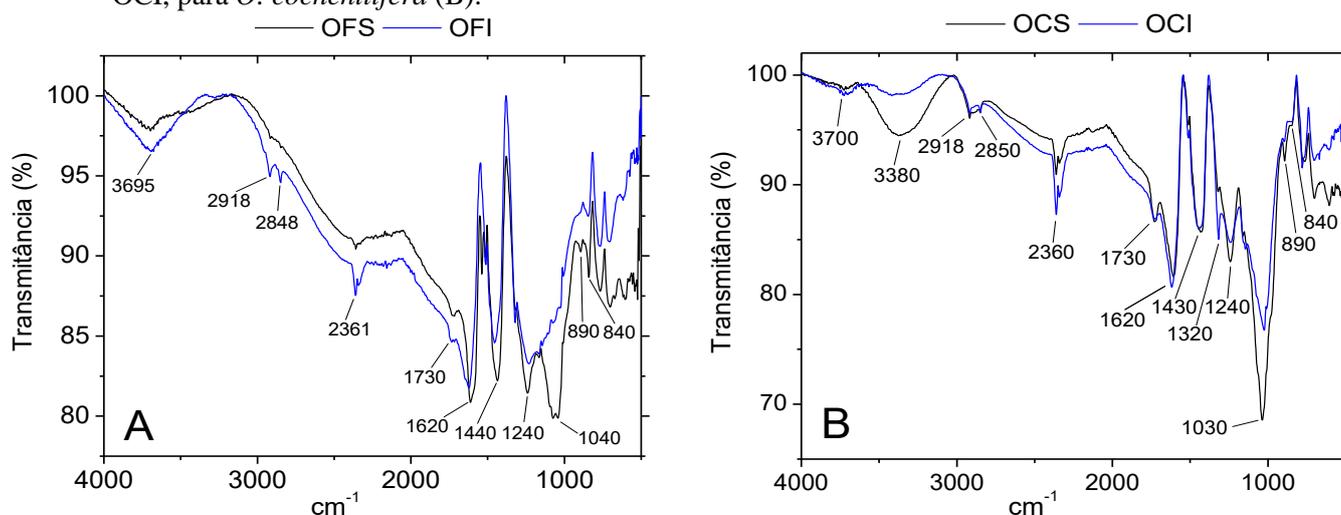
As massas das pectinas naturais variam entre 20 e 360 kDa enquanto as amostras comerciais variam entre 35 e 120 kDa (NASCIMENTO; MELO, 2016). Cárdenas, Goycoolea e Rinaudo (2008) obtiveram peso molar das frações pécticas dos cladódios de *Opuntia ficus-indica* 3×10^6 Da. Em estudo realizados por Bayar, Kriaaa e Kammoun, (2016) extraíndo pectinas também dos cladódios de *Opuntia ficus-indica* obtiveram massas moleculares que variaram na faixa de 58,6 e 110,7 kDa. Kalegowda. Por fim, Singh e Mysore, (2017) caracterizado pectinas de *Opuntia dillenii* observaram que estas apresentaram tamanhos que variaram entre 21 e 76 kDa.

Estas diferenças de massa molecular podem estar relacionadas com às condições de cultivo, clima, idade e parte da planta, tipo de solo, região, técnicas de colheita, método de quantificação e variáveis explicam as diferenças encontradas nos valores obtidos em nosso estudo e os obtidos na literatura (LEFSIH et al. 2016; BAYAR, KRIAA; KAMMOUN, 2016; BAYAR; FRIJI; KAMMOUN 2017). Entretanto pode ser observar que as frações pécticas das espécies de *O. ficus-indica* apresentam menor massa podendo ser apontada como a melhor opção para absorção de nutrientes (LEFSIH et al. 2016; BAYAR; FRIJI; KAMMOUN 2017).

5.5.3 Espectroscopia de Absorção no Infravermelho com transformada de Fourier- (FTIR) e Espectroscopia de Ressonância Nuclear Magnética ^1H

A Figura 27 apresenta os espectros de FTIR das frações precipitadas em etanol e da mucilagem. As bandas foram analisadas de acordo com os resultados obtidos por Lefsih et al. (2016), Bayar, Kriaa e Kammoun, (2016), Bayar Friji e Kammoun (2017).

Figura 27- Espectro de infravermelho para as amostras das frações pectícas solúvel, OFS, e insolúvel, OFI, para *O. ficus-indica* (A) e para as das frações pectícas solúvel, OCS, e insolúvel, OCI, para *O. cochenilifera* (B).



Fonte: Autor, (2019).

Os espectros para as pectinas apresentam uma banda de absorção na região próxima a 3700-3380 cm⁻¹ é típica de grupos hidroxilas (OH), enquanto as bandas entre 2918-2848 cm⁻¹ correspondem a estiramento C-H dos alcanos, álcoois e anel aromático (LEFSIH et al. 2016). As bandas na região em torno de 1730 cm⁻¹ são características da deformação axial do grupo carbonila, C=O, do éster de metila e são atribuídas aos grupos carboxílicos esterificados (MONSOOR; KALAPATHY; PROCTOR, 2001).

A banda da região em torno de 1620 cm⁻¹ representa a deformação axial dos íons carboxilato, COO-, da carboxila livre e são atribuídas aos grupos carboxílicos não esterificados.

As regiões entre 1440-1430 cm⁻¹ também estão relacionadas à vibração do grupo COO- de grupos carboxílicos não esterificados (MONFREGOLA et al. 2011). As bandas observadas em 1240-1320 cm⁻¹ indicam a presença da ligação C-O presente em diversos compostos orgânicos como ácidos carboxílicos (BAYAR; KRIAA; KAMMOUN, 2016).

O perfil de absorção em 1030 e 1040 cm⁻¹ foi atribuído ao grupo C-O-H com exceção em OFI (RAZAVI et al. 2014). Foi observada em todos os espectros a presença

característica das bandas em 890 cm^{-1} e 840 cm^{-1} que são atribuídas às ligações β -glicosídica e α -glicosídica, respectivamente (LEFSIH et al. 2016). Pode-se inferir que a fração OFS é constituída por uma proporção maior de ligações α -glicosídicas, a fração OFI é composta pelas duas ligações em proporções semelhantes e as frações OCS e OCI possuem uma fração maior de ligações β -glicosídicas. A Tabela 12 mostra as principais bandas presentes nas pectinas.

Tabela 12- Principais bandas de FTIR presentes nas frações pécicas

Bandas (cm^{-1})	Atribuições
3420-3300	Estiramento (O-H)
2938-2920	-CH, -CH ₂ e -CH ₃ , metil ester de ácido galacturônico
1720-1675	Grupos carboxílicos esterificados (-COOCH ₃)
1610-1595	grupos carboxílicos livres (-COOH)
1430-1422	(C-H) Deformação assimétrica em -OCH ₃
1143-1000	(C-O-C) vibração de ligação glicosídica
1047-900	Vibrações de deformação de bandas C-O em álcoois primários
1000-600	β -glicosídico e α -glicosídico

Fonte: Autor, (2019).

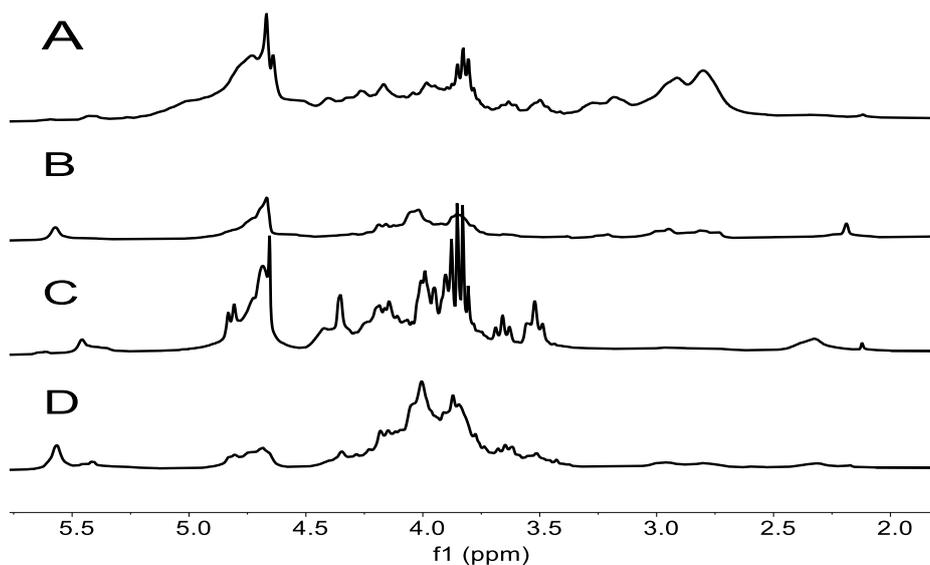
Os valores obtidos para cada uma delas foram: OFS (48,79%), OFI (46,69%) OCS (44,17%), OCI (42,34 %). Ao analisar os graus de esterificação obtidos, pode-se concluir que todas as frações pécicas analisadas estão classificadas como de baixo teor de metoxilação e, devido a esta característica, formam géis na presença de cátions divalentes, como o cálcio (Ca^{2+}), em uma faixa de pH mais ampla (de 2,5 a 7), sem necessitar de grandes quantidades de açúcares (LEFSIH et al. 2016; BAYAR; KRIAA; KAMMOUN, 2016; BAYAR; FRIJI; KAMMOUN, 2017).

As diferenças entre o grau das frações pécicas solúveis e insolúveis de ambas as espécies foi em torno de 2%, indicando que o grau de esterificação não é uma característica que as diferencia significativamente.

O grau de esterificação da fração pécica solúvel de *Opuntia ficus-indica* também foi determinado por Lefsih et al. (2016) e Bayar, Kriaa e Kammoun (2016) e ambos os autores também caracterizaram essa fração como de baixo teor de metoxilação e esse parâmetro está associado ao modo de extração, pectinas extraídas, em sistemas aquosos, apresentam menores graus de esterificação (CÁRDENAS; GOYCOOLEA; RINAUDO, 2008). O grau de esterificação obtido neste estudo se aproximou mais do resultado obtido por Bayar, Kriaa e Kammoun (2016) (41,42%) do que pelo obtido por Lefsih et al. (2017) (30,6%).

Os espectros de RMN ^1H (Figura 28) foram analisados de acordo com a presença de monossacarídeos e mudanças químicas. Os sinais foram relatados por Habibi, Mahrouz e Vignon (2005), Mzoughi et al. (2018) e Hosseini et al. (2019) os sinais foram atribuídos para a fração pectica solúvel (OFS) e insolúvel OFI de *Opuntia ficus-indica* e para a fração pectica solúvel (OCS), e insolúvel, (OCI), para *Opuntia cochenillifera*.

Figura 28-Espectros de RMN ^1H para as frações pecticas dos cladódios das espécies *O. ficus-indica*, solúvel (A) e insolúvel (B), e *O. cochenillifera*, solúvel (C) e insolúvel (D).



Fonte: Autor, (2019).

Na Figura 28 tem-se espectro de RMN ^1H os sinais em torno de 2,0 ppm são derivados de grupos acetil ($-\text{CH}_3$). Nessa região o sinal de baixa intensidade em torno de 2,2 ppm corresponde a presença do ácido α -D-galactopiranosilurônico. Os sinais em δ 3,61 e 3,84 ppm correspondem aos prótons H-2 e H-3 de grupos metílicos dos ácidos galacturônicos esterificados, respectivamente. Apenas OFS apresentou sinais de 4,9 (H-5) e 5,0 (H-1) ppm pertencem a unidades de ácido galacturônico não esterificado. Observa-se, ainda, em δ 4,1 ppm o sinal do próton (H-4) relativo aos resíduos de arabinose (α -arabinofuranose). Em torno de 5,5 ppm sinal relativo a α -galacturonopiranosose ausente em OFS. O sinal a 4,73 ppm pode ser atribuído ao forte desvio químico do solvente D_2O . As pectinas também apresentaram os sinais em 4.42 e 4.19 ppm indicando a presença de resíduos de xilose, esterificados e não esterificados, respectivamente.

5.5.4 Avaliação do potencial antioxidante promovido pelas frações pecticas

As pectinas são polissacarídeos conhecidos por apresentarem atividade antioxidante (BAYAR; KRIAAA; KAMMOUN, 2016). Os resultados para esta atividade estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13- Valores de atividade antioxidante das frações pécnicas solúveis e insolúveis de *O. ficus-indica* e *O. cochenillifera*, em comparação com antioxidantes comerciais.

Frações pécnicas	TAA	DPPH	ABTS
	(%)	(%)	(%)
OFI	5,0 ± 0,1	13,0 ± 0,5	18,0 ± 0,3
OFS	9,8 ± 0,5	17,0 ± 0,2	12,5 ± 0,1
OCI	6,3 ± 0,7	10,9 ± 0,8	17,3 ± 0,4
OCS	11,6 ± 0,3	20,3 ± 0,1	19,7 ± 0,6
Ácido ascórbico	100	96,12	99,9 ± 0,10
BHT	98,9 ± 0,2	93,13 ± 0,58	96,12 ± 0,10

Média ± Desvio Fonte: Autor, (2019).

A Tabela 13 apresenta o resultado de diferentes atividades antioxidante para todas as frações pécnicas. Foi observado que para nenhum dos ensaios de antioxidantes as frações pécnicas apresentaram IC₅₀ (captura de 50% dos radicais). Chaouch et al. (2015), avaliando frações de polissacarídeos obtidas dos cladódios de *O. ficus-indica* obtiveram valores de sequestro para os ensaios com DPPH acima de 37%, em concentrações 500 a 2000 µg /mL. Estas concentrações foram maiores que as obtidas para as frações obtidas para as extraídas dos cladódios de *O. ficus-indica* e *O. cochenillifera* (presentes neste trabalho). Bayar; Kriaaa e Kammoun, (2016) também isolando frações polissacarídeos obtidas dos cladódios de *O. ficus-indica* obteve valores de DPPH acima de 30% e ABTS valores acima de 60%, também em concentrações maiores (2000–50000 µg / mL).

Mesmo apresentado baixo poder antioxidante, quando comparadas aos antioxidantes comerciais (Ácido ascórbico e Hidroxitolueno butilado (BHT)) e a frações pécnicas obtidas por outros autores (em menores concentrações), estas frações pécnicas isoladas neste trabalho apresentaram promissoras atividades antioxidantes.

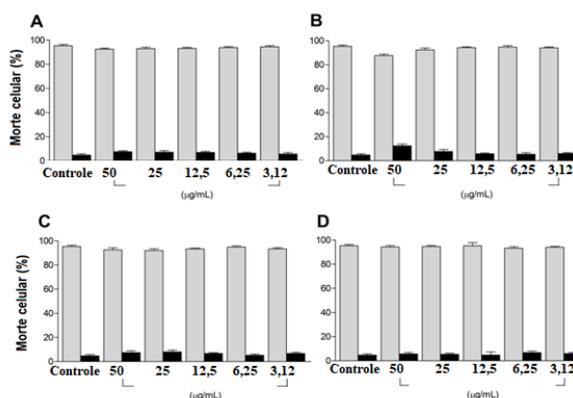
5.5.5 Avaliação da viabilidade celular e proliferativa *in vitro* utilizando as frações pécnicas

A Figura 29 apresenta os resultados de morte celular promovida pelas frações pécnicas em preto e morte celular promovida pelo controle (solução de DMSO).

As células do baço de camundongos Balb/c tratadas com as frações pécnicas das diferentes espécies de *Opuntia* em diferentes concentrações, não sofreram morte celular significativa em nenhuma das concentrações avaliadas. Em estudos realizados por Lefsih et al. (2018), avaliando o efeito das pectinas extraídas dos cladódios de *O. ficus-indica* os autores verificaram que as pectinas obtidas exerceram atividade citotóxica afetando seletivamente as células cancerígenas LAN5, sem qualquer efeito sobre as células normais NIH 3T3. Também foi examinada a capacidade das frações pécnicas de *O. ficus-*

indica e *O. cochenillifera* em estimular a proliferação de esplenócitos. Para isso, foram escolhidas as três menores concentrações utilizadas nos ensaios de citotoxicidade.

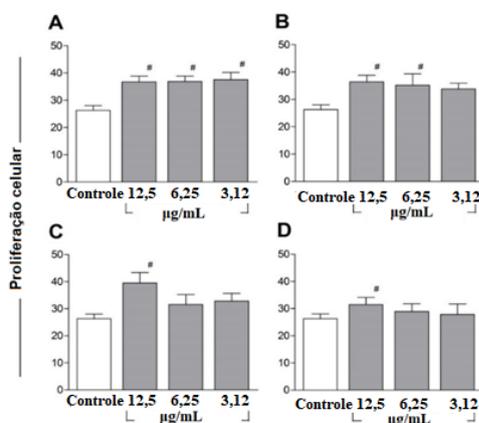
Figura 29- Viabilidade de esplenócitos de camundongos avaliada pela marcação com Iodeto de Propídio (necrose, em preto) e em cinza o controle positivo sem as pectinas, contendo DMSO 100%. Para as diferentes frações pécnicas de *O. ficus-indica*: solúvel e insolúvel (A e B) e *O. cochenillifera*: solúvel e insolúvel (C e D), respectivamente.



Fonte: Autor, (2019).

A Figura 30 mostra que as frações de ambas as palmas promoveram aumento na proliferação de esplenócitos de forma significativa apenas a 12,5/ mL. Resultados semelhantes de proliferação foram obtidos por outros autores também avaliando pectinas. Sakurai et al. (1999) estudando o efeito das pectinas de *Bupleurum falcatum* em esplenócitos observaram que havia proliferação celular este fato também foi observado por Lefsih et al. (2018), estudando o efeito das pectinas solúveis em água dos cladódios de *O. ficus-indica* também verificaram que as células normais NIH 3T3 proliferaram na presença das pectinas.

Figura 30- Índice de proliferação de esplenócitos de camundongos avaliado por coloração com CFSE. As barras brancas verticais representam células de controle negativo (células + meio de cultura) e barras verticais escuras representam os ensaios células e as frações pécnicas de *O. ficus-indica*: solúvel e insolúvel (A e B) e *O. cochenillifera*: solúvel e insolúvel (C e D).

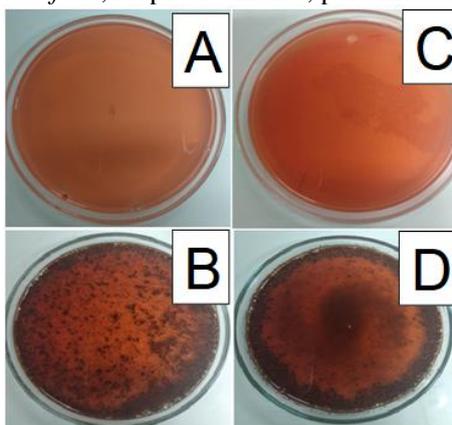


Fonte: Autor, (2019).

5.5.6 Utilização das frações pécnicas solúveis como substrato para a avaliação do crescimento da levedura *S. cerevisiae* UFPEDA 1015

Inicialmente foi avaliado o crescimento da levedura e a produção de enzimas pectinolíticas em placa de Petri utilizando diferentes meios sólidos, contendo as frações pécnicas (UENOJO; PASTORE, 2007). Neste método semiquantitativo os meios utilizados favorecem o crescimento microbiano e a produção de enzimas no meio de cultura foi avaliada pelo halo de degradação (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975; UENOJO; PASTORE, 2007). A Figura 31 mostra que as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* UFPEDA 1015 não produziram enzimas pectinolíticas para este ensaio de degradação em halo quando se utiliza como substrato as frações solúveis e insolúveis de *Opuntia ficus-indica* e *Opuntia cochenillifera*.

Figura 31- Avaliação da produção de enzimas pectinolíticas pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* UFPEDA 1015, para as frações pécnicas solúveis (A, C) e insolúveis (B, D) de *Opuntia ficus-indica* e *Opuntia cochenillifera*, respectivamente, pelo método do halo.



Fonte autor, (2019).

A produção de pectinase por *S. cerevisiae* está relacionada com o grau de esterificação da pectina, isto é, pectinas com alto grau de esterificação (> 50%) são bons substratos para a indução de enzimas pectinolíticas. (JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005). Entretanto, todas as pectinas obtidas neste estudo são de baixo grau de esterificação este fato pode estar relacionado com a não produção de enzimas por essas cepas. Além disso, esse teste é de caráter qualitativo, apresentando baixa sensibilidade.

A cinética de crescimento microbiano foi avaliada pelo método de contagem em placa. O meio de cultura foi composto pela fração líquida contendo as pectinas solúveis, devido a homogeneização. Os açúcares livres obtidos após a precipitação em etanol e foram determinados por CLAE. A Tabela 14 mostra a composição química desses diferentes monossacarídeos.

