



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
Câmpus de Araraquara



**Universidade Estadual Paulista  
“Júlio de Mesquita Filho”**

**Faculdade de Ciências Farmacêuticas– FCF - UNESP**

**Avaliação da produção de oligossacarídeos a  
partir de um subproduto de *Eucalyptus***

**Flávia Sanchez Penalva Pinto Neto**

Tese apresentada ao Programa de  
Pós-graduação em Alimentos e  
Nutrição para obtenção do título de  
Doutor em Alimentos e Nutrição.

Área de Concentração: Ciência dos  
Alimentos

**Orientador:**

**Prof. Dr. Fernando Masarin**

Araraquara 2019

# **Avaliação da produção de oligossacarídeos a partir de um subproduto de *Eucalyptus***

**Flávia Sanchez Penalva Pinto Neto**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Alimentos e Nutrição para obtenção do título de Doutor em Alimentos e Nutrição.

Área de Concentração: Ciência dos Alimentos

**Orientador:**

**Prof. Dr. Fernando Masarin**

Araraquara 2019

---

**N469a**

Neto, Flávia Sanchez Penalva Pinto.

Avaliação da produção de oligossacarídeos a partir de um subproduto de *Eucalyptus* / Flávia Sanchez Penalva Pinto Neto. – Araraquara, 2019.

222 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição. Área de Pesquisa em Ciência dos Alimentos.

Orientador: Fernando Masarin.

1. Subproduto de *Eucalyptus*. 2. Pré-tratamento hidrotérmico. 3. Xilooligossacarídeos (XOS). 4. Hidrólise enzimática. 5. Celulooligossacarídeos (COS). I. Masarin, Fernando, orient. II. Título.

---

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
UNESP - Campus de Araraquara

**CAPES: 33004030055P6**  
**Esta ficha não pode ser modificada**

### TERMO DE SIGILO PARA MEMBRO DE BANCA EXAMINADORA

**JORGE FERNANDO BRANDÃO PEREIRA**, nacionalidade portuguesa, inscrito no CPF/MF sob nº 705.574.791-00 portador da cédula de identidade RG Estrangeiro V530810-Y /SSP-SP, doravante denominado **EXAMINADOR**;

Considerando que a UNESP possui política institucional que visa a proteção legal dos resultados oriundos de suas atividades de pesquisa e desenvolvimento técnico e tecnológico;

Considerando que a novidade é um dos requisitos necessários à proteção dos resultados de pesquisas pelos institutos de propriedade industrial, e, por consequência, a sua manutenção em sigilo até a adoção dos procedimentos legais pertinentes é indispensável para a obtenção da proteção almejada; e

Considerando, ainda, o disciplinado pelo ordenamento jurídico brasileiro, em especial pela Lei nº 9.279/96 (Lei de Propriedade Industrial), Lei nº 9.609/98 (Lei de Programa de Computador), Lei nº 9.610/98 (Lei de Direitos Autorais), Lei nº 10.973/04 (Lei de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 5.563, de 11 de outubro de 2005) e Lei Complementar nº 1.049/08 (Lei Paulista de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 54.690, de 18 de agosto de 2009);

Firma o EXAMINADOR o presente Termo de Sigilo, nas condições a seguir:

**CLÁUSULA PRIMEIRA.** O EXAMINADOR compromete-se a manter sigilo em relação a qualquer "Informação Confidencial" a que tiver acesso no exercício de suas atividades de membro de banca examinadora constituída para análise da tese intitulada "**Avaliação da produção de oligossacarídeos a partir de um subproduto de Eucalyptus**", desenvolvida pela doutoranda **FLAVIA SANCHEZ PENALVA PINTO NETO** da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara-UNESP da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

**CLÁUSULA SEGUNDA.** A expressão "Informação Confidencial" abrange toda a informação relativa às pesquisas desenvolvidas no escopo da tese a que o EXAMINADOR tenha acesso, sob a forma escrita, verbal ou por quaisquer outros meios de comunicação, inclusive eletrônicos.

**Parágrafo único.** Não será considerada "Informação Confidencial" aquela que estiver sob domínio público antes de ser revelada ou disponibilizada ao EXAMINADOR.

**CLÁUSULA TERCEIRA.** O presente termo vigorará até que os direitos de propriedade intelectual das pesquisas desenvolvidas no escopo da tese estejam devidamente protegidos junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI e junto ao Órgão competente em âmbito internacional pela UNESP.

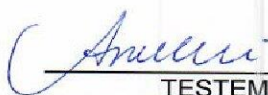
**CLÁUSULA QUARTA.** Fica eleito uma das varas da Fazenda Pública Estadual, circunscrição judiciária de São Paulo, Capital, para dirimir dúvidas ou litígios oriundos do presente instrumento.

E para todos os efeitos, firma o presente termo na presença das testemunhas abaixo-assinadas.

Araraquara, 26 de junho de 2019.



JORGE FERNANDO BRANDÃO PEREIRA



TESTEMUNHA

Nome: Aniele Vilella  
CPF/MF: 368.997.328-74

TESTEMUNHA

Nome:  
CPF/MF:

### TERMO DE SIGILO PARA MEMBRO DE BANCA EXAMINADORA

**ARIELA VELOSO DE PAULA**, nacionalidade brasileira, inscrita no CPF/MF sob nº 309.643.768-81, portadora da cédula de identidade RG 27.717.907-5, doravante denominada **EXAMINADOR**;

Considerando que a UNESP possui política institucional que visa a proteção legal dos resultados oriundos de suas atividades de pesquisa e desenvolvimento técnico e tecnológico;

Considerando que a novidade é um dos requisitos necessários à proteção dos resultados de pesquisas pelos institutos de propriedade industrial, e, por consequência, a sua manutenção em sigilo até a adoção dos procedimentos legais pertinentes é indispensável para a obtenção da proteção almejada; e

Considerando, ainda, o disciplinado pelo ordenamento jurídico brasileiro, em especial pela Lei nº 9.279/96 (Lei de Propriedade Industrial), Lei nº 9.609/98 (Lei de Programa de Computador), Lei nº 9.610/98 (Lei de Direitos Autorais), Lei nº 10.973/04 (Lei de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 5.563, de 11 de outubro de 2005) e Lei Complementar nº 1.049/08 (Lei Paulista de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 54.690, de 18 de agosto de 2009);

Firma o EXAMINADOR o presente Termo de Sigilo, nas condições a seguir:

**CLÁUSULA PRIMEIRA.** O EXAMINADOR compromete-se a manter sigilo em relação a qualquer "Informação Confidencial" a que tiver acesso no exercício de suas atividades de membro de banca examinadora constituída para análise da tese intitulada "**Avaliação da produção de oligossacarídeos a partir de um subproduto de Eucalyptus**", desenvolvida pela doutoranda **FLAVIA SANCHEZ PENALVA PINTO NETO** da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara-UNESP da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

**CLÁUSULA SEGUNDA.** A expressão "Informação Confidencial" abrange toda a informação relativa às pesquisas desenvolvidas no escopo da tese a que o EXAMINADOR tenha acesso, sob a forma escrita, verbal ou por quaisquer outros meios de comunicação, inclusive eletrônicos.

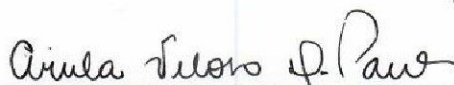
**Parágrafo único.** Não será considerada "Informação Confidencial" aquela que estiver sob domínio público antes de ser revelada ou disponibilizada ao EXAMINADOR.

**CLÁUSULA TERCEIRA.** O presente termo vigorará até que os direitos de propriedade intelectual das pesquisas desenvolvidas no escopo da tese estejam devidamente protegidos junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI e junto ao Órgão competente em âmbito internacional pela UNESP.

**CLÁUSULA QUARTA.** Fica eleito uma das varas da Fazenda Pública Estadual, circunscrição judiciária de São Paulo, Capital, para dirimir dúvidas ou litígios oriundos do presente instrumento.

E para todos os efeitos, firma o presente termo na presença das testemunhas abaixo-assinadas.

Araraquara, 26 de junho de 2019.



ARIELA VELOSO DE PAULA



TESTEMUNHA

Nome: Aniele Vilella  
CPF/MF: 368.997.328-74

TESTEMUNHA

Nome:  
CPF/MF:

### TERMO DE SIGILO PARA MEMBRO DE BANCA EXAMINADORA

**MICHEL BRIENZO**, nacionalidade brasileira, inscrito no CPF/MF sob nº 213.795.888-04, portador da cédula de identidade RG nº 28.915.636-1, doravante denominado **EXAMINADOR**;

Considerando que a UNESP possui política institucional que visa a proteção legal dos resultados oriundos de suas atividades de pesquisa e desenvolvimento técnico e tecnológico;

Considerando que a novidade é um dos requisitos necessários à proteção dos resultados de pesquisas pelos institutos de propriedade industrial, e, por consequência, a sua manutenção em sigilo até a adoção dos procedimentos legais pertinentes é indispensável para a obtenção da proteção almejada; e

Considerando, ainda, o disciplinado pelo ordenamento jurídico brasileiro, em especial pela Lei nº 9.279/96 (Lei de Propriedade Industrial), Lei nº 9.609/98 (Lei de Programa de Computador), Lei nº 9.610/98 (Lei de Direitos Autorais), Lei nº 10.973/04 (Lei de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 5.563, de 11 de outubro de 2005) e Lei Complementar nº 1.049/08 (Lei Paulista de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 54.690, de 18 de agosto de 2009);

Firma o EXAMINADOR o presente Termo de Sigilo, nas condições a seguir:

**CLÁUSULA PRIMEIRA.** O EXAMINADOR compromete-se a manter sigilo em relação a qualquer "Informação Confidencial" a que tiver acesso no exercício de suas atividades de membro de banca examinadora constituída para análise da tese intitulada "**Avaliação da produção de oligossacarídeos a partir de um subproduto de Eucalyptus**", desenvolvida pela doutoranda **FLAVIA SANCHEZ PENALVA PINTO NETO** da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara-UNESP da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

**CLÁUSULA SEGUNDA.** A expressão "Informação Confidencial" abrange toda a informação relativa às pesquisas desenvolvidas no escopo da tese a que o EXAMINADOR tenha acesso, sob a forma escrita, verbal ou por quaisquer outros meios de comunicação, inclusive eletrônicos.

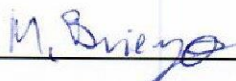
**Parágrafo único.** Não será considerada "Informação Confidencial" aquela que estiver sob domínio público antes de ser revelada ou disponibilizada ao EXAMINADOR.

**CLÁUSULA TERCEIRA.** O presente termo vigorará até que os direitos de propriedade intelectual das pesquisas desenvolvidas no escopo da tese estejam devidamente protegidos junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI e junto ao Órgão competente em âmbito internacional pela UNESP.

**CLÁUSULA QUARTA.** Fica eleito uma das varas da Fazenda Pública Estadual, circunscrição judiciária de São Paulo, Capital, para dirimir dúvidas ou litígios oriundos do presente instrumento.

E para todos os efeitos, firma o presente termo na presença das testemunhas abaixo-assinadas.

Araraquara, 26 de junho de 2019.



MICHEL BRIENZO



TESTEMUNHA

Nome: Aniele Vilella  
CPF/MF: 368.997.328-74

TESTEMUNHA

Nome:  
CPF/MF:

**TERMO DE SIGILO PARA MEMBRO DE BANCA EXAMINADORA**

**JOÃO RENATO CARVALHO MUNIZ**, nacionalidade brasileira, inscrito no CPF/MF sob nº 280.642.338-44 portador da cédula de identidade RG nº 27.764.261-9, doravante denominado **EXAMINADOR**;

Considerando que a UNESP possui política institucional que visa a proteção legal dos resultados oriundos de suas atividades de pesquisa e desenvolvimento técnico e tecnológico;

Considerando que a novidade é um dos requisitos necessários à proteção dos resultados de pesquisas pelos institutos de propriedade industrial, e, por consequência, a sua manutenção em sigilo até a adoção dos procedimentos legais pertinentes é indispensável para a obtenção da proteção almejada; e

Considerando, ainda, o disciplinado pelo ordenamento jurídico brasileiro, em especial pela Lei nº 9.279/96 (Lei de Propriedade Industrial), Lei nº 9.609/98 (Lei de Programa de Computador), Lei nº 9.610/98 (Lei de Direitos Autorais), Lei nº 10.973/04 (Lei de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 5.563, de 11 de outubro de 2005) e Lei Complementar nº 1.049/08 (Lei Paulista de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 54.690, de 18 de agosto de 2009);

Firma o EXAMINADOR o presente Termo de Sigilo, nas condições a seguir:

**CLÁUSULA PRIMEIRA.** O EXAMINADOR compromete-se a manter sigilo em relação a qualquer "Informação Confidencial" a que tiver acesso no exercício de suas atividades de membro de banca examinadora constituída para análise da tese intitulada "**Avaliação da produção de oligossacarídeos a partir de um subproduto de Eucalyptus**", desenvolvida pela doutoranda **FLÁVIA SANCHEZ PENALVA PINTO NETO** da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara-UNESP da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

**CLÁUSULA SEGUNDA.** A expressão "Informação Confidencial" abrange toda a informação relativa às pesquisas desenvolvidas no escopo da tese a que o EXAMINADOR tenha acesso, sob a forma escrita, verbal ou por quaisquer outros meios de comunicação, inclusive eletrônicos.

**Parágrafo único.** Não será considerada "Informação Confidencial" aquela que estiver sob domínio público antes de ser revelada ou disponibilizada ao EXAMINADOR.

**CLÁUSULA TERCEIRA.** O presente termo vigorará até que os direitos de propriedade intelectual das pesquisas desenvolvidas no escopo da tese estejam devidamente protegidos junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI e junto ao Órgão competente em âmbito internacional pela UNESP.

**CLÁUSULA QUARTA.** Fica eleito uma das varas da Fazenda Pública Estadual, circunscrição judiciária de São Paulo, Capital, para dirimir dúvidas ou litígios oriundos do presente instrumento.

E para todos os efeitos, firma o presente termo na presença das testemunhas abaixo-assinadas.

Araraquara, 26 de junho de 2019.

  
\_\_\_\_\_  
**JOÃO RENATO CARVALHO MUNIZ**  
\_\_\_\_\_  
TESTEMUNHA

Nome: Aniele Vilella  
CPF/MF: 368.997.328-74

TESTEMUNHA

Nome:  
CPF/MF:

**TERMO DE SIGILO PARA MEMBRO DE BANCA EXAMINADORA**

**SAMUEL CONCEIÇÃO DE OLIVEIRA**, nacionalidade brasileira, inscrito no CPF/MF sob nº 092.179.478-90, portador da cédula de identidade RG nº 739.181, doravante denominado **EXAMINADOR**;

Considerando que a UNESP possui política institucional que visa a proteção legal dos resultados oriundos de suas atividades de pesquisa e desenvolvimento técnico e tecnológico;

Considerando que a novidade é um dos requisitos necessários à proteção dos resultados de pesquisas pelos institutos de propriedade industrial, e, por consequência, a sua manutenção em sigilo até a adoção dos procedimentos legais pertinentes é indispensável para a obtenção da proteção almejada; e

Considerando, ainda, o disciplinado pelo ordenamento jurídico brasileiro, em especial pela Lei nº 9.279/96 (Lei de Propriedade Industrial), Lei nº 9.609/98 (Lei de Programa de Computador), Lei nº 9.610/98 (Lei de Direitos Autorais), Lei nº 10.973/04 (Lei de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 5.563, de 11 de outubro de 2005) e Lei Complementar nº 1.049/08 (Lei Paulista de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 54.690, de 18 de agosto de 2009);

firma o EXAMINADOR o presente Termo de Sigilo, nas condições a seguir:

**CLÁUSULA PRIMEIRA.** O EXAMINADOR compromete-se a manter sigilo em relação a qualquer "Informação Confidencial" a que tiver acesso no exercício de suas atividades de membro de banca examinadora constituída para análise da tese intitulada "**Avaliação da produção de oligossacarídeos a partir de um subproduto de Eucalyptus**", desenvolvida pela doutoranda **FLAVIA SANCHEZ PENALVA PINTO NETO** da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara-UNESP da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

**CLÁUSULA SEGUNDA.** A expressão "Informação Confidencial" abrange toda a informação relativa às pesquisas desenvolvidas no escopo da tese a que o EXAMINADOR tenha acesso, sob a forma escrita, verbal ou por quaisquer outros meios de comunicação, inclusive eletrônicos.


**Parágrafo único.** Não será considerada "Informação Confidencial" aquela que estiver sob domínio público antes de ser revelada ou disponibilizada ao EXAMINADOR.

**CLÁUSULA TERCEIRA.** O presente termo vigorará até que os direitos de propriedade intelectual das pesquisas desenvolvidas no escopo da tese estejam devidamente protegidos junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI e junto ao Órgão competente em âmbito internacional pela UNESP.

**CLÁUSULA QUARTA.** Fica eleito uma das varas da Fazenda Pública Estadual, circunscrição judiciária de São Paulo, Capital, para dirimir dúvidas ou litígios oriundos do presente instrumento.

E para todos os efeitos, firma o presente termo na presença das testemunhas abaixo-assinadas.

Araraquara, 26 de junho de 2019.



**SAMUEL CONCEIÇÃO DE OLIVEIRA**



TESTEMUNHA  
Nome: Aniele Vilella  
CPF/MF: 368.997.328-74

TESTEMUNHA  
Nome:  
CPF/MF:



### TERMO DE SIGILO PARA MEMBRO DE BANCA EXAMINADORA

**FERNANDO MASARIN**, nacionalidade brasileira, inscrito no CPF/MF sob nº 281.530.278-08, portador da cédula de identidade RG nº 29.687.792-X, doravante denominado **EXAMINADOR**;

Considerando que a UNESP possui política institucional que visa a proteção legal dos resultados oriundos de suas atividades de pesquisa e desenvolvimento técnico e tecnológico;

Considerando que a novidade é um dos requisitos necessários à proteção dos resultados de pesquisas pelos institutos de propriedade industrial, e, por consequência, a sua manutenção em sigilo até a adoção dos procedimentos legais pertinentes é indispensável para a obtenção da proteção almejada; e

Considerando, ainda, o disciplinado pelo ordenamento jurídico brasileiro, em especial pela Lei nº 9.279/96 (Lei de Propriedade Industrial), Lei nº 9.609/98 (Lei de Programa de Computador), Lei nº 9.610/98 (Lei de Direitos Autorais), Lei nº 10.973/04 (Lei de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 5.563, de 11 de outubro de 2005) e Lei Complementar nº 1.049/08 (Lei Paulista de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 54.690, de 18 de agosto de 2009);

Firma o EXAMINADOR o presente Termo de Sigilo, nas condições a seguir:

**CLÁUSULA PRIMEIRA.** O EXAMINADOR compromete-se a manter sigilo em relação a qualquer "Informação Confidencial" a que tiver acesso no exercício de suas atividades de membro de banca examinadora constituída para análise da tese intitulada "**Avaliação da produção de oligossacarídeos a partir de um subproduto de Eucalyptus**", desenvolvida pela doutoranda **FLAVIA SANCHEZ PENALVA PINTO NETO** da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara-UNESP da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

**CLÁUSULA SEGUNDA.** A expressão "Informação Confidencial" abrange toda a informação relativa às pesquisas desenvolvidas no escopo da tese a que o EXAMINADOR tenha acesso, sob a forma escrita, verbal ou por quaisquer outros meios de comunicação, inclusive eletrônicos.

**Parágrafo único.** Não será considerada "Informação Confidencial" aquela que estiver sob domínio público antes de ser revelada ou disponibilizada ao EXAMINADOR.

**CLÁUSULA TERCEIRA.** O presente termo vigorará até que os direitos de propriedade intelectual das pesquisas desenvolvidas no escopo da tese estejam devidamente protegidos junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI e junto ao Órgão competente em âmbito internacional pela UNESP.

**CLÁUSULA QUARTA.** Fica eleito uma das varas da Fazenda Pública Estadual, circunscrição judiciária de São Paulo, Capital, para dirimir dúvidas ou litígios oriundos do presente instrumento.

E para todos os efeitos, firma o presente termo na presença das testemunhas abaixo-assinadas.

Araraquara, 26 de junho de 2019.



FERNANDO MASARIN



TESTEMUNHA  
Nome: Aniele Vilella  
CPF/MF: 368.997.328-74

TESTEMUNHA  
Nome:  
CPF/MF:

### CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Avaliação da produção de oligossacarídeos a partir de um subproduto de Eucalyptus

**AUTORA: FLAVIA SANCHEZ PENALVA PINTO NETO**  
**ORIENTADOR: FERNANDO MASARIN**


Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em ALIMENTOS E NUTRIÇÃO, área: Ciência dos Alimentos pela Comissão Examinadora:



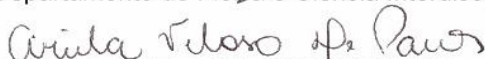
Prof. Dr. FERNANDO MASARIN  
Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia / FCF/UNESP - Araraquara



Prof. Dr. MICHEL BRIENZO  
Instituto de Pesquisa em Bioenergia / IPBEN do Câmpus de Rio Claro - UNESP



Prof. Dr. JOÃO RENATO CARVALHO MUNIZ  
Departamento de Física e Ciência Interdisciplinar / Instituto de Física de São Carlos – USP



Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. ARIELA VELOSO DE PAULA  
Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia / FCF/UNESP - Araraquara



Prof. Dr. JORGE FERNANDO BRANDÃO PEREIRA  
Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia / FCF/UNESP - Araraquara

Araraquara, 26 de junho de 2019

*DEDICO ESSE TRABALHO:*

*A Deus, por me conferir saúde, motivação e oportunidades na busca de novos desafios no desenvolvimento profissional e pessoal;*

*Aos meus pais Válter Sanchez Penalva (in memoriam) e Cecília Vicência de Arruda Penalva, pela presença marcante em todos os momentos de minha vida e por serem os motivadores de um grande sonho;*

*Aos meus queridos e amados filhos Thomás e Lívia Maria, pelo carinho, amor e compreensão pelos momentos de ausência e interesse pela pesquisa;*

*Às minhas irmãs pelo grande incentivo;*

*A todas essas pessoas, que jamais deixaram de incentivar-me, e que sem elas não teria chegado até aqui. Amo muito todos vocês.*

*Flávia Sanchez Penalva Pinto Neto*

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Fernando Masarin, pela oportunidade, orientação, dedicação, confiança, sabedoria e paciência na condução desse trabalho e sua grande e importante contribuição no meu crescimento científico e profissional, que serão guardados com muito carinho. Agradeço por essa parceria.

Ao Prof. Dr. Rubens Monti pelos ensinamentos, por ter me recebido no Laboratório de Enzimologia disponibilizando o uso do mesmo.

Ao Prof. Dr. Samuel Conceição de Oliveira, pela co-orientação na análise estatística, dedicação e amizade.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Campus Araraquara - UNESP, a qual me conferiu a oportunidade de concluir esse trabalho.

Ao Departamento de Alimentos e Nutrição e ao Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia da FCFAR, por toda a infraestrutura e apoio.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Código de Financiamento 001, pela bolsa de doutorado.

À Seção Técnica da Pós-graduação.

Aos professores, funcionários e pós-graduandos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara.

A Fibria por gentilmente ter cedido os subprodutos de *Eucalyptus* utilizados no trabalho.

## **AGRADECIMENTOS PESSOAIS**

Ao meu amigo e colaborador Ismael Ulises Miranda Roldán, pela sua contribuição.

Aos meus amigos Thamyres, Fernando Paz, Lídia, Isabela, que estiveram sempre presente me auxiliando e aconselhando com sua experiência e dedicação.

A todos os funcionários e técnicos que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização desta pesquisa, em especial aos técnicos Adriana, Ana Lúcia, Flávio e Matheus os quais me auxiliaram com muito carinho.

## RESUMO

**Introdução:** O subproduto de *Eucalyptus* gerado pela indústria de celulose apresenta grande potencial devido aos seus elevados teores de celulose e hemicelulose, além de ser uma fonte de matéria prima pouco explorada, principalmente na concepção de biorrefinarias. **Objetivo:** Otimizar a produção de xilo-oligossacarídeos (XOS) por pré-tratamento hidrotérmico e avaliar o potencial de produção de celu-oligossacarídeos (COS) por hidrólise enzimática em material previamente pré-tratado hidrotérmicamente na condição otimizada seguido de extração alcalina por celulases comerciais. **Material e Métodos:** O subproduto foi obtido a partir de cavacos de *Eucalyptus* na indústria de celulose. O subproduto foi pré-tratado hidrotérmicamente em diferentes condições operacionais (temperatura, tempo e consistência) utilizando-se a técnica de planejamento fatorial. As frações insolúveis pós-tratamento hidrotérmico foram caracterizadas quimicamente em relação aos teores de celulose, hemicelulose e lignina. As frações solúveis (hidrolisado hemicelulósico) foram caracterizadas quimicamente em relação aos teores de XOS e produtos indesejáveis. Foi utilizada a ferramenta estatística e modelagem matemática para a determinação da melhor condição operacional do pré-tratamento hidrotérmico para produção de XOS. A fração insolúvel do subproduto pré-tratado hidrotérmicamente na condição otimizada foi submetida a extração alcalina. As diferentes frações do subproduto de *Eucalyptus* foram caracterizadas estruturalmente por microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR-ATR), difração de raios-X (DRX) e espectroscopia de RMN. A fração insolúvel oriunda pós-tratamento hidrotérmico seguido de extração alcalina foram hidrolisadas enzimaticamente com preparado enzimático comercial (Celluclast-Novozymes). O hidrolisado enzimático foi avaliado quanto à produção de COS. **Resultados e discussão:** O subproduto não tratado apresentou teores de celulose, lignina e hemicelulose de 43,9%, 28,5%, 17,3%, respectivamente. Os pré-tratamentos hidrotérmicos foram seletivos para a remoção da fração de hemicelulose. A melhor condição experimental do pré-tratamento hidrotérmico (condição otimizada) foi: 161 °C, 65 min e 10% de consistência. Na condição otimizada o hidrolisado hemicelulósico apresentou conversões de xilana em XOS, xilose e furfural de aproximadamente 42%, 12%, e 1,5%, respectivamente. A produção de XOS na condição otimizada foi de aproximadamente 60 mg para cada grama de material de partida. Todavia, o hidrolisado hemicelulósico também apresentou níveis apreciáveis de contaminantes, como xilose (19 mg), aromáticos solúveis (27 mg), furfural (1,5 mg) e ácido acético (8 mg), para cada grama de material de partida. A extração alcalina no subproduto pós-tratamento hidrotérmico otimizado foi eficiente, sendo seletivo para a remoção de lignina e hemicelulose, além de culminar em um menor índice de cristalinidade. A hidrólise enzimática do subproduto pós-tratamento hidrotérmico na condição otimizada seguido de extração alcalina apresentou potencial para produção de COS, atingindo uma conversão máxima de aproximadamente 55%, após 24 h. Nesta condição o hidrolisado enzimático gerou aproximadamente 0,4 g de COS para cada grama de material de partida. **Conclusão:** O pré-tratamento hidrotérmico do subproduto de *Eucalyptus* revelou potencial para a produção de XOS e COS, sendo uma alternativa para a indústria de celulose, pois esses bioprodutos tem alto valor agregado com potencial de comercialização. Além disso, o “resíduo” final do bioprocessamento poderá ser aproveitado para cogeração de energia e/ou produção de lignina.

**Palavras-chaves:** Subproduto de *Eucalyptus*, Pré-tratamento hidrotérmico, Xilo-oligossacarídeos (XOS), Hidrólise enzimática, Celu-oligossacarídeos (COS).

## ABSTRACT

**Introduction:** *Eucalyptus* byproduct generated by the cellulose industry shows a great potential to be studied due to its high contents of cellulose and hemicellulose, besides being a source of raw material little explored, especially in the field of biorefineries. **Objective:** Optimize xylo-oligosaccharides (XOS) production by hydrothermal pretreatment and to evaluate the potential of cello-oligosaccharides (COS) production by enzymatic hydrolysis in hydrothermally pretreated material in the optimized condition followed by alkaline extraction by commercial cellulases. **Material and Methods:** By-product was obtained from industrial processing of *Eucalyptus* chips in the cellulose industry. By-product was hydrothermally pretreated under different operating conditions (temperature, time and consistency) using the factorial planning technique. The insoluble fractions post-hydrothermal treatment were chemically characterized in relation to the contents of cellulose, hemicellulose and lignin. Soluble fractions (hemicellulosic hydrolysate) were chemically characterized in relation to XOS contents and undesirable products. A statistical tool and mathematical modeling was used to determine the best operational condition of hydrothermal pretreatment for XOS production. The insoluble fraction from hydrothermally pretreated by-product in the optimized condition was subjected to alkaline extraction. The different fractions of the *Eucalyptus* by-product were characterized structurally by scanning electron microscopy (SEM), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR-ATR), X-ray diffraction (XRD) and NMR spectroscopy. The insoluble fraction post-hydrothermal treatment followed by alkaline extraction was enzymatically hydrolyzed with commercial enzyme extract (Celluclast-Novozymes). The enzymatic hydrolysate was evaluated for the production of COS. **Results and discussion:** The untreated by-product presented contents of cellulose, lignin and hemicellulose of 43.9%, 28.5% and 17.3%, respectively. The hydrothermal pretreatments were selective for the removal of hemicellulose fraction. The best experimental condition of the hydrothermal pretreatment (optimized condition) was: 161 °C, 65 min and 10% consistency. In optimized condition, the hemicellulosic hydrolysate showed xylan conversions in XOS, xylose and furfural of approximately 42%, 12%, and 1.5%, respectively. Production of XOS in the optimized condition was approximately 60 mg for each gram of raw material. However, the hemicellulosic hydrolysate also showed appreciable levels of contaminants, such as xylose (19 mg), soluble aromatics (27 mg), furfural (1.5 mg) and acetic acid (8 mg) for each gram of raw material. Alkaline extraction in the optimized hydrothermal treatment by-product was efficient, being selective for the removal of lignin and hemicellulose, besides providing a lower index of crystallinity. The enzymatic hydrolysis of the post-hydrothermal treatment by-product in the optimized condition followed by alkaline extraction showed potential for COS production, reaching a maximum conversion of approximately 55% after 24h. In this condition, the enzymatic hydrolysate generated approximately 0.4 g of COS for each gram of starting material. **Conclusion:** The hydrothermal pretreatment of the *Eucalyptus* by-product revealed potential for the production of XOS and COS, being an alternative for the pulp industry, as these bioproducts have high added value with potential of commercialization. Besides, the final "residue" of the bioprocess may be harnessed for energy cogeneration and/or lignin production.

**Keywords:** *Eucalyptus* by-product, Hydrothermal pretreatment, Xylo-oligosaccharides (XOS), Enzymatic hydrolysis, Cello-oligosaccharides (COS).

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>C<sub>1</sub></b>	Glicose
<b>C<sub>2</sub></b>	Celobiose
<b>C<sub>3</sub></b>	Celotriose
<b>C<sub>4</sub></b>	Celotetraose
<b>C<sub>5</sub></b>	Celopentaose
<b>C<sub>6</sub></b>	Celohexaose
<b>COS</b>	Celu-oligossacarídeos
<b>CLAE</b>	Cromatografia líquida de alta eficiência
<b>CLAE-MS</b>	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (CLAE-MS)
<b>DRX</b>	Difratometria de Raios-X
<b>DNS</b>	Ácido dinitrossalicílico
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamino tetra-acético
<b>FTIR-ATR</b>	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier em modo de refletância total atenuada
<b>HMF</b>	Hidroximetilfurfural
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	Ácido sulfúrico
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrogênio
<b>KOH</b>	Hidróxido de potássio
<b>MEV</b>	Microscopia eletrônica de varredura
<b>ML</b>	Material lignocelulósico
<b>NaOH</b>	Hidróxido de sódio



<b>P-Fator</b>	Fator de severidade
<b>PTH</b>	Pré-tratamento hidrotérmico ou Pré-tratamentos hidrotérmicos
<b>RID</b>	Detector de índice de refração
<b>RMN</b>	Ressonância magnética nuclear
<b>Rpm</b>	Rotações por minuto
<b>SO</b>	Subproduto original
<b>STE</b>	Subproduto triturado-extraído
<b>SO-TO</b>	Subproduto original pré-tratado hidrotermicamente na condição otimizada
<b>STE-TO</b>	Subproduto triturado-extraído pré-tratado hidrotermicamente na condição otimizada
<b>SO-TO-E</b>	Subproduto original pré-tratado hidrotermicamente na condição otimizada seguido de extração alcalina
<b>STE-TO-E</b>	Subproduto triturado-extraído pré-tratado hidrotermicamente na na condição otimizada seguido de extração alcalina
<b>SO-TO-EH</b>	Subproduto original pré-tratado hidrotermicamente na condição otimizada seguido extração alcalina e hidrólise enzimática
<b>STE-TO-EH</b>	Subproduto triturado-extraído pré-tratado hidrotermicamente na condição otimizada seguido de extração alcalina e hidrólise enzimática
<b>UI</b>	Unidade internacional de atividade enzimática
<b>UV/Vis</b>	Ultravioleta visível
<b>XOS</b>	Xilo-oligossacarídeos
<b>X<sub>1</sub></b>	Xilose

<b>X<sub>2</sub></b>	Xilobiose
<b>X<sub>3</sub></b>	Xilotriose
<b>X<sub>4</sub></b>	Xilotetraose
<b>X<sub>5</sub></b>	Xilopentaose
<b>X<sub>6</sub></b>	Xilohexaose
<b>&gt;X<sub>6</sub></b>	Oligômeros com mais de seis unidades de xilose
<b>XFF</b>	Xilose e furfural

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Planejamento fatorial $2^3$ para a avaliação do processo de auto-hidrólise do subproduto de <i>Eucalyptus</i> sob diferentes condições operacionais.....	57
<b>Tabela 2.</b> Bloco de experimentos adicionais realizados visando à continuidade da avaliação do pré-tratamento hidrotérmico (PTH) do subproduto de <i>Eucalyptus</i> em novas condições operacionais.....	59
<b>Tabela 3.</b> Principais monômeros precursores da celulose, xilana e grupo acetil e seus respectivos fatores de hidrólise.....	65
<b>Tabela 4.</b> Fatores de hidrólise de xilana em XOS.....	68
<b>Tabela 5.</b> Fatores de hidrólise de glucana em glicose e COS.....	82
<b>Tabela 6</b> Conversão de xilana em $\text{>X}_6$ , $\text{X}_6+\text{X}_5$ , $\text{X}_4$ , $\text{X}_3$ , $\text{X}_2$ , XOS, xilose e furfural pós-tratamentos hidrotérmicos em diferentes condições. Dados apresentados em porcentagem (grama de produtos por 100 gramas de xilana oriundo do subproduto, dados em base seca).....	90
<b>Tabela 7.</b> Conversão de xilana em $\text{>X}_6$ , $\text{X}_6+\text{X}_5$ , $\text{X}_4$ , $\text{X}_3$ , $\text{X}_2$ , XOS, xilose e furfural pós-tratamentos hidrotérmicos em diferentes condições. Dados apresentados em porcentagem (grama de produtos por 100 gramas de xilana oriundo do subproduto, dados em base seca).....	91
<b>Tabela 8.</b> Teste $p$ para efeito de curvatura no planejamento experimental ( $2^3$ ).....	94
<b>Tabela 9.</b> Rendimento, composição química e fator de severidade (P-Fator) do subproduto original (SO) pós-tratamentos hidrotérmicos. Dados apresentados em porcentagem (grama de componente por 100 gramas de material original, base seca).....	99
<b>Tabela 10.</b> Rendimento, composição química e fator de severidade (P-Fator) do subproduto de <i>Eucalyptus</i> moído-extraído (STE) pós-tratamentos hidrotérmicos. Dados apresentados em porcentagem (grama de componente por 100 gramas do material original, base seca).....	100
<b>Tabela 11.</b> Caracterização química dos hidrolisados hemicelulósicos (frações líquidas) oriundo dos pré-tratamentos hidrotérmicos (PTH) do subproduto	

original de <i>Eucalyptus</i> (SO). Dados apresentados em miligramas de produtos por grama de material de partida (dados em base seca).....	108
<b>Tabela 12.</b> Caracterização química do hidrolisado hemicelulósico (frações líquidas) oriundo dos pré-tratamentos hidrotérmicos (PTH) do subproduto moído-extraído de <i>Eucalyptus</i> (STE). Dados apresentados em miligramas de produtos por grama de material de partida (dados em base seca).....	109
<b>Tabela 13.</b> Teores de xilo-oligossacarídeos (XOS) dos hidrolisados hemicelulósicos pós-tratamentos hidrotérmicos do subproduto original (SO). Dados apresentados em miligramas de produtos por grama de material de partida (dados em base seca).....	115
<b>Tabela 14.</b> Teores de xilo-oligossacarídeos (XOS) dos hidrolisados hemicelulósicos pós-tratamentos hidrotérmicos do subproduto triturado-extraído (STE). Dados apresentados em miligramas de produtos por grama de material de partida (dados em base seca).....	116
<b>Tabela 15.</b> Conversão de xilana do subproduto original (SO) em $\text{>X}_6$ , $\text{X}_6+\text{X}_5$ , $\text{X}_4$ , $\text{X}_3$ , $\text{X}_2$ , XOS, xilose, furfural e ácido fórmico pós-tratamentos hidrotérmicos em diferentes condições. Dados apresentados em porcentagem (grama de produtos por 100 gramas de xilana oriundo do subproduto, dados em base seca).....	119
<b>Tabela 16.</b> Conversão de xilana do subproduto triturado-extraído (STE) em $\text{>X}_6$ , $\text{X}_6+\text{X}_5$ , $\text{X}_4$ , $\text{X}_3$ , $\text{X}_2$ , XOS, xilose, furfural e ácido fórmico pós-tratamentos hidrotérmicos em diferentes condições. Dados apresentados em porcentagem (grama de produtos por 100 gramas de xilana oriundo do subproduto, dados em base seca).....	120
<b>Tabela 17.</b> Teores de xilose, furfural e xilo-oligossacarídeos (XOS) dos hidrolisados hemicelulósicos pós-tratamentos hidrotérmicos do subproduto original (SO) e subproduto triturado-extraído (STE), ambos do presente estudo, além de resultados reportados na literatura. Dados apresentados em miligramas de produtos por grama de material de partida (dados em base seca).....	126
<b>Tabela 18.</b> Massa de produtos recuperados da fração de xilana do subproduto original de <i>Eucalyptus</i> (SO) pós-pré-tratamentos hidrotérmicos.....	128

<b>Tabela 19.</b> Massa de produtos recuperados da fração de xilana do subproduto triturado-extraído (STE) de <i>Eucalyptus</i> pós-pré-tratamentos hidrotérmicos.....	129
<b>Tabela 20.</b> Efeitos e coeficientes do modelo calculados para o planejamento composto central completo tendo como variável resposta a conversão de xilana em XOS.....	131
<b>Tabela 21.</b> Análise de variância (ANOVA) para o ajuste do modelo tendo como variável resposta a conversão de xilana em XOS.....	132
<b>Tabela 22.</b> Valores das coordenadas do ponto ótimo.....	136
<b>Tabela 23.</b> Efeitos e coeficientes do modelo calculados para o planejamento composto central tendo como variável resposta a conversão de xilana em XOS.....	137
<b>Tabela 24.</b> Análise de variância (ANOVA) para o ajuste do modelo tendo como variável de resposta conversão de xilana em XOS.....	138
<b>Tabela 25.</b> Rendimento, composição química e fator de severidade (P-Fator) das frações insolúveis do subproduto original pós-tratamento hidrotérmico na condição otimizada (SO-TO) e do subproduto triturado-extraído pós-tratamento hidrotérmico na condição otimizada (STE-TO). Dados apresentados em porcentagem (grama por 100 gramas de polpa básica e original, dados em base seca).....	145
<b>Tabela 26.</b> Caracterização química dos hidrolisados hemicelulósicos (frações líquidas) pós-tratamentos hidrotérmicos do subproduto original na condição otimizada (SO-TO) e do subproduto triturado-extraído na condição otimizada (STE-TO). Dados apresentados em miligramas de produtos por grama de material de partida (dados em base seca).....	147
<b>Tabela 27.</b> Teores de xilo-oligosacarídeos (XOS) dos hidrolisados hemicelulósicos (frações líquidas) pós-tratamentos hidrotérmicos do subproduto original na condição otimizada (SO-TO) e do subproduto triturado-extraído na condição otimizada (STE-TO). Dados apresentados em miligramas de produto por grama de material de partida (dados em base seca).....	149

<b>Tabela 28.</b> Conversão de xilana em $\text{>X}_6$ , $\text{X}_6+\text{X}_5$ , $\text{X}_4$ , $\text{X}_3$ , $\text{X}_2$ , XOS, xilose e furfural pós-tratamentos hidrotérmicos otimizados do subproduto original (SO-TO) e do subproduto triturado-extraído (STE-TO). Dados apresentados em porcentagem (grama de produtos por 100 gramas de xilana oriundo do subproduto, dados em base seca).....	151
<b>Tabela 29.</b> Balanço de massa de xilana do subproduto original (SO-TO) e do subproduto triturado-extraído (STE-TO) pós-tratamento hidrotérmico otimizados.....	151
<b>Tabela 30.</b> Valores preditos e experimentais de conversão de xilana em XOS dos modelos matemáticos propostos. Dados apresentados em porcentagem (grama de produtos por 100 gramas de xilana oriundo do subproduto, dados em base seca).....	152
<b>Tabela 31.</b> Rendimento e composição química das frações insolúveis pós-tratamento hidrotérmico seguido de extração alcalina do subproduto original (SO-TO-E) e do subproduto triturado-extraído (STE-TO-E). Dados apresentados em porcentagem de material (grama por 100 gramas de material em polpa básica ou original, dados em base seca).....	156
<b>Tabela 32.</b> Índice de cristalinidade (ICr) e amorficidade (IAm) das diferentes frações do subproduto de <i>Eucalyptus</i> . O ICr e o IAm foram obtidos através do método de deconvolução (PeakFit; <a href="http://www.systat.com">www.systat.com</a> ).....	163
<b>Tabela 33.</b> Atribuições de bandas de 1 ao 15 do RMN em estado sólido, indicado nos espectros da figura 44.....	166
<b>Tabela 34.</b> Atribuições das bandas de absorção na região do infravermelho médio (FTIR-ATR) para biomassas lignocelulósicas.....	171
<b>Tabela 35.</b> Atividade específica e teor de proteínas em preparado enzimático comercial Celluclast (Novozymes).....	174
<b>Tabela 36.</b> Conversão de celulose em celu-oligossacarídeos (COS) e glicose e concentração de celu-oligossacarídeos (COS) e glicose, ambos ao longo da hidrólise enzimática com extrato enzimático comercial rico em atividade de endoglucanases (Celluclast-Novozymes). Dados de conversão apresentados em porcentagem (g/100g de material, base seca) e concentração em g.L <sup>-1</sup> .....	179

**Tabela 37.** Rendimento e composição química das frações insolúveis do subproduto original pré-tratado hidrotermicamente na condição otimizada seguido de extração alcalina e hidrólise enzimática (SO-TO-EH) e subproduto triturado-extraído pré-tratado hidrotermicamente na condição otimizada seguido de extração alcalina e hidrólise enzimática (STE-TO-EH). Dados apresentados em porcentagem de material (grama por 100 gramas de material em polpa básica ou original, dados em base seca)..... 183

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Cadeia de produtos florestais. (1) Resíduo industrial (casca, serragem, outros). (2) Resíduo florestal (ponteiras, galhos, casca, ramos, outros). (3) Biocombustíveis florestais (carvão, pellet, etanol celulósico, licor negro, outros).....	30
<b>Figura 2.</b> Estrutura da biomassa lignocelulósica.....	31
<b>Figura 3.</b> Representação da estrutura de um fragmento de celulose mostrando a ligação do tipo $\beta$ -1,4 entre unidades de D-glicopiranosose, as quais formam cadeias lineares.....	33
<b>Figura 4.</b> Representação estrutural das fibras de celulose.....	34
<b>Figura 5.</b> Estrutura típica de xilana encontrada principalmente em madeiras de folhosas e gramíneas.....	36
<b>Figura 6.</b> Estrutura – modelo da lignina de madeiras folhosas.....	37
<b>Figura 7.</b> Principais tipos de ligações entre carboidratos e lignina em complexos lignina-carboidrato: (A) fenol glicosídeo, (B) éster e (C) éter benzílico. carb = carboidrato.....	38
<b>Figura 8.</b> Estrutura de uma fibra vegetal. A imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura (MEV) se refere à fibra de madeira de <i>Eucalyptus</i> ...	40
<b>Figura 9.</b> (A) Microscopia eletrônica de lignocelulósico. (B) Modelo que explica como as microfibrilas de celulose estão organizadas e encaixadas em uma matriz de hemicelulose e lignina presente em um material lignocelulósico (ML).....	41
<b>Figura 10.</b> Efeito do pré-tratamento hidrotérmico (PTH) em materiais lignocelulósicos (ML).....	44
<b>Figura 11.</b> Vias de degradação das frações polissacarídicas dos materiais lignocelulósicos (ML) que podem ocorrer na etapa de pré-tratamento hidrotérmico (PTH).....	45
<b>Figura 12.</b> Ilustração do modo de ação do complexo enzimático na molécula de celulose.....	50
<b>Figura 13.</b> Subproduto original (SO) oriundo do processamento de cavacos de <i>Eucalyptus</i> da indústria de celulose.....	55



- Figura 14.** Fluxograma geral das etapas a serem desenvolvidas com o subproduto de *Eucalyptus* gerado no processo de produção de celulose..... 56
- Figura 15.** Reator munido de controle de temperatura, pressão e agitação mecânica (Marca Regmed)..... 61
- Figura 16.** Banho utilizado para congelar as amostras antes de submeter ao liofilizador..... 73
- Figura 17.** Liofilizador (Marca THERMO – Electron Corporation)..... 74
- Figura 18.** (a) Equipamento de fixação de carbono modelo SCD 050. (b) Microscópio modelo JEOL JSM -7500F..... 76
- Figura 19.** Frações sólidas do subproduto original (SO). (a) subproduto não tratado. (b) subproduto pós-tratamento hidrotérmico na condição 1. (c) subproduto pós-tratamento hidrotérmico na condição do ponto central do planejamento experimental. (d) subproduto pós-tratamento na condição 8 do planejamento experimental. Planejamento experimental disponível na Tabela 1 da seção de material e métodos..... 85
- Figura 20.** Frações sólidas do subproduto triturado-extraído (STE). (a) subproduto não tratado. (b) subproduto pós-tratamento hidrotérmico na condição 1. (c) subproduto pós-tratamento hidrotérmico na condição na condição do ponto central do planejamento experimental. (d) subproduto na condição 8 do planejamento experimental. Planejamento experimental disponível na Tabela 1 da seção de material e métodos..... 85
- Figura 21.** Hidrolisado hemicelulósico (fração líquida) oriundo pós-tratamento hidrotérmico do subproduto original (SO). (a) Hidrolisado pós-tratamento hidrotérmico na condição mais amena (ensaio 1 do planejamento experimental, tabela 1). (b) Hidrolisado pós-tratamento hidrotérmico na condição do ponto central do planejamento experimental. (c) Hidrolisado na condição mais severa (ensaio 8 do planejamento experimental). Planejamento experimental disponível na Tabela 1 da seção de material e métodos..... 86
- Figura 22.** Cromatogramas típicos de XOS. (a) Padrões analíticos de XOS. (b) Hidrolisado hemicelulósico do subproduto original (SO) pós-tratamento hidrotérmico no ponto central do planejamento experimental (Tabela 1).

Ambos separados na coluna BIO-RAD Aminex HPX-87C. ( $>X_6$ ) XOS com mais de 6 unidades de xilose, ( $X_5/X_6$ ) xilopentaose+xilohexaose, ( $X_4$ ) xilotetraose, ( $X_3$ ) xilotriose, ( $X_2$ ) xilobiose e ( $X_1$ ) xilose..... 88

**Figura 23.** Frações sólidas do subproduto original (SO). (a) subproduto pós-tratamento hidrotérmico na condição mais amena (ensaio 9, tabela 9). (b) subproduto pós-tratamento na condição mais severa (ensaio 10, tabela 9)..... 95

**Figura 24.** Frações sólidas do subproduto triturado-extraído (STE). (a) subproduto pós-tratamento na condição mais amena (ensaio 9, conforme tabela 9). (b) subproduto pós-tratamento hidrotérmico na condição mais drástica (ensaio 10, conforme tabela 9)..... 96

**Figura 25.** Hidrolisado hemicelulósico (fração líquida) oriundo pós-tratamento hidrotérmico do subproduto original (SO). (a) Hidrolisado hemicelulósico pós-tratamento hidrotérmico na condição mais amena (ensaio 9, tabela 9). (b) Hidrolisado hemicelulósico pós-tratamento hidrotérmico na condição mais severa (ensaio 10, tabela 9)..... 97

**Figura 26.** Hidrolisado hemicelulósico (fração líquida) oriundo pós-tratamento hidrotérmico do subproduto triturado-extraído (STE). (a) Hidrolisado hemicelulósico pós-tratamento hidrotérmico na condição mais amena (ensaio 9, conforme tabela 9). (b) Hidrolisado hemicelulósico pós-tratamento hidrotérmico na condição mais severa (ensaio 10, conforme tabela 9)..... 97

**Figura 27.** Componentes do subproduto original (SO) pós-tratamento hidrotérmico em função do fator de severidade (P-Fator). Componentes apresentados em porcentagem (grama de componente por 100 gramas do material original, dados em base seca)..... 103

**Figura 28.** Componentes do subproduto triturado-extraído (STE) pós-tratamento hidrotérmico em função do fator de severidade (P-Fator). Componentes apresentados em porcentagem (grama de componente por 100 gramas do material original, dados em base seca)..... 104

**Figura 29.** Conversão de xilana do subproduto original (SO) em XOS, xilose, furfural e ácido fórmico pós-tratamentos hidrotérmicos em função do fator de

severidade (P-Fator). Dados apresentados em porcentagem (grama de produtos por 100 gramas de xilana oriundo do subproduto, dados base seca).....	121
<b>Figura 30.</b> Conversão de xilana do subproduto triturado-extraído (STE) em XOS, xilose, furfural e ácido fórmico pós-tratamentos hidrotérmicos em função do fator de severidade (P-Fator). Dados apresentados em porcentagem (grama de produtos por 100 gramas de xilana oriundo do subproduto, dados em base seca).....	121
<b>Figura 31.</b> Correlação entre as conversões de XOS do subproduto original (SO) previstas pelo modelo matemático e aquelas obtidas experimentalmente.....	133
<b>Figura 32.</b> Distribuição dos resíduos (diferença entre os valores de conversão de xilana em XOS observados e aqueles calculados pelo modelo matemático) em função dos valores observados para o subproduto original (SO).....	134
<b>Figura 33.</b> Superfície de resposta para o planejamento composto central tendo como variável resposta a conversão de xilana em XOS observada no pré-tratamento do subproduto original (SO). Variáveis (T=temperatura e t=tempo).....	135
<b>Figura 34.</b> Correlação entre as conversões de XOS do subproduto triturado-extraído (STE) previstas pelo modelo matemático e aquelas obtidas experimentalmente.....	138
<b>Figura 35.</b> Distribuição dos resíduos (diferença entre os valores de conversão de xilana em XOS observados e aqueles calculados pelo modelo matemático) em função dos valores observados para o subproduto triturado-extraído (STE).....	139
<b>Figura 36.</b> Superfície de resposta para o planejamento composto central tendo como variável resposta a conversão de xilana em XOS observada no pré-tratamento hidrotérmico do subproduto triturado-extraído (STE). Variáveis (T=temperatura e t=tempo).....	140
<b>Figura 37.</b> Frações insolúveis pós-tratamentos hidrotérmicos nas condições operacionais otimizadas. (a) subproduto original (SO-TO). (b) subproduto triturado-extraído (STE-TO).....	142

- Figura 38.** Hidrolisados hemicelulósicos (frações líquidas) pós-tratamentos hidrotérmicos nas condições operacionais otimizadas. (a) subproduto original (SO-TO). (b) subproduto triturado-extraído (STE-TO)..... 143
- Figura 39.** (a) Subproduto original na condição otimizada seguido de extração alcalina (SO-TO-E). (b) subproduto triturado-extraído na condição otimizada seguido de extração alcalina (STE-TO-E)..... 153
- Figura 40.** Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das diferentes frações do subproduto de *Eucalyptus*. (A) Subproduto original (SO). (B) Subproduto original pré-tratado hidrotérmicamente na condição otimizada (SO-TO). (C) Subproduto original pré-tratado hidrotérmicamente na condição otimizada seguido de extração alcalina (SO-TO-E). Amplificações: 40x,100x, 500x, 1000x e 5000x, respectivamente..... 159
- Figura 41.** Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das diferentes frações do subproduto de *Eucalyptus*. (A) Subproduto triturado-extraído (STE). (B) Subproduto triturado-extraído pré-tratado hidrotérmicamente na condição otimizada (STE-TO). (C) Subproduto triturado-extraído pré-tratado hidrotérmicamente na condição otimizada seguido de extração alcalina (STE-TO-E). Amplificações: 40x,100x, 500x, 1000x e 5000x, respectivamente....160
- Figura 42.** Difratoogramas de raios-x (DRX) das diferentes frações do subproduto de *Eucalyptus*. Subproduto triturado-extraído (STE). Subproduto triturado-extraído pré-tratado hidrotérmicamente na condição otimizada (STE-TO). Subproduto triturado-extraído pré-tratado hidrotérmicamente na condição otimizada seguido de extração alcalina (STE-TO-E). Subproduto original (SO). Subproduto original pré-tratado hidrotérmicamente na condição otimizada (SO-TO). Subproduto original pré-tratado hidrotérmicamente na condição otimizada seguido de extração alcalina (SO-TO-E)..... 161
- Figura 43.** Espectro de RMN CP/MAS <sup>13</sup>C de estado sólido das diferentes frações do subproduto de *Eucalyptus*. Subproduto triturado-extraído (STE). Subproduto triturado-extraído pré-tratado hidrotérmicamente na condição otimizada (STE-TO). Subproduto triturado-extraído pré-tratado hidrotérmicamente na condição otimizada seguido de extração alcalina (STE-TO-E). Subproduto original (SO). Subproduto original pré-tratado

hidrotermicamente na condição otimizada (SO-TO). Subproduto original pré-tratado hidrotermicamente na condição otimizada seguido de extração alcalina (SO-TO-E)..... 165

**Figura 44.** Espectros normalizados (Origin) de FTIR-ATR das diferentes frações do subproduto de *Eucalyptus*. Subproduto triturado-extraído (STE). Subproduto triturado-extraído pré-tratado hidrotermicamente na condição otimizada (STE-TO). Subproduto triturado-extraído pré-tratado hidrotermicamente na condição otimizada seguido de extração alcalina (STE-TO-E). Subproduto original (SO). Subproduto original pré-tratado hidrotermicamente na condição otimizada (SO-TO). Subproduto original pré-tratado hidrotermicamente na condição otimizada seguido de extração alcalina (SO-TO-E)..... 170

**Figura 45.** Cromatogramas típicos de COS. (a) Padrões analíticos de COS. (b) Fração líquida pós-hidrólise enzimática do subproduto original pré-tratado hidrotermicamente na condição otimizada seguido de extração alcalina (SO-TO-E) por 24h. Ambos separados na coluna BIO-RAD Aminex HPX-87C. (C<sub>4</sub>/C<sub>5</sub>/C<sub>6</sub>) celotetrose+celopentose+celohexose, (C<sub>3</sub>) celotriose, (C<sub>2</sub>) celobiose, (C<sub>1</sub>) glicose..... 176

**Figura 46.** Conversão de celulose do subproduto original pré-tratado hidrotermicamente na condição otimizada seguido de extração alcalina (SO-TO-E) em celu-oligossacarídeos (COS) e glicose oriundos da hidrólise enzimática utilizando extrato enzimático rico em atividades de endoglucanases (Celluclast-Novozymes)..... 180

**Figura 47.** Conversão de celulose do subproduto triturado-extraído pré-tratado hidrotermicamente na condição otimizada seguido de extração alcalina (STE-TO-E) em celu-oligossacarídeos (COS) e glicose oriundos da hidrólise enzimática utilizando extrato enzimático rico em atividades de endoglucanases (Celluclast-Novozymes)..... 180

**Figura 48.** Fração insolúvel dos subprodutos original e triturado-extraído na condição otimizada pós-tratamento hidrotérmico seguido de extração alcalina e hidrólise enzimática por endoglucanases (SO-TO-EH e STE-TO-EH).....181

## LISTA DE APÊNDICES

<b>APÊNDICE I:</b> Curvas Analíticas para determinação de celulose e hemicelulose.....	208
<b>APÊNDICE II:</b> Curvas analíticas para determinação de xilo-oligossacarídeos (XOS) e xilose.....	210
<b>APÊNDICE III:</b> Curva analítica para determinação de furfural.....	213
<b>APÊNDICE IV:</b> Curva analítica de glicose com DNS, utilizada para a determinação de atividades de endoglucanases e exoglucanases .....	213
<b>APÊNDICE V:</b> Curva analítica do padrão <i>p</i> -Nitrofenol para determinação de atividade de $\beta$ -glicosidases.....	214
<b>APÊNDICE VI:</b> Curvas analíticas para determinação de celu-oligossacarídeos (COS) e glicose.....	214
<b>APÊNDICE VII:</b> Cromatogramas de íons totais das amostras SO (Figura VII.1) e STE (Figura VII.2).....	216
<b>APÊNDICE VIII:</b> Cromatogramas de íons extraídos dos subprodutos SO (Figuras VIII.1, VIII.2, VIII.3, VIII.4 e VIII.5) e do STE (Figuras VIII.6, VIII.7, VIII.8, VIII.9 e VIII.10).....	217

## SUMÁRIO

RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xv
LISTA DE APÊNDICES.....	xxi
1. INTRODUÇÃO .....	25
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	28
2.1 A Indústria de Celulose: uma Biorrefinaria.....	28
2.2. Materiais Lignocelulósicos (ML): Composição Química e Ultraestrutura .....	30
2.2.1. Celulose.....	32
2.2.2. Hemicelulose .....	34
2.2.3. Lignina .....	36
2.3. Produção de Xilo-oligossacarídeos (XOS).....	41
2.4. Pré-tratamento Hidrotérmico (PTH) em Materiais Lignocelulósicos (ML) .....	42
2.5. Extração alcalina de Materiais Lignocelulósicos (ML).....	46
2.6. Hidrólise enzimática dos Materiais Lignocelulósicos (ML) .....	48
2.6.1. Hidrólise Enzimática de Celulose .....	48
2.6.2. Produção de Celu-oligossacarídeos (COS).....	50
2.7. Oligossacarídeos como Ingredientes Funcionais.....	51
2.7.1. Propriedades e Aplicações dos Xilo-oligossacarídeos (XOS) e celu-oligossacarídeos (COS).....	51
3.0 OBJETIVOS .....	54
3.1. Geral.....	54
3.2. Específicos .....	54
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	55
4.1. Obtenção do material e fluxograma das etapas .....	55
4.2. Planejamento fatorial .....	57
4.3. Pré-tratamento hidrotérmico (PTH) do subproduto de <i>Eucalyptus</i> ....	59
4.4. Caracterização química do subproduto de <i>Eucalyptus</i> .....	61
4.4.1. Determinação do teor de extrativos .....	61

4.4.2. Determinação de lignina insolúvel (Klason) e solúvel.....	62
4.4.3. Determinação dos teores de carboidratos e ácidos orgânicos ....	64
4.5. Caracterização química dos hidrolisados (filtrados) obtidos pós-tratamentos hidrotérmicos .....	66
4.5.1. Determinação de XOS e xilose.....	66
4.5.2. Determinação de furfural .....	68
4.5.3. Determinação de aromáticos solúveis .....	69
4.5.4. Determinação de açúcares e ácidos orgânicos .....	69
4.6. Análise estatística .....	69
4.7. Determinação do fator de severidade (P-Fator).....	70
4.8. Balanço de massa .....	70
4.9. Ensaio experimentais para validação dos modelos matemáticos ....	71
4.9.1. Hidrólise ácida do hidrolisado pós-tratamento hidrotérmico .....	71
4.10. Extração alcalina da fração insolúvel pós-tratamento hidrotérmico otimizado .....	72
4.11. Cromatografia em fase líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (CLAE-MS).....	73
4.12. Caracterizações estrutural das frações insolúveis do SO e STE otimizados pós-tratamento hidrotérmico (SO-TO e STE-TO) .....	75
4.12.1. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	75
4.12.2. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR-ATR).....	76
4.12.3. Difração de Raios-X (DRX).....	77
4.12.4. Espectroscopia Ressonância Magnética Nuclear (RMN) .....	78
4.13. Determinação das atividades enzimáticas dos extratos comerciais	78
4.13.1. Endoglucanase .....	78
4.13.2. Exoglucanase .....	79
4.13.3. $\beta$ -glicosidase.....	80
4.14. Hidrólise enzimática das frações insolúveis dos subprodutos otimizados pós-tratamento hidrotérmico + extração alcalina (SO-TO-E e STE-TO-E).....	81
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	83
5.1. Composição química e pré-tratamento hidrotérmico (PTH) do subproduto de <i>Eucalyptus</i> .....	83
5.2. Determinação dos produtos formados no hidrolisado pós-tratamento hidrotérmico do subproduto de <i>Eucalyptus</i> .....	87
5.3. Análise estatística dos produtos formados no hidrolisado pós-tratamento hidrotérmico .....	93



5.4. Pré-tratamento hidrotérmico (PTH) e composição química do subproduto de <i>Eucalyptus</i> do planejamento composto central (2 <sup>3</sup> ) .....	95
5.5. Avaliação da formação de produtos derivados de hemicelulose e lignina do hidrolisado pós-tratamento hidrotérmico do planejamento composto central (2 <sup>3</sup> ).....	106
5.5.1. Avaliação da formação dos compostos não desejados derivados de hemicelulose e lignina pós-tratamento hidrotérmico.....	107
5.5.2. Avaliação da formação dos compostos desejados derivados de hemicelulose e lignina pós-tratamento hidrotérmico .....	114
5.6. Análise estatística do planejamento composto central (2 <sup>3</sup> ) dos compostos desejados (XOS) .....	130
5.6.1 Subproduto original (SO).....	130
5.7. Ensaio experimentais adicionais para validação dos modelos matemáticos .....	141
5.8. Extração alcalina do material pré-tratado hidrotermicamente na condição otimizada .....	152
5.9. Caracterização estrutural das frações do subproduto de <i>Eucalyptus</i> .....	157
5.9.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	157
5.9.2. Difração de Raios-X (DRX).....	161
5.9.3. Espectroscopia Ressonância Magnética Nuclear (RMN) .....	164
5.9.4. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier em modo de Refletância Total Atenuada (FTIR-ATR).....	168
5.10. Hidrólise enzimática das frações do subproduto de <i>Eucalyptus</i> pré-tratado hidrotermicamente seguido de extração alcalina (SO-TO-E e STE-TO-E).....	173
5.10.1. Avaliação de atividade enzimática de extrato comercial.....	173
5.10.2. Determinação dos produtos formados no hidrolisado pós-tratamento hidrotérmico do subproduto de <i>Eucalyptus</i> .....	174
6. CONCLUSÃO .....	184
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	186
8. APÊNDICES .....	208

## 1. INTRODUÇÃO

A madeira proveniente de *Eucalyptus* representa a principal fonte de fibras nos países da América do Sul para a produção de celulose e papel. O Brasil ocupa lugar de destaque na fabricação mundial de celulose de fibra curta de *Eucalyptus* (1). No ano de 2018 a produção brasileira de celulose foi de 10,4 milhões de toneladas (2). A indústria de celulose gera aproximadamente 0,27 toneladas de resíduos sólidos para cada tonelada de celulose produzida, conforme dados reportados recentemente (3).

