



Universidade Estadual Paulista

“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição



**Avaliação da extração de hemicelulose e da produção de
xilooligossacarídeos a partir de um subproduto de
Eucalyptus oriundo de uma
empresa de celulose**

Thamyres Del Torto Mafei

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

Área de concentração: Ciência dos Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Fernando Masarin

Araraquara

2017

Thamyres Del Torto Mafei

**Avaliação da extração de hemicelulose e da produção
de xilooligossacarídeos a partir de um subproduto de
Eucalyptus oriundo de uma empresa de celulose**

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

Área de concentração: Ciência dos
Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Fernando Masarin

Araraquara

2017



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: AVALIAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE HEMICELULOSE E DA PRODUÇÃO DE XILOOLIGOSSACARÍDEOS A PARTIR DE UM SUBPRODUTO DE Eucalyptus ORIUNDO DE UMA EMPRESA DE CELULOSE

AUTORA: THAMYRES DEL TORTO MAFEI

ORIENTADOR: FERNANDO MASARIN

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em ALIMENTOS E NUTRIÇÃO, área: CIÊNCIA DOS ALIMENTOS pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. FERNANDO MASARIN

Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP

Prof. Dr. MICHEL BRIENZO

Laboratório de Caracterização de Biomassa / IPBEN - Instituto de Pesquisa em Bioenergia
(membro participante por meio de videoconferência)

Prof. Dr. GUILHERME PEIXOTO

Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP

Araraquara, 23 de novembro de 2017

Dedico esse trabalho:

Aos meus pais;

Ao meu namorado;

Aos meus amigos

Pela paciência, carinho e incentivo

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por me dar força durante esses dois anos de mestrado; aos meu pais Nilton e Elisabete, pelo amor incondicional, suporte emocional, ensinamentos e motivação para concretizar meus sonhos.

Ao meu namorado Renan, por ser um grande amigo, pelo amor, cumplicidade e paciência.

Ao meu orientador Fernando Masarin, pela oportunidade, orientação e ensinamentos que contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional.

Aos amigos de laboratório e de mestrado em especial: Elen, Flávia, Ana Carolina Pires, Leticia, Eddyn, Fernando Paz, Natalia e Juliana Basan.

Aos técnicos, Flávio, Matheus, Adriana, Daniela e Ana Nasser pela ajuda e importante suporte prestados.

Ao programa de pós-graduação em Alimentos e Nutrição, a Faculdade de Ciências Farmacêuticas-UNESP e a CAPES, pelo apoio estrutural e financeiro.

A todos aqueles que contribuíram de alguma forma para realização deste trabalho.

“Eu guardei muitas coisas em minhas mãos, e perdi todas. Mas todas que coloquei nas mãos de Deus, essas eu ainda possuo.”

Martin Luther King Jr.

RESUMO

A madeira de *Eucalyptus* é aplicada principalmente na cogeração de energia, na alimentação animal, na produção de carvão vegetal e na produção de celulose. Um subproduto de *Eucalyptus* gerado em fábricas de celulose é utilizado principalmente para cogeração de energia, porém o mesmo apresenta um grande potencial a ser estudado, pois tem um elevado teor de celulose e hemicelulose. Uma alternativa é a produção de xilooligossacarídeos (XOS) a partir do subproduto de *Eucalyptus*. Os XOS são responsáveis por diversos efeitos benéficos como a prevenção de cáries, a diminuição de níveis séricos de colesterol e o estímulo do crescimento de bifidobactérias no trato gastrointestinal. **Objetivo:** O presente trabalho propôs avaliar a produção de XOS via hidrólise enzimática de um subproduto de *Eucalyptus* oriundo de uma empresa de celulose. **Métodos:** A parte experimental envolveu a obtenção de um subproduto de *Eucalyptus* oriundo do processamento de toras de madeira. O subproduto foi moído e extraído com etanol e posteriormente pré-tratado com clorito de sódio. Os subprodutos, extraído (SE) e extraído e pré tratado (SEP), foram submetidos a um processo de extração de hemicelulose. As hemiceluloses, hemicelulose extraído do subproduto extraído-moído (HSE) e hemicelulose extraído do subproduto extraído e pré-tratado (HSEP) e os subprodutos (SE e SEP) foram caracterizados quimicamente em relação aos teores de celulose, hemicelulose e lignina. Além disso, as hemiceluloses obtidas (HSE e HSEP) e os subprodutos (SE e SEP) foram hidrolisados enzimaticamente utilizando os extratos comerciais Cellulase (Sigma), Celluclast (Novozymes) e Xilanases (Verdartis) para avaliar a produção de XOS. **Resultados:** O SE e o SEP apresentaram teores de celulose (45,6% e 43,6%), hemicelulose (17,7% e 16,6%) e lignina (28,5% e 14,6%), respectivamente. O SEP apresentou um teor de lignina cerca de 50% inferior ao SE, o que confirma a eficiência deste pré-tratamento no processo de deslignificação. Além disso, os dados indicaram que o pré-tratamento foi seletivo para remoção da lignina. As HSE e HSEP extraídas apresentaram teores de hemicelulose de 23,7% e 57,1%, respectivamente. A hidrólise enzimática do SE e do SEP culminaram em conversões máximas de xilana em XOS de 8,5% e 16,1%, respectivamente. O SE apresentou uma conversão limitada de xilana em XOS, enquanto o SEP mostrou uma conversão mais intensa. Entretanto, a hidrólise enzimática da HSE e da HSEP mostraram conversões máximas de xilana em XOS de 13,7% e 30,8%, respectivamente. Todavia, a concentração máxima de XOS na hidrólise enzimática da HSE e da HSEP foram de 0,56 g.L⁻¹ e 3,39 g.L⁻¹, respectivamente. A hidrólise enzimática de uma hemicelulose comercial de Birchwood culminou em uma conversão e concentração máxima de XOS de 30% e 3,48 g.L⁻¹, respectivamente. **Conclusão:** A formação de XOS no processo de hidrólise enzimática foi mais eficiente frente à HSEP e a hemicelulose comercial de Birchwood quando comparado a HSE. Todavia, a produção de XOS a partir de HSE pode ser uma estratégia para melhor aproveitamento do subproduto em estudo.

Palavras-chaves: Subproduto de *Eucalyptus*, Pré-tratamento, Composição química, Hemicelulose, Hidrólise enzimática e Xilooligossacarídeos.

ABSTRACT

Eucalyptus wood is mainly applied to energy cogeneration production, animal feed, charcoal production and pulp production. A byproduct of *Eucalyptus* generated in pulp mills is mainly used for energy cogeneration, but it has a great potential to be studied because it has a high content of cellulose and hemicellulose. An alternative is the production of XOS from the *Eucalyptus* byproduct. The XOS are responsible for several beneficial effects such as caries prevention, decreased serum cholesterol levels and stimulation of the growth of bifidobacteria in the gastrointestinal tract. **Objective:** The present work proposed to evaluate the XOS production through enzymatic hydrolysis of a by-product of *Eucalyptus* from a cellulose company. **Methods:** The experimental part involved the obtaining of a by-product of *Eucalyptus* from the processing of wood logs. The by-product was ground and extracted with ethanol and then pretreated with sodium chlorite. The by-products, extracted (SE) and extracted and pre-treated (SEP), were submitted to a hemicellulose extraction process. Hemicelluloses, hemicellulose extracted from the ground-extracted by-product (HSE) and hemicellulose extracted from the pre-treated by-product (HSEP) and by-products (SE and SEP) were chemically characterized in relation to the contents of cellulose, hemicellulose and lignina. In addition, the obtained hemicelluloses (HSE and HSEP) and by-products (SE and SEP) were enzymatically hydrolyzed using the commercial extracts Cellulase (Sigma), Celluclast (Novozymes) and Xylanases (Verdartis) to evaluate to evaluate the production of XOS. **Results:** SE and SEP presented cellulose contents (45.6% and 43.6%), hemicellulose (17.7% and 16.6%) and lignin (28.5% and 14.6%), respectively. The SEP presented a lignin content about 50% lower than the SE, which confirms the efficiency of this pretreatment in the delignification process. In addition, the data indicated that pretreatment was selective for lignin removal. The HSE and HSEP extracted had hemicellulose contents of 23.7% and 57.1%, respectively. The enzymatic hydrolysis of SE and SEP showed maximum conversions of xylan in XOS of 8.5% and 16.1%, respectively. SE showed a limited conversion of xylan to XOS, whereas SEP showed a more intense conversion. However, the enzymatic hydrolysis of HSE and HSEP showed maximum conversions of xylan in XOS of 13.7% and 30.8%, respectively. However, the maximum concentrations of XOS in the enzymatic hydrolysis of HSE and HSEP were 0.56 g.L⁻¹ and 3.39 g.L⁻¹, respectively. Enzymatic hydrolysis of a commercial Birchwood hemicellulose showed conversion and maximum concentration of XOS of 30% and 3.48 g.L⁻¹, respectively. **Conclusion:** The formation of XOS in the enzymatic hydrolysis process was more efficient than HSEP and the commercial hemicellulose of Birchwood when compared to HSE. However, the production of XOS from HSE may be a strategy for better utilization of the by-product under study.

Keywords: *Eucalyptus* byproduct, Pretreatment, Chemical composition, Hemicellulose, Enzymatic hydrolysis and Xylooligosaccharides.

LISTA DE ABREVIACÕES

CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência

DNS: Ácido dinitrossalicílico

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

HSE: hemicelulose extraída do subproduto moído-extraído

HSEP: hemicelulose extraída do subproduto moído-extraído + pré-tratado com clorito de sódio

KOH: hidróxido de potássio

ML: Materiais lignocelulósicos

NaOH: hidróxido de sódio

SBA: soro de albumina bovina

SE: subproduto moído-extraído

SEP: subproduto moído-extraído + pré-tratado com clorito de sódio

SO: subproduto original

SOM: subproduto original moído

XOS: Xilooligossacarídeos

X₁: xilose

X₂: xilobiose

X₃: xilotriose

X₄: xilotetrose

X₅: xilopentose

X₆: xiloheXOSe

XynM: endoxilanases purificada

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais monômeros precursores da celulose e hemicelulose e seus respectivos fatores de conversão.	52
Tabela 2. Rendimento do subproduto pré-tratado com clorito de sódio em diferentes tempos.	63
Tabela 3. Composição química do subproduto de <i>Eucalyptus</i> (não tratada e pré-tratado com clorito de sódio) oriundo do subproduto de <i>Eucalyptus</i> gerado no processamento de cavacos de madeira na indústria de celulose.	66
Tabela 4. Rendimento e composição química da hemicelulose extraída em diferentes condições experimentais oriunda do subproduto moído-extraído (SE) de <i>Eucalyptus</i> gerado no processamento de cavacos de madeira na indústria de celulose.	68
Tabela 5. Composição química da hemicelulose extraída do subproduto (moído-extraído e pré-tratado com clorito de sódio) de <i>Eucalyptus</i> gerado no processamento de cavacos de madeira na indústria de celulose.	73
Tabela 6. Atividades enzimáticas específicas e teores de proteínas dos extratos comerciais.	76
Tabela 7. Conversão de xilana do SE oriundo de <i>Eucalyptus</i> gerado no processamento de cavacos de madeira na indústria de celulose.	82
Tabela 8. Conversão de xilana do SEP oriundo de <i>Eucalyptus</i> gerado no processamento de cavacos de madeira na indústria de celulose	84
Tabela 9. Conversão de xilana em produtos da HSE oriunda de <i>Eucalyptus</i> gerado no processamento de cavacos de madeira na indústria de celulose.	88
Tabela 10. Conversão de xilana em produtos da HSEP oriunda de <i>Eucalyptus</i> gerado no processamento de cavacos de madeira na indústria de celulose.	92
Tabela 11. Conversão de xilana em produtos de hemicelulose comercial de Birchwood	97

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação da estrutura de um fragmento de celulose	19
Figura 2. Estrutura de uma xilana	21
Figura 3. Modelo estrutural da lignina	22
Figura 4. Principais tipos de ligações entre carboidratos e lignina em complexo lignina-carboidrato.....	23
Figura 5. Estrutura geral dos materiais lignocelulósicos	24
Figura 6. Estrutura de uma fibra vegetal	25
Figura 7. Desestruturação do complexo lignocelulósico após etapa de pré-tratamento.....	26
Figura 8. Sequência de reações de degradação de lignina em meio alcalino	32
Figura 9. Degradação da molécula de xilana pelas principais hemicelulases	37
Figura 10. Fluxograma geral das etapas desenvolvidas com o “subproduto” gerado no processo de produção de celulose	42
Figura 11. Subproduto oriundo do processamento da indústria de celulose	57
Figura 12. Cromatograma de padrões autênticos de glicose, xilose, arabinose e ácido acético obtidos com a coluna cromatográfica HPX-87H.....	58
Figura 13. Cromatograma do hidrolisado ácido da fração do subproduto em estudo	60
Figura 14. Subproduto oriundo do processamento da indústria de celulose após pré-tratamento com clorito de sódio por 120 min	61
Figura 15. Hemicelulose extraída com H ₂ O ₂ 6% (massa/volume) por 12h .	71
Figura 16. Cromatograma de padrões autênticos de xilopentose e xilohexose, xilotetraose, xilotriose, xilobiose, xilose	77
Figura 17. Cromatograma obtido da análise dos produtos da hidrólise enzimática da HSEP com extrato enzimático Celluclast (Novozymes)	78
Figura 18. Hidrólise enzimática da HSE	98
Figura 19. Hidrólise enzimática da HSEP	99
Figura 20. Hidrólise enzimática de hemicelulose comercial de Birchwood	101

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1. Rendimento do pré-tratamento com clorito de sódio	45
Equação 2. Rendimento do processo de extração da hemicelulose	46
Equação 3. Teor de extrativos do subproduto não tratado	47
Equação 4. Teor de cinzas do subproduto não tratado e tratado	49
Equação 5. Teor de lignina insolúvel presente nos subprodutos	50
Equação 6. Teor de lignina solúvel presente nos subprodutos	50
Equação 7. Teor de lignina total presente nos subprodutos	51
Equação 8. Teor dos componentes presentes nos subprodutos	52
Equação 9. Conversão dos xilooligossacarídeos após hidrólise enzimática	57

Sumário

1. Introdução.....	15
2. Revisão Bibliográfica	17
2.1 Materiais lignocelulósicos: Estrutura e composição química	17
2.2 Pré-tratamentos químicos em matérias lignocelulósicos	25
2.2.1 Pré-tratamento com clorito de sódio	27
2.3 Extração de hemicelulose de materiais lignocelulósicos	28
2.3.1 Processo alcalino.....	28
2.3.2 Processo alcalino oxidativo	29
2.4 Enzimas que catalisam o polissacarídeo xilana.....	33
2.5 Hidrólise enzimática de xilana: Obtenção de XOS.....	36
2.6 Xilooligossacarídeos: o que são e suas aplicações	37
2. Objetivo	41
3. Materiais e métodos	42
3.1 Obtenção do subproduto	43
3.2 Pré-tratamento químico do subproduto com clorito de sódio.....	43
3.3 Extração da hemicelulose dos subprodutos	44
3.4 Caracterização química do subproduto e suas frações	46
3.4.1.Extração Alcoólica	46
3.4.2. Teor de cinzas	47
3.4.3 Hidrólise com ácido concentrado (H ₂ SO ₄ 72%).....	48
3.4.4. Determinação da lignina solúvel.....	49
3.4.5 Determinação dos teores de carboidratos e ácidos orgânicos	50
3.5 Determinação das atividades enzimáticas em extratos comerciais	51
3.5.1 Xilanases totais:.....	51
3.5.2 β-xilosidase:.....	52
3.5.3 Determinação de proteínas totais nos extratos enzimáticos.....	52
3.6 Separação dos XOS por Cromatografia Líquida de alta Eficiência (CLAE) e elaboração de curva de calibração	53
3.7 Hidrólise enzimática das amostras	54
3.8 Determinação dos teores de XOS	55
4. Resultados e Discussão.....	56
4.1 Composição química do subproduto de <i>Eucalyptus</i>	56
4.2 Tratamento com clorito de sódio do subproduto de <i>Eucalyptus</i>	60
4.3 Avaliação da extração de hemicelulose	66
4.4 Avaliação de atividades enzimáticas em extratos comerciais.....	74

4.5 Avaliação da separação dos XOS por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	75
4.6 Hidrólise enzimática das frações em estudo.....	78
4.7 Hidrólise enzimática dos subprodutos moído-extraído e pré-tratado com clorito	79
4.8 Hidrólise enzimática das hemiceluloses oriundas dos subprodutos moído-extraído (HSE) e pré-tratado com clorito (HSEP)	85
5 Conclusão	102
6 Perspectivas Futuras.....	102
Referências.....	106

1. Introdução

A madeira de *Eucalyptus* é a principal fonte de fibra para a produção de papel e celulose nos países da América do Sul. Em 2008 o Brasil atingiu 31% da capacidade global, ocupando lugar de destaque na fabricação mundial de celulose de fibra de *Eucalyptus* (1). No ano de 2015 a produção brasileira de celulose foi de 10,4 milhões de toneladas (2).

O setor agroindustrial é responsável por gerar expressivas quantidades de resíduos sólidos. A indústria de celulose gera 0,27 toneladas de resíduos sólidos para cada tonelada de celulose produzida (3). Devido ao grande volume de resíduos sólidos gerados pelo setor agroindustrial houve a necessidade de utilizá-los como fontes alternativas de matérias-primas em novos processos que, além de diminuir o dano ambiental causado pelo descarte incorreto, possam agregar valor a novos produtos desenvolvidos (4).

Os materiais lignocelulósicos (ML) representam uma fonte de matéria-prima praticamente sub-explorada. Seu uso está baseado principalmente na cogeração de energia, na produção de carvão vegetal e para produção de celulose. Entretanto, novas aplicações estão surgindo e proporcionado um melhor aproveitamento desses materiais. O processamento de toras de *Eucalyptus* em empresas de produção de celulose gera grandes quantidades de serragem, que são oxidadas para a produção de vapor d'água/energia elétrica (cogeração de energia). Essa serragem ("subproduto") contém mais de 60% de celulose e hemicelulose, sendo que essas frações contêm baixa eficiência energética quando comparada a lignina que possui alto calor específico (27,0 MJ/kg) enquanto que a hemicelulose possui apenas metade

desse valor, por isso uma sendo uma alternativa para melhor reaproveitar esse subproduto gerado pelas indústrias de celulose é a extração da hemicelulose para utiliza-la isolada na produção de produtos de maior valor agregado (5).