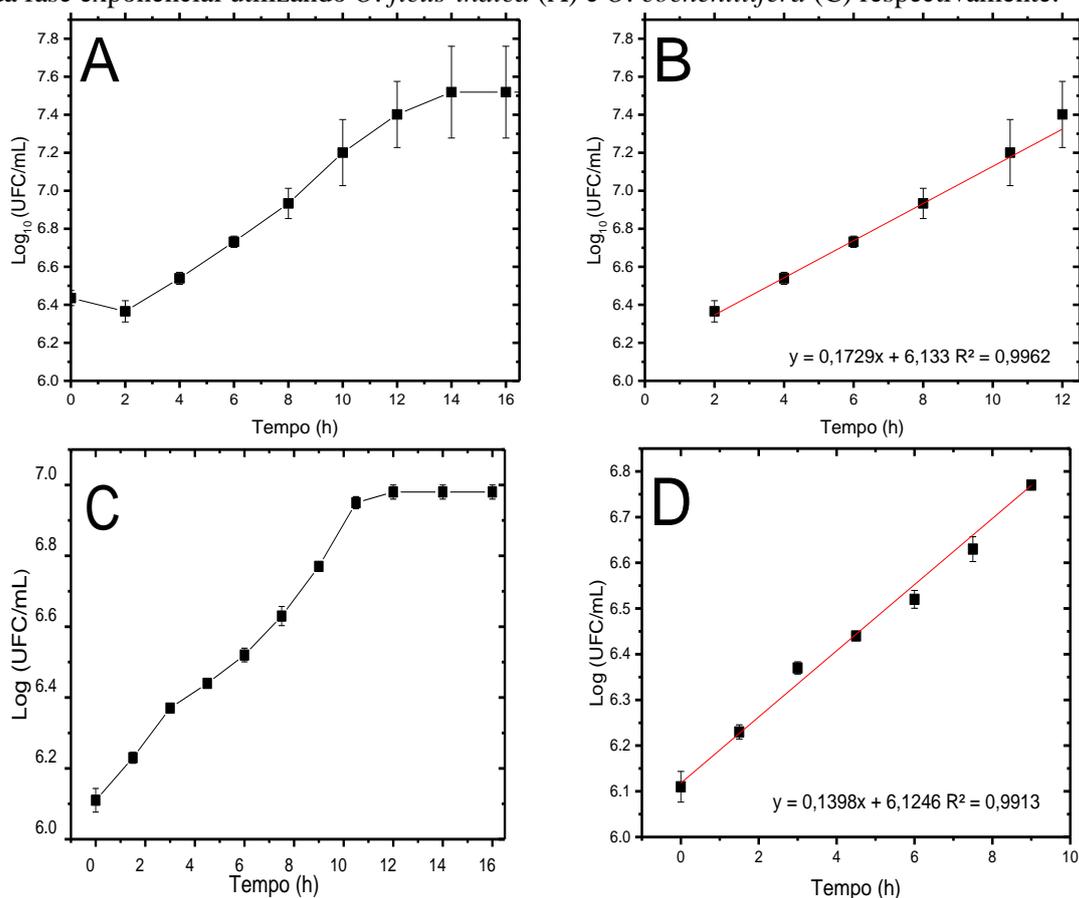
Tabela 14- Composição química dos açúcares livres e pectinas presentes nas frações líquidas de *O. ficus-indica* e *O. cochenillifera*

Monossacarídeos	<i>O. ficus-indica</i> (g/L)	<i>O. cochenillifera</i> (g/L)
Glicose	6,0 ± 0,1	4,7 ± 0,3
Xilose	3,1 ± 0,2	5,0 ± 0,1
Ácido galacturônico	4,2 ± 0,0	3,8 ± 0,4
Galactose	1,4 ± 0,02	0,93 ± 0,0
Ramnose	0,56 ± 0,03	0,71 ± 0,01
Fucose	0,10 ± 0,0	0,30 ± 0,0
Manose	0,03 ± 0,0	0,012 ± 0,0
Pectinas	1,45 ± 0,1	3,75 ± 0,0

Fonte: Autor, (2019).

A Figura 32 apresenta o crescimento das leveduras em meio a base de fração pectínica solúvel das duas espécies de *Opuntia*.

Figura 32- Cinética de crescimento de levedura *Saccharomyces cerevisiae* UFPEDA 1015, utilizando a fração pectínica solúvel de *O. ficus-indica* (A) e *O. cochenillifera* (C). Representação da fase exponencial utilizando *O. ficus-indica* (A) e *O. cochenillifera* (C) respectivamente.



Fonte: Autor, (2019).

Os resultados apresentados durante a cinética de crescimento mostraram que a levedura durante o cultivo apresenta comportamento estacionário a partir das 10 h, para *O. cochenillifera* e a partir de 12h para *O. ficus-indica*. Além disso, de acordo com as

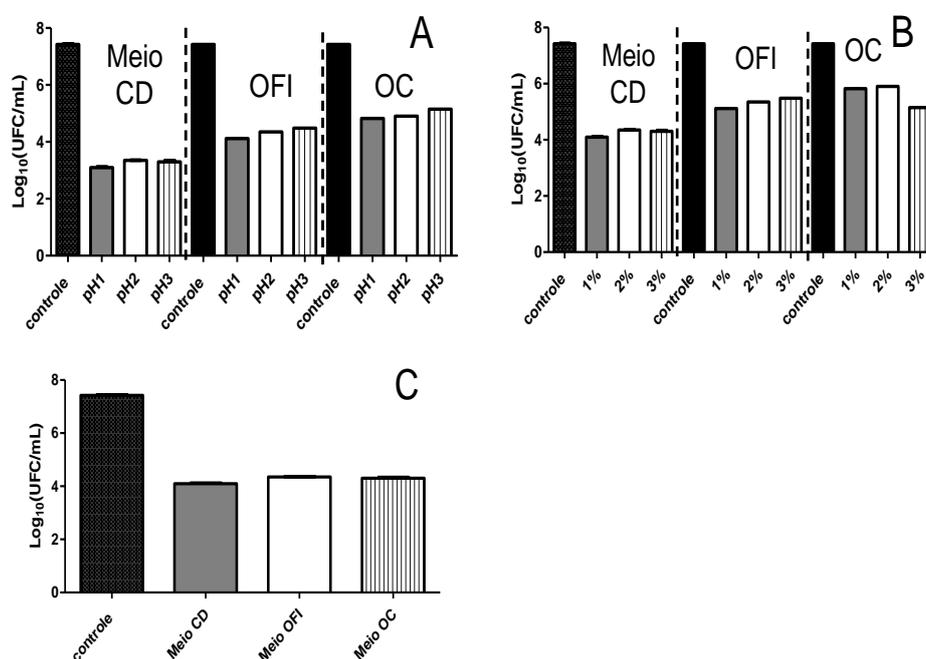
curvas foi observado que a velocidade de crescimento na fração de para as frações de *O. ficus-indica* apresentou velocidade máxima de crescimento $\mu_{max} = 0,17 \text{ h}^{-1}$ e tempo de geração de 4,1h (Figura 32 A e B). Já para o crescimento na fração contendo *O. cochenillifera* apresentou velocidade $\mu_{max} = 0,14 \text{ h}^{-1}$ e tempo de geração de 5,0 (Figura 32 C e D). Quanto maior a velocidade de crescimento menor é o tempo de geração.

Durante o cultivo, alíquotas foram separadas para a determinação de pectinases, foi observado que o micro-organismo não foi capaz de produzir pectinases. A produção de pectinase por *S. cerevisiae* está relacionada com o grau de esterificação da pectina, isto é, pectinas com alto grau de esterificação (> 50%) são bons substratos para a indução de enzimas pectinolíticas. (JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005). Ao final do processo a concentração (g/L) das pectinas presentes na fração líquida foram de $1,39 \pm 0,1$ e $3,70 \pm 0,5$ para *O. ficus-indica* e *O. cochenillifera*, respectivamente, mostrando quase nenhuma variação durante a cinética de crescimento.

As frações pécnicas não foram hidrolisadas durante o crescimento microbiano. Entretanto sabe-se que as pectinas são capazes de proteger a células em condições adversas como variação de pH bile e ao suco gástrico (LARSEN et al. 2018). A Figura 33 apresenta os resultados de viabilidade celular *in vitro* para as variáveis citadas.

Os resultados mostraram que as frações não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre o crescimento entre as condições do ensaio, isto é, pH (Figura 33A), bile bovina (Figura 33 B) e suco gástrico (Figura 33 C). Entretanto, quando se compara os ensaios com o controle existe uma diferença significativa ($p > 0,05$), vista pelo decréscimo da viabilidade celular durante as 8h de ensaio. As frações pécnicas de *O. ficus-indica* e *O. cochenillifera* foram capazes de proteger as leveduras nas condições em estudo. Sendo que a pectina de *O. cochenillifera* apresentou maiores resultados quando comparada a *O. ficus-indica* este fato pode estar relacionado a maior quantidade de pectina presente na fração. Esses resultados corroboram com aqueles obtidos por Larsen et al. (2018) avaliando diferentes pectinas verificaram que estas capazes apresentar efeito de proteção celular frente a condições adversas como variações de pH, concentração de bile e ao suco gástrico.

Figura 33- Avaliação do crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* UFPEDA 1015 em diferentes condições: variação de pH (A), bile bovina (B) e em suco gástrico (C) utilizando as frações solúveis de *O. ficus-indica* (OFI) e *O. cochenillifera* (OC) e meio de cultura quimicamente definido (CD).



Fonte: Autor, (2019).

5.6 PRODUÇÃO DE ENZIMAS INDUSTRIAIS POR *ASPERGILLUS AWAMORI* EM MEIO DE CULTIVO À BASE DE HIDROLISADO ÁCIDO (HEMICELULÓSICO) DE PALMA FORRAGEIRA

5.6.1 Composição química do hidrolisado ácido

Os açúcares, ácidos orgânicos e produtos de degradação presentes nos hidrolisados, resultantes da etapa de hidrólise ácida, foram identificados e quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência. As concentrações de tais componentes encontram-se na Tabela 15.

Tabela 15- Composição do hidrolisado ácido de *O. ficus-indica* (OFI) e *O. cochenillifera* (OC) antes e após hidrólise ácida com ácido sulfúrico a 4%.

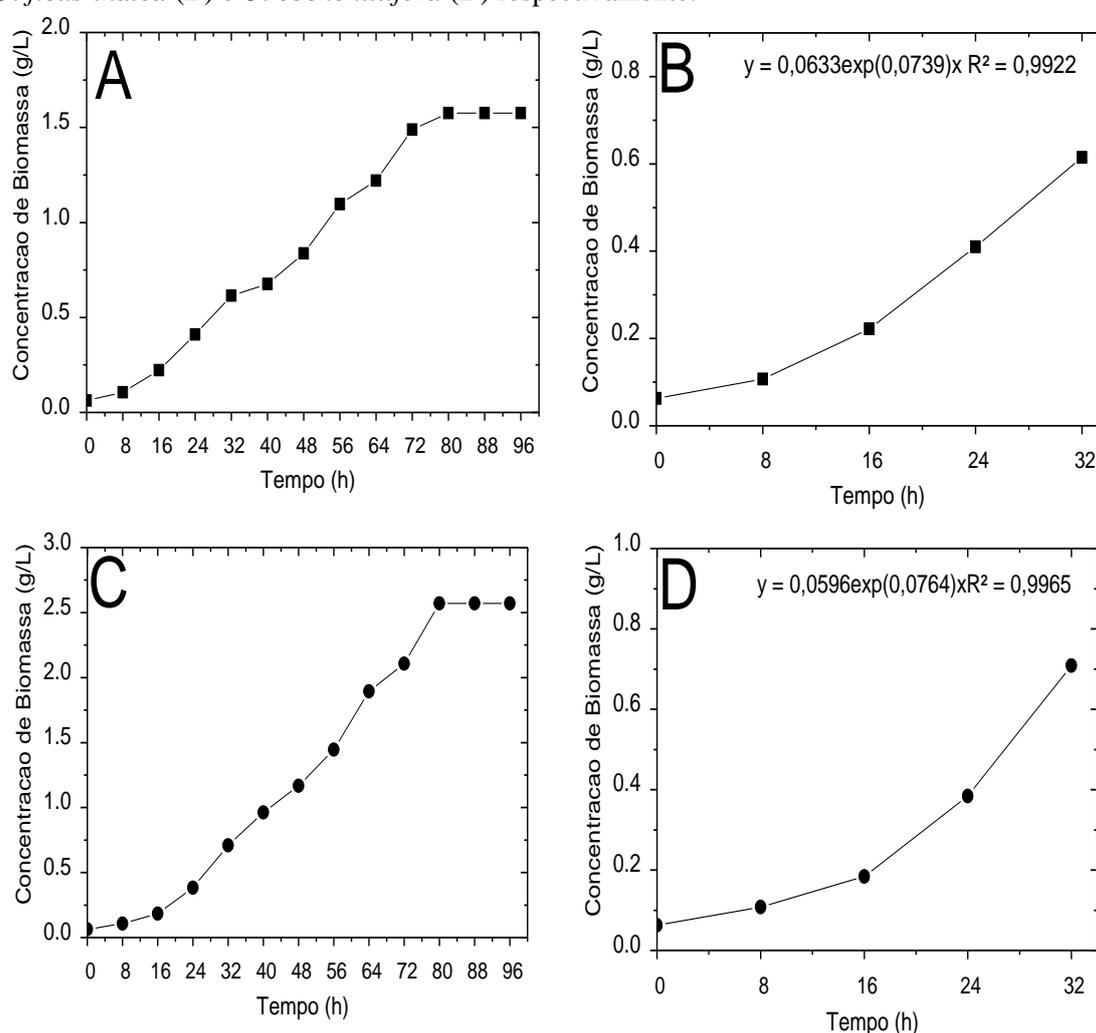
Componentes	OFI (antes hidrólise) (g/L)	OFI (após hidrólise) (g/L)	OC (antes hidrólise) (g/L)	OC (pós hidrólise) (g/L)
Glicose	0,50 ± 0,01	0,7	0,42 ± 0,02	0,97
Xilose	7,35 ± 0,1	8,62	9,30 ± 0,4	10,1
Ácido Galacturônico	0,80 ± 0,0	1,7	1,75 ± 0,01	2,4
Galactose	0,20 ± 0,05	0,25	0,51 ± 0,07	0,64
Celobiose	0,21 ± 0,0	0,11	0,17 ± 0,03	0,19
Arabinose	0,10 ± 0,0	0,28	0,21 ± 0,01	0,31
Ácido Fórmico	0,09 ± 0,0	0,1	0,27 ± 0,0	0,30
Ácido Acético	0,12 ± 0,0	0,2	0,08 ± 0,0	0,12
HMF	0,02 ± 0,0	0,03	0,09 ± 0,0	0,16
Furfural	0,05 ± 0,0	0,09	0,01 ± 0,0	0,09

Fonte: Autor, (2019).

5.6.2 Cinética de crescimento e produção de enzimas pelo fungo *Aspergillus awamori*

A Figura 34 mostra o crescimento do fungo *Aspergillus awamori* em hidrolisado ácido (hemicelulósico) para *O. ficus-indica* e *O. cochenillifera* em cultivos conduzidos em biorreator de bancada. Os hidrolisados utilizados neste trabalho não passaram por uma etapa de destoxificação, isto é, foram utilizados em sua forma *in natura* após pré-tratamento com ácido diluído.

Figura 34- Cinética de crescimento o fungo *Aspergillus awamori*, crescido me hidrolisado ácido a base de *O. ficus-indica* (A) e *O. cochenillifera* (C). Representação da fase exponencial utilizando *O. ficus-indica* (B) e *O. cochenillifera* (D) respectivamente.



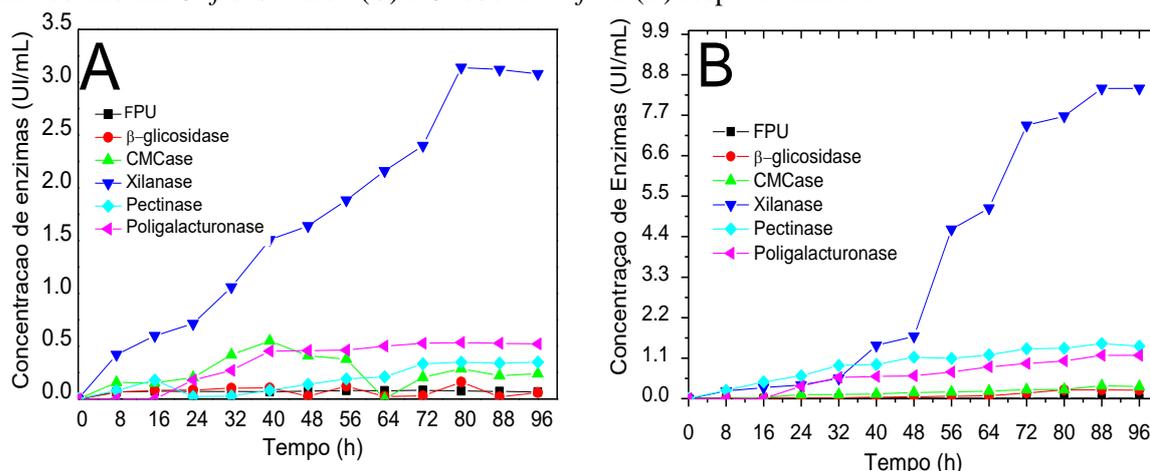
Fonte: Autor, (2019).

Na Figura 34, observa-se que após 8 horas de cultivo o micro-organismo em ambos os ensaios entra na fase exponencial de crescimento. A velocidade de crescimento microbiano no hidrolisado ácido a base de *O. ficus-indica* foi de $\mu_{\max} = 0,0739 \text{ h}^{-1}$ menor que a velocidade em *O. cochenillifera* foi de $\mu_{\max} = 0,0764 \text{ h}^{-1}$. Os resultados de velocidade

não apresentaram diferença significativa ($p>0,05$), entretanto no hidrolisado a base de *O. cochenillifera* o microrganismo apresentou maior velocidade, podendo este fato estar relacionado a uma maior quantidade de açúcares livres presentes no hidrolisado.

A Figura 35 apresenta a produção de enzimas microbianas durante a cinética de crescimento microbiano. Foi observado a produção majoritária de enzimas xilanolíticas num período de fermentação em torno de 96h, para os dois cultivos sendo que o hidrolisado ácido de *O. cochenillifera* induz uma maior produção quando comparado ao hidrolisado de *O. ficus-indica*. Este fato, pode estar relacionado a maior quantidade de polissacarídeos presentes no meio e este fato é constatado pelos resultados obtidos na Tabela 16, onde a pós hidrólise mostrou um aumento da concentração de xilose, isto é, este monossacarídeo estava em sua forma polimérica. O fungo *A. awamori* é descrito na literatura como um bom produtor de enzimas xilanolíticas (KORMELINK et al. 1993).

Figura 35- Produção de enzimas microbianas pelo *A. awamori* durante 96 horas de cultivo em meio a base de hidrolisado ácido de *O. ficus-indica* (A) e *O. cochenillifera* (B) e crescimento microbiano em *O. ficus-indica* (C) e *O. cochenillifera* (B) respectivamente.



Fonte: Autor, (2019).

Além de enzimas xilanolíticas o hidrolisado induz a produção de enzimas celulolíticas e pectinolíticas. Não foi observada a produção das enzimas pectina liase e pectina metilesterase durante o cultivo. Essas enzimas atuam, preferencialmente, substratos com alta metoxilação (JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005; SHEN et al., 2005). As condições experimentais e o micro-organismos são paramentos importantes para o estudo de produção de enzimas microbianas.

A produtividade enzimática foi determinada pela concentração máxima em relação ao tempo (80 ou 88h). Para *O. ficus-indica* a produtividade foi FPase (0,00125 UI/mL.h), CMCCase (0,0025 UI/mL.h), Xilanase (0,039 UI/mL.h), Pectinase (0,00425

UI/mL.h), Poligalacturonase (0,006625 UI/mL.h) e β - glicosidase (0,00025 UI/mL.h). Já para *O. cochenillifera* os valores de produtividade foram: FPase (0,0001 UI/mL.h), CMCCase (0,004 UI/mL.h), xilanase (0,09UI/mL.h), pectinase (0,017UI/mL.h), poligalacturonase (0,013UI/mL.h) e β -glicosidase (0,003UI/mL.h).

O. ficus-indica apresentou maiores produtividades apenas para a enzima FPase, todas as outras enzimas apresentaram maiores produtividades no hidrolisado de *O. cochenillifera*. A Tabela 18 mostra os resultados obtidos neste trabalho e por outros autores utilizando o hidrolisado ácido para produção de enzimas utilizando diferentes micro-organismos e biomassas vegetais. Todos os hidrolisados presentes na Tabela 16 apresentaram maiores concentração de xilose, confirmado que este açúcar é um bom indutor de enzimas microbianas (STRICKER; MACH; GRAAFF, 2008; KOBAKHIDZE et al. 2016).

Tabela 16- Produção de enzimas em meio de cultura utilizando o hidrolisado ácido (Hemicelulósico).

Biomassa	Micro-organismo	Produção de Enzimas (UI/mL)	Referência
<i>O. ficus-indica</i>	<i>Aspergillus awamori</i>	FPase 0,1 CMCase 0,02 Xilanase 3,12 Pectinase 0,34 Poligalacturonase 0,53 β - glicosidase 0,02 Tempo de produção 80h	Este trabalho
<i>O. cochenillifera</i>	<i>Aspergillus awamori</i>	FPase 0,01 CMCase 0,35 Xilanase 8,43 Pectinase 1,49 Poligalacturonase 1,175 β - glicosidase 0,23 Tempo de produção 88h	Este trabalho
<i>O. ficus-indica</i>	<i>Aspergillus awamori</i>	Xilanase 8.3 Tempo de fermentação 40h	Pessoa et al. (2018)
Bagaço de cana-de-açúcar	<i>Trichoderma reesei</i> RUT C30	FPase 0,057 CMCase 0,242 Xilanase 1,40 β - glicosidase 0,0 Tempo de produção 54h	Silva, (2014)
Bagaço de cana-de-açúcar	<i>Trichoderma reesei</i> RUT C30.	FPase 0,98 CMCase 12,70 Xilanase 13,0 β - glicosidase 0,32 Tempo de produção 48h	Vasconcelos, (2012)

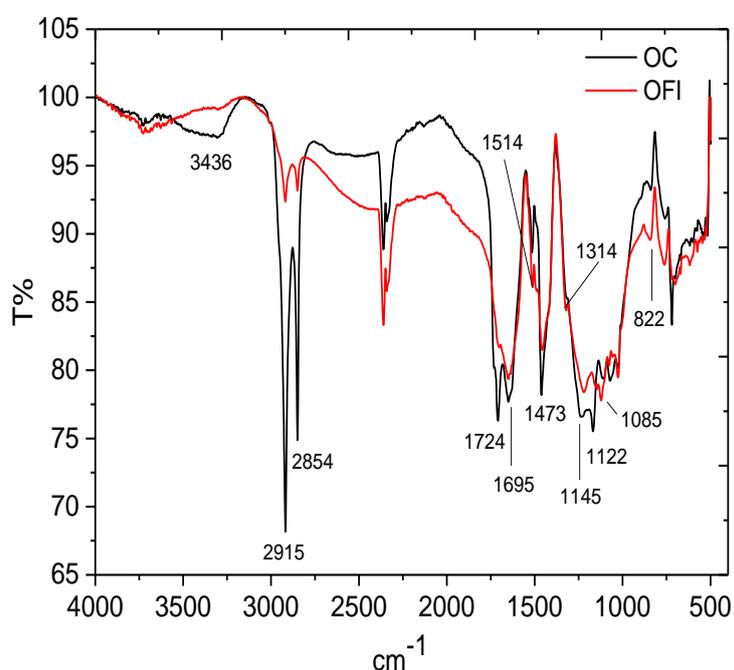
Fonte: Autor, (2019).