Os materiais lignocelulósicos (ML) representam uma fonte de matéria prima pouca explorada e aproveitada. Seu uso está baseado principalmente na cogeração de energia através de sua oxidação (processo de oxidação). Considerando o grande volume de resíduos madeireiros, há recentemente um forte interesse das indústrias de celulose de proporcionar um melhor aproveitamento desses materiais para a produção de produtos de interesse comercial (4).

O processamento de toras de *Eucalyptus* em empresas de produção de celulose gera grandes quantidades de subprodutos (um exemplo é a serragem) que são oxidados para cogeração de energia. Os subprodutos de *Eucalyptus* contêm mais de 60% de celulose e hemicelulose e essas frações contêm baixa eficiência energética sendo uma alternativa o uso delas para produção de bioprodutos de maior valor agregado. Dentre muitas aplicações biotecnológicas, a hemicelulose e a celulose podem ser convertidas em bioprodutos à base de xilo-oligossacarídeos (XOS) e celu-oligossacarídeos (COS) para fins terapêuticos, nutricionais e analíticos. A busca por um estilo

de vida saudável através de cuidados com a alimentação tem impulsionado o interesse por ingredientes de alimentos nutracêuticos, ou seja, aqueles que auxiliam o bom funcionamento do organismo. Entre esses componentes destacam-se os XOS e os COS, os quais são constituídos principalmente por unidades de xilose e glicose, respectivamente, sendo responsáveis por diversos efeitos benéficos relacionados à saúde, tais como a prevenção de cáries, a diminuição de níveis séricos de colesterol e o estímulo do crescimento de bifidobactérias no trato gastrointestinal (5-12). Os efeitos benéficos dos XOS à saúde estão relacionados às propriedades físico-químicas, por serem moderadamente doces, estáveis em uma ampla faixa de pH e temperatura e conferirem características organolépticas aos alimentos, enquanto os COS são importantes para o crescimento de bactérias endógenas tais como *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, melhorando a microflora intestinal (5,13). Além do efeito prebiótico, os XOS têm apresentado uma variedade de aplicações, tais como, antioxidantes, antialérgicos e na prevenção de anemia e arteriosclerose (5,6,12).

Considerando que as operações de fracionamento dos ML contribuem para o alto custo do processo, a auto-hidrólise ou pré-tratamento hidrotérmico (PTH) de *Eucalyptus* (especificamente o subproduto gerado na etapa de obtenção de toras de *Eucalyptus*) seria uma alternativa para a produção de XOS. Considerando que após o PTH a fração insolúvel será rica em celulose e lignina, uma alternativa para o aproveitamento desta fração seria a hidrólise enzimática com celulasas comerciais visando à produção de COS.

Os XOS e COS contêm um alto valor agregado (em média U\$\$ 22-50 dólares por quilo de produto, variando em função da sua pureza) quando comparado a biocombustíveis, celulose e energia elétrica, sendo uma alternativa a ser pesquisada nos setores de celulose e açúcar-álcool (14). Com o desenvolvimento de uma metodologia eficiente para a produção de XOS a partir de ML, como o *Eucalyptus* e bagaço de cana-de-açúcar espera-se impulsionar ainda mais o desenvolvimento de muitos estudos relacionados às suas aplicações.

A proposta de produzir XOS e COS dentro de uma empresa de celulose baseia-se no fato de que esses produtos são potencialmente de maior valor agregado quando comparado à polpa de celulose e energia elétrica. A Fibria, localizada em Jacareí – SP, processa em torno de 2000 toneladas.dia<sup>-1</sup> de cavacos de *Eucalyptus*, sendo que em torno de 200 toneladas.dia<sup>-1</sup> da biomassa não é utilizada para produção de celulose (gerando o subproduto) sendo conduzidas a etapas de oxidação para cogeração de energia elétrica.

O subproduto do processamento de cavacos de *Eucalyptus* seria uma boa alternativa para à produção de XOS e COS, assim, aproveitando melhor essa biomassa, pois a hemicelulose e celulose tem baixo aproveitamento de energia em sua oxidação. Desta forma, a proposta seria produzir XOS com a fração hemicelulósica gerando uma fração rica em lignina e celulose que seria posteriormente aproveitada para produção de COS. Por fim, o “resíduo final” enriquecido em lignina poderia ser aplicado para cogeração de energia elétrica, pois a lignina tem um alto aproveitamento na geração de energia em sua queima.

Dentro do âmbito do conceito apresentado o objeto do trabalho foi avaliar a produção de XOS e COS a partir de um subproduto de *Eucalyptus* oriundo do processamento de *Eucalyptus* da indústria de celulose.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 A Indústria de Celulose: uma Biorrefinaria**

A indústria de processamento de celulose e seus derivados representam uma importante base para a economia mundial. Atualmente, o Brasil é um dos maiores produtores mundiais de celulose proveniente de biomassa de *Eucalyptus* (celulose de fibra curta) (15). A produção de celulose no Brasil cresceu 7,8% nos primeiros seis meses de 2018 em relação ao ano de 2017, o que culminou em 10,4 milhões de toneladas, de acordo com dados divulgados pela Indústria Brasileira de Árvores (Ibá) (16).

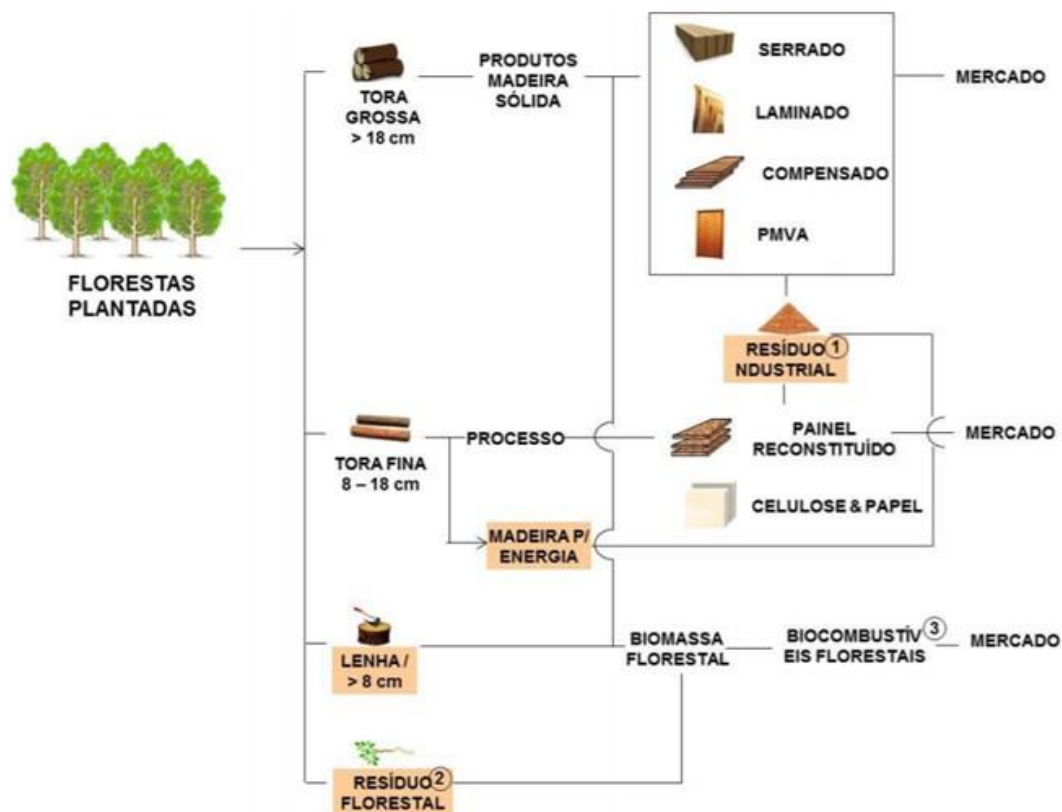
Nos últimos anos, a preocupação com o esgotamento dos combustíveis fósseis, com o aquecimento global e com o aumento da demanda de energia e materiais, fez surgir alternativas em substituição a esses combustíveis, culminando na substituição de fontes de energia não renováveis (principalmente petróleo e gás natural) por matérias primas renováveis (por exemplo: o uso de biomassa lignocelulósica). Desta forma, a biomassa florestal e agrícola tem sido considerada como uma alternativa promissora para a substituição de matérias primas não renováveis. Por esses motivos, nas últimas décadas, a indústria de celulose e seus derivados promoveram

grande interesse, integrando a elas processos modernos e inovadores (17-19).

O Brasil se encontra em uma posição privilegiada em relação ao aproveitamento da biomassa, pois apresenta uma extensa área florestal, grande diversidade de espécies nativas, água em abundância e diversidade climática, e com isso tem se destacado no cenário mundial na utilização de biomassa lignocelulósica, além de ser um dos maiores produtores de celulose proveniente de *Eucalyptus* (15,20). A espécie mais cultivada no Brasil é o *Eucalyptus urograndis*, um híbrido desenvolvido através do cruzamento de *E. grandis* x *E. urophylla*, uma das principais fontes de matéria prima para produção de celulose de fibra curta, e que apresenta como características maior crescimento e rendimento volumétrico (21,22).

O fracionamento da biomassa lignocelulósica é uma técnica inovadora, moderna e promissora da atualidade. Desta forma, pré-tratamentos sob diferentes condições operacionais (por exemplo: pH, temperatura e tempo) são capazes de fracionar a biomassa lignocelulósica gerando frações solúveis e insolúveis que podem conter carboidratos poliméricos, oligossacarídeos e monômeros de açúcares e lignina, que podem ser convertidos em bioprodutos de interesse comercial, como por exemplo: biomateriais, biocombustíveis, prebióticos, fármacos, dentre outros. Desta forma, o intuito da técnica de fracionamento é maximizar o valor da biomassa lignocelulósica e minimizar a produção de subprodutos (19,23-28).

A Figura 1 apresenta de forma resumida o processo de fabricação de celulose, seus derivados e aplicações, bem como, os subprodutos gerados.

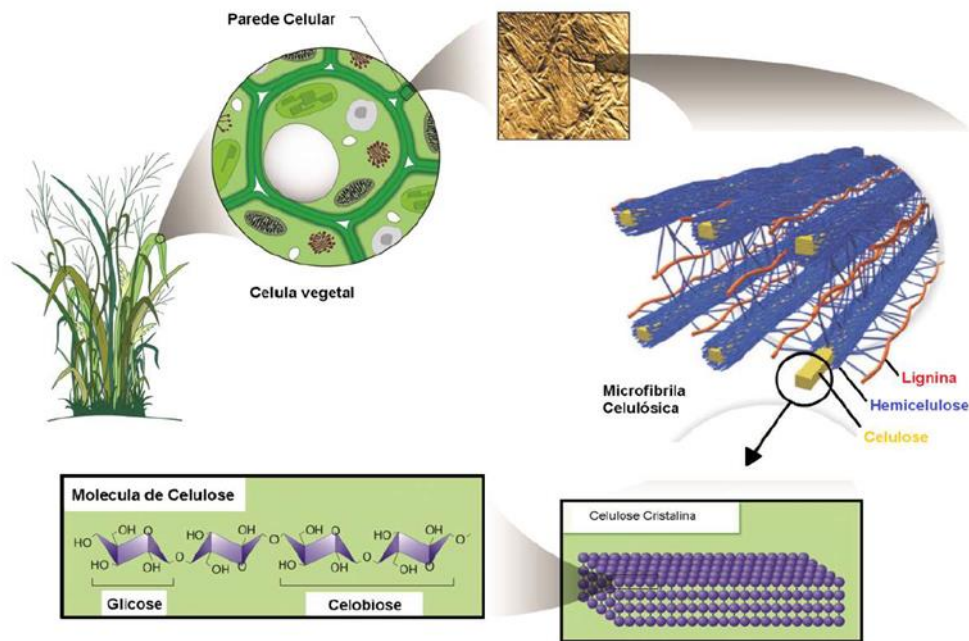


**Figura 1** - Cadeia de produtos florestais. (1) Resíduo industrial (casca, serragem, outros). (2) Resíduo florestal (ponteiras, galhos, casca, ramos, outros). (3) Biocombustíveis florestais (carvão, pellet, etanol celulósico, licor negro, outros) (29).

## 2.2. *Materiais Lignocelulósicos (ML): Composição Química e Ultraestrutura*

Os ML são denominados de biomassas vegetais por serem uma matéria orgânica oriunda de espécies vegetais, bem como por seus subprodutos obtidos nos setores agroindustriais que processam essa matéria prima. Dentre os subprodutos lignocelulósicos destacam-se a palha e o bagaço de cana-de-açúcar (setor de açúcar-etanol); serragem e cavacos de madeira não selecionados no processo (setor celulósico) (30). Os ML são constituídos basicamente por celulose, hemicelulose e lignina. A composição química da

biomassa lignocelulósica varia em função da variedade, condições de crescimento, idade de colheita e parte da planta, e em geral é constituída basicamente de 35-50% de celulose, 23-35% de hemicelulose e 14-30% de lignina (31-36). A Figura 2 apresenta a complexa estrutura dos ML.



**Figura 2** - Estrutura da biomassa lignocelulósica (36). Adaptado - Autor.

Devido as características químicas e morfológicas os ML são considerados recalcitrantes frente a reações químicas e enzimáticas, ou seja, os ML são difíceis de serem convertidos em produtos de interesse. Os principais fatores que tornam os ML recalcitrantes são o grau de polimerização, a área superficial, a porosidade, o teor de lignina e a cristalinidade da celulose (31,33,36,37).

A composição química dos ML pode ser dividida em frações de baixa e elevada massa molar (31,33,36). A fração de baixa massa molar é composta

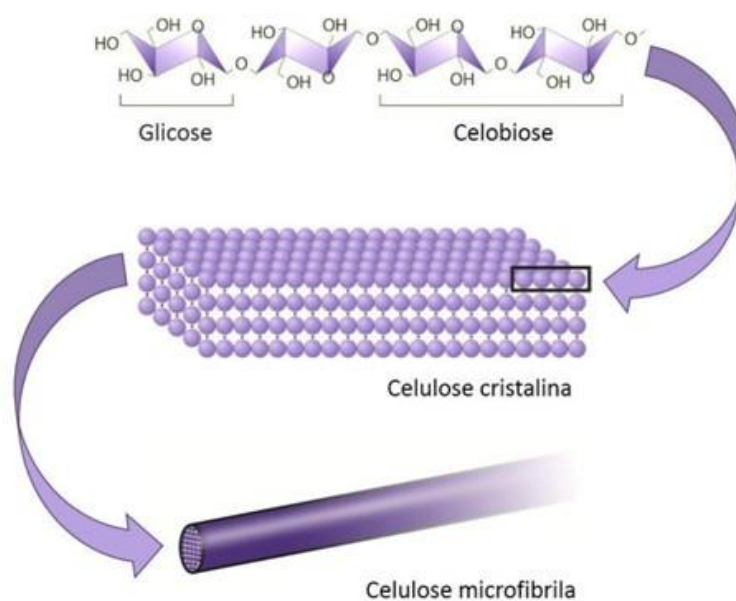


por substâncias orgânicas, geralmente denominadas de extrativos, e substâncias inorgânicas, que são sais de íons metálicos (31,33,36,38). Os extrativos compreendem vários compostos químicos, que podem ser extraídos com solventes orgânicos, embora alguns deles também sejam solúveis em água (31,33,36). Estes compostos são responsáveis por características como odor, cor e sabor e estão presentes em pequenas quantidades nos ML (de 2 a 8%) (38). Como exemplos de extrativos, pode-se citar: ceras, flavanóides, terpenos, lignanas e ácidos graxos, que são encontrados livres ou esterificados. Os compostos inorgânicos estão presentes em quantidades ainda menores nos ML (de 1 a 2%) (31,33,36).

As macromoléculas representam a quase totalidade dos tecidos vegetais e compreendem três classes de compostos distintos: celulose, polioses (hemicelulose) e lignina (31,33,36).

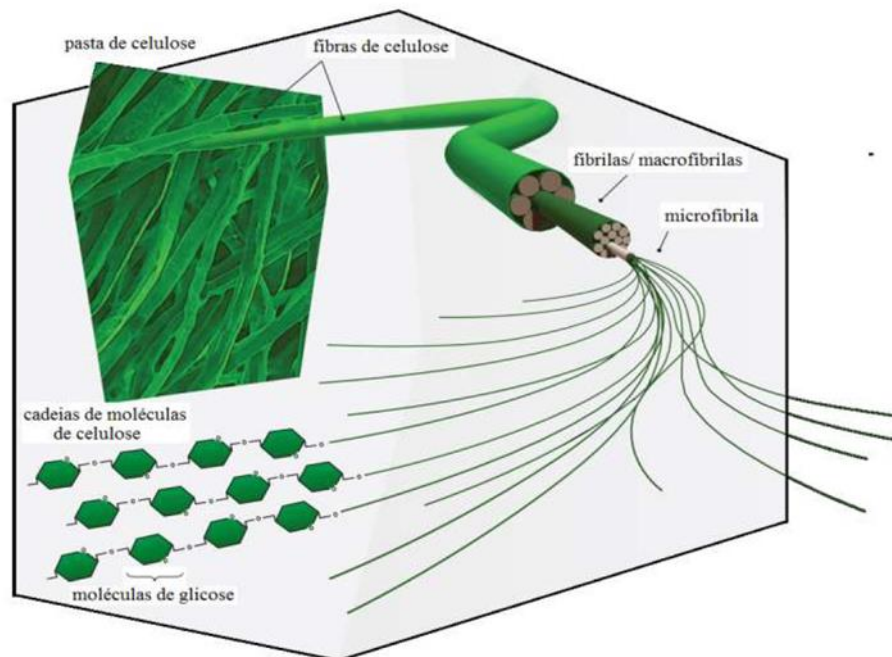
### **2.2.1. Celulose**

A celulose é o componente principal e mais abundante na biomassa vegetal (cerca de 50%), sendo um polissacarídeo linear de elevada massa molecular, contendo regiões amorfas e cristalinas, formado exclusivamente por unidades repetidas de celobiose, molécula que é formada por duas unidades de D-glicopiranosose conectadas através da ligação covalente do tipo  $\beta$ -D-glicopiranosose ( $C_6H_{10}O_5$ )<sub>n</sub>, através da eliminação de uma molécula de água (Figura 3) (31,33,36,40).



**Figura 3** - Representação da estrutura de um fragmento de celulose mostrando a ligação do tipo  $\beta$ -1,4 entre unidades de D-glicopiranosose, as quais formam cadeias lineares (40).

A massa molar da celulose varia consideravelmente (50.000-2,5 milhões  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ), dependendo da origem da amostra. Por tratar-se de um polímero autêntico, o tamanho das cadeias é usualmente especificado como grau de polimerização, que é a razão entre a massa molar média da celulose e a massa molar de uma unidade de anidroglicose. Quanto maior o grau de polimerização da molécula de celulose menor é a sua solubilidade (31,33,41). Outra característica da celulose é a formação de ligações do tipo hidrogênio intramoleculares e intermoleculares, o que dá origem às microfibrilas. As microfibrilas, as quais contém cerca de 36 cadeias de celulose, se agregam formando as fibras celulósicas (42) (Figura 4). Essa estrutura fibrosa que confere alta resistência à degradação e a insolubilidade da celulose na maioria dos solventes (43).



**Figura 4** - Representação estrutural das fibras de celulose (72).

As fibras de celulose são formadas a partir de um aglomerado de microfibrilas, as quais possuem regiões cristalinas que são fortemente organizadas conferindo grande resistência, e regiões amorfas que possuem menor orientação e maior flexibilidade (31,33,36,38).

Na parede celular dos ML, as microfibrilas de celulose estão paralelamente organizadas e encaixadas em uma matriz de hemicelulose e lignina (31,33,36,38).

### **2.2.2. Hemicelulose**

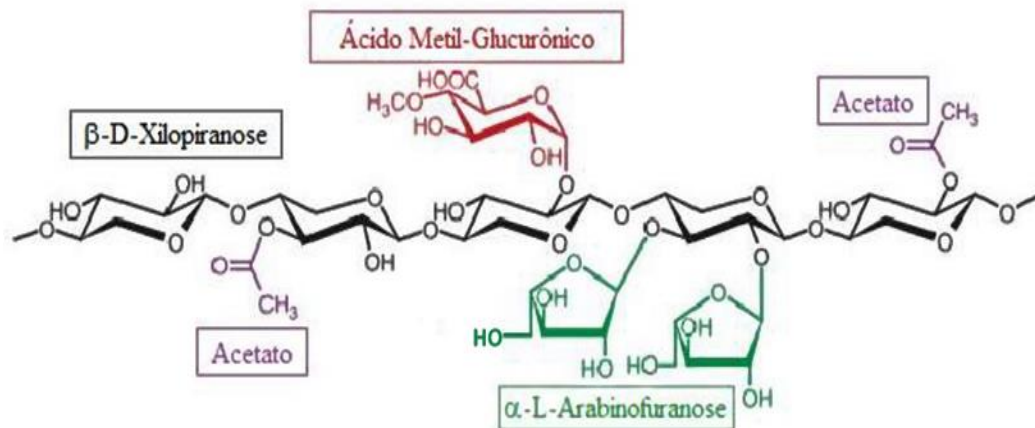
As hemiceluloses (também denominadas de polioses) são polissacarídeos complexos constituintes da parede celular das plantas, as quais ocupam lugar de segundo polímero renovável mais abundante nos ML, sendo que após à celulose em geral 20-35% do complexo lignocelulósico é

composto por este polissacarídeo, variando de acordo com o estágio de desenvolvimento, espécie e tipo de cultivo do vegetal. As hemiceluloses representam um tipo de polissacarídeo de menor grau de polimerização (100-200 unidades) composto de algumas ramificações e grupos laterais. Sua estrutura é constituída principalmente por polímeros formados por hexoses (glicose, manose, ramnose e galactose) e pentoses (xilose e arabinose), podendo ainda apresentar quantidades variáveis de ácidos urônicos (galacturônico, glucurônico e metil-glucurônico) (31,33,44). Estes açúcares apresentam-se na forma de polímeros, de menor massa molar que a celulose e podem ser homopolímeros (por exemplo: xilana, formado por anidroxilose na cadeia principal) ou heteropolímeros (por exemplo: glucomanana, formado por anidroglicose e anidromanose na cadeia principal). O teor de hemiceluloses em diferentes tipos de madeira é bastante variável, podendo-se admitir um valor médio de cerca de 20% (27,31,33).

As hemiceluloses podem ser divididas em diferentes classes (xilanas e mananas) e subclasses (glucuronoxilanas, arabinoxilanas, glucomananas, galactoglucomananas, xiloglucanas, arabinoglucuronoxilanas, entre outras) que variam de acordo com a espécie da planta, tipo de tecido e estágio de desenvolvimento (45).

As xilanas são as hemiceluloses mais comuns de madeira de folhosas e gramíneas e são constituídas de uma cadeia principal composta de unidades de  $\beta$ -xilopiranosas unidas por ligação do tipo  $\beta$ -1,4 com a presença de grupos laterais, como o ácido 4-O-metilglucurônico, acetato e  $\alpha$ -L-arabinofuranose (Figura 5) (33,44,46).

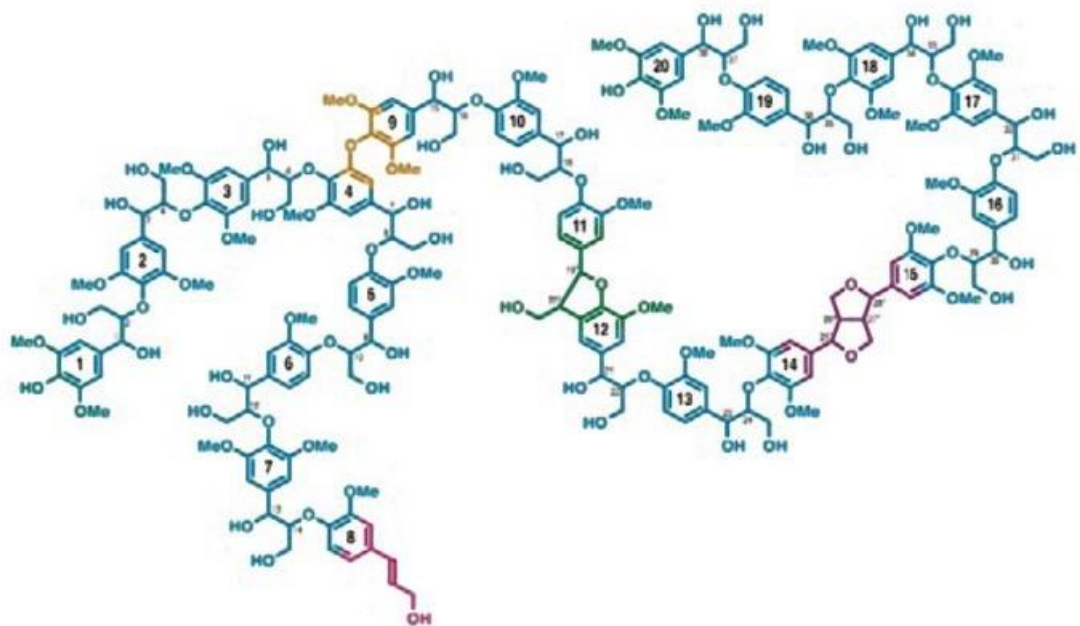
As xilanas destacam-se como uma excelente matéria prima para formação de produtos de alto valor agregado, como xilitol e xilo-oligossacarídeos (XOS) (47).



**Figura 5** - Estrutura típica de xilana encontrada principalmente em madeiras de folhosas e gramíneas (Adaptado de (46)).

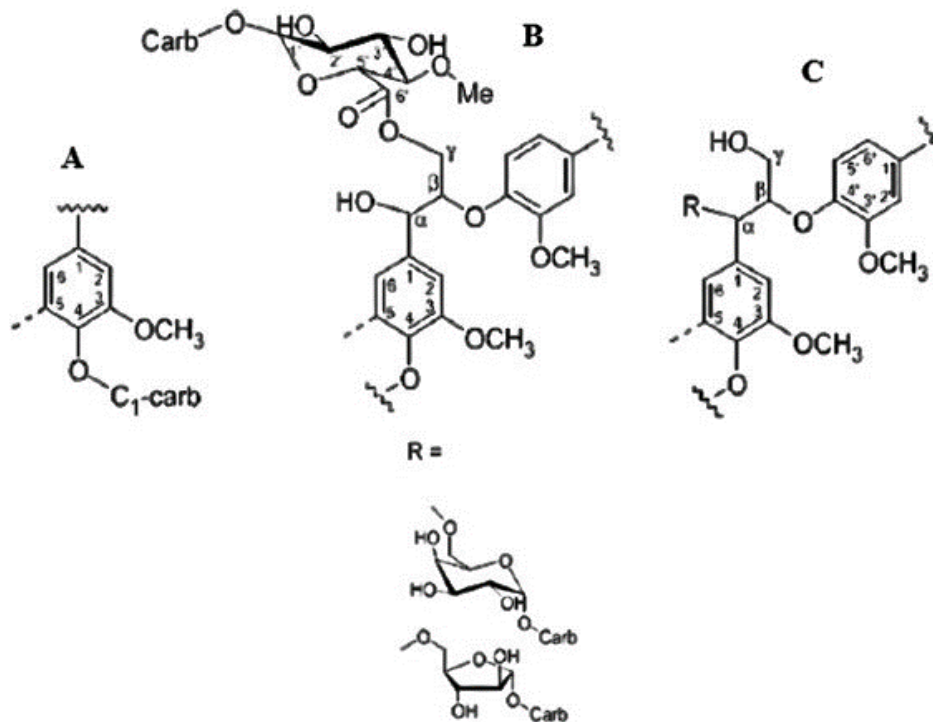
### 2.2.3. Lignina

A lignina é uma macromolécula formada pela polimerização desidrogenativa de álcoois hidroxicinâmicos (p-cumarílico, coniferílico e sinapílico). A macromolécula de lignina possui estrutura bastante complexa devido ao processo de polimerização ser aleatório, como apresentado no modelo da figura 6 (48).



**Figura 6** - Estrutura – modelo da lignina de madeiras de folhosas (48).

Parte das moléculas de lignina está ligada quimicamente com as hemiceluloses, ou seja, existe um complexo lignina-carboidrato na estrutura química da parede celular do vegetal. Algumas ligações já descritas para as conexões entre lignina e carboidratos em madeiras são mostradas na figura 7 (49).



**Figura 7** - Principais tipos de ligações entre carboidratos e lignina em complexos lignina-carboidrato: (A) fenol glicosídeo, (B) éster e (C) éter benzílico. (49). carb = carboidrato.

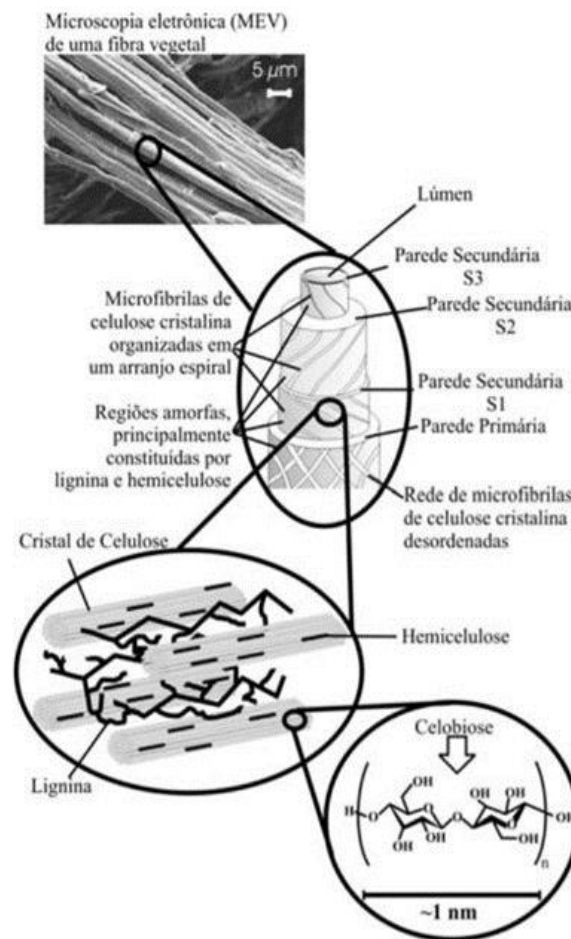
A ocorrência dessas ligações foi confirmada em complexos lignina-carboidrato isolados de pinho moído, a partir da caracterização por ressonância magnética nuclear em duas dimensões. A Figura 7A apresenta uma ligação do tipo fenol glicosídeo; em 7B uma ligação do tipo éster e; em 7C uma ligação do tipo éter benzílico. No caso da ligação fenol glicosídica, a área correspondente no espectro foi integrada indicando que essa ligação está presente em aproximadamente 8 unidades para cada 100 unidades C<sub>9</sub> da lignina.

A grande complexidade estrutural da lignina faz dela uma das macromoléculas naturais mais difíceis de caracterizar quimicamente. A maior parte da lignina não pode ser removida da matriz lignocelulósica sem que haja

alterações estruturais durante a etapa de extração. Além disso, nenhum método de caracterização “*in situ*” é informativo o suficiente para ser empregado de forma conclusiva sem o auxílio de outras metodologias. Portanto, a melhor maneira de estudar a estrutura dessa macromolécula parece ser através do emprego de vários métodos complementares, que forneçam resultados corroborativos.

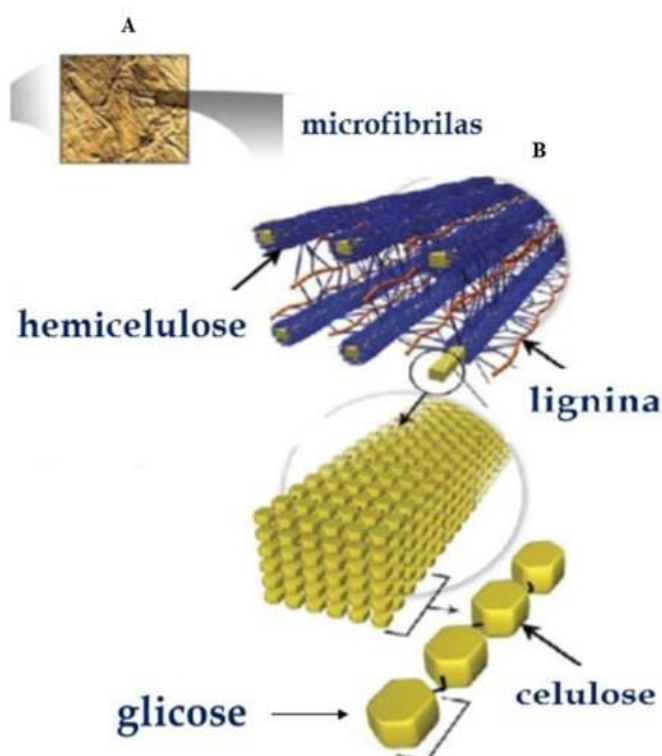
A Figura 8 apresenta a organização de uma fibra vegetal. A fibra lignocelulósica tem uma estrutura de camadas complexas, constituída pela lamela média (Interface entre as células de fibras, rica em lignina), parede primária fina (formada durante o crescimento das células) e a parede secundária. A parede secundária é constituída por três camadas ( $S_1$ ,  $S_2$  e  $S_3$ ), onde a camada intermediária ( $S_2$ , mais espessa) determina as propriedades mecânicas da fibra e consiste em uma série de microfibrilas, helicoidalmente formadas por longas cadeias de celulose e organizadas no sentido da fibra (50).





**Figura 8** - Estrutura de uma fibra vegetal. A imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura (MEV) se refere à fibra de madeira de *Eucalyptus* (50).

É importante ressaltar que os componentes da madeira se encontram intimamente associados, formando longas cadeias de celulose interligadas por ligações de hidrogênio com moléculas de hemicelulose entrelaçadas, e encapsulada pela lignina, para assim constituir o complexo celular da biomassa vegetal (51). Na parede celular do vegetal, tais compostos se organizam formando diferentes camadas. A Figura 9AB apresenta a microscopia eletrônica e um modelo de como as microfibrilas de celulose estão organizadas de forma paralela e encaixadas em uma matriz de hemicelulose e lignina (31,33,36,38).



**Figura 9** - (A) Microscopia eletrônica de lignocelulósico. (B) Modelo que explica como as microfibrilas de celulose estão organizadas e encaixadas em uma matriz de hemicelulose e lignina presente em um material lignocelulósico (ML) (36), modificado por NETO, 2019.

### **2.3. Produção de Xilo-oligossacarídeos (XOS)**

Os XOS são obtidos industrialmente a partir da biomassa lignocelulósica através da hidrólise ácida e/ou enzimática (9,52). A fração hemicelulósica extraída dos ML, contém uma gama de moléculas que podem ser convertidas a diferentes bioprodutos. Dentre eles destacam-se o xilitol e o etanol (oriundo da xilose), XOS, ácido acético, furfural (utilizado como intermediário químico para outros bioprodutos) dentre outras moléculas (53-55).

Os XOS são oligômeros constituídos de unidades de xilose ligados através de ligações do tipo  $\beta$ -(1-4) xilosídicas e apresentam variedades na proporção e tipo de grupos laterais como acetil, ácidos urônicos e fenólicos. A

composição depende da origem do material e do processo de extração (57). Os XOS podem ser obtidos basicamente por diferentes processos hidrolíticos sobre os ML: básico, ácido ou enzimático. Além disso, os XOS podem ser produzidos a partir da molécula de xilana previamente extraída dos ML, ou sem sua prévia extração (58).

### **2.3.1. Pré-tratamento Hidrotérmico (PTH) em Materiais Lignocelulósicos (ML)**

O pré-tratamento é uma das etapas operacionais mais importantes, em termos de custos diretos, envolvidas na produção de XOS a partir da biomassa lignocelulósica, e o principal objetivo é promover uma alteração físico-química na matriz dos ML, reduzindo a cristalinidade da celulose, solubilizando as hemiceluloses e separando-as da matriz de lignina/carboidratos, facilitando assim a produção de XOS e as etapas subsequentes do processo, pois desta forma há maior acessibilidade e susceptibilidade à ação das enzimas na etapa de hidrólise enzimática (59,60).

A alteração nas características estruturais da matriz lignocelulósica pode ser realizada por diversos pré-tratamentos. Atualmente, tem surgido diversos tipos de pré-tratamento com o objetivo de fracionar e aproveitar os ML, dentre eles estão, os biológicos (emprego de fungos ou bactérias), físicos (trituração, microondas e extrusão), químicos (alcalino, ácido, oxidativo, organosolve e líquido iônico), físico-químico (explosão à vapor e hidrotérmico) ou ainda uma combinação entre eles (61-63). Os pré-tratamentos mais utilizados para XOS são os químicos e físico-químicos pois promovem um aumento na área superficial da biomassa devido a redução do tamanho da partícula e do grau

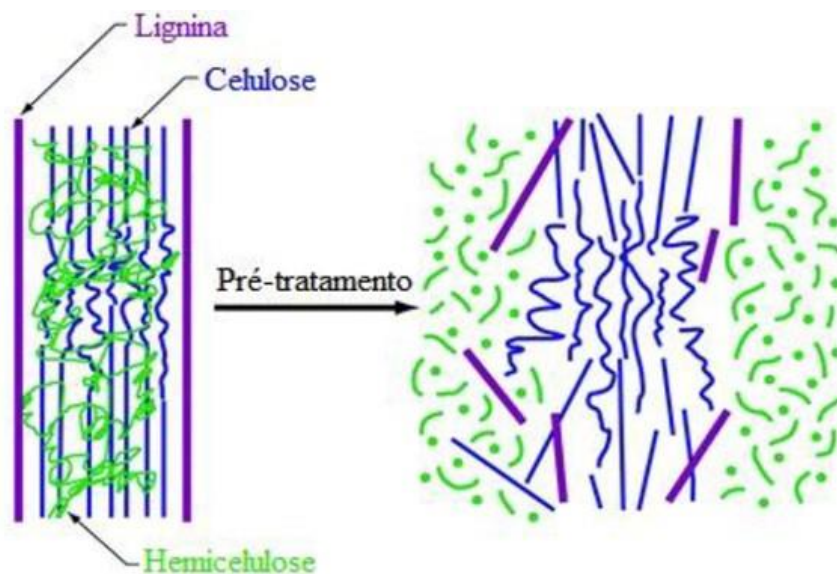
de cristalinidade da celulose, ou seja, promovem modificações químicas e estruturais na parede celular dos ML. O PTH se enquadra nesse tipo de tratamento (59,63,64).

A escolha do pré-tratamento mais adequado para cada processo envolve muitas variáveis operacionais e efeitos, tais como: a natureza da biomassa, produtos desejados e aplicação dos mesmos, custos, impacto ambiental, minimizar a degradação de açúcares em compostos tóxicos, aumentar a área superficial, diminuir a cristalinidade e despolimerizar parcialmente a celulose, solubilizar as hemiceluloses ou lignina, modificar a estrutura da lignina, não produzir resíduos sólidos, reduzir custos operacionais e de capital (59,66,67).

O PTH (também conhecido como auto-hidrólise) requer apenas adição de água. Desta forma, o PTH é considerado uma tecnologia limpa que utiliza apenas água durante o processo, o que diminui a corrosão de equipamentos e a geração de resíduos (44).

O PTH é realizado nos ML em temperaturas entre 140 e 240 °C, em reatores contínuos ou em batelada preenchido com material no estado sólido adicionado de água (permitindo o controle da consistência do meio reacional) com controle de temperatura e pressão (68). A pressão é aplicada para manter a água no estado líquido a temperaturas elevadas, o que provoca alteração na estrutura dos ML (Figura 10). Nas situações de elevadas pressões e temperaturas no meio reacional com água, há geração de maior quantidade de íons hidrogênio, o que acidifica o meio. Esses íons atuam como catalizadores na hidrólise da hemicelulose liberando moléculas de ácido

acético e outros ácidos orgânicos. Desta forma, sob condições operacionais mais severas, reações de condensação entre furfural, lignina e/ou reações de oxidação de açúcares podem ocorrer, enquanto que em condições operacionais mais brandas os produtos de decomposição de açúcar são produzidos em menores quantidades (33,69).



**Figura 10** - Efeito do pré-tratamento hidrotérmico (PTH) em materiais lignocelulósicos (ML) (70).

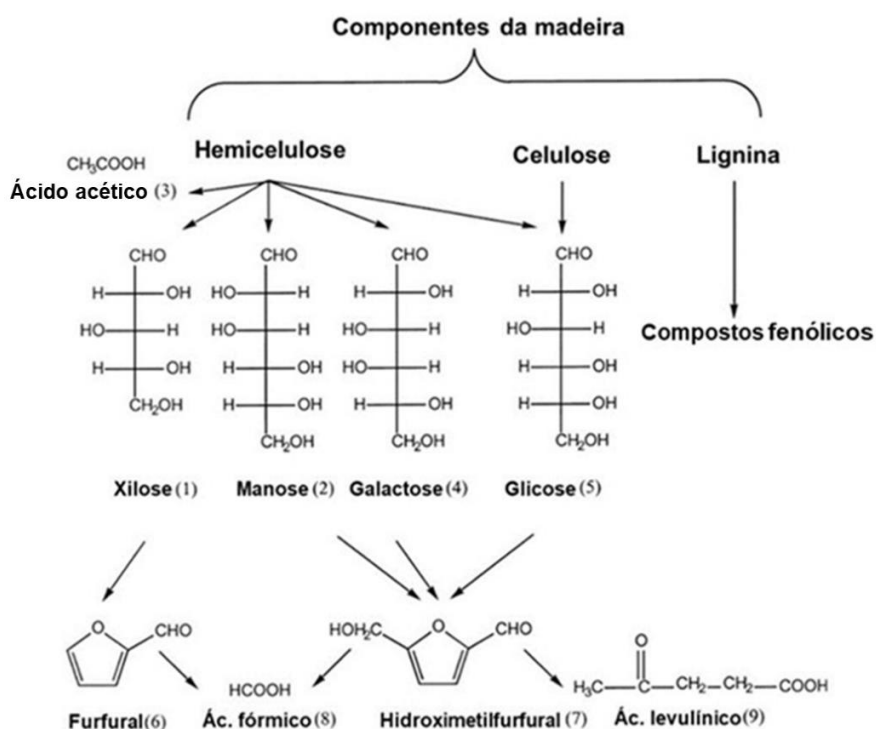
A temperatura, o tempo e a relação sólido/líquido (consistência) são as principais variáveis do PTH. Através da relação entre essas variáveis se determina o fator de severidade (P-Fator) do processo, o qual apresenta efeito direto sobre a acidificação do meio pela clivagem dos grupos acetil, geração dos produtos de degradação de açúcares e grau de polimerização dos XOS (71,72).

Os hidrolisados típicos do PTH contêm uma mistura de oligômeros de açúcares (principalmente XOS, no caso de materiais que são compostos de xilanas), monossacarídeos (principalmente xilose, no caso de materiais que são compostos de xilanas), ácido acético, além dos produtos de

decomposição de açúcares (furfural, hidroximetilfurfural (HMF), ácidos levulínico e fórmico) (73,74).

Os produtos de degradação formados apresentam efeitos negativos nas etapas subsequentes de hidrólise. Esses inibidores são classificados com base na sua origem em: ácidos fracos (ácido acético e ácido fórmico), furanos (furfural e HMF) e compostos fenólicos, e suas concentrações e composição variam de acordo com o tipo de pré-tratamento e das condições operacionais. A primícia desse método consiste em minimizar a quantidade de compostos tóxicos com menor consumo de energia (30,75,76).

A Figura 11 apresenta as principais vias de degradação das frações polissacarídicas que podem ocorrer nos ML na etapa de PTH, além da origem dos compostos indesejáveis resultantes do processo (75).



**Figura 11** - Vias de degradação das frações polissacarídicas dos materiais lignocelulósicos (ML) que podem ocorrer na etapa de pré-tratamento hidrotérmico (PTH) (75).

Durante o PTH dos ML, a xilana é clivada em oligossacarídeos de alta massa molecular, que por sua vez são clivados em XOS de menor massa molecular, até a formação de xilose monomérica. Além disso, o PTH provoca a clivagem das ligações entre os grupos acetil (éster), arabinosil (éter) e ácidos urônicos (éster) e xilana, liberando no meio reacional os grupos laterais da molécula de xilana (arabinose, ácido 4-O-metil-glicurônico e ácido acético). A xilana e os oligômeros de alta massa molecular são pouco solúveis em água. À medida que os oligômeros são hidrolisados a XOS, sua solubilidade aumenta e eles passam para a fase aquosa.

Uma avaliação do PTH em uma mistura de madeira de folhosas foi reportada na literatura (77). A temperatura e o tempo foram as duas variáveis aplicadas ao PTH. A temperatura foi variada de 130-170 °C, enquanto o tempo de 15-500 min. Essas condições proporcionaram conversões de xilana em XOS da ordem de 13-53% (%massa/massa) (77).

Um estudo reportou um PTH em madeira de *Eucalyptus urophylla* e *Eucalyptus grandis* (78). O PTH foi realizado em temperatura de 170 °C e tempo de 60 min. Nessas condições a conversão média de xilana em XOS foi de aproximadamente 45% (%massa/massa). Entretanto, as conversões de xilana em xilose e furfural foram de aproximadamente 7,5% e 3,6%, respectivamente (%massa/massa) (78).

#### **2.4. Extração alcalina de Materiais Lignocelulósicos (ML)**

A hidrólise enzimática de celulose à glicose em ML pré-tratados hidrotermicamente apresenta baixos rendimentos de conversão (menor que

20%). O rendimento baixo pode ser explicado devido a estrutura cristalina da celulose, além do encapsulamento da celulose pela lignina, o que dificulta o acesso das enzimas ao substrato. Essa dificuldade também aumenta devido à celulase adsorver à lignina (adsorção improdutiva). Devido a esse fato torna-se necessário uma etapa extra com o objetivo de solubilizar parcialmente a lignina e desestruturar a estrutura cristalina da celulose, tornando as moléculas de celulose e hemicelulose mais expostas à ação das enzimas, aumentando dessa forma o rendimento de conversão de celulose em glicose (podendo atingir 90%). Desta forma, o PTH seguido de extração alcalina com NaOH seria uma alternativa para melhorar o rendimento da hidrólise enzimática em ML previamente pré-tratados hidrotermicamente.

O tratamento alcalino tem como objetivo remover e/ou modificar a hemicelulose e a lignina e aumentar a disponibilidade de celulose, a fim de obter alto rendimento em açúcares (tanto hexoses quanto pentoses) na hidrólise enzimática dos ML, pois a hemicelulose e a lignina formam uma barreira física, protegendo a celulose do ataque enzimático, a qual não é removida na etapa do PTH (79). Além disso, a extração alcalina com NaOH nos ML provoca aumento da área superficial interna, diminuição da cristalinidade da celulose e a clivagem das ligações do complexo lignina-carboidrato, promovendo a solubilização da lignina (80,81).

Sun et al. (82) reportaram um PTH em madeira de *Eucalyptus urophylla* (180 °C por 30 min), seguido de extração alcalina com NaOH 2% (m.v<sup>-1</sup>) a 90 °C por 2,5 h, seguido de hidrólise enzimática, obtiveram conversão de celulose em glicose de aproximadamente 66,3%.



## **2.5. Hidrólise enzimática dos Materiais Lignocelulósicos (ML)**

A hidrólise enzimática consiste em hidrolisar a fração polissacarídica (cadeias de hemicelulose e celulose) dos ML à oligômeros e monômeros através do processo catalisado por enzimas denominadas de hemicelulases e celulasas. As características do complexo enzimático e do substrato escolhido determinam as condições de temperatura, pH, tempo de sacarificação, atividade enzimática e a consistência (relação sólido/líquido) em que o processo deve ser realizado. Devido à especificidade das enzimas, não ocorre a formação de subprodutos, porém para que haja um alto rendimento, é necessário um nível de atividade enzimática adequada para obter uma alta conversão de celulose em produtos, o que eleva o custo de produção (83-85).

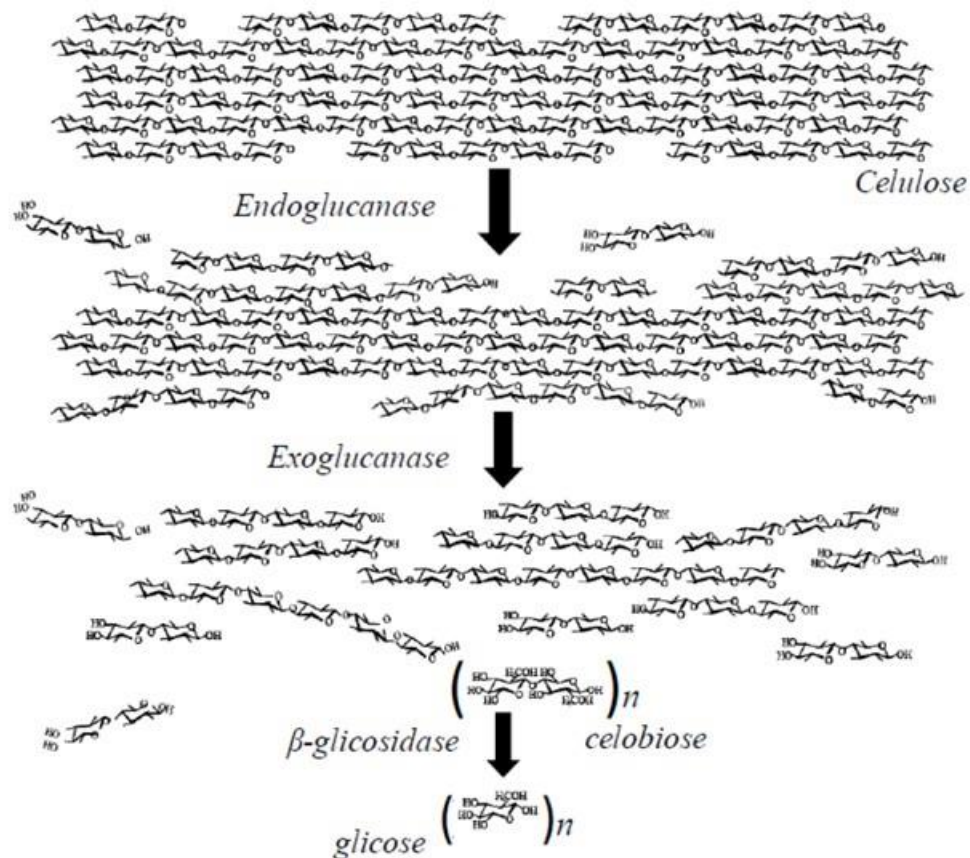
A porosidade, a cristalinidade e o grau de polimerização da celulose e o teor de lignina e hemicelulose na biomassa, são fatores que afetam a hidrólise enzimática da celulose. Desta forma, se o substrato contém uma alta cristalinidade, baixa porosidade e um alto teor de lignina, a catálise enzimática da celulose não será eficiente, do contrário a eficiência será alta e conseqüentemente o tempo necessário para a hidrólise enzimática será menor (86). A catálise enzimática da celulose é realizada sob condições mais amenas, porém requer tempos mais longos de reação (até 72 h) (87).

### **2.5.1. Hidrólise Enzimática de Celulose**

A celulose é um polímero linear com ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -1,4 entre unidades de D-glicopirranose que necessita de um complexo enzimático, denominado celulasas, para catalisar diferentes regiões da fibra de celulose.

Esse complexo se caracteriza por ser altamente específico e por atuar de forma sinérgica (34,88,89). Para uma hidrólise enzimática eficiente da celulose é necessário a ação sinérgica de enzimas, as quais são divididas em três grupos principais: endoglucanases, exoglucanases (celobiohidrolase I e II) e  $\beta$ -glucosidases. Esses três grupos catalisam a hidrólise das ligações do tipo  $\beta$ -1,4 glicosídicas, e atuam sinergicamente, criando novos sítios para hidrólise, além de reduzir a inibição pelo produto (90,91) (Figura 12).

As endoglucanases catalisam de forma aleatória as cadeias de celulose, gerando oligossacarídeos parcialmente solúveis de diferentes graus de polimerização contendo extremidades redutoras e não redutoras (92). As exoglucanases são divididas em duas categorias, como se segue: celobiohidrolases I que catalisam as extremidades redutores e celobiohidrolases II que catalisam as extremidades não redutores dos oligossacarídeos oriundos da hidrólise enzimática da celulose pelas endoglucanases (92,93). As  $\beta$ -glucosidases catalisam a celobiose e celu-oligossacarídeos (COS) de cadeia curta em glicose (94).



**Figura 12** - Ilustração do modo de ação do complexo enzimático na molécula de celulose (95).

### 2.5.2. Produção de celu-oligossacarídeos (COS)

Os COS são oligômeros constituídos de monômeros de glicose ligados através de ligações do tipo  $\beta$ -(1-4) glicosídicas. Os COS são obtidos principalmente via hidrólise enzimática de matérias primas ricas em celulose. As celulasas são as enzimas que catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -1,4 presentes na molécula de celulose (96,97). A hidrólise enzimática da celulose direcionada para a produção de COS deve ser realizada com extratos comerciais que contenham baixa atividade de exo-1,4- $\beta$ -D-glucanases e 1,4- $\beta$ -D-glicosidases, pois essas enzimas hidrolisam a

celulose em celobiose e glicose, que não é interessante para um processo de produção de COS.

## **2.6. Oligossacarídeos como Ingredientes Funcionais**

Os oligossacarídeos são cadeias constituídas de açúcares monoméricos que contém um grau de polimerização relativamente baixo (2-20 unidades de açúcares monoméricos) encontrados naturalmente (alimentos como frutas, leite, mel e vegetais) ou produzidos a partir de polissacarídeos de ML. Muitos destes compostos possuem atividades funcionais que são favoráveis à saúde dos consumidores, pois não são cariogênicos, possuem baixo valor calórico e estimulam o crescimento de bactérias benéficas no cólon. Além disso, os oligossacarídeos melhoram a qualidade dos alimentos, promovendo modificações no sabor e nas propriedades físico-químicas (9,98).

### **2.6.1. Propriedades e Aplicações dos Xilo-oligossacarídeos (XOS) e celulo-oligossacarídeos (COS)**

Os XOS e os COS apresentam notável potencial para a utilização em muitos campos, incluindo o setor alimentício (alimentos funcionais, prebióticos, aditivos em ração de animais domésticos e peixes); no setor farmacêutico (controle da obesidade, tratamento de infecções gastrointestinais, agente ativo contra osteoporose, otite e disfunções na pele e cabelo) e na agricultura (estimulante e acelerador do crescimento) (7-12).