Dentre várias aplicações biotecnológicas da fração de hemicelulose de ML destacam-se a confecção de biofilmes e uso da mesma como aditivos na fabricação de papel. Na sua forma hidrolisada, é aplicada como oligossacarídeos para fins terapêuticos por não serem digeridos pelos seres humanos devido à ausência de uma enzima que degrade ligações do tipo β , encontradas entre unidades de alguns monossacarídeos. Estas características permitem que estes oligossacarídeos sejam utilizados para produção de doces, alimentos de baixa caloria e para consumo de pessoas com diabetes (5). Outra forma de utilizar a hemicelulose é a partir da produção de xilitol ou etanol, através da fermentação de xilose por leveduras (6).

Os xilooligossacarídeos (XOS) são oligômeros constituídos principalmente por unidades de xilose, e são responsáveis por diversos efeitos benéficos como a prevenção de cáries, a diminuição de níveis séricos de colesterol, o estímulo do crescimento de bifidobactérias no trato gastrointestinal, dentre outros (7,8). 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, além de conferirem características organolépticas aos alimentos (9). Além do efeito prebiótico, os XOS têm apresentado uma variedade de aplicações, tais

como, antioxidantes, antialérgicos e na prevenção de anemia e arteriosclerose (10,7,8).

Os XOS contêm um alto valor agregado quando comparado a biocombustíveis, celulose e energia elétrica sendo uma alternativa a ser pesquisada dentro dos setores de celulose e açúcar-álcool. No ano de 2014 o valor de mercado dos XOS foi da ordem de US\$ 22-50 para cada quilograma de produto, sendo que o valor do produto varia em função de sua pureza (11).

Dentro do âmbito do conceito apresentado, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a produção de XOS a partir da hidrólise enzimática de um “subproduto” de *Eucalyptus* gerado na indústria de celulose. A seguir será apresentada uma revisão bibliográfica sobre o estado da arte do tema abordado no projeto

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Materiais lignocelulósicos (ML): Estrutura e composição química

Atualmente, os ML representam a maior fonte de biomassa no mundo, mas infelizmente ainda são pouco exploradas (12). Os ML podem ser uma alternativa para a produção de alimentos, bioenergia, nutracêuticos, dentre outros bioprodutos de interesse comercial (13).

A composição química dos ML pode ser dividida em frações de baixa e elevada massas molares (14,15). A fração de baixa massa molar é composta por substâncias orgânicas, geralmente denominadas de extrativos, e substâncias inorgânicas, que são sais de íons metálicos (16,15). Os extrativos

compreendem vários compostos químicos, que podem ser extraídos com solventes orgânicos, embora alguns deles também sejam solúveis em água (14,15). Estes compostos são responsáveis por características como odor, cor e sabor dos ML e estão presentes em pequenas quantidades (de 2 a 8%) (16). Como exemplos de extrativos, podemos 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%) (14,15).

As frações de elevadas massas molares são chamadas de macromoléculas, que representam a quase totalidade dos tecidos vegetais e compreendem apenas três compostos: celulose, polioses (hemicelulose) e lignina (14,15).

A celulose é o principal componente da parede celular dos ML, contendo em torno de 50% de sua composição, sendo assim o carboidrato mais abundante encontrado na natureza. É um homopolissacarídeo linear formado por unidades repetitivas de celobiose que são formadas por unidades do tipo β -D-glicopiranoose ($C_6H_{10}O_5$)_n que se unem entre si através de ligações glicosídicas do tipo β -1,4 (Figura 1) (17).

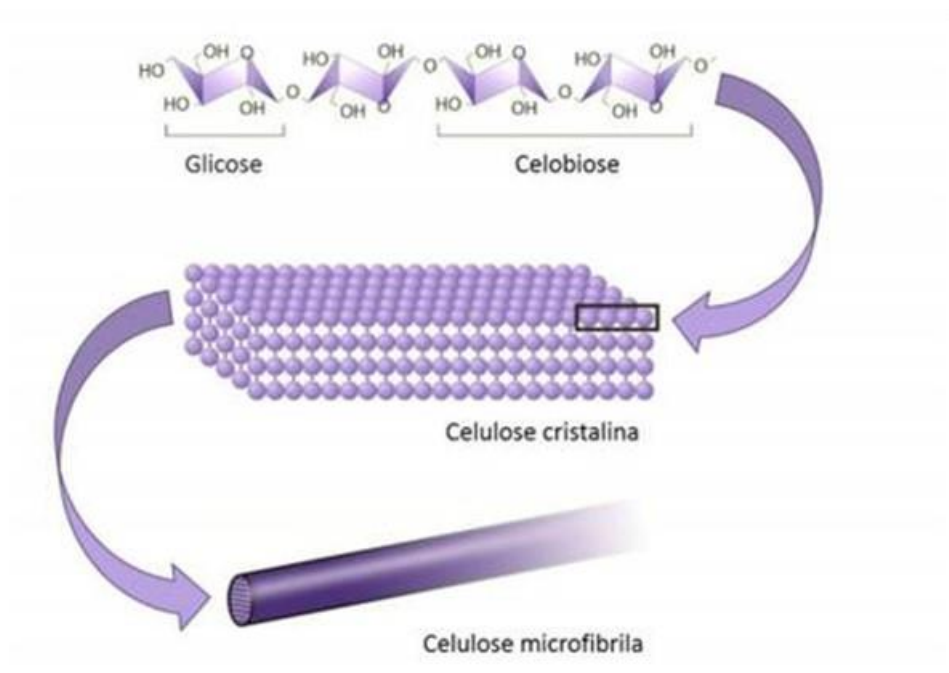


Figura 1. Representação da estrutura de um fragmento de celulose (17).

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 (14,15). Da mesma forma que a massa molar, o grau de polimerização varia com a origem da amostra, assumindo valores altos como no algodão (15.300) e chegando a menos de 305 no Rayon (14,15).

Outra característica da celulose é a formação de microfibrilas, uma estrutura resistente responsável pela constituição da fibrila de celulose (Figura 1). Estas microfibrilas se originam devido a formação de ligações de hidrogênio intramoleculares (entre grupos hidroxila da mesma molécula) e intermoleculares (entre grupos hidroxilas de cadeias adjacentes) (18). Os

aglomerados de cadeias de celulose (fibras de celulose formadas a partir de um aglomerado de microfibrilas) possui regiões cristalinas, que são fortemente organizadas com uma grande resistência, e regiões amorfas, que possuem uma menor orientação entre as moléculas e maior flexibilidade (14,16,15).

A hemicelulose (poliose) é um dos polissacarídeos mais comuns na natureza, seu teor varia de acordo com o tipo de biomassa, em geral de 20 a 35% do complexo lignocelulósico é composto por este polissacarídeo. Sua estrutura é constituída principalmente por polímeros de pentoses (xilose e arabinose), além de hexoses (manose, glicose, galactose, ramnose e fucose) e ácidos urônicos (galacturônico, glucurônico e metil-glucurônico) (19).

A hemicelulose é um homopolissacarídeo com capacidade de realizar ligações covalentes com as moléculas de lignina e ligações de hidrogênio com as moléculas de celulose, resultando em um arranjo pouco fibroso que apresenta somente regiões amorfas, com baixo grau de polimerização (~200). Esse arranjo é responsável pela estabilidade e flexibilidade ao complexo lignocelulósico (18).

De acordo com os açúcares presentes na cadeia principal a hemicelulose pode ser classificada em 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 (20).

As xilanas são as hemiceluloses mais comuns, sendo formadas por unidades de D-xilose unidas por ligações glicosídicas do tipo β -1,4 na cadeia principal (Figura 2).

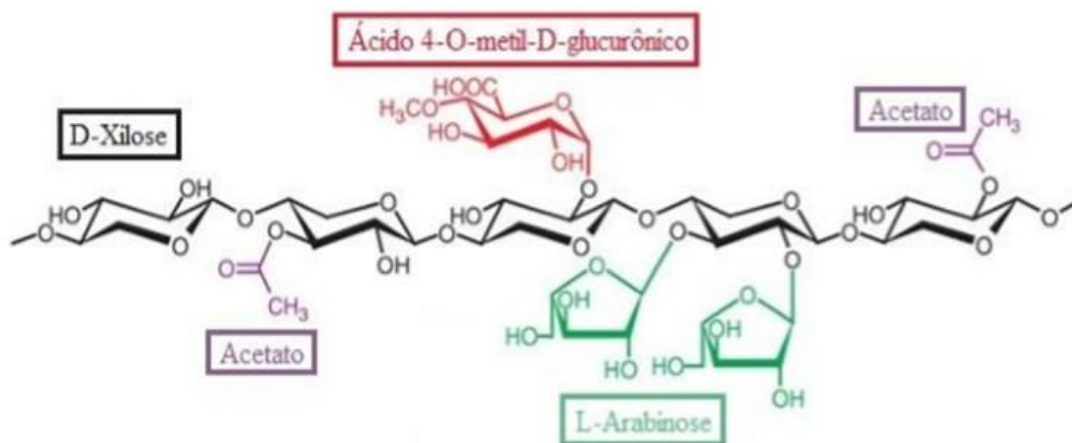


Figura 2. Modelo de estrutura química de uma xilana em madeira de folhosas. Tipos de ligações presentes em uma molécula de xilana (17).

As xilanas também contêm ramificações ao longo de sua cadeia principal, sendo uma molécula não linear. Além disso, as xilanas contêm diferentes grupos pendentes constituídos de açúcares monoméricos, ácidos metil-glucurônico e acético (Figura 2). As xilanas se destacam como uma excelente matéria-prima para formação de produtos de alto valor agregado, como xilitol e XOS (21).

A lignina é o segundo componente encontrado em maior quantidade nos ML oriundas da madeira e sua presença proporciona toda a complexidade existente nos processos de polpação devido à resistência que proporciona aos materiais lignocelulósicos o que interfere na etapa de extração da hemicelulose por exemplo. A lignina é uma macromolécula formada pela polimerização

desidrogenativa de álcoois hidroxicinâmicos (p-cumarílico, coniferílico e sinapílico). Devido ao processo de polimerização ser aleatório, a macromolécula de lignina possui estrutura bastante complexa, como mostra o modelo apresentado na figura 3 (22).

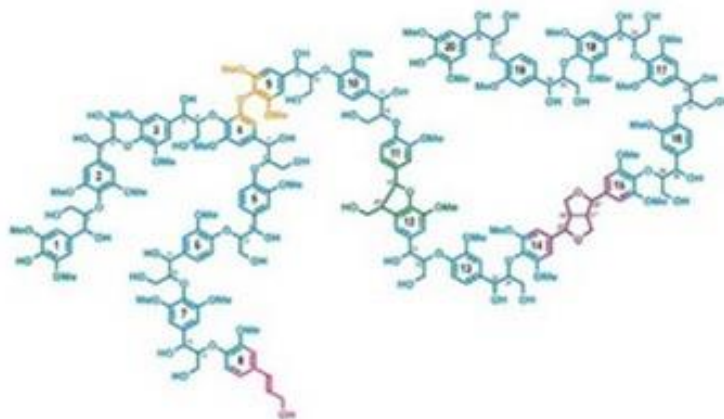


Figura 3. Modelo de estrutura química da lignina em madeira de folhosas (22).

Uma parte das moléculas de lignina está ligada quimicamente com as polioses, ou seja, existe um complexo lignina-carboidrato na estrutura química da parede celular do vegetal. Algumas ligações já descritas para as pontes entre lignina e carboidratos em madeiras são mostradas na figura 4 (23). 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. Na figura 4A nota-se uma ligação do tipo fenol glicosídeo; em 4B uma ligação do tipo éster e; em 3C uma ligação do tipo éter benzílico. No caso da ligação fenol glicosídica, a área

correspondente no espectro foi integrada e indicou que essa ligação está presente em aproximadamente 8 unidades para cada 100 unidades C₉ da lignina.

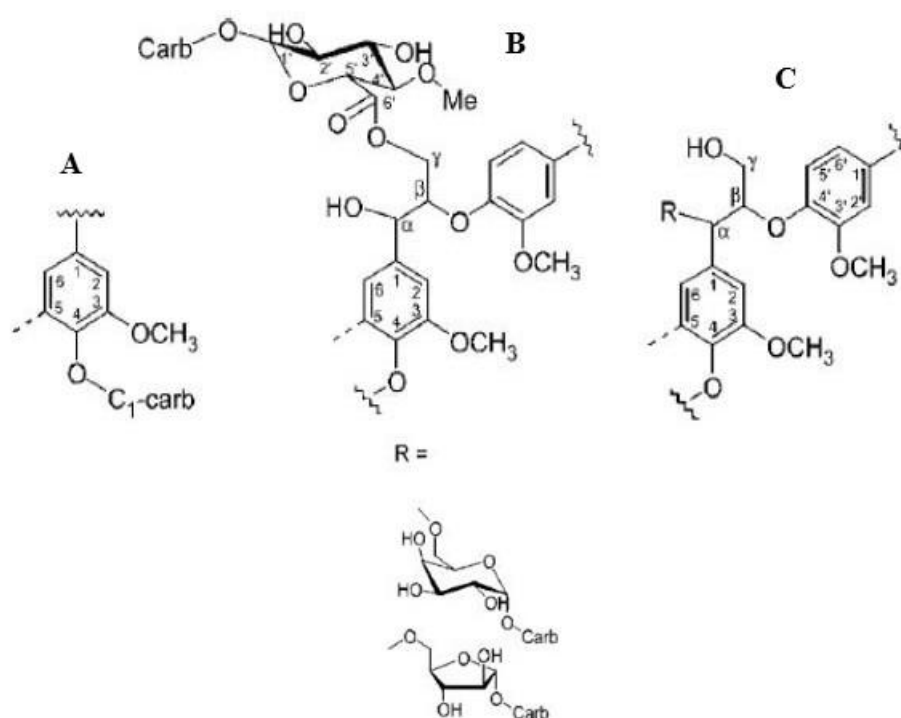


Figura 4. Principais tipos de ligações entre carboidratos e lignina em complexos lignina-carboidrato de madeiras : (A) fenol glicosídeo, (B) éster e (C) éter benzílico; carb = carboidrato (23).

A figura 5 apresenta a estrutura geral dos ML que é formada por longas cadeias de celulose interligadas por ligações de hidrogênio com moléculas de hemicelulose entrelaçadas, o que resulta em uma estrutura altamente complexa que é encapsulada pela lignina (24). Na parede celular dos ML, as microfibrilas de celulose estão organizadas de forma paralela e encaixadas em uma matriz de hemicelulose e lignina (Figura 5) (14,16,15).

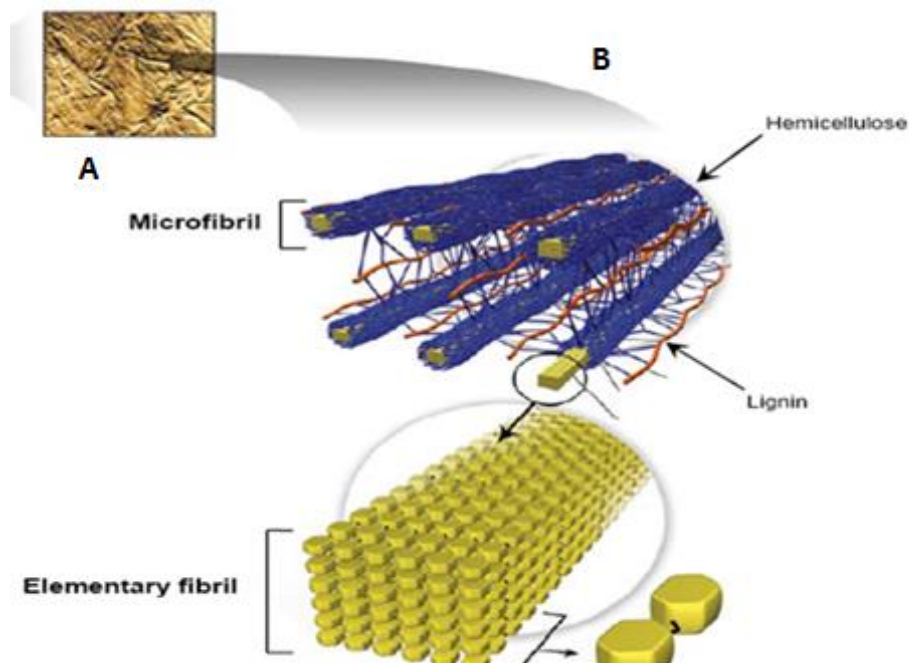


Figura 5. Modelo proposto para representar os componentes macromoleculares na estrutura de materiais lignocelulósicos (ML) (17).

A figura 6 apresenta o arranjo típico dos componentes de elevada massa molar presentes em uma fibra vegetal. A fibra apresenta uma estrutura de camadas complexas; constituídas por uma parede primária fina, formada durante o crescimento das células, que envolve a parede secundária. A parede secundária é constituída por três camadas (S1, S2 e S3), onde a camada intermediária (S2) é a responsável por determinar 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 (25).

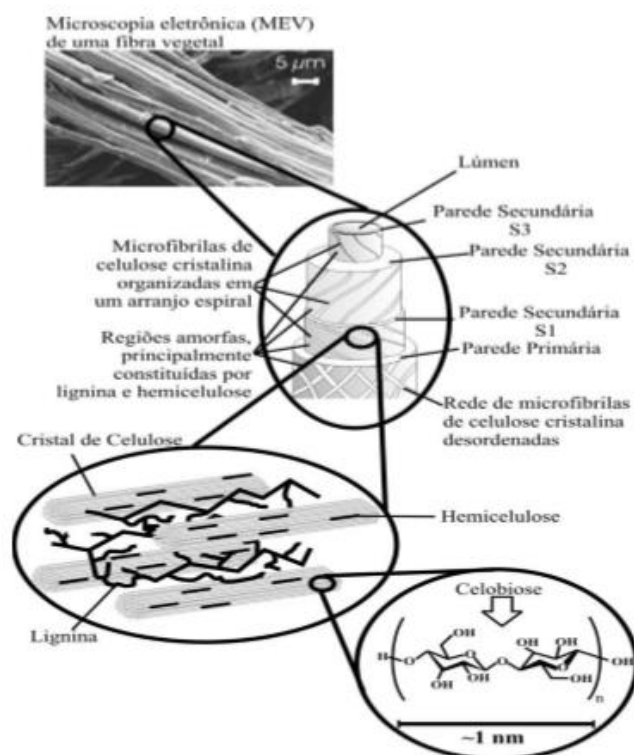


Figura 6. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e modelo proposto para representar a estrutura de uma fibra vegetal (25).

2.2 Pré-tratamentos químicos em matérias lignocelulósicos (ML)

A estrutura e ultraestrutura dos ML os torna resistente à sua degradação. A heterogeneidade dos ML, sua composição química e características físicas são pontos críticos no isolamento de seus componentes, sendo necessário, uma combinação de vários procedimentos para tornar os componentes de interesse acessíveis em futuras etapas (26).