5.7 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, CITOTÓXICA E IMUNOMODULATÓRIA DAS LIGNINAS DE *OPUNTIA FICUS-INDICA* E *OPUNTIA COCHENILLIFERA*

5.7.1 Análise de FTIR e UV/Visível de ligninas

Os espectros de FTIR para as ligninas de *O. ficus-indica* e *O. cochenillifera* são apresentados na Figura 36. As bandas foram previamente atribuídas por Tejado et al. (2007), Guo et al. (2014) e Reyes-Rivera et al. (2015), que estudaram ligninas klason de diferentes espécies de cactos.

Figura 36- Espectro FTIR das ligninas *O. ficus-indica* (OFI) e *O. cochenillifera* (OC).



Fonte: Autor, (2019).

Na faixa de 3800 a 2700 cm^{-1} , algumas bandas merecem destaque: em 3436 cm^{-1} referente ao alongamento da ligação OH do total de hidroxilas presentes na lignina, 2915 e em 2854 cm^{-1} , existe a banda referindo-se ao estiramento da ligação CH em grupos metileno ($-\text{CH}_2$) e metil ($-\text{CH}_3$). Na faixa de 1800 a 600 cm^{-1} a banda em 1724 cm^{-1} , refere-se ao estiramento da ligação C = O em relação aos grupos cetona e éster não conjugados, geralmente de carboidratos, o que evidencia a presença de açúcares residuais da hemicelulose em lignina (TEJADO et al. 2007; GUO et al. 2014; REYES-RIVERA et al. 2015). Essa banda nas ligninas da *O. cochenillifera* apresentou maior intensidade e isso se deve ao aumento da oxidação da lignina e ao aumento do grupo acetila.

As bandas 1514 e 1473 cm^{-1} referem-se aos estiramentos/deformações da ligação C-H do anel aromático. Em 1695 cm^{-1} , obtém-se a banda correspondente às arilcetonas (C = O) conjugadas ao anel siringila. A banda em 1315 cm^{-1} , refere-se ao estiramento da ligação C-O em aromáticos e confirma a presença de grupos metoxilados e hidroxilas fenólicas do anel siringila (TEJADO et al. 2007). A banda em 1269 cm^{-1} está relacionada com a deformação do anel guaiacila e a banda em 1085 cm^{-1} , está relacionada ao estiramento não-conjugado C-O, e com a deformação aromática C-H no plano (G>S) (TEJADO et al. 2007; REYES-RIVERA et al. 2015).

A banda em 1145 cm^{-1} refere-se à vibração da ligação C = O dos ésteres, apresentando maior intensidade nos espectros de lignina GSH do que na lignina do tipo GS. Outra característica espectral importante das ligninas GSH é o aparecimento de uma banda a 830 cm^{-1} , referindo-se à vibração das ligações aromáticas C-H fora do plano (TEJADO et al. 2007; GUO et al. 2014). A Tabela 17 sumariza as atribuições presentes nas duas ligninas.

Tabela 17- Atribuições de bandas de espectros de absorção de infravermelho, características das ligninas de *O. ficus-indica* (OFI) e *O. cochenillifera* (OC).

OFI	OC		
Banda (cm^{-1})	Banda (cm^{-1})	Vibração	Atribuição
3309	3436	st O-H	OH fenólico + OH alifático
2915	2915	st C-H	CH ₃ -CH ₂
2846	2854	st C-H	CH ₃ -CH ₂
1724	1724	st C=O	C = O cetonas não conjugadas
1695	1694	st C=O	C = O cetonas conjugadas (S)
1514	1510	st C-C	vibração do anel aromático (G> S)
1473	1473	$\delta_{\text{assimétrico}}$ C-H	CH ₃ -CH ₂
1315	1315	$\delta_{\text{assimétrico}}$ C-H	CH ₃
1241	1241	st C=O	(G)
1141	1145	st C=O	C = O em ésteres conjugados GSH
1122	1120	δ_{op} Ar C-H	(S)
1085	1085	δ_{ip} Ar C-H	G>S
822	822	δ_{op} Ar C-H	(H)

st: Estiramento; δ_{ip} : vibração de deformação no plano; δ_{op} : fora do plano de deformação por vibração H = p-hidroxifenil, G = guaiacil S= Siringil

Fonte: adaptado de Tejado et al. (2007).

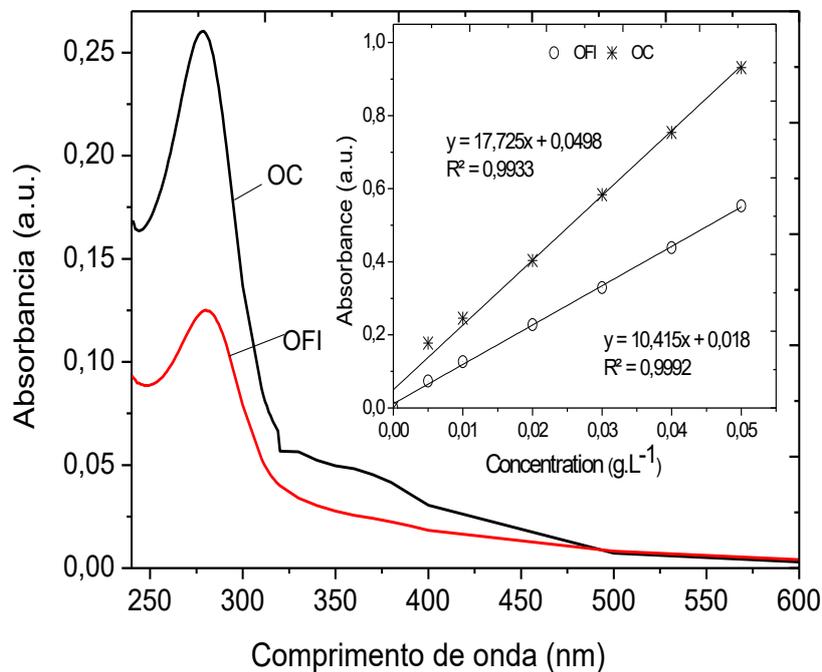
Os espectros de ligninas *Opuntia* foram semelhantes, mostrando que o "núcleo" da estrutura química de cada uma das ligninas não se alterou durante o processo de obtenção. Esta não alteração da estrutura química das ligninas também foi observada por Ahuja et al. (2017) obtendo essas moléculas em diferentes condições de processo.

A Figura 37 apresenta o espectro de absorção das ligninas no comprimento de onda de 250-600 nm. As duas ligninas apresentaram uma absorção típica de UV com

máximos de 284 nm correspondendo respectivamente à excitação eletrônica de grupos fenólicos conjugados. Este sinal mostra que as ligninas apresentam maiores níveis de unidades de guaiacila (G) (SKULCOVA et al. 2017; ROCHA et al. 2014). Além dessa banda, a lignina de *O. cochenillifera* apresentou outra faixa de menor absorção em 300-400 nm, devido a grupos carbonila e/ou duplas ligações conjugadas a um composto aromático (SKULCOVA et al. 2017).

Os coeficientes de extinção UV foram determinados para *Opuntia ficus-indica* (10,42 L/g·cm) e *O. cochenillifera* (17,73 L/g·cm). Esses valores são próximos aos obtidos por Rocha et al. (2014) caracterizando ligninas do bagaço de cana-de-açúcar obtido (14,6 L/g·cm), Varanasi et al. (2012) obtiveram 17,75 L/g·cm (*Panicum virgatum*) e 20,09 L/g·cm (eucalipto). Segundo Rocha et al. (2014), os anéis substituídos devem aumentar a absorvabilidade a 280 nm. Portanto, a diferença na absorvância entre as ligninas a 280 nm, mostra que as ligninas de *O. cochenillifera* provavelmente deveriam ter um grau maior de substituição dos anéis aromáticos, o que pode ser devido a reações de condensação.

Figura 37- Espectros de absorção UV/Vis das ligninas *O. ficus-indica* (OFI) e *O. cochenillifera* (OC) e suas respectivas curvas analíticas.



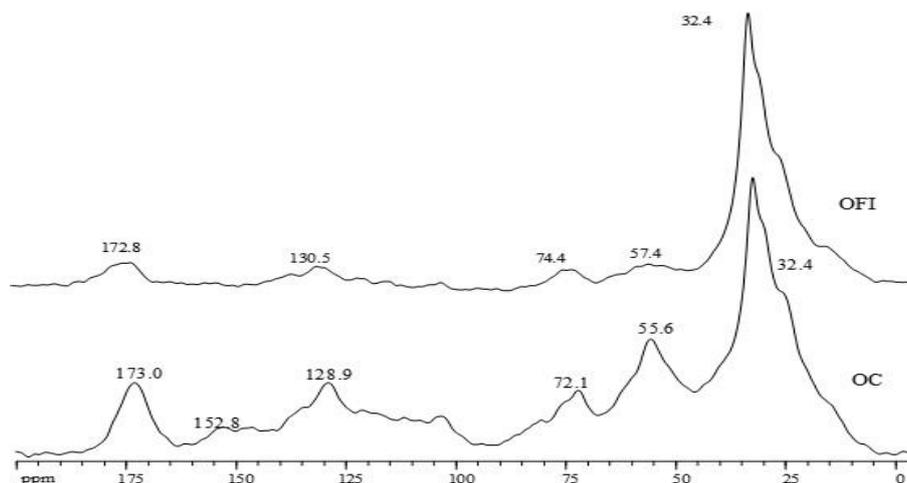
Fonte: Autor, (2019).

5.7.2 Espectroscopia de RMN e análise elementar

As ligninas são de alto peso molecular em solução, possuem alta viscosidade e suas moléculas têm pouca mobilidade e devida a estas características, possui sinais de NMR de baixa resolução (ROCHA et al. 2014). Embora alguns destes sinais não sejam completamente resolvidos, a integração das regiões no espectro é usada para estimar o grau de substituição do anel aromático e a porcentagem de grupos tais como: hidroxila alifática, aromática, metoxilas, entre outros (NASEEM et al. 2016).

Os espectros de RMN ^{13}C -CPMAS das amostras de *O. ficus-indica* e *O. cochenillifera* (Figura 38) e seus sinais foram determinados segundo Martinez-Balmori et al. (2014) como são apresentados na Tabela 18.

Figura 38- Espectro de ^{13}C -CPMAS-RMN das ligninas de *O. ficus-indica* (OFI) e *O. cochenillifera* (OC).



Fonte: Autor, (2019).

Tabela 18 - Distribuição relativa (%) da área do sinal nas regiões de deslocamento químico (ppm) nos espectros de RMN ^{13}C -CPMAS, de *O. ficus-indica* (OFI) e *O. cochenillifera* (OC).

δ (ppm)	Atribuição	OC		OFI	
		Área	%	Área	%
45-0	Alkil-C	4,99	41,1	9,36	70,0
60-45	CH ₃ O/C-N	1,62	13,3	0,91	6,8
110-60	Alkil-O-C	2,2	18,1	0,84	6,3
145-110	Aromatico-C	1,89	15,7	1,08	8,1
160-145	Aril-O-C	0,45	3,7	0,19	1,4
190-160	COOH	1,0	8,2	1,0	7,5
	Total	12,15	100	13,38	100

Fonte: Autor, (2019).

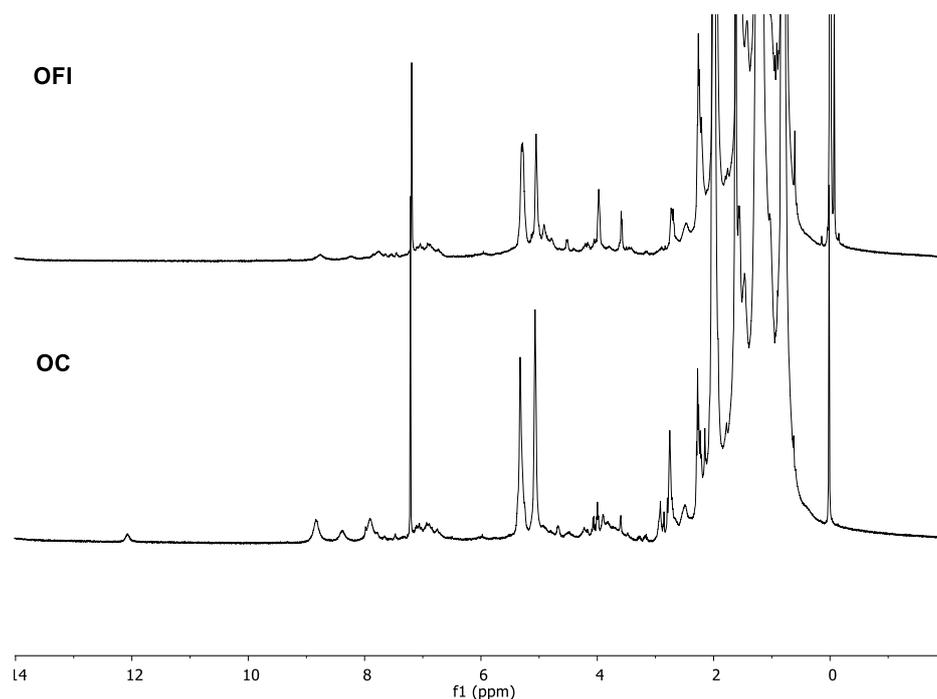
Os sinais em 0-45 ppm podem estar principalmente associados à presença de substituintes metila. Os sinais fracos centrados em torno de 54 ppm nas amostras de *O. ficus-indica* e *O. cochenillifera* apresentam baixos teores de grupos metoxila nos anéis aromáticos das unidades guaiacila e siringila. Estas ligninas também apresentaram baixo teor de estruturas aromáticas sendo estas relacionadas pelos grupos aromático-C (110-160 ppm) sendo atribuído a carbono fenílico não substituído e C-substituído de monômeros guaiacila e siringila das ligninas, regiões aromáticas condensadas (110-140 ppm), e as regiões fenólicas de carbonos do anel O-substituído (140-160 ppm) (MARTINEZ-BALMORI et al. 2013, 2014). Finalmente, o sinal largo a 174 ppm indica o teor de carbonilas de ácidos alifáticos. As ligninas apresentaram sinais em 32 ppm, indicando a presença de grupos CH₂ nas cadeias alquílicas (DOMÍNGUEZ-ROBLES et al. 2017). A presença de sinais referentes a grupos alquil-C 55, 128 e 152 ppm encontrados nas ligninas de *O. cochenillifera* sugerem que essas moléculas apresentam maiores teores de unidades aromáticas.

Através dos espectros de RMN ¹³C-CPMAS, foi possível determinar o teor de ligações β-O-4, grau de condensação (DC) e o conteúdo de estruturas não condensadas (NCS) (obtidas por 100-DC) onde esses parâmetros estão relacionados complexidade estrutural das ligninas. O conteúdo das ligações β-O-4 para cada uma das ligninas em estudo foi calculado de acordo com Costa et al. (2015) (80 80,0 a 90,0 ppm) pela quantidade da área de β-O-4, Cα em β-5 e β-β (δ 80,0 a 90,0 ppm) β -5 e β-β (δ 51,0-53,8 ppm). Com base nesta estimativa, obteve-se o conteúdo das estruturas β-O-4 presentes nas ligninas de *O. ficus-indica* (25%) e *O. cochenillifera* (22%). Ligninas com maior teor de ligações β-O-4 apresentam menor número de grupos hidroxilas fenólicas livres. O grau de condensação e o conteúdo de estruturas não condensadas foram determinados subtraindo-se a intensidade do sinal observado para CAr-H (δ 123-103 ppm) do valor teórico de CAr-H (CAPANEMA; BALAKSHIN; KADLA, 2005).

Os valores de (DC) para ligninas de *O. ficus-indica* e *O. cochenillifera* foi de 11% e 18%, enquanto os de (NCS) foram 89% e 82%, respectivamente. Além das informações obtidas pelos espectros de RMN ¹³C-CPMAS, foi possível estudar os hidrogênios presentes na estrutura das ligninas. A Figura 39 mostra os espectros de RMN de ¹H e a Tabela 19 as atribuições obtidas para as ligninas acetiladas. A maioria dos sinais obtidos para estas macromoléculas também foram previamente observados por regiões atribuídas segundo Gonçalves et al. (2000), García et al. (2009) e Rocha et al. (2014).

Os sinais com deslocamento químico na região dos hidrogênios aromáticos, em torno de 7,00 ppm, são atribuídos aos prótons do anel aromático dos álcoois (propanosiringila e propanoguaiacila, respectivamente (GARCÍA et al. 2009). Os prótons de cadeia lateral de unidades siringila na região de 6,60 ppm. Isso foi observado em relação aos sinais na região 6,0-6,2 ppm que são de prótons vinílicos. Os hidrogênios ligados aos carbonos α e β mostram sinais a 5,1 e 4,7 ppm, respectivamente (GONÇALVES et al. 2000). O H γ de várias unidades de lignina representa os sinais em 4.2 e 4.4 ppm. Um sinal característico dos prótons metoxílicos é observado a 3,65 ppm. Sinais entre 3,1-3,20 ppm são característicos de H- β em estruturas β - β . Sinais de 1,60 ppm e 2,60 ppm são originados de hidroxilas alifáticas e fenólicas, respectivamente. Sinais <1,7 ppm estão relacionados aos grupos CH₃ e CH₂ em cadeias alifáticas saturadas (GONÇALVES et al. 2000; ROCHA et al. 2014). A Tabela 19 mostra as atribuições para cada região do espectro de RMN ¹H.

Figura 39- Espectro de ¹H-RMN da lignina acetilada das ligninas *O. ficus-indica* (OFI) e *O. cochenillifera* (OC).



Fonte: Autor, (2019).

Tabela 19- Atribuições de sinais no espectro de RMN ^1H da lignina acetilada de *O. ficus-indica* e *O. cochenillifera*.

δ (ppm)	Atribuição
9,84-7,53	Prótons aromáticos em unidades de benzaldeído Prótons formílicos em unidades de cinamaldeído Prótons Formil em unidades de benzaldeído
7,29	Clorofórmio (solvente)
7,23-6,25	Ar-H em Ar-H; H- α em Ar-CH = CH-CHO; H- β em Ar-CH = CH-CHO e H- α em Ar-CH = CH-CH ₂ OAc
6,25-5,75	H- α em β -O-4 e β -1; H- β em Ar-CH = CH-CH ₂ OAc
5,75-5,20	H- α em β -5 e α -O-4
5,20-4,50	H- β em β -O-4; H- γ em Ar-CH = CHCH ₂ OAc; H- α em β - β
4,50-3,95	H- γ em β -O-4, β -5, β -1 e β - β
3,95-3,55	Ar-O-CH ₃ (principal); H- β em β -5 e H- γ in β - β
3,55-2,50	H- β em β -1, β - β e outros
2,50-2,20	H ₃ C em Ar-O-Ac, exceto 5-5* estruturas
2,20-1,50	H em Alif.-O-Ac e Ar-O-Ac em 5-5*
1,50-1,10	H em CH ₂
1,10-0,75	H em CH ₃

OAC: Acetoxil; Ar-H: aromático (H está no anel fenílico) Fonte: Autor, (2019).

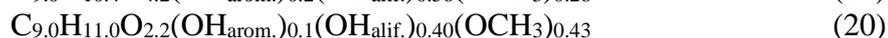
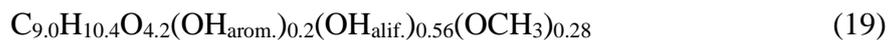
As ligninas em estudo, embora de espécies diferentes, apresentaram sinais característicos muito semelhantes e corroboram com os dados obtidos na análise UV e FTIR, mostrando que a lignina é do tipo GSH com muitos grupos insaturados α - β . Por meio dos sinais obtidos no espectro de RMN ^1H (conteúdo de grupos metoxílicos) e análise elementar (Tabela 20) foi possível determinar a equação C₉ das ligninas em estudo.

Tabela 20- Dados da análise elementar das ligninas *O. ficus-indica* e *O. cochenillifera* e ligninas acetiladas (Act).

Lignina	%C	%H	%N	%O
<i>O. cochenillifera</i>	63,82 \pm 0,10	7,26 \pm 0,00	0,23 \pm 0,01	28,17 \pm 0,12
<i>O. cochenillifera</i> Act	69,90 \pm 0,42	7,75 \pm 0,16	0,30 \pm 0,03	22,57 \pm 0,55
<i>O. ficus-indica</i>	49,26 \pm 0,08	5,50 \pm 0,14	0,51 \pm 0,01	44,24 \pm 0,20
<i>O. ficus-indica</i> Act	53,09 \pm 0,15	5,76 \pm 0,04	0,43 \pm 0,01	40,18 \pm 0,21

Fonte: Autor, (2019).

A porcentagem de grupos metoxílicos foi determinada pela integração da área total, que corresponde a 100 unidades arbitrárias e está relacionada à porcentagem de prótons das ligninas acetiladas. A integração da região do grupo metoxílicos na RMN de ^1H (δH 3,5-4,0) apresentou porcentagem de metoxílicos obtidos pela Tabela 15 para as ligninas *O. ficus-indica* e *O. cochenillifera* foi de 4,0% e 5,5%, respectivamente. As Equações 19 e 20 deram respectivamente a expressão para a fórmula mínima C₉ da lignina para *O. ficus-indica* e *O. cochenillifera*. A porcentagem de nitrogênio com valores menores que 1,5% são desconsiderados (GONÇALVES et al. 2000).