Diversas pesquisas estão sendo realizadas para evidenciar as propriedades físico-químicas e biológicas dos XOS e COS. Há estudos relacionados à doçura, amargor, higroscopicidade, atividade de água,

ativação e estabilização de proteína, sabor e cor, destacando-se sua aplicação como agente de reforço organoléptico em bebidas. Entre as propriedades biológicas investiga-se a digestibilidade e não-digestibilidade, propriedades anti-cariogênicas e não-cariogênicas, ação bacteriostática, seletividade a proliferação de bifidobactéria (7-12). Além dessas vantagens, essas substâncias não apresentam toxicidade ou exibem efeitos negativos em humanos.

As aplicações mais importantes dos XOS, em termos de mercado, correspondem a ingredientes para alimentos funcionais (por exemplo, em combinação com extrato solúvel de soja, refrigerantes, chá, produtos derivados de leite), iogurtes, doces, bolos, biscoitos, massas, além de alimentos especiais para idosos e crianças ou como componentes ativos de preparações simbióticas (99,100). Os XOS que possuem de 2 a 4 unidades de xilose são considerados importantes insumos para a indústria de alimentos e fármacos. No processamento de alimentos os XOS apresentam maiores vantagens em relação à inulina, em termos de resistência térmica e a ácidos, permitindo sua utilização em sucos com baixo pH e bebidas carbonatadas (6).

Os COS possuem propriedades benéficas à saúde, podendo ser aplicado em indústrias de alimentos funcionais e farmacêuticos (101). Segundo Hasan et al. (12), os COS podem ser usados como prebióticos na dieta suplementar em peixes a fim de controlar o crescimento de bactérias patogênicas tais como *Streptococcus*.

Os COS são ingredientes alimentares não digeríveis devido às suas ligações  $\beta$ -1,4. Esses oligossacarídeos não são hidrolisados pelas enzimas

digestivas, e, portanto alcançam as partes distais do intestino onde são assimilados com as bactérias probióticas, servindo como substrato seletivo o qual estimula o crescimento de bactérias endógenas, tais como *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (13). Portanto, os COS podem ser considerados como um aditivo alimentar promissor para promover o crescimento de bactérias probióticas benéficas (96). Segundo Cho et al. (96), a maioria dos estudos anteriores foram direcionados apenas em relação à caracterização e eficácia de  $\beta$ -COS, havendo falta de pesquisas em relação a sua produção.

Os subprodutos agroindustriais estão entre as maiores fontes de biomassa no mundo, representando 40 milhões de toneladas de subprodutos lignocelulósicos por ano, gerando considerável prejuízo às atividades econômicas do setor agroindustrial e ao meio ambiente. Os XOS e COS possuem a vantagem de serem obtidos através de fontes altamente disponíveis e de baixo custo, como os subprodutos florestais e agroindustriais, sendo uma alternativa econômica favorável, pois contribui significativamente para a diminuição de biomassa residual no meio ambiente (6,58).

Com o desenvolvimento de uma metodologia eficiente para a produção de XOS e COS a partir de ML, como o *Eucalyptus* e bagaço de cana de açúcar espera-se impulsionar ainda mais o desenvolvimento de muitos estudos relacionados às suas aplicações.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Geral

Avaliar a produção de xilo-oligossacarídeos (XOS) e celu-oligossacarídeos (COS) a partir de um subproduto de *Eucalyptus* oriundo do processamento de *Eucalyptus* de uma empresa de celulose.

#### 3.2. Específicos

- Caracterizar quimicamente o subproduto de *Eucalyptus* triturado-extraído (livre de extrativos - STE);
- Avaliar o efeito do PTH sobre o subproduto de *Eucalyptus* original (SO) e triturado-extraído (STE);
- Caracterizar quimicamente a fração solúvel e insolúvel pós-tratamentos hidrotérmicos do subproduto em estudo (SO e STE);
- Otimizar o PTH sobre o subproduto em estudo visando à produção de XOS (SO e STE);
- Realizar extração alcalina do “resíduo insolúvel” (rico em celulose e lignina) oriundo da produção de XOS (PTH otimizado do SO e STE);
- Caracterizar estruturalmente as diferentes frações do subproduto em estudo obtidas anteriormente;
- Avaliar o efeito da hidrólise enzimática da fração celulósica do “resíduo insolúvel” (rico em celulose e lignina) oriundo de produção de XOS (PTH otimizado seguido de extração alcalina do SO e STE) com celuloses comerciais visando à produção de COS;

- Analisar o potencial de produção de XOS e COS a partir do subproduto de *Eucalyptus* em escala de laboratório;

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Obtenção do material e fluxograma das etapas

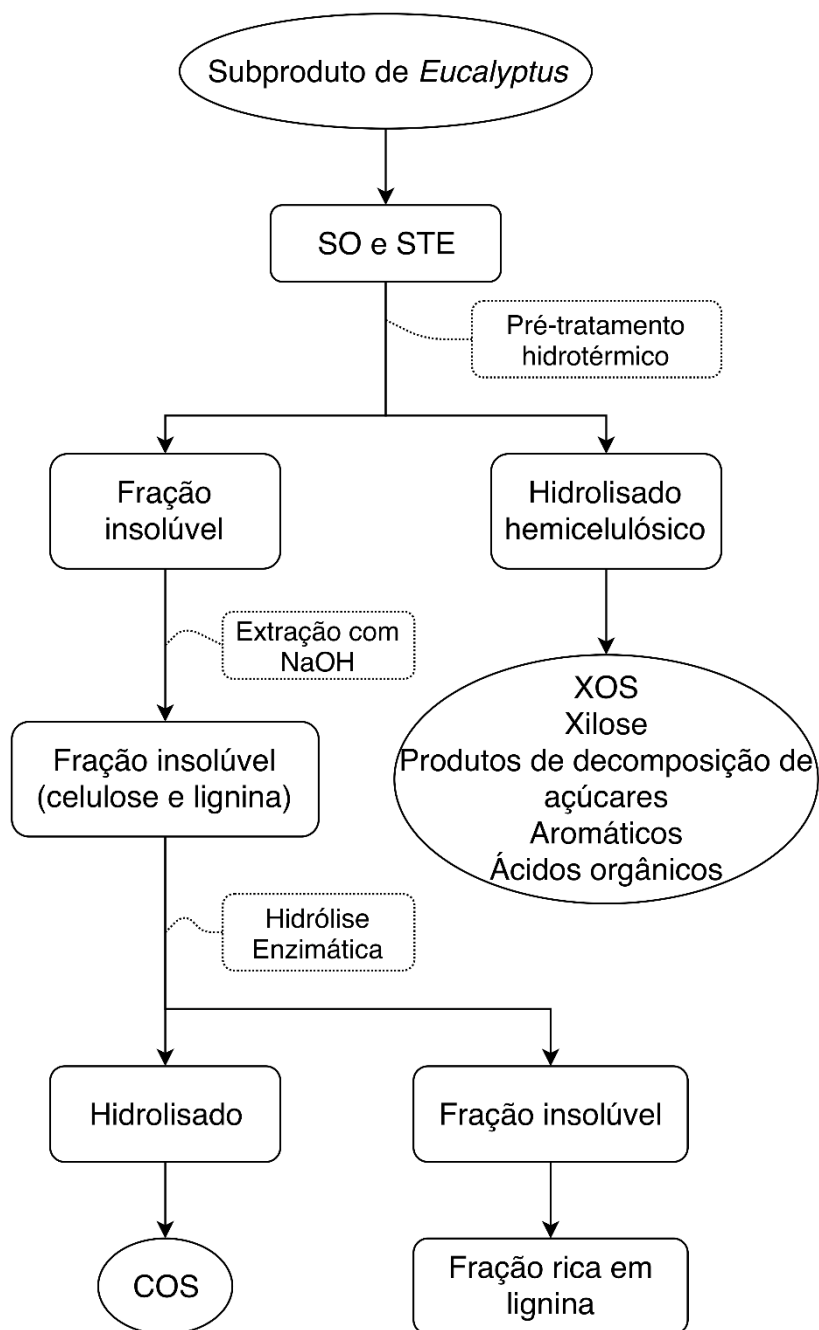
A madeira a ser utilizada nesse trabalho foi uma mistura de *Eucalyptus* (*Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla*) que é biomassa processada diariamente na Fibria Celulose, localizada em Jacareí-SP. Durante a etapa de corte das toras de madeira (produção de cavacos de madeira) um material com uma menor granulometria também é gerado. Desta forma, foi selecionado um lote desse subproduto (serragem) obtido concomitante a produção de cavacos de madeira. O subproduto foi seco a temperatura de 25 °C. Uma fração do lote do subproduto obtido foi triturado em um moinho de facas (Marca Solab, tela de retenção de 0,84 mm) para uniformizar a amostra. A Figura 13 apresenta o subproduto de *Eucalyptus* original (SO) gerado no processamento de cavacos de madeira na empresa de celulose.



**Figura 13** - Subproduto original (SO) oriundo do processamento de cavacos de madeira de *Eucalyptus* da indústria de celulose. FONTE: Autor, (2019).



As etapas desenvolvidas no projeto estão apresentadas sumariamente na forma de fluxograma (Figura 14). Os detalhes de cada etapa serão apresentados a seguir.



**Figura 14** - Fluxograma geral das etapas a serem desenvolvidas com o subproduto de *Eucalyptus* gerado no processo de produção de celulose. FONTE: Autor, (2019).

#### 4.2. Planejamento fatorial em pré-tratamento hidrotérmico (PTH)

O PTH foi realizado em duas frações do subproduto em estudo: subproduto original (SO) e o subproduto previamente triturado-extraído (STE) (item 4.4.1). Para a realização do PTH foi utilizada a técnica de planejamento fatorial  $2^3$  (Tabela 1). As variáveis estudadas (tempo, temperatura e consistência – relação massa/volume) e seus respectivos níveis, foram baseados em trabalhos de PTH para produção de XOS de diferentes resíduos agroindustriais (102,103). O planejamento fatorial proposto foi realizado a fim de se determinar condições ideais para o PTH visando a produção de XOS (Tabela 1). O tratamento estatístico do planejamento fatorial proposto foi realizado no software *Statistica* (versão 10) utilizando como fator resposta as conversões da fração de xilana em XOS (xilobiose + xilotriose + xilotetraose + xilopentaose + xilohexaose + oligossacarídeos com mais de 6 unidades de xilose).

**Tabela 1** - Planejamento fatorial ( $2^3$ ) para a avaliação do pré-tratamento hidrotérmico (PTH) do subproduto de *Eucalyptus* sob diferentes condições operacionais.

Exp.	Níveis codificados das variáveis			Níveis reais das variáveis		
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	T (°C)	t (min)	C (%)
1	-1	-1	-1	140	30	5
2	-1	-1	+1	140	30	15
3	+1	-1	-1	180	30	5
4	+1	-1	+1	180	30	15
5	-1	+1	-1	140	90	5
6	-1	+1	+1	140	90	15
7	+1	+1	-1	180	90	5
8	+1	+1	+1	180	90	15
a,b,c*	0	0	0	160	60	10

\*ensaio realizado em triplicata, correspondente ao ponto central do planejamento experimental.

Com o objetivo de estimar também parâmetros dos modelos de segunda ordem, o planejamento inicial foi ampliado pela previsão de novos ensaios a fim de constituir um planejamento composto central consistindo do bloco de experimentos referentes ao planejamento original  $2^k$ , do bloco de  $2k$  experimentos referentes aos pontos axiais ou estrela oriundos da expansão e do bloco de  $n_c$  experimentos no ponto central. Para três fatores  $x_1$ ,  $x_2$  e  $x_3$  ( $k=3$ ), como é o caso, as coordenadas dos seis pontos axiais ou estrela  $P(x_1, x_2, x_3)$  são dadas por  $(\pm\alpha, 0, 0)$ ,  $(0, \pm\alpha, 0)$  e  $(\pm\alpha, 0, 0)$ , onde  $\alpha$  é um parâmetro denominado de rotabilidade, o qual depende do número de experimentos do bloco fatorial do planejamento inicial conforme a Equação 1 (127). Para o caso de três fatores ( $k=3$ ),  $\alpha = 1,68$ .

$$\alpha = \sqrt[4]{2^k} \quad (1)$$

(Para o caso de três fatores ( $k=3$ ):  $\alpha = 1,68$ ).

Com relação ao número de experimentos no ponto central ( $n_c$ ) (127), geralmente é recomendado realizar de 3 a 5 repetições. Desta forma, para a continuidade do estudo, propôs-se ampliar o planejamento original de experimentos pela realização de novos ensaios nos pontos axiais anteriormente definidos visando possibilitar o ajuste de modelos quadráticos permitindo uma melhor descrição do comportamento das variáveis resposta do sistema bem como a otimização do processo. Além dos experimentos nos pontos axiais, mais experimentos no ponto central foram realizados com o objetivo de estimar com maior precisão os erros experimentais associados às

medidas das variáveis resposta, diminuindo-se assim o grau de incerteza na avaliação da significância estatística dos efeitos estimados. A Tabela 2 apresenta o bloco dos experimentos adicionais que foram realizados visando à continuidade do estudo.

**Tabela 2** - Bloco de experimentos adicionais realizados visando à continuidade da avaliação do pré-tratamento hidrotérmico (PTH) do subproduto de *Eucalyptus* em novas condições operacionais.

Exp.	Níveis codificados das variáveis*			Níveis reais das variáveis		
	x <sub>1</sub>	x <sub>2</sub>	x <sub>3</sub>	T (°C)	t (min)	C (%)
9	-1,68	0	0	126,4	60	10
10	+1,68	0	0	193,6	60	10
11	0	-1,68	0	160	9,6	10
12	0	+1,68	0	160	110,4	10
13	0	0	-1,68	160	60	1,6
14	0	0	+1,68	160	60	18,4
d	0	0	0	160	60	10

\*os valores (níveis) das variáveis codificadas ( $x_i$ ) foram calculados em função dos valores das variáveis reais ( $Z_i$ ) usando-se a seguinte Equação:

$$x_i = \frac{Z_i - Z_{\text{méd},i}}{\left(\frac{Z_{\text{máx},i} - Z_{\text{mín},i}}{2}\right)}, \quad i=1,2,3 \quad (2)$$

#### 4.3. Pré-tratamento hidrotérmico (PTH) do subproduto de *Eucalyptus*

Os pré-tratamentos hidrotérmicos foram realizados em equipamento munido de quatro reatores individuais (Reator da Regmed, dispositivo dotado de controle de agitação mecânica, temperatura e pressão) de 1,5 L de capacidade, contendo cada um uma válvula individual, porém todos conectados à um único equipamento (Figura 15). Foram pesados aproximadamente 10 g (dados em base seca) de SO ou STE em um béquer de polipropileno de 1 L que foram transferidos para os reatores de aço

inoxidável. Após a transferência do material foram adicionados volumes de água destilada pré-definidos (200, 100 e 75 mL) variando desta forma a consistência do material no meio reacional (5, 10 e 15%), respectivamente. Os reatores foram fechados. Para a impregnação do material, o equipamento foi ligado e ao atingir a temperatura de 100 °C, foi desligado, aberto as válvulas dos reatores para a retirada de excesso de ar e em seguida ligado novamente e ajustado a diferentes temperaturas (140, 160 e 180 °C). Após atingir a temperatura desejada os reatores permaneceram por diferentes tempos (30, 60 e 90 min). Ao final das reações os reatores foram desconectados e resfriados naturalmente por 24 h. Os hidrolisados obtidos pós-tratamentos hidrotérmicos foram filtrados através de filtros de vidro sinterizados de porosidade número 3 de 50 mL. O filtrado foi recolhido, medido o pH, borbulhado com nitrogênio até a retirada do excesso de oxigênio presente e estocado em freezer a -20 °C até o momento do uso. O material retido nos filtros foi lavado com solução de água destilada até atingir pH neutro, retirado do filtro e seco em estufa com circulação de ar a temperatura de 60 °C por 72 h. O material seco foi pesado e armazenado até o momento de seu uso. O rendimento do processo foi calculado de acordo com a Equação 3. Os materiais retidos (insolúveis) e os hidrolisados (filtrados) obtidos foram caracterizados quimicamente (itens 4.4 e 4.5).

$$R(\%) = 100 - \frac{(M_i - M_f)}{(M_i)} * (100) \quad (3)$$

Onde:

$R$  = rendimento mássico do pré-tratamento hidrotérmico (%).

$M_i$  = massa inicial em base seca do subproduto (g).

$M_f$  = massa final em base seca do subproduto pós-tratamento hidrotérmico (g).



**Figura 15** - Reator munido de controle de temperatura, pressão e agitação mecânica (Marca Regmed). FONTE: Autor, (2019).

#### **4.4. Caracterização química do subproduto de *Eucalyptus***

O SO e o STE (não tratados e previamente pré-tratados hidrotermicamente, item 4.3), foram caracterizadas quimicamente para determinação dos teores de extrativos, lignina total, celulose e hemicelulose. Os ensaios de caracterização química foram realizados em triplicata e os dados expressados em porcentagem mássica (grama de componente por 100 gramas do material original, dados em base seca).

##### **4.4.1. Determinação do teor de extrativos**

Cerca de 10 g (dados em base seca) de SO, previamente triturado, foram colocados em cartuchos de papel de filtro e em seguida foram inseridos em um extrator tipo *Soxhlet* e extraídos com etanol 95% (volume/volume) por cerca de 6 h (cerca de 10 ciclos de extração). Os cartuchos contendo o material extraído foram secos à temperatura de 25 °C para evaporação do solvente até à massa constante, em seguida o material foi pesado em balança

analítica (104,105). O material obtido foi denominado de triturado-extraído (STE) e foi armazenado em sacos plásticos fechados até o momento do uso (Item 4.3, 4.4 e 4.5). O percentual de extrativos foi determinado segundo a Equação 4.

$$E(\%) = \frac{m_i - m_f}{m_i} * (100) \quad (4)$$

Onde:

$E$  = porcentagem mássica de extrativos do material não tratado (%).

$m_i$  = massa seca inicial do material não tratado (g)

$m_f$  = massa seca final do material pós-extração com etanol 95% (g).

#### **4.4.2. Determinação de lignina insolúvel (Klason) e solúvel**

O material não tratado e pré-tratados hidrotermicamente foram analisados quanto ao teor de lignina Klason (insolúvel). Para isso, cerca de 300 mg (dados em base seca) de cada amostra foram tratadas com 3 mL de ácido sulfúrico 72% (massa/massa) em banho-maria por 1 h a 30 °C, sendo a mistura agitada em intervalos de 10 min com auxílio de um bastão de vidro. Após 1 h os conteúdos dos tubos de ensaio foram transferidos quantitativamente para Elermeyers de 250 mL com auxílio de 79 mL de água destilada. Para a hidrólise completa dos oligômeros restantes, os Elermeyers foram fechados com papel alumínio e autoclavados a 121 °C por 1 h. Após a decompressão da autoclave, os frascos foram resfriados à temperatura de 25 °C e em seguida foram filtrados em filtros de vidro sinterizados de porosidade número 3 de 30 mL (Schott, Alemanha) (previamente secos em estufa a 105 °C por 1,5 h e pesados). O material retido foi lavado, com 2 porções de 5 mL de água destilada e seco em estufa até massa constante. Esse resíduo correspondeu à lignina insolúvel em ácido (lignina Klason). A

determinação da lignina Klason foi calculada segundo a Equação 5. O cálculo foi realizado através da massa dos filtros de vidro sinterizados vazios e a massa dos filtros sinterizados contendo o material retido após a filtração (104,105).

$$L_I = m_{filt+res} - m_{filt} \quad (5)$$

Onde:

$L_I$  = lignina Klason da amostra (g).

$m_{filt+res}$  = massa do filtro sinterizado seco contendo a lignina Klason (g).

$m_{filt}$  = massa do filtro sinterizado seco vazio (g).

Os filtrados foram avolumados a 100 mL em balão volumétrico e o teor de lignina solúvel em ácido foi determinado através da leitura de absorbância do filtrado obtido em um espectrofotômetro UV-visível a 205 nm (Marca Thermo Scientific, modelo Genesys 10S UV-Vis) (104,105). Para a determinação das concentrações de lignina solúvel, foi utilizado o coeficiente de extinção de 105 L.g<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> (104,105). O cálculo da concentração da lignina solúvel foi realizado conforme a Equação 6. Após o cálculo da concentração de lignina solúvel em g.L<sup>-1</sup> o valor foi multiplicado pelo fator de diluição para a determinação real da lignina solúvel. Então, a concentração de lignina solúvel real foi multiplicada por 0,1.

$$C_{lig} = (A_{hid}/C_e) * diluição * 0,1 \quad (6)$$

Onde:

$C_{lig}$  = Massa de lignina solúvel (g).

$A_{hid}$  = Absorbância do hidrolisado em 205 nm.

$C_e$  = 105 (coeficiente de extinção).



O teor de lignina total ( $L_t$ ) foi calculado segundo a Equação 7. As massas de lignina solúvel e insolúvel foram somadas e multiplicadas por 100, o resultado foi dividido pela massa inicial do subproduto (dados em base seca) do processo de hidrólise ácida. Desta forma o resultado final do teor de lignina foi expressado em porcentagem (grama de lignina por 100 gramas de subproduto, dados em base seca).

$$L_t(\%) = ((L_{sol} + L_{insol}) * 100)/(M_i) \quad (7)$$

Onde:

$L_t$  = Lignina total (%).

$L_{sol}$  = teor de lignina solúvel em meio ácido (g).

$L_{insol}$  = teor de lignina Klason em meio ácido (g).

$M_i$  = massa inicial seca do subproduto do processo de hidrólise ácida (g).

#### **4.4.3. Determinação dos teores de carboidratos e ácidos orgânicos**

O filtrado produzido pelo método de lignina Klason foi utilizado para a determinação dos teores de açúcares monoméricos e ácidos orgânicos (glicose, xilose, arabinose e ácido acético), através da técnica de cromatografia em fase líquida de alta eficiência (CLAE). Para isso, uma pequena alíquota do filtrado foi passada através de cartuchos do tipo SEP-PAK C<sub>18</sub> para a retenção de compostos fenólicos (104,105). A análise cromatográfica foi realizada em cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE, SHIMADZU modelo NEXERA XR) nas seguintes condições: coluna BIO-RAD Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm); temperatura do forno: 60 °C; eluente: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mM com fluxo 0,6 mL.min<sup>-1</sup>; volume de amostra: 20 µL; detector: índice de refração a 60 °C (SHIMADZU, modelo RID- 20A) com um tempo de análise

de 17 min. As concentrações dos açúcares, arabinose e ácido acético foram determinadas através de curvas analíticas preparadas com padrões, de grau analítico, secos sob pentóxido de fósforo e vácuo (Apêndice I) (104,105).

Os teores de celulose, xilana, grupos arabinosil e grupos acetil foram calculados segundo a Equação 8. As massas de glicose, xilose, arabinose e ácido acético foram determinadas através de suas concentrações (em um volume final de 100 mL, item 4.4.3). As massas de glicose, xilose, arabinose e ácido acético foram multiplicadas pelos seus respectivos fatores de hidrólise (Tabela 3). O resultado foi multiplicado por 100 e dividido pela massa inicial do subproduto do processo de hidrólise ácida (item 4.4.3). Desta forma os resultados finais dos teores de celulose, xilana, grupo arabinosil e grupos acetil foram expressos em porcentagem (grama de componente por 100 gramas de subproduto, dados em base seca).

$$C(\%) = (M_f \times f) * 100 / (M_i) \quad (8)$$

Onde:

$C$  = teor de celulose, xilana ou grupo acetil (%).

$M_f$  = massa de glicose, xilose, arabinose ou ácido acético (g).

$f$  = fator de hidrólise para celulose, xilana e grupo acetil (Tabela 3).

$M_i$  = massa inicial seca do subproduto do processo de hidrólise ácida (g).

**Tabela 3** - Monômeros precursores da celulose, xilana e grupo acetil e seus respectivos fatores de hidrólise.

Monômero	Fator de Hidrólise	Molécula
Glicose	0,90	Celulose
Xilose	0,88	Xilana
Ácido Acético	0,72	Grupo acetil

#### **4.5. Caracterização química dos hidrolisados hemicelulósicos (filtrados) obtidos pós-tratamentos hidrotérmicos**

Os hidrolisados hemicelulósicos obtidos (filtrados) pós-tratamento hidrotérmico foram caracterizados pela presença de carboidratos (oligômeros e monômeros), ácido acético e derivados da oxidação de carboidratos (furfural, ácido fórmico e ácido levulínico).

##### **4.5.1. Determinação de XOS e xilose**

Os teores de XOS e xilose nos hidrolisados (filtrados) obtidos pós-tratamento hidrotérmicos foram determinadas por cromatografia em fase líquida de alta eficiência (CLAE, SHIMADZU modelo NEXERA XR) (106-109), com modificações. A coluna utilizada foi uma BIO-RAD Aminex HPX-87C (300 x 7,8 mm): temperatura de forno de 80 °C: eluente composto de água ultrapura com fluxo 0,6 mL.min<sup>-1</sup>: volume de amostra de 20 µL: detector de índice de refração (Shimadzu, modelo RID- 20A) a 60 °C e tempo de análise de 19 min. Os pHs das amostras foram ajustados para 6,5 com NaOH 1M e filtradas em filtro tipo SEP-PACK C<sub>18</sub>, previamente a serem analisadas. A cromatografia para determinação dos XOS foi realizada com os seguintes padrões, de grau analítico, secos sob pentóxido de fósforo e vácuo: xilose (X<sub>1</sub>), xilobiose (X<sub>2</sub>), xilotriose (X<sub>3</sub>), xilotetraose (X<sub>4</sub>), xilopentaose (X<sub>5</sub>) e xilohexaose (X<sub>6</sub>). Sendo X<sub>1</sub> da SIGMA e X<sub>2</sub>-X<sub>6</sub> da Megazyme-Irlanda. Para a separação e elaboração da curva analítica dos XOS, foram pesados aproximadamente 1 mg dos padrões autênticos: xilose (X<sub>1</sub>-Sigma), xilobiose (X<sub>2</sub>) xilotriose (X<sub>3</sub>), xilotetraose (X<sub>4</sub>), xilopentaose (X<sub>5</sub>), xilohexaose (X<sub>6</sub>) (Megazyme-Irlanda),

sendo que não tinha padrão para  $>X_6$ . Após pesados, cada padrão foi colocado em um balão volumétrico de 5 mL separadamente, resultando em uma solução pura de aproximadamente  $0,2 \text{ g.L}^{-1}$  de cada padrão em estudo. Cada solução resultante foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-SHIMADZU, modelo NEXERA XR), nas condições descritas anteriormente. A curva analítica dos XOS foi determinada através do preparado de soluções com os padrões de grau analítico citados acima, secos sob pentóxido de fósforo e vácuo. A curva analítica dos XOS (Apêndice II) foi determinada com uma solução mista dos padrões citados acima. 4 mg de cada padrão foi pesado e transferido para um balão volumétrico de 5 mL, resultando na solução mãe mista de  $0,8 \text{ g.L}^{-1}$ . Diluições sucessivas foram realizadas com essa solução gerando as seguintes concentrações para cada padrão em estudo: 0,6; 0,4; 0,2; 0,1 e  $0,05 \text{ g.L}^{-1}$ . As diferentes concentrações das soluções mistas foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) como descrito anteriormente. Os experimentos foram realizados em triplicata. Os dados foram expressos em  $\text{mg.g}^{-1}$  (miligrama de XOS ou xilose por grama de subproduto pré-tratado hidrotermicamente, dados em base seca). Além disso, também foi calculada a conversão de xilana em XOS e xilose (Equação 9).

$$\zeta (\%) = (XOS \text{ ou } xilose) * f) * (100)/(m) \quad (9)$$

Onde:

$\zeta$  = Conversão de xilana em XOS (xilobiose+xilotriose+xilotetraose+xilopentaose+xilohexaose+oligossacarídeos com mais de 6 unidades de xilose) ou xilose (%).

XOS ou xilose = massa de XOS (xilobiose+xilotriose+xilotetraose+xilopentaose+xilohexaose+oligossacarídeos com mais de 6 unidades de xilose) ou xilose (g), respectivamente.

$f$  = fatores de hidrólise de xilana em XOS (xilobiose, xilotriose, xilotetraose, xilopentaose+xilohexaose e oligossacarídeos com mais de 6 unidades de xilose ( $>X_6$ ) e xilose (Tabela 4).

$m$  = massa inicial seca de xilana (g).

**Tabela 4** - Fatores de hidrólise de xilana em XOS.

XOS	Fator de Hidrólise
Xilose	0,88
Xilobiose	0,936
Xilotriose	0,956
Xilotetraose	0,967
Xilopentaose/Xilohexaose	0,9755
(>X <sub>6</sub> )	1

#### 4.5.2. Determinação de furfural

As determinações foram conduzidas em um cromatógrafo em fase líquida de alta eficiência (CLAE, Perkin-Elmer, modelo Flexar) segundo Brienzo et al. (106), com modificações. A análise foi realizada com um fluxo de 0,8 ml.min<sup>-1</sup> a temperatura de 25 °C com detecção em 276 nm. A coluna utilizada foi a ODS Hypersil com 250 mm de comprimento, 4,0 mm de diâmetro, preenchida com octadecil - C<sub>18</sub> como fase estacionária (5 µm de diâmetro da partícula e 120 Å de diâmetro do poro, Marca Thermo). A fase móvel foi composta de acetonitrila:água (1:8) com ácido acético 1% (massa/volume) e tempo de análise de 12 min. Para os cálculos foi elaborada uma curva analítica com padrão de furfural (Apêndice III). Os experimentos foram realizados em triplicata. Os dados foram expressos em mg.g<sup>-1</sup> (miligrama de furfural por grama de subproduto pré-tratado hidrotermicamente, dados em base seca). Além disso, também foi calculada a conversão de xilana em furfural (Equação 10).

$$\zeta (\%) = (FF_{1,56}) * 0,88) * (100)/(m) \quad (10)$$

Onde:

$\zeta$  = conversão de xilana em furfural ou ácido fórmico (%).

$FF$  = massa de furfural ou ácido fórmico, respectivamente (g).

1,56 = fator de oxidação de xilose em furfural.

0,88 = fator de hidrólise de xilana em xilose.

$m$  = massa inicial seca de xilana (g).

#### **4.5.3. Determinação de aromáticos solúveis**

Os aromáticos solúveis foram quantificados através da leitura de absorvância em um espectrofotômetro UV-visível a 280 nm com coeficiente de extinção de  $20 \text{ L.g}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ , (Marca Thermo Scientific, modelo Genesys 10S UV-Vis). Os resultados foram multiplicados pela diluição, quando necessário, e expressos em  $\text{mg.g}^{-1}$  (miligramas de aromáticos solúveis por grama de subproduto pré-tratado hidrotêrmicamente, dados em base seca) (105,110).

#### **4.5.4. Determinação de açúcares e ácidos orgânicos**

Os teores de glicose, arabinose, ácido acético e ácido fórmico foram determinados por cromatografia em fase líquida de alta eficiência (CLAE) com apresentado no item 4.4.3. Os resultados foram expressos em  $\text{mg.g}^{-1}$  (miligramas de açúcar ou ácido por grama de subproduto, dados em base seca).

#### **4.6. Análise estatística**

As análises estatísticas dos dados obtidos através do planejamento experimental foram realizadas utilizando-se o software *Statistica* (Versão 10), tendo como variáveis resposta as conversões de xilana em produtos desejados (XOS) em função das variáveis independentes (temperatura,

tempo e consistência). Foi realizado o teste de Tukey utilizando o software GraphPad InStat (Versão 8), para verificar se ocorreu diferença significativa na composição química entre as condições testadas do planejamento experimental.

#### **4.7. Determinação do fator de severidade (P-Fator)**

O fator de severidade (P-Fator) em pré-hidrólise, puramente empírico, foi determinado a fim de combinar o efeito tempo de reação e temperatura no PTH do subproduto em estudo. O fator resultante foi definido como fator de severidade (P-Fator) como descrito na equação 11 (111).

$$P\text{-Fator} = t * e^{(A' - B'/T)} \quad (11)$$

Onde:

*P-Fator* = fator de severidade (h).

*t* = tempo (h).

*T* = temperatura (Kelvin).

*A'* = 40,48, constante arbitrária da equação (adimensional).

*B'* = 15106, constante arbitrária da equação (adimensional).

#### **4.8. Massa de produtos recuperados – Balanço de massa**

O balanço de massa foi realizado a fim de verificar se os produtos formados e quantificados na fração líquida constituem toda biomassa que foi previamente removida nos pré-tratamentos hidrotérmicos. Para isso, foi considerada a massa da fração de xilana que permaneceu na fração insolúvel em relação aos produtos formados que foram dissolvidos para a fração líquida (solúvel). A massa de produtos recuperados foi calculada através da equação 12.

$$MP(g) = \frac{(m * XCP)}{100} + \frac{m * (s * \frac{100}{14,1})}{100} \quad (12)$$

Onde:

*MP* = massa de produtos recuperados (g).

*XCP* = xilana convertida em XOS + xilose + furfural + ácido fórmico (%).

*m* = massa seca de xilana presente no subproduto (g).

*s* = teor de xilana após balanço de massa na amostra pré-tratada hidrotermicamente (%).

14,1 = teor de xilana da amostra não tratada hidrotermicamente (%).

#### **4.9. Ensaaios experimentais para validação dos modelos matemáticos**

Foram utilizados para os experimentos 50 g de massa do SO e do STE.

As frações insolúveis e solúveis (hidrolisados hemicelulósicos) para o modelo ajustado foram caracterizados pelos métodos descritos anteriormente (itens 4.3, 4.4, 4.5, 4.7 e 4.8).

##### **4.9.1. Hidrólise ácida do hidrolisado hemicelulósico pós-tratamento hidrotérmico**

O hidrolisado hemicelulósico oriundo do SO e do STE pós-tratamento hidrotérmico na condição otimizada (SO-TO e STE-TO) foram submetidos a hidrólise ácida com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Para isso foi adicionando 1,4 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 72% (massa/massa) em 23,6 mL de hidrolisado hemicelulósico (correspondendo a um volume final de 25 mL com uma concentração de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> de 4% (volume/volume). Então, o hidrolisado foi autoclavado a 121 °C por 1 h (112). O hidrolisado sem tratamento e pós-hidrólise ácida foram analisados quanto aos teores de xilose utilizando cromatografia em fase líquida de alta eficiência (CLAE) (item 4.4.3). A porcentagem de XOS foi determinada pela diferença da concentração de xilose presente no hidrolisado pós-hidrólise ácida pela xilose presente no hidrolisado sem tratamento (Equação 13).



$$XOS (\%) = ((A - H) * 0,95 * 100)/7,05 \quad (13)$$

Onde:

*XOS* = xilo-oligossacarídeos (%).

*A* = massa de xilose no hidrolisado pós-hidrólise ácida (g).

*H* = massa de xilose no hidrolisado sem tratamento (g).

0,88 = fator de hidrólise de xilana em xilose.

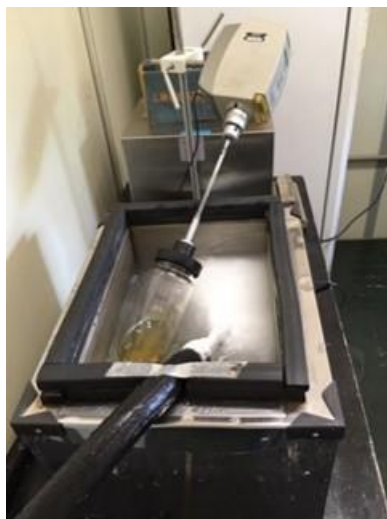
7,05 = massa inicial em base seca de xilana no subproduto não tratado hidrotêrmicamente (g).

#### **4.10. Extração alcalina da fração insolúvel pós-tratamento hidrotêrmico otimizado**

O SO-TO e o STE-TO foram submetidas à extração alcalina com NaOH 0,5% (massa/volume). A presente extração foi realizada no mesmo reator utilizado no PTH (item 4.3). Foram pesados aproximadamente 10 g (dados em base seca) do SO-TO e do STE-TO em um béquer e transferidos para os reatores de aço inoxidável. Após a transferência dos materiais foram adicionados 100 mL de NaOH 0,5% (massa/volume) o que culminou em uma consistência final no meio reacional de 10% (massa/volume). Os reatores foram fechados, ligados e após atingir a temperatura de 70 °C os mesmos permaneceram por 1 h. Após esse tempo foram desligados e resfriados naturalmente. Após o resfriamento as amostras foram retiradas do reator e lavadas com água destilada em caixa de lavagem (Regmed) com tela de retenção de #100/pol, até a água de lavagem atingir pH neutro. O material obtido foi seco em estufa com circulação de ar à 60 °C por 72 h. O material seco foi pesado e determinado a sua umidade. O rendimento do processo de extração alcalina foi calculado de acordo com a Equação 1 (item 4.3). O material insolúvel foi caracterizado quimicamente como descrito no item 4.4 e 4.5.

#### **4.11. Cromatografia em fase líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (CLAE-MS)**

Os hidrolisados hemicelulósicos pós-tratamento hidrotérmico do SO-TO e do STE-TO foram liofilizados previamente a análise em CLAE-MS. Desta forma, volumes de 112 mL e 88 mL dos hidrolisados hemicelulósicos do SO-TO e do STE-TO, respectivamente, foram colocados em um frasco próprio do liofilizador (Marca Thermo- Electron Corporation, Modulyod – Freeze Dryer), e submetidos à um banho com agitação para o congelamento das amostras (Figura 16). Após serem congelados no banho, os hidrolisados foram adicionados no liofilizador à temperatura de -53 °C por 24 h (Figura 17).



**Figura 16** - Banho utilizado para congelar as amostras antes de submeter ao liofilizador. FONTE: Autor, (2019).



**Figura 17** - Liofilizador (Marca THERMO – Electron Corporation). FONTE: Autor, (2019).

Os hidrolisados do SO-TO e do STE-TO previamente liofilizados foram solubilizados e analisados em cromatografia em fase líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (CLAE-MS) para confirmar a presença dos XOS identificados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de índice de refração (RID). As condições das análises foram: Condições cromatográficas; equipamento marca Agilent 1200 Series (Autosampler 1200 Séries, detector DAD 1260, bomba quaternária 1200 e forno para coluna 1200 Séries). A coluna utilizada foi a BIO-RAD Aminex HPX-87C (300 x 7,8 mm): temperatura de forno de 80 °C: fase móvel água ultrapura com fluxo de 0,6 mL.min<sup>-1</sup> e volume de injeção de 20 µL. Condições do espectrômetro de massas; 3200 QTRAP (Quadrúpolo – íon trap linear), AB SCIex Ionização por electrospray (Turbo Ion Spray) no modo positivo. Parâmetros da fonte de ionização no modo positivo: íon Spray: 5500 V, curtain gás: 20 psi, temperatura: 700 °C, gás 1: 50 psi, gás 2: 50 psi, interface heater: ON. Foram realizadas no modo SEM (“Selected reaction monitoring”), onde

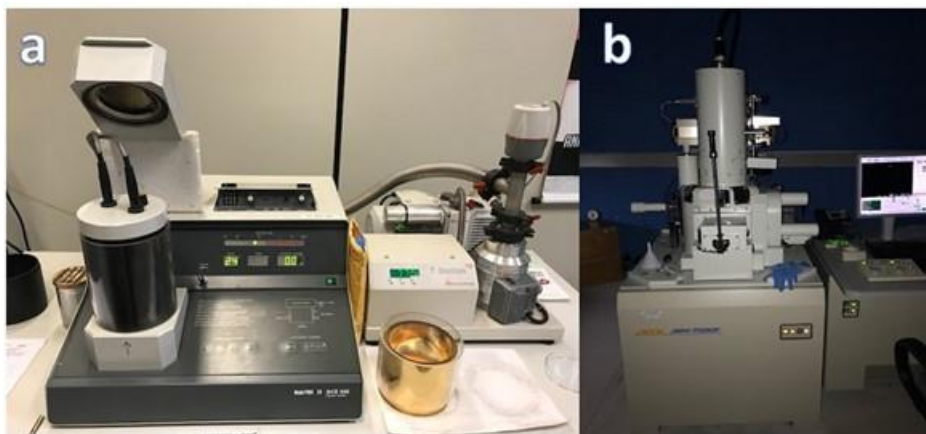
transições de cada XOS foram monitoradas e otimizadas individualmente para cada composto.

#### **4.12. Caracterizações estrutural das frações insolúveis do SO e STE otimizados pós-tratamento hidrotérmico (SO-TO e STE-TO)**

As diferentes frações do subproduto em estudo, como se segue: subproduto original (SO), subproduto triturado-extraído (STE), subproduto original pré-tratado hidrotérmicamente na condição otimizada (SO-TO), subproduto triturado-extraído pré-tratado hidrotérmicamente na condição otimizada (STE-TO), subproduto original pré-tratado hidrotérmicamente na condição otimizada seguido de extração alcalina (SO-TO-E) e subproduto triturado-extraído pré-tratado hidrotérmicamente na condição otimizada seguido de extração alcalina (STE-TO-E) foram avaliadas estruturalmente pelas seguintes técnicas:

##### **4.12.1. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

Foi utilizado um microscópio modelo JEOL JSM -7500F, pertencente ao Departamento de Físico-Química do Instituto de Química - IQ - Araraquara-UNESP. As amostras foram secas em estufa a 60 °C por 48 h e trituradas com auxílio de um pistilo. Uma alíquota de cada amostra foi fixada sobre suportes de alumínio recobertas por fita de carbono de 1-10 mm por 60 s (2Kb e 9,5 A) sob uma voltagem de aceleração de 2-10 kV. As microscopias foram obtidas em diferentes ampliações (40, 100, 500, 1000 e 5000 vezes) utilizando um microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM-7500 F). A figura 18 apresenta a fotografia do equipamento.



**Figura 18** - (a) Equipamento de fixação de carbono modelo SCD 050. (b) Microscópio modelo JEOL JSM -7500F. FONTE: Autor, (2019).

#### ***4.12.2. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier em modo de Refletância Total Atenuada (FTIR-ATR)***

Os espectros foram registrados na região compreendida entre 4000 e 400  $\text{cm}^{-1}$ , com 4  $\text{cm}^{-1}$  de resolução, 64 varreduras por ensaio, em modo ATR (Refletância Total Atenuada) em um Espectrofotômetro FTIR - Platinum/BRUKER; equipado com um cristal ATR em ZnSe de alta capacidade para análise de sólidos, pastas e líquidos, localizado no laboratório do Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêutica - FCF - UNESP - Araraquara.

As amostras foram secas em estufa a 60 °C por 48 h e trituradas com auxílio de um pistilo. Foi utilizada uma alíquota de cada amostra para a realização dos experimentos. Os gráficos foram construídos e normalizados no programa OriginPro 8.

#### 4.12.3. Difração de Raios-X (DRX)

O equipamento utilizado foi um difratômetro Siemens Kristalloflex diffractometer, localizado no Departamento de Físico-Química do Instituto de Química – IQ – UNESP - Araraquara, operando a uma potência de 40 kV com uma corrente de 30 mA sendo a radiação  $K\alpha$  do Cu ( $\lambda=1,5406 \text{ \AA}$ ). Prévio a realização das análises de DRX, todas as amostras (item 4.12) foram secas a  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 12 h em uma estufa de circulação de ar e triturada com auxílio de um pistilo. Os difratogramas foram obtidos à temperatura de  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  dentro de uma variação de  $2\theta$  entre  $5^\circ$  a  $40^\circ$  e uma velocidade de varredura de  $2^\circ \text{ min}^{-1}$ . O índice de cristalinidade (ICr) das amostras foi calculado pelo método de deconvolução (ajuste de curvas) a partir dos difratogramas de raios-X. Um programa de ajuste de curvas foi utilizado (PeakFit; [www.systat.com](http://www.systat.com)), assumindo os picos como funções gaussianas (113). Em seguida, o ICr foi calculado através da Equação 14 (114):

$$ICr (\%) = (Ac / (Ac + Aa)) * 100 \quad (14)$$

Onde:

ICr = Índice de cristalinidade (%);

Ac = Áreas dos picos cristalinos;

Aa = Áreas dos picos halo amorfo.

O cálculo do índice de amorficidade foi realizado através da Equação 15 (115).

$$IAm(\%) = 100 - ICr(\%) \quad (15)$$

Onde:

IAm = Índice de amorficidade (%);

ICr = Índice de cristalinidade (%)

#### **4.12.4. Espectroscopia Ressonância Magnética Nuclear (RMN)**

Espectros de alta resolução CP/MAS RMN  $^{13}\text{C}$ , em estado sólido, foram conduzidos a temperatura de 25 °C em um espectrômetro BRUKER ASCEND 400WD operando a 400 MHz em um campo magnético estático de 9,04 T. As amostras (item 4.12) secas em estufa a 60 °C por 48 h, triturada com auxílio de um pistilo, compactadas em um rotor de zircônia de 4 mm de diâmetro. O tempo de contato usado para todas as amostras foi de 5,0 ms. A varredura foi de 0-200 ppm com velocidade de rotação de 10 KHZ.

#### **4.13. Determinação das atividades enzimáticas do extrato comercial**

A determinação das atividades enzimáticas foi realizada para o extrato comercial contendo atividades de celulasas, como se segue: Celluclast (Novozymes). As seguintes determinações foram realizadas:

##### **4.13.1. Endoglucanase**

A atividade de endo-1,4- $\beta$ -glucanase foi determinada segundo Tanaka et al. (116). O método consiste na hidrólise de carboximetilcelulose (Sigma, C4146-100G), resultando na formação de extremidades redutoras, detectadas pela reação com ácido dinitrossalicílico - DNS (117). Uma alíquota de 0,9 mL de solução composta por carboximetilcelulose 0,44% (massa/volume), dissolvida em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,5 foi adicionada à 0,1 mL do extrato enzimático devidamente diluído e a mistura foi incubada a 50 °C por 60 min. A reação foi interrompida pela adição de 1,5 mL de DNS. Os tubos foram tratados termicamente a 100 °C por 5 min e a leitura

foi realizada em espectrofotômetro (Ultraspec 3100 Pro, Amersham Biosciences) a 540 nm. Um controle foi feito adicionando DNS antes do extrato enzimático. O branco foi realizado adicionando água destilada no lugar do extrato enzimático. Os valores de absorbância foram convertidos em concentração de glicose utilizando uma curva analítica com padrão autêntico de glicose (Synth, G1008.01.AG, Lot# 86333) (Apêndice IV). Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar um  $\mu\text{mol}$  de açúcares redutores por minuto, a 50 °C.

#### **4.13.2. Exoglucanase**

A atividade de exo-1,4- $\beta$ -glucanase foi determinada segundo Tanaka et al. (116). O método consiste na hidrólise de avicel (Sigma, 11365-1KG), resultando na formação de extremidades redutoras, detectadas pela reação com DNS (117). Uma alíquota de 0,9 mL de suspensão composta por avicel 0,5% (massa/volume) em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0, foi adicionada à 0,1 mL do extrato enzimático devidamente diluído e a mistura foi incubada a 50 °C por 120 min. A reação foi interrompida pela adição de 1,5 mL de DNS. Os tubos foram tratados termicamente a 100 °C por 5 min, seguido de centrifugação (Excelsa baby I, FANEM) da suspensão obtida. O sobrenadante foi recuperado e a leitura foi realizada em espectrofotômetro (Ultraspec 3100 Pro, Amersham Biosciences) a 540 nm. Um controle foi feito adicionando DNS antes do extrato enzimático. O branco foi feito adicionando água destilada no lugar do extrato enzimático. Os valores de absorbância foram convertidos em concentração de glicose utilizando uma curva analítica



com padrão autêntico de glicose (Synth, G1008.01.AG, Lot#) (Apêndice IV). Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar um  $\mu\text{mol}$  de açúcares redutores por minuto, a 50 °C.

#### **4.13.3. $\beta$ -glicosidase**

A atividade de  $\beta$ -glicosidase foi determinada segundo Yu et al. (118), através da liberação de p-nitrofenol durante a hidrólise do reagente comercial p-nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo (pNPG) (Sigma, N700G-1G, Lot# BCBK3820V). Assim foi preparada uma solução de pNPG 0,1% (massa/volume) em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0 e uma alíquota de 0,8 mL da solução foi adicionada à 0,2 mL do extrato enzimático devidamente diluído e a mistura foi incubada a 50 °C por 30 min. Após esse tempo, a reação foi interrompida pela adição de 2 mL de bicarbonato de sódio 10% (massa/volume) e a leitura foi realizada em espectrofotômetro (Ultraspec 3100 Pro, Amersham Biosciences) a 410 nm. O branco foi preparado da mesma forma, adicionando-se, no entanto, o bicarbonato de sódio antes do extrato enzimático. Os valores de absorbância foram convertidos em concentração de p-nitrofenol utilizando uma curva de analítica com padrão autêntico do mesmo (Apêndice V). Uma unidade de  $\beta$ -glicosidase foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar um  $\mu\text{mol}$  de p-nitrofenol por minuto, a 50 °C.

#### **4.14. Hidrólise enzimática das frações insolúveis dos subprodutos otimizados pós-tratamento hidrotérmico seguido de extração alcalina (SO-TO-E e STE-TO-E)**

As amostras foram hidrolisadas individualmente com o extrato comercial contendo atividade de celulasas (Celluclast – Novozymes). Primeiramente foram testadas cargas enzimáticas de 107,7, 195,5 e 385,1 UI/g. Com base nos testes realizados, foi selecionado a carga enzimática de 195,5 UI de endoglucanases por grama de substrato (dados em base seca), devido à melhor atividade obtida. Todas as reações foram realizadas a 2% de consistência contendo 1 g de material pré-tratado (dados em base seca) em 50 mL de volume final (solução tampão de sódio 50 mM pH 4,8 + extrato enzimático) (massa/volume) sob agitação de 170 rpm a 45 °C por 72 h em shaker (Gyromax 737R, Amerex Instruments). Durante o processo de sacarificação enzimática as reações foram monitoradas em intervalos de 3, 6, 12, 24, 48 e 72 h. A cada intervalo de tempo foram retiradas alíquotas de 3 mL que foram tratadas termicamente a 100 °C por 10 min para a inativação das enzimas, centrifugadas, retirado o sobrenadante e posteriormente congelado em freezer (-10 °C). Para a determinação e quantificação dos celulo oligossacarídeos (COS) e glicose resultantes da hidrólise enzimática, as alíquotas foram descongeladas, centrifugadas, filtradas e previamente diluídas, quando necessário, e analisadas por um sistema de cromatografia em fase líquida de alta eficiência (CLAE) (item 4.5.1), porém com diferentes padrões analíticos, como se segue: glicose (C<sub>1</sub>Sigma), celobiose (C<sub>2</sub>), celotriose (C<sub>3</sub>), celotetrose (C<sub>4</sub>), celopentose (C<sub>5</sub>), celohexose (C<sub>6</sub>)

(Megazyme). Para os cálculos foi elaborada uma curva analítica com padrões autênticos (Apêndice VI). Os extratos enzimáticos (na mesma diluição das hidrólises enzimáticas dos substratos) também foram analisados a fim de detectar a presença de açúcares livres. Foram calculadas as concentrações de glicose, celobiose, celotriose e oligossacarídeos com mais de 4 unidades de glicose (celotetrose+celopentose+celohexose) no hidrolisado enzimático e nos extratos enzimáticos. A partir dos dados de composição química e dos fatores de hidrólise enzimática foram calculadas as porcentagens de conversão de celulose em COS e glicose (Equação 16).

$$\zeta (\%) = ((COS \text{ ou } glicose) * f) * (100)/(m) \quad (16)$$

Onde:

$\zeta$  = Conversão de celulose em COS (celobiose+celotriose+oligossacarídeos com mais de 4 unidades de glicose) ou glicose (%).

*COS ou glicose* = massa de COS (celobiose+celotriose+oligossacarídeos com mais de 4 unidades de glicose) ou glicose) (g).

*f* = fatores de hidrólise de celulose em COS e glicose (celotetrose+celopentose+celohexose, celotriose, celobiose e glicose (Tabela 5).

*m* = massa inicial seca de celulose (g).

**Tabela 5** - Fatores de hidrólise de glucana em glicose e COS.

COS	Fator de Hidrólise
Glicose	0,90
Celobiose	0,95
Celotriose	0,96
Celotetrose+celopentose+celohexose	0,98

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Composição química e pré-tratamento hidrotérmico (PTH) do subproduto de *Eucalyptus*

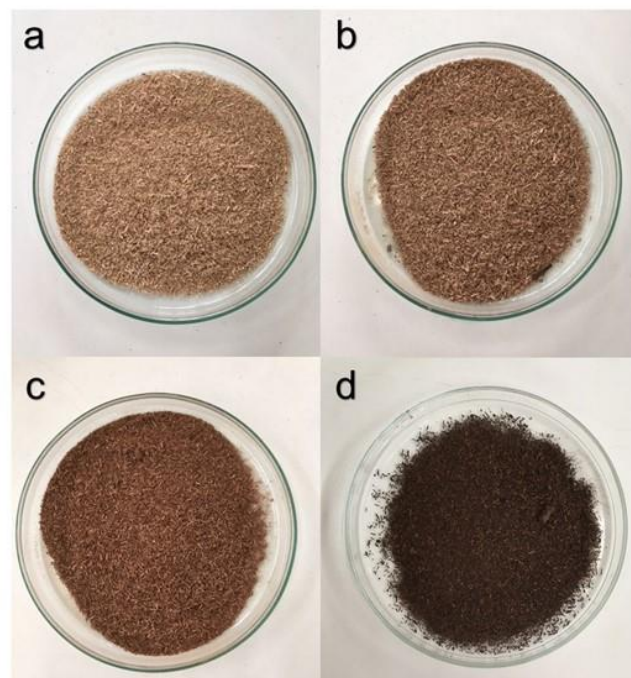
Inicialmente o subproduto de *Eucalyptus* foi caracterizado quimicamente para fins de comparação com a madeira de *Eucalyptus*. Os teores de celulose, xilana, grupos acetil, lignina, extrativos e cinzas do subproduto em estudo apresentaram teores de 43,9%, 14,1%, 3,3%, 28,5%, 3,4% e 0,7% (%massa/massa), respectivamente. A soma de todos os componentes foi de 93,9% (%massa/massa). A composição química do subproduto em estudo mostrou valores similares aos reportados na literatura para madeira de *Eucalyptus* (119-121). Todavia, o método utilizado para a quantificação da arabinose não foi sensível o suficiente para sua detecção. Desta esta forma, a presença de grupos arabinosil no subproduto em estudo (que são comuns em madeira de *Eucalyptus*) não foi detectável no subproduto em estudo. Os componentes não determinados podem ser atribuídos a presença de ácido metil-glucurônico que é frequentemente encontrado nas cadeias de hemicelulose de madeiras de folhosas, que não foram quantificados nas amostras em estudo (122). Além disso, a formação de produtos de oxidação de açúcares (como HMF, furfural, ácido fórmico e ácido levulínico) formados durante a etapa de hidrólise ácida também fazem parte do conteúdo dos componentes não determinados (123).

O pré-tratamento foi realizado com o objetivo de hidrolisar a fração de xilana do subproduto de *Eucalyptus* visando produzir XOS na hidrolisado

hemicelulósico (fração líquida). Desta forma, foi proposta a metodologia de planejamento fatorial ( $2^3$ ) onde foi variada a temperatura, a consistência e o tempo a fim de otimizar a produção de XOS (Tabela 1). Duas formas do subproduto foram preparadas previamente aos pré-tratados hidrotermicamente, como se segue: o subproduto original (SO) e o subproduto previamente triturado-extraído (STE) (Tabela 1). Após a realização dos PTH com as biomassas foi averiguada alteração no aspecto visual das frações insolúveis recuperadas (escurecimento do material pós-tratamento) quando comparado ao material não tratado (Figuras 19 e 20). O escurecimento foi mais acentuado nas condições operacionais mais severas (principalmente temperaturas de 180 °C, conforme apresentado na Tabela 1). Esse escurecimento também foi reportado na literatura para PTH e ácidos sobre outros subprodutos agroindustriais (124,72). Esse efeito pode ser atribuído a formação de produtos derivados da lignina que são formados na superfície da celulose, denominado de pseudo-lignina (33,36,72,125).



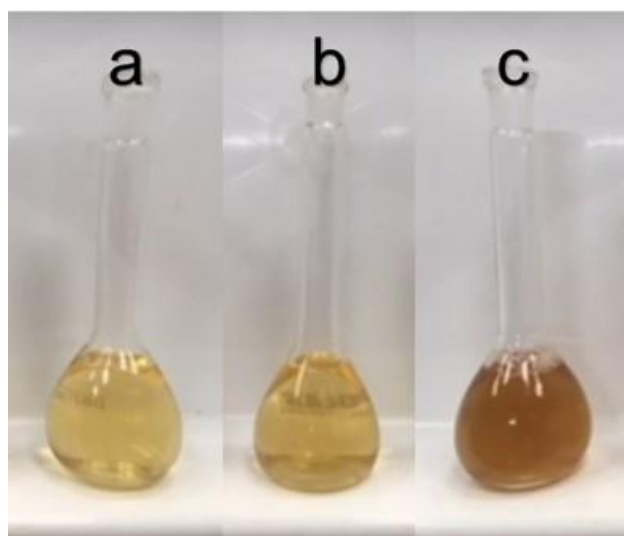
**Figura 19** - Frações sólidas do subproduto original (SO). (a) subproduto não tratado. (b) subproduto pós-tratamento hidrotérmico na condição 1. (c) subproduto pós-tratamento hidrotérmico na condição do ponto central do planejamento experimental. (d) subproduto pós-tratamento na condição 8 do planejamento experimental. Planejamento experimental disponível na Tabela 1 da seção de material e métodos. FONTE: Autor, (2019).



**Figura 20** - Frações sólidas do subproduto tritado-extraído (STE). (a) subproduto não tratado. (b) subproduto pós-tratamento hidrotérmico na condição 1. (c) subproduto pós-tratamento hidrotérmico na condição na condição do ponto central do planejamento experimental. (d) subproduto na

condição 8 do planejamento experimental. Planejamento experimental disponível na Tabela 1 da seção de material e métodos. FONTE: Autor, (2019).

Também foi evidente o escurecimento do hidrolisado hemicelulósico (fração líquida) em função das diferentes condições dos PTH para o SO (Figura 21).



**Figura 21** – Hidrolisado hemicelulósico (fração líquida) oriundo pós-tratamento hidrotérmico do subproduto original (SO). (a) Hidrolisado pós-tratamento hidrotérmico na condição mais amena (ensaio 1 do planejamento experimental, tabela 1). (b) Hidrolisado pós-tratamento hidrotérmico na condição do ponto central do planejamento experimental. (c) Hidrolisado na condição mais severa (ensaio 8 do planejamento experimental). Planejamento experimental disponível na Tabela 1 da seção de material e métodos. FONTE: Autor, (2019).