A hidrólise enzimática dos polissacarídeos que compõem os ML em açúcares fermentescíveis é limitada devido a estrutura complexa e recalcitrante (17). Dentre os fatores que limitam a hidrólise enzimática podemos destacar: grau de polimerização, área superficial disponível, porosidade do material, teor de lignina e cristalinidade da celulose. De

maneira geral os pré-tratamentos proporcionam modificações na estrutura do material, conforme ilustra a figura 7.

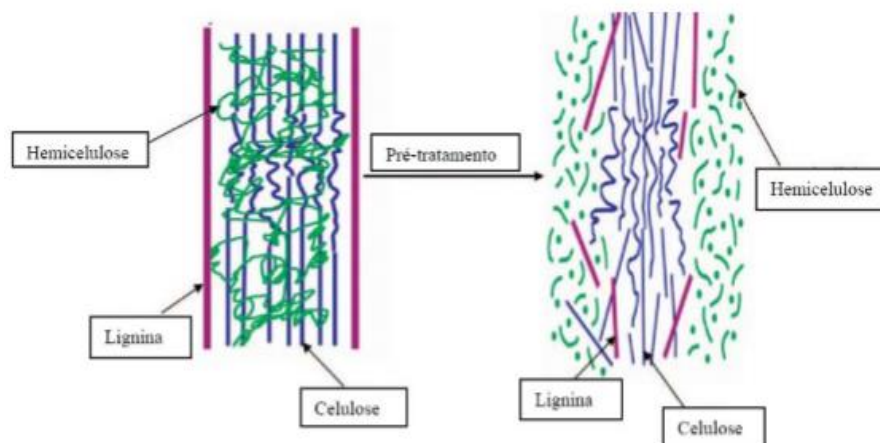


Figura 7. Modelo proposto para representar a desestruturação do complexo lignocelulósico pós-etapa de pré-tratamento (27).

A alteração nas características estruturais da matriz lignocelulósica pode ser realizada por diversos pré-tratamentos, os quais são classificados em físicos, químicos, físico-químicos e biológicos. O pré-tratamento deve ser escolhido com base no componente que se deseja isolar, e se será mantida ou não a sua integridade física. De modo geral, é desejável que o pré-tratamento apresente características operacionais e efeitos como: a) produção de fibras reativas, b) não oxidar a hemicelulose, c) não produzir compostos de degradação que possam inibir fermentações, d) que possa trabalhar em reator de tamanho razoável com custo moderado, e) minimize a produção de resíduos sólidos, e) que tenha um alto grau de simplicidade (28).

A etapa de pré-tratamento é realizada com o objetivo de alterar a estrutura complexa dos ML visando melhorar a conversão e consequentemente a produção de XOS ou açúcares fermentescíveis que

serão liberados durante a etapa de hidrólise enzimática (17). Para isso, os pré-tratamentos devem proporcionar a remoção e/ou redistribuição de lignina presente na biomassa, reduzir a cristalinidade da fração celulósica e aumentar a porosidade do material, resultando em maior acessibilidade da celulose e da hemicelulose na etapa de hidrólise enzimática (29).

2.2.1 Pré-tratamento com clorito de sódio

O processo de remoção de lignina, também conhecido de deslignificação, pode ser realizado através de métodos oxidativos como no caso do pré-tratamento com clorito de sódio em meio aquoso na presença de ácido acético diluído. Esse pré-tratamento é utilizado com a finalidade de se obter a holocelulose (celulose + hemicelulose) e no geral resulta em bons resultados na remoção seletiva de lignina, podendo remover até 60% desse componente (30). Os grupos pendentes presentes nas moléculas de xilana (arabinose, ácidos metil-glucurônico e acético) também podem ser removidos através da clivagem pela ação do pré-tratamento com clorito de sódio (Figura 3) (31). Além disso, as ligações entre a lignina e a hemicelulose (Figura 4) também podem ser clivadas pela ação do pré-tratamento com clorito de sódio.

A reação formada por este pré-tratamento consiste na formação de ácido cloroso, o qual se decompõem em dióxido de cloro como produto principal da reação e alguns produtos secundários como os íons de cloreto e clorato. As reações que ocorrem durante o processo não são definidas com exatidão e os produtos formados dependem de alguns fatores como temperatura e pH (32).

2.3 Extração de hemicelulose de materiais lignocelulósicos

Devido a estrutura bastante complexa dos ML a extração seletiva da hemicelulose é importante para a realização de etapas que a utilize como substrato para processos biotecnológicos com a finalidade de obter produtos de maior valor agregado (33).

A maioria das hemiceluloses podem ser extraídas dos ML através de tratamentos com soluções aquosas e alcalinas sendo o hidróxido de sódio e potássio os mais utilizados (14). A sua extração ocorre principalmente pela hidrólise alcalina de ligações ésteres que liberam a hemicelulose da matriz lignocelulósica em meio aquoso (34). Outro método de extração da hemicelulose pode ser através do uso de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que é um excelente oxidante em meio alcalino, possui baixa toxicidade e é de fácil manuseio. Durante a decomposição de H_2O_2 dois produtos não poluentes são formados, água e oxigênio. O tratamento com H_2O_2 é um processo eficiente para remoção de lignina e extração da hemicelulose de ML, além de remover também sílica e graxas (35). O H_2O_2 devido ao seu poder de reagir com as estruturas aromáticas e alifáticas da lignina é muito utilizado em processos de branqueamento de celulose (36).

2.3.1 Processo alcalino

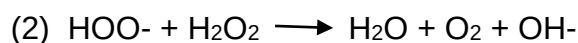
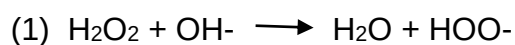
A ação alcalina nos pré-tratamentos de ML visando a extração da fração de hemicelulose é atribuída a saponificação da ligação éster que une a hemicelulose à lignina (Figura 4, item 2.1). Além disso, o tratamento da biomassa com solução de hidróxido de sódio, resulta em um inchamento

interno da estrutura da celulose, aumentando consequentemente sua área superficial. O inchamento faz com a interação entre a lignina e os carboidratos seja reduzida, causando ainda, rompimento na estrutura da lignina que é solúvel nessas condições (37). O pré-tratamento alcalino tem sido testado em resíduos como casca de trigo (85°C, 3 h), madeira de choupo (150°C, 6h e 14 atm), gramínea do gênero *Panicum* (100°C por 2h) e sabugo de milho (100°C, 13h) (27). Um trabalho realizado com bagaço de cana-de-açúcar mostrou que quando aplicada uma alta concentração de hidróxido de sódio (1 M), com o objetivo de extrair a hemicelulose, foi obtido um rendimento da ordem de 55.5% (%massa/massa), a temperatura de 25°C. O rendimento aumentou para 62.1% (%massa/massa) quando foi aplicada uma temperatura de 40°C. Além disso, os autores observaram que o aumento da temperatura para 40°C promoveu maior remoção da lignina do bagaço de cana-de-açúcar. Entretanto, em pHs e temperaturas elevadas os carboidratos podem sofrer reações de degradação que provocam a formação de extremidades redutoras e diminuição da massa molar (38).

2.3.2 Processo alcalino oxidativo

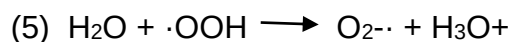
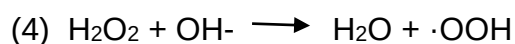
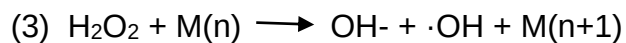
O H_2O_2 é um excelente oxidante em meio alcalino, possui baixa toxicidade e é de fácil manuseio. Além disso, os dois produtos de decomposição do H_2O_2 , água e oxigênio, não são poluentes. O pré-tratamento com H_2O_2 é um processo eficiente no processo de remoção da lignina e hemicelulose de ML, além de remover também sílica e graxas (35). O H_2O_2 é muito utilizado nos processos de branqueamento de polpa de

celulose devido sua capacidade de reagir com as estruturas aromáticas e alifáticas da lignina. (39). A ação desse agente pode gerar produtos de degradação devido à formação de agentes oxidantes. A influência do pH da reação já foi bastante estudada, sendo o pH ótimo reportado na literatura de 11,6 (40,41). Em meio alcalino o H_2O_2 se decompõe no ânion peroxidrila (HOO^-), o principal agente na degradação de grupos cromóforos, de acordo com a reação 1 ($\text{pka} = 11,6$ a 25°C) (42).



Entretanto, quando o H_2O_2 é usado visando a remoção da lignina em extração alcalina, a sua decomposição é possível devido à formação dos grupos hidroxila e de oxigênio, agentes oxidantes que iniciam as reações de deslignificação (reação 2). Embora a decomposição do H_2O_2 seja necessária para que ocorra o processo de deslignificação, a velocidade da reação de decomposição deve ser reduzida para evitar a formação excessiva de radicais livres, o que pode levar a uma degradação intensa dos polissacarídeos. Alguns metais como ferro, cobre e manganês aceleram a decomposição do H_2O_2 em meio alcalino, formando radicais hidroxila ($\text{HO}\cdot$) e ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), os quais participam do mecanismo de deslignificação (reações 3, 4 e 5) (40). Tais radicais apresentam efeito positivo para o processo de deslignificação, todavia, também atuam oxidando os carboidratos, o que é indesejável para o rendimento do processo. Como as consequências

negativas são maiores em relação aos efeitos positivos, é aconselhável que os metais sejam eliminados do material previamente aos pré-tratamentos.



Onde: M representa o metal

O ânion peroxidrila é considerado a espécie ativa do H_2O_2 , e é o responsável por agir sobre a macromolécula de lignina decompondo-a em ácidos mono e dicarboxílicos e compostos fenólicos, em menores quantidades, como ácidos aromáticos e aldeídos (43). Entre os produtos derivados dos ácidos carboxílicos destacam-se: ácidos oxálico, fórmico, acético, malônico e succínico e entre os compostos fenólicos e aldeídos destacam-se o ácido vanílico, benzodicarboxílico, vanilina, seringaldeído e hidroxibenzaldeído. A figura 8 mostra a sequência de degradação da lignina pela alta concentração de H_2O_2 (3,7 gramas de H_2O_2 /grama de substrato). Produtos derivados da lignina como vanilina e seringaldeído são formados na via A, entretanto, estes compostos são rapidamente degradados, sendo encontrados em baixas concentrações. Os compostos cromóforos são formados nas vias B e C e são os responsáveis pelo escurecimento do meio, podendo serem ser degradados a ponto de romper o anel aromático e formar ácidos de baixa massa molar (43).

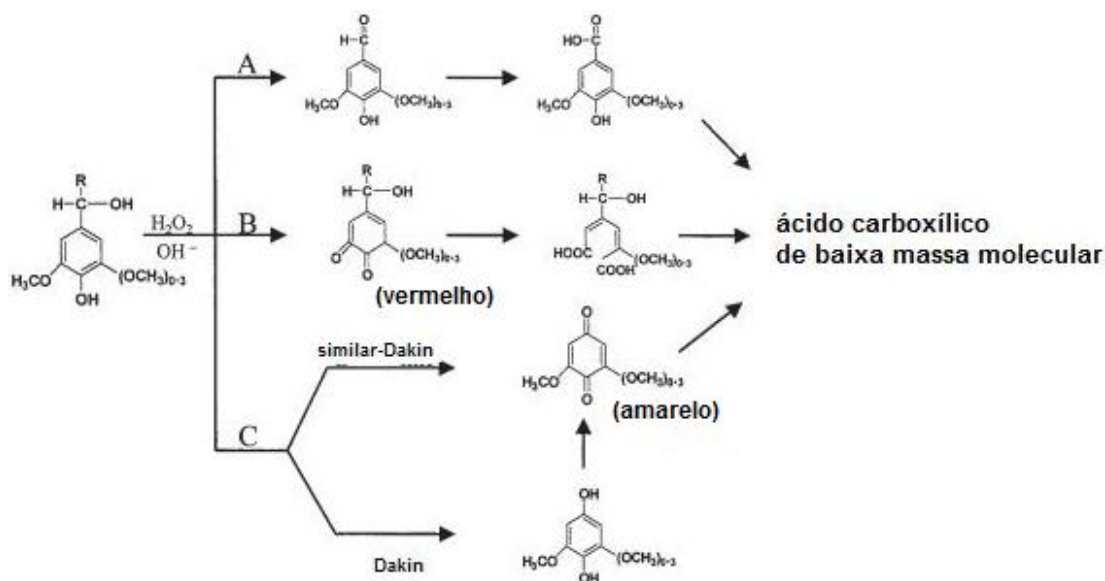


Figura 8. Sequência de reações de degradação de lignina em meio alcalino (43).

O radical hidroxila, produto de decomposição do H_2O_2 , degrada carboidratos pelo ataque ao carbono 2, formando uma estrutura de cetona, que em seguida é rompida pelo mecanismo de β -eliminação (44). Alguns autores mostraram que o ataque de radicais hidroxilas a moléculas de xilanas diminui o grau de polimerização das cadeias das mesmas, entretanto, não ocorre a formação de oligossacarídeos (45).

A hemicelulose pode ser extraída do ML utilizando o H_2O_2 em meio alcalino. A literatura reporta um rendimento de 92% (%massa/massa) após a extração da fração de hemicelulose de palha de trigo, empregando 2% (%volume/volume) de H_2O_2 a 50°C por 16h. Esse polissacarídeo apresentou massa molar entre $55\text{-}64 \text{ g.mol}^{-1}$. Sua composição mostrou um teor de 72% de xilose, 8,9% de glicose, 15,6% de arabinose, 4,7% de lignina (%massa/massa), além de pequenas quantidades de ramnose e galactose (34). Os autores observaram que a hemicelulose extraída com H_2O_2

apresentou cor mais clara que a extraída somente com KOH, o que foi atribuído à ação do H₂O₂ sobre os grupos cromóforos (34). A aplicação de 4% (%volume/volume) de H₂O₂ a 200°C por 8 min removeu 63% da hemicelulose e 64% da lignina (%massa/massa) de *Miscanthus giganteus* (46).

Diferentes tipos de processos de extração de hemicelulose do algodão foram realizados por meio de um estudo comparativo e foi observado que o H₂O₂ (2% massa/massa, 30 min por 121°C/1 atm) solubilizou 30% da fração da xilana e 29.5% da fração da lignina (%massa/massa); o hidróxido de sódio (2% massa/massa, 90 min a 121°C/1 atm) solubilizou 25% da fração da xilana e 65.6% da fração de lignina (%massa/massa) e o ácido sulfúrico (2% massa/massa, 90 min a 121°C/1 atm) solubilizou 95% da fração da xilana e 25% da fração da lignina (%massa/massa) (47).

2.4 Enzimas que hidrolisam o polissacarídeo xilana

As xilanases são enzimas específicas responsáveis por atuar na degradação do polímero de xilana, hidrolisando as ligações glicosídicas do tipo β -1,4; sua produção ocorre através de cultivos de diferentes microrganismos (48). As principais enzimas responsáveis pela despolimerização da cadeia de xilana são as endo- β -1,4-xilanases (EC 3.2.1.8), responsáveis por clivar a cadeia principal da xilana em oligossacarídeos menores, e as β -xilosidades (EC 3.2.1.37), que clivam as pontas não redutoras da xilobiase e dos XOS de cadeias curtas em monômeros de xilose (49).

A produção de xilanases pode ser realizada por diversos gêneros e espécies de bactérias, fungos e actinomicetos. Várias espécies bacterianas

secretam níveis elevados de xilanase extracelular, enquanto que os fungos filamentosos secretam grandes quantidades de proteínas extracelulares, onde a secreção de xilanases frequentemente acompanha enzimas celulolíticas (50). Dentro do grupo das hemicelulases, as xilanases de origem microbianas são as mais utilizadas pela indústria, pois as mesmas apresentarem alta especificidade, baixa perda de substrato e baixa geração de resíduos (51).

As endo-1,4- β -xilanases produzidas pela maioria dos fungos toleram temperaturas de até 50°C. Em geral, com pouquíssimas exceções, os fungos são relatados por produzir endo-1,4- β -xilanases e têm um pH de cultivo inicial menor do que pH 7,0. O pH ótimo das endo-1,4- β -xilanases bacterianas é ligeiramente mais elevado do que o pH ótimo das endo-1,4- β -xilanases de fungos (4).

Com base na sequência primária de aminoácidos e de seu domínio catalítico, as xilanases são predominantemente classificadas nas famílias 10 e 11. As xilanases da família 10 em geral apresentam massa molar maior que 30 kDa e ponto isoelétrico mais baixo quando comparada as das famílias 11. Já as enzimas da família 11 apresentam baixa massa molar (52,53). As xilanases da família 10 apresentam uma maior versatilidade catalítica, ou seja, menor especificidade. As xilanases dessa família também podem apresentar atividade sobre moléculas de celulose de baixa massa molar. Em contraste, as xilanases da família 11 são consideradas como verdadeiras, porque agem exclusivamente sobre xilanas (52). Em função das diferenças catalíticas,

xilanases da família 10 produzem XOS com menores graus de polimerização do que xilanases da família 11 (54).

Na natureza, uma ampla variedade de microrganismos é capaz de produzir endoxilanases, incluindo bactérias, leveduras e fungos filamentosos. Dentre esses microrganismos, os fungos filamentosos produzem xilanases extracelulares em níveis mais elevados quando comparados com leveduras e bactérias, o que os tornam mais atraentes para produção dessas enzimas em escala industrial (55).

Estudos mostraram que os principais fatores que influenciam a hidrólise da fração de xilana são o comprimento da cadeia e os grupos substituintes presentes na mesma (52). Alguns autores observaram que, na ausência de β -xilosidase e das enzimas acessórias α -glucuronidase e α -arabinofuranosidase, a hidrólise de glucuronoxilana por endoxilanase da família 11 de *Thermomyces lanuginosus* levou a produção de XOS com grupos pendentes (56).

A presença de grupos pendentes pode ser um entrave mais ou menos acentuado dependendo do modo de ação da enzima. Xilanases de *Aspergillus niger* hidrolisa melhor a molécula de xilana com grupos pendentes, enquanto que xilanases de *Trichoderma longibrachiatum* agem sobre ambas xilanas (57). Estudos mostraram que xilanases purificadas de *A. niger* podem hidrolisar xilotriose, mas não hidrolisam arabinoxilotriose (58). A presença de grupos pendentes, os quais geralmente localizam-se no terminal não redutor de XOS, protege a ligação glicosídica da cadeia principal (59).