5.7.3 Termoquimólise e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (THM-GC-MS)

Como destacado no experimento de RMN, foi encontrado um maior rendimento relativo de componentes alquílicos no pirograma nas ligninas de *O. ficus-indica* e *O. cochenillifera*, revelando uma preservação seletiva de moléculas alifáticas lineares e cíclicas de cadeia longa. Os compostos foram determinados pelo padrão de fragmentação principal e a estes foram atribuídos símbolos a fim de que o pudesse ser agrupado nos seguintes monômeros G, S e H. A Tabela 21 apresenta os principais derivados obtidos por THM GC-MS para as ligninas de *O. ficus-indica* (OFI) e *O. cochenillifera* (OC)

Tabela 21- Produtos identificados por THM para as ligninas de *O. ficus-indica* (OFI) e *O. cochenillifera* (OC).

r.t.	Composto	Lig. OC	Lig. OFI
5.7	Benzeno, 1-CH ₃ O-4-metil	Lig H2	Lig H2
7.1	1-Fenol, 2-CH ₃ O-benzeno	Lig G1	Lig G1
8.4	Benzeno, 1-etil-4-CH ₃ O-	Lig H3	Lig H3
10.4	3,4-diCH ₃ O-tolueno	Lig G2	Lig G2
12.7	4-CH ₃ O-acetofenona	Lig H5	-
14.0	Benzeno, 4-etil-1,2-diCH ₃ O-	Lig G3	Lig G3
14.3	Ácido benzoico, 4-CH ₃ O-,	Lig H6	-
16.4	1,2,3-triCH ₃ Obenzeno	Lig S1	-
18.5	Benzeno, 1,2,3-triCH ₃ O-5-metil	Lig S2	Lig S2
19.8	Etanona, 1-(3,4-diCH ₃ O fenil)	Lig G5	Lig G5
20.4	Ácido benzoico, 3,4-di CH ₃ O-	Lig G6	Lig G6
22.7	Etanona, 1-(3,4,5-triCH ₃ Ofenil)-	Lig S5	Lig S5
23.7	cis/trans -2-(3,4-diCH ₃ O fenil)-1-CH ₃ Oetileno	Lig G7/8	LigG7/8
23.9	Metil 3,4,5-tri CH ₃ O benzoato	Lig S6	Lig S6
23.9	4-(1,2-diCH ₃ Oetano)-1,2-di CH ₃ O benzeno	Lig G	-
24.4	cis-1-(3,4-diCH ₃ Ofenil) 1-CH ₃ O-1-propeno	Lig G10	-
25.0	2-ácido propanoico, 3-(4-CH ₃ Ofenil)	Lig H18	Lig H18
25.2	1-(3,4-diCH ₃ Ofenil)-3-CH ₃ O-1-propeno	Lig G13	Lig G13
26.1	Ácido benzacético, 3,4, 5-triCH ₃ O-	Lig S24	Lig S24
26.3	cis-1-(3,4,5-triCH ₃ Ofenil)-2-CH ₃ Oetileno	Lig S7	Lig S7
27.0	Eritro/Treo -1-(3,4-diCH ₃ O fenil)-1,2,3 triCH ₃ Opropano	Lig G14	Lig G14
27.4	Eritro/Treo -1-(3,4-diCH ₃ O fenil)-1,2,3-triCH ₃ Opropano	Lig G15	Lig G15
27.5	1-(3,4,5 triCH ₃ Ofenil)-CH ₃ Oprop-1-eno	Lig S10	Lig S10
29.2	trans-3-(3,4-DiCH ₃ Ofenil)-3-ácido propanoico	Lig G18	Lig G18
30.1	threo/erythro-1-(3,4,5-triCH ₃ O fenil) -1,2,3-triCH ₃ Opropano	Lig S14	Lig S14
30.4	threo/erythro-1-(3,4,5-triCH ₃ O fenil) -1,2,3 triCH ₃ Opropano	Lig S15	Lig S15
35.8	trans-1-(3,4,5-triCH ₃ Ofenil)-2-CH ₃ O etileno	Lig S8	Lig S8

r.t: tempo de retenção (min), H = p-hidroxifenila, G = guaiacila, S = siringila Fonte: Autor, (2019).

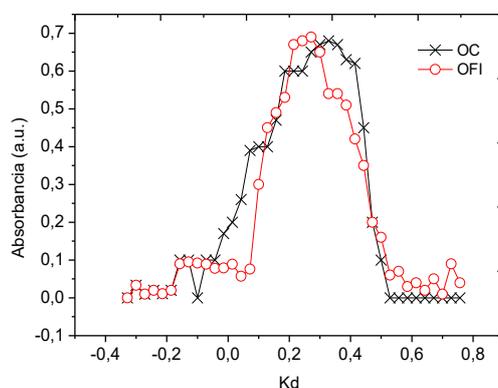
Os resultados revelaram que estas ligninas são do tipo *p*-hidroxifenila-guaiacila-siringila (GSH). A abundância aproximada de compostos fenólicos foi de 44%, 37%, 19% para as unidades de lignina G, S e H para as ligninas *O. ficus-indica* e 45%, 40%, 15% para *O. Cochenilifera*, respectivamente. A THM-GC-MS tem sido utilizada com sucesso para analisar a relação S/G relativa da lignina (LOPES et al. 2011). Verificou-se que as relações S/G para as ligninas de *O. ficus-indica* e *O. Cochenillifera* foi de 0,98 e 0,89.

Essas diferenças na relação S/G foram provavelmente relacionadas à desmetoxilação induzida pela pirólise. Bergen et al. (2000) relataram que a desmetoxilação de unidades de siringila ocorre mais facilmente nas unidades G quando comparadas às unidades S durante o processo de pirólise, levando à formação de mais produtos de degradação do tipo guaiacila e, assim, diminuindo a relação siringila/guaiacila. Além disso, foi possível determinar a alta concentração de unidades de *p*-hidroxifenil (H), resultado muito semelhante aos níveis obtidos em ligninas de bagaço de cana (MENEZES et al. 2017). A presença dessas unidades torna a lignina mais reativa em processos de modificação química, por exemplo, na nitração ou sulfonação da lignina (VÁZQUEZ et al. 1997).

5.7.4 Peso molecular

A cromatografia de permeação em gel é um método rápido, simples e apropriado para determinar o peso molecular médio das moléculas do polímero (MENEZES et al. 2017). A Figura 40 apresenta os cromatogramas de permeação em gel (GPC) obtidos para as ligninas de *O. ficus-indica* e *O. cochenillifera*. A média ponderada (Mw) e os pesos moleculares médios (Mn) e a polidispersividade (Mw/Mn) das duas ligninas são mostradas na Tabela 22.

Figura 40- Cromatograma de permeação em gel da coluna Sephadex G-50 das ligninas de *O. ficus-indica* (OFI) e *O. cochenillifera* (OC).



Fonte: Autor, (2019).

Tabela 22- Valores de média ponderada (M_w), peso molecular médio (M_n) e a polidispersividade (M_w/M_n) das ligninas de *O. ficus-indica* e *O. cochenillifera*.

Ligninas	M_n (g/mol)	M_w (g/mol)	M_w/M_n
<i>O. cochenillifera</i>	2248	4209	1,8
<i>O. ficus-indica</i>	1927	4171	2,1

Fonte: Autor, (2019).

Os resultados obtidos para todas as amostras de lignina *O. ficus-indica* e *O. cochenillifera* estão de acordo como descrito na literatura para outros tipos de ligninas (MONTEIL-RIVERA et al. 2013; REN et al. 2015; DOMÍNGUEZ-ROBLES et al. 2017). A diferença de peso molecular entre as nossas ligninas está associada à matéria-prima e à estrutura química dessas moléculas. Estas ligninas são de baixo peso molecular.

5.7.5 Utilização da ferramenta Radar de lignina para classificação de ligninas

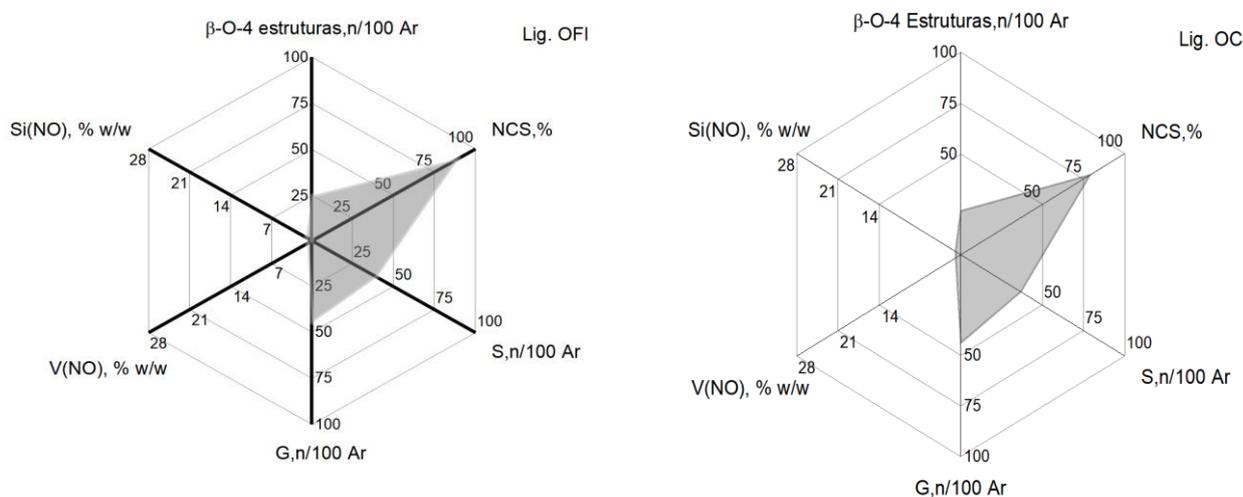
O uso de gráficos de radar (Figura 41) permite uma classificação direta das diferentes ligninas por comparação dos parâmetros-chave (COSTA et al. 2015). Os parâmetros selecionados para a elaboração dos gráficos (Figura 40) foram: conteúdo de ligações β -O-4, unidades não condensadas (NCS), unidades S e G (obtidas por THM-GC-MS), e rendimento de vanilina (V) e Siringaldeido (Si) (obtido por NO) descrito na Tabela 23.

Tabela 23- Produção de produtos fenólicos monoméricos (Si, V e H) obtidos por oxidação com nitrobenzeno (NO) de ligninas de *O. ficus-indica* (OFI) e *O. cochenillifera* (OC).

Lignin	H (%m/m _{lignina})	V (%m/m _{lignina})	Si (%m/m _{lignina})	Total (%m/m _{lignina})
OFI	0,49 ± 0,1	1,30 ± 0,02	1,51 ± 0,1	3,3 ± 0,0
OC	0,40 ± 0,03	1,38 ± 0,01	1,42 ± 0,01	3,2 ± 0,4

* Média ± Desvio padrão Fonte: Autor, (2019)

Figura 41- Gráficos de radar para comparação de ligninas de *O. ficus-indica* (OFI) e *O. cochenillifera* (OC)



Fonte: Autor, (2019).

Os gráficos radar confirmam que as ligninas isoladas apresentam poucas diferenças estruturais, entretanto as ligninas de *O. ficus-indica* apresentam maiores níveis de ligações β -O-4 e NCS, quando comparadas com as de *O. cochenillifera*, sendo assim as ligninas de *O. ficus-indica* são mais facilmente removidas da parede celular quando comparada às ligninas de *O. cochenillifera* durante o processo de deslignificação, além de serem mais facilmente despolimerizadas (HIGUCHI, 2006).

Estas ligninas são bem diferentes das isoladas por Costa et al. (2015) e Costa et al. (2016) que também utilizaram a ferramenta de radar para estudar diferenças estruturais e concluíram que mudanças na estrutura química dessas moléculas estão diretamente relacionadas ao processo e às espécies estudadas. No entanto, mesmo com pequenas diferenças devido às suas estruturas, as ligninas dessas duas espécies de *Opuntia* podem ser utilizadas como matéria-prima para obtenção de fenóis, produção de solventes, corantes, pesticidas, resinas sintéticas, antioxidantes, além de serem interessantes para a obtenção de bio-óleo.

Os resultados a seguir discutidos foram publicados na revista International Journal of Biological Macromolecules qualis A1 para Biotecnologia e encontra-se no apêndice 1.

5.7.6 Atividade antioxidante obtida das ligninas *O. cochenillifera* e *O. ficus-indica*

A atividade antioxidante foi determinada através de DPPH, ABTS, NO e ensaios AAT. Os fenóis totais foram medidos em função do ácido gálico (Tabela 24). A atividade antioxidante pode estar relacionada presença de grupos fenólicos na estrutura lignina (AADIL et al. 2014).

Tabela 24- Resultados dos fenóis totais e diferentes atividades antioxidantes promovidas pelas ligninas *O. ficus-indica* e *O. cochenillifera*.

Ensaio	<i>O. ficus-indica</i>	<i>O. cochenillifera</i>	Ácido ascórbico	BHT
DPPH (%)	12,0 \pm 0,3	21,1 \pm 0,1	90,04 \pm 0,16	93,13 \pm 0,58
ABTS (%)	26,8 \pm 0,1	61,5 \pm 0,9	91,46 \pm 0,38	96,12 \pm 0,10
NO (%)	4,7 \pm 0,7	5,8 \pm 0,2	-	-
AAT (%)	4,0 \pm 0,0	8,5 \pm 0,0	100	98,9 \pm 0,2
Fenóis				
Total (mgAAE/g)	36,4 \pm 0,4	87,8 \pm 6,5	-	-

* Média \pm Desvio padrão BHT: Hidroxitolueno butilado Fonte: Autor, (2019).

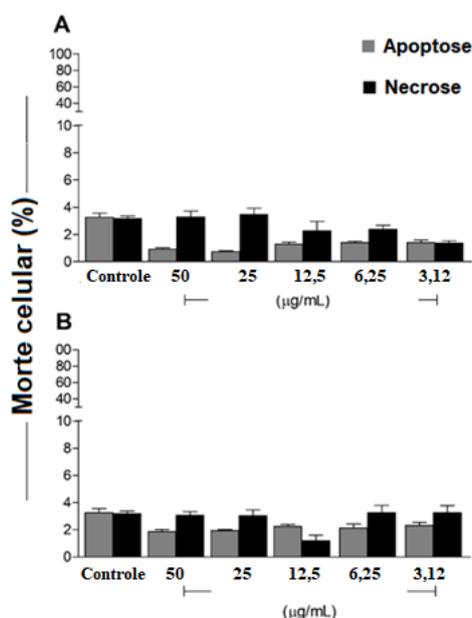
As ligninas de *O. cochenillifera* apresentaram maiores porcentagens de sequestro de radicais livres e quantidade de fenol total quando comparada à *O. ficus-indica* (Tabela 24). Além disso, apenas na lignina *O. cochenillifera* e através do ensaio ABTS foi possível determinar IC₅₀ (253,9 μ g/mL) de radicais livres (concentração de lignina

necessária para reduzir 50% dos radicais livres). Já para a lignina de *O. ficus-indica*, não foi possível determinar o IC₅₀ para nenhum dos ensaios.

5.7.7 Ensaios de ativação, proliferação e produção de citocinas em esplenócitos de camundongos.

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados em células de esplenócitos de camundongo. As células foram cultivadas com diferentes concentrações de ligninas de *O. ficus-indica* e lignina de *O. cochenillifera* (3,12 a 50 µg/mL). As Figuras 42 A e 42 B apresentam os resultados para as ligninas respectivamente.

Figura 42- Investigação de morte celular promovida por ligninas utilizando anexina V e coloração com iodeto de propídio. (A) - Morte celular promovida por lignina de *O. ficus-indica* e lignina de *O. cochenillifera* (B).



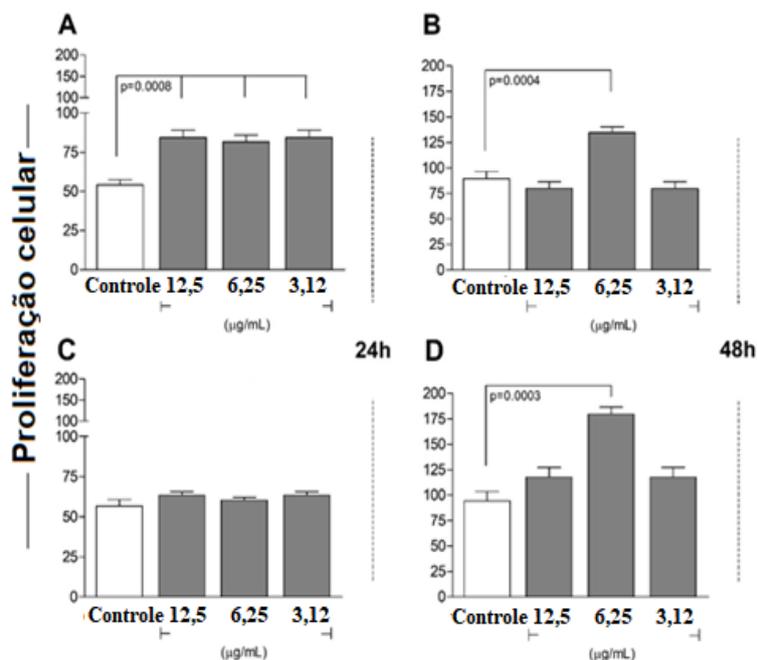
Fonte: Autor, (2019).

Os resultados mostraram que nenhuma lignina foi capaz de promover morte significativa em células animais e podem ser usadas com segurança em todas as concentrações avaliadas neste estudo (Figura. 42A e B). Estes resultados, são semelhantes aos obtidos por Morganti et al. (2017), os autores também investigaram o perfil citotóxico promovido pelas suas ligninas as quais denominaram CN-Bio-Lignina e não observaram morte celular significativa contra queratinócitos humanos (HaCat) nas concentrações de 100, 50 e 10 µg/mL. Figueiredo et al. (2017) investigando a atividade antitumoral contra carcinomas mamários e prostáticos humanos e linhagens de

adenocarcinoma colorretal promovidas por nanopartículas de lignina carboxilada, os quais mostraram que a lignina foi capaz de matar células cancerígenas, mas não células normais em altas concentrações (500, 250, 100 e 50 $\mu\text{g/mL}$). Espinoza-Acosta et al. (2016), em sua revisão, relataram que as ligninas apresentam efeito citotóxico apenas em concentrações acima de 700 $\mu\text{g/mL}$ em células de fibroblastos de camundongos.

A partir dos resultados de viabilidade foram realizados ensaios de proliferação celular em três diferentes concentrações de ligninas (12,5, 6,25 e 3,12 $\mu\text{g/mL}$), em tempos de 24 e 48 horas. Os resultados da proliferação celular promovida pelas ligninas estão apresentados nas Figuras 43 A, B, C e D.

Figura 43- Índice de proliferação de esplenócitos de camundongos avaliado por coloração com CFSE. Em um período de 24 e 48 horas para as ligninas de *O. ficus-indica* (A e B) e de *O. cochenillifera* (C e D) respectivamente.



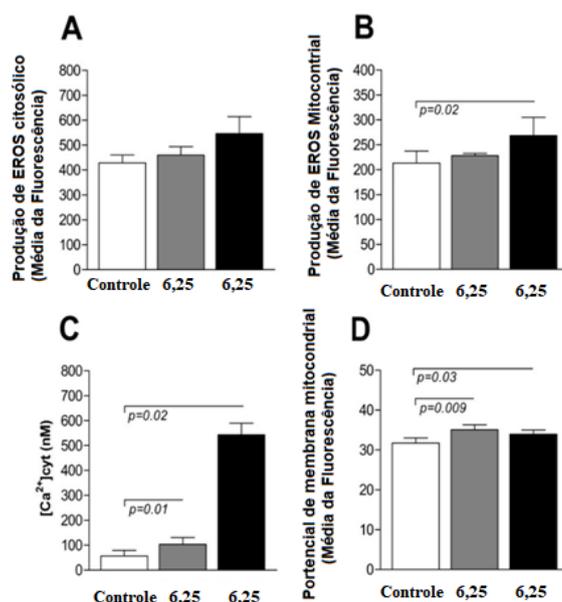
Fonte: Autor, (2019).

As ligninas de *O. ficus-indica* induziram proliferação significativa em 24 e 48 h (Figura 43A e B) e as de *O. cochenillifera* apenas em 48 h de ensaio (Figura 43C e D). Além disso, foi possível observar que ambas as ligninas promoveram maior índice proliferativo na concentração de 6,25 $\mu\text{g/mL}$ (o ensaio dependeu da dose) e, por essa razão, esta concentração foi escolhida para avaliar outros parâmetros imunológicos.

5.7.8 Alterações nas EROs, nos níveis de cálcio citosólico e no potencial de membrana mitocondrial por duas ligninas em esplenócitos de camundongos

Com base nos resultados de proliferação foi escolhida a concentração de 6,25 µg/mL, para investigar a capacidade das ligninas induziram um estado de estresse oxidativo promovendo alterações nos níveis de espécies reativas de oxigênio, citosólico (Figura 44A) e mitocondrial (Figura 44B), nos níveis de cálcio (Figura 44 C) e no potencial de membrana mitocondrial (Figura 44A). A resposta ao estresse oxidativo, sem induzir a morte celular, é crucial para a diferenciação e ativação das células do sistema imunológico (MELO et al. 2010).

Figura 44- Medição do estresse oxidativo promovida por ligninas de *O. ficus-indica* e *O. cochenillifera*. Produção de EROS citosólico (A) e mitocondrial (B) cálcio citosólico (D) e potencial de membrana (D). Numa concentração 6,25 µg/mL.



Fonte: Autor, (2019).

Os resultados mostram que a lignina de *O. cochenillifera* foi capaz de promover aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio esses radicais livres (na mitocôndria) em valores significativos (Figura 44A e B) quando comparado ao controle e a lignina de *O. ficus-indica*. As ligninas promoveram aumento nos níveis de cálcio citosólico (Figura 44C) no potencial de membrana mitocondrial (Figura 44D). Estes resultados indicam que estas macromoléculas são capazes de promover a ativação celular. Já que não ocorreu morte celular como apresentados nos ensaios de citotoxicidade.