O comportamento frente ao aspecto visual dos hidrolisados hemicelulósicos (frações líquidas) pós-tratamentos hidrotérmicos do SO foram semelhantes para os PTH do STE. Esse escurecimento foi mais evidente nos PTH mais severos (condições com 180 °C de temperatura) quando comparado aos PTH mais amenos (condições com 140 °C de temperatura). Esse comportamento também foi reportado na literatura em

PTH em cavacos de *Eucalyptus urograndis* (124). Esse efeito na alteração visual dos diferentes ensaios do hidrolisado hemicelulósico do subproduto pode ser atribuído a formação de compostos fenólicos e aromáticos derivados da lignina durante o PTH do ML (33,72,110). Além disso, outra possibilidade pode ser atribuída a formação de produtos derivados da degradação de polissacarídeos (36).

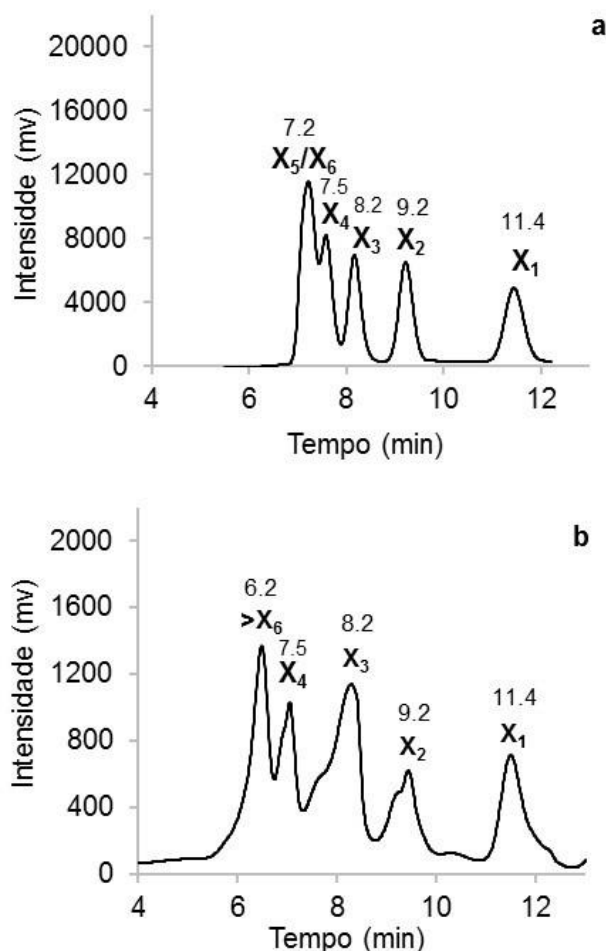
## **5.2. Determinação dos produtos formados no hidrolisado pós-tratamento hidrotérmico do subproduto de *Eucalyptus***

O objetivo do pré-tratamento foi hidrolisar hidrotérmicamente a xilana do subproduto em estudo visando à produção de XOS. Entretanto, para quantificação dos XOS foi necessário a avaliação de um método cromatográfico adequado. Desta forma, foi utilizado o método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), descrito no item 4.5.1. O cromatograma típico obtido para a eluição dos seguintes padrões analíticos de XOS com os seus respectivos tempos de retenção foram: xilopentaose/xilohexaose (7,2 min), xilotetraose (7,5 min), xilotriose (8,2 min), xilobiose (9,2 min) e xilose (11,4 min). Os padrões analíticos xilopentaose e xilohexaose não foram separados, coeluinto no tempo de retenção de 7,2 min (Figura 22a). As curvas de analíticas de cada padrão foram utilizadas para quantificação dos XOS obtidos através dos PTH. A curva analítica para os oligômeros xilopentaose+xilohexaose, xilotetraose, xilotriose, xilobiose e xilose apresentaram linearidade na faixa de 0,1-1,6; 0,01-0,6; 0,02-0,6; 0,05-



0,72 e 0,05-0,62 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente. O coeficiente de correlação médio das respectivas curvas foi 0,998 (Apêndice II).

A figura 22b apresenta o cromatograma de eluição dos XOS do ensaio do PTH do STE na condição do ponto central do planejamento experimental (Tabela 1). O cromatograma confirmou a presença de xilotetraose (X<sub>4</sub>), xilotriose, (X<sub>3</sub>), xilobiose (X<sub>2</sub>) e xilose (X<sub>1</sub>). Além disso, um pico extra no tempo de retenção de 6,2 min também foi eluído. O presente pico foi considerado com um XOS com mais de 6 unidades de xilose (>X<sub>6</sub>).



**Figura 22** - Cromatogramas típicos de XOS. (a) Padrões analíticos de XOS. (b) Hidrolisado hemicelulósico do subproduto original (SO) pós-tratamento hidrotérmico no ponto central do planejamento experimental (Tabela 1). Ambos separados na coluna BIO-RAD Aminex HPX-87C. (>X<sub>6</sub>) XOS com

mais de 6 unidades de xilose, ( $X_5/X_6$ ) xilopentaose+xilohexaose, ( $X_4$ ) xilotetraose, ( $X_3$ ) xilotriose, ( $X_2$ ) xilobiose e ( $X_1$ ) xilose. FONTE: Autor, (2019).

As Tabelas 6 e 7 apresentam os principais produtos formados na fração líquida pós-tratamento hidrotérmico do SO e STE de todas as condições experimentais propostas no planejamento experimental (Tabela 1). Os produtos analisados foram os XOS (xilotriose+xilotetraose+xilopentaose+xilohexaose+xilobiose+oligossacarídeos com mais de 6 unidades de xilose ( $X>6$ ), xilose e furfural. Os dados foram reportados no formato de conversão (100 gramas de xilana oriundo do subproduto por grama de produtos formados). As conversões de XOS, xilose e furfural pós-tratamentos hidrotérmicos do SO variam de 5,53-47,74%, 0,27-24,33% e 0,01-13,83% respectivamente. As conversões de XOS, xilose e furfural pós-tratamentos hidrotérmicos do STE variam de 7,54-49,42%, 0,72-21,35% e 0,13-26,98% respectivamente (Tabelas 6 e 7).

**Tabela 6** - Conversão de xilana em  $>X_6$ ,  $X_6+X_5$ ,  $X_4$ ,  $X_3$ ,  $X_2$ , XOS, xilose e furfural pós-tratamentos hidrotérmicos em diferentes condições. Dados apresentados em porcentagem (grama de produtos por 100 gramas de xilana oriundo do subproduto, dados em base seca).

Subproduto SO	Variáveis do pré-tratamento hidrotérmico			Conversão de xilana em produtos (%)							
	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Consistência (%)	$>X_6$ (%)	$X_6+X_5$ (%)	$X_4$ (%)	$X_3$ (%)	$X_2$ (%)	XOS (%)	Xilose (%)	Furfural (%)
1	140	30	5	13,66	1,93	*	3,18	*	18,77	0,57	0,01
2	140	30	15	7,59	1,89	*	2,88	*	12,35	0,27	0,16
3	180	30	5	3,21	*	6,76	*	*	9,97	24,29	12,17
4	180	30	15	5,53	*	*	*	*	5,53	24,33	12,12
5	140	90	5	10,78	2,52	*	*	*	13,31	3,18	0,26
6	140	90	15	10,65	3,35	*	*	*	14,01	1,46	0,22
7	180	90	5	0,94	2,79	2,19	*	2,23	8,14	0,45	23,81
8	180	90	15	3,31	4,12	2,21	1,94	0,82	12,41	3,25	13,07
a	160	60	10	22,73	*	6,2	3,83	15,76	48,54	12,47	0,65
b	160	60	10	26,26	*	5,68	5,43	6,47	43,84	9,17	0,17
c	160	60	10	25,92	*	5,29	3,59	1,48	36,27	6,69	0,62

$X_2$ )=Xilobiose, ( $X_3$ )=Xilotriose, ( $X_4$ )=Xilotetraose, ( $X_6+X_5$ )= Xilopentaose+Xilohexaose e ( $>X_6$ )= oligossacarídeos com mais de seis unidades repetitivas. XOS = ( $>X_6$ )+( $X_6+X_5$ )+( $X_4$ )+( $X_3$ )+( $X_2$ ). \* = não detectável.

**Tabela 7** - Conversão de xilana em  $>X_6$ ,  $X_6+X_5$ ,  $X_4$ ,  $X_3$ ,  $X_2$ , XOS, xilose e furfural pós-tratamentos hidrotérmicos em diferentes condições. Dados apresentados em porcentagem (grama de produtos por 100 gramas de xilana oriundo do subproduto, dados em base seca).

Subproduto STE	Variáveis do pré-tratamento hidrotérmico			Conversão de xilana em produtos (%)								
	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Consistência (%)	$>X_6$ (%)	$X_6+X_5$ (%)	$X_4$ (%)	$X_3$ (%)	$X_2$ (%)	XOS (%)	Xilose (%)	Furfural (%)	
1	140	30	5	6,72	*	*	3,11	*	9,83	0,8	0,20	
2	140	30	15	6,85	*	*	3,38	*	10,23	0,53	0,06	
3	180	30	5	4,39	*	5,89	*	*	10,27	16,27	12,36	
4	180	30	15	4,48	*	6,72	*	*	11,20	21,35	12,64	
5	140	90	5	6,21	*	*	2,93	*	9,14	0,72	0,14	
6	140	90	15	4,16	5,67	3,02	3,18	2,58	18,62	1,9	0,14	
7	180	90	5	4,99	*	6,18	*	*	11,17	7,3	23,74	
8	180	90	15	3,46	*	4,08	*	*	7,54	5,14	17,54	
a	160	60	10	20,46	*	6,27	3,7	15,59	46,02	12,14	1,90	
b	160	60	10	20,06	*	6,23	6,78	16,35	49,41	13,43	1,07	
c	160	60	10	19,02	*	5,91	5,99	10,63	41,55	11,51	1,45	

( $X_2$ )=Xilobiose, ( $X_3$ )=Xilotriose, ( $X_4$ )=Xilotetraose, ( $X_6+X_5$ )= Xilopentaose+Xilohexaose e ( $>X_6$ )= oligossacarídeos com mais de seis unidades repetitivas. XOS = ( $>X_6$ )+( $X_6+X_5$ )+( $X_4$ )+( $X_3$ )+( $X_2$ ). \* = não detectável.

Os PTH do SO nas condições mais severas (3, 4, 7 e 8, Tabela 6) mostraram uma conversão média de xilana em XOS, xilose e furfural da ordem de 9%, 13,1% e 15,3% (%massa/massa, base seca), respectivamente. Já o STE nas condições mais severas (3, 4, 7 e 8, Tabela 7) apresentaram uma conversão média de xilana em XOS, xilose e furfural da ordem 10%, 12,5% e 16,6% (%massa/massa, base seca), respectivamente. Entretanto, os PTH do SO nas condições mais brandas (1, 2, 5 e 6, Tabela 6) mostraram uma conversão média de xilana em XOS, xilose e furfural da ordem de 14,6%, 1,4% e 0,2% (%massa/massa, base seca), respectivamente. Já o STE nas condições mais brandas (1, 2, 5 e 6, Tabela 7) mostraram uma conversão média de xilana em XOS, xilose e furfural da ordem de 12%, 1,0% e 0,1% (%massa/massa, base seca), respectivamente. As condições intermediárias dos PTH do SO (condições a, b e c, ponto central do planejamento fatorial, Tabela 6) mostraram uma conversão média da fração de xilana em XOS, xilose e furfural da ordem de 43%, 9% e 0,5% (%massa/massa, base seca), respectivamente. Já o STE condições intermediárias apresentaram uma conversão média da fração de xilana em XOS, xilose e furfural da ordem de 46%, 12% e 1,5% (%massa/massa, base seca), respectivamente (Tabela 7).

Os resultados apresentados neste trabalho corroboram com os reportados por Yu et al. (126) e Balat (80), que estudaram a influência do tempo e da temperatura no PTH de madeira *Eucalyptus grandis*. Nesse estudo os autores concluíram que os PTH em temperaturas mais severas (180-200°C), com tempos variando de 10-500 min promoveram conversões limitadas de xilana em XOS, porém altas conversões de xilana em furfural.

De uma maneira geral os PTH nas condições mais severas culminaram em altas conversões de xilana em furfural e xilose, enquanto os PTH nas condições mais brandas culminaram em conversões limitadas de xilana em furfural e xilose (Tabelas 6 e 7). Entretanto, ambas as condições (brandas e severas) mostraram conversões razoáveis da fração de xilana em XOS (Tabelas 6 e 7). Todavia, os PTH nas condições intermediárias culminaram em altas conversões de xilana em XOS e conversões limitadas em xilose e furfural (Tabelas 6 e 7). Ressalta-se, o objetivo do PTH foi hidrolisar a xilana do subproduto em estudo a fim de produzir XOS. Desta forma, pode-se afirmar de forma preliminar que os PTH nas condições intermediárias apresentaram maior seletividade para a produção de XOS.

### ***5.3. Análise estatística dos produtos formados no hidrolisado pós-tratamento hidrotérmico***

Nesta seção é reportada a análise estatística dos dados de conversão de xilana em produtos apresentados nas Tabelas 6 e 7, os quais foram obtidos em condições de temperatura, tempo e consistência previamente estabelecidas por um planejamento de experimentos ( $2^3$ ) (Tabela 1) envolvendo esses fatores (variáveis independentes), além da realização de réplicas no ponto central, com o objetivo de estimar os erros experimentais associados às medidas das variáveis dependentes (respostas) do sistema bem como checar a existência ou não de curvatura nas superfícies de resposta das variáveis, determinando, respectivamente, a necessidade ou não de modelos matemáticos de mais alta ordem que o de primeira para

representá-las. As variáveis resposta analisadas em função dos fatores independentes (temperatura, tempo e consistência) foram as conversões de xilana em produtos desejados (XOS) e em produtos indesejados (xilose e furfural (XFF)). A análise foi realizada para cada grupo de dados (XOS e XFF) separadamente e para cada tipo de amostra (SO e STE).

A principal informação obtida dos resultados desse planejamento inicial de experimentos visando à sequência do estudo foi quanto à significância estatística da curvatura da superfície de resposta das variáveis dependentes, indicando que modelos de primeira ordem (lineares) são inadequados para a modelagem e a otimização destas variáveis na região experimental investigada, fato que tornou necessário o uso de modelos matemáticos de segunda ordem (quadráticos) para tais finalidades. A checagem de curvatura foi realizada mediante o teste do valor  $p$  segundo o qual uma determinada hipótese é rejeitada se esse valor é menor que o valor do nível de significância ( $\alpha$ ) adotado para o teste, usualmente 0,05, o que representa um grau de confiança de 95% no teste. Na Tabela 8 são apresentados os valores  $p$  para o teste de significância estatística da curvatura das superfícies de resposta.

**Tabela 8** - Teste  $p$  para efeito de curvatura no planejamento experimental ( $2^3$ ).

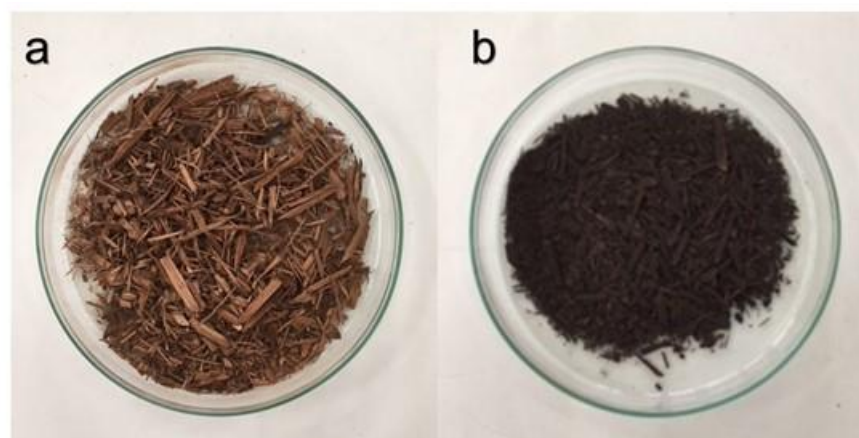
Amostras	Produtos desejados (XOS)	Produtos indesejados (XFF)
	$P$	$P$
SO	0,0015617	0,535266
STE	0,004761	0,111322

Conforme apresentado na Tabela 8, o efeito de curvatura foi significativo para a formação de produtos desejados, não sendo significativo

para a formação de produtos indesejados. Considerando que o objetivo é a maximização de produtos desejados, um modelo matemático quadrático torna-se necessário para este fim.

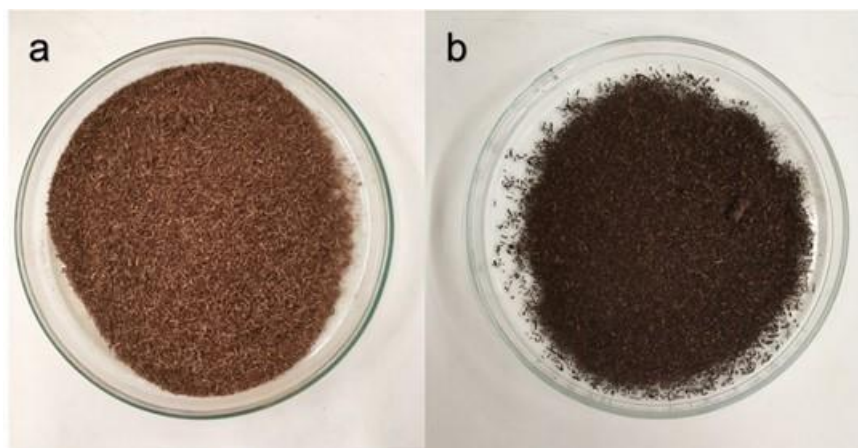
#### **5.4. Pré-tratamento hidrotérmico (PTH) e composição química do subproduto de *Eucalyptus* do planejamento composto central (2<sup>3</sup>)**

O SO e STE foram PTH de acordo com as novas condições experimentais propostas na Tabela 2. Inicialmente foi avaliado o aspecto visual das frações obtidas pós-tratamento hidrotérmico. A fração insolúvel obtida após o PTH do SO e do STE, apresentou um escurecimento no ensaio com a condição mais severa (temperatura de 193,6 °C, ensaio 10, Tabela 2) quando comparado a condição de PTH mais amena (temperatura de 126,4 °C, ensaio 9, Tabela 2) (Figuras 23 e 24). Esse escurecimento também foi reportado na literatura em PTH em cavacos de madeira de *Eucalyptus urograndis* na condição de 190 °C por 20 minutos (124).



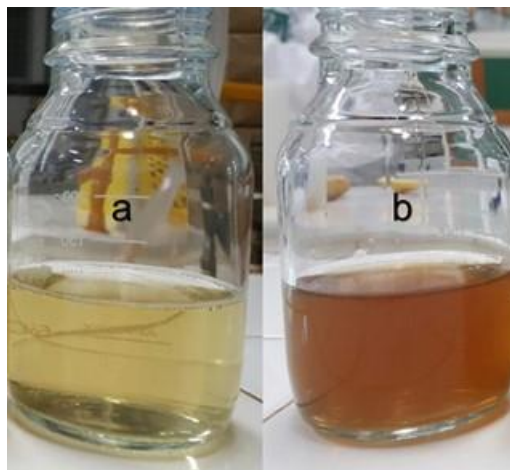
**Figura 23** - Frações sólidas do subproduto original (SO). (a) subproduto pós-tratamento hidrotérmico na condição mais amena (ensaio 9, Tabela 2). (b) subproduto pós-tratamento na condição mais severa (ensaio 10, Tabela 2). FONTE: Autor, (2019).



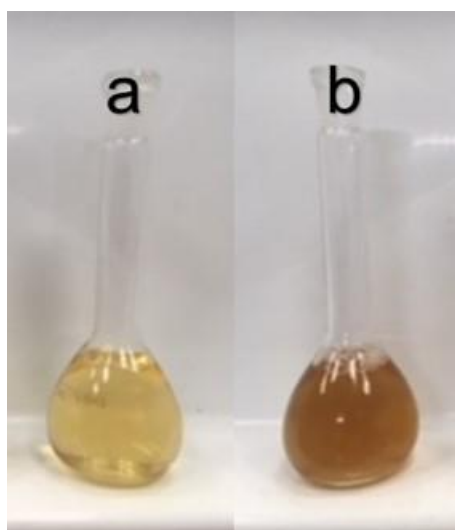


**Figura 24** - Frações sólidas do subproduto triturado-extraído (STE). (a) subproduto pós-tratamento na condição mais amena (ensaio 9, conforme Tabela 2). (b) subproduto pós-tratamento hidrotérmico na condição mais drástica (ensaio 10, conforme Tabela 2). FONTE: Autor, (2019).

Além disso, o hidrolisado hemicelulósico (fração solúvel) também apresentou uma coloração mais escura após o PTH, principalmente na condição mais severa (temperatura de 193,6 °C, ensaio 10, Tabela 2) do SO e do STE, quando comparado ao PTH na condição mais amena (temperatura de 126,4 °C, ensaio 9, Tabela 2) (Figuras 25 e 26). Esse escurecimento também foi reportado na literatura em PTH em cavacos de *Eucalyptus urograndis* na condição de 190 °C por 20 minutos (124), e também em PTH em palha de cana-de-açúcar nas condições de 170 °C por 15 min, 195 °C por 10 min, 220 °C por 5 min e 220 °C por 15 min (72). Esse escurecimento pode ser atribuído a formação de produtos derivados da degradação de carboidratos ou a caramelização dos polissacarídeos (36). Outra possível explicação para o escurecimento é a recondensação de produtos escuros na superfície da celulose denominado pseudo-lignina (125).



**Figura 25** - Hidrolisado hemicelulósico (fração líquida) oriundo pós-tratamento hidrotérmico do subproduto original (SO). (a) Hidrolisado hemicelulósico pós-tratamento hidrotérmico na condição mais amena (ensaio 9, Tabela 2). (b) Hidrolisado hemicelulósico pós-tratamento hidrotérmico na condição mais severa (ensaio 10, Tabela 2). FONTE: Autor, (2019).



**Figura 26** - Hidrolisado hemicelulósico (fração líquida) oriundo pós-tratamento hidrotérmico do subproduto triturado-extraído (STE). (a) Hidrolisado hemicelulósico pós-tratamento hidrotérmico na condição mais amena (ensaio 9, conforme Tabela 2). (b) Hidrolisado hemicelulósico pós-tratamento hidrotérmico na condição mais severa (ensaio 10, conforme Tabela 2). FONTE: Autor, (2019).

As Tabelas 9 e 10 apresentam os resultados dos rendimentos e composição química dos componentes macromoleculares (celulose, hemicelulose e lignina) obtidos pós-tratamentos hidrotérmicos do SO e do

STE. Além disso, as Tabelas 9 e 10 apresentam o fator de severidade (P-Fator) nas condições operacionais dos PTH do SO e do STE.

**Tabela 9** – Rendimento, composição química e fator de severidade (P-Fator) do subproduto original (SO) pós-tratamentos hidrotérmicos. Dados apresentados em porcentagem (grama de componente por 100 gramas de material original, base seca).

Subproduto Original (SO)	Variáveis do pré-tratamento Hidrotérmico			Rendimento pré-tratamento (%)	Componentes do material				Fator de severidade
	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Consistência (%)		Celulose (%)	Xilana (%)	Grupo acetil (%)	Lignina (%)	P-Fator (horas)
Não tratado	-	-	-	-	43,9 ± 0,5	14,1 ± 0,3	3,2 ± 0,0	28,5 ± 0,6	-
1	140	30	5	91,0	44,8 ± 0,7	8,1 ± 0,4	1,4 ± 0,1	26,2 ± 0,9	24,8
2	140	30	15	90,7	43,1 ± 0,3	14,4 ± 0,7	2,4 ± 0,8	26,5 ± 1,3	24,8
3	180	30	5	68,2	43,9 ± 0,2	0,5 ± 0,0	0,2 ± 0,0	19,3 ± 1,7	626,3
4	180	30	15	71,3	42,6 ± 0,6	0,4 ± 0,0	0,2 ± 0,0	25,2 ± 1,1	626,3
5	140	90	5	88,4	41,5 ± 1,1	11,2 ± 0,4	2,2 ± 0,3	24,6 ± 1,4	74,4
6	140	90	15	89,4	40,9 ± 1,2	12,1 ± 0,3	2,0 ± 0,0	23,5 ± 1,1	74,4
7	180	90	5	68,8	42,5 ± 1,2	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	22,1 ± 1,1	1878,9
8	180	90	15	69,8	36,6 ± 0,8	0,4 ± 0,3	0,2 ± 0,0	24,6 ± 0,4	1878,9
9	126,4	60	10	95,1	43,5 ± 0,9	11,4 ± 0,4	0,5 ± 0,1	28,3 ± 0,2	14,3
10	193,6	60	10	64,6	40,5 ± 0,9	0,2 ± 0,0	*	21,3 ± 1,1	3310,9
11	160	9,6	10	88,0	45,5 ± 1,2	8,9 ± 0,1	0,3 ± 0,0	29,9 ± 0,9	26,6
12	160	110,4	10	70,1	32,9 ± 2,4	1,6 ± 0,1	*	25,1 ± 2,1	494,1
13	160	60	1,6	67,1	35,1 ± 1,0	3,2 ± 0,5	0,3 ± 0,0	26,8 ± 1,5	268,5
14	160	60	18,4	75,2	36,6 ± 1,3	4,6 ± 0,4	0,7 ± 0,1	28,7 ± 0,9	268,5
a	160	60	10	73,3	38,2 ± 0,3	5,5 ± 0,2	0,7 ± 0,0	24,2 ± 0,9	268,5
b	160	60	10	69,4	36,6 ± 0,3	6,9 ± 1,4	1,0 ± 0,1	22,7 ± 0,4	268,5
c	160	60	10	73,3	34,8 ± 1,0	5,2 ± 0,8	0,8 ± 0,1	22,8 ± 0,2	268,5
d	160	60	10	72,8	34,6 ± 1,1	4,1 ± 0,6	0,4 ± 0,0	24,6 ± 1,0	268,5

\*Extrativos na amostra não tratada = 3,4% (%massa/massa, base seca). As amostras tratadas não apresentaram teores significativos de extrativos. \* = não detectável. Foram realizados os testes de Tukey (95% de confiança) para determinar se houve redução significativa dos componentes.

**Tabela 10** – Rendimento, composição química e fator de severidade (P-Fator) do subproduto de *Eucalyptus* moído-extraído (STE) pós-tratamentos hidrotérmicos. Dados apresentados em porcentagem (grama de componente por 100 gramas do material original, base seca).

Subproduto triturado-extraído (STE)	Variáveis do pré-tratamento hidrotérmico			Rendimento pré-tratamento (%)	Componentes do material				Fator de severidade
	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Consistência (%)		Celulose (%)	Xilana (%)	Grupo acetil (%)	Lignina (%)	P-Fator (horas)
Não tratado	-	-	-	-	43,9 ± 0,5	14,1 ± 0,3	3,2 ± 0,0	28,5 ± 0,6	-
1	140	30	5	94,9	45,0 ± 0,9	13,0 ± 0,2	2,3 ± 0,1	23,6 ± 1,1	24,8
2	140	30	15	91,4	40,1 ± 1,0	14,0 ± 0,2	2,4 ± 0,1	21,8 ± 0,8	24,8
3	180	30	5	69,8	42,5 ± 0,5	0,1 ± 0,0	0,3 ± 0,0	21,9 ± 0,7	626,3
4	180	30	15	69,5	41,9 ± 1,0	0,3 ± 0,0	0,2 ± 0,0	22,4 ± 0,7	626,3
5	140	90	5	91,1	42,2 ± 1,3	12,5 ± 0,2	2,4 ± 0,3	23,5 ± 2,3	74,4
6	140	90	15	89,3	41,8 ± 0,9	12,0 ± 0,3	1,9 ± 0,2	25,5 ± 2,0	74,4
7	180	90	5	65,5	40,4 ± 0,6	0,1 ± 0,0	*	23,1 ± 0,7	1878,9
8	180	90	15	62,2	29,7 ± 0,8	0,1 ± 0,0	*	23,4 ± 0,7	1878,9
9	126,4	60	10	96,1	43,9 ± 0,3	12,0 ± 0,3	0,5 ± 0,0	24,6 ± 0,7	14,3
10	193,6	60	10	62,5	30,8 ± 1,1	*	*	24,5 ± 0,3	3310,9
11	160	9,6	10	90,7	43,5 ± 1,1	9,4 ± 0,2	0,6 ± 0,1	23,0 ± 0,6	26,6
12	160	110,4	10	73,5	37,3 ± 0,7	2,5 ± 0,5	0,3 ± 0,0	23,2 ± 0,1	494,1
13	160	60	1,6	69,9	41,8 ± 0,4	2,1 ± 0,1	0,2 ± 0,0	22,2 ± 0,7	268,5
14	160	60	18,4	73,0	38,0 ± 0,6	4,0 ± 0,3	*	20,6 ± 0,3	268,5
a	160	60	10	74,9	39,6 ± 0,6	5,4 ± 0,2	0,6 ± 0,0	22,9 ± 1,5	268,5
b	160	60	10	77,8	39,7 ± 1,0	5,2 ± 0,2	0,8 ± 0,3	23,1 ± 1,1	268,5
c	160	60	10	78,7	42,2 ± 1,3	6,8 ± 0,1	1,0 ± 0,1	23,2 ± 0,3	268,5
d	160	60	10	76,5	42,3 ± 0,1	2,3 ± 0,0	0,5 ± 0,1	20,5 ± 0,3	268,5

\*Extrativos na amostra não tratada = 3,4% (%massa/massa, base seca). As amostras tratadas não apresentaram teores significativos de extrativos. \* = não detectável. Foram realizados os testes de Tukey (95% de confiança) para determinar se houve redução significativa dos componentes.

Os rendimentos das frações insolúveis, dos respectivos PTH, com o SO e o STE variaram de 64,6-95,1% e 62,2-96,1% (%massa/massa, base seca), respectivamente. De forma geral, os rendimentos foram maiores para os pré-tratamentos realizados sob condições mais brandas, enquanto condições mais severas foram menores (Tabelas 9 e 10).

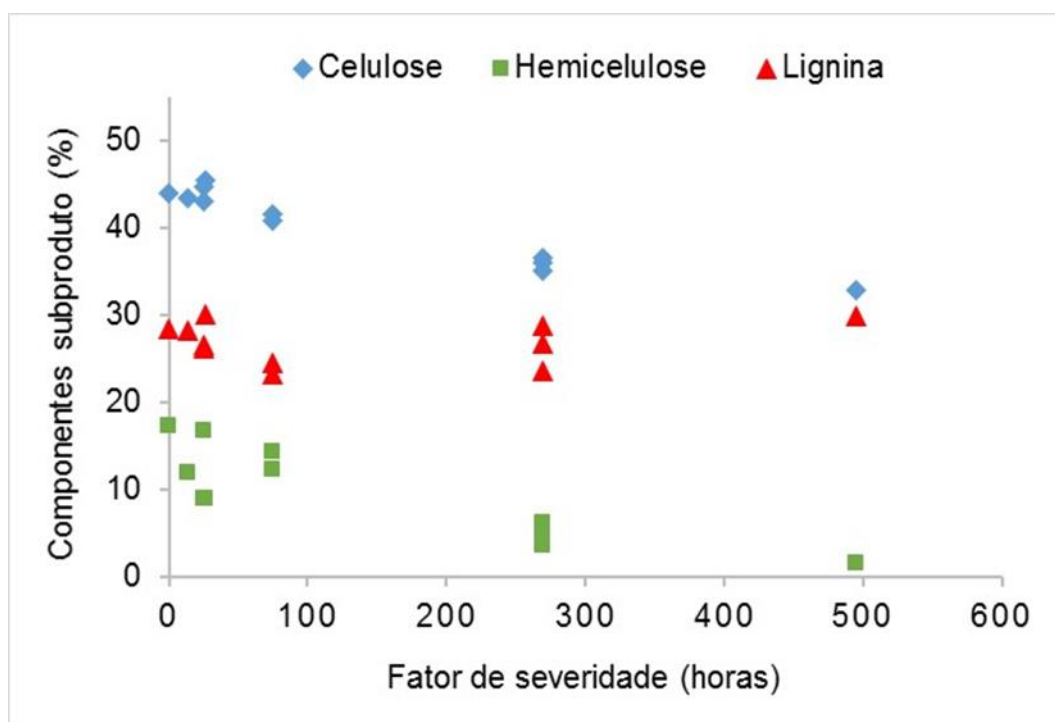
Os teores brutos de celulose, xilana, grupos acetil e lignina do SO variaram de 45-64%, 0,3-16%, 0-2,6% e 26-39% (%massa/massa, teores brutos em base seca), respectivamente (dados não apresentados). O balanço de massa dos componentes do subproduto em estudo foi necessário para ser possível a comparação das frações PTH, diretamente, com o subproduto não tratado (Tabela 9). Os PTH no SO nas condições mais severas (condições 3, 4, 7, 8 e 10, Tabela 9) mostraram uma remoção média de xilana, grupos acetil e lignina da ordem de 98%, 90% e 20% (%massa/massa), respectivamente (Tabela 9). Entretanto, os pré-tratamentos nas condições mais brandas (condições 1, 2, 5, 6, 9 e 11) mostraram uma remoção média de xilana, grupos acetil e lignina da ordem de 22%, 54% e 8% (%massa/massa), respectivamente (Tabela 9). As condições do PTH intermediário (condições a, b, c e d, ponto central do planejamento fatorial) mostraram uma remoção média de xilana, grupos acetil, lignina da ordem de 62%, 77%, 17% (%massa/massa), respectivamente. Todavia, a fração de celulose não revelou indicativos de que foi degradada frente aos PTH, com exceção da condição 8, 12, 13, 14 e do ponto central do planejamento experimental que mostraram uma remoção média da ordem de 19% (%massa/massa) (Teste de Tukey) (Tabela 9). Esse fato pode ser justificado devido às características da celulose

(como por exemplo ligações de hidrogênio intramoleculares) que conferem rigidez (cristalinidade) à molécula (33,67,124,128,129).

Os teores brutos de celulose, xilana, grupos acetil e lignina do STE variaram de 29,7-45%, 0,1-14%, 0-2,4% e 21,8-25,5% (% massa/massa teores brutos em base seca), respectivamente (dados não apresentados). Os PTH nas condições operacionais mais severas (condições 3, 4, 7, 8 e 10, Tabela 10) mostraram uma remoção média de xilana, grupos acetil e lignina da ordem de 99%, 97% e 19% (%massa/massa), respectivamente. Entretanto, os PTH nas condições operacionais mais brandas (condições 1, 2, 5, 6, 9 e 11) mostraram uma remoção média de xilana, grupos acetil e lignina da ordem de 14%, 47% e 17% (%massa/massa), respectivamente (Tabela 10). As condições operacionais do PTH intermediário (condições a, b, c e d, ponto central do planejamento fatorial) mostraram uma remoção média de xilana, grupos acetil e lignina da ordem de 65%, 77%, 21% (%massa/massa), respectivamente. Todavia, a fração de celulose, não revelou indicativos de que foi degradada frente aos PTH, com exceção das condições 8, 10, 12, 14, a, b do ponto central do planejamento experimental que mostraram uma remoção média da ordem de 18% (%massa/massa) (Teste de Tukey) (Tabela 10).

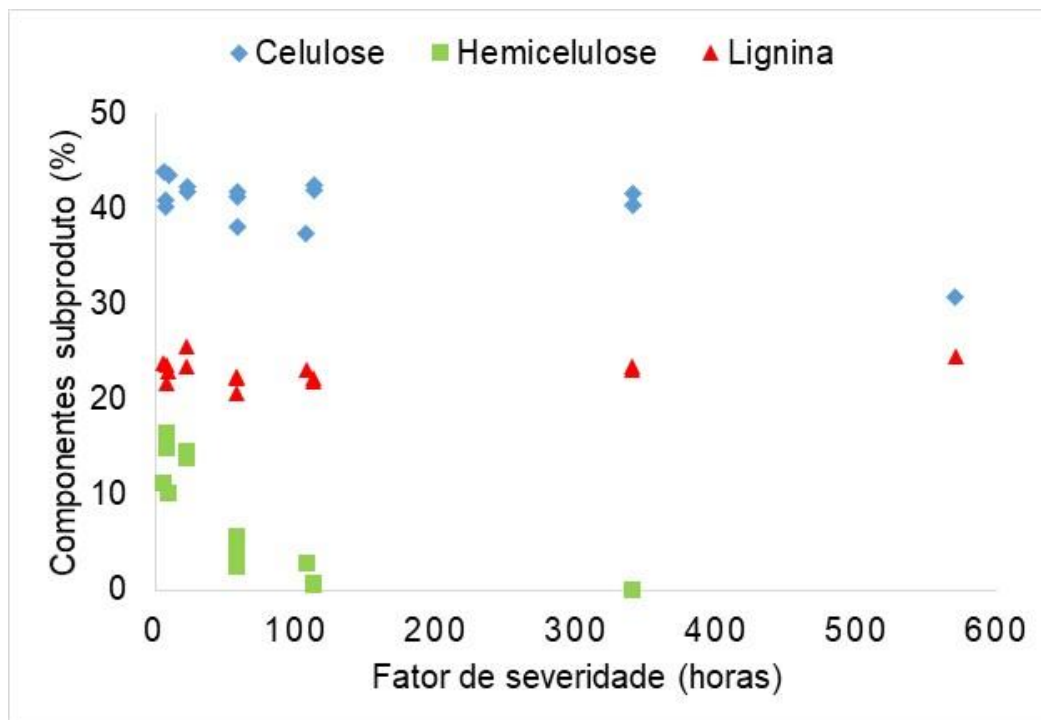
O efeito da temperatura e do tempo no PTH de ML pode ser reportado de forma numérica através do cálculo do fator de severidade (P-Fator), que pode ser considerado como um parâmetro de avaliação para verificar a severidade do processo e conseqüentemente o potencial de remoção da fração hemicelulósica, além da formação de produtos derivados da

hemicelulose (77). Nas condições do planejamento proposto no presente trabalho o P-Fator foi aplicado como uma ferramenta numérica para identificar as condições favoráveis de conversão de xilana em produtos desejados (XOS) e indesejados (furfural e xilose). As Figuras 27 e 28 apresentam os teores dos componentes (celulose, lignina e hemicelulose) em função do P-Fator.



**Figura 27** - Componentes do subproduto original (SO) pós-tratamento hidrotérmico em função do fator de severidade (P-Fator). Componentes apresentados em porcentagem (grama de componente por 100 gramas do material original, dados em base seca). FONTE: Autor, (2019).





**Figura 28** - Componentes do subproduto triturado-extraído (STE) pós-tratamento hidrotérmico em função do fator de severidade (P-Fator). Componentes apresentados em porcentagem (grama de componente por 100 gramas do material original, dados em base seca). FONTE: Autor, (2019).

Os valores do P-Fator no presente estudo, para ambos SO e STE, variaram de 14,3 a 3310,9 h, sendo numericamente maiores nos PTH mais severos (626,3, 1878,9, 3310,9 e 494,1 h) (condições 3, 4, 7, 8, 10 e 12), respectivamente, o que culminou em uma remoção média de 95% (%massa/massa) da fração de xilana (Tabelas 9 e 10 e Figuras 27 e 28). Todavia, os PTH nas condições mais amenas (condições 1, 2, 5, 6, 9 e 11, Tabelas 9 e 10) apresentaram valores menores para o P-Fator (24,8, 74,4, 14,3 e 26,6 h) não removendo ou removendo menos de 30% (%massa/massa) da fração de xilana (Tabelas 9 e 10 e Figuras 27 e 28). Além disso, o PTH na condição intermediária (ponto central do planejamento experimental) apresentou um valor intermediário para o P-Fator (268,5h,

Tabelas 9 e 10) o que culminou em uma remoção média de 63% (%massa/massa) da fração de xilana (Tabelas 9 e 10 e Figuras 27 e 28).

De forma geral os PTH do SO e do STE apresentaram potencial de dissolução seletiva da fração de xilana, com exceção das condições mais brandas, 1, 2, 5, 6, 9 e 11, (Tabelas 9 e 10 e Figuras 27 e 28). Nessas condições não houve dissolução apreciável da fração de xilana, bem como da celulose e lignina.

Os resultados apresentados corroboram com os reportados por Júnior e Colodette (130), os quais estudaram a remoção de hemiceluloses em cavacos de uma mistura de madeiras de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla* por PTH e demonstraram que o aumento do tempo e da temperatura acarretaram maior remoção da fração hemicelulósica.

Os resultados dos rendimentos e composição química pós-tratamentos hidrotérmicos do SO e do STE também corroboram com os reportados recentemente por Cruz Filho (124), que estudaram a influência do tempo e da temperatura no PTH de madeira *Eucalyptus grandis*. Nesse estudo os autores mostraram que o PTH em madeira de *Eucalyptus grandis* na temperatura de 190 °C por 20 min culminou em uma remoção de hemicelulose da ordem de 93% (%massa/massa).

Outros estudos realizados por Yu et al. (126) e Xiao et al. (131), mostraram o efeito do PTH em madeira de *Eucalyptus grandis*. O PTH em madeira de *Eucalyptus grandis* nas condições operacionais de 180 °C, 20 min e 5% de consistência culminou em uma redução de 86,4% (%massa/massa) da fração hemicelulósica (126). Entretanto, o PTH em madeira de *Eucalyptus*

*grandis* nas condições operacionais de 160 °C, 15 min e 10% de consistência culminou em uma redução de 96,6% (%massa/massa) da fração hemicelulósica (131). Esses estudos também corroboram com os resultados obtidos com o subproduto de *Eucalyptus* em estudo. Entretanto, o objetivo dos PTH foi hidrolisar a xilana do subproduto em estudo a fim de produzir XOS. Os PTH mostraram a dissolução seletiva da fração de xilana, ou seja, foram capazes de promover a remoção da xilana do subproduto em estudo (Tabelas 9 e 10 e Figuras 27 e 28). Em relação a lignina e a celulose, esses componentes permaneceram praticamente intactos pós-tratamento hidrotérmico (com exceção das condições mais drásticas). O mesmo comportamento foi observado por Tun e Van Heiningen (77) em madeira de folhosas e Liu et al. (78), com madeira de *Eucalyptus urophylla* e *Eucalyptus grandis*.

### **5.5. Avaliação da formação de produtos derivados de hemicelulose e lignina do hidrolisado pós-tratamento hidrotérmico do planejamento composto central (2<sup>3</sup>)**

O hidrolisado hemicelulósico (fração líquida) oriundo do PTH foi analisado quanto aos compostos desejados (XOS) e compostos não desejados, como se segue: derivados da hemicelulose (xilose, arabinose e ácido acético), derivados da celulose (glicose), derivados da lignina (aromáticos solúveis), além de derivados da oxidação de açúcares (furfural e ácido fórmico).

### **5.5.1. Formação dos compostos não desejados derivados de hemicelulose e lignina do hidrolisado pós-tratamento hidrotérmico**

Os compostos não desejados foram formados em maiores quantidades nas condições mais severas dos PTH (ambos SO e STE) e apresentados na forma de miligramas de produtos formados por grama de subproduto PTH (dados em base seca) (Tabelas 11 e 12).

O PTH realizado em altas temperaturas tem potencial suficiente para romper as ligações do tipo éster (entre o ácido acético e a xilose) presentes na molécula de xilana. O ácido acético liberado, reduz o pH do meio (em torno de 3-4), potencializando à remoção da fração hemicelulósica do material através da hidrólise ácida. Dependendo da intensidade da hidrólise, podem ocorrer reações de degradação dos açúcares, formando furfural (derivado da oxidação de pentoses), HMF (derivado da oxidação de hexoses), além da formação de compostos aromáticos, os quais são derivados da lignina. O furfural e o HMF submetidos a altas temperaturas, em meio ácido, também podem ser convertidos em ácido fórmico, ácido levulínico e outros produtos de decomposição (77).

**Tabela 11** - Caracterização química dos hidrolisados hemicelulósicos (frações líquidas) oriundo dos pré-tratamentos hidrotérmicos (PTH) do subproduto original de *Eucalyptus* (SO). Dados apresentados em miligramas de produtos por grama de material de partida (dados em base seca).

Subproduto Original	Variáveis do pré-tratamento hidrotérmico			Componentes do hidrolisado hemicelulósico						
	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Consistência (%)	Glicose (mg.g <sup>-1</sup> )	Arabinose (mg.g <sup>-1</sup> )	Ácido acético (mg.g <sup>-1</sup> )	&Fórmico (mg.g <sup>-1</sup> )	#Aromáticos (mg.g <sup>-1</sup> )	Furfural (mg.g <sup>-1</sup> )	Xilose (mg.g <sup>-1</sup> )
1	140	30	5	0,61	1,32	3,42	1,06	5,35	0,01	0,91
2	140	30	15	0,45	1,21	4,58	0,92	4,56	0,16	0,43
3	180	30	5	3,86	*	42,49	8,08	53,50	12,49	38,93
4	180	30	15	3,84	*	40,19	7,82	45,58	12,44	38,99
5	140	90	5	0,58	1,73	4,89	1,18	26,75	0,27	5,09
6	140	90	15	0,58	2,32	5,88	0,94	22,79	0,22	2,34
7	180	90	5	4,88	*	43,02	10,54	26,75	24,44	0,71
8	180	90	15	11,14	*	66,92	10,52	22,79	13,41	5,20
9	126,4	60	10	0,55	0,39	4,08	*	26,75	*	*
10	193,6	60	10	3,63	1,52	37,78	8,55	22,79	12,03	*
11	160	9,6	10	0,56	1,15	2,62	1,06	26,75	0,10	*
12	160	110,4	10	2,80	*	29,85	4,11	22,79	3,70	35,68
13	160	60	1,6	2,09	1,50	4,90	*	10,70	0,67	8,29
14	160	60	18,4	0,40	1,54	4,47	1,57	22,79	0,69	10,71
a	160	60	10	1,19	0,86	11,74	2,14	45,58	0,65	19,98
b	160	60	10	0,92	0,31	10,98	1,83	53,50	0,17	14,70
c	160	60	10	1,03	0,35	11,41	1,64	53,50	0,62	10,71
d	160	60	10	0,82	0,53	8,84	1,96	26,75	0,77	11,39

\* = não detectável. # = Aromáticos solúveis. & = Ácido fórmico.

**Tabela 12** - Caracterização química do hidrolisado hemicelulósico (frações líquidas) oriundo dos pré-tratamentos hidrotérmicos (PTH) do subproduto moído-extraído de *Eucalyptus* (STE). Dados apresentados em miligramas de produtos por grama de material de partida (dados em base seca).

Subproduto Triturado-Extraído	Variáveis do pré-tratamento hidrotérmico			Componentes hidrolisado hemicelulósico						
	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Consistência (%)	Glicose (mg.g <sup>-1</sup> )	Arabinose (mg.g <sup>-1</sup> )	Ácido acético (mg.g <sup>-1</sup> )	&Fórmico (mg.g <sup>-1</sup> )	#Aromáticos (mg.g <sup>-1</sup> )	Furfural (mg.g <sup>-1</sup> )	Xilose (mg.g <sup>-1</sup> )
1	140	30	5	0,26	0,76	2,17	*	5,35	0,20	1,28
2	140	30	15	0,50	1,69	2,39	*	5,35	0,06	0,84
3	180	30	5	2,21	*	18,15	2,57	45,68	12,68	26,07
4	180	30	15	2,89	*	23,91	2,92	53,50	12,98	34,21
5	140	90	5	0,32	1,18	3,59	*	4,56	0,15	1,16
6	140	90	15	0,49	0,66	3,19	1,12	5,35	0,14	3,04
7	180	90	5	5,80	0,35	26,79	3,65	45,58	24,37	11,70
8	180	90	15	3,71	1,84	20,06	2,98	45,58	18,01	8,24
9	126,4	60	10	0,11	0,14	0,63	0,52	5,35	*	*
10	193,6	60	10	1,38	*	17,47	2,60	45,58	5,26	*
11	160	9,6	10	0,68	1,33	2,35	1,00	5,35	0,10	*
12	160	110,4	10	2,99	*	31,56	6,71	53,50	3,88	37,33
13	160	60	1,6	2,41	3,83	29,58	7,99	9,12	2,16	8,90
14	160	60	18,4	2,68	3,09	29,36	5,93	26,75	2,39	20,49
a	160	60	10	0,88	0,37	11,94	1,99	45,58	1,95	19,45
b	160	60	10	1,55	0,35	9,59	2,12	53,50	1,09	21,52
c	160	60	10	0,44	0,45	10,69	1,91	45,58	1,49	18,45
d	160	60	10	0,94	0,41	8,53	1,75	53,50	1,55	24,54

\* = não detectável. # = Aromáticos solúveis. & = Ácido fórmico.

Os principais componentes detectados nos hidrolisados pós-tratamento hidrotérmico em todas as condições experimentais foram os aromáticos solúveis e a xilose (Tabelas 11 e 12). Os hidrolisados oriundos do SO e STE mostraram teores de aromáticos solúveis da ordem de 4,6 mg.g<sup>-1</sup> a 53,5 mg.g<sup>-1</sup> (dados em base seca), respectivamente. Os maiores teores de aromáticos solúveis, nos hidrolisados hemicelulósicos pós-tratamento hidrotérmico, foram encontrados nas condições experimentais mais drásticas (ensaios 3, 4, 7, 8, 10 e 12, Tabelas 11 e 12) e no ponto central do planejamento experimental, onde os teores variaram de 26,7-53,5 mg.g<sup>-1</sup> (dados em base seca) (Tabelas 11 e 12). Todavia, esses teores representam em média apenas 2,7-5,3% (%massa/massa) em relação a massa de material pré-tratada hidrotermicamente (massa do material de partida em base seca) e 9,4-18,6% (%massa/massa) em relação a massa de lignina pré-tratada hidrotermicamente (massa de lignina do material de partida em base seca). Os teores de aromáticos solúveis são compatíveis com o maior potencial de dissolução/degradação parcial da lignina, corroborando com os resultados de composição química (Tabelas 9 e 10).

Os hidrolisados hemicelulósicos oriundos do SO e STE mostraram teores de xilose da ordem de 0,4 mg.g<sup>-1</sup> a 38,9 mg.g<sup>-1</sup> (dados em base seca), respectivamente. Os maiores teores de xilose, nos hidrolisados hemicelulósicos pós-tratamento hidrotérmico, foram encontrados nas condições experimentais 3, 4 e 12 culminando em um valor médio de 35,2 mg.g<sup>-1</sup> (Tabelas 11 e 12) (dados em base seca). Além disso, o ponto central do planejamento experimental, onde os teores médios de xilose para o SO e

o STE foram de 14,2 mg.g<sup>-1</sup> e 21,0 mg.g<sup>-1</sup> (dados em base seca), respectivamente (Tabelas 11 e 12). Assim, a formação de xilose foi ligeiramente maior no ponto central no STE quando comparado ao SO (Tabelas 11 e 12).

Os teores de xilose nos hidrolisados do SO e do STE estão de acordo com o trabalho de Testova et al. (132), onde os autores realizaram PTH em madeira de bétula com duas diferentes condições operacionais de temperatura e tempo. Os autores reportaram maiores teores de xilose no hidrolisado hemicelulósicos pós-tratamento hidrotérmico, condição de 170 °C e 84 min, culminando em 51 mg.g<sup>-1</sup> de xilose. Entretanto, na condição de PTH de 150 °C e 126 min os hidrolisados hemicelulósicos mostraram teores de xilose de apenas 2 mg.g<sup>-1</sup> (condição mais branda).

Os teores de xilose nos hidrolisados hemicelulósicos do SO e do STE também estão de acordo com o trabalho de Liu et al. (78), onde os autores reportaram que o PTH de *Eucalyptus urophylla* e *Eucalyptus grandis*, condição de 180 °C e 110 min, foram gerados 46 mg.g<sup>-1</sup> de xilose no hidrolisado hemicelulósico (condição mais severa), enquanto que na condição mais branda do PTH, 150 °C e 90 min, resultou em teores de xilose de 3 mg.g<sup>-1</sup>.

O SO nas condições de PTH mais drásticas (3, 4, 7, 8, 10 e 12) promoveu maior formação de ácido acético (29,8-66,9 mg.g<sup>-1</sup>) e furfural (3,7-24,4 mg.g<sup>-1</sup>) (dados em base seca) (Tabela 11). Os maiores teores de ácido acético e furfural indicam que houve clivagem da ligação éster (entre a xilana e ácido acético), além da oxidação de xilose em furfural. Entretanto, nas



condições mais brandas à formação de ácido acético (2,6-5,8 mg.g<sup>-1</sup>) e furfural (0,01-0,3 mg.g<sup>-1</sup>) (dados em base seca) foram menores quando comparadas as condições experimentais mais drásticas, pois nestas condições as temperaturas e tempos foram mais moderados (Tabela 11). O ponto central do planejamento experimental apresentou um comportamento intermediário, onde os teores médios de ácido acético e furfural foram de 10,7 mg.g<sup>-1</sup> e 0,6 mg.g<sup>-1</sup> (dados em base seca), respectivamente (Tabela 11).

O STE também apresentou um comportamento similar ao SO, havendo maior formação de ácido acético e furfural nas condições mais drásticas (3, 4, 7, 8, 10 e 12, Tabela 12) e menores teores nas condições mais brandas (1, 2, 5, 6, 9 e 11, Tabela 12). Além disso, o ponto central do planejamento experimental apresentou um comportamento intermediário, onde os teores médios de ácido acético e furfural foram de 10,2 mg.g<sup>-1</sup> e 1,5 mg.g<sup>-1</sup> (dados em base seca), respectivamente, sendo o teor médio de furfural maior quando comparado ao SO (0,6 mg.g<sup>-1</sup>) (Tabelas 11 e 12). A literatura reporta comportamento similar em estudos de PTH em uma mistura de madeira de folhosas onde os autores reportaram que o PTH na condição experimental de 170 °C e 100 min houve formação significativa de furfural (1,1 mg.g<sup>-1</sup>) (dados em base seca) nos hidrolisados hemicelulósicos (77). Liu et al. (78), reportaram o efeito do PTH em um híbrido de *Eucalyptus urophylla* e *Eucalyptus grandis*, na condição operacional de 160 °C e 80 min e constatou a formação de 2 mg.g<sup>-1</sup> (dados em base seca) de furfural no hidrolisado hemicelulósico, corroborando com os resultados obtidos neste trabalho.

Os teores de glicose nos hidrolisados hemicelulósicos pós-tratamento hidrotérmico em todas as condições experimentais (ambos SO e STE) variaram de 0,1-11,1 mg.g<sup>-1</sup> (dados em base seca), o que representa em média apenas 0,01-1,1% (%massa/massa) em relação a massa de material pré-tratada hidrotermicamente (massa do material de partida em base seca) e 0,02-2,5% (%massa/massa) em relação a massa de celulose pré-tratada hidrotermicamente (massa de celulose do material de partida em base seca). Desta forma, a formação de glicose foi praticamente desprezível em todas as condições experimentais. Esse comportamento concerne com os dados de composição química (Tabelas 9 e 10 e Figuras 27 e 28) o qual confirmam que a celulose foi degradada apenas nas condições mais drásticas do PTH, para ambos SO e STE (Teste de Tukey). Além disso, houve formação limitada de arabinose nos hidrolisados pós-tratamento hidrotérmico em todas as condições experimentais, o qual já era esperado devido ao baixo teor de grupos arabinosil na fração hemicelulósica do subproduto em estudo (inclusive não detectável na composição química). Os baixos teores de glicose e arabinose nos hidrolisados pós-tratamento hidrotérmico corroboram com os resultados obtidos por Testova et al. (132), o qual verificou que em madeira de folhosas mesmo em condições severas de PTH os teores glicose e arabinose do hidrolisado foram relativamente baixos, da ordem 6,1 mg.g<sup>-1</sup> e 1,4 mg.g<sup>-1</sup> (dados em base seca) respectivamente, na condição operacional de 170 °C por 84 min. Xiao et al. (131), avaliaram o PTH em madeira de híbrido de duas espécies *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla*, condição

operacional de 170 °C por 30 min, o que culminou em um teor de arabinose de 0,7 mg.g<sup>-1</sup> (dados em base seca), corroborando com os resultados obtidos.

As Tabelas 11 e 12 também apresentam os teores de ácido fórmico nos hidrolisados hemicelulósicos pós-tratamento hidrotérmico em todas as condições experimentais. Os hidrolisados hemicelulósicos mostraram teores de ácido fórmico da ordem de 9,1 mg.g<sup>-1</sup> e 4,2 mg.g<sup>-1</sup> (dados em base seca) nas condições mais drásticas, em relação às demais condições do PTH do SO e STE, respectivamente (Tabelas 9 e 10). Esses teores representam em média apenas 0,91% e 0,42% (%massa/massa) em relação a massa de material pré-tratada hidrotermicamente (massa de material de partida em base seca). Esses resultados são similares aos obtidos por Yan e Liu (133), onde foi reportado o PTH com cavacos de *Aspen*, condição operacional de 160 °C por 120 min, culminado em uma conversão máxima em ácido fórmico de 0,48% (%massa/massa).

### **5.5.2. Formação dos compostos desejados derivados de hemicelulose do hidrolisado pós-tratamento hidrotérmico**

As Tabelas 13 e 14 apresentam os produtos desejados formados no hidrolisado hemicelulósico pós-tratamentos hidrotérmicos. Os seguintes produtos desejados foram analisados: xilobiose, xilotriose, xilotetraose, xilopentaose, xilohexaose e >X<sub>6</sub>, além da soma total (xilotriose+xilotetraose+xilopentaose+xilohexaose+>X<sub>6</sub>) representada por “XOS”. Os dados também foram apresentados na forma de miligramas de produtos formados por grama de subproduto PTH (dados em base seca).

**Tabela 13** - Teores de xilo-oligossacarídeos (XOS) dos hidrolisados hemicelulósicos pós-tratamentos hidrotérmicos do subproduto original (SO). Dados apresentados em miligramas de produtos por grama de material de partida (dados em base seca).

Subproduto Original (SO)	Variáveis do pré-tratamento hidrotérmico			Componentes do hidrolisado hemicelulósico					
	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Consistência (%)	>X <sub>6</sub> (mg.g <sup>-1</sup> )	X <sub>6</sub> +X <sub>5</sub> (mg.g <sup>-1</sup> )	X <sub>4</sub> (mg.g <sup>-1</sup> )	X <sub>3</sub> (mg.g <sup>-1</sup> )	X <sub>2</sub> (mg.g <sup>-1</sup> )	XOS (mg.g <sup>-1</sup> )
1	140	30	5	19,26	2,79	*	4,69	*	26,74
2	140	30	15	10,70	2,73	*	4,25	*	17,67
3	180	30	5	4,53	*	9,86	*	*	14,39
4	180	30	15	7,80	*	*	*	*	7,80
5	140	90	5	15,20	3,65	*	*	*	18,85
6	140	90	15	15,01	4,85	*	*	*	19,87
7	180	90	5	1,32	4,03	3,19	*	3,36	11,90
8	180	90	15	4,66	5,95	3,23	2,86	1,24	17,95
9	126,4	60	10	3,17	1,43	*	*	*	4,60
10	193,6	60	10	3,30	16,32	*	*	60,11	79,73
11	160	9,6	10	11,74	*	3,89	*	*	15,63
12	160	110,4	10	14,97	17,76	*	*	18,08	50,81
13	160	60	1,6	22,57	*	*	*	*	22,57
14	160	60	18,4	38,16	12,51	*	*	5,86	56,53
a	160	60	10	32,06	*	9,05	5,66	23,75	70,50
b	160	60	10	37,02	*	8,28	8,01	9,75	63,06
c	160	60	10	36,54	*	7,71	5,29	2,23	51,77
d	160	60	10	37,13	*	8,24	6,92	4,64	56,93

(X<sub>2</sub>)=Xilobiose, (X<sub>3</sub>)=Xilotriose, (X<sub>4</sub>)=Xilotetraose, (X<sub>5</sub>/X<sub>6</sub>)= Xilopentaose+Xilohexose e (>X<sub>6</sub>)= oligossacarídeos com mais de seis unidades repetitivas. XOS = (>X<sub>6</sub>)+(X<sub>6</sub>+X<sub>5</sub>)+(X<sub>4</sub>)+(X<sub>3</sub>)+(X<sub>2</sub>). \* = não detectável.