2.5 Hidrólise enzimática de xilana: Obtenção de XOS

Os principais métodos empregados para hidrolisar a fração de xilana visando a produção de XOS são físicos, químicos e enzimáticos. A auto-hidrólise e a hidrólise ácida são os dois principais métodos físico-químicos empregados, mas devido a rápida conversão do substrato em monossacarídeos ocorre diminuição da formação de XOS e aumento na liberação de subprodutos (monossacarídeos, furfural e hidroximetilfurfural). Todavia, o processo de hidrólise enzimática é ecologicamente melhor, pois exige condições suaves durante o processo de hidrólise o que acarreta uma menor formação de monossacarídeos e subprodutos (60). Atualmente os principais “subprodutos” lignocelulósicos (espiga de milho, casca de arroz, palha de cevada, talo de tabaco, haste de algodão, haste de girassol, palha de trigo, bagaço de cana-de-açúcar e madeira) são utilizados para a produção industrial de XOS pelo processo de hidrólise enzimática da xilana (61).

As moléculas de xilanas apresentam uma grande heterogeneidade devido a presença de diferentes grupos e ligações químicas (Figura 2 e 9). Devido a essa característica a completa hidrólise da fração de xilana exige um complexo de enzimas (Figura 9) (17). Este complexo enzimático é constituído pelas endoxilanases (EC 3.2.1.8), que hidrolisam aleatoriamente as ligações do tipo β -1,4-xilosídicas da cadeia principal da xilana liberando XOS. Todavia, as β -xilosidades (EC 3.2.1.37) suplementam a ação das endoxilanases fazendo com que os XOS de cadeia curtas e a xilobiose sejam hidrolisados e convertidos em xilose (Figura 9) (62).

As enzimas acessórios que atuam nos grupos pendentes dos principais tipos de xilanas são as arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55) que removem a arabinose, a α -glucuronidasas (EC 3.2.1.131) que removem o ácido metil-glucurônico e as acetil-xilana-esterases (EC 3.1.1.72) que removem o ácido acético (Figura 9) (63).

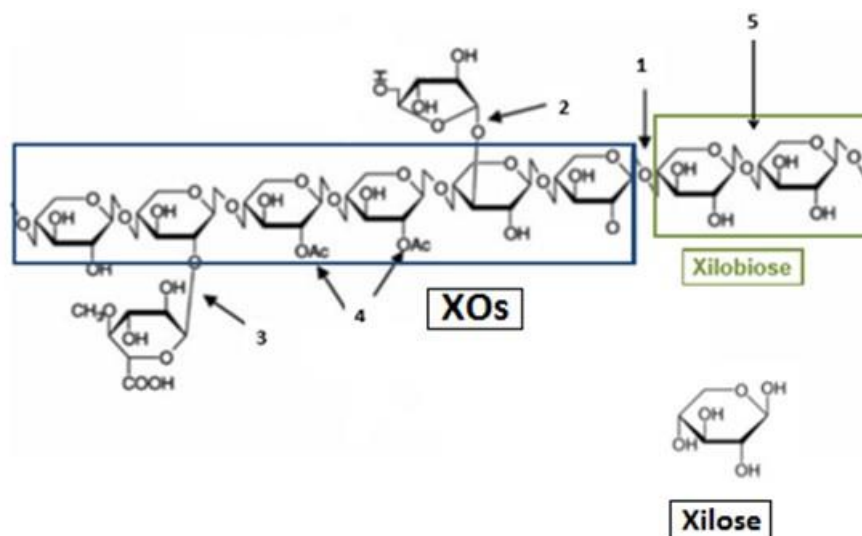


Figura 9. Degradação da molécula de xilana pelas principais hemicelulases. (1) endoxilanase clivando o polissacarídeo em unidades menores, formando oligossacarídeos (xilooligômeros). (2) α -L-arabinofuranosidases. (3) glucuronidasas. (4) acetil esterases. (5) β -xilosidase clivando uma molécula de xilobiose em xilose. Essa enzima também pode clivar xilooligômeros de cadeias curtas em xilose. Adaptado de Diogo, 2016.

2.6 Xilooligossacarídeos: o que são e suas aplicações

Os XOS são oligômeros constituídos de unidades de xilose contendo ligações do tipo β -1-4, presentes naturalmente em vegetais, frutas, leite e mel (64). A composição dos XOS sofre variações de acordo com a sua origem e os processos de hidrólise que foram utilizados para sua produção (65).

Atualmente os XOS são complementados em ingredientes de alimentos funcionais utilizados com o objetivo de promover uma série de benefícios ao sistema digestivo e imunológico e apresentam vantagens em relação a outros oligossacarídeos em termos de estabilidade e efeitos à saúde (66).

Os XOS são considerados oligossacarídeos não digeríveis com a capacidade de estimular o crescimento de bactérias do gênero *Bifidobacterium*, podendo inibir e/ou diminuir a proliferação de bactérias patogênicas no intestino podendo assim ser considerado substâncias prebióticas (67). Uma substância prebiótica é um ingrediente não-digerível do alimento que afeta benéficamente e estimula seletivamente o crescimento e/ou a atividade de um número limitado de bactérias, melhorando assim a saúde do hospedeiro (68). A literatura reporta o efeito seletivo de prebióticos em microrganismos probióticos e alguns patogênicos comuns à flora intestinal humana. Os probióticos cresceram em oligofrutose (FOs) e XOS, inibindo o crescimento dos patógenos *Escherichia coli*, *Campilobacter jejuni* e *Salmonella enteritidis*. A adição de XOS mostrou uma diminuição no crescimento de *Clostridium* sp e apresentou ação como agente bacteriostático contra *Vibrio anguillarum* (68).

Muitas pesquisas estão sendo realizadas com o objetivo de evidenciar as propriedades físico-químicas e biológicas dos oligossacarídeos. A literatura reporta alguns estudos relacionados à doçura, amargor, higroscopicidade, atividade de água, ativação e estabilização de proteína, sabor e cor, chamando a atenção para a aplicação desses compostos como agente de

reforço organoléptico em bebidas. Entre as propriedades biológicas investigadas estão a digestibilidade e não-digestibilidade, propriedades anti-cariogênicas e não-cariogênicas, ação bacteriostática, seletividade a proliferação de bifidobactéria (69).

Nos últimos anos houve um aumento no interesse do desenvolvimento de novos prebióticos, incluindo os XOS devido aos seus efeitos benéficos à saúde que 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 (67).

A utilização de XOS já é uma realidade em alguns países. No Japão, por exemplo, essa substância já é comumente empregada em vários produtos alimentícios para humanos e animais (7).

Alguns benefícios para a saúde de quem realiza a suplementação alimentar estão sendo citados como: melhorar as funções intestinais, a absorção de cálcio, proporcionando efeitos positivos sobre o sistema imunológico e cardiovascular, melhorando atividades alérgicas e anti-inflamatórias (67). Além do efeito prebiótico, os XOS têm apresentado uma variedade de aplicações, tais como, antioxidantes, antialérgicos e na prevenção de anemia e arteriosclerose (7,8).

O trato intestinal humano contém um complexo ecossistema microbiológico composto por inúmeras espécies de bactérias. A maioria destas bactérias apresenta capacidade de assimilar açúcar, e algumas espécies são consideradas como benéficas ao hospedeiro, enquanto outras podem ser patogênicas. Em função de seu efeito benéfico é desejável o

aumento de microrganismos probióticos. A aplicação de XOS promove aumento desse tipo de bactérias, principalmente Bifidobactérias e Lactobacilos. As bifidobactérias utilizam principalmente xilobiose e xilotriose para seu desenvolvimento (70).

Além de fornecer modificações úteis ao sabor e às características físico-químicas do alimento, muitos destes açúcares possuem propriedades que são favoráveis à saúde dos consumidores, pois não são carcinogênicos, possuem baixo valor calórico e estimulam o crescimento de bactérias benéficas no colón. As aplicações mais importantes de 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 (71), iogurtes, doces, bolos, biscoitos, massas, e em alimentos especiais para idosos e crianças ou como componentes ativos de preparações simbióticas (72).

No processamento de alimentos os XOS mostram 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 (8).

Estudos recentes de ésteres e éteres de XOS têm sido utilizados como matéria-prima para produção de compostos termoplásticos biodegradáveis, filme solúvel em água, cápsulas e hidrogel de quitosana-xilana (72). Esses produtos apresentam alto valor agregado e uma nobre característica, a biodegradação, que colabora para o meio ambiente.

2. Objetivo

O objetivo principal deste trabalho foi avaliar a produção de XOS via hidrólise enzimática de um “subproduto” de *Eucalyptus* oriundo de uma empresa de celulose. Para atingir a meta do trabalho são apresentados os seguintes objetivos específicos:

- Obter um material livre de extraíveis a partir do “subproduto” de *Eucalyptus*;
- Obter um material parcialmente livre de lignina a partir do “subproduto” de *Eucalyptus*;
- Extrair a hemicelulose das amostras em estudo (material livre de extraíveis e parcialmente livre de lignina);
- Realizar a composição química da amostra original e das amostras obtidas anteriormente (livre de extraíveis e parcialmente livre de lignina, além das frações de hemicelulose obtidas);
- Determinar as atividades enzimáticas de xilanases de três extratos enzimáticos comerciais;
- Hidrolisar enzimaticamente com xilanases comerciais as amostras em estudo (livre de extraíveis e parcialmente livre de lignina, além das frações de hemicelulose obtidas) visando a produção de XOS;

3. Materiais e métodos

As etapas desenvolvidas no presente projeto encontram-se apresentadas em um fluxograma geral (Figura 10). Os detalhes de cada etapa são descritos a seguir.

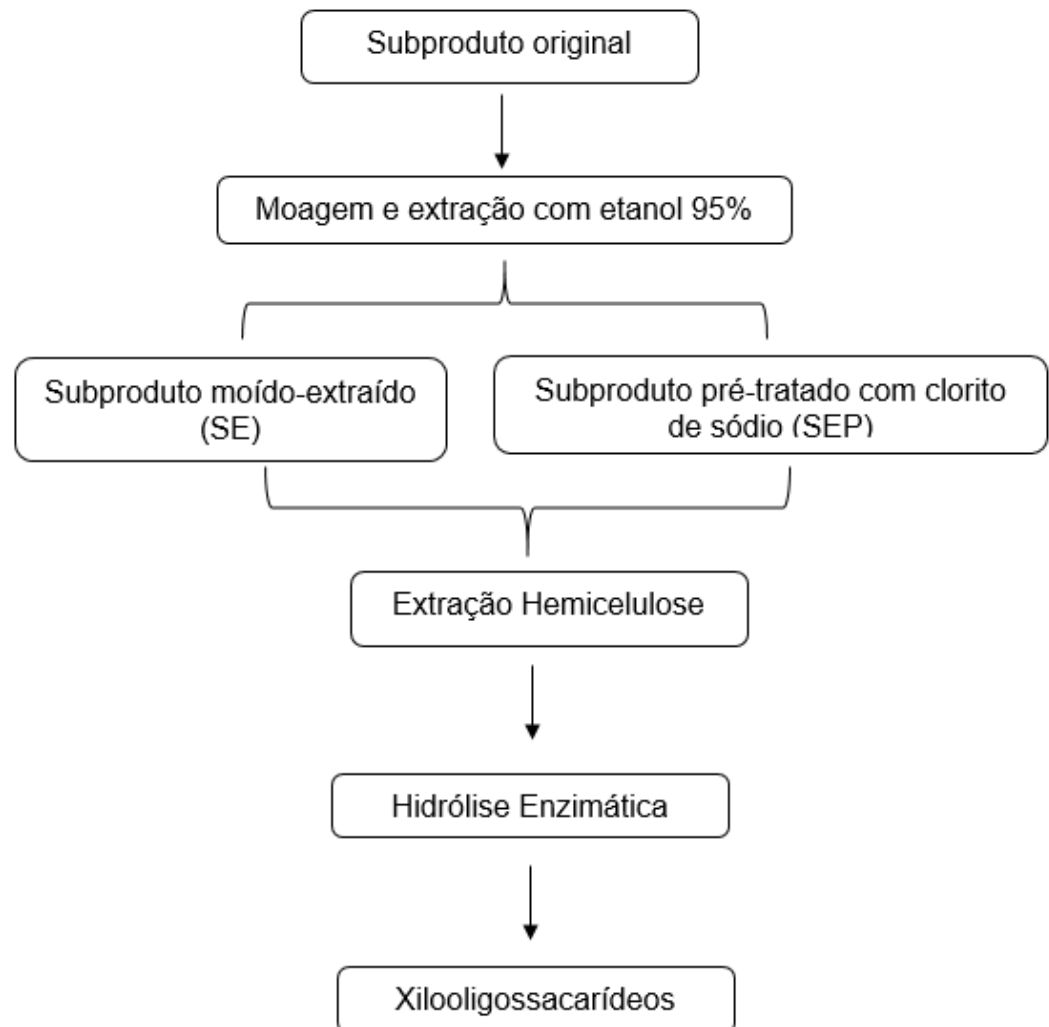


Figura 10. Fluxograma geral das etapas desenvolvidas com o “subproduto” gerado no processo de produção de celulose.

3.1 Obtenção do subproduto

A madeira utilizada nesse trabalho constitui-se de uma mistura de *Eucalyptus* (*Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla*, proporção média de 1:1) que é processada diariamente na indústria de celulose. O material utilizado foi obtido na etapa de produção de cavacos de madeira. Durante a etapa de corte das toras de madeira (produção de cavacos de madeira) um material com menor granulometria comparado aos cavacos de madeira também é gerado. Denominamos esse material como “subproduto” de *Eucalyptus* na fábrica de celulose (SO = subproduto original). Foram selecionados lotes dessa biomassa obtida concomitante a produção de cavacos de madeira, onde a mesma foi seca a temperatura de 25°C e posteriormente a biomassa foi moída em um moinho de facas (0,84 mm) (SOM = subproduto original moído) para uniformizar o tamanho da mesma. Após a moagem a biomassa foi armazenada em temperatura ambiente em sacos plásticos fechados até o momento do uso.

3.2 Pré-tratamento químico do subproduto com clorito de sódio

Para cada grama de subproduto previamente moído-extraído (SE) (dados em base seca) foi utilizado 0,3 g de clorito de sódio (0,93%, massa/volume), 0,1 mL de ácido acético anidro (0,31%, volume/volume) e 32 mL de água destilada. Aproximadamente 20 g do “subproduto” foram pesados em béquer de vidro de 1 L e tratados com clorito de sódio/ácido acético na proporção previamente citada acima por até 4h. Nos experimentos onde o tempo de reação foi superior a 1h de reação o clorito de sódio e o ácido acético

foram readicionados a amostra nas mesmas proporções iniciais. O procedimento foi realizado para cada hora de reação. Este procedimento foi repetido até 4h de reação (15). Após os pré-tratamentos as amostras foram filtradas em filtros sinterizados número 3 e lavadas com água destilada até a neutralização do material tratado. As amostras tratadas retidas nos filtros sinterizados número 3 ainda foram lavadas com 200 mL de acetona pura após a etapa de neutralização. O material foi separado e seco em estufa por 24h a 45°C. Os ensaios foram todos realizados em triplicata e os dados foram expressos em percentuais médios juntamente com os respectivos desvios padrões. O rendimento dos pré-tratamentos do subproduto foi calculado de acordo com a equação 1.

$$R = \frac{(Mf)}{(Mi)} \times (100\%) \quad (1)$$

Sendo:

R = Rendimento mássico do pré-tratamento com clorito de sódio (%).

Mi = massa seca inicial do material de partida (não tratado) (g).

Mf = massa seca final do material pré-tratado com clorito de sódio (g).

3.3 Extração da hemicelulose dos subprodutos

O subproduto moído-extraído (SE) e o subproduto moído-extraído + pré-tratado com clorito de sódio por 180 min (SEP) foram submetidos ao processo de extração de hemicelulose. Para isso, 10 g do material foram tratados inicialmente com 100 mL de solução de ácido tetracético etilenodiamina (EDTA) 0,2% (%massa/volume) durante 1h a 90°C para remoção de metais. Em seguida foram lavados com água destilada, levados a estufa (50°C) para secagem e armazenados até o momento da extração da hemicelulose (34). 5 g do material previamente tratado com EDTA foram colocados em um béquer

de polipropileno de 600 mL seguido da adição de 100 mL de H₂O₂ 6% (%massa/volume), com pH ajustado para 11,6 com NaOH 2 M e em seguida o meio foi agitado em incubadora shaker a 80 rpm por 4h a 20°C (6). A hemicelulose também foi extraída das amostras nas mesmas condições mencionadas acima, porém substituindo-se o NaOH por KOH na mesma molaridade. Ensaios com NaOH e KOH com molaridades de 5M também foram avaliados. Outros tempos de extração (8h e 12h) também foram testados.

Após a reação, o material foi filtrado e o pH corrigido para 6 com adição de HCl 6 M. A solução obtida foi concentrada cerca de 3 vezes (relação volume) em uma estufa com circulação de ar a 60°C e precipitada utilizando 3 volumes de etanol 95% (%volume/volume). Após a sedimentação do material, o sobrenadante foi removido e o precipitado foi lavado com 50 mL de etanol 70% (%volume/volume). Nesta etapa o material ficou em repouso para sedimentação por aproximadamente 12h e o sobrenadante foi retirado adicionando-se etanol 70% (%volume/volume) novamente. A etapa de lavagem com etanol foi repetida cerca de 8 vezes até obter-se um sobrenadante límpido (38). O material foi separado e seco em estufa a 45°C por 24h, sendo designado de hemicelulose. Os ensaios foram todos realizados em triplicata e os dados foram expressos em percentuais médios juntamente com os respectivos desvios padrões. O rendimento da extração de hemicelulose do subproduto foi calculado de acordo com a equação 2.

$$R = \frac{(Mf)}{(Mi)} \times (100\%) \quad (2)$$

Sendo:

E = Rendimento mássico de hemicelulose (%).

M_i = Fração mássica seca de hemicelulose do material de partida (g).

M_f = Massa seca final da hemicelulose obtida (g).

3.4 Caracterização química do subproduto e suas frações

O SE e o SEP e as respectivas hemiceluloses extraídas (Hemicelulose subproduto moído-extraído (HSE) e Hemicelulose subproduto moído-extraído + pré-tratada com clorito de sódio (HSEP)) dos mesmos foram caracterizadas quimicamente para determinação dos teores de cinzas, extrativos, lignina total (insolúvel + solúvel) e carboidratos. Os ensaios de caracterização química foram todos realizados em triplicata e os dados foram expressos em percentuais médios juntamente com os respectivos desvios padrões.