5.7.9 Produção de citocinas e liberação de NO, investigados em sobrenadantes de culturas de esplenócitos de camundongos

Os sobrenadantes obtidos durante a cultura esplenócitos submetidos às duas ligninas, na concentração de 6,25 µg/mL, em 24 e 48 h de incubação, apresentaram diferentes quantidades de produção de citocinas (Tabela 25).

Tabela 25- Produção de citocinas promovida por ligninas de *O. ficus-indica* (OFI) e *O. cochenillifera* (OC) a 6,25 µg /mL por 24 e 48 horas de incubação de esplenócitos.

Citocinas (pg/mL)	Controle		Lignina de OFI		Lignina de OC	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h
IFN- γ	7,69 \pm 0,8	7,01 \pm 0,5	7,26 \pm 0,4	7,18 \pm 0,4	7,32 \pm 0,2	7,03 \pm 0,7
IL-2	8,62 \pm 0,5	8,20 \pm 0,6	8,10 \pm 0,3	8,20 \pm 0,2	8,73 \pm 0,1	8,30 \pm 0,2
IL-4	8,80 \pm 0,2	8,60 \pm 0,2	8,50 \pm 0,2	8,47 \pm 0,4	8,43 \pm 0,1	8,32 \pm 0,3
IL-17	7,70 \pm 0,7	7,27 \pm 0,6	7,99 \pm 0,4	7,70 \pm 0,8	7,41 \pm 0,4	7,72 \pm 0,3
TNF-α	45,3 \pm 1,5	5,7 \pm 0,1	50,3 \pm 0,7	7,3 \pm 0,9	58,8 \pm 0,9	7,9 \pm 0,1
IL-6	12,0 \pm 0,8	8,0 \pm 0,5	18,0 \pm 0,1	8,3 \pm 0,1	14,3 \pm 0,1	4,7 \pm 0,5
IL-10	10,0 \pm 0,3	5,3 \pm 0,1	10,2 \pm 0,8	8,7 \pm 0,7	9,8 \pm 0,3	6,7 \pm 0,1

Fonte: Autor, (2019).

Os resultados da Tabela 25 mostram que muitas citocinas foram produzidas em valores basais (semelhantes ao controle) e, por isso, não promoveram alterações no estado imunológico em culturas. Entretanto, ambas as ligninas apresentaram o mesmo comportamento em relação à alta produção de TNF- α , IL-6 e IL-10. Estas citocinas foram produzidas em valores significativos pelas células quando em contato com ligninas e nos mesmos tempos experimentais (Figura 45A-F). Além disso, a Figura 45 mostra a baixa produção de NO, provavelmente associada à baixa produção de IFN- γ .

As ligninas de *O. ficus-indica* e *O. cochenillifera* estimularam uma resposta pró-inflamatória através da produção de citocinas TNF- α , IL-6 e IL-10 (DANIELE et al 2014; GOTOH et al. 2017). Os mecanismos envolvidos na sinalização do TNF- α ainda não estão claros, mas foi demonstrado que esta citocina promove mudanças na função mitocondrial e aumento na produção de ROS (FORTES et al. 2012; TILSTRA et al. 2014). Além disso, a produção de TNF- α indica um sinal químico para a liberação de IL6, uma citocina considerada como um marcador da resposta inflamatória sistêmica associada a infecções (DANIELE et al 2014).

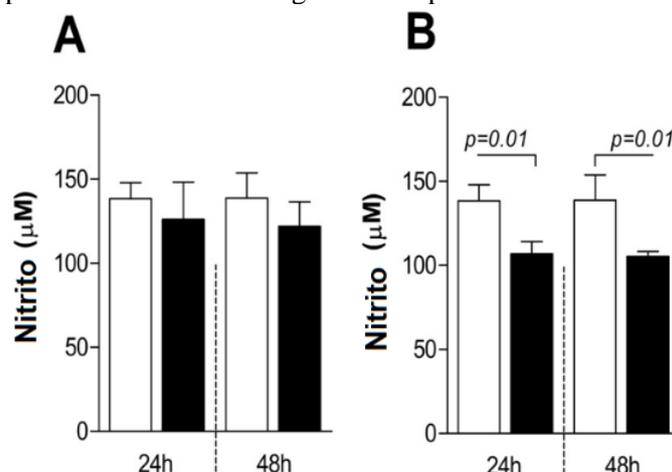
Em contrapartida, a IL-10 age como uma citocina anti-inflamatória e em baixas concentrações promove aumento da produção de TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-8 (GOTOH et al. 2017). Matsuhisa et al. (2018) avaliando o ácido lignosulfônico observada modulação na produção de citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-1 β e IL-6 Células Caco-2. Morganti et al. (2017), estudando o efeito imuno-modulatório da bio-lignina, obtiveram citocinas pró-

inflamatórias, incluindo TNF- α , IL-1 α e IL-8. Além disso, Sakagami et al. (2011), investigando a ação imunomodulatória promovida pelo complexo lignina-carboidrato nas células RAW264.7 e J774.1, também observaram aumento do TNF- α e diminuição de IL-1 β , IFN- α e IFN- γ . Reesi et al. (2011) publicaram resultados semelhantes avaliando nanofibras de lignina (Lig-NFs) na cicatrização de feridas *in vivo*. Lig-NFs foram capazes de promover o reparo de feridas em ratos Wistar por aumento da reepitelização, deposição de colágeno e angiogênese.

Dois estudos com ligninas reforçam os achados sobre a estimulação imunológica promovida pelas ligninas de *O. ficus-indica* e *O. cochenillifera*. O primeiro, publicado por Tsuji et al. (2017), avaliando uma preparação específica de lignina-carboidrato, mostrou que a macromolécula promove uma potente atividade imunoestimulante em ensaios celulares *in vitro*. O segundo estudo, conduzido por Morganti et al. (2017), indica que sua bio-lignina é usada para promover cicatrização de feridas *in vitro* e teve um comportamento imunomodulador.

O óxido nítrico (Figura 45) é um mediador químico que, em condições fisiológicas, tem sido relatado como uma molécula de sinalização vital e um mediador chave da transdução de sinal no sistema imunológico (KOVACEVIC et al. 2017). Entretanto, estímulos diferentes podem levar a um aumento do NO, que pode reagir com o O²⁻, formando peroxinitrito, uma molécula relativamente tóxica capaz de nitrosilar resíduos de tirosina, levando à formação de proteínas modificadas ou inibindo suas funções e promovendo danos ao DNA (GIRARD et al. 2016).

Figura 45- Efeito das ligninas da *O. ficus-indica* (A) e *O. cochenillifera* (B) na produção de óxido nítrico (NO) em esplenócitos de camundongos em um período de 24 e 48 horas.



Fonte: Autor, (2019).

Sendo assim, as ligninas de *Opuntia* promoveram uma diminuição nos níveis de NO e estes achados estão correlacionados com a baixa produção de citocina IFN- γ também observada em nossos ensaios. Por fim um estudo realizado por Niu et al. (2016), com ligninas obtidas de *Inonotus obliquus* por extração alcalina, mostraram que as frações IOAx apresentaram o potencial estimulatório da produção de NO e índice de fagocitose em macrófagos RAW 264.7 em resposta dose-dependente. No entanto, os autores não investigam outros mediadores imunológicos (como as citocinas), mas indicam que suas ligninas também foram capazes de ativar as células imunológicas.

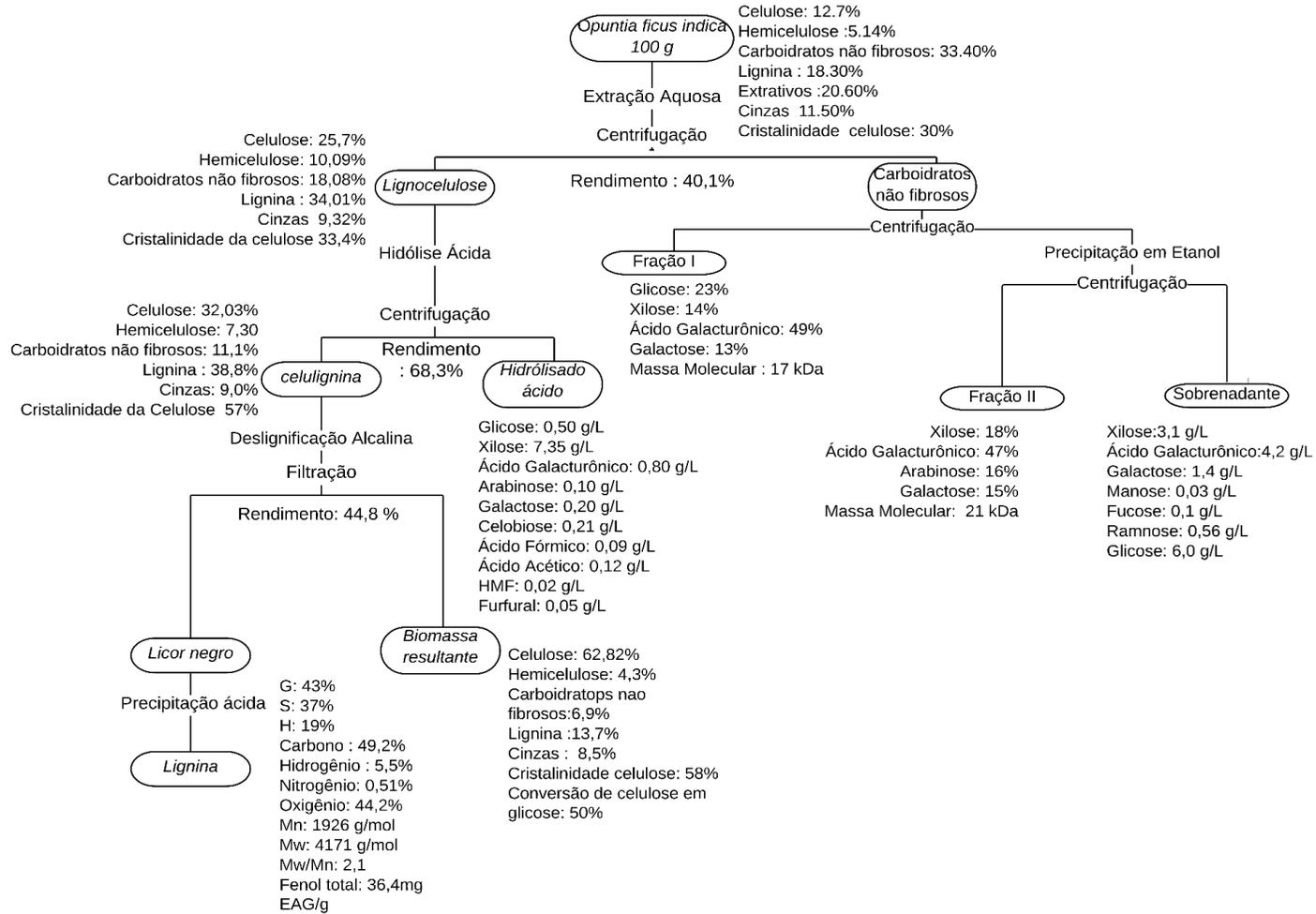
5.8 VISÃO GERAL DA BIORREFINARIA DE *OPUNTIA FICUS-INDICA* E *OPUNTIA COCHENILLIFERA* PROPOSTA NESTE TRABALHO

As Figuras 46 e 47 resumem os resultados da caracterização físico-química dos principais constituintes obtidos durante o fracionamento das biomassas. É notória a diferença estrutural e as aplicações destas palmas como matéria-prima estão diretamente relacionadas a estrutura química dos constituintes obtidos.

Este trabalho trouxe como inovação uma biorrefinaria de cactáceas, entretanto, estudar este tipo de biomassa ainda é um desafio, visto que, muitos dos seus constituintes apresentam alta complexidade estrutural, como é o caso da pectina e hemicelulose as quais apresentam em sua composição, carboidratos em comum, tais como: arabinose, xilose, galactose dentre outros. Esta similaridade dificulta a determinação da composição e do rendimento do fracionamento.

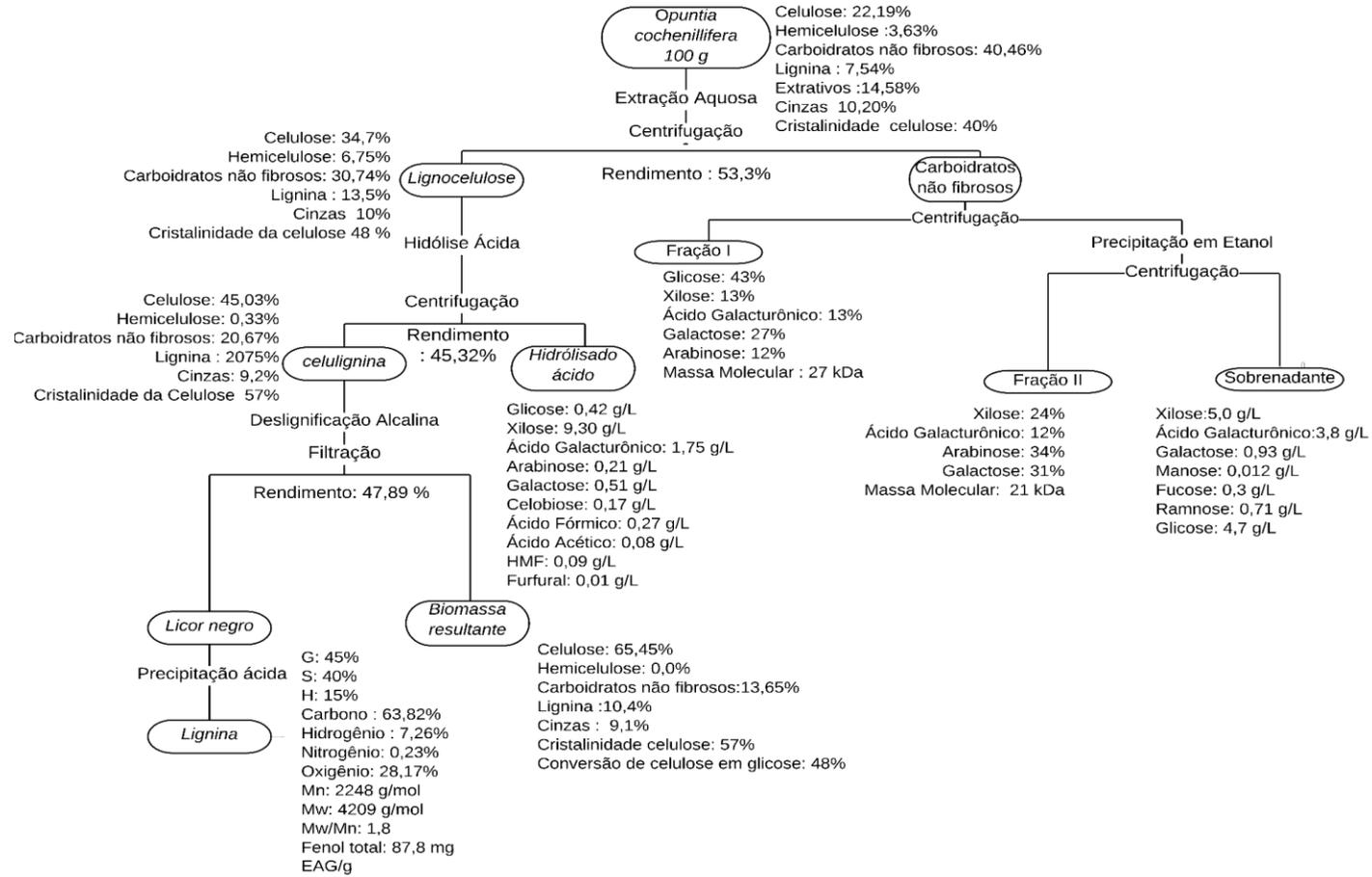
A lignina presente nestas palmas é estruturalmente complexa e de difícil caracterização, além disso, muito pouco se sabe sobre sua utilização. A celulose é a macromolécula que apresenta menor complexidade, esta após a separação do licor negro pode ser utilizada como substrato (após neutralização) para a produção de enzimas e células microbianas. Sendo assim, mais esforços para o estudo de biorrefinaria de cactáceas são necessários a fim de consolidar seus processos e produtos.

Figura 46- Fluxograma do fracionamento e caracterização dos constituintes da palma gigante (*O. ficus-indica*)



Fonte: Autor, (2019).

Figura 47- Fluxograma do fracionamento e caracterização dos constituintes da palma miúda (*O. cochenillifera*)



Fonte: Autor, (2019).

6 CONCLUSÃO

A análise da composição dos cladódios mostrou que *O. cochenillifera* apresenta maiores teores de polissacarídeos pécnicos, celulose e proteína quando comparados a *O. ficus-indica*, que por sua vez, apresentou maiores teores de lignina, hemicelulose e extrativos. Essas diferenças composicionais estão relacionadas principalmente a diferença de espécies, visto que foram obtidas com a mesma idade e na mesma região.

As condições experimentais utilizadas para o fracionamento juntamente com a caracterização físico-química apresentam eficiência de extração acima de 60% para os polissacarídeos pécnicos. Já o pré-tratamento ácido e a deslignificação alcalina removeram valores acima de 90% para hemicelulose e lignina. Esses resultados foram confirmados pelas análises físico-químicas as quais mostraram que durante o fracionamento ocorram mudanças superficiais e estruturais, sendo que a espécie *O. cochenillifera* apresentou maiores rendimentos de extração. Através do fracionamento foi possível obter maior exposição da celulose o que favoreceu a hidrólise enzimática obtendo-se taxas de conversão entorno de 50%, valor este compatível com o observado para a hidrólise da celulose de outras biomassas. Além disso, os hidrolisados enzimáticos foram bons substratos para a produção de etanol por *S. cerevisiae*.

As análises físico-químicas mostraram que as frações pécnicas obtidas apresentam diferenças estruturais. *O. ficus-indica* apresentou para as duas frações (solúvel e insolúvel) maiores teores de ácido galacturônico quando comparados a *O. cochenillifera*. Além disso, as frações insolúveis apresentaram glicose na sua composição. Todas as frações pécnicas deste estudo apresentaram baixo peso molecular e grau de esterificação, características estas que favorecem a geleificação. As frações solúveis foram utilizadas como substrato para crescimento de leveduras *S. cerevisiae*, além disso foram capazes de proteger as células contra variação de pH, bile e suco gástrico em ensaios *in vitro*.

Os hidrolisados ácidos (ricos em hemicelulose) são bons substratos para a produção de enzimas industriais (FPase, CMCase, xilanase, pectinase, poligalacturonase e β - glicosidase) por *A. awamori* sendo que a sua maior produção foi obtida no hidrolisado de *O. cochenillifera*.

As ligninas obtidas são do tipo GSH, estruturalmente semelhantes e de baixo peso molecular além disso são capazes de estimular células do sistema imunológico.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

- Realizar uma hidrólise enzimática das frações pécticas precipitadas em etanol, com pectinases fúngica comercial, para uma melhor caracterização química em termos de monossacarídeos.
- Realizar as análises dos açúcares presentes nas amostras dos cultivos de produção de enzimas, já realizados nas frações ácidas (hemicelulósica) e realizar outros cultivos necessários para uma modelagem cinética da produção de Xilanase por *A. awamori*.

8 REFERÊNCIAS

- AADIL, K. R.; BARAPATRE, A.; SAHU, S.; JHA, H.; TIWARY, B. N. Free radical scavenging activity and reducing power of *Acacia nilotica* wood lignin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 67, n. 6, p. 220-227, 2014.
- ABIDI, S.; BEN SALEM, H.; VASTA, V.; PRIOLO, A. Supplementation with barley or spineless cactus (*Opuntia ficus indica* f. *inermis*) cladodes on digestion, growth and intramuscular fatty acid composition in sheep and goats receiving oaten hay. **Small Ruminant Research**, v. 87, n. 1-3, p. 9-16, 2009.
- AGBLEVOR, F. A.; EVANS, R. J.; JOHNSON, K. D. Molecular-beam mass-spectrometric analysis of lignocellulosic materials: I. Herbaceous biomass. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 30, n. 2, p. 125-144, 1994.
- AGBOR, V. B.; CICEK, N.; SPARLING, R.; BERLIN, A.; LEVIN, D. B. Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 6, p. 675-685, 2011.
- AHMAD, A.; DAVIES, J.; RANDALL, S.; SKINNER, G. R. B. Antiviral properties of extract of *Opuntia streptacantha*. **Antiviral Research**, v. 30, n. 2-3, p. 75-85, 1996.
- AHMED, B.; ABOUDI, K.; TYAGI, V. K.; ÁLVAREZ-GALLEGO, C. J.; FERNÁNDEZ-GÜELFO, L. A.; ROMERO-GARCÍA, L. I.; KAZMI, A. A. Improvement of anaerobic digestion of lignocellulosic biomass by hydrothermal pretreatment. **Applied Sciences**, v. 9, n. 18, p. 3853-3870, 2019.
- AHUJA, D.; KAUSHIK, A.; CHAUHAN, G. S. Fractionation and physicochemical characterization of lignin from waste jute bags: effect of process parameters on yield and thermal degradation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 97, n. 4, p. 403-410, 2017.
- AJADI, T.; CUMING, V.; BOYLE, R.; STRAHAN, D.; KIMMEL, M.; LOGAN, M.; MCCRONE, A. **Global Trends in Renewable Energy Investment**, 2020.
- AKHTAR, N.; AANCHAL, GOYAL, D.; GOYAL, A. Biodiversity of cellulase producing bacteria and their applications. **Cellulose Chemistry and Technology**, v. 50, n. 9-10, p. 983-995, 2016.
- ALBA, K.; LAWS, A. P.; KONTOGIORGOS, V. Isolation and characterization of acetylated LM-pectins extracted from okra pods. **Food Hydrocolloids**, v. 43, n. 1, p. 726-735, 2015.
- ALBERSHEIM, P. Pectin lyase from fungi. **Methods in Enzymology**, p.628-631, 1966.