**Tabela 14** - Teores de xilo-oligossacarídeos (XOS) dos hidrolisados hemicelulósicos pós-tratamentos hidrotérmicos do subproduto triturado-extraído (STE). Dados apresentados em miligramas de produtos por grama de material de partida (dados em base seca).

Subproduto Triturado- Extraído (STE)	Variáveis do pré-tratamento hidrotérmico			Componentes do hidrolisado hemicelulósico					
	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Consistência (%)	>X <sub>6</sub> (mg.g <sup>-1</sup> )	X <sub>6</sub> +X <sub>5</sub> (mg.g <sup>-1</sup> )	X <sub>4</sub> (mg.g <sup>-1</sup> )	X <sub>3</sub> (mg.g <sup>-1</sup> )	X <sub>2</sub> (mg.g <sup>-1</sup> )	XOS (mg.g <sup>-1</sup> )
	-	-	-						
1	140	30	5	9,48	*		4,58	*	14,05
2	140	30	15	9,66	*		4,99	*	14,65
3	180	30	5	6,18	*	8,59	*	*	14,77
4	180	30	15	6,32	*	9,80		*	16,12
5	140	90	5	8,76	*		4,33	*	13,08
6	140	90	15	5,87	8,20	4,40	4,69	3,89	27,05
7	180	90	5	7,04	*	9,01	*	*	16,05
8	180	90	15	4,88	*	5,95	*	*	10,82
9	126,4	60	10	2,28	1,24		*	*	3,51
10	193,6	60	10	5,08	*	13,19	*	*	18,28
11	160	9,6	10	18,86	*	3,75	*	*	22,61
12	160	110,4	10	14,22	16,25	*	*	17,33	47,79
13	160	60	1,6	21,56	*	*	9,40	*	40,37
14	160	60	18,4	23,28	16,04	*	17,23	8,62	65,17
a	160	60	10	28,85	*	9,15	5,45	23,49	66,94
b	160	60	10	28,28	*	9,08	9,99	24,63	71,98
c	160	60	10	26,82	*	8,61	8,83	16,01	60,28
d	160	60	10	25,23	*	9,06	13,78	10,04	58,12

(X<sub>2</sub>)=Xilobiose, (X<sub>3</sub>)=Xilotriose, (X<sub>4</sub>)=Xilotetraose, (X<sub>5</sub>/X<sub>6</sub>)= Xilopentaose+Xilohexose e (>X<sub>6</sub>)= oligossacarídeos com mais de seis unidades repetitivas. XOS = (>X<sub>6</sub>)+(X<sub>6</sub>+X<sub>5</sub>)+(X<sub>4</sub>)+(X<sub>3</sub>)+(X<sub>2</sub>). \* = não detectável.

Os teores totais de XOS do SO, pós-tratamento hidrotérmico, variaram de 4,60-79,73 mg.g<sup>-1</sup> (dados em base seca) (Tabela 13). Em todas condições experimentais houve a formação de >X<sub>6</sub> (XOS com mais de 6 unidades de xilose), sendo que os teores mais elevados desse componente foram detectados no ponto central do planejamento experimental (média de 36 mg.g<sup>-1</sup>) (Tabela 13). A maior formação de XOS no ponto central do planejamento experimental corrobora com o trabalho de Tun e Van Heiningen (134) os quais verificaram que a maior formação de XOS ocorreu a temperaturas superiores a 150 °C e inferiores a 170 °C, ou seja, em torno de 160 °C.

O ponto central também apresentou um teor médio de xilobiose (X<sub>2</sub>), xilotriose (X<sub>3</sub>) e xilotetraose (X<sub>4</sub>) de 10,1, 7,9 e 6,5 mg.g<sup>-1</sup> (dados em base seca), respectivamente. Todavia, não foi detectada a formação de xilopentaose+xilohexaose (X<sub>5</sub>+X<sub>6</sub>) no ponto central do planejamento (Tabela 13). Testova et al. (132) reportaram teores de xilobiose, xilotriose e xilotetraose em hidrolisado hemicelulósico de lascas de madeira (*Betula pendula*) da ordem de 12,2, 7,6 e 5,3 mg.g<sup>-1</sup> (dados em base seca), respectivamente, pós-tratamento hidrotérmico na condição operacional de 170°C e 84 min, corroborando com os dados do subproduto em estudo.

Os teores totais de XOS, pós-tratamento hidrotérmico, do STE variaram de 3,51-71,98 mg.g<sup>-1</sup> (dados em base seca) (Tabela 14). Neste caso também houve a formação de >X<sub>6</sub> (XOS com mais de 6 unidades de xilose), em todas condições experimentais, sendo que os teores mais elevados desse componente também foram detectados no ponto central do planejamento experimental (média de 27 mg.g<sup>-1</sup>) (Tabela 14). O ponto central também

apresentou um teor médio de xilobiose ( $X_2$ ), xilotriose ( $X_3$ ) e xilotetraose ( $X_4$ ) de 18,5, 9,5 e 9,0  $\text{mg.g}^{-1}$  (dados em base seca), respectivamente. Todavia, não foi detectada a formação de xilopentaose+xilohexaose ( $X_5+X_6$ ) no ponto central do planejamento (Tabela 14).

O STE mostrou um teor mais elevado de xilobiose (18,5  $\text{mg.g}^{-1}$ ) quando comparado ao SO (10,1  $\text{mg.g}^{-1}$ ), porém, os teores de xilotriose e xilotetraose foram similares para ambos substratos (ambos no ponto central do planejamento experimental). Além disso, o teor total de XOS foram similares para o SO e o STE no ponto central do planejamento experimental (Tabelas 13 e 14), corroborando com o trabalho de Testova et al. (132).

As Tabelas 15 e 16 apresentam as conversões de xilana em produtos desejados (XOS) e os principais produtos não desejados (xilose, furfural e ácido fórmico). Além disso, as Figuras 29 e 30 apresentam as conversões de xilana em produtos em função do P-Fator. Os teores de aromáticos solúveis que representaram uma porcentagem importante nos hidrolisados hemicelulósicos são oriundos da fração de lignina. Desta forma, os aromáticos solúveis não puderam ser tratados em termos de conversão de xilana em produtos, todavia, salienta-se que esse composto é um importante contaminante nos hidrolisados hemicelulósicos oriundos do PTH.

**Tabela 15** - Conversão de xilana do subproduto original (SO) em  $>X_6$ ,  $X_6+X_5$ ,  $X_4$ ,  $X_3$ ,  $X_2$ , XOS, xilose, furfural e ácido fórmico pós-tratamentos hidrotérmicos em diferentes condições. Dados apresentados em porcentagem (grama de produtos por 100 gramas de xilana oriundo do subproduto, dados em base seca).

Subproduto Original	Variáveis do pré-tratamento hidrotérmico			Conversão de xilana em produtos (%)								
	Temperatura	Tempo	Consistência	$>X_6$	$X_6+X_5$	$X_4$	$X_3$	$X_2$	XOS	Xilose	Furfural	#Fórmico
	(°C)	(min)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
	-	-	-									
1	140	30	5	13,66	1,93	*	3,18	*	18,77	0,57	0,01	0,03
2	140	30	15	7,59	1,89	*	2,88	*	12,36	0,27	0,16	0,02
3	180	30	5	3,21	*	6,76	*	*	9,97	24,29	12,17	0,22
4	180	30	15	5,53	*	*	*	*	5,53	24,33	12,12	0,21
5	140	90	5	10,78	2,52	*	*	*	13,31	3,18	0,26	0,03
6	140	90	15	10,65	3,35	*	*	*	14,01	1,46	0,22	0,03
7	180	90	5	0,94	2,79	2,19	*	2,23	8,14	0,45	1,31	0,29
8	180	90	15	3,31	4,12	2,21	1,94	0,82	12,41	3,25	2,38	0,29
9	126,4	60	10	2,25	0,99	*	*	*	3,24	*	*	*
10	193,6	60	10	2,34	*	11,29	*	*	13,63	*	11,72	0,23
11	160	9,6	10	8,32	*	2,67	*	*	10,99	*	0,09	0,03
12	160	110,4	10	10,62	12,29	*	*	12	34,91	22,27	3,60	0,11
13	160	60	1,6	16,01	*	*	*	*	21,18	2,59	0,66	*
14	160	60	18,4	27,06	8,66	*	*	2,04	39,61	6,68	0,68	0,04
a	160	60	10	22,73	*	6,20	3,83	15,76	48,54	12,47	0,63	0,06
b	160	60	10	26,26	*	5,68	5,43	6,47	43,84	9,17	0,17	0,05
c	160	60	10	25,92	*	5,29	3,59	1,48	36,27	6,69	0,61	0,04
d	160	60	10	26,33	*	5,65	4,69	3,08	39,75	7,11	0,75	0,05

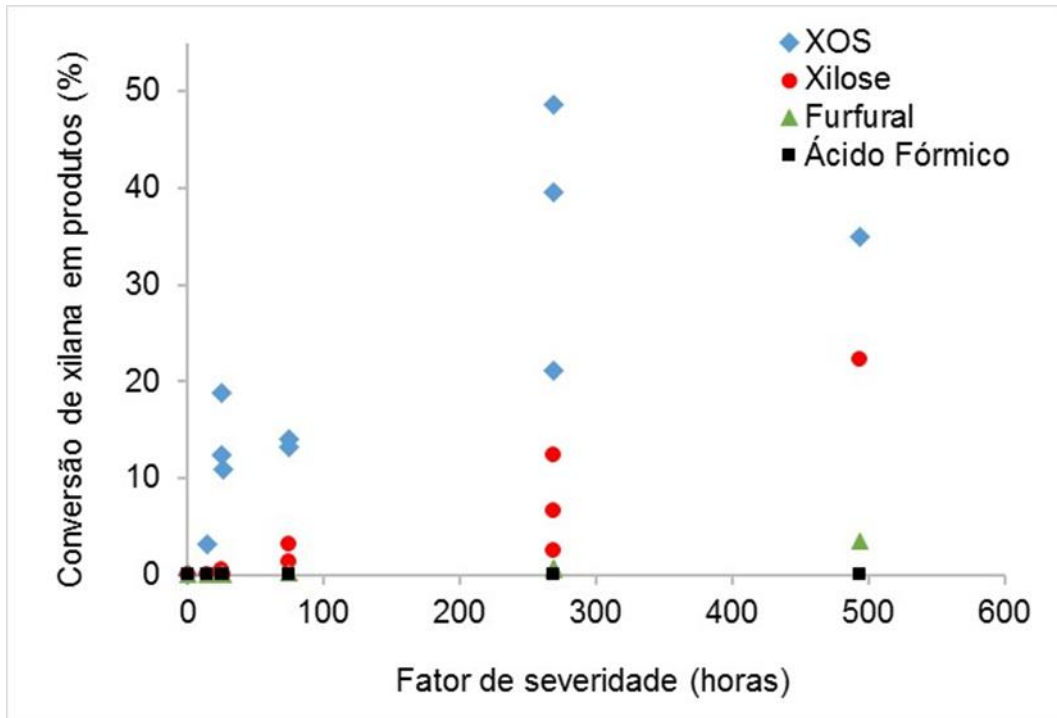
( $X_2$ )=Xilobiose, ( $X_3$ )=Xilotriose, ( $X_4$ )=Xilotetraose, ( $X_5/X_6$ )= Xilopentaose+Xilohexose e ( $>X_6$ )= oligossacarídeos com mais de seis unidades repetitivas. XOS = ( $>X_6$ )+(X<sub>6</sub>+X<sub>5</sub>)+(X<sub>4</sub>)+(X<sub>3</sub>)+(X<sub>2</sub>). \* = não detectável. #Fórmico = ácido fórmico.



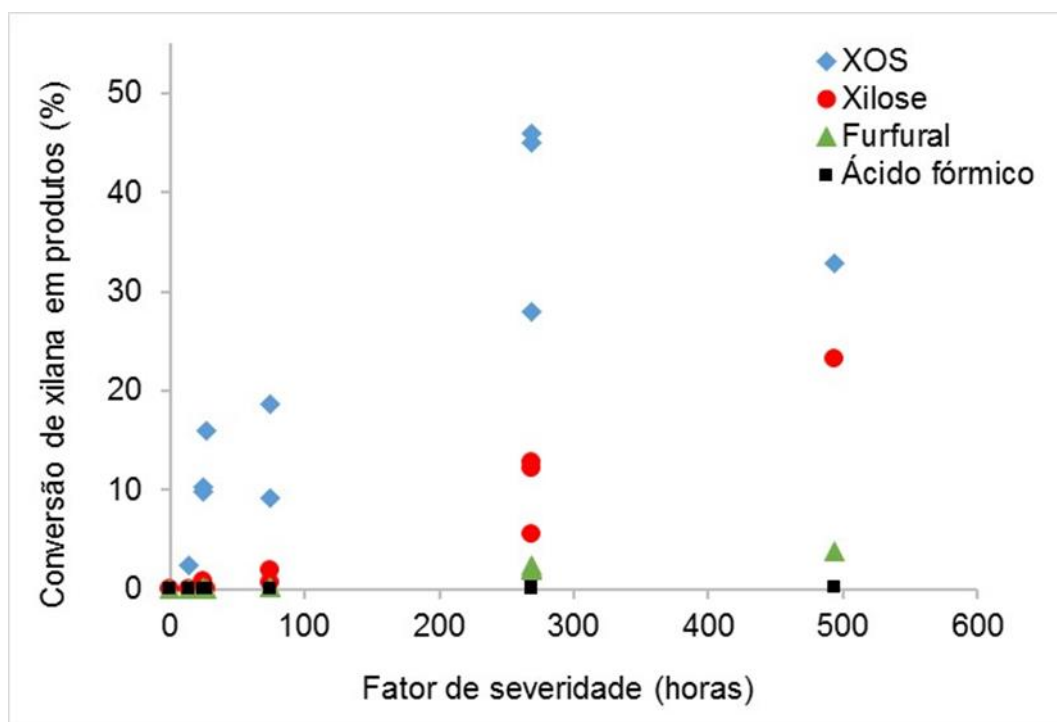
**Tabela 16** - Conversão de xilana do subproduto triturado-extraído (STE) em  $>X_6$ ,  $X_6+X_5$ ,  $X_4$ ,  $X_3$ ,  $X_2$ , XOS, xilose, furfural e ácido fórmico pós-tratamentos hidrotérmicos em diferentes condições. Dados apresentados em porcentagem (grama de produtos por 100 gramas de xilana oriundo do subproduto, dados em base seca).

Subproduto Triturado-Extraído	Variáveis do pré-tratamento hidrotérmico			Conversão de xilana em produtos (%)								
	Temperatura	Tempo	Consistência	$>X_6$	$X_6+X_5$	$X_4$	$X_3$	$X_2$	XOS	Xilose	Furfural	#Fórmico
	(°C)	(min)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
	-	-	-									
1	140	30	5	6,72	*	*	3,11	*	9,82	0,80	0,20	*
2	140	30	15	6,85	*	*	3,38	*	10,23	0,53	0,06	*
3	180	30	5	4,39	*	5,89	*	*	10,27	16,27	12,36	0,07
4	180	30	15	4,48	*	6,72	*	*	11,20	21,35	12,64	0,08
5	140	90	5	6,21	*	*	2,93	*	9,14	0,72	0,14	*
6	140	90	15	4,16	5,67	3,02	3,18	2,58	18,62	1,90	0,14	0,03
7	180	90	5	4,99	*	6,18	*	*	11,17	7,30	23,74	0,10
8	180	90	15	3,46	*	4,08	*	*	7,54	5,14	17,54	0,08
9	126,4	60	10	1,61	0,86	*	*	*	2,46	*	*	0,01
10	193,6	60	10	3,61	*	9,05	*	*	12,65	*	5,12	0,07
11	160	9,6	10	13,38	*	2,57	*	*	15,97	*	0,10	0,03
12	160	110,4	10	10,08	11,24	*	*	11,51	32,83	23,30	3,78	0,18
13	160	60	1,6	15,29	*	*	12,75	*	28,01	5,55	2,11	0,22
14	160	60	18,4	16,51	11,10	*	11,68	5,72	45,02	12,79	2,33	0,16
a	160	60	10	20,46	*	6,27	3,70	15,59	46,02	12,14	1,90	0,05
b	160	60	10	20,06	*	6,23	6,78	16,35	49,41	13,43	1,07	0,06
c	160	60	10	19,02	*	5,91	5,99	10,63	41,55	11,51	1,45	0,05
d	160	60	10	17,90	*	6,22	9,34	6,67	40,12	15,32	1,51	0,05

( $X_2$ )=Xilobiose, ( $X_3$ )=Xilotriose, ( $X_4$ )=Xilotetraose, ( $X_5/X_6$ )= Xilopentaose+Xilohexose e ( $>X_6$ )= oligossacarídeos com mais de seis unidades repetitivas. XOS = ( $>X_6$ )+(X<sub>6</sub>+X<sub>5</sub>)+(X<sub>4</sub>)+(X<sub>3</sub>)+(X<sub>2</sub>). \* = não detectável. #Fórmico = ácido fórmico.



**Figura 29** - Conversão de xilana do subproduto original (SO) em XOS, xilose, furfural e ácido fórmico pós-tratamentos hidrotérmicos em função do fator de severidade (P-Fator). Dados apresentados em porcentagem (grama de produtos por 100 gramas de xilana oriundo do subproduto, dados base seca). FONTE: Autor, (2019).



**Figura 30** - Conversão de xilana do subproduto triturado-extraído (STE) em XOS, xilose, furfural e ácido fórmico pós-tratamentos hidrotérmicos em função

do fator de severidade (P-Fator). Dados apresentados em porcentagem (grama de produtos por 100 gramas de xilana oriundo do subproduto, dados em base seca). FONTE: Autor, (2019).

Os PTH do SO nas condições operacionais mais severas (condições 3, 4, 7, 8, 10 e 12, Tabela 15 e Figura 29) mostraram uma conversão média da fração de xilana em XOS, xilose e furfural da ordem de 14%, 12% e 7% (dados em base seca), respectivamente. Nestas condições o P-Fator variou de 494,1-3310,9 h, sendo o valor médio de 1469,2 h (Tabela 15 e Figura 29). Entretanto, os PTH nas condições operacionais mais brandas (condições 1, 2, 5, 6 e 9, Tabela 15 e Figura 29) mostraram uma conversão média da fração de xilana em XOS, xilose e furfural da ordem de 12%, 1,3% e 0,2% (dados em base seca), respectivamente. Nestas condições o P-Fator variou de 14,3-74,4 h, sendo o valor médio de 39,9 h (Tabela 15 e Figura 29). A condição do PTH intermediário (ponto central do planejamento experimental) mostraram uma conversão média da fração de xilana em XOS, xilose e furfural da ordem de 42%, 9% e 0,5% (dados em base seca), respectivamente, onde o P-fator foi de 268,5 h (Tabela 15 e Figura 29).

Os bioprodutos mais abundantes gerados no PTH foram os XOS, que atingiram um máximo na condição operacional intermediária do PTH, sendo que nessa condição ocorreu maior formação de XOS com mais de 6 unidades de xilose ( $>X_6$ , 25,3%), seguido de xilobiose ( $X_2$ , 5,7%), xilotriose ( $X_3$ , 4,4%) e xilotetraose ( $X_4$ , 6,7%). Entretanto, não ocorreu a formação de xilopentaose e xilohexaose nesta condição (Tabela 15). Nas condições operacionais mais amenas do PTH não ocorreu a formação de xilobiose ( $X_2$ ) e xilotetraose ( $X_4$ ), formando apenas XOS com mais de 6 unidades de xilose ( $>X_6$ , 9%),

xilopentaose+xilohexaose ( $X_6+X_5$ , 2,1%) e xilotriose ( $X_3$ , 3%) (Tabela 15). As condições operacionais mais severas do PTH resultaram em maior formação de xilose e conseqüentemente menor formação de XOS. Nestas condições os componentes derivados da hemicelulose resultaram em XOS com mais de 6 unidades de xilose ( $>X_6$ , 3,1%), xilohexaose+xilopentaose ( $X_6+X_5$ , 3,4%) xilotetraose ( $X_4$ , 5,6%), xilotriose ( $X_3$ , 1,9%), xilobiose ( $X_2$ , 1,5%) (Tabela 15). Os resultados apresentados foram similares aos obtidos por Testova et al. (132), onde os autores pré-trataram hidrotermicamente lascas de madeira do tipo folhosas na condição operacional de 180 °C por 84 min, obtendo-se a formação de xilotetraose ( $X_4$ , 1,3%), xilotriose ( $X_3$ , 1,7%) e xilobiose ( $X_2$ , 2,5%). Também nessa condição resultou na formação de 50% de xilose, sendo considerada uma condição severa.

Os PTH do STE nas condições operacionais mais severas (condições 3, 4, 7, 8, 10 e 12, Tabela 16 e Figura 30) mostraram uma conversão média da fração de xilana em XOS, xilose e furfural da ordem de 14%, 15%, 13% (dados em base seca), respectivamente (Tabela 16). Nestas condições o P-Fator variou de 494,1-3310,9 h, sendo o valor médio de 1469,2 h (Tabela 15 e Figura 30). Entretanto, os PTH nas condições operacionais mais brandas (condições 1, 2, 5, 6, 9 e 11, Tabela 16 e Figura 30) mostraram uma conversão média da fração de xilana em XOS, xilose e furfural da ordem de 11%, 1% e 0,1% (dados em base seca), respectivamente. Nestas condições o P-Fator variou de 14,3-74,4 h, sendo o valor médio de 39,9 h (Tabela 15 e Figura 30). A condição operacional do PTH intermediário (ponto central do planejamento) mostraram uma conversão média da fração de xilana em XOS, xilose e furfural

da ordem de 44%, 13% e 1,5% (dados em base seca), respectivamente, onde o P-Fator foi de 268,5 h (Tabela 16 e Figura 30).

A formação de XOS no PTH atingiu seu máximo na condição operacional intermediária, sendo que nessas condições ocorreu maior formação de XOS com mais de 6 unidades de xilose ( $>X_6$ , 19,4%), seguido de xilobiose ( $X_2$ , 12,3%), xilotriose ( $X_3$ , 6,5%) e xilotetraose ( $X_4$ , 6,2%). Entretanto, não ocorreu a formação de xilopentaose e xilohexaose nesta condição (Tabela 16). Nas condições operacionais mais amenas do PTH ocorreu a formação de XOS com mais de 6 unidades de xilose ( $>X_6$ , 5,1%), xilohexaose+xilopentaose ( $X_6+X_5$ , 0,86%) xilotetraose ( $X_4$ , 3%), xilotriose ( $X_3$ , 3,2%), xilobiose ( $X_2$ , 2,6%) (Tabela 16). As condições operacionais mais severas do PTH mostraram maior formação de xilose e menor formação em XOS. Nessas condições não ocorreram formação de xilopentaose+xilohexaose ( $X_6+X_5$ ), xilotriose ( $X_3$ ) e xilobiose ( $X_2$ ), resultando apenas na formação de XOS com mais de 6 unidades de xilose ( $>X_6$ , 4,3%) e xilotetraose ( $X_4$ , 6,4%) (Tabela 16). Esses resultados corroboram com os reportados por Yu et al. (126), que estudaram a influência do tempo e da temperatura no PTH de madeira *Eucalyptus grandis*. Nesse estudo os autores concluíram que os PTH em temperaturas mais severas (180-200 °C), com tempos variando de 10-60 min promoveram conversões limitadas de xilana em XOS, porém altas conversões de xilana em furfural. Os resultados obtidos também estão de acordo com Testova et al. (132), onde os autores pré-trataram hidrotêrmicamente lascas de madeira do tipo folhosas, condição experimental de 170 °C e 84 min, o que culminou nas seguintes conversões de xilana em xilose e XOS: 50% em xilose, 2,5% em

xilobiose ( $X_2$ ), 1,5% em xilotriose ( $X_3$ ), 1,2% em xilotetraose ( $X_4$ ) e 0,6% em  $>X_4$  (xilo-oligossacarídeos com mais 4 unidades de xilose) (%massa/massa).

De uma maneira geral os PTH nas condições mais severas culminaram em altas conversões da fração de xilana em furfural e xilose, enquanto os PTH nas condições mais brandas culminaram em conversões limitadas da fração de xilana em furfural e xilose. Entretanto, ambas as condições operacionais (brandas e severas) mostraram conversões razoáveis da fração de xilana em XOS. Todavia, os PTH na condição intermediária culminaram em altas conversões da fração de xilana em XOS, porém conversões menores em xilose e furfural (Tabelas 15 e 16 e Figuras 29 e 30).

A Tabela 17 apresenta os teores de xilose, furfural e XOS dos hidrolisados dos PTH oriundos do presente estudo comparado com hidrolisados hemicelulósicos oriundos de PTH com madeiras de folhosas de outros trabalhos reportados na literatura. Os resultados obtidos no presente estudo corroboram com o trabalho de Liu et al. (78). Os autores estudaram o efeito da severidade do PTH em uma mistura de polpa de *Eucalyptus urophylla* e *Eucalyptus grandis*. Os autores reportaram que o efeito do P-Fator (738 h) nas condições operacionais do PTH (170 °C e 60 min). Nestas condições houve maior formação de XOS (50%) e menor formação de furfural (3,7%). Todavia, em uma condição operacional mais drástica (180 °C e 110 min) o P-Fator foi mais intenso (2654,9 h). Nesta condição houve menor formação de XOS (11,25%) e maior formação de furfural (22,5%) em relação a massa inicial de material de partida (Tabela 17).

**Tabela 17** - Teores de xilose, furfural e xilo-oligossacarídeos (XOS) dos hidrolisados hemicelulósicos pós-tratamentos hidrotérmicos do subproduto original (SO) e subproduto triturado-extraído (STE), ambos do presente estudo, além de resultados reportados na literatura. Dados apresentados em miligramas de produtos por grama de material de partida (dados em base seca).

Temperatura (°C)	Tempo (min)	P-Fator (h)	SO	SO	SO	STE	STE	STE	Referência
			Xilose (mg/g)	Furfural (mg/g)	XOS (mg/g)	Xilose (mg/g)	Furfural (mg/g)	XOS (mg/g)	
140	30	24,8	0,67	0,1	22,21	1,06	0,13	14,35	Este estudo
140	90	74,4	3,72	0,25	19,36	2,1	0,14	20,07	Este estudo
160	9,6	26,6	*	0,1	15,63	0,1	*	22,61	Este estudo
160	110,4	494,1	35,68	3,7	50,81	37,33	3,88	47,79	Este estudo
160	60	268,5	14,2	0,55	60,57	20,99	1,52	64,33	Este estudo
180	30	626,3	38,96	12,45	11,1	30,14	12,83	15,45	Este estudo
180	90	1878,9	2,96	18,93	14,93	9,97	21,19	13,44	Este estudo
150	90	198,2	3,1	2,4	42,9	3,1	2,4	42,9	<a href="#">Liu et al. (2015)</a>
160	80	416,3	13,0	6,0	52,5	13,0	6,0	52,5	<a href="#">Liu et al. (2015)</a>
180	40	1188,7	25,0	15,0	77,0	25,0	15,0	77,0	<a href="#">Liu et al. (2015)</a>
180	60	1607,6	44,0	17,0	45,0	44,0	17,0	45,0	<a href="#">Liu et al. (2015)</a>
170	60	737,5	15,0	7,5	90,0	15,0	7,5	90,0	<a href="#">Liu et al. (2015)</a>
180	110	2654,9	51,0	43,0	22,0	51,0	43,0	22,0	<a href="#">Liu et al. (2015)</a>
170	84	1000	50,0	8,0	58,0	50,0	8,0	58,0	<a href="#">Testova et al. (2011)</a>
170	60	590	34,2	6,3	69,3	38,0	4,6	77,0	<a href="#">Gütsch et al. (2012)</a>

Desta forma, pode-se afirmar preliminarmente que o PTH na condição intermediária apresentou maior seletividade para a produção de XOS (Tabelas 15 e 16 e Figuras 29 e 30).

As Tabelas 9, 10, 15 e 16 apresentam duas informações relevantes em relação à fração de xilana dos subprodutos em estudo (SO e STE): o teor de xilana obtido na fração sólida (Tabelas 9 e 10) e o teor de xilana convertida em produtos no hidrolisado hemicelulósico (ambos pós-tratamento hidrotérmico) (Tabelas 15 e 16). No entanto, a fim de verificar se os produtos formados e quantificados no hidrolisado hemicelulósico constituem toda a biomassa que foi previamente removida nos PTH foi realizado um balanço de massa.

As Tabelas 18 e 19 apresentam a massa de produtos recuperados da fração de xilana pós-tratamento hidrotérmico do SO e do STE. Para isso, foi considerada a massa de xilana que permaneceu na fração sólida (Tabelas 9 e 10) em relação aos produtos formados no hidrolisado hemicelulósico pós-tratamento hidrotérmico (Tabelas 15 e 16). Desta forma, se a soma da massa de xilana residual e a massa dos produtos recuperados pós-tratamento hidrotérmico apresentarem um valor próximo a 1,41 g (que é a massa inicial de xilana antes do PTH) ou um valor próximo a 100%, pode-se considerar que toda a massa de xilana previamente removida nos PTH constituem os produtos formados (quantificados anteriormente, Tabelas 15 e 16).



**Tabela 18** – Massa de produtos recuperados da fração de xilana do subproduto original de *Eucalyptus* (SO) pós-pré-tratamentos hidrotérmicos.

Subproduto Original	Variáveis do tratamento hidrotérmico			Massa de produtos recuperados				
	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Consistência (%)	Massa inicial de xilana (g)	Xilana convertida em produtos (%)	Xilana não convertida em produtos (%)	Produtos recuperados (g)	Produtos recuperados (%)
1	140	30	5	1,41	19,34	54,61	1,04	73,76
2	140	30	15	1,41	12,78	102,13	1,62	114,89
3	180	30	5	1,41	46,44	3,55	0,70	49,65
4	180	30	15	1,41	41,99	2,84	0,63	44,68
5	140	90	5	1,41	16,74	79,43	1,36	96,45
6	140	90	15	1,41	15,68	86,52	1,44	102,13
7	180	90	5	1,41	32,40	1,42	0,48	34,04
8	180	90	15	1,41	28,72	3,55	0,45	31,91
9	126,4	60	10	1,41	3,24	80,85	1,19	84,40
10	193,6	60	10	1,41	65,25	1,42	0,94	66,67
11	160	9,6	10	1,41	11,09	63,12	1,05	74,47
12	160	110,4	10	1,41	60,77	11,35	1,02	72,34
13	160	60	1,6	1,41	21,84	22,70	0,63	44,68
14	160	60	18,4	1,41	46,97	32,62	1,12	79,43
a	160	60	10	1,41	61,64	39,72	1,43	101,42
b	160	60	10	1,41	53,18	48,94	1,44	102,13
c	160	60	10	1,41	43,56	36,88	1,13	80,14
d	160	60	10	1,41	47,61	29,08	1,08	76,60

**Tabela 19** – Massa de produtos recuperados da fração de xilana do subproduto triturado-extraído (STE) de *Eucalyptus* pós-pré-tratamentos hidrotérmicos.

Subproduto Triturado- Extraído	Variáveis do tratamento hidrotérmico			Massa de produtos recuperados				
	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Consistência (%)	Massa inicial de xilana (g)	Xilana convertida em produtos (%)	Xilana não convertida em produtos (%)	Produtos recuperados (g)	Produtos recuperados (%)
1	140	30	5	1,41	10,82	91,20	1,45	102,28
2	140	30	15	1,41	10,81	99,29	1,55	109,93
3	180	30	5	1,41	38,90	0,71	0,56	39,72
4	180	30	15	1,41	45,19	2,13	0,67	47,52
5	140	90	5	1,41	10,01	88,65	1,39	98,58
6	140	90	15	1,41	20,66	85,11	1,49	105,67
7	180	90	5	1,41	42,21	0,71	0,61	43,26
8	180	90	15	1,41	30,22	0,71	0,44	31,21
9	126,4	60	10	1,41	2,47	71,63	1,04	73,76
10	193,6	60	10	1,41	17,78	*	0,25	17,73
11	160	9,6	10	1,41	16,05	66,67	1,17	82,98
12	160	110,4	10	1,41	59,91	17,73	1,09	77,30
13	160	60	1,6	1,41	35,70	14,89	0,71	50,35
14	160	60	18,4	1,41	60,14	28,37	1,25	88,65
a	160	60	10	1,41	60,06	38,30	1,39	98,58
b	160	60	10	1,41	63,91	36,88	1,42	100,71
c	160	60	10	1,41	54,51	48,23	1,45	102,84
d	160	60	10	1,41	56,95	16,31	1,03	73,05

As Tabelas 18 e 19 mostram que nas condições operacionais mais severas do PTH do SO e do STE (condições 3, 4, 7, 8 e 10) o balanço de massa dos produtos recuperados não fechou, ou seja, parte da massa da fração de xilana removida para o hidrolisado hemicelulósico pós-tratamento hidrotérmico não foi quantificada. Desta forma, a indicativo de que ocorreu um intenso processo de oxidação da xilana nas condições operacionais mais drásticas do PTH. Essa oxidação pode ter provocado a formação de compostos derivados de furfural e ácido fórmico, além da formação de dióxido de carbono (32,71). Todavia, os PTH nas condições operacionais mais amenas (condições 1, 2, 5, 6, 9 e 11) e intermediária (ponto central do planejamento experimental) o balanço massa dos produtos recuperados foi fechado (considerando uma variação de 15% nos valores calculado no PC, devido aos erros experimentais), indicando que todos os produtos formados no hidrolisado hemicelulósico foram quantificados com sucesso.

## ***5.6. Análise estatística do planejamento composto central (2<sup>3</sup>) dos compostos desejados (XOS)***

### ***5.6.1 Subproduto original (SO)***

De acordo com Calado e Montgomery (127), quatro diferentes modelos podem ser testados no planejamento composto central: (i) modelo contendo somente termos lineares dos efeitos principais; (ii) modelo contendo termos lineares e quadráticos dos efeitos principais; (iii) modelo contendo termos lineares dos efeitos principais e interações de segunda ordem e (iv)

modelo contendo termos lineares e quadráticos dos efeitos principais e interações de segunda ordem. A Tabela 20 apresenta os valores dos efeitos e dos coeficientes do modelo calculados tendo como variável resposta a conversão de xilana em XOS. A análise estatística dos resultados obtidos no planejamento experimental mostrou que os efeitos de interação de 2ª ordem não foram significativos a um nível de confiança de 95% ( $\alpha=5\%$ ). Os efeitos lineares também não foram significativos para todos os fatores investigados. Entretanto, os efeitos quadráticos mostraram ser significativos para as 3 variáveis independentes investigadas (Tabela 20). Desta forma, considerando os resultados obtidos, o modelo a ser estabelecido deve conter termos lineares e quadráticos dos efeitos principais que se mostraram significativos.

**Tabela 20** - Efeitos e coeficientes do modelo calculados para o planejamento composto central completo tendo como variável resposta a conversão de xilana em XOS.

Efeitos estimados: Subproduto Original (SO) - XOS (%): $R^2 = 0,804$								
Fator	Efeito	DP	t(3)	P	-95%	+95%	Coef.	DP Coef.
Média	42,3920	2,482788	17,0744	0,00044	34,4907	50,2934	42,392	2,482788
(1)X <sub>1</sub> (L)	0,2830	2,691303	0,10515	0,92289	-8,2819	8,8479	0,1415	1,345652
X <sub>1</sub> (Q)	-27,9572	2,796450	-9,99739	0,002130	-36,8568	-19,0577	-13,9786	1,398225
(2)X <sub>2</sub> (L)	5,8620	2,691303	2,17814	0,117554	-2,7029	14,4270	2,9310	1,345652
X <sub>2</sub> (Q)	-17,8032	2,796450	-6,36634	0,007844	-26,7027	-8,9036	-8,9016	1,398225
(3)X <sub>3</sub> (L)	0,0050	2,691303	0,00185	0,998642	-8,5600	8,5699	0,0025	1,345652
X <sub>3</sub> (Q)	-9,1376	2,796450	-3,26756	0,046863	18,0371	-0,2380	-4,5688	1,398225

Variáveis codificadas (X<sub>1</sub>=temperatura, X<sub>2</sub>=tempo, X<sub>3</sub>=consistência); DP=desvio padrão do erro puro; t(3)=estatística t de Student; P=valor-p de probabilidade de significância; 95%=limite de confiança, Coef.= coeficiente; DP Coef.=desvio padrão do coeficiente. L=Linear; Q=quadrático.

De acordo com a Tabela 20, a Equação do modelo ajustado é dada por:

$$XOS = b_0 + b_1X_1 + b_2X_1^2 + b_3X_2 + b_4X_2^2 + b_5X_3 + b_6X_3^2 \quad (17)$$

Onde:

$b_0=42,3920$ ;  $b_1=0,1415$ ;  $b_2=-13,9786$ ;  $b_3=2,9310$ ;  $b_4=-8,9016$ ;  $b_5=0,0025$ ;  $b_6=-4,5688$

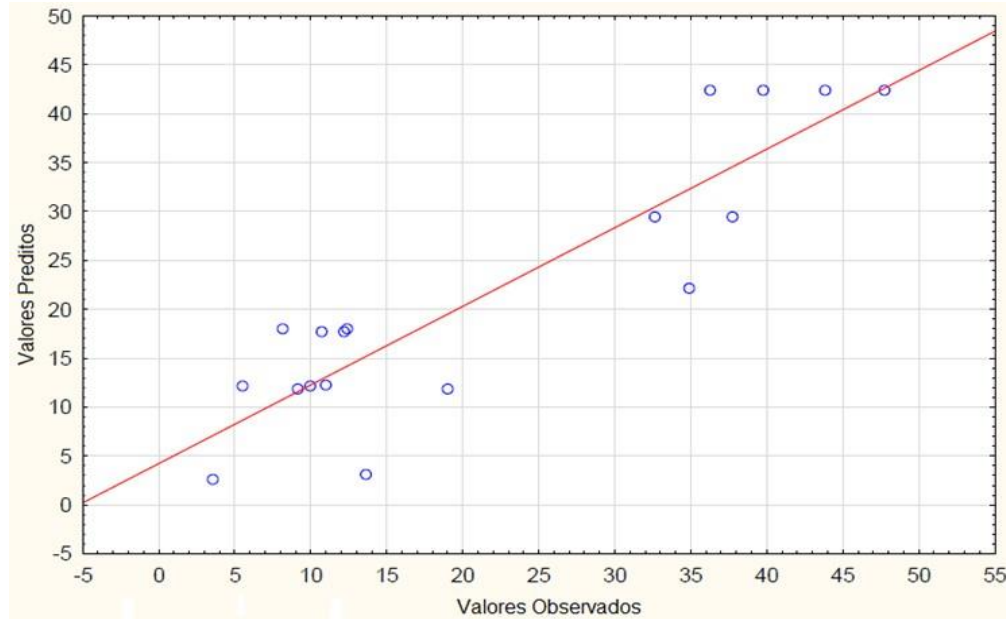
A Tabela 21 apresenta a ANOVA (Análise de Variância), na qual é realizada a análise da validade estatística do ajuste do modelo por meio do teste  $p$ . O teste  $p$  para falta de ajuste do modelo foi negativo, isto é, não significativo, indicando que o modelo ajustado é estatisticamente adequado para descrever os dados experimentais a um nível de confiança de 95%, apresentando um coeficiente de determinação/explicação ( $R^2$ ) de 0,80.

**Tabela 21** - Análise de variância (ANOVA) para o ajuste do modelo tendo como variável resposta a conversão de xilana em XOS.

<b>ANOVA – Subproduto Original (SO) - XOS (%): <math>R^2 = 0,80</math></b>					
Fator	SQ	GL	MQ	F	p
(1) $X_1$ (L)	0,273	1	0,273	0,01106	0,922889
$X_1$ (Q)	2471,664	1	2471,664	99,94785	0,002130
(2) $X_2$ (L)	117,324	1	117,324	4,7443	0,117554
$X_2$ (Q)	1002,295	1	1002,295	40,53029	0,007844
(3) $X_3$ (L)	0,000	1	0,000	0,00000	0,998642
$X_3$ (Q)	264,035	1	264,035	10,67693	0,046863
Falta de ajuste	672,202	8	84,025	3,39777	0,171400
Puro erro	74,189	3	24,730		
Total SQ	3812,826	17			

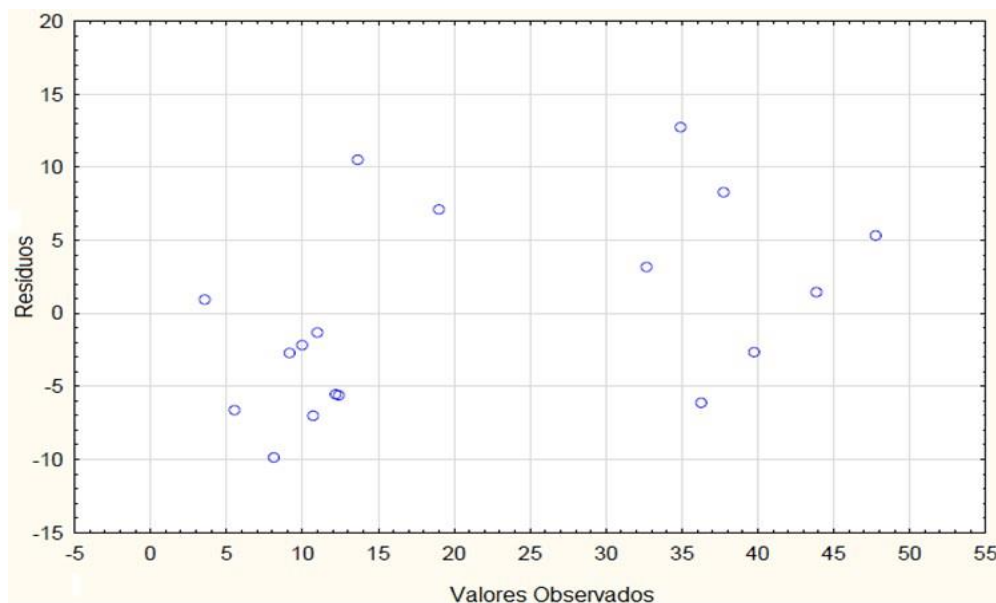
Variáveis codificadas ( $X_1$ =temperatura,  $X_2$ =tempo,  $X_3$ =consistência); SQ=soma quadrática; GL=graus de liberdade; MQ=média quadrática; F=estatística de Fisher; p=valor-p de probabilidade de significância.

A qualidade do ajuste também pode ser avaliada por meio do gráfico de distribuição dos valores da conversão de xilana em XOS preditos pelo modelo matemático e aqueles obtidos experimentalmente. Desta forma, quanto maior a proximidade dos pontos em relação à reta identidade ( $y=x$ ), melhor é a qualidade do ajuste (Figura 31).



**Figura 31** - Correlação entre as conversões de XOS do subproduto original (SO) preditas pelo modelo matemático e aquelas obtidas experimentalmente. FONTE: Autor, (2019).

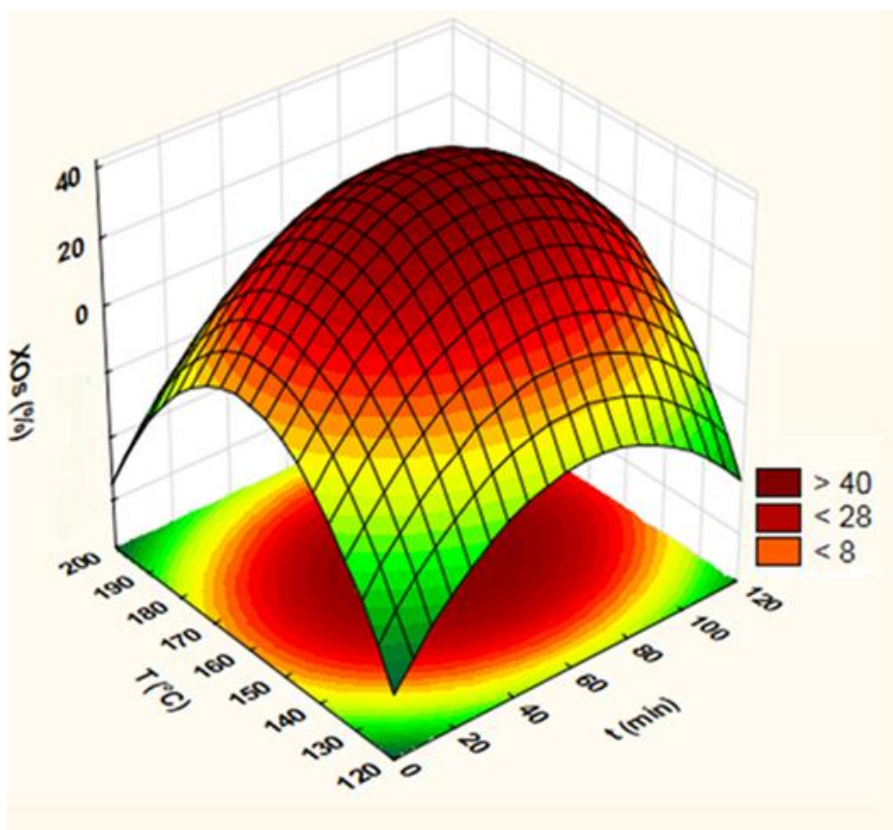
A Figura 32 apresenta a distribuição dos resíduos (valores de conversão experimentais - valores de conversão calculados pelo modelo matemático) em função dos valores experimentais (observados) da conversão da xilana em XOS. Observa-se uma distribuição simétrica e aleatória dos resíduos em torno do valor zero, o que qualifica o ajuste do modelo matemático. Além disso, não há padrões (tendências de comportamento) aparentemente detectáveis, validando, dessa forma, a suposição de variância constante (homocedasticidade) dos resíduos.



**Figura 32** - Distribuição dos resíduos (diferença entre os valores de conversão de xilana em XOS observados e aqueles calculados pelo modelo matemático) em função dos valores observados para o subproduto original (SO). FONTE: Autor, (2019).

A Figura 33 apresenta a superfície de resposta gerada com o modelo matemático representado pela Equação 14. A superfície de resposta mostra uma concavidade voltada para baixo, sendo que a máxima produção de XOS ocorre em condições experimentais em torno do ponto central do planejamento experimental. Para geração da superfície é necessário fixar uma das três variáveis independentes uma vez que a superfície é tridimensional e permite apenas a representação espacial de três variáveis: a resposta e duas variáveis independentes. No caso, a superfície foi gerada fixando-se a consistência em seu valor central ( $x_3=0$ ), pois o termo quadrático referente a esta variável mostrou-se marginalmente significativo, apresentando um valor de  $p$  igual a 0,046863, bem próximo daquele adotado para o teste de significância ( $\alpha=0,05$ ). Ademais, as superfícies geradas fixando-se o tempo ou a temperatura reacional são bem similares àquela

mostrada na Figura 33, retratando de forma equivalente o comportamento do sistema.



**Figura 33** - Superfície de resposta para o planejamento composto central tendo como variável resposta a conversão de xilana em XOS observada no pré-tratamento do subproduto original (SO). Variáveis (T (°C) = temperatura e t (min) = tempo). FONTE: Autor, (2019).

A determinação do ponto ótimo para maximização da produção de XOS foi realizada no próprio software *Statística* segundo um procedimento que consiste em derivar parcialmente a Equação 14 com relação às variáveis  $X_1$ ,  $X_2$  e  $X_3$ , gerando três equações algébricas que são resolvidas em  $X_1$ ,  $X_2$  e  $X_3$  para fornecer as coordenadas do ponto ótimo, as quais, no caso, estão apresentadas na Tabela 22 e confirmam que tal ponto está realmente localizado próximo ao ponto central.



**Tabela 22** - Valores das coordenadas do ponto ótimo.

Fator	Valores Preditos da solução - Subproduto Original SO: 42,634%		
	Mínimo observado	Valor crítico	Máximo observado
<b>T (°C)</b>	-1,68179	0,005061 (161,01°C)	1,681793
<b>t (min)</b>	-1,68179	0,164635 (65 min)	1,681793
<b>C (%)</b>	-1,68179	0,000272 (10%)	1,681793

Decodificando-se as coordenadas do ponto ótimo obtém-se as seguintes condições ótimas para a temperatura, tempo e consistência do processo.

$$x_1 = (T - 160) / 20 \Rightarrow T = 0,005061 * 20 + 160 \Rightarrow T = 161,01^\circ\text{C}$$

$$x_2 = (t - 60) / 30 \Rightarrow t = 0,164635 * 30 + 60 \Rightarrow t = 65 \text{ min}$$

$$x_3 = (C - 10) / 5 \Rightarrow C = 0,000272 * 5 + 10 \Rightarrow C = 10\%$$

### 5.6.2 Subproduto triturado-extraído (STE)

A análise estatística dos resultados obtidos no planejamento experimental do STE foi similar à do SO, desta forma, o modelo a ser estabelecido deve conter termos lineares e quadráticos dos efeitos principais que se mostraram significativos. A Tabela 23 apresenta os valores dos efeitos e dos coeficientes do modelo calculados tendo como variável resposta a conversão de xilana em XOS. Assim os efeitos e os coeficientes quadráticos foram estatisticamente significativos para duas variáveis independentes (tempo e temperatura) investigadas, não sendo significativo para a variável consistência como já indicava o resultado obtido para esta variável com os dados relativos ao subproduto original (SO).

**Tabela 23** - Efeitos e coeficientes do modelo calculados para o planejamento composto central tendo como variável resposta a conversão de xilana em XOS.

Efeitos estimados: Subproduto Triturado-Extraído (STE) - XOS (%): R <sup>2</sup> = 0,81									
Fator	Efeito	DP erro puro	t(3)	P	-95%	+95%	Coef.	DP Coef.	Coef.
Média	45,0279	2,120179	21,2378	0,000228	38,2806	51,7753	45,0279	2,120179	
(1)X <sub>1</sub> (L)	1,3922	2,298240	0,6057	0,587439	-5,9219	8,7062	0,6961	1,149120	
X <sub>1</sub> (Q)	-32,6961	2,388030	-13,6917	0,000843	-40,2959	-25,0964	-16,3481	1,194015	
(2)X <sub>2</sub> (L)	4,8767	2,298240	2,1219	0,123958	-2,4374	12,1907	2,4383	1,149120	
X <sub>2</sub> (Q)	-20,7871	2,388030	-8,7047	0,003191	-28,3869	-13,1873	-10,3935	1,194015	
(3)X <sub>3</sub> (L)	-1,7591	2,298240	-0,7654	0,499728	-9,0731	5,5549	-0,8796	1,149120	
X <sub>3</sub> (Q)	-2,1736	2,388030	-0,9102	0,429820	-9,7734	5,4262	-1,0868	1,194015	

Variáveis codificadas (X<sub>1</sub>= Temperatura, X<sub>2</sub>= tempo, X<sub>3</sub>= consistência); DP = desvio padrão do erro puro; t(3)=estatística t de Student; P=valor-p de probabilidade de significância; 95%= limite de confiança, Coef.=coeficiente, DP Coef. = desvio padrão do coeficiente. L=Linear; Q=quadrático.

De acordo com a Tabela 23, a Equação do modelo ajustado é dada por:

$$XOS=b_0 + b_1X_1 + b_2X_1^2 + b_3X_2 + b_4X_2^2 \quad (18)$$

Onde:

$$b_0=45,0279; b_1=0,6961; b_2=-16,9541; b_3=2,4383; b_4=-10,3935$$

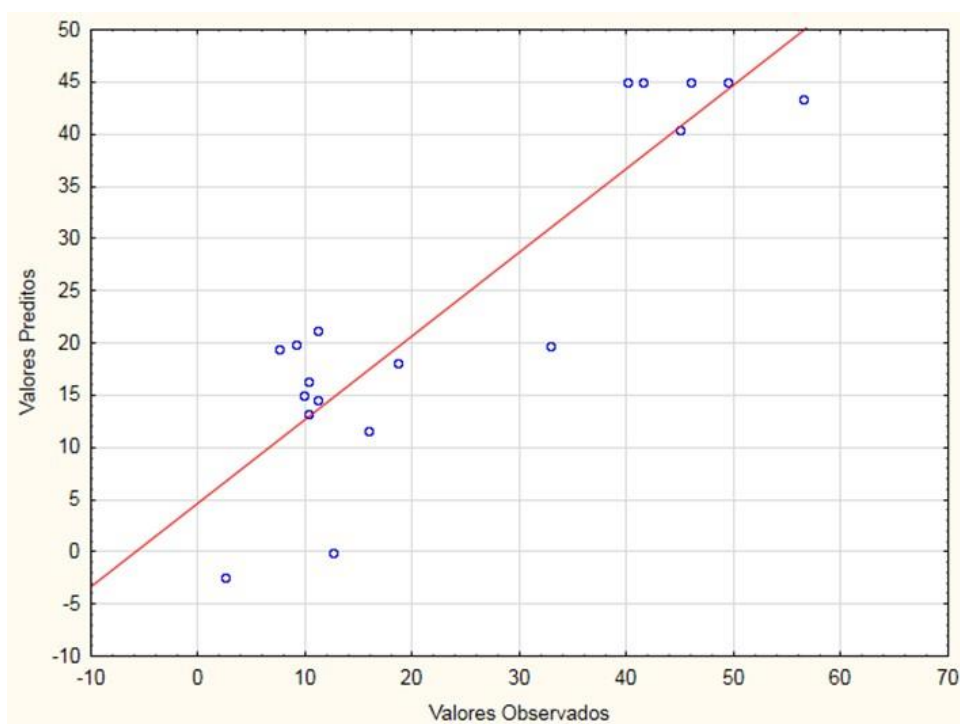
A Tabela 24 apresenta a ANOVA (análise de variância), para a avaliação da validade estatística do ajuste do modelo proposto segundo o teste *p*. Observa-se que o teste *p* para falta de ajuste do modelo foi negativo, isto é, não significativo, indicando que o modelo ajustado é estatisticamente adequado para descrever os dados experimentais a um nível de confiança de 95%, apresentando um coeficiente de determinação/explicação (R<sup>2</sup>) de 0,80.

**Tabela 24** - Análise de variância (ANOVA) para o ajuste do modelo tendo como variável de resposta conversão de xilana em XOS.

ANOVA - Subproduto Triturado-Extraído (STE) - XOS (%): $R^2=0,81$					
Fator	SQ	GL	MQ	F	P
(1) $X_1$ (L)	6,617	1	6,617	0,3669	0,587439
$X_1$ (Q)	3380,607	1	3380,607	187,4620	0,000843
(2) $X_2$ (L)	81,196	1	81,196	4,5025	0,123958
$X_2$ (Q)	1366,435	1	1366,435	75,7718	0,003191
(3) $X_3$ (L)	10,565	1	10,565	0,5859	0,499728
$X_3$ (Q)	14,940	1	14,940	0,8285	0,429820
Falta de ajuste	1008,203	8	126,025	6,9884	0,068757
Puro erro	54,101	3	18,034		
Total SQ	5355,232	17			

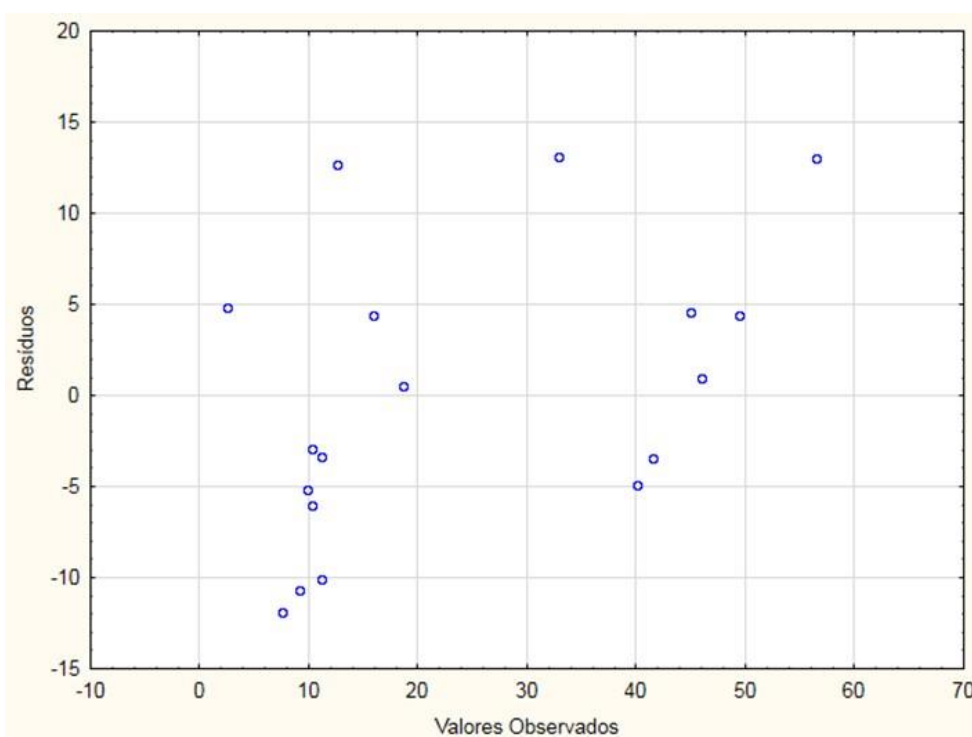
\*Variáveis codificadas ( $X_1$ =Temperatura,  $X_2$ =tempo,  $X_3$ =Consistência), SQ=soma quadrática, GL=graus de liberdade, MQ=média quadrática, F=estatística de Fisher, p=valor-p de probabilidade de significância.

A Figura 34, na qual está apresentada a distribuição das conversões de xilana em XOS previstas pelo modelo matemático e aquelas observadas experimentalmente, também fornece uma ideia da qualidade do ajuste, enfatizando que, quanto mais próxima for a distribuição dos pontos em torno da reta identidade, melhor é a qualidade do ajuste do modelo.