3.4.1. Extração Alcoólica

Cerca de 10 g (dados em base seca) do subproduto original previamente moído (SOM) foram colocados em cartuchos de papel de filtro e em seguida foram inseridos em um extrator Soxhlet e extraídos com etanol 95% (%volume/volume) por cerca de 6h (cerca de 10 ciclos de extração) (73). Os cartuchos contendo o subproduto extraído foram secos ao ar à temperatura de 25°C para evaporação do solvente até à massa constante, após a qual, as amostras foram pesadas e quantificadas em balança analítica. O material foi armazenado em sacos plásticos fechados até o momento do uso. O percentual de extrativos foi determinado pela Equação 3.

$$E = \frac{(M_i - M_f)}{(M_i)} \times (100\%) \quad (3)$$

Sendo:

E = teor mássico de extrativos do “subproduto” não tratado (%).

M_i = massa seca inicial do material não tratado (g).

M_f = massa seca final do material não tratado após extração com etanol 95% (g).

3.4.2. Teor de cinzas

Cadinhos de porcelana foram colocados em um forno de mufla a $575 \pm 25^\circ\text{C}$ por 180 min utilizando uma rampa de aquecimento com a seguinte programação, a temperatura foi aumentando gradativamente até 105°C e após atingir essa temperatura manteve-se por 12 min. Após os 12 min a temperatura foi aumentada em intervalos de $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ até 250°C permanecendo nesta temperatura por 30 min. Após os 30 min, a temperatura foi aumentada em intervalos de $20^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ até 575° permanecendo por 180 min e após esse período houve o resfriamento gradativo até atingir 105°C (74).

Após o procedimento na mufla, os cadinhos foram retirados e colocados em um dessecador com sílica para o resfriamento a temperatura de 25°C . Após 1h (aproximadamente) os cadinhos foram pesados. Posteriormente, foram pesados aproximadamente 1g (dados em base seca) das amostras, colocadas nos cadinhos e levadas a mufla novamente. A mufla foi ligada e utilizou-se a mesma rampa de aquecimento mostrada anteriormente. Os cadinhos permaneceram no forno de mufla por 3h após a temperatura atingir $575 \pm 25^\circ\text{C}$. Após o término de 3h, os cadinhos foram mantidos no forno de mufla até a temperatura atingir aproximadamente 105°C . Os cadinhos foram retirados do forno de mufla e colocados em um dessecador munido com sílica para o resfriamento a temperatura de 25°C . Após 1h (aproximadamente) os cadinhos foram pesados e a diferença entre as massas resultou no teor de cinzas. Todos os experimentos foram realizados em triplicata (74).

$$\text{Cinzas} = \frac{(M_f)}{(M_i)} \times (100\%) \quad (4)$$

Sendo:

Cinzas = Teor mássico de cinzas (%).

Mi = massa seca inicial do subproduto (g).

Mf = massa seca final das cinzas (g).

3.4.3 Hidrólise com ácido concentrado (H_2SO_4 72%)

Em tubos de ensaio com capacidade para 30 mL, devidamente identificados, foram pesados 300 mg (dados em base seca) de amostra. Foram adicionados 3 mL de ácido sulfúrico 72% (%massa/massa) e a reação ocorreu em banho-maria a 30°C, por 60 min sendo a mistura agitada a cada intervalo de 10 min com auxílio de um bastão de vidro. Após os 60 min os conteúdos dos tubos de ensaio foram transferidos, quantitativamente, para Erlenmeyers de 250 mL com auxílio de 79 mL de água destilada, reduzindo a concentração final do ácido para cerca de 3% (%massa/massa). Para a hidrólise completa dos oligômeros restantes, os Erlenmeyers foram fechados com papel alumínio e autoclavados por 60 min a 121°C. Após a decompressão da autoclave, os frascos foram retirados e 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 1h e meia e pesados). O material retido foi lavado, com 2 porções de 5 mL de água destilada, e seco até massa constante. Esse resíduo seco correspondeu à lignina insolúvel em ácido (lignina Klason). Os filtrados foram avolumados em balão volumétrico de 100 mL (74,76). O teor de lignina insolúvel foi calculado de acordo com a equação 5:

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

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).

3.4.4. Determinação da lignina solúvel

O teor de lignina solúvel foi determinado pela medida de absorbância em um espectrofotômetro UV-visível (Modelo Ultospec™ 3100UV-Amersham Biosciences). Transferiu-se uma alíquota de 1 mL de cada hidrolisado ácido (avolumados em balão volumétrico de 100 mL, item 3.4.3) para balões volumétricos de 50 mL que tiveram o volume aferido com água destilada. Utilizando cubetas de quartzo, as leituras de absorbância das soluções foram realizadas a 205 nm. Para a determinação das concentrações de lignina solúvel utilizou-se o coeficiente de extinção molar da lignina de $105 \text{ L.g}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ que é a média das absortividades apresentadas para modelos de lignina (74,76). O cálculo da massa de lignina solúvel foi realizado conforme a equação 6.

$$C_{lig} = \left(\frac{A_{hid}}{105} \right) X(f) X(0,1) \quad (6)$$

Onde:

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

A_{hid} = Absorbância da amostra de hidrolisado em 205 nm.

f = fator de diluição do hidrolisado ácido antes da leitura em 205 nm.

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 do processo de

hidrólise ácida. Desta forma o resultado final do teor de lignina foi expressado em porcentagem (grama/100gramas de subproduto).

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

Onde:

L_t = Teor mássico de 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).

3.4.5 Determinação dos teores de carboidratos e ácidos orgânicos

Para a determinação dos teores de carboidratos e ácidos orgânicos, uma pequena alíquota do hidrolisado ácido foi passada através de cartuchos do tipo SEP-PACK C₁₈ e injetados em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A análise cromatográfica foi realizada nas seguintes condições: coluna BIO-RAD Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm); temperatura: 60°C; eluente: H₂SO₄ 5 mM com fluxo 0.6 mL.min⁻¹; volume de amostra: 20 µL; detector: índice de refração a 60°C (Shimadzu, modelo RID- 20A) com um tempo de análise de 17 min. A concentração de glicose, xilose e ácido acético foram determinadas através de curvas de calibração preparada com padrões, de grau analítico, secos sob pentóxido de fósforo e vácuo (74,76). A partir das concentrações foi calculado a massa de glicose, xilose e ácido acético utilizando-se o volume total do hidrolisado (100 mL). O cálculo dos teores de celulose, xilana e grupos acetil foram realizados de acordo com a equação 8.

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

Onde:

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

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

f = fator de hidrólise para celulose, xilana e grupo acetil (Tabela 1).

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

Tabela 1: Principais monômeros precursores da celulose e hemicelulose e seus respectivos fatores de conversão.

Monômero	Fator de Conversão	Polímero
Glicose	0,90	Celulose
Xilose	0,88	Hemicelulose
Ácido Acético	0,72	Hemicelulose

3.5 Determinação das atividades enzimáticas em extratos comerciais

A determinação das atividades enzimáticas foi realizada para 3 extratos comerciais: Celluclast oriunda de *Trichoderma* (Novozymes), Cellulase oriunda de *Trichoderma* (Sigma) e Xilanases oriunda de *Escherichia coli* (Verdartis).

3.5.1 Xilanases totais:

A atividade de xilanases totais foi determinada conforme descrição a seguir. Um volume de 0,9 mL de uma solução de xilana de Birchwood 1% (%massa/volume), preparada em tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5,5), foi adicionada à 0,1 mL de extrato enzimático e a mistura foi incubada a 50°C por 5 min. Após o tempo de incubação a reação foi interrompida pela adição de 1,5 mL de DNS e os tubos foram fervidos por 5 min. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Modelo Ultospec™ 3100UV-Amersham Biosciences) a 540 nm e os valores de absorbância foram convertidos em concentração de

xilose através da curva de calibração de xilose. Um controle foi realizado adicionando-se o DNS antes do extrato enzimático. O branco foi realizado com água destilada no lugar da amostra. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar um μmol de açúcares redutores por minuto, a 50°C (76).

3.5.2 β -xilosidase:

A atividade de β -xilosidase foi determinada da seguinte maneira: um volume de 0,4 mL de solução de p-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo (pNPX) 0,1% (%massa/volume), preparada em tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5,0), foi adicionado a 0,1 mL do extrato enzimático devidamente diluído. A mistura foi incubada a 50°C por 30 min. Após o tempo de incubação adicionou-se 1 mL de bicarbonato de sódio 10% (%massa/volume) para parar a reação. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro (Modelo Ultospec™ 3100UV-Amersham Biosciences) no comprimento de onda de 410 nm. Os valores de absorbância foram convertidos em concentração de pNP utilizando a curva de calibração previamente construída. O branco foi realizado com água destilada no lugar do extrato enzimático. Uma unidade de β -xilosidase foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de pNPx por minuto, a 50°C (77).

3.5.3 *Determinação de proteínas totais nos extratos enzimáticos*

O método para determinação de proteína totais foi baseado em uma mistura contendo molibdato, tungstato e ácido fosfórico, (reagente Folin-Ciocalteu), que sofre uma redução quando reage com as proteínas

presentes nos extratos, na presença do catalisador cobre (II), e produz um composto com absorção em 660nm. É um método bastante sensível e as seguintes soluções são utilizadas como reagentes: solução (a): carbonato de sódio 2% (%massa/volume) em hidróxido de sódio 0.1N, Solução (b): tartarato de sódio e potássio 1% (%massa/volume) em água destilada e solução (c): Sulfato de cobre 1% (%massa/volume) em água destilada.

No momento da dosagem, as soluções a, b e c foram misturadas na proporção de 100:1:1, respectivamente. Alíquotas de 0,1mL de extrato enzimático diluído em 0,4mL de água destilada foram adicionadas em 2,5mL, contendo a mistura das soluções a, b e c (proporção 100:1:1, respectivamente). A mistura foi homogeneizada mantendo-a em repouso durante 15 min e então foi adicionado à 0,25mL de Folin- Ciocalteau 1N, agitando-se novamente para completa homogeneização. Após 30 min, foram realizadas leituras em espectrofotômetro (Modelo Ultospec™ 3100UV- Amersham Biosciences) no comprimento de onda de 660nm. Para a determinação quantitativa de proteínas foi construída uma curva de calibração utilizando soro de albumina bovina (SBA) como padrão (Sigma). Os experimentos foram realizados em triplicata. Os dados foram expressos em mg de proteína por mL de extrato enzimático (78).

3.6 Separação dos XOS por Cromatografia Líquida de alta Eficiência (CLAE) e elaboração de curva de calibração

Para a separação e elaboração de curva de calibração dos XOS foram pesados aproximadamente 1 mg dos seguintes padrões autênticos: xilose (X₁-

Sigma), xilobiose (X_2) xilotriose (X_3), xilotetraose (X_4), xilopentose (X_5), xiloheXOSe (X_6) (Megazyme-Irlanda) e transferidos para um balão volumétrico de 5 mL separadamente, resultando em uma solução pura de aproximadamente $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ para cada padrão em estudo. Essa solução resultante foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-SHIMADZU, modelo NEXERA XR), nas seguintes condições: coluna BIO-RAD Aminex HPX-87C (300 x 7,8 mm); temperatura: 80°C ; eluente: água Milli-Q com fluxo $0,6 \text{ mL.min}^{-1}$; volume de amostra: $20 \mu\text{L}$; detector: índice de refração a 60°C (Shimadzu, modelo RID- 20A) com um tempo de análise de 19 min.

A curva de calibração dos XOS foi determinada através do preparado de soluções com os padrões de grau analítico citados acima, secos sob pentóxido de fósforo e vácuo. Para a realização da curva de calibração foi realizado uma solução mista dos padrões citados acima, onde 4 mg de cada padrão foram pesados e transferidos para um balão volumétrico de 5 mL, resultando na solução mãe mista de $0,8 \text{ g.L}^{-1}$. Diluições sucessivas foram realizadas com a solução mãe mista 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) nas mesmas condições citadas acima.

3.7 Hidrólise enzimática das amostras

O SE e o SEP e suas respectivas hemiceluloses (HSE e HSEP) foram hidrolisados com xilanases comerciais (Cellulase-Sigma), Celluclast-

Novozymes) e (Xilanases-Verdartis). A hidrólise enzimática foi realizada com 80 UI de xilanases/grama de substrato (dados em base seca). As reações foram realizadas em tubos Falcon de 50 mL contendo aproximadamente 200 mg de amostra, com isso as reações foram realizadas a uma consistência (relação massa/água) de 2% (%massa/volume) em solução de tampão acetato de sódio 50 mM pH 4,8. Os experimentos foram realizados em triplicata sob agitação de 120 rpm a 45°C por até 72h. Durante o processo de sacarificação enzimática as reações foram monitoradas em intervalos de 3, 6, 12, 24, 48 e 72h. Após o período de reação as amostras foram fervidas por 5 min, centrifugadas e o sobrenadante congelado em freezer a -20°C até o momento do uso (79).

3.8 Determinação dos teores de XOS

Os teores de XOS foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE, SHIMADZU modelo NEXERA XR) de acordo com metodologia previamente descrita com algumas modificações (6). 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 (Milli Q) com fluxo 0,6 mL.min⁻¹: 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 previamente ajustados para 6,5 com NaOH 1M, prévio a injeção no cromatógrafo. Os experimentos foram realizados em triplicata. A conversão de xilana em XOS foi calculada através da equação 9:

$$Convers\tilde{a}o = \left(\left(\frac{XOS}{100} \right) \times fator\ XOS \right) \times (100\%)/(m) \quad (9)$$

Onde:

Conversão = Conversão mássica de xilana em xilose, xilobiose xilotriose, xilotretose ou oligossacarídeos com mais de 6 unidades repetitivas de xilose (%).

XOS = concentração de xilose, xilobiose xilotriose, xilotretose ou oligossacarídeos com mais de 6 unidades repetitivas de xilose) (g.L^{-1}).

Fator XOS = fatores de hidrólise de xilana em xilose (0,88), xilobiose (0,936), xilotriose = 0,956; xilotretose = (0,967) e oligossacarídeos com mais de 6 unidades repetitivas de xilose = 0,978).

m = massa inicial seca de xilana (g). Sendo, SE=0,0282g; SEP=0,032g; HSE=0,041g; HSEP=0,11g.

4. Resultados e Discussão

4.1 Composição química do subproduto de *Eucalyptus*

A figura 11A-B apresenta o subproduto de *Eucalyptus* oriundo do processamento da indústria de celulose (SO). A figura 11A mostra o aspecto visual do SO. O material apresenta-se na forma de uma serragem e um análise prévia (qualitativa-visual) mostra uma variação considerável em sua granulometria (material pouco homogêneo). Já a figura 11B mostra o mesmo subproduto, porém após sua moagem (SOM), o que culminou em uma maior homogeneidade.



Figura 11. Subproduto oriundo do processamento da indústria de celulose. (a) Subproduto original (SO). (b) Subproduto original moído (SOM).

Para a avaliação da composição química do subproduto em estudo foi utilizada a metodologia de hidrólise ácida para ML (76,74). O material previamente moído (Figura 11B) foi utilizado para determinação da composição química, pois mostrou uma maior homogeneidade quando comparado ao material original. Após a hidrólise ácida do SOM livre de extrativos (SE) foram analisados os teores de açúcares monoméricos e ácido acético presentes nos hidrolisados obtidos.

A coluna cromatográfica HPX-87H (específica para ácidos orgânicos), utilizada para análises de açúcares monoméricos e seus derivados em meio ácido, foi testada previamente ao início das análises. A figura 12 apresenta o cromatograma típico obtido com a coluna HPX-87H para a eluição dos seguintes padrões autênticos, com os seus respectivos tempos de retenção:

glicose (9,5 min), xilose (10,2 min), arabinose (10,9 min) e ácido acético (14,7 min). As curvas de calibração das concentrações de cada padrão autêntico (variável x, dada em g.L⁻¹) em função da intensidade do índice de refração (variável y, dada em milivolts) foram obtidas, como se segue: $y=265822x+157,22$, $R^2 = 0,9998$ (glicose); $y=254071x+239,67$, $R^2 = 0,9998$ (xilose); $y=376769x - 1126,5$, $R^2 = 0,9977$ (arabinose) e $y=112512x - 178,42$, $R^2 = 0,9992$ (ácido acético), respectivamente. Todas as curvas de calibração apresentaram um R^2 próximo de 1 o que indica que as mesmas se ajustaram em um modelo matemático linear. Desta forma, o cromatograma apresenta uma separação dos padrões testados com uma resolução intermediária, porém passível de calibração e quantificação dos teores de carboidratos e ácido acético em amostras desconhecidas (76,74).

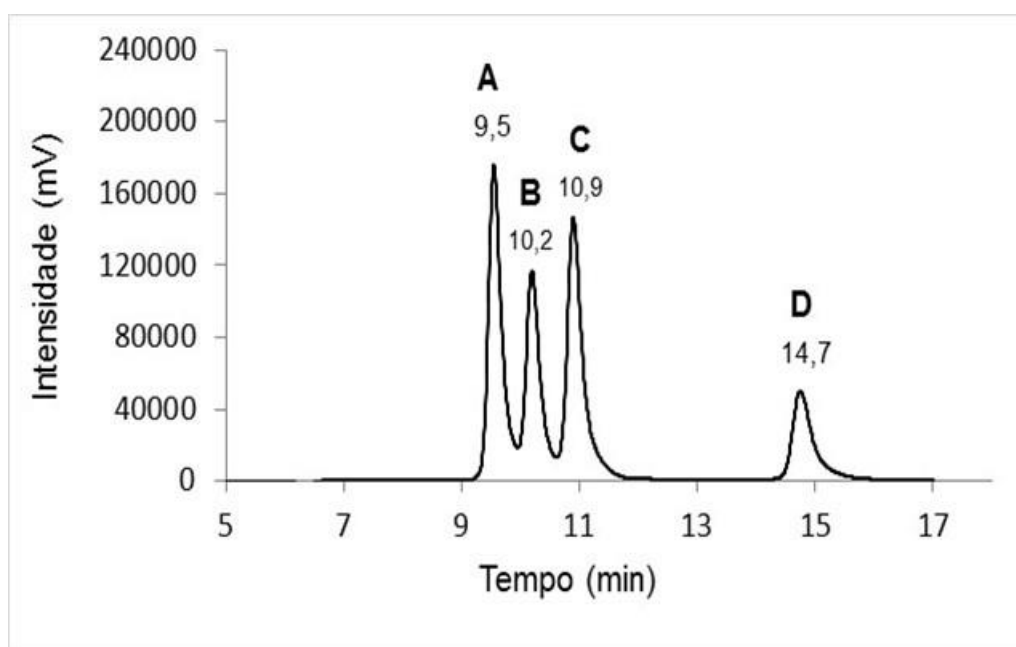


Figura 12. Cromatograma de padrões autênticos de (A) glicose, (B) xilose, (C) arabinose e (D) ácido acético obtidos com a coluna cromatográfica HPX-87H.