ALENCAR, B. R. A.; DUTRA, E. D.; SAMPAIO, E. V. D. S. B.; MENEZES, R. S. C.; MORAIS JR, M. A. Enzymatic hydrolysis of cactus pear varieties with high solids loading for bioethanol production. **Bioresource technology**, v. 250, n. 2, p. 273-280, 2018.

ALIMI, H.; HFAIEDH, N.; BOUONI, Z.; SAKLY, M.; RHOUMA, K. B. Antioxidant and antiulcerogenic activities of *Opuntia ficus indica* f. *inermis* root extract in rats. **Phytomedicine**, v. 17, n. 14, p. 1120-1126, 2010.

ALLEGRA, M.; IANARO, A.; TERSIGNI, M.; PANZA, E.; TESORIERE, L.; LIVREA, M.A. Indicaxanthin from cactus pear fruit exerts anti-inflammatory effects in carrageenin-induced rat pleurisy. **The Journal of Nutrition**, v. 144, n. 2, p. 185-192, 2013.

ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M. J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4851-4861, 2010.

ARIOLI, T.; PENG, L.; BETZNER, A. S.; BURN, J.; WITTKE, W.; HERTH, W.; CORK, A. Molecular analysis of cellulose biosynthesis in Arabidopsis. **Science**, v. 279, n. 5351, p. 717-720, 1998.

ARSLAN, N. Extraction of pectin from sugar-beet pulp and intrinsic viscosity–molecular weight relationship of pectin solutions. **Journal of Food Science and Technology**, v. 32, n. 5, p. 381–385, 1995.

AZIZUL, H. M., BARMAN, D. N., KANG, T. H., KIM, M. K., KIM, J. H., KIM, H., & YUN, H. D. Effect of dilute alkali on structural features and enzymatic hydrolysis of barley straw (*Hordeum vulgare*) at boiling temperature with low residence time. **Journal of Microbiology And Biotechnology**, v. 22, n. 12, p. 1681-1691, 2012.

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

BAKARI, S.; DAOUD, A.; FELHI, S.; SMAOUI, S.; GHARSALLAH, N.; KADRI, A. Proximate analysis, mineral composition, phytochemical contents, antioxidant and antimicrobial activities and GC-MS investigation of various solvent extracts of cactus cladode. **Food Science and Technology**, v. 37, n. 2, p. 286-293, 2017.

BALADHANDAYUTHAM, S.; THANGAVELU, V. Optimization and kinetics of solid-state fermentative production of pectinase by *Aspergillus awamori*. **International Journal of ChemTech Research**, v. 3, n. 4, p. 1758-1764, 2011.

- BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. **Energy Conversion and Management**, v. 52, n. 2, p. 858-875, 2011.
- BARAPATRE, A.; MEENA, A. S.; MEKALA, S.; DAS, A.; JHA, H. *In vitro* evaluation of antioxidant and cytotoxic activities of lignin fractions extracted from *Acacia nilotica*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 86, n. 5 p. 443-453, 2016.
- BAYAR, N.; FRIJI, M.; KAMMOUN, R. Optimization of enzymatic extraction of pectin from *Opuntia ficus-indica* cladodes after mucilage removal. **Food Chemistry**, v. 241, n. 2, p. 127-134, 2017.
- BAYAR, N.; KRIAA, M.; KAMMOUN, R. Extraction and characterization of three polysaccharides extracted from *Opuntia ficus-indica* cladodes. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, n. 11, p. 441-450, 2016.
- BEG, Q.; KAPOOR, M.; MAHAJAN, L.; HOONDAL, G. S. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, n. 3-4, p. 326-338, 2001.
- BERGEN, V. P. F.; POOLE, I.; OGILVIE, T. M.; CAPLE, C.; EVERSLED, R. P. Evidence for demethylation of syringyl moieties in archaeological wood using pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 14, n. 2, p. 71-79, 2000.
- BHARDWAJ, N.; KUMAR, B.; VERMA, P. A detailed overview of xylanases: an emerging biomolecule for current and future prospective. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 6, n. 1, p. 40, 2019.
- CAI, W.; GU, X.; TANG, J. Extraction, purification, and characterization of the polysaccharides from *Opuntia milpa* alta. **Carbohydrate Polymers**, v. 71, n. 3, p. 403-410, 2008.
- CANTERI, M. H. G.; MORENO, L.; WOSIACKI, G.; SCHEER, A. P. Pectina: da matéria-prima ao produto final. **Polímeros**, v. 22, n. 2, p. 149-157, 2012.
- CAPANEMA, E. A.; BALAKSHIN, M. Y.; KADLA, J. F. Quantitative characterization of a hardwood milled wood lignin by nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 25, p. 9639-9649, 2005.
- CÁRDENAS, A.; GOYCOOLEA, F. M.; RINAUDO, M. On the gelling behaviour of 'nopal' (*Opuntia ficus indica*) low methoxyl pectin. **Carbohydrate Polymers**, v. 73, n. 2, p. 212-222, 2008.

- CASTILLO, S.L.; HEREDIA, N.; CONTRERAS, J.F.; GARCÍA, S. Extracts of edible and medicinal plants in inhibition of growth, adherence, and cytotoxin production of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 6, p. M421-M426, 2011.
- CHAOUCH, M. A.; HAFSA, J.; RIHOUEY, C.; LE CERF, D.; MAJDOUB, H. Depolymerization of polysaccharides from *Opuntia ficus indica*: Antioxidant and antiglycated activities. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 79, n. 8, p. 779-786, 2015.
- CHEN, F.; TOBIMATSU, Y.; JACKSON, L.; NAKASHIMA, J.; RALPH, J.; DIXON, R. A. Novel seed coat lignins in the *C* actaceae: structure, distribution and implications for the evolution of lignin diversity. **The Plant Journal**, v. 73, n. 2, p. 201-211, 2013.
- CHEREMISINOFF, N. P. Designing EPDM products for extrusion applications. **Journal of Macromolecular Science - Chemistry**, v. 26, n. 8, p. 1231-1259, 1989.
- CHERUBINI, F. The biorefinery concept: using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. **Energy Conversion and Management**, v. 51, n. 7, p. 1412-1421, 2010.
- CHIACCHIO, F. P. B., MESQUITA, A. S., SANTOS, J. R. D. Palma forrageira: uma oportunidade econômica ainda desperdiçada para o semiárido baiano. **Bahia Agrícola**, v. 7, n. 3, p. 39-49, 2006.
- CHITEVA, R.; WAIRAGU, N. Chemical and nutritional content of *Opuntia ficus-indica* (L.). **African Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 21, p. 3309-3312, 2013.
- CHRISTIAENS, S.; VAN BUGGENHOUT, S.; HOUBEN, K.; FRAEYE, I.; VAN LOEY, A. M.; HENDRICKX, M. E. Towards a better understanding of the pectin structure–function relationship in broccoli during processing: Part I - macroscopic and molecular analyses. **Food Research International**, v. 44, n. 6, p. 1604-1612, 2011.
- CIESIELSKI, P. N.; WANG, W.; CHEN, X.; VINZANT, T. B.; TUCKER, M. P.; DECKER, S. R.; DONOHOE, B. S. Effect of mechanical disruption on the effectiveness of three reactors used for dilute acid pretreatment of corn stover Part 2: morphological and structural substrate analysis. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 1, p. 47-58, 2014.
- COLONETTI, V. C. Caracterização da mucilagem do fruto e cladódio de *Cereus hildmaniannus* k. schum. Dissertação de Mestrado. Florianópolis, SC: Universidade Federal de Santa Catarina, 2012.
- CONTRERAS-ESQUIVEL, J. C.; CORREA-ROBLES, C.; AGUILAR, C. N.; RODRIGUEZ, J.; ROMERO, J.; HOURS, R. A Pectinesterase extraction from Mexican lime (*Citrus aurantifolia* Swingle) and prickly pear (*Opuntia ficus indica* L.) peels. **Food Chemistry**, v. 65, n. 2, p. 153-156, 1999.

- CORDEIRO, N.; OLIVEIRA, L.; FARIA, H. ; BELGACEM, M. N.; MOURA, J. C. V. P. Surface modification of banana-based lignocellulose fibres. **Contact Angle, Wettability and Adhesion**, v. 4, p. 1-19, 2006.
- COSTA, C. A. E.; COLEMAN, W.; DUBE, M.; RODRIGUES, A. E.; PINTO, P. C. R. Assessment of key features of lignin from lignocellulosic crops: Stalks and roots of corn, cotton, sugarcane, and tobacco. **Industrial Crops and Products**, v. 92, n. 12, p. 136-148, 2016.
- COSTA, C. A. E.; PINTO, P. C. R.; RODRIGUES, A. E. Radar tool for lignin classification on the perspective of its valorization. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 54, n. 31, p. 7580-7590, 2015.
- COURTS, F. L. Profiling of modified citrus pectin oligosaccharide transport across Caco-2 cell monolayers. **Pharma Nutrition**, v. 1, n. 1, p. 22-31, 2013.
- CRUZ FILHO, I. J. Separação dos principais componentes do cavaco de eucalipto, hidrólise enzimática da celulose e caracterização das frações obtidas. **Dissertação de Mestrado**. Recife, PE: Universidade Federal de Pernambuco, 2016.
- DANIELE, G., GUARDADO, M. R; WINNIER, D.; FIORENTINO, T.V; PENGOU, Z.; CORNELL, J.; ANDREOZZI, F.; JENKINSON, C.; CERSOSIMO, E.; FEDERICI, M.; TRIPATHY, D.; FOLLI, F. The inflammatory status score including IL-6, TNF- α , osteopontin, fractalkine, MCP-1 and adiponectin underlies whole-body insulin resistance and hyperglycemia in type 2 diabetes mellitus. **Acta Diabetologica**, v. 51, n. 1, p. 123-131, 2014.
- DEGASPERI, G. R.; VELHO, J. A.; ZECCHIN, K. G.; SOUZA, C. T.; VELLOSO, L. A.; BORECKÝ, J., CASTILHO, R. F; VERCESI, A. E. Role of mitochondria in the immune response to cancer: a central role for Ca²⁺. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 38, n. 1, p. 1-10, 2006.
- DING, A. H.; NATHAN, C. F.; STUEHR, D. J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. **The Journal of Immunology**, v. 141, n. 7, p. 2407-2412, 1988.
- DING, R.; WU, H.; THUNGA, M.; BOWLER, N.; KESSLER, M. R. Processing and characterization of low-cost electrospun carbon fibers from organosolv lignin/polyacrylonitrile blends. **Carbon**, v. 100, n. 4, p. 126-136, 2016.
- DIOSMA, G.; ROMANIN, D. E.; REY-BURUSCO, M. F.; LONDERO, A.; GARROTE, G. L. Yeasts from kefir grains: isolation, identification, and probiotic characterization. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 1, p. 43-53, 2014.

- DOMÍNGUEZ-ROBLES, J.; SÁNCHEZ, R.; DÍAZ-CARRASCO, P.; ESPINOSA, E.; GARCÍA-DOMÍNGUEZ, M. T.; RODRÍGUEZ, A. Isolation and characterization of lignins from wheat straw: Application as binder in lithium batteries. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 104, n. 11, p. 909-918, 2017.
- DONALDSON, L. A.; LAUSBERG, M. J. F. Comparison of conventional transmitted light and confocal microscopy for measuring wood cell dimensions by image analysis. **Iawa Journal**, v. 19, n. 3, p. 321-336, 1998.
- EL-MOSTAFA, K.; EL KHARRASSI, Y.; BADREDDINE, A.; ANDREOLETTI, P.; VAMECQ, J.; EL KEBBAJ, M. H.; CHERKAOUI-MALKI, M. Nopal cactus (*Opuntia ficus-indica*) as a source of bioactive compounds for nutrition, health and disease. **Molecules**, v. 19, n. 9, p. 14879-14901, 2014.
- ESPINOZA-ACOSTA, J. L.; TORRES-CHÁVEZ, P. I.; RAMÍREZ-WONG, B.; LÓPEZ-SAIZ, C. M.; MONTAÑO-LEYVA, B. Antioxidant, antimicrobial, and antimutagenic properties of technical lignins and their applications. **BioResources**, v. 11, n. 2, p. 5452-5481, 2016.
- FENGEL, D.; WEGENER. Wood, chemistry, ultrastructure, reactions. New York: **Waster de Gruyter**, p. 613, 1984.
- FEUGANG, J.M.; KONARSKI, P.; ZOU, D.; STINTZING, F.C.; ZOU, C. Nutritional and medicinal use of Cactus pear (*Opuntia* spp.) cladodes and fruits. **Front Biosci**, v. 11, n. 1, p. 2574-2589, 2006.
- FIGUEIREDO, P.; FERRO, C.; KEMELL, M.; LIU, Z.; KIRIAZIS, A.; LINTINEN, K.; SANTOS, H. A. Functionalization of carboxylated lignin nanoparticles for targeted and pH-responsive delivery of anticancer drugs. **Nanomedicine**, v. 12, n. 21, p. 2581-2596, 2017.
- FINANCIE, R.; MONIRUZZAMAN, M.; UEMURA, Y. Enhanced enzymatic delignification of oil palm biomass with ionic liquid pretreatment. **Biochemical Engineering Journal**, v. 110, p. 1-7, 2016.
- FISSORE, E. N.; ROJAS, A. M.; GERSCHENSON, L. N.; WILLIAMS, P. A. Butternut and beetroot pectins: Characterization and functional properties. **Food Hydrocolloids**, v. 31, n. 2, p. 172-182, 2013.
- FORTES, G.B; ALVES, L.S.; OLIVEIRA, R.; DUTRA, F.F.; RODRIGUES, D.; FERNANDEZ, P.L.; SOUTO-PADRON, T.; ROSA, M.J.; KELLIHER, M.; GOLENBOCK, D.; CHAN, F.K.; BOZZA, M.T. Heme induces programmed necrosis on macrophages through autocrine TNF and ROS production. **Blood**, v. 119, n. 10, p. 2368-2375, 2012.

- GÁMEZ, S.; GONZÁLEZ-CABRIALES, J. J.; RAMÍREZ, J. A.; GARROTE, G.; VÁZQUEZ, M. Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid. **Journal of Food Engineering**, v. 74, n. 1, p. 78-88, 2006.
- GARCÍA, A.; TOLEDANO, A.; SERRANO, L.; EGÜÉS, I.; GONZÁLEZ, M.; MARÍN, F.; LABIDI, J. Characterization of lignins obtained by selective precipitation. **Sep. Purif. Technol.**, v. 68, n. 2, p. 193-198, 2009.
- GARG, G.; SINGH, A.; KAUR, A.; SINGH, R.; KAUR, J.; MAHAJAN, R. Microbial pectinases: an ecofriendly tool of nature for industries. **3 Biotech**, v. 6, n. 1, p. 47, 2016.
- GEDDES, C. C.; NIEVES, I. U.; INGRAM, L. O. Advances in ethanol production. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, n. 3, p. 312-319, 2011.
- GEDDES, C. C.; PETERSON, J. J.; ROSLANDER, C.; ZACCHI, G.; MULLINNIX, M. T.; SHANMUGAM, K. T.; INGRAM, L. O. Optimizing the saccharification of sugar cane bagasse using dilute phosphoric acid followed by fungal cellulases. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 6, p. 1851-1857, 2010.
- GIRARD, P. M.; ARBABIAN, A.; FLEURY, M.; BAUVILLE, G.; PUECH, V.; DUTREIX, M.; SOUSA, J. S. Synergistic effect of H₂O₂ and NO₂ in cell death induced by cold atmospheric He plasma. **Scientific reports**, v. 6, n. 6, p. 29098, 2016.
- GONÇALVES, A. R.; SCHUCHARDT, U.; BIANCHI, M. L.; CURVELO, A. A. Piassava fibers (*Attalea funifera*): NMR spectroscopy of their lignin. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 11, n. 5, p. 491-494, 2000.
- GONÇALVES, F. A.; RUIZ, H. A.; COSTA NOGUEIRA, C.; SANTOS, E. S.; TEIXEIRA, J. A.; MACEDO, G. R. Comparison of delignified coconuts waste and cactus for fuel-ethanol production by the simultaneous and semi-simultaneous saccharification and fermentation strategies. **Fuel**, v. 131, n. 9, p. 66-76, 2014.
- GONZÁLEZ-VILA, F. J.; TINOCO, P.; ALMENDROS, G.; MARTIN, F. Pyrolysis–GC–MS analysis of the formation and degradation stages of charred residues from lignocellulosic biomass. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 3, p. 1128-1131, 2001.
- GOPALAKRISHNAN, A. M.; KUMAR, N. Antimalarial action of artesunate involves DNA damage mediated by reactive oxygen species. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 59, n. 1, p. 317-325, 2015.
- GOTOH, K.; FUJIWARA, K.; ANAI, M.; OKAMOTO, M.; MASAKI, T.; KAKUMA, T.; SHIBATA, H. Role of spleen-derived IL-10 in prevention of systemic low-grade inflammation by obesity. **Endocrine Journal**, v.64, n. 4, p. 375-378, 2017.

GOUVEIA, E. R.; NASCIMENTO, R. T.; SOUTO-MAIOR, A. M.; ROCHA, G. J. M. Validação de Metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1500-1503, 2009.

GOYCOOLEA, F. M.; CÁRDENAS, A. Pectins from *Opuntia* spp.: A short review. **Journal of the Professional Association for Cactus Development**, v. 5, n. 1, p. 17-29, 2003.

GRIFFITHS, H.; MALES, J. Succulent plants. **Current Biology**, v. 27, n. 17, p. R890-R896, 2017.

GUERRIERO, G; BERNI, R; MUÑOZ-SANCHEZ, J.A; APONE, F.; ABDEL-SALAM, E.M.; QAHTAN, A.A; ALATAR, A.A.; CANTINI, C.; CAI, G.; HAUSMAN, J.F.; SIDDIQUI, K.S.; HERNÁNDEZ-SOTOMAYOR, S.M.T; FAISAL, M. Production of plant secondary metabolites: Examples, tips and suggestions for biotechnologists. **Genes**, v. 9, n. 6, p. 309, 2018.

GUEVARA-ARAUZA, J. C.; DE JESÚS ORNELAS-PAZ, J.; PIMENTEL-GONZÁLEZ, D. J.; MENDOZA, S. R.; GUERRA, R. E. S.; MALDONADO, L. M. T. P. Prebiotic effect of mucilage and pectic-derived oligosaccharides from nopal (*Opuntia ficus-indica*). **Food Science and Biotechnology**, v. 21, n. 4, p. 997-1003, 2012.

GUO, F.; SHI, W.; SUN, W.; LI, X.; WANG, F.; ZHAO, J.; QU, Y. Differences in the adsorption of enzymes onto lignins from diverse types of lignocellulosic biomass and the underlying mechanism. **Biotechnology for biofuels**, v. 7, n. 1, p. 38-48, 2014.

HABIBI, Y.; HEUX, L.; MAHROUZ, M.; VIGNON, M. R. Morphological and structural study of seed pericarp of *Opuntia ficus-indica* prickly pear fruits. **Carbohydrate Polymers**, v. 72, n. 1, p. 102-112, 2008.

HABIBI, Y.; MAHROUZ, M.; VIGNON, M. R. Isolation and structural characterization of protopectin from the skin of *Opuntia ficus-indica* prickly pear fruits. **Carbohydrate Polymers**, v. 60, n. 2, p. 205-213, 2005.

HABIBI, Y.; MAHROUZ, M.; VIGNON, M. R. Isolation and Structure Characterization of a (4-O-Methyl-d-glucurono)-d-xylan from the Skin of *Opuntia ficus-indica* Prickly Pear Fruits. **Journal of Carbohydrate Chemistry**, v. 22, n. 5, p. 331-337, 2003.

HABIBI, Y.; MAHROUZ, M.; VIGNON, M. R. Isolation and structure of D-xylans from pericarp seeds of *Opuntia ficus-indica* prickly pear fruits. **Carbohydrate Research**, v. 337, n. 17, p. 1593-1598, 2002.

HAMES, B.; SCARLATA, C.; SLUITER, A. Determination of protein content in biomass. **National Renewable Energy Laboratory**, p. 1-5, 2008.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycologia**, v. 67, n. 3, p. 597-607, 1975.

HARRIS, A. D.; RAMALINGAM, C. Xylanases and its application in food industry: a review. **Journal of Experimental Sciences**, v. 1, n. 7, p. 1-11, 2010.

HENDRIKS, A. T. W. M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Biouresource Technology**, v. 100, n. 1, p. 10-18, 2009.

HOSSEINI, S. S.; KHODAIYAN, F.; KAZEMI, M.; NAJARI, Z. Optimization and characterization of pectin extracted from sour orange peel by ultrasound assisted method. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 125, n. 3, p. 621-629, 2019.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, plantação de forrageiras no Brasil, <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/pesquisa/24/0_Censo_Agropecuario>. Acesso 1º jul. 2010.

IYAMA, K.; LAM, T. B. T. The reactivities of lignin units during alkaline nitrobenzene oxidation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 51, n. 4, p. 481-491, 1990.

IMRAN, M.; BANO, S.; NAZIR, S.; JAVID, A.; ASAD, M. J.; YASEEN, A. Cellulases production and application of cellulases and accessory enzymes in pulp and paper industry: a review. **PSM Biological Research**, v. 4, n. 1, p. 29-39, 2019.

JANA, S. Nutraceutical and functional properties of cactus pear (*Opuntia* spp.) and its utilization for food applications. **Journal of Engineering Research and Studies**, v. 3, n. 2, p. 60-66, 2012.

JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: A review. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 9, p. 2931-2944, 2005.

JEN, J. J.; ROBINSON, M. L. Pectolytic Enzymes in Sweet Bell Peppers (*Capsicum annuum* L.). **Journal of Food Science**, v. 49, n. 4, p. 1085-1087, 1984.

JIANG, B.; ZHANG, Y.; GU, L.; WU, W.; ZHAO, H.; JIN, Y. Structural elucidation and antioxidant activity of lignin isolated from rice straw and alkali-oxygen black liquor. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 116, n. 9, p. 513-519, 2018.