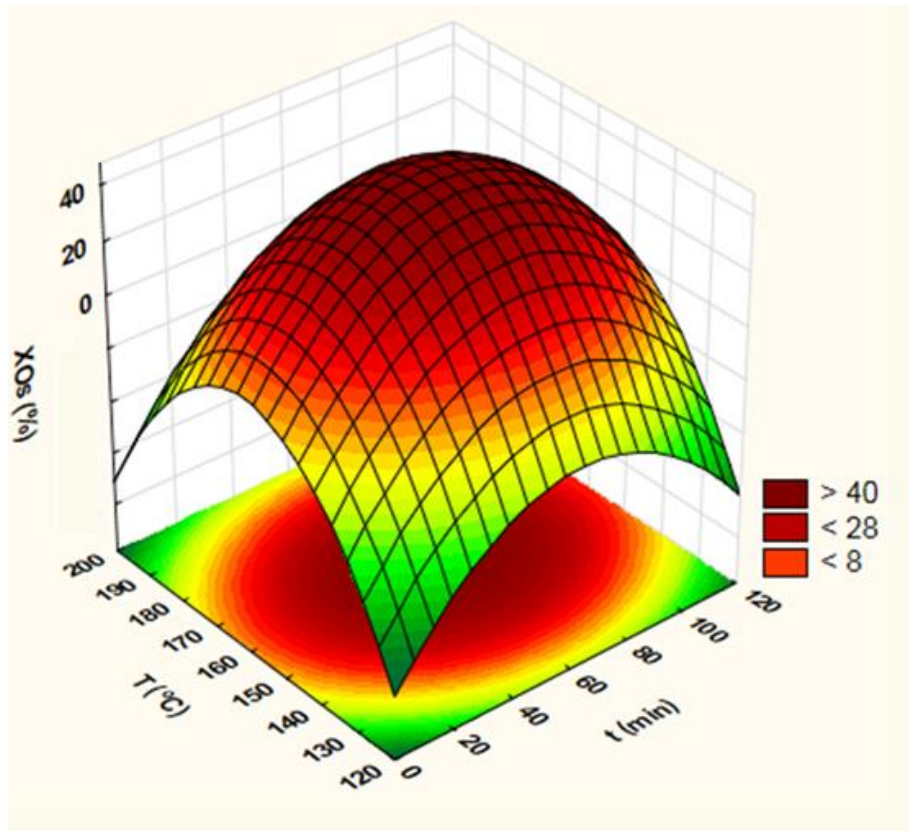
**Figura 34** - Correlação entre as conversões de XOS do subproduto triturado-extraído (STE) previstas pelo modelo matemático e aquelas obtidas experimentalmente. FONTE: Autor, (2019).

A Figura 35 apresenta a distribuição dos resíduos em função das conversões de xilana em XOS observadas experimentalmente. Observa-se nessa figura uma distribuição simétrica e aleatória dos resíduos em torno do ponto zero, não sendo verificado nenhum padrão de comportamento definido, o que valida a hipótese de variância constante (homocedasticidade) dos resíduos e qualifica o ajuste do modelo matemático.



**Figura 35** - Distribuição dos resíduos (diferença entre os valores de conversão de xilana em XOS observados e aqueles calculados pelo modelo matemático) em função dos valores observados para o subproduto triturado-extraído (STE). FONTE: Autor, (2019).

A Figura 36 apresenta a superfície de resposta gerada com o modelo matemático representado pela Equação 15. Observa-se que a concavidade da superfície está voltada para baixo e que a máxima produção de XOS ocorre em condições experimentais em torno do ponto central.



**Figura 36** - Superfície de resposta para o planejamento composto central tendo como variável resposta a conversão de xilana em XOS observada no pré-tratamento hidrotérmico do subproduto triturado-extraído (STE). Variáveis (T (°C) = temperatura e t (min) = tempo). FONTE: Autor, (2019).

Para a maximização da produção de XOS, determinou-se o ponto ótimo do mesmo modo como feito anteriormente, obtendo-se as coordenadas apresentadas a seguir, as quais mostram que tal ponto está localizado em torno do ponto central.

$$\frac{\partial(\text{XOs})}{\partial X_1} = b_1 + 2b_2X_1=0 \Rightarrow X_1 = -b_1/(2b_2)=0,0213$$

$$\frac{\partial(\text{XOs})}{\partial X_2} = b_3 + 2b_4X_2=0 \Rightarrow X_2 = -b_3/(2b_4)=0,1173$$

Decodificando as coordenadas do ponto ótimo, obtêm-se os seguintes valores ótimos de temperatura, tempo e consistência reacional:

$$x_1=(T-160)/20 \Rightarrow T=0,0205*20+160=160,42^\circ\text{C}$$

$$x_2=(t-60)/30 \Rightarrow t=0,1108*30+60 \Rightarrow t=63,52 \text{ min}$$

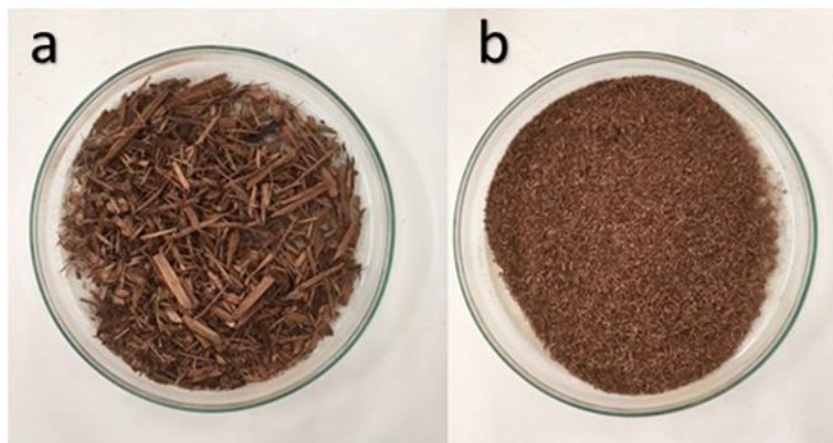
$$x_3=0 \Rightarrow C=10\%$$

### ***5.7. Ensaios experimentais adicionais para validação dos modelos matemáticos***

A partir dos modelos matemáticos elaborados, foi possível determinar as condições experimentais que maximizam a formação de produtos desejados. Os valores determinados pelo modelo matemático indicaram condições experimentais próximas do ponto central do planejamento proposto, o que já era esperado visto que nesta condição operacional ocorreu a maior conversão de xilana em XOS (Tabelas 15 e 16).

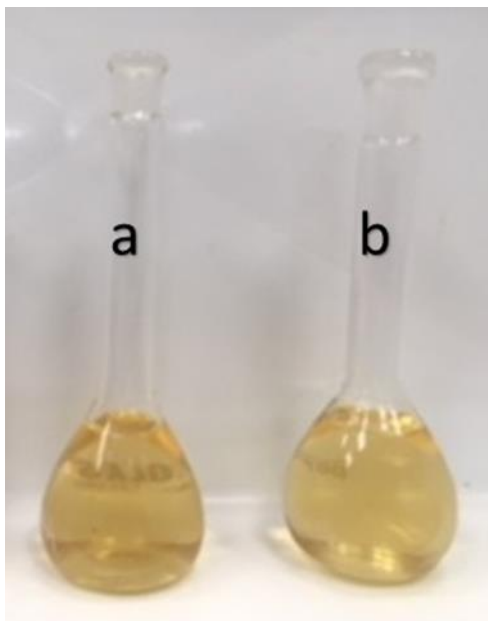
As condições experimentais ótimas previstas pelo modelo foram implementadas e testadas experimentalmente no PTH do subproduto original (SO) e triturado-extraído (STE). As frações insolúveis pós-tratamentos hidrotérmicos do subproduto original na condição otimizada (SO-TO) e do subproduto triturado-extraído na condição otimizada (STE-TO) apresentaram um aspecto visual com um leve escurecimento (Figura 37) quando comparado aos subprodutos não tratados (Ambos, SO e STE) (Figuras 19 e 20). Além disso, os aspectos visuais das frações insolúveis pós-tratamentos hidrotérmicos do SO-TO e do STE-TO foram similares ao ensaio na condição operacional do ponto central do planejamento experimental (Figuras 19 e 20). Todavia, o aspecto dos materiais pós-tratamentos hidrotérmicos do SO-TO e do STE-TO resultaram em um visual mais claro quando comparado às

condições operacionais mais drásticas do planejamento experimental (Figuras 19, 20, 23 e 24).



**Figura 37** - Frações insolúveis pós-tratamentos hidrotérmicos nas condições operacionais otimizadas. (a) subproduto original (SO-TO). (b) subproduto triturado-extraído (STE-TO). FONTE: Autor, (2019).

Os hidrolisados hemicelulósicos pós-tratamentos hidrotérmicos do SO-TO e do STE-TO (fração líquida) também apresentaram um aspecto visual com um leve escurecimento quando comparado aos subprodutos PTH na condição operacional mais amena do planejamento experimental. Além disso, o aspecto visual dos hidrolisados hemicelulósicos pós-tratamentos hidrotérmicos do SO-TO e do STE-TO foram similares ao ensaio na condição operacional do ponto central do planejamento experimental (Figuras 21 e 38). Todavia, o aspecto visual dos hidrolisados hemicelulósicos pós-tratamentos hidrotérmicos do SO-TO e do STE-TO resultaram em um visual mais claro quando comparado às condições mais drásticas (temperatura e tempo elevados) do planejamento experimental (Figuras 21, 25, 26 e 38).



**Figura 38** – Hidrolisados hemicelulósicos (frações líquidas) pós-tratamentos hidrotérmicos nas condições operacionais otimizadas. (a) subproduto original (SO-TO). (b) subproduto triturado-extraído (STE-TO). FONTE: Autor, (2019).

As frações insolúveis (sólidos recuperados) do SO-TO e do STE-TO pós-tratamentos hidrotérmicos foram caracterizados quimicamente (Tabela 25). O SO-TO e o STE-TO apresentaram rendimentos de 76,5% e 81,0% (% massa/massa, base seca), respectivamente, corroborando com os rendimentos médios obtidos nas condições do ponto central do planejamento experimental do SO e do STE pós-tratamento hidrotérmico (72,2% e 77,0%, Tabelas 9 e 10, respectivamente). O SO-TO e o STE-TO mostraram teores brutos de celulose (49,7% e 47,6%), xilana (7,5% e 8,0%), grupos acetil (1,0% e 1,3%) e lignina (32,4% e 27,8%) (% massa/massa, base seca), respectivamente (Tabela 25). Os teores desses componentes foram similares aos ensaios na condição operacional do ponto central do planejamento experimental do SO e STE, respectivamente.



O balanço de massa dos componentes foi necessário para comparar as frações pré-tratadas hidrotérmicamente, diretamente, com o subproduto não tratado (Tabela 25). Desta forma, o SO-TO e o STE-TO apresentaram reduções significativas nos teores de celulose (13,2% e 12,3%), xilana (59,6% e 53,9%), grupos acetil (76,9% e 68,9%) e lignina (13,0% e 21,0%) (% massa/massa, base seca), respectivamente (Teste de Tukey) (Tabela 25). As reduções das frações de celulose, xilana, grupos acetil e lignina foram similares aos valores reportados anteriormente na condição operacional do ponto central do planejamento experimental (Tabelas 9 e 10). O SO-TO e o STE-TO apresentaram valores de P-Fator de 268,8 e 264,1 h, respectivamente (Tabela 25). Esses valores também foram similares aos reportados anteriormente na condição operacional do ponto central do planejamento experimental (Tabelas 9 e 10).

Os resultados nas condições otimizadas integrado a análise estatística comprovam que o modelo matemático foi capaz de estabelecer condições experimentais para uma remoção seletiva da fração de xilana, mantendo praticamente intacta às frações de celulose e lignina, corroborando com os resultados reportados anteriormente para a condição operacional do ponto central do planejamento experimental (Tabelas 9, 10 e 25).

**Tabela 25** – Rendimento, composição química e fator de severidade (P-Fator) das frações insolúveis do subproduto original pós-tratamento hidrotérmico na condição otimizada (SO-TO) e do subproduto triturado-extraído pós-tratamento hidrotérmico na condição otimizada (STE-TO). Dados apresentados em porcentagem (grama por 100 gramas de polpa básica e original, dados em base seca).

Amostras	Variáveis do pré-tratamento hidrotérmico				Rendimento pré-tratamento (g/100g de material)	Componentes do material (Grama por 100 gramas de material em polpa básica)				Fator de severidade
	Temperatura	Tempo	Consistência			Celulose	Xilana	Grupo acetil	Lignina	P-Fator
	(°C)	(min)	(%)	(%)		(%)	(%)	(%)	(%)	(horas)
Não tratado	-	-	-	-	-	43,9 ± 0,5	14,1 ± 0,3	3,2 ± 0,0	28,5 ± 0,6	
SO-TO	161	65	10	76,5	49,7 ± 0,8	7,5 ± 0,1	1,0 ± 0,0	32,4 ± 0,2	268,8	
STE-TO	160,4	63	10	81,0	47,6 ± 1,5	8,0 ± 0,3	1,3 ± 0,1	27,8 ± 0,8	264,1	

Amostras	Variáveis do pré-tratamento hidrotérmico				Rendimento pré-tratamento (g/100g de material)	Componentes do material (Grama por 100 gramas de material original - balanço de massa)				Fator de severidade
	Temperatura	Tempo	Consistência			Celulose	Xilana	Grupo acetil	Lignina	P-Fator
	(°C)	(min)	(%)	(%)		(%)	(%)	(%)	(%)	(horas)
Não tratado	-	-	-	-	-	43,9 ± 0,5	14,1 ± 0,3	3,2 ± 0,0	28,5 ± 0,6	
SO-TO	161	65	10	76,5	38,1 ± 0,6	5,7 ± 0,1	0,7 ± 0,0	24,8 ± 0,2	268,8	
STE-TO	160,4	63	10	81,0	38,5 ± 1,2	6,5 ± 0,2	1,0 ± 0,1	22,5 ± 0,7	264,1	

\*As amostras pré-tratadas hidrotérmicamente não apresentaram teores significativos de extrativos.

SO-TO = subproduto original pré-tratado hidrotérmicamente na condição otimizada.

STE-TO = subproduto triturado-extraído pré-tratado hidrotérmicamente na condição otimizada.

Foram realizados os testes de Tukey (95% de confiança) para determinar se houve redução significativa dos componentes.

Os hidrolisados hemicelulósicos (frações líquidas) do SO-TO e do STE-TO pós-tratamentos hidrotérmicos foram caracterizados quimicamente (Tabela 26). Os hidrolisados do SO-TO e do STE-TO apresentaram teores de furfural (1,47 e 1,51 mg.g<sup>-1</sup>), ácido fórmico (1,75 e 1,81 mg.g<sup>-1</sup>), ácido acético (7,95 e 8,72 mg.g<sup>-1</sup>), aromáticos solúveis (28,54 e 26,33 mg.g<sup>-1</sup>), glicose (0,97 e 0,94 mg.g<sup>-1</sup>), arabinose (0,45 e 0,25 mg.g<sup>-1</sup>) e xilose (18,82 e 19,62 mg.g<sup>-1</sup>), respectivamente (dados em base seca) (Tabela 26). Os resultados obtidos foram similares aos valores médios reportados no ponto central do planejamento experimental (Tabelas 11 e 12), a exceção foram os teores de aromáticos solúveis, os quais apresentaram valores ligeiramente menores nas condições operacionais do SO-TO e STE-TO (Tabelas 11, 12 e 26).

**Tabela 26** - Caracterização química dos hidrolisados hemicelulósicos (frações líquidas) pós-tratamentos hidrotérmicos do subproduto original na condição otimizada (SO-TO) e do subproduto triturado-extraído na condição otimizada (STE-TO). Dados apresentados em miligramas de produtos por grama de material de partida (dados em base seca).

Subprodutos	Variáveis do pré-tratamento hidrotérmico			Componentes do hidrolisado hemicelulósico (miligramas/grama de material de partida)						
	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Consistência (%)	Glicose (mg.g <sup>-1</sup> )	Arabinose (mg.g <sup>-1</sup> )	Ácido acético (mg.g <sup>-1</sup> )	&Fórmico (mg.g <sup>-1</sup> )	#Aromáticos (mg.g <sup>-1</sup> )	Furfural (mg.g <sup>-1</sup> )	Xilose (mg.g <sup>-1</sup> )
SO-TO	161	65	10	0,97 ± 0,0	0,45 ± 0,0	7,95 ± 0,1	1,75 ± 0,0	28,54 ± 0,1	1,47 ± 0,0	18,82 ± 0,0
STE-TO	160,4	63	10	0,94 ± 0,0	0,25 ± 0,0	8,72 ± 0,0	1,81 ± 0,0	26,33 ± 0,2	1,51 ± 0,2	19,62 ± 0,1

# = Aromáticos solúveis. & = Ácido fórmico.

SO-TO = subproduto original pré-tratado hidrotérmicamente na condição otimizada.

STE-TO = subproduto triturado-extraído pré-tratado hidrotérmicamente na condição otimizada.

Na Tabela 27 estão apresentados os valores da formação de XOS pós-tratamento hidrotérmico do SO-TO e do STE-TO. Os teores totais de XOS do SO-TO e do STE-TO, pós-tratamento hidrotérmico, foram de 61,33 mg.g<sup>-1</sup> e 62,91 mg.g<sup>-1</sup>, respectivamente (dados em base seca). Na condição otimizada experimental para ambos subprodutos, houve a formação de >X<sub>6</sub> (XOS com mais de 6 unidades de xilose) da ordem de 28,10 e 32,59 mg.g<sup>-1</sup>, xilobiose (X<sub>2</sub>) 16,47 e 15,98 mg.g<sup>-1</sup>, xilotriose (X<sub>3</sub>) 9,42 e 7,05 mg.g<sup>-1</sup> e xilotetraose (X<sub>4</sub>) 7,37 e 7,29 mg.g<sup>-1</sup> (dados em base seca), respectivamente. Todavia, não foi detectada a formação de xilopentaose+xilohexaose (X<sub>5</sub>+X<sub>6</sub>), o que já era esperado pois a condição otimizada ficou próxima ao ponto central do planejamento experimental composto central.

A análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CLAE-MS), também foi realizada a fim de confirmar a presença dos XOS nos hidrolisados do SO-TO e do STE-TO. Desta forma, foi confirmada a presença de xilose (X<sub>1</sub>), xilobiose (X<sub>2</sub>), xilotriose (X<sub>3</sub>) e xilotetraose (X<sub>4</sub>) nos hidrolisados do SO-TO e STE-TO. Os cromatogramas de íons totais e íons extraídos expresso em tempo de retenção (min) versus intensidade (cps) estão apresentados nos apêndices VII e VIII. Esses resultados confirmam a presença dos XOS determinada anteriormente por cromatografia líquida acoplada a índice de refração (CLAE-RID).

**Tabela 27** – Teores de XOS dos hidrolisados hemicelulósicos (frações líquidas) pós-tratamentos hidrotérmicos do subproduto original na condição otimizada (SO-TO) e do subproduto triturado-extraído na condição otimizada (STE-TO). Dados apresentados em miligramas de produto por grama de material de partida (dados em base seca).

Subprodutos	Variáveis do pré-tratamento hidrotérmico			Componentes do hidrolisado hemicelulósico (miligramas/grama de material de partida)					
	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Consistência (%)	>X <sub>6</sub> (mg.g <sup>-1</sup> )	X <sub>6</sub> +X <sub>5</sub> (mg.g <sup>-1</sup> )	X <sub>4</sub> (mg.g <sup>-1</sup> )	X <sub>3</sub> (mg.g <sup>-1</sup> )	X <sub>2</sub> (mg.g <sup>-1</sup> )	XOS (mg.g <sup>-1</sup> )
SO-TO	161	65	10	28,10 ± 0,0	*	7,37 ± 0,1	9,42 ± 0,0	16,47 ± 0,1	61,33 ± 0,0
STE-TO	160,4	63	10	32,59 ± 0,0	*	7,29 ± 0,1	7,05 ± 0,0	15,98 ± 0,1	62,91 ± 0,1

(X<sub>2</sub>)=Xilobiose, (X<sub>3</sub>)=Xilotriose, (X<sub>4</sub>)=Xilotetraose, (X<sub>6</sub>+X<sub>5</sub>)= Xilopentaose+Xilohexaose e (>X<sub>6</sub>)= oligossacarídeos com mais de seis unidades repetitivas. XOS = (>X<sub>6</sub>)+(X<sub>6</sub>+X<sub>5</sub>)+(X<sub>4</sub>)+(X<sub>3</sub>)+(X<sub>2</sub>). \* = não detectável.

SO-TO = subproduto original pré-tratado hidrotérmicamente na condição otimizada.

STE-TO = subproduto triturado-extraído pré-tratado hidrotérmicamente na condição otimizada.

A Tabela 28 apresenta as conversões de xilana em produtos desejados e não desejados pós-tratamentos hidrotérmicos do SO-TO e do STE-TO. O SO-TO e o STE-TO apresentaram conversões de XOS (42,29% e 43,50%), xilose (11,75% e 12,24%), furfural (1,47% e 1,43%) e ácido fórmico (0,24% e 0,25%) (% massa/massa, dados em base seca), respectivamente. De forma geral, as conversões dos produtos desejados e não desejados foram similares as reportados na condição operacional do ponto central do planejamento experimental (Tabelas 28, 15 e 16, respectivamente).

A Tabela 29 apresenta o balanço de massa pós-tratamento hidrotérmico do SO-TO e STE-TO. Para isso, foi considerada a massa da fração de xilana que permaneceu na fração sólida em relação aos produtos formados que foram dissolvidos para o hidrolisado hemicelulósico (fração líquida). Desta forma, quando o balanço de massa indicar um valor próximo a 7,05g (que é a massa inicial da fração de xilana da condição operacional otimizada do PTH) podemos considerar que toda massa inicial de xilana que foi previamente removida no PTH constituem os produtos formados. Os resultados mostram que toda a xilana constitui os produtos desejados e não desejados analisados anteriormente (Tabelas 26 e 27), indicando que os XOS provenientes do SO-TO e do STE-TO podem ser obtidos sem degradação apreciável das frações de celulose e lignina. Além disso, os valores do P-Fator comprovam que a condição ajustada pelo modelo é favorável para a remoção da xilana na forma de XOS.

**Tabela 28** - Conversão de xilana em  $>X_6$ ,  $X_6+X_5$ ,  $X_4$ ,  $X_3$ ,  $X_2$ , XOS, xilose e furfural pós-tratamentos hidrotérmicos otimizados do subproduto original (SO-TO) e do subproduto triturado-extraído (STE-TO). Dados apresentados em porcentagem (grama de produtos por 100 gramas de xilana oriundo do subproduto, dados em base seca).

Subprodutos	Variáveis do pré-tratamento hidrotérmico			Conversão de xilana em produtos (%)									
	Temp. (°C)	Tempo (min)	Consist. (%)	$>X_6$ (%)	$X_6+X_5$ (%)	$X_4$ (%)	$X_3$ (%)	$X_2$ (%)	XOS (%)	XOS* (%)	Xilose (%)	Furfural (%)	Fórmico (%)
SO-TO	161	65	10	19,91 ± 0,2	*	5,06 ± 0,3	6,39 ± 0,4	10,93 ± 0,8	42,29 ± 0,3	40,09 ± 0,1	11,75 ± 0,5	1,47 ± 0,2	0,24 ± 0,0
STE-TO	160,4	63	10	23,12 ± 0,3	*	5,00 ± 1,1	4,78 ± 0,1	10,61 ± 0,3	43,50 ± 0,3	39,32 ± 0,2	12,24 ± 0,2	1,43 ± 0,0	0,25 ± 0,0

( $X_2$ )=Xilobiose, ( $X_3$ )=Xilotriose, ( $X_4$ )=Xilotetraose, ( $X_6+X_5$ )= Xilopentaose+Xilohexaose e ( $>X_6$ )= oligossacarídeos com mais de seis unidades repetitivas. XOS = ( $>X_6$ )+(X<sub>6</sub>+X<sub>5</sub>)+(X<sub>4</sub>)+(X<sub>3</sub>)+(X<sub>2</sub>). \* = não detectável, XOS\* = método de hidrólise ácida. Consist.=Consistência. Temp.=Temperatura. Fórmico = Ácido Fórmico.

SO-TO = subproduto original pré-tratado hidrotermicamente na condição otimizada.

STE-TO = subproduto triturado-extraído pré-tratado hidrotermicamente na condição otimizada.

**Tabela 29** - Balanço de massa de xilana do subproduto original (SO-TO) e do subproduto triturado-extraído (STE-TO) pós-tratamento hidrotérmico otimizados.

Subprodutos	Variáveis do pré-tratamento hidrotérmico			Balanço de massa			
	Temp. (°C)	Tempo (min)	Consistência (%)	Massa inicial de xilana (g)	Xilana convertida em produtos (%)	Xilana não convertida em produtos (%)	Balanço de massa (g)
SO-TO	161	65	10	7,05	56,17	40,43	6,81
STE-TO	160,4	63,3	10	7,05	57,21	46,10	7,28

SO-TO = subproduto original pré-tratado hidrotermicamente na condição otimizada.

STE-TO = subproduto triturado-extraído pré-tratado hidrotermicamente na condição otimizada.



Para verificar se os valores preditos pelos modelos matemáticos otimizados e validados do SO-TO e do STE-TO são concordantes com os experimentais, foram substituídos os valores das coordenadas obtidas nos pontos ótimos dos modelos propostos, obtendo dessa forma o valor da conversão de xilana em XOS na condição operacional otimizada, os quais resultaram em 42,63% e 45,10% (% massa/massa, dados em base seca), respectivamente (Tabela 30). Desta forma, os valores preditos pelos modelos matemáticos de conversão de xilana em XOS do SO-TO e do STE-TO são concordantes com aqueles medidos experimentalmente (42,28% e 43,50%), respectivamente, o que valida os modelos matemáticos formulados (Tabela 30).

**Tabela 30** - Valores preditos e experimentais de conversão de xilana em XOS dos modelos matemáticos propostos. Dados apresentados em porcentagem (grama de produtos por 100 gramas de xilana oriundo do subproduto, dados em base seca).

Subprodutos	Variáveis do pré-tratamento hidrotérmico			Conversão de xilana em XOS			Erro experimental	
	Temp. (°C)	Tempo (min.)	Consist. (%)	Valores preditos de XOS (%)	Valores experimentais de XOS (%)	Valores experimentais de *XOS (%)	Erro XOS (%)	Erro *XOS (%)
SO-TO	161	65	10	42,63	42,28	42,53	0,83	0,23
STE-TO	160,4	63,3	10	45,10	43,50	41,62	3,68	7,72

XOS\* = método de hidrólise ácida. Temp.=Temperatura. Consist.=Consistência.

SO-TO = subproduto original pré-tratado hidrotermicamente na condição otimizada.

STE-TO = subproduto triturado-extraído pré-tratado hidrotermicamente na condição otimizada.

### **5.8. Extração alcalina do material pré-tratado hidrotermicamente (PTH) na condição otimizada**

O PTH na condição otimizada atingiu uma solubilização da fração de lignina de aproximadamente 17% (%massa/massa, base seca) (Tabela 25). Devido a esse fato, foi necessária uma etapa de extração alcalina com NaOH,

em temperaturas amenas (70 °C), a qual tem à finalidade de proporcionar o inchamento da fibra de celulose, aumentar a área superficial interna da celulose e dissolver parte da lignina (19,80).

A Figura 39 apresenta o aspecto visual do subproduto original na condição otimizada seguido de extração alcalina (SO-TO-E) e do subproduto triturado-extraído na condição otimizada seguido de extração alcalina (STE-TO-E). Não houve uma mudança drástica no aspecto visual do SO-TO-E e do STE-TO-E.



**Figura 39** - (a) Subproduto original na condição otimizada seguido de extração alcalina (SO-TO-E). (b) subproduto triturado-extraído na condição otimizada seguido de extração alcalina (STE-TO-E). FONTE: Autor, (2019).

As frações insolúveis (sólidos recuperados) do SO-TO-E e do STE-TO-E foram caracterizados quimicamente (Tabela 25). O SO-TO-E e o STE-TO-E apresentaram rendimentos de 84,5% e 84,1% (% massa/massa, base seca), respectivamente, sendo considerado um processo de alto rendimento. O SO-TO-E e o STE-TO-E mostraram teores brutos de celulose (59,0% e 54,4%), xilana (5,9% e 8,8%) e lignina (30,2% e 26,2%) (% massa/massa, base seca), respectivamente (Tabela 31). Desta forma, foi averiguado um enriquecimento da fração de celulose do SO-TO-E e do STE-TO-E quando

comparado ao SO-TO e o STE-TO (49,7% e 47,6%), respectivamente (Tabelas 25 e 31).

O balanço de massa dos componentes foi necessário para compararmos as frações PTH seguida de extração alcalina (SO-TO-E e STE-TO-E), diretamente, com o SO-TO e o STE-TO (Tabela 31). Desta forma, o SO-TO-E e o STE-TO-E, não apresentaram reduções significativas nos teores de celulose (Teste de Tukey). Entretanto, o SO-TO-E e o STE-TO-E apresentaram reduções significativas das frações de xilana (33,3% e 7,5%) e lignina (21,0% e 16,7%), respectivamente (Tabela 31). Todavia, os grupos acetil foram completamente removidos de ambos SO-TO-E e STE-TO-E. Desta forma, foi constatado que a extração alcalina foi seletiva na remoção das frações de xilana e lignina, não removendo a fração de celulose, assim, atingindo o objeto proposto.

Sun et al. (82) realizaram PTH seguido de extração alcalina em fibras de *Eucalyptus urophylla*, nas seguintes condições: NaOH 2% (m·v<sup>-1</sup>), 90 °C por 2,5 h, obtendo rendimento de 76% e uma redução nos teores de hemicelulose e lignina de 86% e 46%, respectivamente, enquanto que a celulose não apresentou redução significativa. Lima et al. (135), utilizando madeiras de *Eucalyptus grandis* pré-tratadas hidrotermicamente nas seguintes condições: 80 °C por 60 min, seguidas de extração alcalina com NaOH 4% (m·v<sup>-1</sup>), relação sólido:líquido 1:10 (m·v<sup>-1</sup>), temperatura de 120 °C por 1 h, obteve 23% de redução no teor de lignina e 40% no teor de hemicelulose. Esses resultados demonstram que a combinação do PTH seguido de extração alcalina nos subprodutos de *Eucalyptus*, remove mais

hemicelulose e lignina do que o PTH como única etapa, resultando em frações com alto teor de celulose, o que favorece a hidrólise enzimática (82).

**Tabela 31** – Rendimento e composição química das frações insolúveis pós-tratamento hidrotérmico seguido de extração alcalina do subproduto original (SO-TO-E) e do subproduto triturado-extraído (STE-TO-E). Dados apresentados em porcentagem de material (grama por 100 gramas de material em polpa básica ou original, dados em base seca).

Amostras	Variáveis do pré-tratamento hidrotérmico			Rendimento pré-tratamento (g/100g de material)	Componentes do material (Grama por 100 gramas de material em polpa básica)			
	Temperatura	Tempo	Consistência		Celulose	Xilana	Grupo acetil	Lignina
	(°C)	(min)	(%)		(%)	(%)	(%)	(%)
SO-TO	-	-	-	-	49,7 ± 0,8	7,5 ± 0,1	1,0 ± 0,0	32,4 ± 0,2
STE-TO	-	-	-	-	47,6 ± 1,5	8,0 ± 0,3	1,3 ± 0,1	27,8 ± 0,8
SO-TO-E	70	60	10	84,5	59,0 ± 2,1	5,9 ± 0,2	*	30,2 ± 0,3
STE-TO-E	70	60	10	84,1	54,4 ± 0,1	8,8 ± 0,6	*	26,8 ± 0,6

Amostras	Variáveis do pré-tratamento hidrotérmico			Rendimento pré-tratamento (g/100g de material)	Componentes do material (Grama por 100 gramas de material original - balanço de massa)			
	Temperatura	Tempo	Consistência		Celulose	Xilana	Grupo acetil	Lignina
	(°C)	(min)	(%)		(%)	(%)	(%)	(%)
SO-TO	-	-	-	-	49,7 ± 0,8	7,5 ± 0,1	1,0 ± 0,0	32,4 ± 0,2
STE-TO	-	-	-	-	47,6 ± 1,5	8,0 ± 0,3	1,3 ± 0,1	27,8 ± 0,8
SO-TO-E	70	60	10	84,5	49,8 ± 2,1	5,0 ± 0,1	*	25,6 ± 0,3
STE-TO-E	70	60	10	84,1	46,2 ± 0,1	7,4 ± 0,5	*	22,6 ± 0,5

SO-TO = Subproduto original pré-tratado hidrotérmicamente na condição otimizada.

STE-TO = subproduto triturado-extraído pré-tratado hidrotérmicamente na condição otimizada.

SO-TO-E = Subproduto original pré-tratado hidrotérmicamente na condição otimizada seguido de extração alcalina.

STE-TO-E = Subproduto triturado-extraído pré-tratado hidrotérmicamente na condição otimizada seguido de extração alcalina.

\*= não detectado.

Foram realizados os testes de Tukey (95% de confiança) para determinar se houve redução significativa dos componentes.

### **5.9. Caracterização estrutural das frações do subproduto de *Eucalyptus***

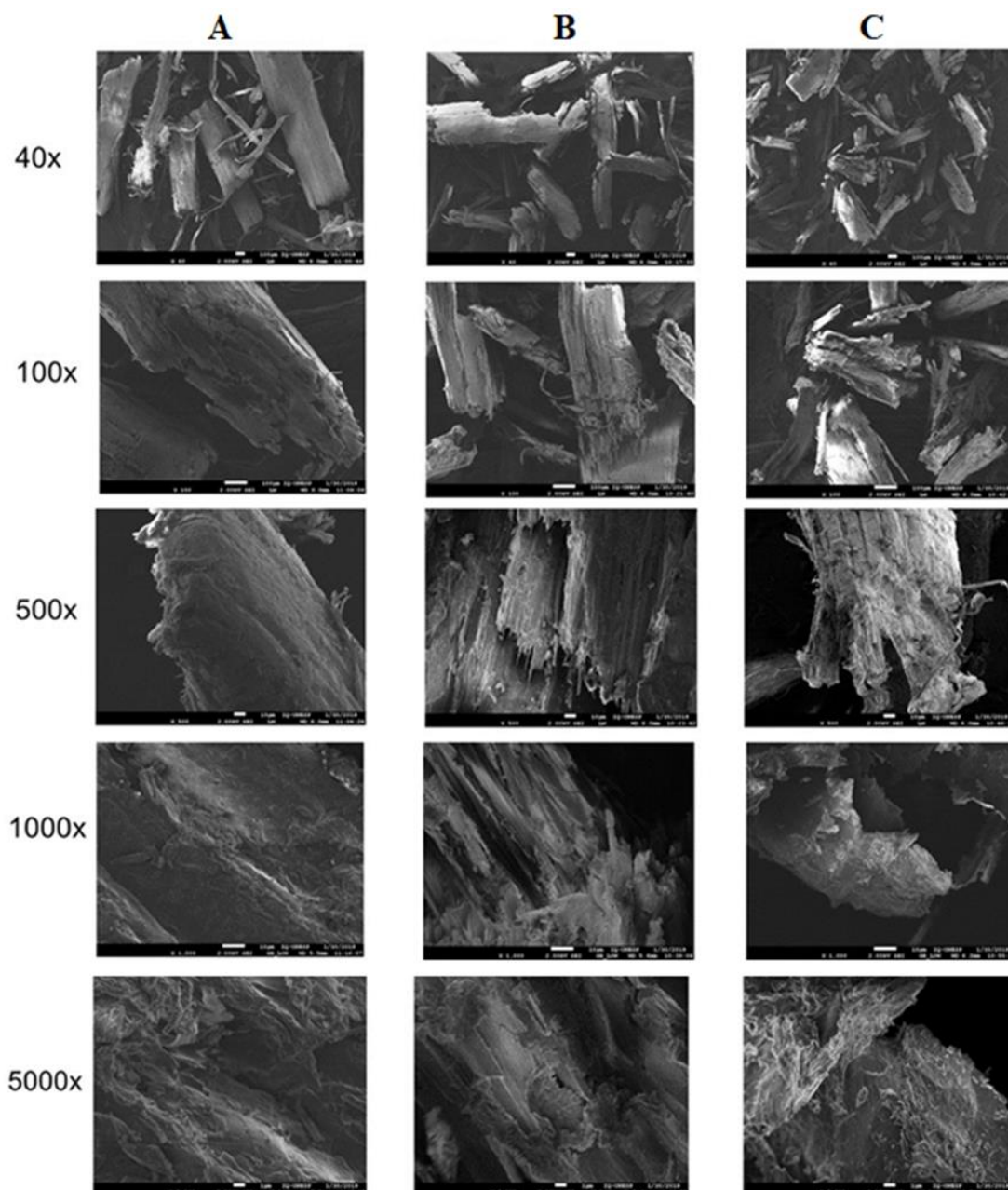
As frações obtidas a partir do subproduto de *Eucalyptus* (SO, SO-TO, SO-TO-E, STE, STE-TO e STE-TO-E) foram caracterizadas estruturalmente pelas técnicas de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Difração de Raios-X (DRX), Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier em modo de Refletância Total Atenuada (FTIR-ATR) a fim de avaliar possíveis modificações nos materiais que corroborem com os resultados de composição química realizados anteriormente.

#### **5.9.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foi realizada para verificar as alterações estruturais que eventualmente podem ter ocorrido nas frações obtidas anteriormente: SO, SO-TO, SO-TO-E, STE, STE-TO e STE-TO-E. As Figuras 40 e 41 apresentam as imagens obtidas a partir da técnica de MEV das frações descritas anteriormente, com aumentos de 40x, 100x, 500x, 1000x e 5000x. O aspecto visual do SO e STE revelam uma estrutura bem organizada, com fibras lisas, compactas e sem rupturas (Figuras 40A e 41A, respectivamente). Isso ocorre devido a organização supramolecular da fibra e seu encapsulamento pela fração de lignina (136). Não houveram diferenças significativas levando-se em conta o aspecto visual do SO e STE. Todavia, o aspecto visual do SO-TO e STE-TO (principalmente nos aumentos de 500x e 5000x), apresentou pequenas alterações na estrutura do material, como por exemplo a ruptura parcial das fibras e formação de aglomerados. Além disso,

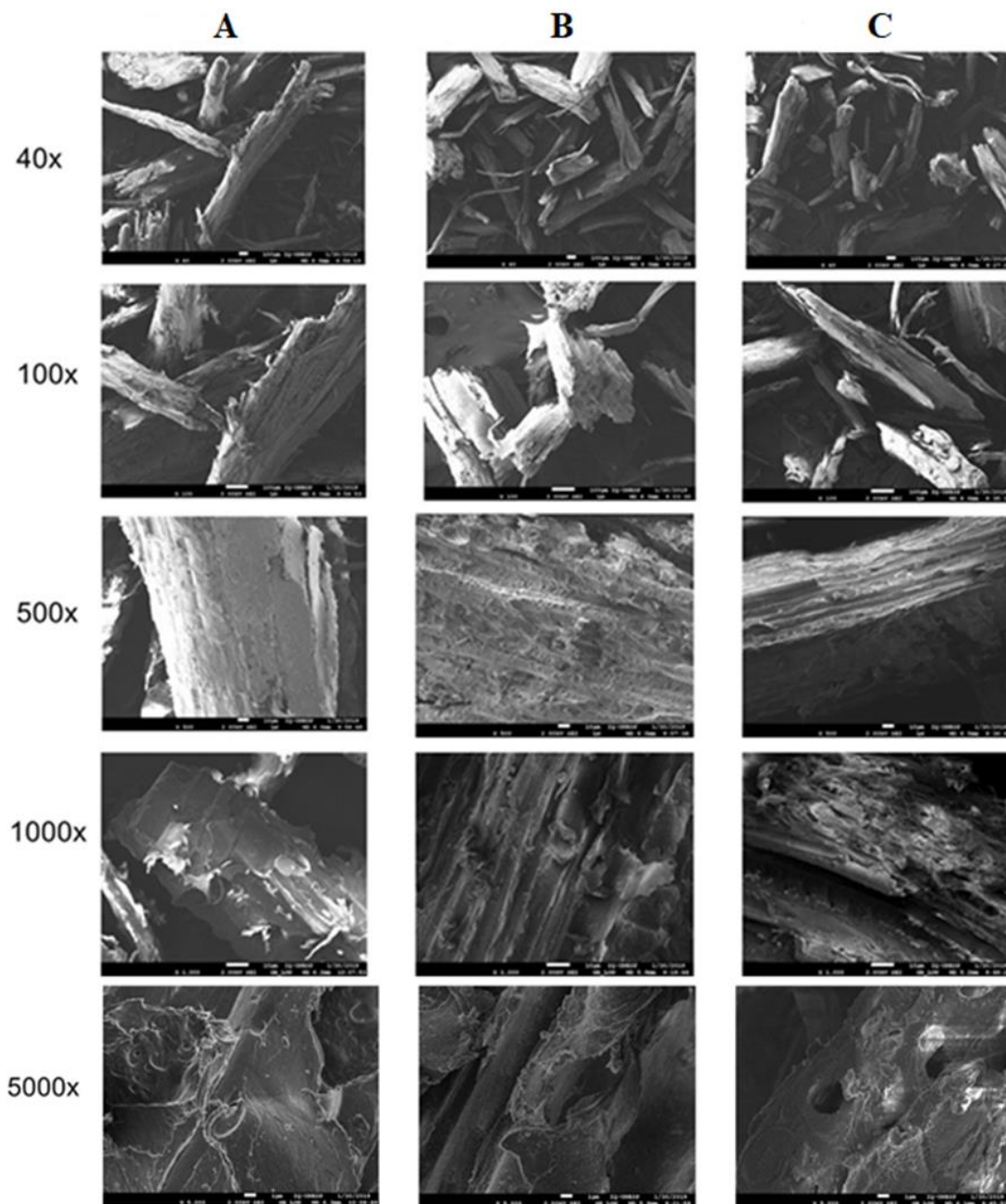
foi evidente o aumento de ranhuras e regiões rugosas, indicando que houve desestruturação da compacta estrutura da fibra de celulose. Não houveram diferenças significativas do SO-TO e STE-TO levando-se em conta o aspecto visual (Figuras 40B e 41B).

O aspecto visual do SO-TO-E e STE-TO-E indicaram aberturas de fendas ou canais e a formação de uma parede celular estratificada (Figuras 40C e 41C). Segundo Rezende et al. (137), essas camadas formadas indicam que as fibras de celulose aumentaram sua área superficial e porosidade, além de diminuir o índice de cristalinidade. O PTH seguido de extração alcalina (SO-TO-E e STE-TO-E) provocou a clivagem do complexo lignina-carboidrato representada pela desorganização da parede celular da fibra de celulose. Alvira et al. (59) afirmam que essa desestruturação ocorre devido à solubilização da lignina, resultando no aumento da porosidade do material, tornando-o mais exposto à hidrólise enzimática, culminado no aumento da digestibilidade da molécula de celulose.



**Figura 40** - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das diferentes frações do subproduto de *Eucalyptus*. (A) Subproduto original (SO). (B) Subproduto original pré-tratado hidrotérmicamente na condição otimizada (SO-TO). (C) Subproduto original pré-tratado hidrotérmicamente na condição otimizada seguido de extração alcalina (SO-TO-E). Amplificações: 40x, 100x, 500x, 1000x e 5000x, respectivamente. FONTE: Autor, (2019).

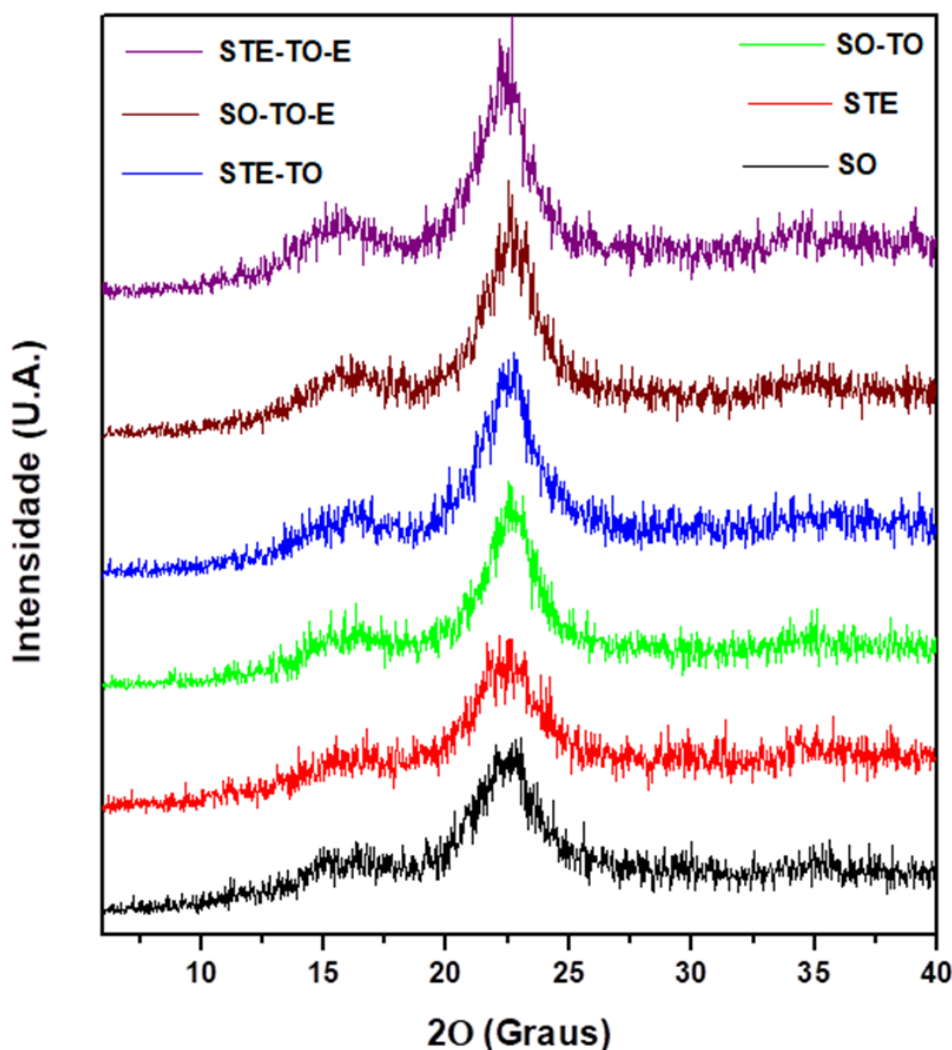




**Figura 41** - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das diferentes frações do subproduto de *Eucalyptus*. (A) Subproduto triturado-extraído (STE). (B) Subproduto triturado-extraído pré-tratado hidrotêrmicamente na condição otimizada (STE-TO). (C) Subproduto triturado-extraído pré-tratado hidrotêrmicamente na condição otimizada seguido de extração alcalina (STE-TO-E). Amplificações: 40x, 100x, 500x, 1000x e 5000x, respectivamente. FONTE: Autor, (2019).

### 5.9.2. Difração de Raios-X (DRX)

A análise por Difração de Raios-X (DRX) das frações do subproduto obtidas anteriormente permitiram determinar alterações na estrutura supramolecular das amostras em estudo. Os perfis de DRX estão apresentados na Figura 42.



**Figura 42.** Difratogramas de raios-x (DRX) das diferentes frações do subproduto de *Eucalyptus*. Subproduto triturado-extraído (STE). Subproduto triturado-extraído pré-tratado hidrotérmicamente na condição otimizada (STE-TO). Subproduto triturado-extraído pré-tratado hidrotérmicamente na condição otimizada seguido de extração alcalina (STE-TO-E). Subproduto original (SO). Subproduto original pré-tratado hidrotérmicamente na condição otimizada (SO-TO). Subproduto original pré-tratado hidrotérmicamente na condição otimizada seguido de extração alcalina (SO-TO-E). FONTE: Autor, (2019).

O DRX foi importante para descrever o índice de cristalinidade dos materiais, a fim de avaliar se o PTH e/ou extração alcalina tem efeito nos subprodutos em estudo. A cristalinidade do ML é considerada um fator importante que influencia a eficiência da hidrólise enzimática, pois a cristalinidade da celulose pode impedir significativamente a hidrólise enzimática (138,139). Dessa forma é de grande importância determinar o índice de cristalinidade, a fim de avaliar as quantidades de reagentes necessários no meio reacional.

Os difratogramas deconvoluídos dos subprodutos SO e STE apresentaram maior alargamento de bandas quando comparado aos submetidos ao PTH otimizado (SO-TO e STE-TO) e ao PTH otimizado seguido de extração alcalina (SO-TO-E e STE-TO-E). Essa diferença ocorreu devido à alteração na associação da celulose com outras macromoléculas, como a hemicelulose e lignina. As alterações no comportamento dos difratogramas do SO e STE ao longo do pré-tratamento e extração alcalina, podem estar relacionadas com a solubilização das estruturas amorfas da celulose, solubilização de hemicelulose e lignina, além da transformação da estrutura da celulose em outras formas (33, 139). Os valores absolutos dos ICrs podem ser diferentes dependendo do método utilizado para sua determinação, sendo que neste caso foi utilizado o método de deconvolução (113,114).

A Tabela 32 apresenta as intensidades nas regiões amorfas e cristalinas e os índices de cristalinidade (ICr) e amorficidade (IAm) para as diferentes frações do subproduto de *Eucalyptus* em estudo.

**Tabela 32.** Índice de cristalinidade (ICr) e amorficidade (IAm) das diferentes frações do subproduto de *Eucalyptus*. O ICr e o IAm foram obtidos através do método de deconvolução (PeakFit; [www.systat.com](http://www.systat.com)).

AMOSTRAS	Área das bandas		ICr (%)	IAm (%)
	Cristalino	Amorfo		
*SO	225,7	204,3	52,5	47,5
*STE	180,8	217,6	45,4	54,6
&SO-TO	265,2	152,6	63,5	36,5
&STE-TO	256,3	187,6	57,7	42,3
#SO-TO-E	233,3	363,7	39,1	60,9
#STE-TO-E	153,2	329,1	31,8	68,2

\*SO = subproduto de *Eucalyptus* original.

\*STE = subproduto de *Eucalyptus* triturado-extraído.

&SO-TO = subproduto de *Eucalyptus* original pré-tratado hidrotérmicamente na condição otimizada.

&STE-TO = subproduto *Eucalyptus* triturado-extraído pré-tratado hidrotérmicamente na condição otimizada.

#SO-TO-E = subproduto de *Eucalyptus* original pré-tratado hidrotérmicamente na condição otimizada seguido de extração alcalina.

#STE-TO-E = subproduto de *Eucalyptus* triturado-extraído pré-tratado hidrotérmicamente na condição otimizada seguido de extração alcalina.

ICr = índice de cristalinidade.

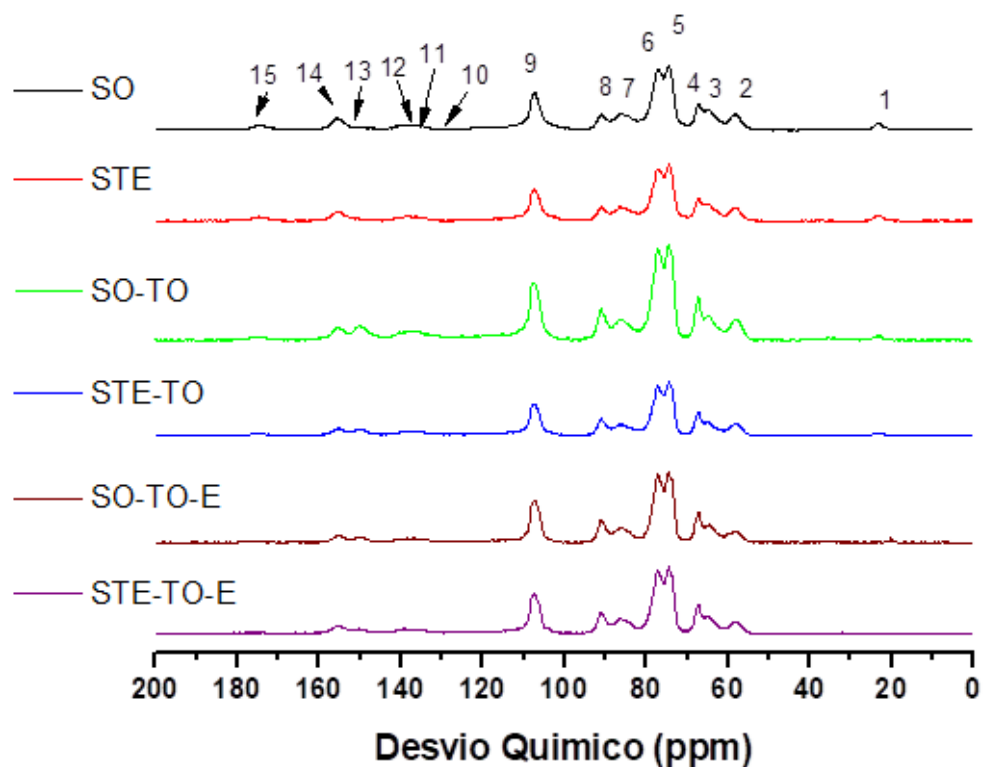
IAm = índice de amorficidade.

De acordo com os resultados obtidos na Tabela 32, os ICr da celulose do SO, SO-TO e SO-TO-E foram de 52,5%, 63,5% e 39,1%, respectivamente. Todavia os ICr da celulose do STE, STE-TO e STE-TO-E foram de 45,4%, 57,7% e 31,8%, respectivamente (Tabela 32). Os valores dos ICr da celulose do SO e STE foram semelhantes, sendo que esses resultados estão de acordo com Rambo e Sun (53, 82) os quais obtiveram um ICr de 46% em serragem de *Eucalyptus* “in natura” e 57% em madeira de *Eucalyptus urophylla*, respectivamente. Todavia, os ICr do SO-TO e STE-TO foram aumentados quando comparado ao SO e STE (21% e 27%, respectivamente). O aumento do ICr pós-tratamento hidrotérmico do subproduto em estudo pode ser explicado devido à degradação da fração amorfa de celulose, degradação da fração de xilana, além da condensação e reprecipitação da lignina na superfície da parede celular (82) (Tabelas 25 e 32).

Entretanto, houve uma diminuição nos ICrs do SO-TO-E e STE-TO-E quando comparado ao SO-TO e STE-TO (38% e 30%, respectivamente). A diminuição dos ICrs pós-extração alcalina do SO-TO e STE-TO pode ser atribuído ao inchamento da fibra de celulose e sua desestruturação, pois o acesso a fração de celulose pelo alcali foi aumentando pós-tratamento hidrotérmico dos materiais (remoção de xilana e lignina, Tabela 25). Outra hipótese para a diminuição do ICr seria através da reação de mercerização parcial de celulose I a celulose II do SO-TO e STE-TO (processo que ocorre em meio alcalino). Desta forma, a reação de mercerização proporciona uma alteração na estrutura da celulose I, que é composta de cadeias paralelas, para à celulose II, que é composta de cadeias antiparalelas. A reação de mercerização é irreversível e normalmente é acompanhada de diminuição do ICr (Tabelas 32) (33,139,140).

### **5.9.3. Espectroscopia Ressonância Magnética Nuclear (RMN)**

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) em estado sólido das frações do subproduto obtidas anteriormente estão apresentados na Figura 43. Para a interpretação qualitativa foram utilizados como base os deslocamentos químicos (reportados em ppm) e atribuídas numerações às bandas, conforme apresentado na Tabela 33.



**Figura 43** - Espectro de RMN CP/MAS  $^{13}\text{C}$  de estado sólido das diferentes frações do subproduto de *Eucalyptus*. Subproduto triturado-extraído (STE). Subproduto triturado-extraído pré-tratado hidrotermicamente na condição otimizada (STE-TO). Subproduto triturado-extraído pré-tratado hidrotermicamente na condição otimizada seguido de extração alcalina (STE-TO-E). Subproduto original (SO). Subproduto original pré-tratado hidrotermicamente na condição otimizada (SO-TO). Subproduto original pré-tratado hidrotermicamente na condição otimizada seguido de extração alcalina (SO-TO-E). FONTE: Autor, (2019).

**Tabela 33** - Atribuições de bandas de 1 ao 15 do RMN em estado sólido, indicado nos espectros da Figura 44.

Número de linha	Grupo químico	Desvio químico <sup>13</sup> C (ppm)
1	CH <sub>3</sub> em grupos acetil de Hemiceluloses	23,0
2	Grupos aril metoxil carbonos de Lignina	58,2
3	C-6-amorfo de Celulose, C-6 de Hemiceluloses, OCyH <sub>2</sub> de Lignina	64,8
4	C-6-cristalino de Celulose	67,1
5	C-2,C-3,C-5 de Celulose	74,5
6	C-2,C-3,C-5 de Celulose e Hemiceluloses	77,1
7	C-4-amorfo de Celulose e Hemiceluloses	86,3
8	C-4-cristalino de Celulose	90,9
9	C-1 de Celulose	107,4
10	C-2 aromáticos de guaiacil de lignina	130,3
11	C-1,C-4 aromáticos de siringil (eterificados)	136
12	C-1, C-4 aromáticos de siringil (não eterificados)	138,4
13	C-3, C-5 aromáticos de siringil (não eterificados) e C-1,C4 aromáticos de guaiacil de lignina	147,2 - 150,2
14	C-3,C-5 aromáticos de siringil (esterificados) em lignina	155,61
15	Grupos carboxílicos de lignina	174,82

Fonte: (137,141,142).

As bandas em 23 e 58,2 ppm (números 1 e 2, respectivamente, Figura 43 e Tabela 33) apresentaram sinais poucos intensos que foram atribuídos a grupos acetil de hemicelulose e grupos aril-metoxil de carbonos de lignina, respectivamente. Esses resultados estão de acordo com Lima et al. (135) que estudaram cascas de madeiras de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus grandis x urophylla* pré-tratadas hidrotermicamente à 80 °C por 60 min, seguidas de extração alcalina com NaOH 4% (m·v<sup>-1</sup>) e nas condições: relação sólido:líquido 1:10 (m·v<sup>-1</sup>), temperatura de 120 °C por 1 h. As bandas entre 64,8-107,4 ppm (números de 2-9, Figura 43 e Tabela 33) apresentaram sinais mais intensos, que foram atribuídos principalmente a vários carbonos presentes na molécula de celulose (amorfa e cristalina), além de carbonos da hemicelulose (havendo inclusive sobreposições de banda de celulose e hemicelulose em 64,8, 77,1 e 86,3 ppm), estando de acordo com Lima et al.

(135). Todavia, as bandas em 107,4, 90,9 e 67,1 ppm corresponderam aos carbonos de celulose C<sub>1</sub>, C<sub>4</sub> e C<sub>6</sub> ordenados, respectivamente, enquanto as bandas em 86,3 e 64,8 ppm corresponderam aos carbonos de celulose desordenados C<sub>4</sub> e C<sub>6</sub>, respectivamente, além de carbonos da hemicelulose. A banda em 74,5 ppm foi atribuído à celulose C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> e C<sub>5</sub>. As bandas entre 130,3-155,6 (números de 10-14, Figura 43 e Tabela 33) apresentaram sinais menos intensos e foram atribuídos principalmente a carbonos presentes na molécula de lignina (Figura 43 e Tabela 31), corroborando com os resultados de Lima et al. (135).

A Figura 43 mostra que a banda em 23 ppm (número 1, Tabela 33) foi menos intensa no subproduto pós-tratamento hidrotérmico (SO-TO e STE-TO), e praticamente desapareceu no subproduto pós-tratamento hidrotérmico seguido de extração alcalina (SO-TO-E e STE-TO-E), indicando que houve remoção de grupos acetil da fração de hemicelulose, corroborando com os dados de composição química (Tabelas 25 e 31).