A Figura 13 apresenta o perfil do cromatograma obtido com a coluna HPX-87H do hidrolisado ácido da amostra da fração do subproduto de *Eucalyptus* em estudo. Com base nos tempos de retenção dos padrões apresentados na figura 12 podemos confirmar a presença de glicose, xilose e ácido acético na amostra em estudo. Entretanto, a arabinose, um outro composto presente neste tipo de biomassa, não foi detectado no subproduto de *Eucalyptus* em estudo.

Os teores de celulose, xilana, grupos acetil, lignina, cinzas e extraíveis no subproduto em estudo foram de 43,9%, 14,1%, 3,0%, 27,5%, 0,7% e 3,4% (%massa/massa), respectivamente. A soma de todos os componentes do subproduto foi de 92,6% (%massa/massa). O ácido metil-glucurônico, que é frequentemente encontrado em hemiceluloses de madeira, além de compostos derivados da oxidação de carboidratos (hidroximetilfurfural e furfural) não foram quantificados nas amostras em estudo. Desta forma, esses compostos foram atribuídos a fração dos componentes não determinados, o que explica a diferença da somatória dos componentes analisados (7,4%, massa/massa) (80),(81). A composição química do subproduto em estudo mostrou valores similares aos reportados na literatura para madeira de *Eucalyptus* (82). Todavia, o método utilizado para a quantificação da arabinose (item 4.2) não foi sensível o suficiente para sua quantificação. Desta forma, a presença de grupos arabinosil (que são comuns em biomassa de *Eucalyptus*) foi considerada não detectável nas amostras do subproduto em estudo.

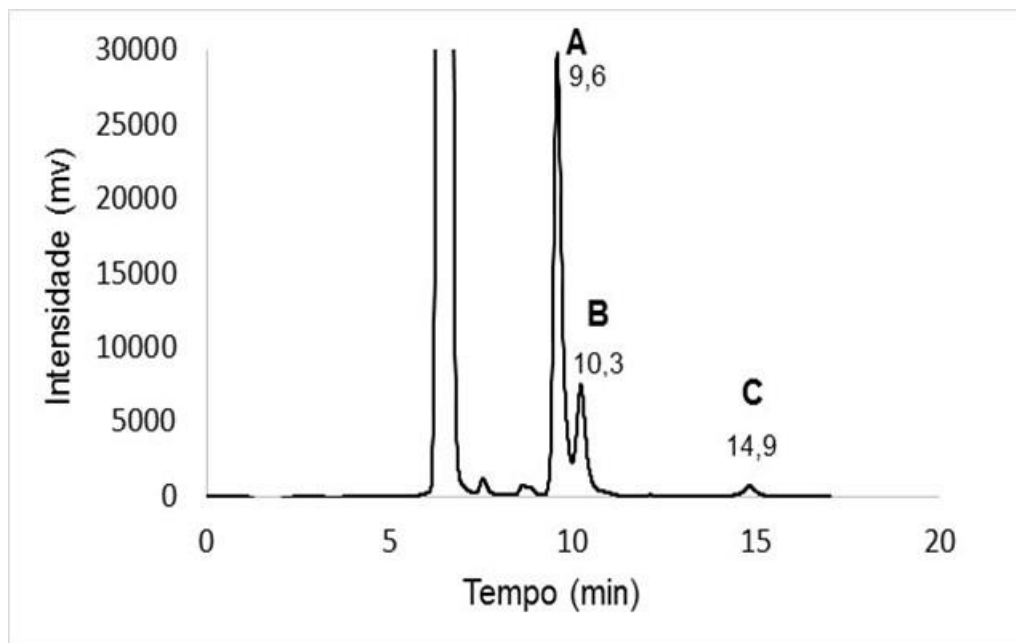


Figura 13. Cromatograma do hidrolisado ácido da fração do subproduto em estudo. Tempo de retenção de (A) glicose, (B) xilose, (C) ácido acético. Coluna HPX-87H.

4.2 Tratamento com clorito de sódio do subproduto de *Eucalyptus*

O subproduto moído-extraído (SE) foi submetido a um pré-tratamento químico com clorito de sódio (30). A figura 14 apresenta o aspecto visual do material após o pré-tratamento. O subproduto moído-extraído + pré-tratado com clorito por 180 min (SEP) sofreu um clareamento quando comparado ao SE, o que é comum nesse tipo de pré-tratamento devido a remoção da fração de lignina e seus derivados (Figura 14) (30). O pré-tratamento foi realizado a fim de se obter um subproduto com um teor reduzido de lignina, mantendo-se intacta as frações de hemicelulose e celulose. O objetivo foi obter um SEP que poderia servir como modelo para comparar com o SE. Esse modelo foi importante, pois mostrou efeito diferente nas etapas de extração de hemicelulose quando comparado ao SE. Além disso, o modelo também

permitiu avaliarmos o efeito da hidrólise enzimática (visando a produção de XOS) das frações de hemiceluloses nas amostras pré-tratadas (no subproduto (SEP) e na hemicelulose isolada do mesmo (HSEP)) em comparação as frações das hemiceluloses da amostra apenas moída-extraída (no subproduto (SE) e na hemicelulose isolada do mesmo (HSE)).

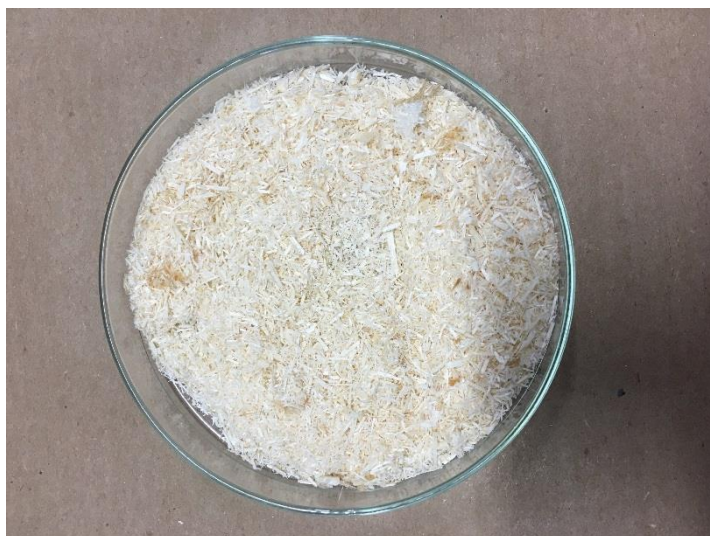


Figura 14. Subproduto oriundo do processamento da indústria de celulose após pré-tratamento com clorito de sódio por 180 min (SEP).

A Tabela 2 apresenta a recuperação do SE após o pré-tratamento com clorito de sódio em diferentes tempos de reação.

Tabela 2. Recuperação de massa do subproduto pré-tratado com clorito de sódio em diferentes tempos. Dados reportados em % (grama/100gramas de subproduto pré-tratado com clorito de sódio, dados em base seca).

Amostra	Tempo (min)	Rendimento (%)
0	0	-
1	60	89,1 ± 0,5
2	120	91,1 ± 1,3
3	180	86,1 ± 0,6
4	240	85,2 ± 1,2

Os rendimentos após o pré-tratamento com clorito de sódio foram similares nos diferentes tempos de reação testados (Tabela 2). Nos tempos de 60 e 120 min os rendimentos foram de aproximadamente 90%. Todavia, nos tempos de reação de 180 e 240 min os rendimentos foram um pouco menores (aproximadamente 85%) (Tabela 2). Entretanto, podemos considerar que os pré-tratamentos com clorito de sódio culminaram em processos de alto rendimento, ou seja, não houve uma perda muito elevada de massa do material de partida em comparação aos materiais pré-tratados.

Alguns autores reportaram na literatura o mesmo pré-tratamento com clorito de sódio, porém para bagaço de cana-de-açúcar. Os rendimentos obtidos neste caso foram de 91,4% (%massa/massa, 60 min de reação), 89,0% (%massa/massa, 120 min de reação), 82% (%massa/massa, 180 min de reação) e 80,2% (%massa/massa, 240 min de reação) (30). Os rendimentos do pré-tratamento no bagaço de cana-de-açúcar nos tempos de 60 e 120 min foram similares aos obtidos com o subproduto de *Eucalyptus* em estudo (90%, massa/massa). Entretanto, os rendimentos dos pré-tratamentos

do bagaço de cana-de-açúcar nos tempos de 180 e 240 min foram um pouco inferiores (aproximadamente 81%, massa/massa) quando comparado ao subproduto de *Eucalyptus* em estudo (aproximadamente 85%, massa/massa) (Tabela 2).

A tabela 3 apresenta a caracterização química dos componentes macromoleculares (celulose, xilana, grupo acetil e lignina total) e não macromoleculares (cinzas e extrativos) das diferentes amostras em estudo (SE e SEP). Para apresentar os componentes macromoleculares das amostras foram utilizados os fatores de correção de hidrólise, apresentados na Tabela 1 (seção de materiais e métodos, item 3.3.7). A tabela 3 apresenta também a composição química em relação ao material de partida após aplicar um balanço de massa.

As amostras tratadas com clorito de sódio por 60, 120, 180 e por 240 min (componentes brutos) apresentaram teores de celulose (49,4%, 49,9%, 50,6% e 51,1%, massa/massa), xilana (16,1%, 16,2%, 16,0% e 16,3%, massa/massa), grupo acetil (3,2%, 3,1%, 3,2% e 3,6%, massa/massa), lignina total (27,3%, 24,5%, 17,0% e 17,2%, massa/massa), cinzas (0,3%, 0,2%, 0,9% e 1,2%, massa/massa) e a soma dos componentes (96,3%, 93,9%, 87,7% e 89,4%, massa/massa), respectivamente (Tabela 3).

O balanço de massa é necessário para compararmos as frações do subproduto previamente pré-tratados com clorito de sódio diretamente com o subproduto não tratado. Os teores de celulose e xilana não foram alterados significativamente nas frações do subproduto pré-tratado com clorito de sódio quando comparado com o subproduto não pré-tratado (Tabela 3). Todavia, os

teores de lignina nas frações do subprodutos pré-tratados por 60, 120, 180 e 240 min foram reduzidos em 14,7%, 21,7%, 48,8% e 48,4% (massa/massa), respectivamente (Tabela 3). Desta forma, podemos afirmar que o pré-tratamento foi seletivo para remoção de lignina e que 180 min de pré-tratamento foi suficiente para remover 48,8% da lignina, além de manter as frações de celulose e xilana intactas. Assim, a amostra do subproduto pré-tratado com clorito de sódio por 180 min (SEP) foi selecionada como modelo para posterior extração de hemicelulose e produção de XOS.

Tabela 3. Composição química do subproduto de *Eucalyptus* (SE e pré-tratados com clorito de sódio) oriundo do subproduto de *Eucalyptus* gerado no processamento de cavacos de madeira na indústria de celulose. Dados apresentados em % mássica (grama/100gramas de material, dados em base seca).

Componentes da amostra (grama/100gramas de material bruto)							
Amostra	Rendimento pré-tratamento (%)	Celulose (%)	Xilana (%)	Grupo acetil (%)	Lignina total (%)	Cinzas (%)	Soma (%)
SE	-	45,6 ± 0,6	14,6 ± 0,3	3,1 ± 0,4	28,5 ± 0,6	0,7 ± 0,04	92,5
T1 (60 min)	89,1 ± 0,5	49,4 ± 1,9	16,1 ± 0,5	3,2 ± 0,1	27,3 ± 0,4	0,3 ± 0,1	96,3
T2 (120 min)	91,1 ± 1,3	49,9 ± 1,5	16,2 ± 0,4	3,1 ± 0,4	24,5 ± 0,1	0,2 ± 0,03	93,9
T3 (180 min)	86,1 ± 0,6	50,6 ± 1,1	16,0 ± 0,7	3,2 ± 0,5	17,0 ± 1,0	0,9 ± 0,1	87,7
T4 (240 min)	85,2 ± 1,2	51,1 ± 0,6	16,3 ± 0,8	3,6 ± 0,3	17,2 ± 1,1	1,2 ± 0,2	89,4
Componentes da amostra (grama/100gramas de material original – Balanço de massa)							
Amostra	Rendimento pré-tratamento (%)	Celulose (%)	Xilana (%)	Grupo acetil (%)	Lignina total (%)	Cinzas (%)	Soma (%)
SE	-	45,6 ± 0,6	14,6 ± 0,3	3,1 ± 0,4	28,5 ± 0,6	0,7 ± 0,04	92,5
T1 (60 min)	89,1 ± 0,5	44,0 ± 1,9	14,3 ± 0,5	2,8 ± 0,1	24,3 ± 0,4	0,3 ± 0,1	85,7
T2 (120 min)	91,1 ± 1,3	45,4 ± 0,4	14,7 ± 0,4	2,8 ± 0,4	22,3 ± 0,1	0,2 ± 0,1	85,4
T3 (180 min)	86,1 ± 0,6	43,6 ± 1,1	13,8 ± 0,7	2,8 ± 0,5	14,6 ± 1,0	0,8 ± 0,1	75,6
T4 (240 min)	85,2 ± 1,2	43,5 ± 0,6	13,9 ± 0,8	3,1 ± 0,3	14,7 ± 1,1	1,1 ± 0,2	76,3

*Extrativos no subproduto original moído (SOM) = 3,4% (grama/100gramas de material).

4.3 Avaliação da extração de hemicelulose

A extração da hemicelulose do SE e do SEP foi realizada com base na metodologia de extração de hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar (6).

Algumas condições experimentais foram modificadas devido as diferenças na composição química do bagaço de cana-de-açúcar quando comparado ao subproduto obtido no processamento de celulose. Os teores de celulose, hemicelulose e lignina reportados para o bagaço de cana-de-açúcar são de 42,4%, 25,2% e 19,6%, respectivamente (6). Entretanto, os teores de celulose, hemicelulose e lignina do subproduto oriundo do processamento de celulose foram de 43,9%, 17,1% e 27,5%, respectivamente (Tabela 3). Desta forma, o subproduto em estudo apresentou um teor similar de celulose, um maior teor de lignina (+29%) e um menor teor de hemicelulose (-32%) quando comparado ao bagaço de cana-de-açúcar. Assim, diferentes condições experimentais para extração de hemicelulose foram testadas, como por exemplo o aumento da concentração das soluções de hidróxido de sódio (NaOH) e hidróxido de potássio (KOH) e dos tempos de extração (8h e 12h).

Inicialmente foram realizados alguns ensaios de extração de hemicelulose somente do SE a fim de se determinar as melhores condições de extração. A tabela 4 apresenta os rendimentos e a composição química das hemiceluloses extraídas do SE em diferentes condições experimentais.

Tabela 4. Rendimento e composição química da hemicelulose extraída em diferentes condições experimentais oriunda do subproduto moído-extraído (SE) de *Eucalyptus* gerado no processamento de cavacos de madeira na indústria de celulose. Dados apresentados em % mássica (grama/100gramas de material, dados em base seca).

Ensaio	Rendimento hemicelulose (%)	Anidroglicose (%)	Xilana (%)	Grupo Arabinosil (%)	Lignina total (%)	Cinzas (%)	Soma (%)
NaOH 2M - 4h	20,1 ± 1,3	1,6 ± 0,1	6,5 ± 0,3	0,7 ± 0,2	0,1 ± 0,01	29,8 ± 0,9	58,7
KOH 2M - 4h	37,5 ± 1,7	2,4 ± 0,2	9,6 ± 1,2	1,0 ± 0,2	0,1 ± 0,02	59,9 ± 1,6	73,0
NaOH 5M - 4h	22,0 ± 0,2	4,1 ± 0,8	8,4 ± 0,02	1,2 ± 0,1	1,1 ± 0,02	na	-
KOH 5M - 4h	54,3 ± 0,5	8,4 ± 0,9	6,4 ± 0,6	0,9 ± 0,4	0,1 ± 0,01	na	-
NaOH 2M - 8h	32,0 ± 0,3	2,3 ± 0,1	11,2 ± 0,4	1,5 ± 0,5	0,3 ± 0,02	na	-
KOH 2M - 8h	44,0 ± 0,9	1,2 ± 0,01	7,6 ± 0,9	1,3 ± 0,1	0,1 ± 0,01	na	-
Xilana Comercial de Birchwood	-	1,0 ± 0,2	58,8 ± 1,2	nd	4,1 ± 1,1	12,6 ± 1,0	76,6

na = não analisado. nd = não detectado.

Os rendimentos das extrações da hemicelulose foram de 20,1% e 37,5% (%massa/massa), para as condições com NaOH 2M e KOH 2M, 4h de extração, respectivamente) (Tabela 4). Entretanto, quando a concentração da solução alcalina foi alterada para 5M, os rendimentos das extrações foram de 22% e 54,3% (%massa/massa), para as condições com NaOH e KOH, 4h de extração, respectivamente) (Tabela 4). Os aumentos no tempo de extração da hemicelulose do SE, para ambos álcalis utilizados, culminaram em rendimentos de 32% e 44% (%massa/massa), para as condições com NaOH 2M e KOH 2M, 8h de extração, respectivamente). Assim, a extração de hemicelulose do SE em estudo com NaOH e KOH com aumento de 4h para 8h culminaram em maiores rendimentos. Todavia, a extração de hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar utilizando-se condições similares (NaOH 2M, 4h de extração) proporcionaram um rendimento da ordem de 86% (%massa/massa) (6).

A tabela 4 apresenta os teores dos componentes encontrados nas hemiceluloses extraídas nas diferentes condições avaliadas. Os teores de celulose, xilana, grupo arabinosil, lignina e cinzas variaram de 1-8,4%; 6,5-58,8%; 0,7-1,5%; 0,1-4,1% e 12,6-59,9%, (%massa/massa), respectivamente. Os teores de celulose nas hemiceluloses extraídas foram desprezíveis, corroborando com sua insolubilidade na solução extratora (14,15). Porém, os teores de cinzas na hemicelulose extraída com KOH 2M foi elevado (atingindo 59,9%, massa/massa) quando comparado a hemicelulose comercial de Birchwood (12,4%, massa/massa) (Tabela 4), o que indica a formação de grandes quantidades de sal durante a neutralização da solução alcalina pós-extração de hemicelulose. As hemiceluloses extraídas apresentaram somente a presença de traços de grupos acetil, diferentemente do que ocorreu com o SE e

SEP (Tabela 3). Esse fato pode ter explicado devido a degradação das ligações do tipo éster entre o ácido acético e a xilana no processo de extração da hemicelulose (31). Nas frações de hemicelulose isoladas foi possível detectar a presença do grupo arabinosil (Tabela 4), diferentemente dos SE e SEP onde não foi possível detectar o mesmo (Tabela 3). Esse efeito pode ser explicado pelo processo de extração de hemicelulose onde há um enriquecimento da fração de grupos arabinosil e consequentemente aumento no seu teor, devido a ligação existente entre a xilana e arabinose que é uma ligação tipo éter, ou seja, mais difícil de se romper quando comparado com a ligação existente entre a xilana e ácido acético (figura 2) o que justifica a detecção do mesmo (17,31,84). As condições de extração com as soluções de NaOH 2M (tempo de extração de 8h) e KOH 2M (tempo de extração de 4h) culminaram nos maiores conteúdos de hemicelulose (11,2% e 9,6%, massa/massa), respetivamente. Todavia, a hemicelulose comercial de Birchwood mostrou um conteúdo de hemicelulose de 58,8% (%massa/massa) (Tabela 4).