JOLIE, R. P.; CHRISTIAENS, S.; DE ROECK, A.; FRAEYE, I.; HOUBEN, K.; VAN BUGGENHOUT, S.; VAN LOEY, A. M.; HENDRICKX, M. E. Pectin conversions under high pressure: Implications for the structure-related quality characteristics of plant-based foods. **Trends in Food Science and Technology**, v. 24, n. 2, p. 103-118, 2012.

JUNIOR, L.C.D.S.F; MIRANDA, C.S; JOSE, N.M. Prospecção tecnológica sobre as composições de derivados de celulose e celulose na área medicina. **Cadernos de Prospecção**, v.6, n.2, p.181, 2014.

KALEGOWDA, P.; SINGH, C. A.; MYSORE, N. S. Opuntia dillenii (Ker-gawl) haw fruit peel pectin: Physicochemical, rheological, and functional behavior. **Journal Of Food Processing and Preservation**, v. 41, n. 5, p. e13165, 2017.

KANAUJIA, P. K.; SHARMA, Y. K.; GARG, M. O.; TRIPATHI, D.; SINGH, R. Review of analytical strategies in the production and upgrading of bio-oils derived from lignocellulosic biomass. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 105, n.1, p. 55-74, 2014.

KARIMI, K.; TAHERZADEH, M. J. A critical review of analytical methods in pretreatment of lignocelluloses: composition, imaging, and crystallinity. **Bioresource technology**, v. 200, n. 1, p. 1008-1018, 2016.

KÄRKÄS, M. D.; MATSUURA, B. S.; MONOS, T. M.; MAGALLANES, G.; STEPHENSON, C. R. Transition-metal catalyzed valorization of lignin: the key to a sustainable carbon-neutral future. **Organic & biomolecular chemistry**, v. 14, n. 6, p. 1853-1914, 2016.

KARP, E. M.; DONOHOE, B. S.; O'BRIEN, M. H.; CIESIELSKI, P. N.; MITTAL, A.; BIDDY, M. J.; BECKHAM, G. T. Alkaline pretreatment of corn stover: bench-scale fractionation and stream characterization. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 2, n. 6, p. 1481-1491, 2014.

KIM, J.-H.; PARK, S.-M.; HA, H.-J.; MOON, C.-J.; SHIN, T.-K.; KIM, J.-M.; LEE, N.-H.; KIM, H.-C.; JANG, K.-J.; WIE, M.-B. Opuntia ficus-indica attenuates neuronal injury in in vitro and in vivo models of cerebral ischemia. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 104, n. 1-2, p. 257-262, 2006.

KIMURA, S.; LAOSINCHAI, W.; ITOH, T.; CUI, X.; LINDER, C. R.; BROWN, R. M. Immunogold labeling of rosette terminal cellulose-synthesizing complexes in the vascular plant *Vigna angularis*. **The Plant Cell**, v. 11, n. 11, p. 2075-2085, 1999.

KIRIKYALI, N.; CONNERTON, I. F. Xylan degrading enzymes from fungal sources. **Journal of Proteomics & Enzymology**, v. 4, n. 1, p. 118, 2015.

- KOBAKHIDZE, A.; ASATIANI, M.; KACHLISHVILI, E.; ELISASHVILI, V. Induction and catabolite repression of cellulase and xylanase synthesis in the selected white-rot basidiomycetes. **Annals of Agrarian Science**, v. 14, n. 3, p. 169-176, 2016.
- KOBAYASHI, H.; FUKUOKA, A. Synthesis and utilization of sugar compounds derived from lignocellulosic biomass. **Green Chemistry**, v.15, n. 7, p. 1740-1763, 2013.
- KORMELINK, F. J. M.; SEARLE- VAN LEEUWEN, M. J. F.; Wood, T. M.; Voragen, A. G. J. Purification and characterization of three endo (1,2)-beta-xylanases and beta-xylosidase from *Aspergillus awamori*. **Journak of Biotechnonology**, v.27, n.3, p.249-65, 1993.
- KOVACEVIC, Z.; SAHNI, S.; LOK, H.; DAVIES, M. J.; WINK, D. A.; RICHARDSON, D. R. Regulation and control of nitric oxide (NO) in macrophages: Protecting the “professional killer cell” from its own cytotoxic arsenal via MRP1 and GSTP1. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1861, n. 5, p. 995-999, 2017.
- KOWALCZYK, J. E.; LUBBERS, R. J.; PENG, M.; BATTAGLIA, E.; VISSER, J.; DE VRIES, R. P. Combinatorial control of gene expression in *Aspergillus niger* grown on sugar beet pectin. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1-12, 2017.
- KRUSE, S.; HERRMANN, A.; KORNER, A.; TAUBE, F. Evaluation of genotype and environmental variation in fibre content of silage maize using a model-assisted approach. **European Journal of Agronomy**, v. 28, n. 3, p. 210-223, 2008.
- KUCHARSKA, K.; RYBARCZYK, P.; HOŁOWACZ, I.; ŁUKAJTIS, R.; GLINKA, M.; KAMIŃSKI, M. Pretreatment of lignocellulosic materials as substrates for fermentation processes. **Molecules**, v. 23, n. 11, p. 2937, 2018.
- KULOYO, O. O.; DU PREEZ, J. C.; GARCÍA-APARICIO, P. M., KILIAN, S. G.; STEYN, L.; GÖRGENS, J. *Opuntia ficus-indica* cladodes as feedstock for ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 12, p. 3173-3183, 2014.
- KUMAR, D.; KUMAR, S. S.; KUMAR, J.; KUMAR, O.; MISHRA, S. V.; MALYAN, S.; KUMAR, R. Xylanases and their industrial applications: a review. **Biochem. Cell. Arch**, v. 17, n. 1, pág. 353-360, 2017.
- LARSEN, Nadja et al. The effect of pectins on survival of probiotic *Lactobacillus* spp. in gastrointestinal juices is related to their structure and physical properties. **Food microbiology**, v. 74, p. 11-20, 2018.

- LEE, J. C.; KIM, H. R., KIM, J.; JANG, Y. S. Antioxidant property of an ethanol extract of the stem of *Opuntia ficus-indica* var. saboten. **Journal of Agricultural And Food Chemistry**, v. 50, n. 22, p. 6490-6496, 2002.
- LEFSIH, K.; GIACOMAZZA, D.; DAHMOUNE, F.; MANGIONE, M. R.; BULONE, D.; SAN BIAGIO, P. L.; PASSANTINO, R.; COSTA, M. A.; GUARRASI, V.; MADANI, K. Pectin from *Opuntia ficus indica*: Optimization of microwave-assisted extraction and preliminary characterization, **Food Chemistry**, v. 221, n.4, p. 91-99, 2017.
- LEFSIH, K.; GIACOMAZZA, D.; PASSANTINO, R.; COSTA, M. A.; BULONE, D.; MANGIONE, M. R.; MADANI, K. Biochemical and biophysical characterization of water-soluble pectin from *Opuntia ficus-indica* and its potential cytotoxic activity. **Phytochemistry**, v. 154, p. 47-55, 2018.
- LOIX, C.; HUYBRECHTS, M.; VANGRONSVELD, J.; GIELEN, M.; KEUNEN, E.; CUYPERS, A. Reciprocal interactions between cadmium-induced cell wall responses and oxidative stress in plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, n.10, p. 1867, 2017.
- LOPES, F. J. F.; SILVÉRIO, F. O.; BAFFA, D. C. F.; LOUREIRO, M. E.; BARBOSA, M. H. P. Determination of sugarcane bagasse lignin S/G/H ratio by pyrolysis GC/MS. **Journal of Wood Chemistry and Technology**, v. 31, n. 4, p. 309-323, 2011.
- LULDEKING, R. Fermentation process kinetics. In: BLAKEBROUGH, N. (Ed.). **Biochemical and Biological Engineering Science Vol. 1**. London: Academic Press Inc. 1967. p. 181-243.
- LUPOI, J. S.; SINGH, S.; PARTHASARATHI, R., SIMMONS, B. A.; HENRY, R. J. Recent innovations in analytical methods for the qualitative and quantitative assessment of lignin. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 49, n.9, p. 871-906, 2015.
- MALAININE, M. E.; DUFRESNE, A.; DUPEYRE, D.; MAHROUZ, M.; VUONG, R.; VIGNON, M. R. Structure and morphology of cladodes and spines of *Opuntia ficus indica*. Cellulose extraction and characterisation. **Carbohydrate Polymers**, v. 51, n. 1, p. 77-83, 2003.
- MALDONADO, M. C.; SAAD, A. M. S. Production of pectinesterase and polygalacturonase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state systems. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 34-38, 1998.
- MANDAL, A.; CHAKRABARTY, D. Isolation of nanocellulose from waste sugarcane bagasse (SCB) and its characterization. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 3, p. 1291-1299, 2011.
- MANNAI, F.; AMMAR, M.; YANEZ, J. G.; ELALOUI, E.; MOUSSAOUI. Cellulose fiber from Tunisian Barbary Fig “*Opuntia ficus-indica* ” for papermaking. **Cellulose**, v. 23, n. 3, p. 2061-2072, 2016.

- MARQUES, O. F. C.; GOMES, L.; MOURTHÉ, M., BRAZ, T.; PIRES NETO, O. D. S. Palma forrageira: cultivo e utilização na alimentação de bovinos. **Cadernos de Ciências Agrárias**, v. 9, n. 1, p. 75-93, 2017.
- MARRIOTT, P. E.; GÓMEZ, L. D.; MCQUEEN-MASON, S. J. Unlocking the potential of lignocellulosic biomass through plant science. **New Phytologist**, v. 209, n. 4, p. 1366-1381, 2016.
- MARTINEZ-BALMORI, D.; OLIVARES, F. L.; SPACCINI, R.; AGUIAR, K. P.; ARAÚJO, M. F.; AGUIAR, N. O.; CANELLAS, L. P. Molecular characteristics of vermicompost and their relationship to preservation of inoculated nitrogen-fixing bacteria. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 104, n. 12, p. 540-550, 2013.
- MARTINEZ-BALMORI, D.; SPACCINI, R.; AGUIAR, N. O.; NOVOTNY, E. H.; OLIVARES, F. L.; CANELLAS, L. P. Molecular characteristics of humic acids isolated from vermicomposts and their relationship to bioactivity. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 62, n. 47, p. 11412-11419, 2014.
- MATSUHISA, K.; WATARI, A.; IWAMOTO, K.; KONDOH, M.; YAGI, K. Lignosulfonic acid attenuates NF- κ B activation and intestinal epithelial barrier dysfunction induced by TNF- α /IFN- γ in Caco-2 cells. **Journal of natural medicines**, v. 72, n. 2, p. 448-455, 2018.
- MATTHÄUS, B.; ÖZCAN, M. M. Habitat effects on yield, fatty acid composition and tocopherol contents of prickly pear (*Opuntia ficus-indica* L.) seed oils. **Scientia Horticulturae**, v. 131, n. 11, p. 95-98, 2011.
- MCITEKA, H. Fermentation characteristics and nutritional value of *Opuntia ficus-indica* var. *Fuscicaulis* cladode silage. **Tese de Doutorado**. Blumefontaina, Africa do sul University of the Free State, 2008.
- MELLO, N. R. T. D. D. Utilização da palma forrageira na produção de enzimas microbianas industriais, **Dissertação de Mestrado**. Recife, PE: Universidade Federal de Pernambuco, 2015.
- MELO, C. M. L.; CASTRO, M. C. A. B.; OLIVEIRA, A. P.; GOMES, F. O. S.; PEREIRA, V. R. A., CORREIA, M. T. S.; PAIVA, P. M. G. Immunomodulatory response of Cramoll 1, 4 lectin on experimental lymphocytes. **Phytotherapy research**, v. 24, n. 11, p. 1631-1636, 2010.
- MELO, C. M. L.; MELO, H.; CORREIA, M. T.; COELHO, L. C. B. B.; SILVA, M. B.; PEREIRA, V. R. A. Mitogenic response and cytokine production induced by Cramoll 1, 4 lectin in splenocytes of inoculated mice. **Scandinavian journal of immunology**, v. 73, n. 2, p. 112-121, 2011.

MELO, C. M. L.; PAIM, B. A.; ZECCHIN, K. G.; MORARI, J.; CHIARATTI, M. R.; CORREIA, M. T. S.; PAIVA, P. M. G. Cramoll 1, 4 lectin increases ROS production, calcium levels, and cytokine expression in treated spleen cells of rats. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 342, n. 1, p. 163-169, 2010.

MENEZES, F. F.; RENCORET, J.; NAKANISHI, S. C.; NASCIMENTO, V. M.; SILVA, V. F. N.; GUTIÉRREZ, A.; MORAES ROCHA, G. J. Alkaline pretreatment severity leads to different lignin applications in sugar cane biorefineries. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 5, n. 7, p. 5702-5712, 2017.

MONFREGOLA, L.; BUGATTI, V.; AMODEO, P.; LUCA, E.; VITTORIA, V. Physical and water sorption properties of chemically modified pectin with an environmentally friendly process. **Biomacromolecules**, v. 12, n. 6, p. 2311-2318, 2011.

MONSOOR, M. A.; KALAPATHY U.; PROCTOR, A. Improved Method for Determination of Pectin Degree of Esterification by Diffuse Reflectance Fourier Transform Infrared Spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 6, p. 2756-2760, 2001.

MONTEIL-RIVERA, F.; PHUONG, M.; YE, M.; HALASZ, A.; HAWARI, J. Isolation and characterization of herbaceous lignins for applications in biomaterials. **Industrial Crops and Products**, v. 41, n. 1, p. 356-364, 2013.

MOON, J.; LIU, Z.L. Engineered NADH-dependent GRE2 from *Saccharomyces cerevisiae* by directed enzyme evolution enhances HMF reduction using additional cofactor NADPH. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 50, n. 2, p. 115-120, 2012.

MORGANTI, P.; FUSCO, A.; PAOLETTI, I.; PERFETTO, B.; DEL CIOTTO, P.; PALOMBO, M.; DONNARUMMA, G. Anti-inflammatory, immunomodulatory, and tissue repair activity on human keratinocytes by green innovative nanocomposites. **Materials**, v. 10, n. 7, p. 843, 2017.

MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y. Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Biouresource Technology**, v. 96, n. 6, p. 673-686, 2005.

MRUDULA, S.; MURUGAMMAL, R. Production of cellulase by *Aspergillus niger* under submerged and solid state fermentation using coir waste as a substrate. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 1119-1127, 2011.

MZOUGH, Z.; ABDELHAMID, A.; RIHOUEY, C.; LE CERF, D.; BOURAOUI, A.; MAJDOUB, H. Optimized extraction of pectin-like polysaccharide from *Suaeda fruticosa*

leaves: Characterization, antioxidant, anti-inflammatory and analgesic activities. **Carbohydrate polymers**, v. 185, n. 4, p. 127-137, 2018.

NAIR, R. B.; LUNDIN, M.; LENNARTSSON, P. R.; TAHERZADEH, M. J. Optimizing dilute phosphoric acid pretreatment of wheat straw in the laboratory and in a demonstration plant for ethanol and edible fungal biomass production using *Neurospora intermedia*. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 92, n. 6, p. 1256-1265, 2017.

NASCIMENTO F. W. B.; MELO F. A. A. Estudo Reológico da Pectina Extraída da Casca de Maracujás. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 3, p. 838-855, 2016.

NASCIMENTO S. T.; DUTRA, E. D.; PRADO, A. G.; LEITE, F. C. B.; SOUZA, R. D. F. R.; SANTOS, D. C.; MENEZES, R. S. C. Potential for biofuels from the biomass of prickly pear cladodes: Challenges for bioethanol and biogas production in dry areas. **Biomass and Bioenergy**, v. 85, n. 2, p. 215222, 2016.

NASEEM, A.; TABASUM, S.; ZIA, K. M.; ZUBER, M.; ALI, M.; NOREEN, A. Lignin-derivatives based polymers, blends and composites: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 93, n. 12, p. 296-313, 2016.

NASH, M. C.; DIAZ-PULIDO, G.; HARVEY, A. S.; ADEY, W. Coralline algal calcification: A morphological and process-based understanding. **PloS one**, v. 14, n. 9, p. e0221396, 2019.

NITURE, Suryakant. Comparative biochemical and structural characterizations of fungal polygalacturonases. **Biologia**, v. 63, n. 1, p. 1-19, 2008.

NIU, H.; SONG, D.; MU, H.; ZHANG, W.; SUN, F.; DUAN, J. Investigation of three lignin complexes with antioxidant and immunological capacities from *Inonotus obliquus*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 86, n. 5, p. 587-593, 2016.

NUNES, C. D. S. Usos e aplicações da palma forrageira como uma grande fonte de economia para o semiárido nordestino. **Revista Verde**, v. 6, n. 1, p. 58-66, 2011.

OGBURN, R. M.; EDWARDS, E. J. THE ecological water-use strategies of succulent plants. **Advances in botanical research**, v. 55, p. 179-225, 2010.

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise enzimática de biomassa. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1549-1558, 2010.

ÖHGREN, K.; BURA, R.; SADDLER, J.; ZACCHI, G. Effect of hemicellulose and lignin removal on enzymatic hydrolysis of steam pretreated corn stover. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 13, p. 2503-2510, 2007.

OLANO-MARTIN, E.; GIBSON, G. R.; RASTALL, R. A. Comparison of the in vitro bifidogenic properties of pectins and pectic-oligosaccharides. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, n. 3, p. 505-511, 2002.

ONDREY, G. The path to biorefineries. **Chemical Engineering**, v. 113 n.4, 2006.

PALMA, M. L.; ZAMITH-MIRANDA, D.; MARTINS, F. S.; BOZZA, F. A.; NIMRICHTER, L.; MONTERO-LOMELI, M.; DOURADINHA, B. Probiotic *Saccharomyces cerevisiae* strains as biotherapeutic tools: is there room for improvement?. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 16, p. 6563-6570, 2015.

PANG, Y.; LI, X.; ZHOU, M.; LI, Y.; GAO, W.; QIU, X. Relationship between the hydrophilicity of lignin dispersants and their performance towards pesticide particles. **Holzforschung**, v. 70, n. 7, p. 653-660, 2016.

PARADA, M. P.; OSSEWEIJER, P.; DUQUE, J. A. P. Sustainable biorefineries, an analysis of practices for incorporating sustainability in biorefinery design. **Industrial Crops and Products**, v. 106, n. 12, p. 105-123, 2017.

PARAJULI, R.; DALGAARD, T.; JØRGENSEN, U.; ADAMSEN, A. P. S.; KNUDSEN, M. T.; BIRKVED, M.; SCHJØRRING, J. K. Biorefining in the prevailing energy and materials crisis: a review of sustainable pathways for biorefinery value chains and sustainability assessment methodologies. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 43, n.3, p. 244-263, 2015.

PARK, S.; BAKER, J. O.; HIMMEL, M. E.; PARILLA, P. A.; JOHNSON, D. K. Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, n. 1, p. 10, 2010.

PARK, S.; JOHNSON, D. K.; ISHIZAWA, C. I.; PARILLA, P. A.; DAVIS, M. F. Measuring the crystallinity index of cellulose by solid state ¹³C nuclear magnetic resonance. **Cellulose**, v. 16, n. 4, p. 641-647, 2009.

PEÑA-VALDIVIA, C. B.; TREJO, C., ARROYO-PEÑA, V. B., SANCHEZ URDANETA, A. B., BALOIS MORALES, R. Diversity of unavailable polysaccharides and dietary fiber in domesticated nopalito and cactus pear fruit (*Opuntia* spp.). **Chemistry & Biodiversity**, v. 9, n. 8, p. 1599-1610, 2012.

PESSOA, J. G. B. ; LIMA, A. M. N. O. ; SOUTO-MAIOR, A. M. ; DA CRUZ FILHO, I. J. . Production of xylanase by *Aspergillus awamori*: use of hydrolysate of prickly pear cladodes as an alternative cultivation medium. In: ENZITEC, 2018. ENZITEC, 2018.

PINHEIRO, F. G. C.; SOARES, A. K. L.; SANTAELLA, S. T.; E SILVA, L. M. A.; CANUTO, K. M.; CÁCERES, C. A.; LEITÃO, R. C. Optimization of the acetosolv extraction of lignin from sugarcane bagasse for phenolic resin production. **Industrial Crops and Products**, v. 96, n. 2, p. 80-90, 2017.

POLIKOVSKY, M.; BEN-JACOB, E.; FINKELSHTEIN, A. P. vortex-mediated strategies for polysaccharides decomposition. **Technology**, v. 3, n. 2-3, p. 80-83, 2015.

POPOV, S. V.; OVODOV, Yu S. Polypotency of the immunomodulatory effect of pectins. **Biochemistry (Moscow)**, v. 78, n. 7, p. 823-835, 2013.

PSOMAS, E.; ANDRIGHETTO, C.; LITOPOULOU-TZANETAKI, E.; LOMBARDI, A.; TZANETAKIS, N. Some probiotic properties of yeast isolates from infant faeces and Feta cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 69, n. 1-2, p. 125-133, 2001.

RAGAUSKAS, A. J.; BECKHAM, G. T.; BIDDY, M. J.; CHANDRA, R., CHEN, F., DAVIS, M. F; WYMAN, C. E. Lignin valorization: improving lignin processing in the biorefinery. **Science**, v. 344, n. 6185, p. 1246843, 2014.

RAGAUSKAS, A. J.; WILLIAMS, C. K.; DAVISON, B. H.; BRITOVSEK, G.; CAIRNEY, J.; ECKERT, C. A.; FREDERICK Jr, W. J.; HALLETT, J. P.; LEAK, D. J.; LIOTTA, C. L.; MIELENZ, J. R.; MURPHY, R.; TEMPLER, R.; TSCHAPLINSKI, T. The Path Forward for Biofuels and Biomaterials. **Science**, v. 311, n. 5760, p. 484-489, 2006.

RAMOS, L.P. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. **Química nova**. v.26, n.6 p.863-871, 2003.

RAZAVI, S. M. A.; CUI, S. W.; GUO, Q.; DING, H. Some physicochemical properties of sage (*Salvia macrosiphon*) seed gum. **Food Hydrocolloids**, v. 35, n.3, p. 453-462, 2014.