A Figura 43 também mostra a banda em 58 ppm (número 2, Tabela 33) onde não foi possível evidenciar uma alteração clara entre as frações em estudo, corroborando com os dados de composição química, onde foi constatado remoção parcial de lignina pós-tratamento hidrotérmico (SO-TO e STE-TO) da ordem de 13% e 21%, respectivamente. Além disso, o subproduto pós-tratamento hidrotérmico seguido de extração alcalina também não apresentou alterações significativas na banda de 58 ppm, o que corrobora com os dados de composição química onde foi constatado uma remoção parcial de lignina pós-tratamento hidrotérmico seguido de extração alcalina



(SO-TO-E e STE-TO-E) da ordem de 21,0% e 16,7%, respectivamente (Tabela 31).

A Figura 43 também mostra bandas entre 4-9, que correspondem aos deslocamentos de 67,1-107,4 ppm, respectivamente. Em geral, as bandas de celulose aparecem entre os deslocamentos de 50 e 100 ppm (139,142). As intensidades das bandas em 4-9 (67,1-107,4 ppm) que são atribuídos aos carbonos da celulose cristalina e amorfa apresentaram pequenas alterações nos subprodutos pós-tratamento hidrotérmico (SO-TO e STE-TO) e nos subprodutos pós-tratamento hidrotérmico seguido de extração alcalina (SO-TO-E e STE-TO-E). Estes resultados corroboram com os estudos de difração de Raio-X (DRX) (Figura 42 e Tabela 32) onde foi apresentado um aumento no índice de cristalinidade (ICr) da celulose dos subprodutos pós-tratamento hidrotérmico (SO-TO e STE-TO) e diminuição do ICr nos subprodutos pós-tratamento hidrotérmico seguido de extração alcalina (SO-TO-E e STE-TO-E).

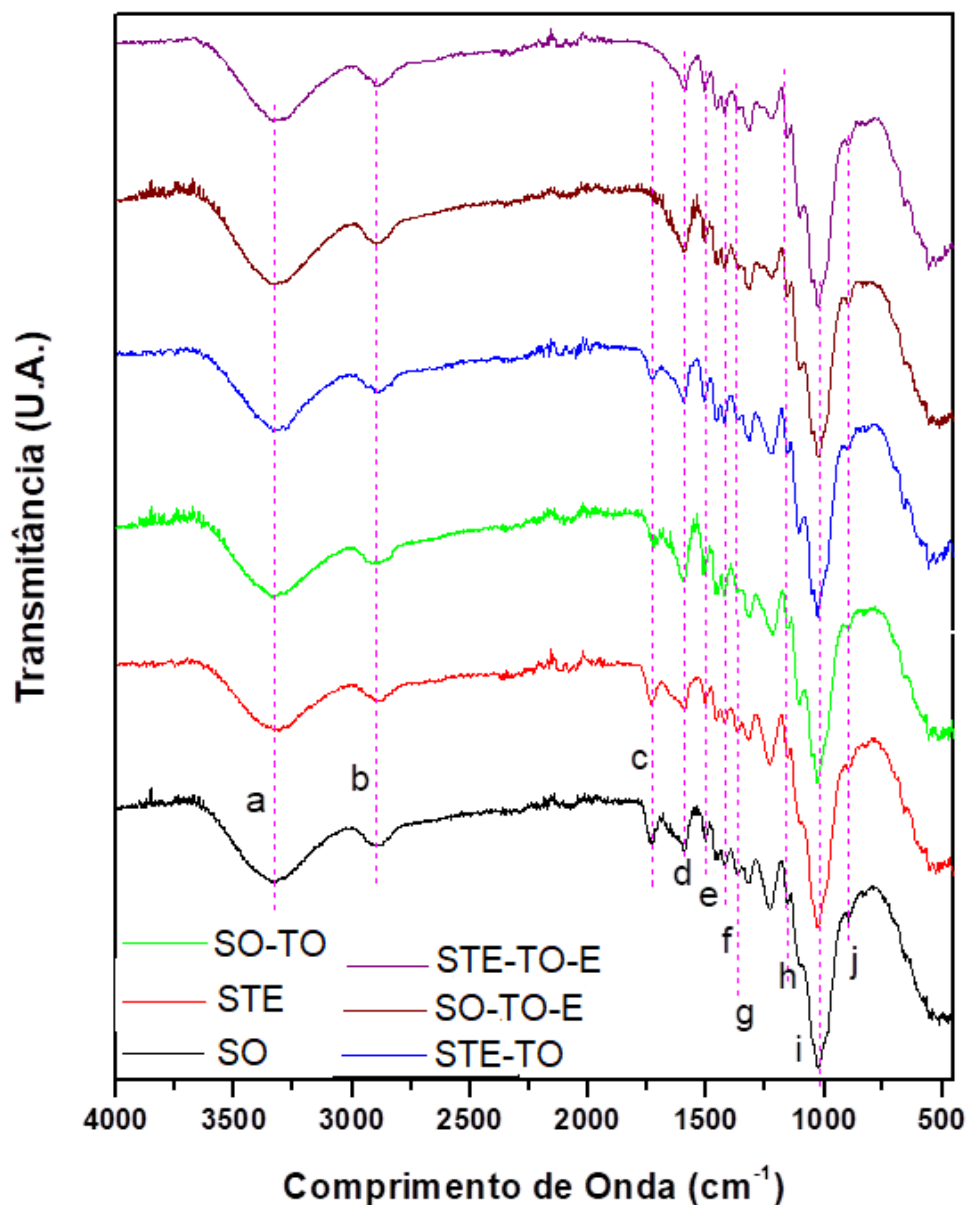
#### ***5.9.4. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier em modo de Refletância Total Atenuada (FTIR-ATR)***

A análise espectroscópica de infravermelho médio por transformada de Fourier em modo de Refletância Total Atenuada (FTIR-ATR) é uma técnica rápida e não destrutiva, além de que requerer pouca quantidade de amostra. A técnica fornece informações sobre grupos funcionais da biomassa lignocelulósica da planta através de bandas de absorbância (143) e utilizada para caracterizar estruturas químicas de diferentes polissacarídeos e lignina

(144), obtendo assim informações diretas sobre mudanças químicas que ocorrem durante os diversos tipos de pré-tratamentos (145).

Os comprimentos de onda na região do infravermelho médio ocorrem entre 4000-200  $\text{cm}^{-1}$ , apresentando vibrações moleculares das frequências de grupos, possibilitando a identificação de pequenas diferenças na estrutura das moléculas. Esta região está dividida em duas regiões: a primeira é a região da frequência de grupo, que corresponde à parte de espectro entre 4000-1200  $\text{cm}^{-1}$ ; e a segunda é a região denominada de impressão digital, que corresponde à parte do espectro entre 1200-600  $\text{cm}^{-1}$ , que fornece informações características do composto analisado, sendo que as alterações nas bandas observadas representam pequenas modificações na estrutura da molécula (146). Poletto et al. (145) divide as bandas oriundas de espectros de FTIR-ATR de celulose em duas regiões principais, denominadas: vibrações de estiramento dos grupos OH e CH entre 4000-2700  $\text{cm}^{-1}$ , e a região de impressão digital que é atribuída a diferentes vibrações de estiramento de diferentes grupos entre 1800-800  $\text{cm}^{-1}$ .

As análises de FTIR-ATR das diferentes frações do subproduto foram realizadas na região entre 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ . A estrutura química foi interpretada em função dos grupos funcionais presentes nas amostras. A Figura 44 apresenta os espectros das diferentes frações do subproduto em estudo. Para a interpretação qualitativa foram utilizados como base as bandas (reportadas em  $\text{cm}^{-1}$ ) e atribuídas numerações às bandas, conforme apresentado na Tabela 34.



**Figura 44.** Espectros normalizados (Origin) de FTIR-ATR das diferentes frações do subproduto de *Eucalyptus*. Subproduto triturado-extraído (STE). Subproduto triturado-extraído pré-tratado hidrotérmicamente na condição otimizada (STE-TO). Subproduto triturado-extraído pré-tratado hidrotérmicamente na condição otimizada seguido de extração alcalina (STE-TO-E). Subproduto original (SO). Subproduto original pré-tratado hidrotérmicamente na condição otimizada (SO-TO). Subproduto original pré-tratado hidrotérmicamente na condição otimizada seguido de extração alcalina (SO-TO-E). FONTE: Autor, (2019).

**Tabela 34** - Atribuições das bandas de absorção na região do infravermelho médio (FTIR-ATR) para biomassas lignocelulósicas.

Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Identificação das bandas de absorção	Letras que identificam as bandas na Figura 24
3330	Estiramento O-H	a
2896	Estiramento simétrico e assimétrico C-H(CH <sub>2</sub> e CH <sub>3</sub> ) da celulose	b
1728	Estiramento C=O Aldeído/Cetona da hemicelulose	c
1592	Vibração do anel aromático + Estiramento C=O da lignina	d
1504	Vibração do anel aromático da lignina	e
1424	Esqueleto aromático combinado com C-H no plano de deformação e alongamento.	f
1367	Deformação angular simétrica no plano C-H da celulose	g
1158	Estiramento assimétrico da ponte de oxigênio C-O-C em celulose	h
1022	Deformação no plano C-H da celulose	i
894	Estiramento do anel de glicose, deformação C <sub>1</sub> -H glicosídica da celulose	j

\*Adaptado de (143,145,147-150)

A Figura 44 mostra que a banda em 1728 cm<sup>-1</sup> (letra c, Tabela 34), relacionada ao estiramento de grupos carbonilas, foi menos intensa no subproduto pós-tratamento hidrotérmico (SO-TO e STE-TO) e praticamente desapareceu no subproduto pós-tratamento hidrotérmico seguido de extração alcalina (SO-TO-E e STE-TO-E), indicando que houve remoção da fração de hemicelulose, corroborando com os dados de composição química e RMN (Tabela 25 e 31 e Figura 43). Esses resultados estão de acordo com Cruz Filho (124), que reportaram pré-tratado hidrotérmicamente (190 °C por 20 min) e pré-tratado hidrotérmicamente seguido de extração alcalina (NaOH 1%, m·v<sup>-1</sup>) em cavacos de *Eucalyptus urograndis* “in natura”, com as seguintes

condições experimentais: relação sólido:líquido 1:10 (m·v<sup>-1</sup>) e 100 °C por 1 h. Os autores verificaram o mesmo comportamento do presente trabalho na banda em 1751 cm<sup>-1</sup>. Lima et al. (135), utilizando madeiras de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus grandis x urophylla* pré-tratadas hidrotêrmicamente à 80 °C por 60 min, seguidas de extração alcalina com NaOH 4% (m·v<sup>-1</sup>) e nas seguintes condições experimentais: relação sólido:líquido 1:10 (m·v<sup>-1</sup>), temperatura de 120 °C por 1 h. Os autores verificaram o mesmo comportamento do presente trabalho na banda em 1751 cm<sup>-1</sup>.

Segundo Xu et al. (143), Chen et al. (151), Lionetto et al. (152), a estrutura da lignina é identificada no espectro de FTIR-ATR nas bandas de absorção em torno de 1600, 1595, 1520, 1509, 1464, 1422 cm<sup>-1</sup>. Pequenas diferenças nas intensidades dos picos que compreendem a vibração do anel aromático+estiramento C=O da lignina em torno de 1592 cm<sup>-1</sup>, bem como a vibração do anel aromático da lignina em 1504 cm<sup>-1</sup> também foram evidentes para todas as frações do subproduto em estudo. A presença de tais bandas em todas as amostras evidencia a presença de lignina. Todavia, não foi possível evidenciar uma alteração clara entre as frações em estudo nas bandas de 1592 e 1504 cm<sup>-1</sup>, corroborando com os dados de composição química, onde foi constatado remoção parcial de lignina pós-tratamento hidrotêrmico (SO-TO e STE-TO) da ordem de 13% e 21%, respectivamente. Além disso, o subproduto pós-tratamento hidrotêrmico seguido de extração alcalina também não apresentou alterações significativas nas bandas de 1592 e 1504 cm<sup>-1</sup>, o que corrobora com os dados de composição química onde foi constatado uma remoção parcial de lignina pós-tratamento hidrotêrmico

seguido de extração alcalina (SO-TO-E e STE-TO-E) da ordem de 21,0% e 16,7%, respectivamente (Tabela 31). Os dados de FTIR-ATR também são corroborados com os dados de RMN, onde também não foi constatada alterações na banda de 58 ppm (número 2, Tabela 33), que representa grupos aril-metoxil de carbonos de lignina (Figura 43).

A região denominada de impressão digital que corresponde à região do espectro entre 1200-600  $\text{cm}^{-1}$ , confirma a presença de celulose em todas as frações do subproduto em estudo (Tabela 34 e Figura 44). A banda de absorção de 1022  $\text{cm}^{-1}$ , que é característica da deformação no plano C-H da celulose (150,151), ocorreu com uma alta intensidade em todas as frações do subproduto em estudo, não havendo uma diferença significativa entre as amostras (Tabela 34 e Figura 44). Desta forma, não foi possível constatar alterações significativas nos subprodutos pós-tratamento hidrotérmico (SO-TO e STE-TO) e nos subprodutos pós-tratamento hidrotérmico seguido de extração alcalina (SO-TO-E e STE-TO-E) o que corrobora com os dados de composição química e RMN (Tabelas 25 e 31; Figura 43).

## ***5.10. Hidrólise enzimática das frações do subproduto de *Eucalyptus* pré-tratado hidrotermicamente seguido de extração alcalina (SO-TO-E e STE-TO-E)***

### ***5.10.1. Avaliação de atividade enzimática de extrato comercial***

A Tabela 35 apresenta o teor de proteína e atividade específica de endoglucanases, exoglucanases e  $\beta$ -glicosidases do preparado enzimático Celluclast (Novozymes). O preparado enzimático apresentou atividades de

endoglucanases, exoglucanases e  $\beta$ -glicosidases de 296,2, 22,8 e 69,3 UI.mL<sup>-1</sup>, respectivamente. A literatura reporta atividades de endoglucanases e  $\beta$ -glicosidases de 29,5 UI.mg<sup>-1</sup> e 0,27 UI.mg<sup>-1</sup> para o mesmo preparado enzimático (153). Desta forma, o preparado enzimático tem potencial para a hidrólise enzimática de celulose visando a produção de GOS, pois apresenta atividades de exoglucanases e  $\beta$ -glicosidases relativamente baixas.

**Tabela 35** - Atividade específica e teor de proteínas em preparado enzimático comercial Celluclast (Novozymes).

Preparado enzimático	Proteínas totais (mg.ml <sup>-1</sup> )	Endoglucanases (UI.mg <sup>-1</sup> )	Exoglucanases (UI.mg <sup>-1</sup> )	$\beta$ -glicosidases (UI.mg <sup>-1</sup> )
Celluclast	25,4	11,7	0,9	2,7

#### **5.10.2. Determinação dos produtos formados no hidrolisado pós-tratamento hidrotérmico seguido de extração alcalina do subproduto de *Eucalyptus***

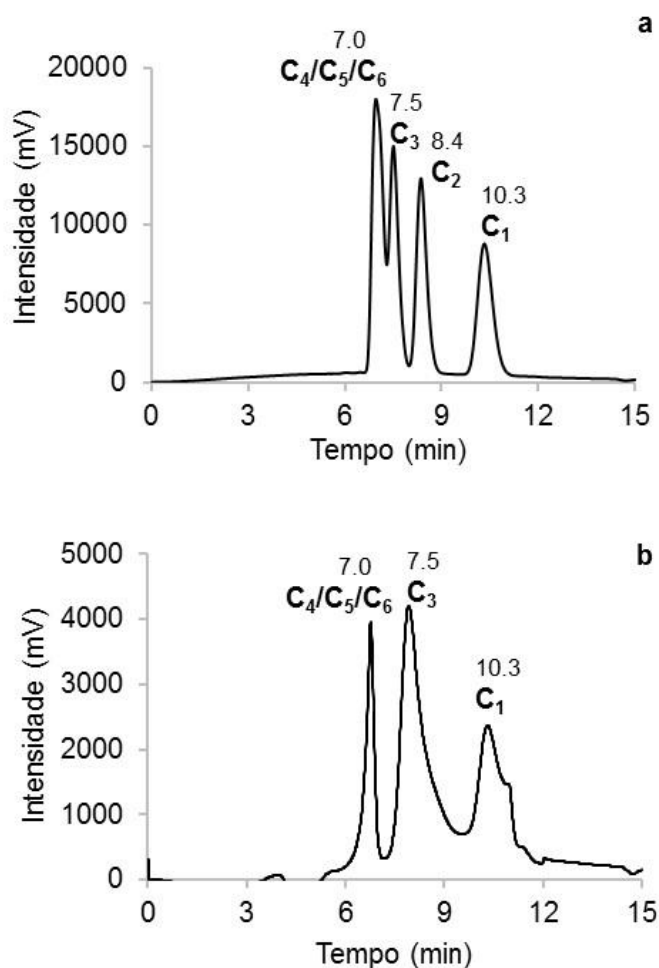
As condições do PTH otimizadas seguido de extração alcalina tornaram a celulose contida no subproduto mais susceptível à ação de celulases, podendo influenciar diretamente na conversão de celulose em COS e glicose (82).

Com o objetivo de avaliar a eficiência do pré-tratamento seguido de extração alcalina frente à conversão de celulose em COS e glicose, foram realizados ensaios de hidrólise enzimática com os subprodutos pré-tratados hidrotermicamente seguido de extração alcalina (SO-TO-E e STE-TO-E), por até 72 h em intervalos de 3, 6, 12, 24, 48 e 72 h, utilizando uma carga

enzimática de  $195,5 \text{ UI.g}^{-1}$ . Entretanto, para quantificação dos COS foi necessário a avaliação de um método cromatográfico adequado. Desta forma, foi utilizado o método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando-se a coluna BIO-RAD Aminex HPX-87C para avaliar a separação de padrões analíticos de COS. O cromatograma típico obtido para a eluição dos seguintes padrões analíticos de COS com os seus respectivos tempos de retenção foram: celotetrose+celopentose+celohexose (7,0 min), celotriose (7,5 min), celobiose (8,4 min) e glicose (10,3 min). Os padrões analíticos celotetrose, celopentose e celohexose não foram separados, coeluinto no tempo de retenção de 7,0 min (Figura 45a). As curvas de analíticas de cada padrão foram utilizadas para quantificação dos COS oriundos da hidrólise enzimática. A curva analítica para os oligômeros celotetrose/celopentose/celohexose, celotriose, celobiose e glicose apresentaram linearidade na faixa de 0,09-1,9; 0,06-1,1; 0,06-1,1 e 0,06-1,2  $\text{g.L}^{-1}$  respectivamente. O coeficiente de correlação médio das respectivas curvas foi 0,9987 (Apêndice VI).

A Figura 45b apresenta o cromatograma de eluição dos COS do ensaio da hidrólise enzimática do SO-TO-E na condição de 24 h (Tabela 36). O cromatograma confirmou a presença de celotetrose/celopentose/celohexose ( $C_4+C_5+C_6$ ), celotriose, ( $C_3$ ) e glicose ( $C_1$ ).





**Figura 45** - Cromatogramas típicos de COS. (a) Padrões analíticos de COS. (b) Fração líquida pós-hidrólise enzimática do subproduto original pré-tratado hidrotérmicamente na condição otimizada seguido de extração alcalina (SO-TO-EH) por 24 h. Ambos separados na coluna BIO-RAD Aminex HPX-87C. (C<sub>4</sub>/C<sub>5</sub>/C<sub>6</sub>) celotetrose+celopentose+celohexose, (C<sub>3</sub>) celotriose, (C<sub>2</sub>) celobiose, (C<sub>1</sub>) glicose. FONTE: Autor, (2019).

A Tabela 36 e as Figuras 46 e 47 apresentam o perfil da hidrólise enzimática das celulosas (SO-TO-EH e STE-TO-EH) em função do tempo. Desta forma, as celulosas do SO-TO-EH e do STE-TO-EH foram rapidamente convertidas em COS, atingindo um máximo em 24 h, culminando em conversões de celulose em COS de 53,6% e 61,4%, respectivamente. Todavia, as celulosas do SO-TO-E e do STE-TO-E também foram

parcialmente convertidas em glicose após 24 h de hidrólise enzimática, culminando em conversões de celulose em glicose de 14,8% e 21,8%, respectivamente.

Após 24 h de hidrólise enzimática as celuloses do SO-TO-EH e do STE-TO-EH foi notável a redução dos teores de COS e conseqüente aumento de glicose, pois as exoglucanases e  $\beta$ -glicosidases podem clivar com maior facilidade seus substratos, ou seja, os COS podem ser convertidos em glicose através da clivagem pelas exoglucanases e  $\beta$ -glicosidases presentes no extrato comercial utilizado no presente estudo (90,91). Todavia, após 72 h de hidrólise enzimática as celuloses do SO-TO-EH e do STE-TO-EH atingiram conversões máximas em glicose de 34,4% e 34,9%, respectivamente, o que culminou na diminuição da conversão das celuloses do SO-TO-EH e do STE-TO-EH em COS (28,6% e 33,4%, respectivamente) em relação ao tempo de 24h (Tabela 36 e as Figuras 46 e 47).

Sun et al. (82), reportaram recentemente um pré-tratamento hidrotérmico em *Eucalyptus urophylla* (160 °C por 60 min), seguido de deslignificação alcalina com NaOH 2% (m·v<sup>-1</sup>) a 90 °C por 2,5 h e relação sólido:líquido de 3,3% (m·v<sup>-1</sup>). Os autores obtiveram conversão máxima de celulose em glicose de aproximadamente 55% em 72 h de reação nas seguintes condições experimentais: temperatura 45 °C; pH 4,8; agitação de 150 rpm; relação sólido:líquido 2% (m·v<sup>-1</sup>); por 72 h com carga enzimática de 17 FPU·g<sup>-1</sup> e 34 IU·g<sup>-1</sup> de celulasas totais e  $\beta$ -glicosidase por grama de substrato, respectivamente. A conversão de celulose em glicose do SO-TO-EH e do STE-TO-EH após 72 h de hidrólise foram inferiores (34,4% e 34,9%,

respectivamente) quando comparado ao estudo reportado na literatura. A maior conversão de celulose em glicose reportado pelos autores pode ser atribuído aos maiores níveis de atividades de  $\beta$ -glicosidase e exoglucanases do preparado enzimático. Desta forma, o preparado enzimático Celluclast (utilizado no presente estudo) apresentou maior potencial para produção de COS em relação a glicose, confirmando a boa escolha do mesmo.

A concentração máxima de glicose ao final da hidrólise enzimática (72 h) do SO-TO-EH e do STE-TO-EH, foram de 5,2 e 4,8 g.L<sup>-1</sup> respectivamente. Entretanto, a concentração máxima de COS foi de 7,8 e 7,9 g.L<sup>-1</sup>, após 24 h de hidrólise enzimática (Tabela 36). Considerando 24 h de hidrólise enzimática foi possível produzir aproximadamente 0,4 g de COS por cada grama de material de partida (SO-TO-E e STE-TO-E).

O SO-TO-EH e o STE-TO-EH mostraram aumento na conversão de celulose em glicose e diminuição na conversão de celulose de COS ao longo do tempo de hidrólise enzimática (Figuras 46 e 47). Esse comportamento pode ser explicado pela clivagem dos COS por  $\beta$ -glicosidases, as quais clivam as ligações glicosídicas dos COS convertendo-os em glicose (70,154).

Chu et al. (155) estudando a produção de celu-oligossacarídeos a partir dos resíduos de sabugo de milho, por hidrólise enzimática utilizando preparado enzimático Cellulase (C2730 – Sigma), à 50 °C, 150 rpm por 24 h, consistência de 5%, tampão citrato 50 mM, pH 4,8. Verificaram maiores conversões de COS em 24h de 51,78%, corroborando com os resultados obtidos no presente trabalho que em 24 h resultaram em conversões de 53,6% e 61,4% para SO-TO-EH e STE-TO-EH, respectivamente (Tabela 36).

**Tabela 36** - Conversão de celulose em celu-oligossacarídeos (COS) e glicose e concentração de celu-oligossacarídeos (COS) e glicose, ambos ao longo da hidrólise enzimática com extrato enzimático comercial rico em atividade de endoglucanases (Celluclast-Novozymes). Dados de conversão apresentados em porcentagem (g/100g de material, base seca) e concentração em g.L<sup>-1</sup>.

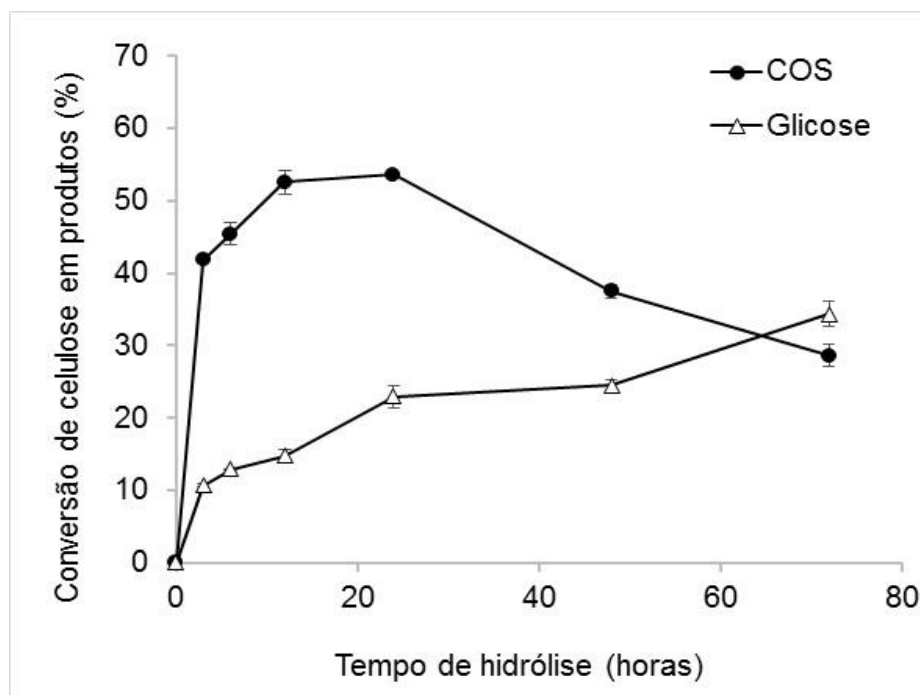
Amostra	Tempo (h)	Conversão de celulose produtos (%)			Concentração de glicose e COS (g.L <sup>-1</sup> )		
		C <sub>4</sub> +C <sub>5</sub> +C <sub>6</sub>	Celotriose	Glicose	*COS	Glicose	*COS
SO-TO-EH	3	6,8 ± 0,3	34,9 ± 0,6	10,7 ± 0,2	41,8 ± 0,2	1,6 ± 0,1	5,8 ± 0,0
	6	10,9 ± 0,6	34,5 ± 1,2	12,9 ± 0,1	45,5 ± 1,6	1,9 ± 0,0	6,5 ± 0,2
	12	13,5 ± 0,3	39,2 ± 1,6	14,0 ± 1,4	52,6 ± 1,6	2,4 ± 0,2	7,4 ± 0,3
	24	19,9 ± 1,1	35,3 ± 1,7	14,8 ± 0,8	53,6 ± 0,2	3,5 ± 0,3	7,8 ± 0,5
	48	10,7 ± 0,3	26,9 ± 1,2	24,5 ± 0,7	37,5 ± 0,9	3,7 ± 0,1	5,3 ± 0,1
	72	28,6 ± 1,6	nd	34,4 ± 1,7	28,6 ± 1,6	5,2 ± 0,2	4,0 ± 0,2
STE-TO-EH	3	8,2 ± 0,3	37,1 ± 0,6	11,7 ± 0,3	45,5 ± 0,7	1,6 ± 0,1	5,9 ± 0,0
	6	9,7 ± 0,4	36,6 ± 1,1	13,5 ± 1,0	46,4 ± 1,2	1,8 ± 0,1	6,0 ± 0,2
	12	11,1 ± 0,7	35,6 ± 0,8	16,7 ± 0,5	47,0 ± 0,3	2,3 ± 0,0	6,0 ± 0,1
	24	15,6 ± 1,0	45,8 ± 0,8	21,8 ± 0,6	61,4 ± 0,9	3,0 ± 0,1	7,9 ± 0,1
	48	10,9 ± 0,7	38,6 ± 0,9	22,1 ± 0,7	49,5 ± 1,5	3,0 ± 0,1	6,4 ± 0,1
	72	33,4 ± 1,2	nd	34,9 ± 0,6	33,4 ± 1,2	4,8 ± 0,1	4,2 ± 0,2

\*COS = Celu-oligossacarídeos maiores que duas unidades de glicose = (C<sub>4</sub>+C<sub>5</sub>+C<sub>6</sub>)+Celotriose+Celobiose.

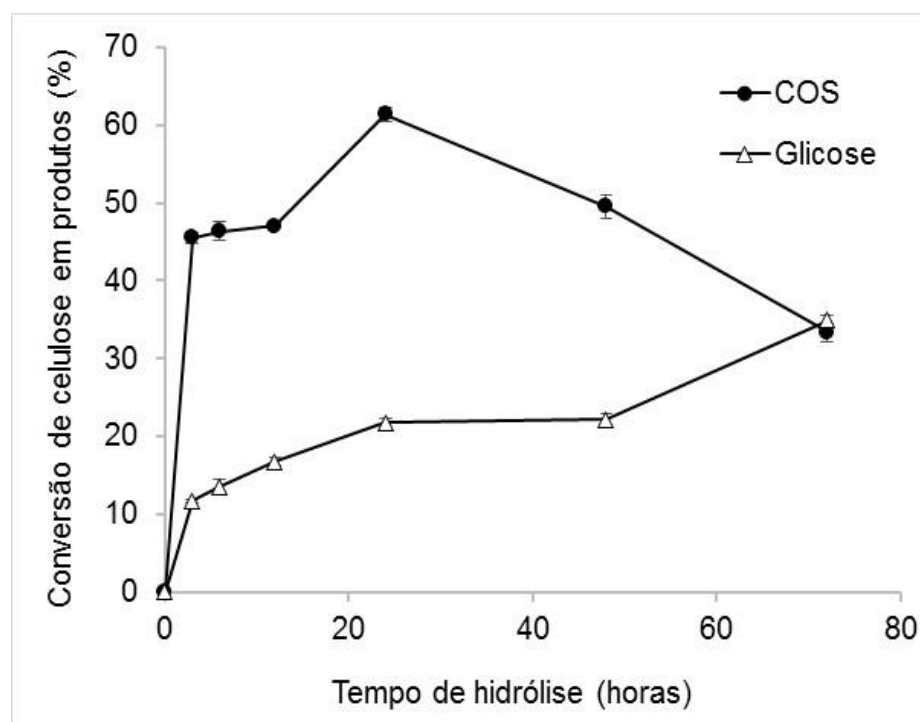
SO-TO-EH = Subproduto original pré-tratado hidrotermicamente em condição otimizada seguido de extração alcalina e hidrólise enzimática.

STE-TO-EH = Subproduto triturado-extraído pré-tratado hidrotermicamente em condição otimizada seguido de extração alcalina e hidrólise enzimática.

nd = não detectável.



**Figura 46** - Conversão de celulose do subproduto original pré-tratado hidrotérmicamente na condição otimizada seguido de extração alcalina (SO-TO-E) em celu-oligossacarídeos (COS) e glicose oriundos da hidrólise enzimática utilizando extrato enzimático rico em atividades de endoglucanases (Celluclast-Novozymes). FONTE: Autor, (2019).

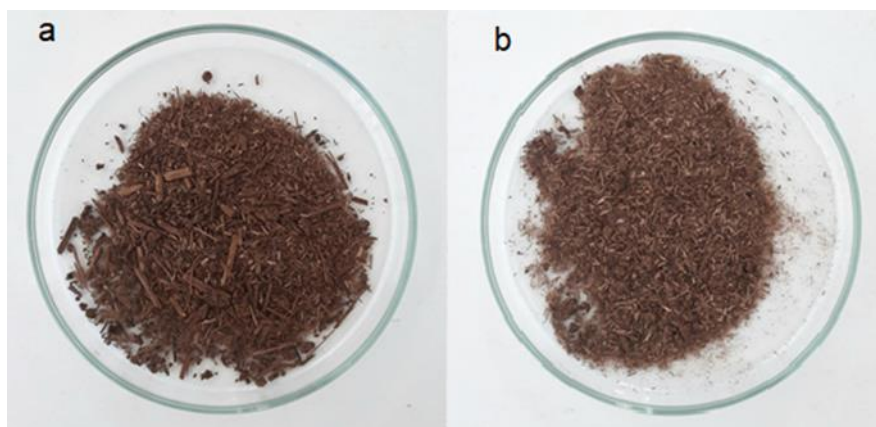


**Figura 47** - Conversão de celulose do subproduto triturado-extraído pré-tratado hidrotérmicamente na condição otimizada seguido de extração alcalina (STE-TO-E) em celu-oligossacarídeos (COS) e glicose oriundos da hidrólise enzimática

utilizando extrato enzimático rico em atividades de endoglucanases (Celluclast-Novozymes). FONTE: Autor, (2019).

O SO-TO-EH e o STE-TO-EH ao final do processo de hidrólise enzimática (72 h) apresentaram rendimentos de 66,9 e 69,6% (%massa/massa, base seca), respectivamente (Tabela 37). Zhu e Pan (27), reportaram a recuperação máxima de monossacarídeos em resíduos de *Eucalyptus* e obtiveram um rendimento de 57,3% em 48 h de hidrólise enzimática nas seguintes condições experimentais: temperatura 50 °C; pH 5,5; relação sólido:líquido 5% (m·v<sup>-1</sup>); incubados com uma formulação de duas enzimas comerciais, Celluclast 1,5 L (0,225 g·g<sup>-1</sup> de substrato) suplementada com Novozyme 188 (0,025 g·g<sup>-1</sup> de substrato), correspondente a aproximadamente 8 FPU e 24 UI β-glicosidade por grama de substrato.

A Figura 48 apresenta as frações insolúveis do SO-TO-EH e do STE-TO-EH após 72 h de hidrólise enzimática.



**Figura 48** - Fração insolúvel dos subprodutos original e triturado-extraído na condição otimizada pós-tratamento hidrotérmico seguido de extração alcalina e hidrólise enzimática por endoglucanases (SO-TO-EH e STE-TO-EH). FONTE: Autor, (2019).

O SO-TO-EH e o STE-TO-EH mostraram teores brutos de celulose (53,6% e 49,4%), xilana (0,4% e 0,9%) e lignina (35,4% e 36,2%) (% massa/massa, base

seca), respectivamente (Tabela 37). Desta forma, foi averiguado um enriquecimento da fração de lignina do SO-TO-EH e do STE-TO-EH quando comparado ao SO-TO-E e o STE-TO-E (30,2% e 26,8%), respectivamente (Tabela 37).

O balanço de massa dos componentes foi necessário para comparar as frações PTH seguida de extração alcalina e hidrólise enzimática (SO-TO-EH e STE-TO-EH), diretamente, com o SO-TO-E e STE-TO-E (Tabela 38). Desta forma, o SO-TO-EH e o STE-TO-EH, apresentaram reduções significativas nos teores de celulose (51,3% e 55,1%). Além disso, o SO-TO-E e o STE-TO-E apresentaram reduções significativas das frações de xilana (96,6% e 94,3%) e lignina (37,0% e 33,2%), respectivamente (Tabela 37). Desta forma, foi constatado que a hidrólise enzimática foi seletiva na remoção das frações de celulose e xilana, removendo parcialmente a fração de lignina.

A hidrólise enzimática mostrou que a celulose foi hidrolisada para o SO-TO-EH e para o STE-TO-EH na ordem de 51,3% e 55,1% (Tabela 37). Entretanto, a fração de xilana foi praticamente totalmente removida frente a hidrólise enzimática. Isso já era esperado visto que grande parte da xilana já tinha sido solubilizada no PTH (Tabela 25). Ao final, o “resíduo” final após a hidrólise enzimática tornou-se mais rico em lignina, sendo uma alternativa para cogeração de energia e/ou produção de lignina.

**Tabela 37** - Rendimento e composição química das frações insolúveis do subproduto original pré-tratado hidrotêrmicamente na condição otimizada seguido de extração alcalina e hidrólise enzimática (SO-TO-EH) e subproduto triturado-extraído pré-tratado hidrotêrmicamente na condição otimizada seguido de extração alcalina e hidrólise enzimática (STE-TO-EH). Dados apresentados em porcentagem de material (grama por 100 gramas de material em polpa básica ou original, dados em base seca).

Amostras	Variáveis do pré-tratamento hidrotérmico			Rendimento pré-tratamento (g/100g de material)	Componentes do material (Gramas por 100 gramas de material em polpa básica)			
	Temperatura	Tempo	Consistência		Celulose	Xilana	Grupo acetil	Lignina
	(°C)	(min)	(%)		(%)	(%)	(%)	(%)
SO-TO-E	-	-	-	-	59,0 ± 2,1	5,9 ± 0,2	*	30,2 ± 0,3
STE-TO-E	-	-	-	-	54,4 ± 0,1	8,8 ± 0,6	*	26,8 ± 0,6
SO-TO-EH	45	72	2	66,9	53,6 ± 2,3	0,4 ± 0,0	*	35,4 ± 0,4
STE-TO-EH	45	72	2	69,6	49,4 ± 2,3	0,9 ± 0,3	*	36,2 ± 1,6

Amostras	Variáveis do pré-tratamento hidrotérmico			Rendimento pré-tratamento (g/100g de material)	Componentes do material (Gramas por 100 gramas de material original - balanço de massa)			
	Temperatura	Tempo	Consistência		Celulose	Xilana	Grupo acetil	Lignina
	(°C)	(min)	(%)		(%)	(%)	(%)	(%)
SO-TO-E	-	-	-	-	59,0 ± 2,1	5,9 ± 0,2	*	30,2 ± 0,3
STE-TO-E	-	-	-	-	54,4 ± 0,1	8,8 ± 0,6	*	26,8 ± 0,6
SO-TO-EH	45	72	2	66,9	28,7 ± 1,3	0,2 ± 0,0	*	19,0 ± 0,2
STE-TO-EH	45	72	2	69,6	24,4 ± 1,6	0,5 ± 0,2	*	17,9 ± 1,1

SO-TO-E= Subproduto original pré-tratado hidrotêrmicamente na condição otimizada seguido de extração alcalina.

STE-TO-E = Subproduto triturado-extraído pré-tratado hidrotêrmicamente na condição otimizada seguido de extração alcalina.

SO-TO-EH = Subproduto original pré-tratado hidrotêrmicamente na condição otimizada seguido de extração alcalina e hidrólise enzimática.

STE-TO-EH = Subproduto triturado-extraído pré-tratado hidrotêrmicamente na condição otimizada seguido de extração alcalina e hidrólise enzimática.

\*= não detectado



## 6. CONCLUSÃO

- ✓ O pré-tratamento hidrotérmico foi seletivo na remoção da fração de hemicelulose, em ambos subprodutos avaliados (SO e STE). As condições otimizadas do PTH visando a produção de XOS para o SO e STE foram as seguintes: 161,0 °C por 65 min e 160,4 °C por 63 min, respectivamente (consistência de 10% (m·v<sup>-1</sup>), para ambos SO e STE). Nestas condições o SO e o STE culminaram em uma redução da fração de hemicelulose e celulose de aproximadamente 65% e 12%, respectivamente;
- ✓ Os hidrolisados hemicelulósicos oriundos dos PTH otimizados do SO e do STE apresentaram potencial para a produção de XOS (em média 62 mg de XOS para cada grama de subproduto de *Eucalyptus*). Todavia, os hidrolisados também apresentaram níveis apreciáveis de contaminantes, como por exemplo: aromáticos solúveis, xilose e ácido acético. Desta forma, etapas de purificação do hidrolisado hemicelulósico serão necessárias para a posterior formulação do bioproduto (XOS);
- ✓ O processo de PTH seguido de extração alcalina foi seletivo para remoção de lignina e hemicelulose culminando em uma celulose com maior pureza;
- ✓ A caracterização estrutural dos subprodutos de *Eucalyptus* PTH na condição otimizada (SO-TO e STE-TO) confirmaram a seletividade na remoção de hemicelulose, além do aumento do ICr. Além disso, os subprodutos de *Eucalyptus* PTH seguido de extração alcalina na condição otimizada (SO-TO-E e STE-TO-E) confirmaram a seletividade da remoção de lignina e hemicelulose, além da diminuição do ICr;

- ✓ A hidrólise enzimática do SO-TO-E e do STE-TO-E com preparado enzimático (Celluclast-Novozyme) apresentaram potencial para a produção de COS (em média 0,4 g de COS para cada grama de subproduto PTH), confirmando que a extração alcalina no SO-TO e no STE-TO foram eficientes, permitindo maior acesso das endoglucanases à molécula de celulose;
- ✓ O processo de produção de oligossacarídeos (XOS e COS) a partir de um subproduto de *Eucalyptus* pode ser uma alternativa promissora no setor celulósico, pois os oligossacarídeos são bioprodutos com alto valor agregado e tem potencial de comercialização em nível mundial. Sendo que para cada 200 toneladas de subproduto produz em média 12,4 toneladas de XOS e 61,2 toneladas de COS;
- ✓ O “resíduo final” do processo (SO-TO-EH ou STE-TO-EH, enriquecidos em lignina) poderão ser uma alternativa para cogeração de energia (pois este “resíduo final” contém maior eficiência energética quando comparado ao material “in natura”). Outra alternativa seria a produção de lignina, visando à aplicação no setor químico e de construção civil. Algumas aplicações da lignina podem ser destacadas, como se segue: produção de aglutinantes naturais, adesivos, compósitos, fibra de carbono, dentre outros produtos;
- ✓ O bioprocesso avaliado concerne com o conceito atual de biorrefinarias, ou seja, processamento sustentável de biomassa lignocelulósica com possibilidade de produção de um espectro de bioprodutos de alto valor agregado potencialmente comercializáveis;

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Magaton AS, Piló-Veloso D, Colodette JL. Caracterização das O-acetil-(4-O-metilglicurono) xilanas isoladas da madeira de *Eucalyptus urograndis*. *Química Nova*. Setembro de 2008; 31(5): 1085-8.
2. Farinha SCA, Bueno JM, Neves, MR. A Indústria de Celulose e Papel no Brasil “A inovação é o que faz a diferença entre um líder e um seguidor”. “Innovation distinguishes between a leader and a follower”. *Guia ABTCP - Fornecedores e Fabr.* 2017; 16–28.
3. Marques ML, Silva EJ, Velasco FM, Junior CCMF. Potencialidades do uso de resíduos de celulose (DREGS/GRITS) como agregado em argamassas. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*; 2014; 16(4): 423–31.
4. Fang H, Gurshagan K, Rajan K, Djioleu A, Carrier DJ, Hood KR, Hood EE. Effects of oligosaccharides isolated from pinewood hot water pre-hydrolyzates on recombinant cellulases. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2018; 6: 1-11.
5. Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *The journal of Nutrition*. 1995; 125: 1401-12.
6. Vázquez J, Alonso JL, Dominguez H, Parajó JC. Xylooligosaccharides: manufacture and applications. *Trends in Food Science and Technology*. 2001; 11: 387-93.
7. Nakakuki, T. Present status and future of functional oligosaccharide development in Japan. *Pure Applied Chemistry*. 2002; 74: 1245–51.

8. Singh RD, Banerjee J, Arora, A. Prebiotic potential of oligosaccharides: A focus on xylan derived oligosaccharides. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*. 2015; 5:19-30.
9. Samanta AK, Jayapal N, Jayaram C, Roy S, Kolte AP, Senani S. et al. Xylooligosaccharides as prebiotics from agricultural by-products: Production and applications. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*. 2015; 5: 62-7.
10. Figueiredo FC, Carvalho AFA, Brienza M, Campioni TS, Oliva-Neto. Chemical input reduction in the arabinoxylan and lignocellulose alkaline extraction and xylooligosaccharides production. *Bioresour Technol*. 2017; 228:164–70.
11. Domínguez MN, Eugenio LI, York-Durán MJ, Rodríguez-Colinas B, Plou FJ, Chenoll E, Pardo E, Codoner F, Martínez MJ. Prebiotic effect of xylooligosaccharides produced from birchwood xylan by a novel fungal GH11 xylanase. *Food chemistry*. 2017; 232: 105-13.
12. Hasan MT, Jang WJ, Lee S, Kim KW, Lee BJ, Han HS, et al. Effect of b-glucooligosaccharides as a new prebiotic for dietary supplementation in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) aquaculture. *Aquaculture Research*. 2018; 49:1310-19.
13. Song J, Jiao LF, Xiao K, Luan ZS, Hu CH, Shi B, et al. Cello-oligosaccharide ameliorates heat stress-induced impairment of intestinal microflora, morphology and barrier integrity in broilers. *Animal Feed Science and Technology*. Elsevier. 2013; 185: 175-81.

14. Chen M, Bowman MJ, Dien BS, Rausch KD, Tumbleson ME, Singh V. Bioresource Technology Autohydrolysis of Miscanthus x giganteus for the production of xylooligosaccharides (XOS): Kinetics, characterization and recovery. *Bioresour Technol.* 2014; 155: 359–65.
15. Bracelpa. Associação Brasileira de Celulose e Papel. Relatório de sustentabilidade, 2006. Acesso em: jan. 2017. Disponível em: [www.sinpesc.com.br/images/publicacoes/02sustentabilidade.pdf](http://www.sinpesc.com.br/images/publicacoes/02sustentabilidade.pdf)
16. IBÁ. Anuário Ibá. Indústria brasileira de Árvores. 2018 – Acesso em: jan. 2019. Disponível em: [iba.org/historico-de-desempenho#celulose-1](http://iba.org/historico-de-desempenho#celulose-1)
17. Alén, R. “Principles of biorefining,” in: *Biorefining of Forest Resources*. Paper Engineers’ Association, Helsinki, Finland. 2011; 18-114.
18. Moshkelani M, Marinova M, Perrier M, Paris J. “The forest biorefinery and its implementation in the pulp and paper industry: Energy overview,” *Appl. Therm. Eng.* 2013; 50(2):1427-36. doi:10.1016/j.applthermaleng.2011.12.038.
19. Lehto JT, Alén RJ. "Chemical pretreatments of wood chips prior to alkaline pulping - A review of pretreatment alternatives, chemical aspects of the resulting liquors, and pulping outcomes. *BioResources*. 2015; 10(4): 8604-56.
20. Gomide J, Fantuzzi H, Regazzi A. Análise de critérios de qualidade da madeira de eucalipto para produção de celulose kraft. *Revista Árvore*. 2010; 34(2): 339-44.
21. Barroso DG, Carneiro JGA, Novaes AB, Leles PSS. Efeitos do recipiente sobre o desempenho pós-plantio de *Eucalyptus*

- camaldulensis Dehn e *E. urophylla* S.T. Blake. *Revista Árvore*. 2000; 24(3): 291-6.
22. Pinto DS, Resende RT, Mesquita AGG, Rosado AM, Cruz CD. Seleção precoce para características de crescimento em testes clonais de *Eucalyptus urophylla*. *Scintia Forestali*. 2014; 42(102): 251-7.
23. Carvalheiro F, Duarte LC, Gírio FM. Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments. *Journal of Scientific and Industrial Research*. 2008; 67: 849-64.
24. Sánchez OJ, Cardona CA. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource Technology*. 2008; 99: 5270–95.
25. Cordeiro N, Ashori A, Hamzeh Y, Faria M. “Effects of hot water pre-extraction on surface properties of bagasse soda pulp,” *Mat. Sci. Eng. C*. 2013; 33(2), 613-17. doi: 10.1016/j.msec.2012.10.005.
26. Behera S, Arora R, Nandhagopal N, Kumar S. “Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass.” *Renew. Sust. En. Prod*. 2014; 36, 91-106. doi: 10.1016/j.rser.2014.04.047.
27. Zhu JY, Pan XJ. “Woody biomass pretreatment for cellulosic ethanol production: Technology and energy consumption evaluation,” *Bioresour. Technol*. 2010; 101(13), 4992-5002. doi: 10.1016/j.biortech.2009.11.007.
28. Silva-Fernandes T, Duarte LC, Carvalheiro F, Loureiro-Dias MC, Fonseca C, Gírio F. “Hydrothermal pretreatment of several lignocellulosic mixtures containing wheat straw and two hardwood

- residues available in Southern Europe,” *Bioresour. Technol.* 183, 213-220. doi: 10.1016/j.biortech.2015.01.059
29. <https://www.inputbrasil.org/wpcontent/uploads/2015/11/Oportunidades-Para-Florestas-Energ%C3%A9ticas-NAgera%C3%A7%C3%A3o-De-Energia-No-Brasil-1.pdf>. acesso em dez.2018.
30. Ruiz HA et al. Evaluation of a hydrothermal process for pretreatment of wheat straw-effect of particle size and process conditions. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology.* 2011; 86: 88-94.
31. Fengel DE, Wegener G. *Wood. Chemistry, Ultrastructure, reactions.* New York: W. De Gruyter. 1989; 613.
32. Gan Q, Allen SJ, Taylor G. Kinetic dynamics in heterogeneous enzymatic hydrolysis of cellulose: an overview, an experimental study and mathematical modeling. *Process Biochemical.* 2003; 38: 1003-18.
33. Gellerstedt, EKM.; Henriksson, G. *Wood Chemistry and Wood Biotechnology, 1 and Pulping Chemistry and Technology 2.* 2009; Berlin: Walter de Gruyter.
34. Ogeda TL, Petri DFS. Hidrólise enzimática de biomassa. *Química Nova.* 2010; 33(7): 1549-58.
35. Parajuli R. et al. 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.* 2015; 43: 244-63.
36. Santos, FA. et al. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. *Quím. Nova.* 2012; 35: 1004-10.

37. Wu M. et al. Integration of mild acid hydrolysis in  $\gamma$ -valerolactone/water system for enhancement of enzymatic saccharification from cotton stalk. *Bioresource Technology*. 2016; 200: 23-8.
38. Sjöström E, Westermark U. Chemical composition of wood and pulps: basic constituents and their distribution. In: Eds. Sjöström E.; Alén R. *Analytical methods in wood chemistry, pulping and papermaking*. Helsinki: Springer Series in Wood Science; 1999; 1-20.
39. Hendriks ATWM, Zeeman G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*. Jan. 2009; 100(1): 10–8.
40. Fonseca, MA. Avaliação da produção de xilo-oligossacarídeos a partir de casca de soja [dissertação]. São Carlos (SP): Universidade Federal de São Carlos, Ufscar; 2015.
41. Lynd LR. et al. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2002; 66(3): 506-77.
42. Festucci-Buselli RA, Otoni WC, Joshi CP. Structure, organization, and functions of cellulose synthase complexes in higher plants. *Braz. J. Plant Physiol*. 2007; 19(1): 1–13.
43. Klock U, Muniz GIB, Hernandez JA. *Química da Madeira: manual didático*. 3ª ed. Curitiba: Universidade Federal do Paraná setor de Ciências Agrárias Departamento de Engenharia e Tecnologia Florestal; 2005. Acesso em: novembro de 2018. Disponível em: [marioloureiro.net/ciencia/biomass/quimicadamadeira.pdf](http://marioloureiro.net/ciencia/biomass/quimicadamadeira.pdf)



44. Saha BC. Hemicellulose bioconversion. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 1 maio 2003; 30(5): 279–91.
45. Lucy T, Petri DFS. *Química I De, Paulo UDS, Prof A, Prestes L, et al. Revisão*. 2010; 33(7):1549–58.
46. Dodd D, Cann IKO. Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. *Bioenergy*. 2009; 1: 2-17.
47. Limayem A, Ricke SC. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. *Prog Energy Combust Sci* [Internet]. 2012; 38(4):449–67. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pecs.2012.03.002>
48. Ralph J. et al. Lignins: natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenyl-propanoids. *Phytochemistry Reviews*. 2004; 3(1-2): 29-60.
49. Balakshi MY, Capanema EA, Chang H. MWL fraction with a high concentration of lignin carbohydrate linkages: Isolation and 2D NMR spectroscopic analysis. *Holzforschung*. 2007; 61: 1-7.
50. Silva R, Haraguchi SK, Muniz EC, Rubira, AF. Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos. *Quimica Nova*. 2009; 32(3): 661-71.
51. Brandt A. et al. Deconstruction of lignocellulosic biomass with ionic liquids. *Green Chemistry*. Dezembro de 2013; 15(3): 550-83.
52. Quiñones TS. et al. Production of xylooligosaccharides from renewable agricultural lignocellulose biomass. *Biofuels*. 2015; 6(3–4): 147–55.
53. Rambo MKD, Schmidt FL, Ferreira MMC. Analysis of the

- lignocellulosic components of biomass residues for biorefinery opportunities. *Talanta*. 2015; 144(11): 696–703.
54. Kaur I, NI Y. A process to produce furfural and acetic acid from pre-hydrolysis liquor of kraft based dissolving pulp process. *Separation and Purification Technology*. 2015; 146: 121–6.
  55. Mandelli F. et al. Simultaneous production of xylooligosaccharides and antioxidant compounds from sugarcane bagasse via enzymatic hydrolysis. *Industrial Crops and Products*. 2014; 52: 770–5.
  56. Venkateswar RAO, L. et al. Bioconversion of lignocellulosic biomass to xylitol: An overview. *Bioresource Technology*. 1 agosto de 2015; 213: 299–310.
  57. Kumar V, Satyanarayana T. Applicability of thermo-alkali-stable and cellulose free xylanase from a novel thermo-halo-alkaliphilic *Bacillus halodurans* in producing xylooligosaccharides. *Biotechnology Letters*. 2013; 33: 2279–85.
  58. Barreto AR, Zancan LR, Menezes CR. Obtenção de Xilooligosacarídeos por resíduos lignocelulósicos: alternativa para produção de compostos funcionais para alimentos. *Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental Santa Maria – Revista do Centro de Ciências Naturais e Exatas – UFSM*. Set-dez. 2015; 19(3): 821-36.
  59. Alvira P, Tomás-Pejó E, Ballesteros M, Negro MJ. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology*. 2010;

- 101(13): 4851-61.
60. Capolupo L, Faraco V. Green methods of lignocellulose pretreatment for biorefinery development. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2016; 100(22): 9451–67.
  61. Nitson CK, Matis KA, Triantafyllidis KS. Optimization of hydrothermal pretreatment of lignocellulosic biomass in the bioethanol production process. *ChemSusChem*. 2013; 6:110-22.
  62. Mood SH. et al. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*. 2013; 27: 77-93.
  63. Gupta A, Verma JP. Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2015; 41: 550–67.
  64. Pedraza L. et al. Prebiotic Activity of Xylooligosaccharides from Corncob. *Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences*. 2014; 4(5): 1–5.
  65. Da Silva ASA. et al. Milling pretreatment of sugarcane bagasse and straw for enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. *Bioresource Technology*. 2010; 101(19): 7402–09.
  66. Kumar D, Murthy GS. Stochastic molecular model of enzymatic hydrolysis of cellulose for ethanol production. *Biotechnol Biofuels*, Vol. 6:63, 2013. Acesso em: dez. 2018. Available from: <http://www.biotechnologyforbiofuels.com/content/6/1/63>

67. Canilha L. et al. A study on the pretreatment of a sugarcane bagasse sample with dilute sulfuric acid. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 2011; 38(9):1467-75.
68. Silva AS. et al. Sugarcane and Woody Biomass Pretreatments for Ethanol Production, Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization, Dr. Anuj Chandel (Ed.). 2013; ISBN: 978-953-51-1119-1, InTech, doi:10.5772/53378.
69. Imman S. et al. Autohydrolysis of Tropical Agricultural Residues by Compressed Liquid Hot Water Pretreatment. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2013; 170: 1982-95.
70. Mosier N. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*. Abril de 2005; 96(6): 673–86.
71. Overend RP, Chornet E, Gascoigne JA. Fractionation of lignocellulosics by steam-aqueous pretreatments. *Philosophical Transaction of the Royal Society A*. 1987; 321(1561): 523-36.
72. Souza RBA. Estudo do pré-tratamento hidrotérmico e hidrólise enzimática da palha de cana-de-açúcar [tese]. São Carlos. (SP). Universidade Federal de São Carlos, Ufscar; 2016.
73. Carvalheiro F. et al. Hydrothermal/Liquid Hot Water Pretreatment (Autohydrolysis): A Multipurpose Process for Biomass Upgrading. In: *Biomass Fractionation Technologies for a Lignocellulosic Feedstock Based Biorefinery*. [s.l.] Elsevier. 2016; 315–47.

74. Nakasu PYS. et al. Kinetic Study of the Acid Post-hydrolysis of Xylooligosaccharides from Hydrothermal Pretreatment. *Bioenergy Research*. 12 de dezembro 2017; 10(4):1045–56.
75. Palmqvist E, Hahn-Hagerdal B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology*. 2000; 74(1): 25-33.
76. Phitsuwan P, Sakka K, Ratanakhanokcha, K. Improvement of lignocellulosic biomass in planta: A review of feedstocks, biomass recalcitrance, and strategic manipulation of ideal plants designed for ethanol production and processability. *Biomass and Bioenergy*. 2013; 58: 390-405.
77. Tunc MS, Van Heiningen ARP. Autohydrolysis of mixed southern hard woods: Effect of P-factor. *Nordic Pulp And Paper Reserarch Journal*. 2009; 24(1):42-7.
78. Liu J, Li M, Luo X, Chen L, Huang L. Effect of hot-water extraction (HWE) severity on bleached pulp based biorefinery performance of eucalyptus during the HWE–Kraft–ECF bleaching process. *Bioresource Technology*. 2015; 181: 183–90.
79. Öhgren K, Bura R, Saddler J, Zacchi G. Effect of hemicellulose and lignin removal on enzymatic hydrolysis of steam pretreated corn stover. *Bioresource Technology*. 2007; 98: 2503-10.
80. Balat, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy Conversion and Management*. 2011; 52: 858–75.

81. Quilhó LFTL. Produção de Bioetanol a partir de Materiais Lenhocelulósicos de Sorgo Sacarino [dissertação]. Lisboa (Portugal): Faculdade de Ciência e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa; 2011.
82. Sun SN, Cao XF, Sun SL, Xu F, Song XL, Jones GL. Improving the enzymatic hydrolysis of thermo-mechanical fiber from *Eucalyptus urophylla* by a combination of hydrothermal pretreatment and alkali fractionation. *Biotechnol Biofuels*. 2014; 7: 116.
83. Rabelo SC. Avaliação e otimização de pré-tratamentos e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para produção de etanol de segunda geração [tese]. Campinas (SP): Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas. 2010.
84. Carvalho ML. et al. Kinetic study of the enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 2013; 30(3):437-47.
85. Pratto B, De Souza RB, Sousa RJR, Da Cruz AJ. Enzymatic Hydrolysis of Pretreated Sugarcane Straw: Kinetic Study and Semi-Mechanistic Modeling. *Appl Biochem Biotechnol*. 2016; 178(7): 1430-44.
86. Chang VS, Holtzaple MT. Fundamental Factors Affecting Biomass Enzymatic Reactivity. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2000; 84–86(1–9): 5–38.
87. Ramos LP. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. *Química nova*. 2003; 26(6): 863-71.