Os dados de rendimento e conteúdo de xilana das hemiceluloses extraídas do SE foram inferiores ao reportado na literatura para outros ML (Tabela 4) (6). A literatura reporta que os rendimentos da extração de hemiceluloses de diversas matérias-primas são proporcionais ao aumento no tempo de extração e da concentração de H_2O_2 (6,30). Com base nessa teoria, um novo ensaio foi realizado, aumentando-se os tempos de extração de 4h para 12h. Neste último ensaio foi utilizada apenas a solução alcalina de NaOH 2M para correção do pH da solução extratora, uma vez que quando se utilizou KOH o teor de cinzas presente nas amostras foi muito elevado (Tabela 4). O aumento no teor de cinzas foi proporcional ao volume de KOH utilizado para ajustar o pH a 11,6.

A Figura 15A-B mostra o aspecto visual das hemiceluloses obtidas com os ajustes das variáveis de extração propostas. A figura 15A apresenta a hemicelulose oriunda do subproduto apenas moído-extraído (HSE), já a figura 15B a hemicelulose oriunda do subproduto moído-extraído e pré-tratado com clorito de sódio por 180 min (HSEP). Visualmente é notável o aspecto mais branqueado da HSEP (Figura 15B), enquanto que na HSE foi observado um aspecto visual mais escuro (Figura 15A).



Figura 15. Hemiceluloses extraídas com H_2O_2 6% (massa/volume) por 12h. (a) Hemicelulose extraída do subproduto apenas moído-extraído (HSE). (b) Hemicelulose extraída do subproduto moído-extraído e pré-tratado com clorito de sódio por 180 min (HSEP).

A tabela 5 apresenta os rendimentos e a composição química das hemiceluloses extraídas do SE e SEP. O rendimento da hemicelulose obtida após 12h de extração foi maior no SEP (62,6%, massa/massa) do que no SE (22,8%, massa/massa) (Tabela 5).

Tabela 5. Composição química da hemicelulose extraída do subproduto (SE e SEP) de *Eucalyptus* gerado no processamento de cavacos de madeira na indústria de celulose. Dados apresentados em % mássica (grama/100gramas de material de material, dados em base seca).

Ensaio	Rendimento hemicelulose (%)	Anidroglicose (%)	Xilana (%)	Grupo Arabinosil (%)	Lignina total (%)	Cinzas (%)	Soma (%)	Taxa de extração*
Moído-extraído (NaOH) 2M-12 h	22,8 ± 1,1	5,5 ± 0,1	20,5 ± 0,4	3,2 ± 0,1	4,8 ± 0,3	28,2 ± 0,2	62,2	1,6
Pré-tratado (NaOH) 2M-12 h	62,6 ± 1,5	4,3 ± 0,4	55,0 ± 0,9	2,1 ± 0,1	4,0 ± 0,3	14,1 ± 0,6	79,5	4,3
Xilana Comercial de Birchwood	-	1,0 ± 0,2	58,5 ± 1,2	nd	4,6 ± 0,4	12,6 ± 1,0	76,7	-

nd = não detectado

(*)= relação entre percentagem de hemicelulose extraída e o teor de lignina do material de partida.

Os teores de celulose, xilana, grupo arabinosil, lignina e cinzas nas amostras em estudo variaram de 1-5,5%, 20,5-55,0%, 2,1-3,2%, 4-4,8% e 12,6-28,2% (%massa/massa), respectivamente (Tabela 5). A composição química da hemicelulose obtida do subproduto em estudo também foi comparada com a xilana comercial de Birchwood pelo fato do subproduto ser um material similar (em termos de composição química) com a madeira de Birchwood (matéria-prima da hemicelulose comercial) (Tabela 5) (84).

O HSEP e a xilana comercial de Birchwood culminaram nos maiores teores de hemicelulose (57,1% e 58,5%, massa/massa, respetivamente). Todavia, a HSE mostrou um teor de hemicelulose de 23,7% (%massa/massa) (Tabela 5). O maior conteúdo de xilana e rendimento da HSEP pode ser explicado devido ao processo de deslignificação que o clorito de sódio promove no material, ou seja, remoção de lignina (item 4.2 - avaliação da composição química das frações em estudo), além do aumento de superfície de área e porosidade (31). Desta forma, o maior teor de xilana do subproduto pré-tratado poderá ser benéfico no processo de hidrolise enzimática (visando a produção de XOS) do mesmo.

O rendimento de extração de hemicelulose do subproduto apenas moído-extraído (28,5%, massa/massa, Tabela 5) corrobora ao reportado em outro estudo onde foi realizado a extração da hemicelulose de palha de trigo utilizando H_2O_2 2% (massa/volume), ajustando o pH da solução para 11,6 com NaOH por 16h. Nessas condições, o rendimento de hemicelulose de palha de trigo foi de 26,6% (%massa/massa) (34). Entretanto, o teor de xilana da HSE foi de apenas 23,7% (%massa/massa), enquanto da hemicelulose de palha de trigo foi de 76,9% (%massa/massa), sugerindo que o processo de extração do subproduto em

estudo foi limitado pelas características da estrutura do material que o torna resistente à degradação das frações polissacarídica se tornando um ponto crítico no isolamento da hemicelulose (26).

Quanto a taxa de extração do processo visando isolar a hemicelulose pode-se observar que o SEP apresenta uma taxa de extração de 4,6 vezes equanto que SE apresenta uma taxa de 1,6, cerca de 3 vezes menos que o material SEP (tabela 5). Essa diferença entre as taxas de extração das hemiceluloses está diretamente relacionada ao teor de lignina presente em cada subproduto visto que o SE apresenta 28,5 % de lignina em sua composição enquanto que o SEP apresenta 14,6%, confirmando que o teor de lignina interfere diretamente na extração da hemicelulose por isso a necessidade da realização de um pré tratamento visando a remoção ou diminuição deste componente.

4.4 Avaliação de atividades enzimáticas em extratos comerciais

O presente projeto propôs estudos de hidrólise enzimática das frações do SE e SEP, bem como suas hemiceluloses obtidas (HSE e HSEP). Para estes estudos três extratos enzimáticos comerciais contendo atividades de xilanases foram caracterizados, como se segue: Celluclast oriunda de *Trichoderma* (Novozymes), Cellulase oriunda de *Trichoderma* (Sigma) e Xilanases oriunda de *Escherichia coli* (Verdatis). Os extratos em estudo foram caracterizados em relação aos teores de proteínas totais e atividades de xilanases (xilanases totais e β -xilosidases).

A tabela 6 apresenta os teores de proteínas totais e atividades específicas dos extratos enzimáticos comerciais. Os teores de proteínas totais dos extratos

enzimáticos Cellulase, Celluclast e Xilanases foram de 40, 25,4 e 4,7 mg.mL⁻¹, respectivamente (Tabela 6). As atividades específicas dos extratos enzimáticos Cellulase, Celluclast e Xilanases foram de 17,5, 27,3 e 28,4 UI.mg⁻¹ (xilanases totais) e 0,1, 0,2 e 0,2 UI.mg⁻¹ (β-xilosidases), respectivamente (Tabela 6). Todos extratos em estudo apresentaram altas atividades específicas de xilanases, sendo que o extrato enzimático Xilanases (Verdartis) e o extrato Celluclast (Novozymes) apresentaram atividades semelhantes. Todavia, as atividades específicas de β-xilosidases foram relativamente baixas nos três extratos em estudo (Tabela 6). Assim, os extratos enzimáticos podem ser considerados como bons candidatos para a avaliação da hidrólise enzimática do subproduto e de suas frações obtidas visando a produção de XOS.

Tabela 6. Atividades enzimáticas específicas e teores de proteínas dos extratos comerciais.

Preparados Enzimáticos	Proteínas totais (mg.mL ⁻¹)	Xilanases totais (UI.mg ⁻¹)	β-xilosidases (UI.mg ⁻¹)
Celluclast (Novozymes)	25,4	27,3 ± 1.4	0,2 ± 0.001
Cellulase (Sigma)	40,0	17,5 ± 0.9	0,1 ± 0.008
Xilanases (Verdartis)	4,5	28,3 ± 1,3	0,2 ± 0,003

4.5 Avaliação da separação dos XOS por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A figura 16 apresenta o cromatograma típico obtido com coluna BIO-RAD Aminex HPX-87C, para a eluição dos seguintes padrões autênticos de XOS com

os seus respectivos tempos de retenção: xilopentose/xiloheXOSe (7,2 min), xilotetraose (7,5 min), xilotriose (8,2 min), xilobiose (9,2 min) e xilose (11,4 min). Os padrões autênticos xilopentose e xiloheXOSe apresentam tempos de retenção semelhante quando analisados separadamente (6,8 e 7,0 min, respectivamente). Porém, quando esses padrões foram misturados em uma mesma solução, não foi possível realizar a separação dos mesmos através da coluna BIO-RAD Aminex HPX-87C, uma vez que os picos coeluíram (Figura 16, Pico A). Os padrões xilopentose e xiloheXOSe foram considerados uma mistura, sendo realizado uma curva de calibração que contempla os dois compostos juntos. As curvas de calibração das concentrações (variável x, dada em g.L⁻¹) de cada padrão autêntico em função da intensidade do índice de refração (variável y, dada em milivolts) foram obtidas como se segue: $y=262786x - 1178,4$ com $R^2 = 0,999$ (xilopentose+xiloheXOSe); $y=529392x - 10982$ com $R^2 = 0,996$ (xilotetraose); $y=246656x + 1502,6$ com $R^2 = 0,9995$ (xilotriose); $y=216113x + 1415,2$ com $R^2 = 0,9994$ (xilobiose) e $y=251976x + 547,73$ com $R^2 = 0,9999$ (xilose), respectivamente. Todas as curvas de calibração apresentaram um R^2 próximo de 1 o que indica que as mesmas se ajustaram em um modelo matemático linear. Desta forma, o cromatograma apresenta uma separação dos padrões testados com uma resolução intermediária, porém passível de calibração e quantificação dos XOS em amostras desconhecidas.

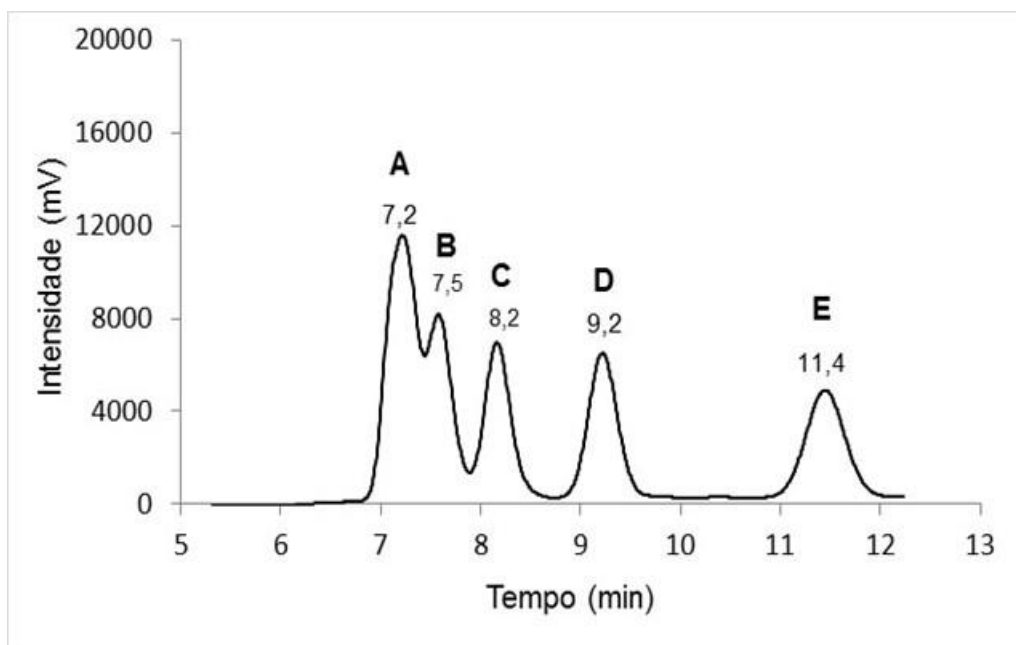


Figura 16. Cromatograma de padrões autênticos de (A) Coelução de xilopentose e xiloheXOSe, (B) xilotetraose, (C) xilotriosee (D) xilobiose, (E) xilose. Coluna cromatográfica BIO-RAD Aminex HPX-87C.

A figura 17 apresenta o perfil do cromatograma obtido com a coluna HPX-87C dos XOS obtidos através da hidrólise enzimática da fração de HSEP utilizando o extrato enzimático Celluclast (Novozymes) por 72h. Com base nos tempos de retenção dos padrões apresentados na figura 16 podemos confirmar a presença de xilotetraose (X_4 , 7,5 min), xilobiose (X_2 , 9,2 min) e xilose (X_1 , 11,4 min). Através do cromatograma podemos observar também o aparecimento de XOS de cadeia com mais de 6 unidades repetitivas de xilose ($>X_6$, 6,7 min) o qual quantificamos utilizando a equação da reta da xilpentose/xiloheXOSe uma vez que não existem padrões autênticos disponíveis comercialmente para esse XOS.

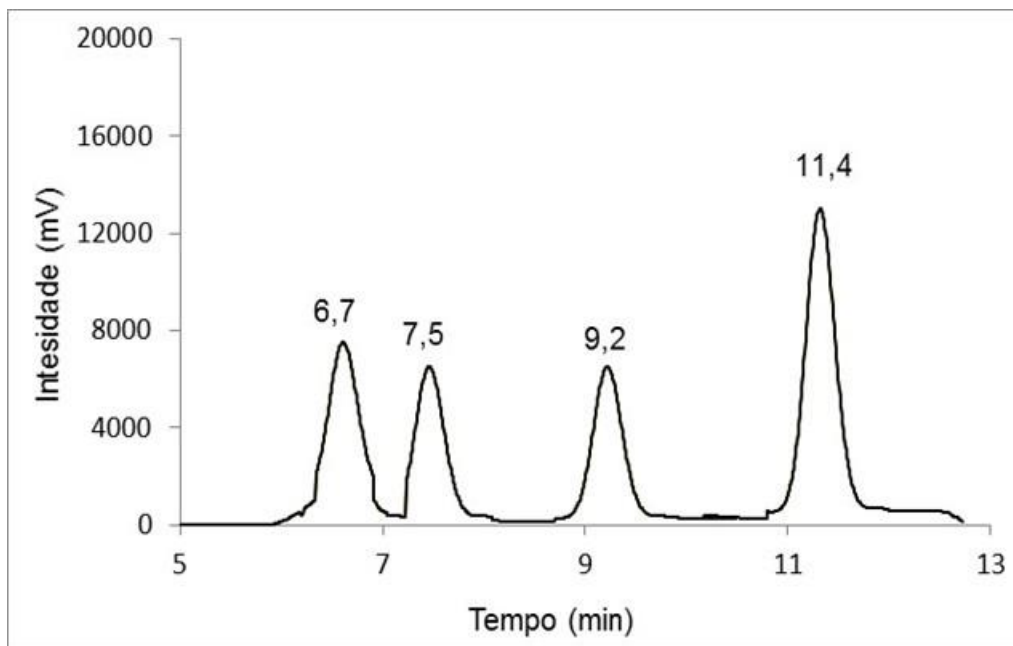


Figura 17. Cromatograma obtido da análise dos produtos da hidrólise enzimática da HSEP com extrato enzimático Celluclast (Novozymes): **(A)** XOS com mais de 6 xiloses **(B)** xilotetraose, **(C)** xilobiose, **(D)** xilose. Coluna cromatográfica BIO-RAD Aminex HPX-87C.

4.6 Hidrólise enzimática das frações em estudo

Os ensaios de hidrólise enzimática das frações em estudo foram realizados com os seguintes extratos enzimáticos comerciais: Celluclast (Novozymes), Cellulase (Sigma) e Xilanases (Verdartis). O objetivo da hidrólise enzimática nas frações em estudo foi avaliar a produção de XOS. Inicialmente a hidrólise enzimática foi avaliada com o SE e com o SEP. As hemiceluloses oriundas dos subprodutos HSE e HSEP (extraídas com NaOH 2M por 12h, Tabela 5) também foram submetidas a ensaios de hidrólise enzimática posteriormente. Além disso, uma hemicelulose comercial oriunda de madeira de Birchwood também foi avaliada frente à hidrólise enzimática. Foram calculadas as conversões de xilana nos seguintes produtos: (X_1) =Xilose, (X_2) =Xilobiose, (X_3) =Xilotriose,

(X₄)=(Xilotriose), (X₆/X₅)=Xilohexose+Xilopentose e (>X₆)=Xilos com mais de seis unidades repetitivas de xilose. Todos os ensaios foram realizados com os três extratos enzimáticos em estudo.

4.7 Hidrólise enzimática dos subprodutos moído-extraído e pré-tratado com clorito

A tabela 7 apresenta os resultados da hidrólise enzimática do SE. As conversões de xilana em >X₆, X₄ e Xilos foram ranqueadas de acordo com o extrato comercial utilizado, ao longo dos tempos de hidrólise enzimática (3-72h), como se segue: 0,9-4,7%, 0,7-3,6% e 1,8-8,3% (Celucast), 0,5-4,7%, 0,2-3,0% e 1,8-8,3% (Cellulase) e 0,8-5,3%, 1,1-3,6% e 0,8-8,5% (Xilanases) (%massa/massa), respectivamente. Todavia, não foram detectadas a presença de X₆/X₅, X₃, X₂ e X₁ ao longo do processo de hidrólise enzimática (3-72h), com ambos os extratos em estudo (Tabela 7). O símbolo (**Xilos) apresentado nas tabelas 7, 8, 9, 10 e 11 representa a soma dos seguintes compostos: (>X₆)+(X₄)+(X₂). A concentração máxima de Xilos obtida com a hidrólise enzimática do SE foi de 0,25 g.L⁻¹ (extrato Xilanases, em 48h de hidrólise enzimática, tabela 7).