REALINI, M. F.; GONZÁLEZ, G. E.; FONT, F.; PICCA, P. I.; POGGIO, L.; GOTTLIEB, A. M. Phylogenetic relationships in *Opuntia* (Cactaceae, Opuntioideae) from southern South America. **Plant systematics and evolution**, v. 301, n. 4, p. 1123-1134, 2015.

REESI, F.; MINAIYAN, M.; TAHERI, A. A novel lignin-based nanofibrous dressing containing arginine for wound-healing applications. **Drug delivery and translational research**, v. 8, n. 1, p. 111-122, 2018.

REN, H.; DAI, X.; ZHAI, H.; LIU, Z.; OMORI, S. Comparison of bamboo native lignin and alkaline lignin modified by phase-separation method. **Cellulose Chemistry and Technology**, v. 49, n. 5-6, p. 429-438, 2015.

RENNIE, E. A.; SCHELLER, H. V. Xylan biosynthesis. **Current opinion in biotechnology**, v. 26, n. 4, p. 100-107, 2014.

- REYES-RIVERA, J.; CANCHÉ-ESCAMILLA, G.; SOTO-HERNÁNDEZ, M.; TERRAZAS, T. Wood chemical composition in species of Cactaceae: the relationship between lignification and stem morphology. **PloS one**, v. 10, n. 4, p. e0123919, 2015.
- RO, J.; KIM, Y.; KIM, H.; JANG, S. B.; LEE, H. J.; CHAKMA, S.; LEE, J. Anti-oxidative activity of pectin and its stabilizing effect on retinyl palmitate. **The Korean Journal of Physiology & Pharmacology**, v. 17, n. 3, p. 197-201, 2013.
- ROCHA, G. J. M. Deslignificação de Bagaço de Cana de Açúcar Assistida por Oxigênio, **Tese de Doutorado**. São Carlos, SP: Universidade Federal de São Carlos, 2000.
- ROCHA, G. J. M.; MARTIN, C.; SILVA, V. F. N.; OLIVAREZ, E. G.; GONÇALVES, A. R. Mass balance of pilot-scale pretreatment of sugarcane bagasse by steam explosion followed by alkaline delignification. **Bioresource Technology**, v. 111, n. 5, p. 447-452, 2012.
- ROCHA, G. J. M.; MARTIN, C.; SOARES, I. B.; SOUTO-MAIOR, A. M.; BAUDEL, H. M.; ABREU, C. A. M. Dilute mixed-acid pretreatment of sugarcane bagasse for ethanol production. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 1, p. 663-670, 2011.
- ROCHA, G. J. M.; NASCIMENTO, V. M.; SILVA, V. F. N. Enzymatic bioremediation of effluent from sugarcane bagasse soda delignification process. **Waste and Biomass Valorization**, v. 5, n. 6, p. 919-929, 2014.
- SAAD, S.M.I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 1, p. 01 - 16, 2006.
- SAEMAN, J. F. Kinetics of wood saccharification hydrolysis of cellulose and decomposition of sugars in diluted acid at high temperature. **Industrial Engineering Chemistry**, v. 37, n. 1, p. 43-52, 1945.
- SAKAGAMI, H.; KAWANO, M.; THET, M.M.; HASHIMOTO, K.; SATOH, K.; KANAMOTO, T.; TERAOKUBO, S.; NAKASHIMA, H.; HAISHIMA, Y.; MAEDA, Y.; SAKURAI, K. Anti-HIV and Immunomodulation Activities of Cacao Mass Lignin–Carbohydrate Complex. **In vivo**, v. 25, n. 2, p. 229-236, 2011.
- SAKURAI, M. H.; MATSUMOTO, T.; KIYOHARA, H.; YAMADA, H. B-cell proliferation activity of pectic polysaccharide from a medicinal herb, the roots of *Bupleurum falcatum* L. and its structural requirement. **Immunology**, v. 97, n. 3, p. 540, 1999.
- SANCHEZ, S. & DEMAIN, A.L. Metabolic regulation of fermentation processes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 895-906, 2002.
- SANT'ANNA, C.; SOUZA, W. Microscopy as a tool to follow deconstruction of lignocellulosic biomass. **Formatex Research Center, Espanha**, p. 639-645, 2012.

SANTOS, C.; CAMPESTRINI, L.; VIEIRA, D.; PRITSCH, I.; YAMASSAKI, F.; ZAWADZKI-BAGGIO, S.; MOLENTO, M. Chemical Characterization of *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. Hydroalcoholic Extract and Its Efficiency against Gastrointestinal Nematodes of Sheep. **Veterinary Sciences**, v. 5, n. 3, p. 80-93, 2018.

SANTOS, D. C.; SANTOS, M. V. F.; FARIAS, I.; DIAS, F. M.; ANDRADE LIRA, M. Desempenho produtivo de vacas 5/8 Holando/Zebu alimentadas com diferentes cultivares de palma forrageira (*Opuntia* e *Nopalea*). **Rev. bras. zootec**, v. 30, n. 1, p. 12-17, 2001.

SANTOS, D.C.; FARIAS, I.; LIRA, M. A.; SANTOS, M.V.F.; ARRUDA, G.P.; COELHO, R.S.B.; DIAS, F. M.; MELO, J.N. Manejo e utilização da palma forrageira (*Opuntia* e *Nopalea*) em Pernambuco. Recife: **IPA**, p. 48, 2006.

SANTOS, J. D. G.; ESPELETA, A. F.; BRANCO, A.; ASSIS, S. A. Aqueous extraction of pectin from sisal waste. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 2, p. 1997-2001, 2013.

SANTOS, N. T.; DUTRA, E. D.; PRADO, A. G.; LEITE, F. C. B.; SOUZA, R. D. F. R.; SANTOS, D. C.; MENEZES, R. S. C. Potential for biofuels from the biomass of prickly pear cladodes: Challenges for bioethanol and biogas production in dry areas. **Biomass and Bioenergy**, v. 85, n. 2, p. 215-222, 2016.

SARKO, A. Recent X-ray crystallographic studies of celluloses. In: YOUNG, R. A; ROWELL, R. M. Eds. **CELLULOSE - STRUCTURE, MODIFICATION AND HYDROLYSIS**, John Wiley, New York, USA, p. 29-50, 1986.

SAWAYA, W. N.; KHALIL, J. K.; AL-MOHAMMAD, M. M. Nutritive value of prickly pear seeds, *Opuntia ficus-indica* . **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 33, n. 1, p. 91-97, 1983.

SCHUCHARDT, U.; RIBEIRO, M.L.; GONÇALVES, A. R. A indústria petroquímica no próximo século: como substituir o petróleo como matéria-prima. **Química nova**, v. 24, n.2, p. 247-251, 2001.

SEGAL, L. G. J. M. A.; CREELY, J. J.; MARTIN, A. E.; CONRAD, C. M. An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer. **Textile Research Journal**, v. 29, n. 10, p. 786-794, 1959.

SEPÚLVEDA, E.; SÁENZ, C.; ALIAGA, E.; ACEITUNO, C. Extraction and characterization of mucilage in *Opuntia* spp. **Journal of Arid Environments**, v. 68, n. 4, p. 534-545, 2007.

SHAH, T. A. Effect of alkalis pretreatment on lignocellulosic waste biomass for biogas production. **International Journal of Renewable Energy Research (IJRER)**, v. 8, n. 3, p. 1318-1326, 2018.

SILVA, M. J. Produção de enzimas celulolíticas e xilanolíticas por *Trichoderma reesei* RUT C-30 em meios com diferentes capacidades de indução. **Dissertação de Mestrado**. Recife, PE: Universidade Federal de Pernambuco, 2014.

SILVA, S. B.; ARANTES, M. D. C.; ANDRADE, J. K. B.; ANDRADE, C. R.; CARNEIRO, A. D. C. O.; PAULA PROTÁSIO, T. Influence of physical and chemical compositions on the properties and energy use of lignocellulosic biomass pellets in Brazil. **Renewable Energy**, v. 147, p. 1870-1879, 2020.

SINGH, R.; KUMAR, M.; MITTAL, A.; MEHTA, P. K. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. **3 Biotech**, v. 6, n. 2, p. 174, 2016.

SIQUEIRA, J. G. W; RODRIGUES, C.; SOUZA VANDENBERGHE, L. P, WOICIECHOWSKI, A. L.; SOCCOL. Current advances in on-site cellulase production and application on lignocellulosic biomass conversion to biofuels: A review. **Biomass and Bioenergy**, v. 132, p. 105419, 2020.

SKULCOVA, A.; MAJOVA, V.; KOHUTOVA, M.; GROSIK, M.; SIMA, J.; JABLONSKY, M. UV/Vis Spectrometry as a quantification tool for lignin solubilized in deep eutectic solvents. **BioResources**, v. 12, n. 3, p. 6713-6722, 2017.

SLEZAK, A.; MOREIRA, H.; SZYJKA, A.; OSZMIANSKI, J.; GASIOROWSKI, K. Conditions of prooxidant activity of cistus and pomegranate polyphenols in v79 cell cultures. **Acta Poloniae Pharmaceutica**, v. 74, n. 2, p. 670-678, 2017.

SLUITER, A.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D. Determination of Extractives in Biomass. **Laboratory Analytical Procedure (LAP)**. Issue Date: 7/17/2005. Technical Report NREL/TP – 510-42619.

SLUITER, J. B.; RUIZ, R. O.; SCARLATA, C. J.; SLUITER, A. D.; TEMPLETON, D. W. Compositional analysis of lignocellulosic feedstocks. 1. Review and description of methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 16, p. 9043-9053, 2010.

SMITH, P. J.; WANG, H. T.; YORK, W. S.; PEÑA, M. J.; URBANOWICZ, B. R Designer biomass for next-generation biorefineries: leveraging recent insights into xylan structure and biosynthesis. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, n. 1, p. 286, 2017.

SOUZA-FILHO, P. F.; RIBEIRO, V. T.; SANTOS, E. S.; MACEDO, G. R. Simultaneous saccharification and fermentation of cactus pear biomass—evaluation of using different pretreatments. **Industrial Crops and Products**, v. 89, n 9. p. 425-433, 2016.

- SRIVASTAVA, P.; MALVIYA, R. Sources of pectin, extraction and its applications in pharmaceutical industry - An overview. **Indian Journal of Natural Products and Resources**, v. 2, n. 1, p. 10-18, 2011.
- STREFFER, F. **Method for digesting a biomass comprising lignin together with cellulose and/or hemicellulose**. U.S. Patent n. 8,895,290, 2014.
- STRICKER, A. R.; MACH, R. L.; DE GRAAFF, L. H. Regulation of transcription of cellulases-and hemicellulases-encoding genes in *Aspergillus niger* and *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*). **Applied microbiology and biotechnology**, v. 78, n. 2, p. 211, 2008.
- STRICKER, A. R.; MACH, R. L.; DE GRAAFF, L. H. Regulation of transcription of cellulases-and hemicellulases-encoding genes in *Aspergillus niger* and *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*). **Applied microbiology and biotechnology**, v. 78, n. 2, p. 211, 2008.
- SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Biouresource Technology**, v. 83, n. 1, p. 1-11, 2002.
- SUNNA, A.; ANTRANIKIAN, G. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 17, n. 1, p. 39-67, 1997.
- TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, p. 1621-1651, 2008.
- TALEBNIA, F.; KARAKASHEV, D.; ANGELIDAKI, I. Production of bioethanol from wheat straw: an overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4744-4753, 2010.
- TEIXEIRA, G.; SANTANA, A. R.; PAIS, M. S.; CLEMENTE, A. Enzymes of *Opuntia ficus-indica* (L.) Miller with potential industrial applications-I. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 88, n. 1-3, p. 299-312, 2000.
- TEJADO, A.; PENA, C.; LABIDI, J.; ECHEVERRIA, J. M.; MONDRAGON, I. Physico-chemical characterization of lignins from different sources for use in phenol–formaldehyde resin synthesis. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 8, p. 1655-1663, 2007.
- TILSTRA, J. S.; GADDY, D. F.; ZHAO, J.; DAVÉ, S. H.; NIEDERNHOFER, L. J.; PLEVY, S. E.; ROBBINS, P. D. Pharmacologic IKK/NF- κ B inhibition causes antigen presenting cells to undergo TNF α dependent ROS-mediated programmed cell death. **Scientific Reports**, v. 4, n.1, p. 3631, 2014.
- TSIEN, R. Y. Fluorescence measurement and photochemical manipulation of cytosolic free calcium. **Trends in Neurosciences**, v. 11, n. 10, p. 419-424, 1988.

TSUJI, R.; IKADO, K.; FUJIWARA, D. Modulation of innate immunity by lignin-carbohydrate, a novel TLR4 ligand, results in augmentation of mucosal IgA and systemic IgG production. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 1, p. 64, 2017.

UÇAR, R. C.; ŞENGÜL, A.; CELIKTAS, M. S. Biorefineries for wheat bran: Sustainable utilization and market potential. In: **Sustainable Recovery and Reutilization of Cereal Processing By-Products**. Woodhead Publishing, p. 87-124, 2018.

UENOJO, M.; PASTORE, G. M. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 388-394, 2007.

UM, B.H.; KARIM, M.; HENK, L. Effect of sulfuric and phosphoric acid pretreatments on enzymatic hydrolysis of corn stover. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 105- 108, p. 115-125, 2003.

VAN D. A.A. K. A.; SKOVGAARD, K.; JESPERSEN, L. in vitro screening of probiotic properties of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* and food-borne *Saccharomyces cerevisiae* strains. **International Journal of Food Microbiology**, v. 101, n. 1, p. 29-39, 2005.

VARANASI, P.; SINGH, P.; ARORA, R.; ADAMS, P. D.; AUER, M.; SIMMONS, B. A.; SINGH, S. Understanding changes in lignin of *Panicum virgatum* and *Eucalyptus globulus* as a function of ionic liquid pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 126, n. 12, p. 156-161, 2012.

VASCONCELOS, A. G. V. D.; LIRA, M. D. A.; CAVALCANTI, V. L. B.; SANTOS, M. V. F. D.; WILLADINO, L. Seleção de clones de palma forrageira resistentes à cochonilha-do-carmim (*Dactylopius* sp). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. 5, p. 827-831, 2009.

VASCONCELOS, A. G. V.; LIRA, M. A.; CAVALCANTI, V. L. B.; SANTOS, M. V. F.; WILLADINO, L. Seleção de clones de palma forrageira resistentes à cochonilha do carmin (*Dactylopius* sp) **Revista Brasileira Zootecnia**, v. 38, n. 5, p. 827-831, 2009.

VASCONCELOS, S. M. D. Pré-tratamentos Hidrotérmico e Com Ácido Fosfórico Diluído de Bagaço de Cana-de-açúcar Para Aplicação Em Biorrefinarias, **Tese de Doutorado**. Recife, PE: Universidade Federal de Pernambuco, 2012.

VASCONCELOS, S. M., SANTOS, A. M. P., ROCHA, G. J. M., SOUTO-MAIOR, A. M. Diluted phosphoric acid pretreatment for production of fermentable sugars in a sugarcane-based biorefinery. **Bioresource technology**, v. 135, n.5, p. 46-52, 2013.

VAZ JR, S. Biorrefinarias: cenários e perspectivas. **Embrapa Agroenergia**, v. 176, 2011.

- VÁZQUEZ, G.; GONZÁLEZ, J.; FREIRE, S., ANTORRENA, G. Effect of chemical modification of lignin on the gluebond performance of lignin-phenolic resins. **Bioresource Technology**, v. 60, n. 3, p. 191-198, 1997.
- VINARDELL, M.; MITJANS, M. Lignins and their derivatives with beneficial effects on human health. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 6, p. 1219, 2017.
- VORAGEN, A. G. J., COENEN, G., VERHOE, R. P., SCHOLS, H. A. Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. **Structural Chemistry**, v. 20, n. 2, p. 263–275, 2009.
- WANG, X.; CHEN, Q.; LÜ, X. Pectin extracted from apple pomace and citrus peel by subcritical water. **Food Hydrocolloids**, v. 38, n. 6, p. 129-137, 2014.
- WANG, X.; HUANG, H.; MA, X.; WANG, L.; LIU, C.; HOU, B.; DU, G. Anti-inflammatory effects and mechanism of the total flavonoids from *Artemisia scoparia* Waldst. et kit. *in vitro* and *in vivo*. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 104, n. 8, p. 390-403, 2018.
- WU, M.; YAN, Z. Y.; ZHANG, X. M., XU, F.; SUN, R. C. Integration of mild acid hydrolysis in γ -valerolactone/water system for enhancement of enzymatic saccharification from cotton stalk. **Bioresource Technology**, v. 200, n. 1, p. 23-28, 2016.
- XU, F.; YU, J.; TESSO, T.; DOWELL, F.; WANG, D. Qualitative and quantitative analysis of lignocellulosic biomass using infrared techniques: a mini-review. **Applied Energy**, v. 104, n. 5, p. 801-809, 2013.
- YANG, L.; LU, M.; CARL, S.; MAYER, J. A.; CUSHMAN, J. C.; TIAN, E.; LIN, H. Biomass characterization of *Agave* and *Opuntia* as potential biofuel feedstocks. **Biomass and Bioenergy**, v. 76, n.5, p. 43-53, 2015.
- ZHANG, L.; LIU, Y.; NIU, X.; LIU, Y.; LIAO, W. Effects of acid and alkali treated lignocellulosic materials on cellulase/xylanase production by *Trichoderma reesei* Rut C30 and corresponding enzymatic hydrolysis. **Biomass and Bioenergy**, v. 37, n. 2, p. 16-24, 2012.
- ZHENG, Y.; PAN, Z.; ZHANG, R. Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production, **International Journal of Agricultural and Biological Engineering**, v. 2 n.3, p. 51-68, 2009.



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biological Macromolecules

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ijbiomac>



Lignins isolated from Prickly pear cladodes of the species *Opuntia ficus-indica* (Linnaeus) Miller and *Opuntia cochenillifera* (Linnaeus) Miller induces mice splenocytes activation, proliferation and cytokines production

Iranildo José da Cruz Filho ^a, Bárbara Rafaela da Silva Barros ^b, Lethícia Maria de Souza Aguiar ^b, Claudia Daniele Carvalho Navarro ^c, Juliana Silveira Ruas ^c, Virgínia Maria Barros de Lorena ^d, George Jackson de Moraes Rocha ^e, Aníbal Eugênio Vercesi ^c, Cristiane Moutinho Lagos de Melo ^{c,*}, Ana Maria Souto Maior ^a

^a Laboratory of Biotechnological Process, Antibiotics Department, Federal University of Pernambuco, Pernambuco, Brazil

^b Laboratory of Immunological and Antitumor Analyses, Antibiotics Department, Federal University of Pernambuco, Pernambuco, Brazil

^c Laboratory of Bioenergetic, Department of Clinical Patology, Campinas State University, São Paulo, Brazil

^d Laboratory of Immunoparasitology, Aggeu Magalhães Institute, FIOCRUZ, Pernambuco, Brazil

^e National Laboratory of Bioethanol Science and Technology, National Center for Research in Energy and Materials, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 July 2018

Received in revised form 14 September 2018

Accepted 20 September 2018

Available online xxxxx

Keywords:

Immunomodulation

Lignins

Macromolecules

Cytokines

ABSTRACT

Opuntia ficus-indica and *Opuntia cochenillifera* are species of Cactaceae, found in the arid regions of the planet. They present water, cellulose, hemicellulose, pectins, extractives, ashes and lignins. Here we aimed to study the immunomodulatory action of lignins from these two species against mice splenocytes, since no study for this purpose has yet been performed. The antioxidant activities of these lignins were evaluated by the DPPH, ABTS, NO assays and total antioxidant activity. Cytotoxicity was evaluated through Annexin V-FITC and propidium iodide-PE probed and cell proliferation was determined by CFSE. Immunomodulation studies with *Opuntia* lignins obtained were performed through investigation of ROS levels, cytosolic calcium release, changes on mitochondrial membrane potential, cytokine production and NO release. Results showed that *Opuntia cochenillifera* lignin presented most phenolic amount and antioxidant activities than *Opuntia ficus-indica*. Both lignins showed higher cell viability (>96%) and cell proliferation. Activation signal was observed to both lignins with increase of ROS and cytosolic calcium levels, and changes in mitochondrial membrane potential. In addition, lignins induced the higher TNF- α , IL-6 and IL-10 production and low NO release. Therefore, these lignins present great potential to be used as molecules with a proinflammatory profile, being shown as a promising therapeutic target.

© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Lignin is one of the most abundant natural polymers and the most abundant source of aromatic compounds belonging to lignocellulosic biomass [1]. Structurally it is an irregular heterogeneous polymer and, depending of plant species, exhibits a variable ratio between its Siringyl (S), Guaiacyl (G) and *p*-Hydroxylphenyl (H) units linked by bonds of the type β -O-4, 5-5, β -5, 4-O-5 [2]. Lignin is widely obtained as a by-product of the pulp industry and is a good candidate for the

development of new materials due to the presence of phenolic and aliphatic hydroxyl groups in its structure [3].

Several high value-added products can be obtained such as low cost carbon fiber, plastics, polymer membranes, fuels and a variety of chemicals [4]. Moreover, different biological activities, such as diabetes treatment [5], obesity control [6], antiviral activity [7], anticoagulant, anti-emphysema [8], Anti-inflammatory and immunomodulatory actions [9] are related to lignins. Due to this versatility, isolated lignins have been widely studied in last years [4,8].

Opuntia ficus-indica (Linnaeus) Miller and *Opuntia cochenillifera* (Linnaeus) Miller are Cactaceae prevalent in different arid regions of the planet. Semi-arid regions of the Brazilian northeast, with prevalent dry climate, dairy goats, dairy cattle and sheep, survive feeding on these vegetables. Studies demonstrated the importance of these cactaceae as

* Corresponding author at: Department of Antibiotics, Federal University of Pernambuco, Brazil, Av. Prof. Artur de Sá, s/n, 50740-520 Recife, Pernambuco, Brazil.
E-mail address: crismout_melo@hotmail.com (C.M.L. de Melo).