88. Hamelinck, CN.; Hooijdonk, GV.; Faaij, APC. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and longterm. *Biomass and Bioenergy*. 2005; 28: 384-410.
89. Kristensen JB, Felby C, Jorgensen H. Yield-determining factors in high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Biotechnol Biofuels*. 2009; 2: 11.
90. Henning Jørgensen JBK, CF. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. *Biofuels, Bioprod Biorefining*. 2007; 1: 119–34.
91. Brienzo M, Siqueira AF, Milagres AMF. Search for optimum conditions of sugarcane bagasse hemicellulose extraction. *Biochemical Engineering Journal*. 2009; 46: 199-204.
92. Lynd LR. et al. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2002; 66(3): 506-77.
93. Kumar D, Murthy GS. Stochastic molecular model of enzymatic hydrolysis of cellulose for ethanol production. *Biotechnol Biofuels* [Internet]. 2013. [dez. 2018]; 6:63. Available from: <http://www.biotechnologyforbiofuels.com/content/6/1/63>
94. Sun Y, Cheng J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*. 2002; 83: 1-11.
95. Martins LF, Kolling D, Camassola M, Dillon AJP, Ramos LP. Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their activity against various cellulosic

- substrates. *Bioresour Technol.* 2008; 99(5): 1417–24.
96. Kumagai Y, Okuyama M, Kimura A. Heat treatment of curdlan enhances the enzymatic production of biologically active-(1,3)-glucan oligosaccharides. *Carbohydrate Polymers.* 2016; 146: 396-401.
97. Cho HJ, Jang WJ, Moon SY, Lee JM, Kim JH, Han HS, et al. Immobilization of  $\beta$ -1,3-1,4-glucanase from *Bacillus* sp. on porous silica for production of  $\beta$ -glucooligosaccharides. *Enzyme and Microbial Technology.* 2018; 110: 30-37.
98. Onishi N, Kira I, Yokozeki K. Galactooligosaccharide production from lactose by *Sirobasidium magnum* CBS6803. *Letters in Applied Microbiology.* 1996; 23: 253-6.
99. Crittenden RG, Playne MJ. Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. *Trends in Food Science and Technology.* 1996; 7: 353-61.
100. Moure A, Gullón P, Domínguez H, Parajó J.C. Advances in the manufacture, purification and applications of xylo-oligosaccharides as food additives and nutraceuticals. *Process Biochemistry.* 2006; 41: 1913–23.
101. Wang D, Kim DH, Yoon JJ, Kim KH. Production of high-value -1,3-glucooligosaccharides by microwave-assisted hydrothermal hydrolysis of curdlan. *Process Biochemistry.* Elsevier, 2017; 52: 233–7.
102. Carvalheiro F, Esteves MP, Parajó JC, Pereira H, Gírio FM. Production of oligosaccharides by autohydrolysis of brewery's spent grain. *Bioresource Technology.* 2004; 91: 93–100.



103. Nabarlatz D, Farriol X, Montané D. Kinetic modeling of the autohydrolysis of lignocellulosic biomass for the production of hemicellulose-derived oligosaccharides. *Industrial Engineering Chemistry Research*. 2004; 43: 4124-31.
104. Ferraz A, Baeza J, Rodriguez J, Freer J. Estimating the chemical composition of biodegraded pine and eucalyptus wood by DRIFT spectroscopy and multivariate analysis. *Bioresource Technol.* 2000; 74: 201-12.
105. Masarin F, Gurpilhares DB, Baffa DCF, Barbosa MHP, Carvalho W, Ferraz A. Chemical composition and enzymatic digestibility of sugarcane clones selected for varied lignin content. *Biotechnology for Biofuels.* 2011; 4: 55.
106. Brienzo M, Carvalho W, Milagres AMF. Xylooligosaccharides Production from Alkali-Pretreated Sugarcane Bagasse Using Xylanases from *Thermoascus aurantiacus*. *Appl Biochem Biotechnol.* 2010; 162: 1195-205.
107. Rajagopalan G, Shanmugavelu K, Yang KL. Production of prebiotic-xylooligosaccharides from alkali pretreated mahogany and mango wood sawdust by using purified xylanase of *Clostridium* strain BOH3. *Carbohydrate Polymers.* 2017; 167: 158-66.
108. Puchart V, Lucia Franová L, Mørkeberg Krogh KBR, Hoff T, Biely P. Action of different types of endoxylanases on eucalyptus xylan in situ. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 2018; 102: 1725-36.

109. Sukri SSMS, Sakinah AMM. Production of High Commercial Value Xylooligosaccharides from *Meranti* Wood Sawdust Using Immobilised Xylanase. *Appl Biochem Biotechnol*. 2018; 184: 278-90.
110. Jönsson LJ, Alriksson B, Nilvebrant NO. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. *Biotechnology for Biofuels*. 2013; 6:16.
111. Duarte GV, Ramarao BV, Amidon TE, Ferreira PT. Effect of hot water extraction on hardwood kraft pulp fibers (*Acer saccharum*, sugar maple). *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 2011; 50: 9949-59.
112. Santos VTO, Siqueira G, Milagres AMF, Ferraz A. Role of hemicellulose removal during dilute acid pretreatment on the cellulose accessibility and enzymatic hydrolysis of compositionally diverse sugarcane hybrids. *Industrial Crops & Products*. 2018; 111: 722-30.
113. Park S, Baker JO, Himmel ME, Parilla PA, Johnson DK. Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance. *Biotechnology for Biofuels*. 2010; 3(10): 1-10.
114. Terinte N, Ibbett R, Schuster KC. Overview on native cellulose and microcrystalline cellulose I structure studied by X-ray diffraction (WAXD): comparison between measurement techniques. *Lenzinger Berichte*. 2011; 89: 118-31.
115. Sun Y, Lin L, Deng H, Li J, He B, Sun R. Structural changes of bamboo cellulose in formic acid. *BioResources*. 2008; 3(2): 297-315.

116. Tanaka, M.; Taniguchi, M.; Matsuno, R.; Kamikubo, T. Purification and Properties of Cellulases from *Eupencillium javanicum*: Studies on the Re-123 utilization of Cellulosic Resources(VII). *J Ferment Technol* [Internet]. The Society for Biotechnology. 1981; 59(3):177–83. Available from: <http://ci.nii.ac.jp/naid/110002672575/en/>
117. Miller GL. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal Chem*. 1959; 31(3): 426–8.
118. Yu EKC, Tan LUL, Chan MKH, Deschatelets L, Saddler JN. Production of thermostable xylanase by a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*. *Enzyme Microb Technol*. 1987; 9(1):16–24.
119. Parajó JC, Garrote G, Cruz JM, Dominguez H. Production of xylooligosaccharides by autohydrolysis of lignocellulosic materials. *Trends in Food Science & Technology*. 2004;15: 115-20.
120. Vena APF, García-Aparicio MP, Brienzo M, Görgens JF, Rypstra T. Effect of Alkaline Hemicellulose Extraction on Kraft Pulp Fibers from *Eucalyptus Grandis*. *Journal of Wood Chemistry and Technology*. Stellenbosch, South Africa. 2013; 157-73.
121. Neto FSPP, Lucca EA, Masarin F. Particle Size Influence on the Chemical Composition from Waste *Eucalyptus* in the Processing for Industrial Production of Cellulose Pulp. *Chemical Engineering Transactions*. 2016; 50: 337-42.
122. Sluiter JB, Ruiz RO, Scarlata CJ, Sluiter AD, Templeton DW. Compositional analysis of lignocellulosic feedstocks. 1. Review and description of methods. *J Agric Food Chem*. 2010; 58: 9043-53.

123. Sluiter A, Hames B, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter J, Templeton D. Determination of ash in biomass: Laboratory Analytical Procedure (LAP). Nrel/Tp-510-42622 [Internet]. 2008;(April 2005):18. Available from: <http://www.nrel.gov/docs/gen/fy08/42622.pdf>
124. Cruz Filho IJ. Separação dos principais componentes do cavaco de eucalipto, hidrólise enzimática da celulose e caracterização das frações obtidas. [dissertação]. Pernambuco (CE): Universidade Federal de Pernambuco, Ufpe; 2016
125. Kim DS. et al. Evaluation of hot compressed water pretreatment and enzymatic saccharification of tulip tree sawdust using severity factors. *Bioresource Technology*. 2013;144: 460-6.
126. Yu Q, Zhuang X, Yuan Z, Wang Q, Qi W, Wang W. et al. Two-step liquid hot water pretreatment of *Eucalyptus grandis* to enhance sugar recovery and enzymatic digestibility of cellulose. *Bioresource Technology*. 2010; 101(13): 4895-99.
127. Calado V, Montgomery DC. Planejamento de experimentos usando *Statistica*. E-Papers Serviços Editoriais. 2003; 260.
128. Vasconcelos SM, Santos AMP, Rocha GJM, Souto-Maior AM. Diluted phosphoric acid pretreatment for production of fermentable sugars in a sugarcane-based biorefinery. *Bioresourcer technology*. 2013; 135: 46-52.
129. Bobleter O. Hydrothermal degradation of polymers derived from plants. *Progress in Polymer Science*. 1994; 19: 797-841.

130. Junior DL, Colodette JL. Remoção de hemiceluloses da madeira por tratamento de auto-hidrólise. Wood cellulose removal by means of self-hydrolysis treatment. *Ciência Florestal*. 2011; 21(3): 541-50.
131. Xiao LP, Lin Z, Peng WX, Yuan TQ, Xu F, Li NC. et al. Unraveling the structural characteristics of lignin in hydrothermal pretreated fibers and manufactured binderless boards from *Eucalyptus grandis*. *Sustainable Chemical Processes*. 2014; 2: 9-21.
132. Testova L, Chong SL, Tenkanen M, Sixta H. Autohydrolysis of birch wood *Holzforschung*. 2011; 65: 535–42.
133. Yan J, Liu S. Hot Water Pretreatment of Boreal Aspen Woodchips in a Pilot Scale Digester. *Energies*. 2015; 8 (2):1166-80.
134. Tunc MS, Van Heiningen ARP. Hydrothermal dissolution of mixed southern hardwoods. *Holzforschung*. 2008; 62: 539–45.
135. Lima MA, Lavorente GB, Da Silva HK, Bragatto J, Rezende CA, Bernardinelli OD. et al. Effects of pretreatment on morphology, chemical composition and enzymatic digestibility of eucalyptus bark: a potentially valuable source of fermentable sugars for biofuel production - part 1. *Biotechnol Biofuels*. 2013; 6(1): 75.
136. Assumpção SMN, Pontes PAM, De Carvalho LS, Campos LMA, De Andrade JCF, DA SILVA EG. Pré-tratamento combinado H<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/NaOH para obtenção das frações lignocelulósicas do bagaço de cana-de-açúcar. *Rev. Virtual Quim*. 2016; 8 (3): 803-22.
137. Rezende CA, Lima MA, Maziero P, Azevedo ER, Garcia W, Polikarpov I. Chemical and morphological characterization of sugarcane bagasse

- submitted to a delignification process for enhanced enzymatic digestibility. *Biotechnology for Biofuels*. 2011; 4(54): 1-18.
138. 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. 1986; 29-50.
139. Xiao LP, Sun ZJ, Shi ZJ, Xu F, Sun RC. Effects of pretreatment on morphology, chemical composition and enzymatic digestibility of eucalyptus bark: a potentially valuable source of fermentable sugars for biofuel production. *Bioresources*. 2011; 6(2): 1576-98.
140. Ass BAP, Belgacem MN, Frollini E. Mercerized linters cellulose: characterization and acetylation in N,N-dimethylacetamide/lithium chloride. *Carbohydrate Polymers*. Science Direct. 2006; 63: 19-29.
141. Martelli FH. Determinação e Caracterização físico-química de biomassas vegetais para obtenção de bioetanol de 2ª geração. [dissertação]. São Carlos (SP). Instituto de Química de São Carlos-USP; 2014.
142. Meng LY, Kang SM, Zhang XM, Wu YY, Xu F, Sun RC. Fractional pretreatment of hybrid poplar for accelerated enzymatic hydrolysis: Characterization of cellulose-enriched fraction. *Bioresource Technology*. 2012; 110: 308-13.
143. 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*. 2013; 104: 801-09.

144. Webber V. Extração e caracterização de carragenana obtida de *Kappaphycus alvarezii*. Dissertação de Mestrado em Ciência de Alimentos. Florianópolis (SC): Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC; 2010.
145. Poletto M, Pistor V, Zattera AJ. Structural characteristics and thermal properties of native cellulose. In: VEN, T. V.; Godbout, L. (Ed.). Cellulose: fundamental aspects. Rijeka (Croácia): In Tech, 2013; 2: 45-68.
146. Martin S. Catálise heterogênea. Rio de Janeiro: Synergia, 2011; 376.
147. Irfan M, Syed Q, Abbas S, Gulsher M, Baig S, Nadeem M. FTIR and SEM analysis of thermo-chemical fractionated of sugarcane bagasse. Turk Journal Biochemistry. 2011; 36(4): 322-8.
148. Rosa MF, Medeiros ES, Malmonge JÁ, Gregorski KS, Wood DF, Mattoso LHC. et al. Cellulose nanowhiskers from coconut husk fibers: effect of preparation conditions on their thermal and morphological behavior. Carbohydrate Polymers. 2010; 81: 83-92.
149. Sun JX, Sun XF, Zhao H, Sun RC. Isolation and characterization of cellulose from sugarcane bagasse. Polymer Degradation and Stability. 2004b; 84: 331-9.
150. Liu X.-Y, Wang Q, Cui SW, Liu H.-Z. A new isolation method of  $\beta$ -D-glucans from spent yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Food Hydrocolloids. Oxford. 2006; 22(2): 239-47. doi:10.1016/j.foodhyd.2006.11.008.

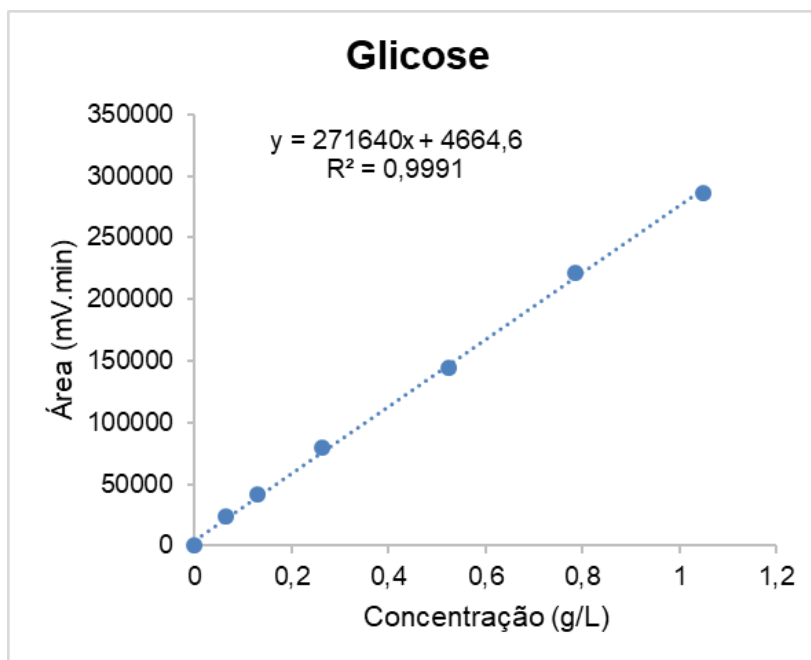
151. Chen M, Bowman MJ, Dien BS, Rausch KD, Tumbleson M E, Singh V. Bioresource Technology Autohydrolysis of *Miscanthus x giganteus* for the production of xylooligosaccharides (XOS): Kinetics, characterization and recovery. *Bioresour Technol.* 2014; 155: 359–65.
152. Lionetto F, Del Sole R, Cannoletta D, Vasapollo G, Maffezzoli A. Monitoring wood degradation during weathering by cellulose crystallinity. *Materials.* 2012; 5(10): 1910-22.
153. Mendes MF. et al. Enzymatic Digestion of Alkaline-Sulfite Pretreated Sugar Cane Bagasse and Its Correlation with the Chemical and Structural Changes Occurring During the Pretreatment Step. *Biotechnology Progress.* 2013; 29(4).
154. Binod P, Janu KU, Sindhu R, Pandey A. Hydrolysis of lignocellulosic biomass for bioethanol production. *Biofuels: alternative feedstocks and conversion processes.* 2011; 229-50.
155. Chu Q, Li X, Xu Y, Wang Z, Huang J, Yu S, et al. Functional cello-oligosaccharides production from the corncob residues of xilo-oligosaccharides manufacture. *Process Biochemistry.* 2014; 49, 1217-22.



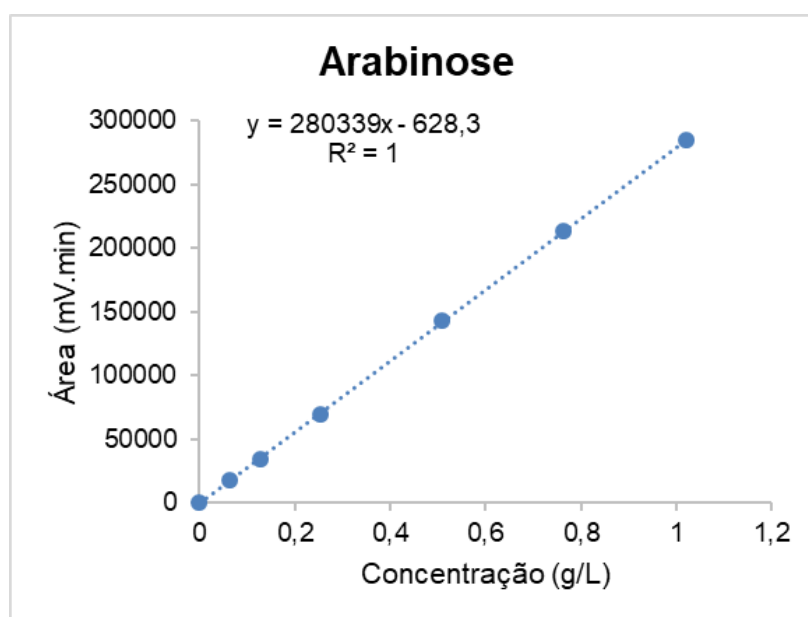
## LISTA DE APÊNDICES

**APÊNDICE I:** Curvas Analíticas para determinação de celulose e hemicelulose.

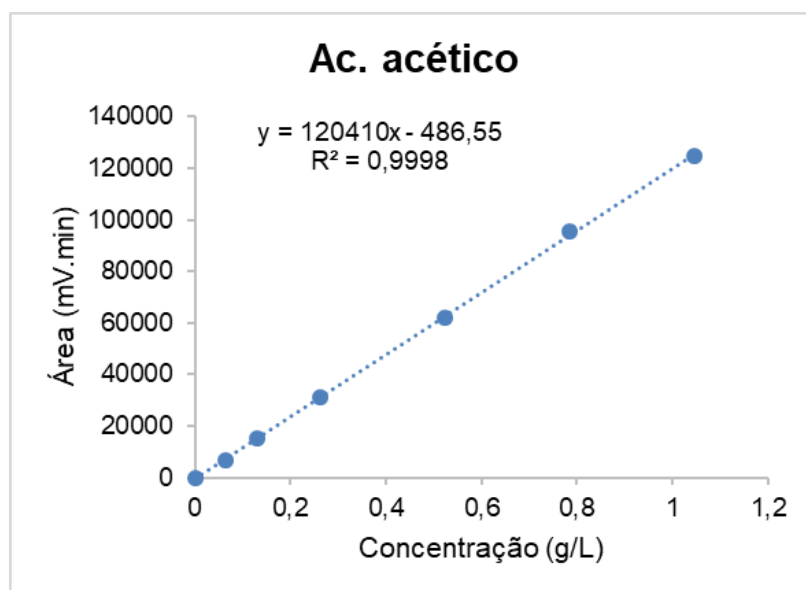
**Figura I.1:** Curva analítica para determinação de glicose.



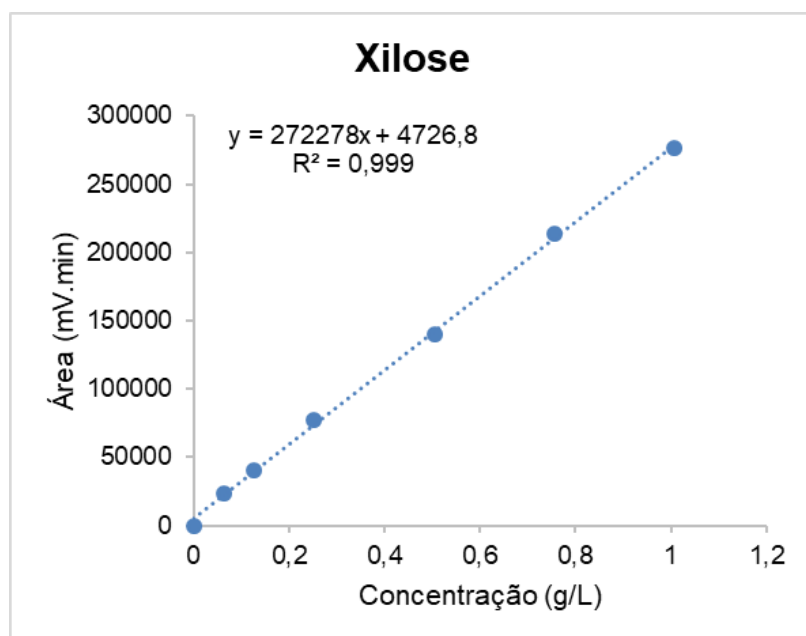
**Figura I.2:** Curva analítica para determinação de arabinose.



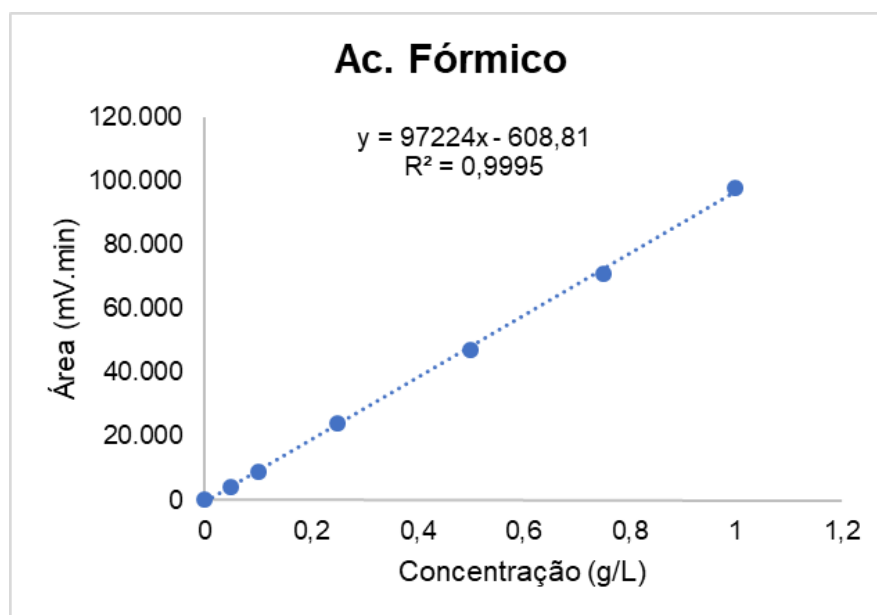
**Figura I.3:** Curva analítica para determinação de ácido acético.



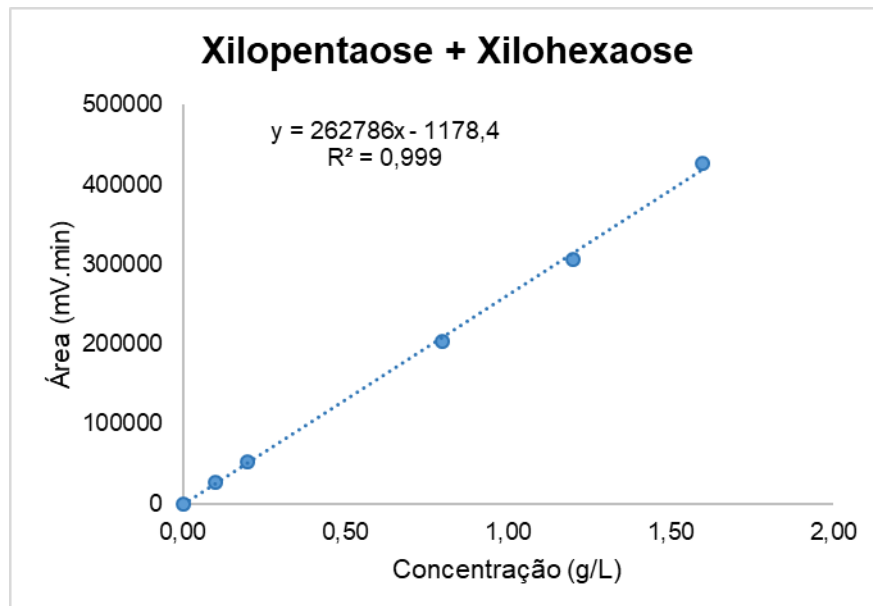
**Figura I.4:** Curva analítica para determinação de xilose.

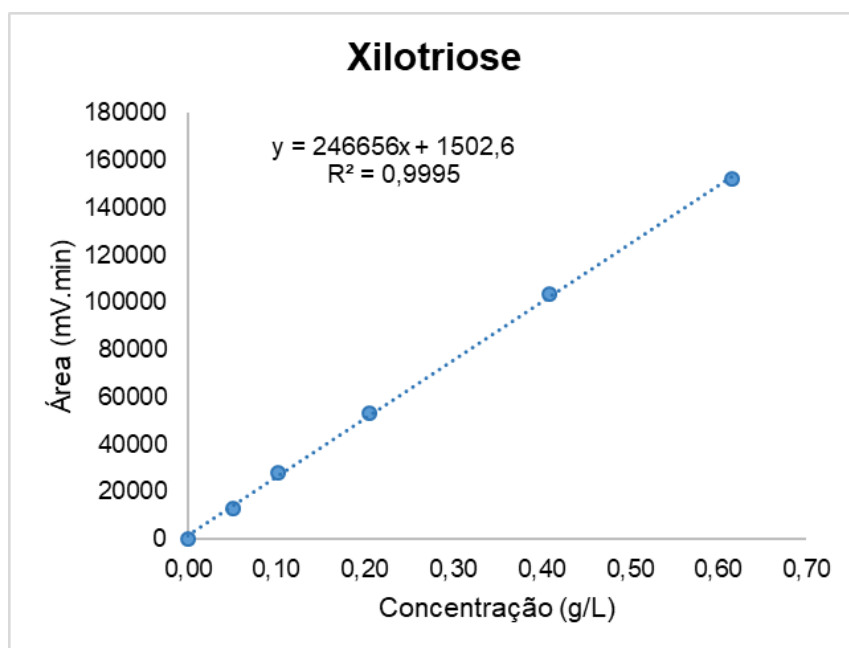
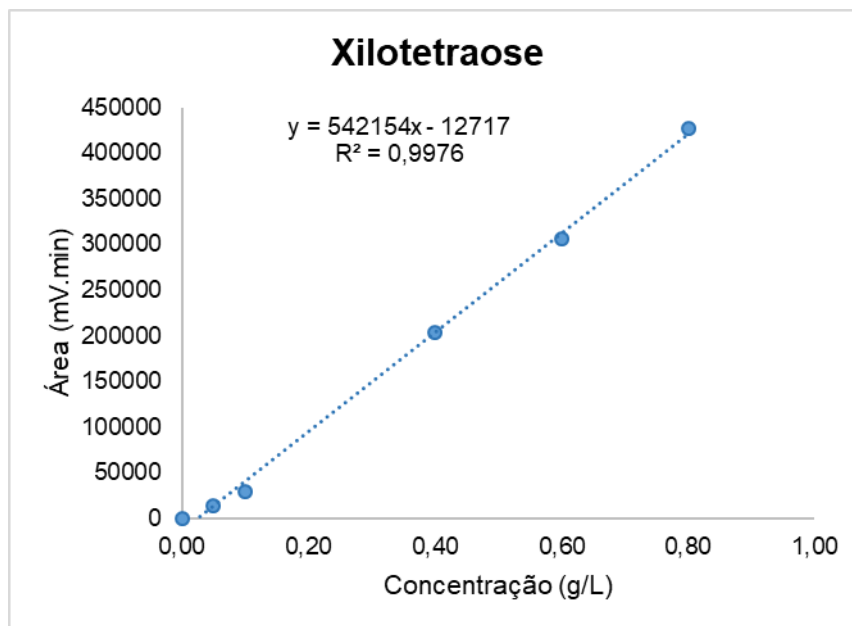


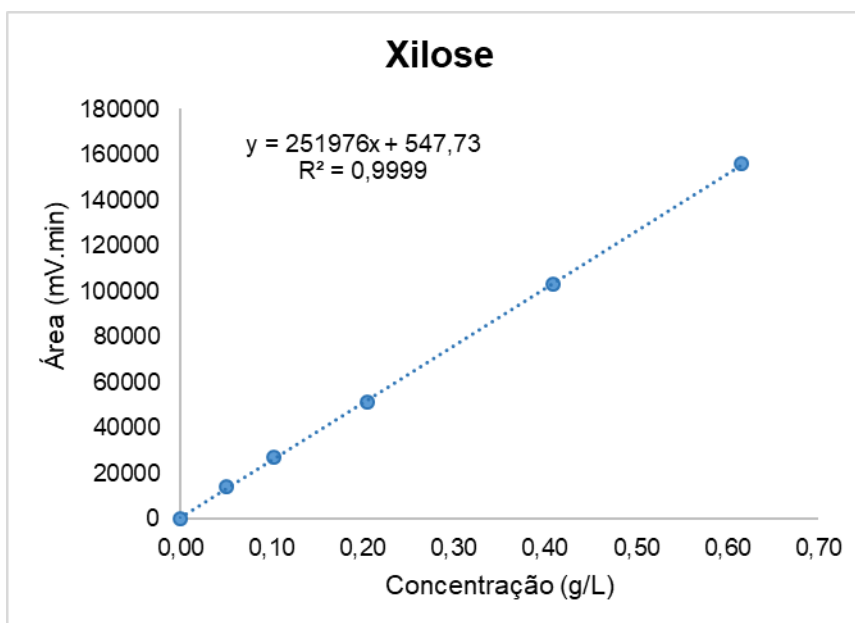
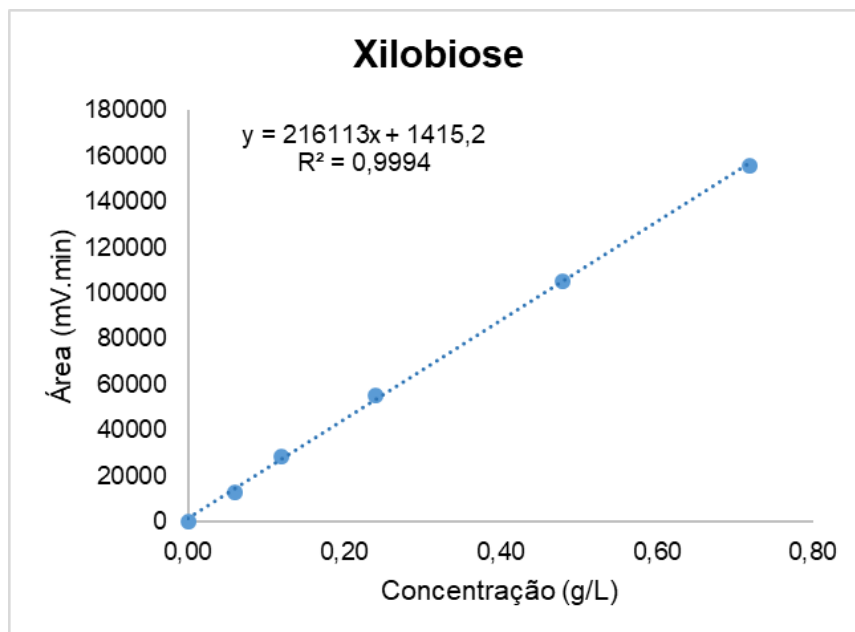
**Figura I.5:** Curva analítica para determinação de ácido fórmico.

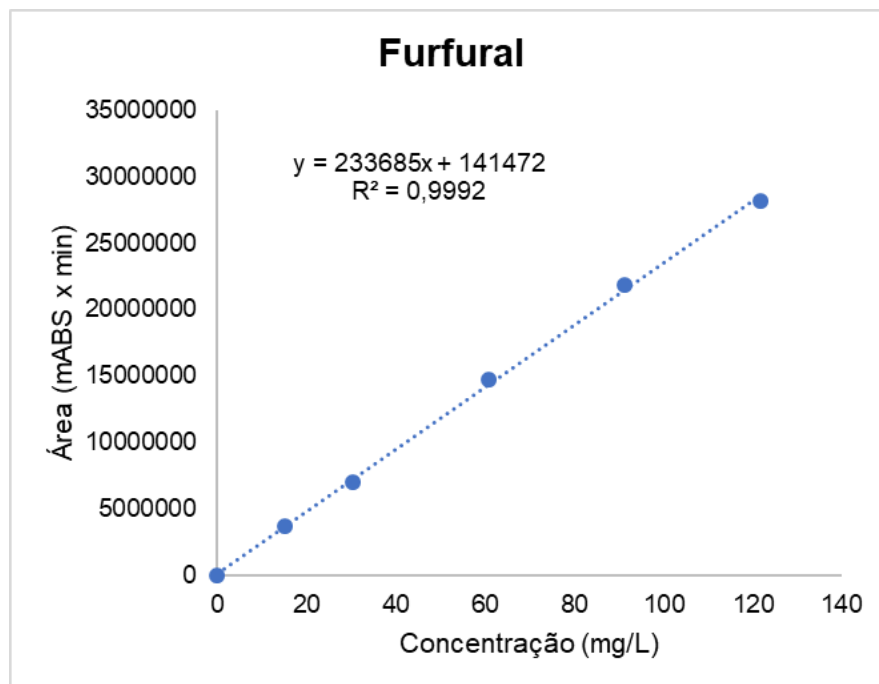
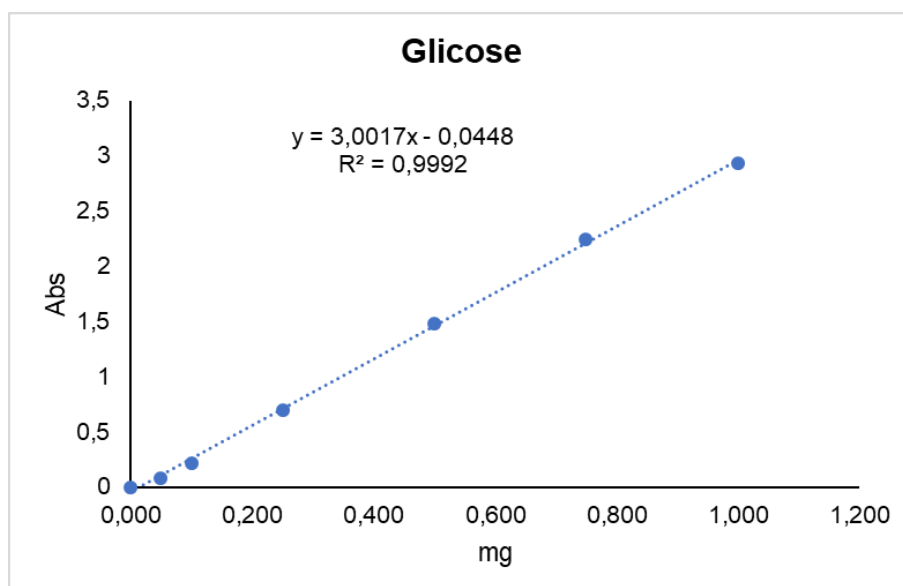


**APÊNDICE II:** Curvas analíticas para determinação de xilo-oligossacarídeos (XOS) e xilose.

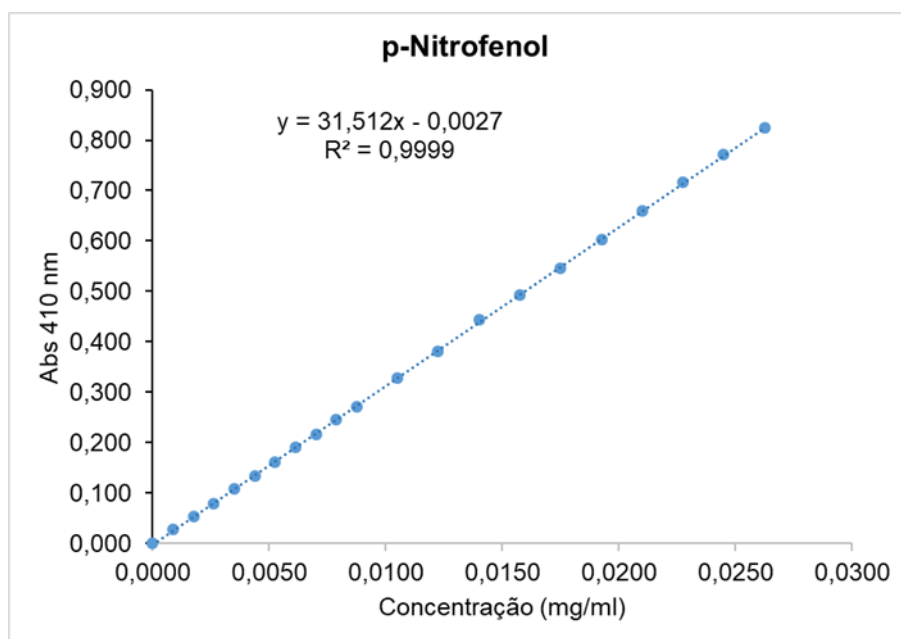




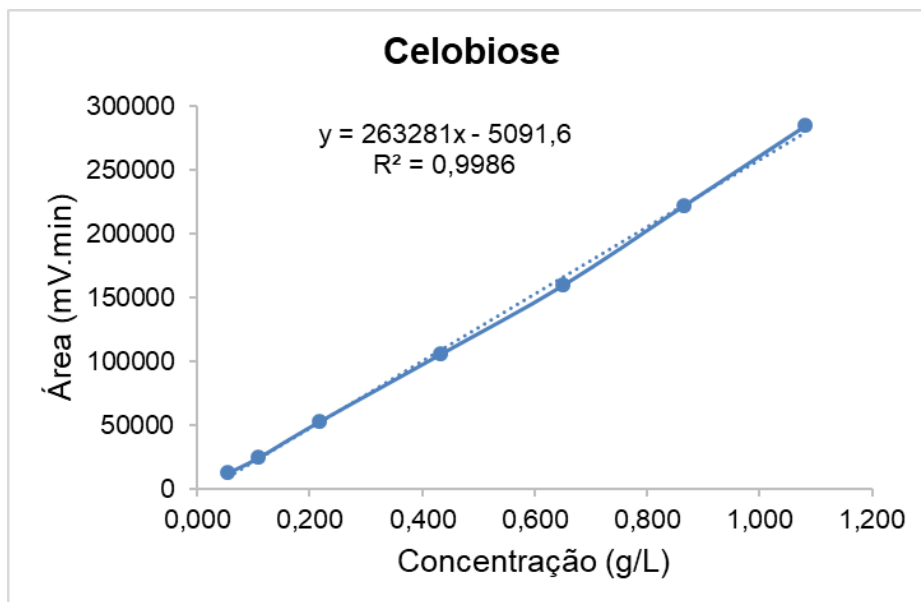


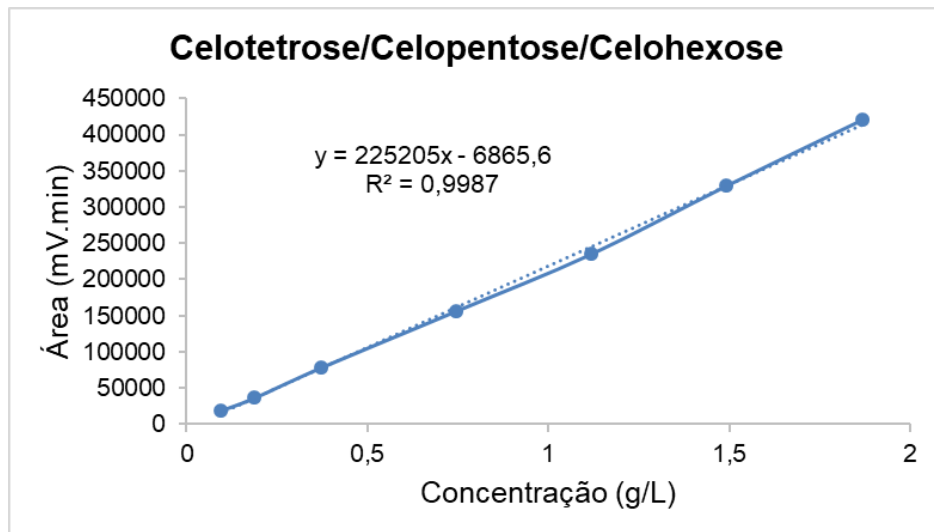
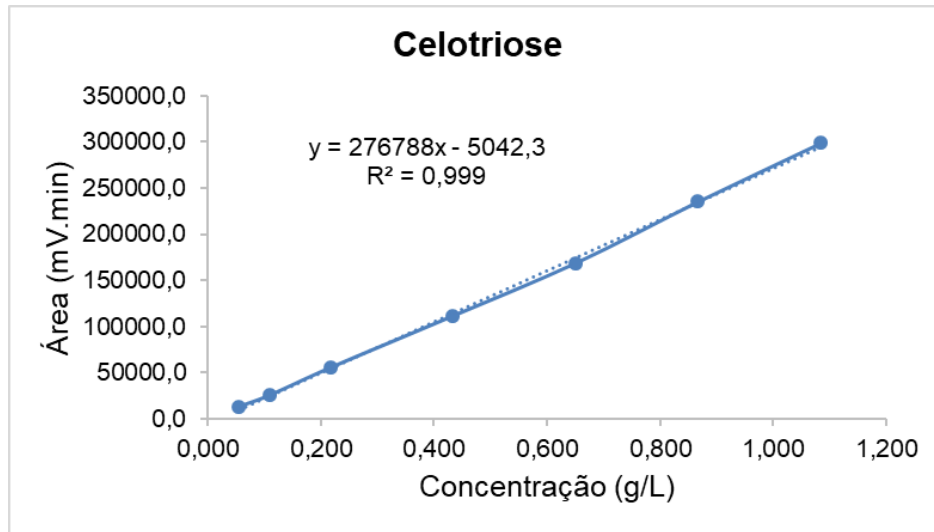
**APÊNDICE III:** Curva analítica para determinação de furfural.**APÊNDICE IV:** Curva analítica de glicose com DNS, utilizada para determinação de atividades de endoglucanases e exoglucanases.

**APÊNDICE V:** Curva analítica do padrão *p*-Nitrofenol para determinação de atividade de  $\beta$ -glicosidases.

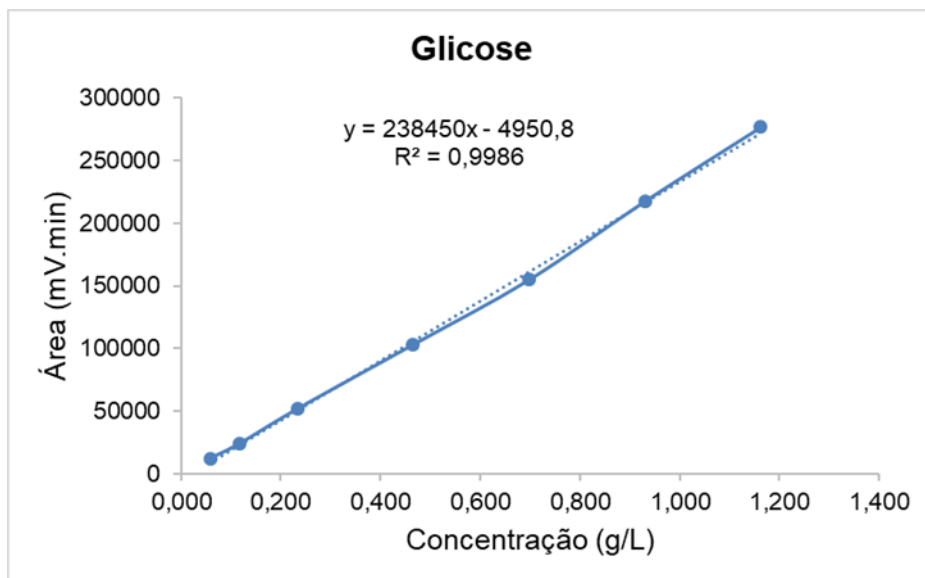


**APÊNDICE VI:** Curvas Analíticas para determinação de gluco-oligosacarídeos (COS) e glicose.

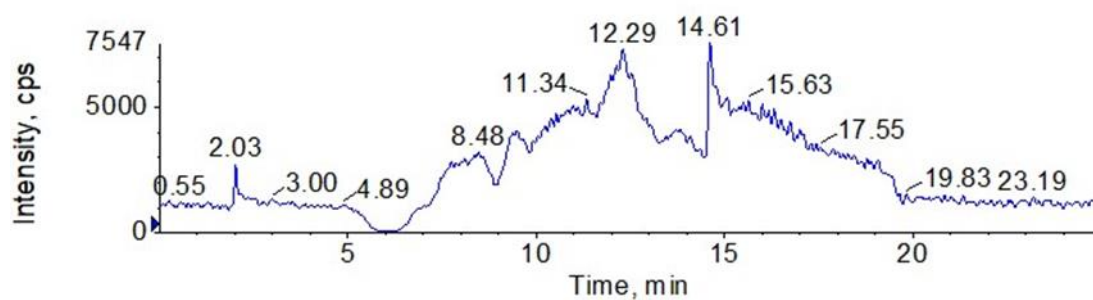




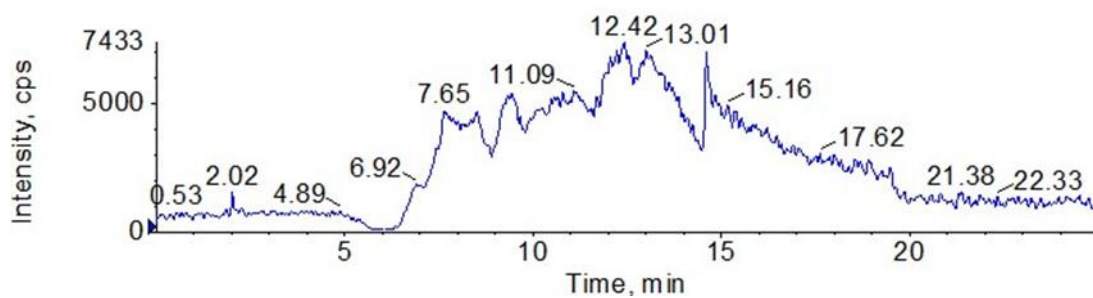




**APÊNDICE VII:** Cromatogramas de íons totais das amostras SO (Figura VII.1) e STE (Figura VII.2).

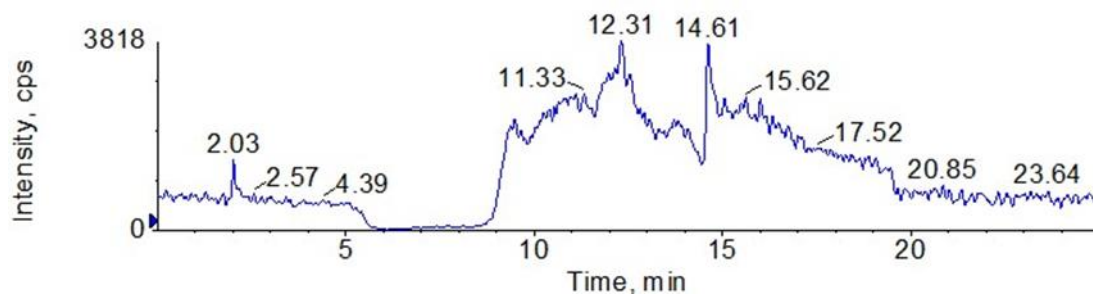


**Figura VII.1:** TIC (Cromatograma de íons totais) da amostra SO.

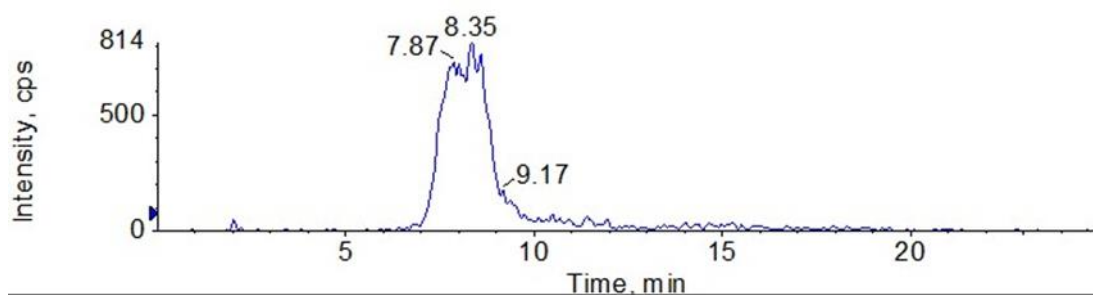


**Figura VII.2:** TIC (Cromatograma de íons totais) da amostra STE.

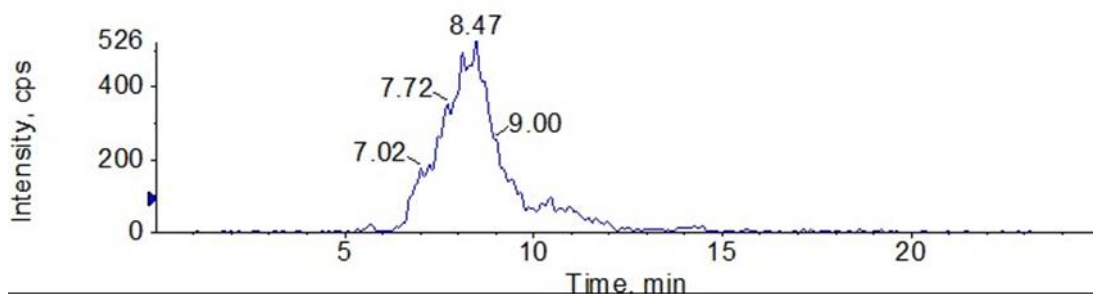
**APÊNDICE VIII:** Cromatogramas de íons extraídos dos subprodutos SO (Figuras VIII.1, VIII.2, VIII.3, VIII.4 e VIII.5) e do STE (Figuras VIII.6, VIII.7, VIII.8, VIII.9 e VIII.10).



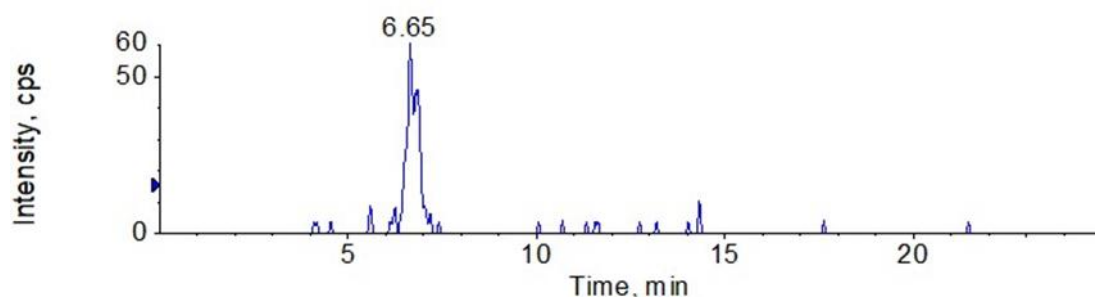
**Figura VIII.1:** XIC (Cromatograma de íons extraído) Xilose SO.



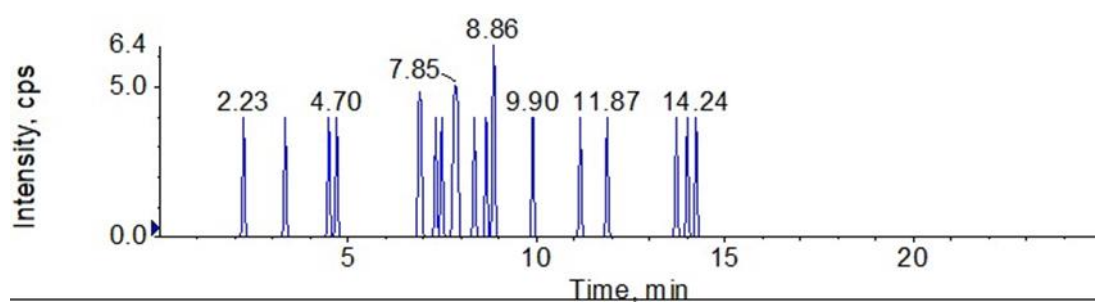
**Figura VIII.2:** XIC (Cromatograma de íons extraído) Xilobiose SO.



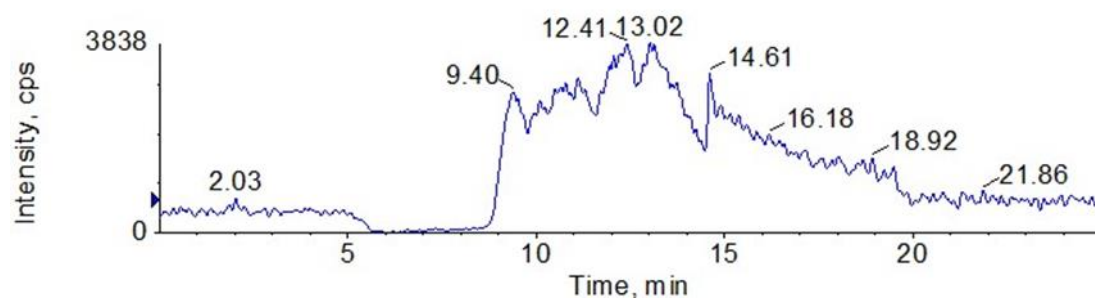
**Figura VIII.3:** XIC (Cromatograma de íons extraído) Xilotriose SO.



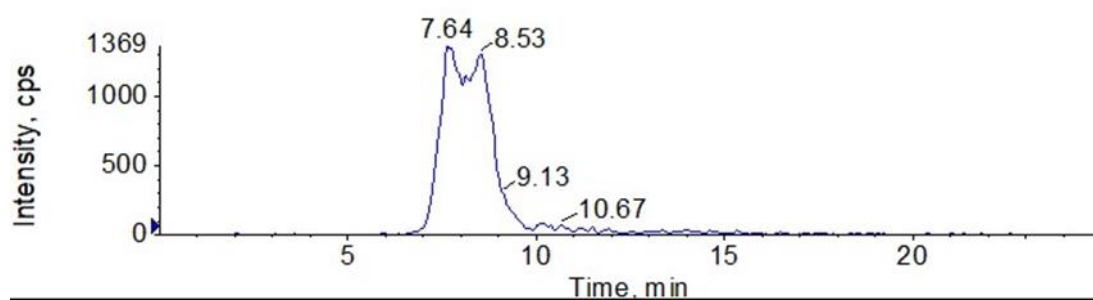
**Figura VIII.4:** XIC (Cromatograma de íons extraído) Xilotetraose SO.



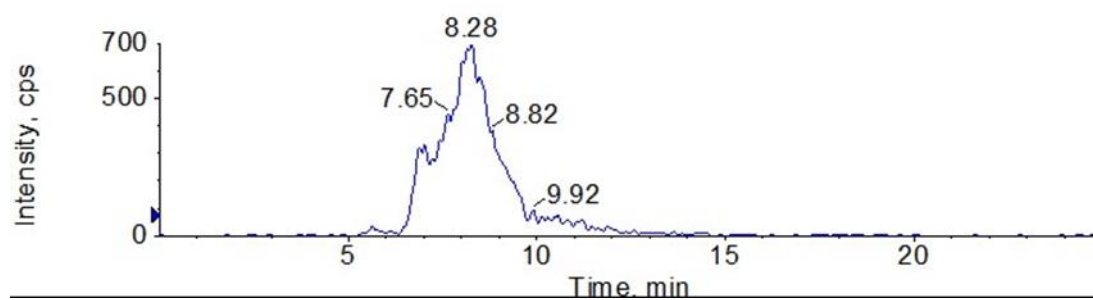
**Figura VIII.5:** XIC (Cromatograma de íons extraído) Xilopentaose SO.



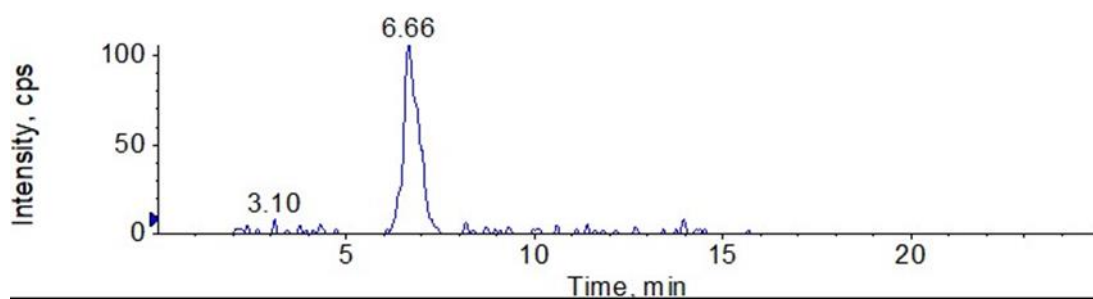
**Figura VIII.6:** XIC (Cromatograma de íons extraído) Xilose STE.



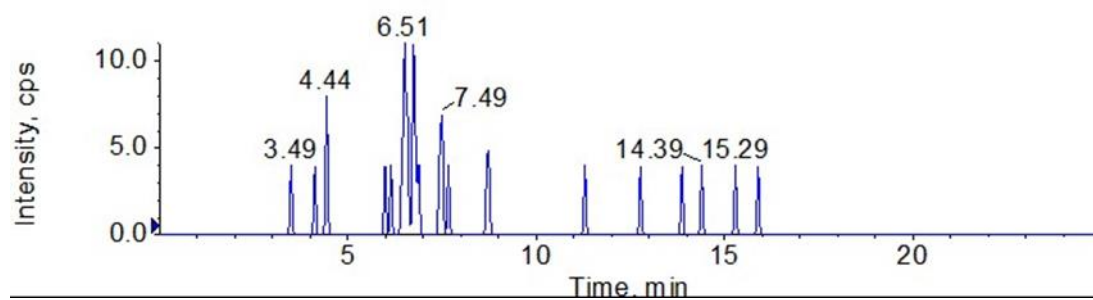
**Figura VIII.7:** XIC (Cromatograma de íons extraído) Xilobiose STE.



**Figura VIII.8:** XIC (Cromatograma de íons extraído) Xilotriose STE.



**Figura VIII.9:** XIC (Cromatograma de íons extraído) Xilotetraose STE.



**Figura VIII.10:** XIC (Cromatograma de íons extraído) Xilopentaose STE