De um modo geral a formação de XOS foi limitada frente ao SE, atingindo um valor máximo de conversão de xilana em XOS de 8,5% (%massa/massa) (extrato Xilanases, em 48h de hidrólise enzimática, tabela 7). Um dos fatores limitantes para a hidrólise enzimática da fração de xilana do SE está relacionado à disponibilidade da xilana presente na matriz da parede celular do material. A xilana em ML é ocluída pela lignina formando uma espécie de rede ao redor da xilana, bem como ligações do tipo éster e éter entre o complexo lignina-carboidrato

(lignina e xilana) (Figuras 4 e 5) (85,17,86). Desta forma, o fato de o SE conter um alto conteúdo de lignina (28,5%, massa/massa) explica, em parte, a limitação da hidrólise enzimática da fração de xilana, pois quanto maior o teor de lignina, maior a probabilidade de oclusão da fração de xilana.

Tabela 7. Conversão de xilana do SE oriundo de *Eucalyptus* gerado no processamento de cavacos de madeira na indústria de celulose. Dados de conversão apresentados em % mássica (gramas/100gramas de material, dados em base seca).

Extrato enzimático	Tempo (h)	Conversão de xilana em produtos (%)					Concentração de produtos (g.L ⁻¹)
		>X ₆	X ₄	X ₂	X ₁	**Xilos	**Xilos
Celucast (Novozymes)	3	0,9 ± 0,1	0,9 ± 0,01	*nd	*nd	1,8	0,051
	6	1,9 ± 0,1	1,1 ± 0,05	nd	nd	3,0	0,085
	12	2,7 ± 0,1	1,7 ± 0,1	nd	nd	4,4	0,13
	24	5,4 ± 0,3	2,5 ± 0,2	nd	nd	7,9	0,22
	48	4,8 ± 0,2	3,5 ± 0,1	nd	nd	8,3	0,23
	72	3,5 ± 0,1	2,8 ± 0,1	nd	nd	6,3	0,18
Celullase (Sigma)	3	0,5 ± 0,02	nd	nd	nd	0,5	0,015
	6	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,03	nd	nd	2,0	0,057
	12	2,2 ± 0,1	1,5 ± 0,1	nd	nd	3,7	0,10
	24	4,7 ± 0,2	2,3 ± 0,1	nd	nd	7,0	0,20
	48	4,0 ± 0,05	3,0 ± 0,1	nd	nd	7,0	0,20
	72	3,0 ± 0,3	3,0 ± 0,05	nd	nd	6,0	0,17
Xilanases (Verdartis)	3	0,8 ± 0,02	nd	nd	nd	0,8	0,023
	6	2,0 ± 0,2	1,1 ± 0,01	nd	nd	3,1	0,090
	12	2,3 ± 0,1	1,9 ± 0,1	nd	nd	4,2	0,12
	24	5,1 ± 0,2	2,6 ± 0,1	nd	nd	7,7	0,22
	48	4,9 ± 0,2	3,6 ± 0,1	nd	Nd	8,5	0,25
	72	3,6 ± 0,2	2,9 ± 0,2	nd	Nd	6,5	0,19

*nd = não detectado. (X₁)=Xilose, (X₂)=Xilobiase, (X₃)=xilotriose, (X₄)=Xilotetraose, (X₅/X₆)= Xilopentaose+Xilohexose e (>X₆)=XOS com mais de seis unidades repetitivas. **Xilos = (>X₆)+(X₄)+(X₂).

A tabela 8 apresenta os resultados da hidrólise enzimática do SEP. As conversões de xilana em $>X_6$ foram ranqueadas de acordo com o extrato comercial utilizado, ao longo dos tempos de hidrólise enzimática (3-72h), com se segue: 2-6,1% (Celucast), 0,9-6,1% (Cellulase) e 1,7-6,3% (Xilanases) (%massa/massa). As conversões de xilana em X_4 , X_2 e X_1 também foram ranqueadas, com se segue: 1,6-4,6%, 0,6-5,3% e 2,5-8,5% (Celucast), 0,8-4,8%, 0,5-5,1% e 2,1-8,6% (Cellulase) e 1,4-4,9%, 0,7-5,6% e 2,1-8,7% (Xilanases) (%massa/massa), respetivamente. As conversões de xilana em Xilos também foi ranqueada, com se segue: 4,2-15,5% (Celucast), 2,2-16% (Cellulase) e 3,8-16,1% (Xilanases) (%massa/massa). Todavia, não foi detectada a presença de X_3 e X_6/X_5 ao longo da hidrólise enzimática (4-72h) com os extratos em estudo (Tabela 8). A concentração máxima de XOS e X_1 obtida com a hidrólise enzimática do SEP foi de 0,51 e 0,28 g.L⁻¹, respectivamente (extrato Xilanases, em 48h e 72h de hidrólise enzimática, respectivamente, tabela 8).

Tabela 8. Conversão de xilana do SEP oriundo de *Eucalyptus* gerado no processamento de cavacos de madeira na indústria de celulose. Dados de conversão apresentados em % mássica (gramas/100gramas de material, dados em base seca).

Extrato enzimático	Tempo (h)	Conversão de xilana em produtos (%)					Concentração de produtos (g.L ⁻¹)	
		>X ₆	X ₄	X ₂	X ₁	**Xilos	X ₁	**Xilos
Celucast (Novozymes)	3	2,0 ± 0,2	1,6 ± 0,1	0,6 ± 0,1	2,5 ± 0,1	4,2	0,080	0,13
	6	4,5 ± 0,3	2,8 ± 0,2	1,4 ± 0,2	2,8 ± 0,2	8,7	0,090	0,28
	12	5,4 ± 0,2	3,4 ± 0,2	2,4 ± 0,1	3,6 ± 0,3	11,2	0,11	0,36
	24	6,1 ± 0,4	4,3 ± 0,2	4,1 ± 0,3	4,3 ± 0,2	14,5	0,14	0,46
	48	5,6 ± 0,1	4,6 ± 0,2	5,3 ± 0,2	6,6 ± 0,4	15,5	0,21	0,50
	72	4,3 ± 0,3	4,0 ± 0,3	4,5 ± 0,2	8,5 ± 0,2	12,8	0,27	0,41
Celullase (Sigma)	3	0,9 ± 0,01	0,8 ± 0,01	0,5 ± 0,02	2,1 ± 0,2	2,2	0,067	0,070
	6	3,3 ± 0,3	2,5 ± 0,1	1,5 ± 0,2	2,6 ± 0,1	7,3	0,083	0,23
	12	4,0 ± 0,3	2,7 ± 0,2	2,6 ± 0,2	3,0 ± 0,1	9,3	0,096	0,30
	24	5,4 ± 0,3	4,1 ± 0,1	3,2 ± 0,2	4,3 ± 0,3	12,7	0,14	0,41
	48	6,1 ± 0,1	4,8 ± 0,1	5,1 ± 0,1	6,1 ± 0,4	16,0	0,19	0,51
	72	5,2 ± 0,3	3,7 ± 0,02	4,6 ± 0,4	8,6 ± 0,1	13,5	0,27	0,43
Xilanases (Verdatis)	3	1,7 ± 0,2	1,4 ± 0,01	0,7 ± 0,01	2,1 ± 0,1	3,8	0,070	0,12
	6	4,2 ± 0,3	2,9 ± 0,05	1,5 ± 0,01	3,3 ± 0,1	8,6	0,10	0,27
	12	5,5 ± 0,2	3,5 ± 0,03	3,0 ± 0,1	3,9 ± 0,1	12,0	0,12	0,38
	24	6,3 ± 0,1	4,5 ± 0,03	3,9 ± 0,2	5,0 ± 0,2	14,7	0,16	0,47
	48	5,6 ± 0,1	4,9 ± 0,1	5,6 ± 0,2	6,4 ± 0,2	16,1	0,20	0,51
	72	4,1 ± 0,2	3,7 ± 0,04	4,8 ± 0,3	8,7 ± 0,1	12,6	0,28	0,40

(X₁)=Xilose, (X₂)=Xilobiose, (X₃)=xilotriose, (X₄)=Xilotretose, (X₅/X₆)= Xilopentose+Xilohexose e (>X₆)=XOS com mais de seis unidades repetitivas.

**Xilos = (>X₆)+(X₄)+(X₂).

A formação de Xilos via hidrólise enzimática a partir do SEP foi mais intensa, atingindo um valor máximo de conversão de 16,1% (%massa/massa) (extrato Xilanases, em 48h de hidrólise enzimática, tabela 8), sendo 1,9 vezes maior quando comparado ao valor de conversão do SE (Tabela 7). O SEP mostrou uma maior conversão em X_6 e X_4 quando comparado ao SE (em ambos os extratos em estudo) (Tabelas 7 e 8). Além disso, neste caso houve a formação de X_2 e X_1 , o que não tinha ocorrido com o SE (Tabela 7 e 8). O aumento na conversão do SEP pode ser explicado pelo menor conteúdo de lignina presente no material (17%, massa/massa, tabela 3), sugerindo uma menor oclusão da xilana pela lignina (86). Desta forma, uma fração das ligações do tipo éter e éster presentes no complexo lignina-carboidrato do SEP em estudo foram rompidas (pré-tratamento com clorito de sódio) facilitando a hidrólise enzimática da fração de xilana (85).

Um estudo recente com bagaço de cana-de-açúcar mostrou o efeito da hidrólise enzimática da fração de xilana do material não tratado (material original, com 19% de lignina, massa/massa) e o material previamente pré-tratado com clorito de sódio (com 7% de lignina, massa/massa) (30). O material não tratado apresentou uma conversão máxima de xilana em xilose da ordem de 10% (%massa/massa, em 48h de hidrólise), enquanto que o material pré-tratado, apresentou uma conversão máxima de xilana em xilose da ordem de 60% (%massa/massa, em 48h de hidrólise) (30). Esse estudo mostrou que o processo de deslignificação dos ML facilita o acesso das enzimas hidrolíticas aos polissacarídeos, corroborando com os dados de conversão de xilana em Xilos dos SEP e SE. Todavia, os teores de lignina do bagaço de cana-de-açúcar não tratado e pré-tratado com clorito de sódio (19% e 7%, massa/massa,

respectivamente) são inferiores ao SE e SEP (28,5% e 14,6%, massa/massa), respectivamente. Desta forma, a conversão máxima de xilana em XOS do SE (8,5%, massa/massa, extrato Xilanases em 48h de hidrólise, tabela 7) e do SEP (16,1%, massa/massa, extrato Xilanases em 48h de hidrólise, tabela 8) foram ainda inferiores quando comparado as amostras do bagaço de cana-de-açúcar.

Um estudo recente mostrou que o substrato de casca de soja previamente pré-tratada com H₂O₂ e ácido acético foi susceptível a hidrólise enzimática com xilanases. O material mostrou a formação (qualitativa) de X₂, X₃ e X₄, indicando que a fração da hemicelulose do material pré-tratado foi mais facilmente hidrolisada quando comparada ao material não tratado (material original) (17). Esse comportamento da casca de soja pré-tratada também corrobora com os dados de conversão de xilana em Xilos dos SE e SEP.

4.8 Hidrólise enzimática das hemiceluloses oriundas dos subprodutos moído-extraído (HSE) e pré-tratado com clorito (HSEP)

A tabela 9 apresenta os resultados da hidrólise enzimática da HSE. As conversões de xilana em >X₆ foram ranqueadas de acordo com os extratos comerciais utilizados, ao longo dos tempos de hidrólise enzimática (3-72h), como se segue: 3,7-6,8% (Celucast), 3,6-5,8% (Cellulase) e 2,2-5,9% (Xilanases) (%massa/massa). As conversões de xilana em X₄, X₂ e X₁ também foram ranqueadas, como se segue: 1,8-3,3%, 1,2-4,7% e 3,8-20% (Celucast), 1,9-2,9%, 1,2-4,3% e 1,5-20% (Cellulase) e 1,8-3,5%, 1,1-7,1% e 3,6-20% (Xilanases) (%massa/massa), respectivamente. As conversões de xilana em Xilos também foi ranqueada, como se segue: 10,1-13,3% (Celucast), 8,9-11,5% (Cellulase) e 8,8-13,7% (Xilanases), (%massa/massa). Todavia, não foram

detectadas as presenças de X_6/X_5 e X_3 , ao longo da hidrólise enzimática (3-72h) com os extratos em estudo (Tabela 9). A exceção foi à conversão de $0,8 \pm 0,1$ e $0,4 \pm 0,02$ (%massa/massa) de xilana em X_3 nos tempos de 3h e 6h quando foi utilizado extrato enzimático Celuclast, respetivamente.

Tabela 9. Conversão de xilana em produtos da HSE oriunda de *Eucalyptus* gerado no processamento de cavacos de madeira na indústria de celulose. Dados de conversão apresentados em % mássica (gramas/100gramas de material, dados em base seca).

Extrato enzimático	Tempo (h)	Conversão de xilana em produtos (%)					Concentração produtos (g.L ⁻¹)	
		>X ₆	X ₄	X ₂	X ₁	**Xilos	X ₁	**Xilos
Celucast (Novozymes)	3	6,8 ± 0,03	1,8 ± 0,1	1,2 ± 0,1	3,8 ± 0,2	10,6	0,16	0,43
	6	6,3 ± 0,02	1,9 ± 0,03	2,3 ± 0,04	5,3 ± 0,03	10,9	0,22	0,45
	12	5,5 ± 0,1	2,3 ± 0,1	3,1 ± 0,1	6,4 ± 0,1	10,9	0,26	0,45
	24	5,5 ± 0,02	2,9 ± 0,1	4,7 ± 0,1	7,0 ± 0,1	13,3	0,29	0,54
	48	4,6 ± 0,03	3,3 ± 0,1	4,1 ± 0,01	12,5 ± 0,1	12,1	0,51	0,50
	72	3,7 ± 0,1	2,3 ± 0,1	4,0 ± 0,03	20,0 ± 0,6	10,1	0,82	0,41
Celullase (Sigma)	3	5,8 ± 0,1	1,9 ± 0,3	1,2 ± 0,01	1,5 ± 0,05	8,9	0,06	0,36
	6	5,7 ± 0,01	2,4 ± 0,1	1,3 ± 0,1	3,3 ± 0,3	9,4	0,13	0,38
	12	5,3 ± 0,04	2,5 ± 0,03	2,8 ± 0,1	6,4 ± 0,1	10,6	0,26	0,43
	24	4,6 ± 0,1	2,6 ± 0,01	4,3 ± 0,1	10,5 ± 0,05	11,5	0,43	0,47
	48	4,3 ± 0,1	2,9 ± 0,03	4,0 ± 0,1	15,6 ± 0,1	11,2	0,64	0,46
	72	3,6 ± 0,1	2,7 ± 0,2	3,6 ± 0,1	20,0 ± 0,2	9,9	0,82	0,41
Xilanases (Verdartis)	3	5,9 ± 0,1	1,8 ± 0,1	1,1 ± 0,1	3,6 ± 0,03	8,8	0,15	0,36
	6	5,2 ± 0,1	1,8 ± 0,1	2,0 ± 0,1	5,8 ± 0,05	9,0	0,24	0,37
	12	4,7 ± 0,8	2,5 ± 0,02	3,2 ± 0,2	6,5 ± 0,03	10,4	0,27	0,43
	24	4,1 ± 0,7	3,0 ± 0,04	4,3 ± 0,1	7,0 ± 0,05	11,4	0,29	0,47
	48	3,1 ± 0,5	3,5 ± 0,1	7,1 ± 0,8	10,4 ± 0,3	13,7	0,43	0,56
	72	2,2 ± 0,4	2,7 ± 0,1	5,7 ± 0,2	20,0 ± 0,2	10,6	0,82	0,43

(X₁)=Xilose, (X₂)=Xilobiose, (X₃)=xilotriose, (X₄)=Xilotretose, (X₅/X₆)= Xilopentaose+Xilohexose e (>X₆)=XOS com mais de seis unidades repetitivas. **Xilos = (>X₆)+(X₄)+(X₂).

A tabela 9 também apresenta as concentrações de X_1 e Xilos resultantes da hidrólise enzimática da HSE. As concentrações de X_1 e Xilos foram ranqueadas de acordo com os extratos comerciais utilizados, ao longo dos tempos de hidrólise enzimática (3-72h), como se segue: 0,16-0,82 g.L⁻¹ e 0,43-0,54 g.L⁻¹ (Celucast), 0,06-0,82 g.L⁻¹ e 0,36-0,47 g.L⁻¹ (Celullase) e 0,15-0,82 g.L⁻¹ e 0,36-0,56 g.L⁻¹ (Xilanases), respetivamente (Tabela 9). A maior concentração de Xilos foi de 0,56 g.L⁻¹ no tempo de hidrólise de 48h utilizando-se o extrato enzimático Xilanases. Entretanto, a maior concentração de X_1 foi de 0,82 g.L⁻¹ no tempo de hidrólise de 72h, para ambos extratos (Celucast, Celullase e Xilanases) (Tabela 9). Não houve diferenças apreciáveis entre os três extratos enzimáticos em relação as conversões e concentrações de Xilos resultantes do processo de hidrólise enzimática da HSE (Tabela 9).

De um modo geral a formação de Xilos foi parcialmente limitada frente à HSE, atingindo um valor máximo de conversão de xilana em Xilos de 13,7% (%massa/massa) (extrato Xilanases, em 48h de hidrólise enzimática, tabela 9). De qualquer maneira, a conversão máxima de xilana em Xilos da HSE foi 1,6 vezes maior quando comparado ao SE (ambos com o extrato Xilanases, em 48h de hidrólise enzimática, tabela 7 e 9).

A hidrólise enzimática da HSE foi superior quando comparada ao SE. Um exemplo foi a conversão de xilana em Xilos de 10,9% e 4,5% (%massa/massa) para a HSE e SE, respectivamente (ambos em 12h de hidrólise com o extrato Celucast, tabela 7 e 9). Assim, a HSE foi convertida 2,4 vezes mais quando comparado ao SE. Além disso, o efeito aumenta ainda mais quando comparamos as concentrações de Xilos com o SE (0,13 g.L⁻¹) e com a HSE (0,45 g.L⁻¹), ou seja, 3,5 vezes mais para a HSE (Tabela 7 e 9). As diferenças dos efeitos de conversão

(2,4 vezes) e da concentração (3,5 vezes) de Xilos para a HSE ocorre devido ao teor de xilana de ambos substratos em estudo. Desta forma, a HSE apresentou 20,5% (%massa/massa) de xilana, enquanto o SE mostrou 14,6% (%massa/massa) de xilana (Tabela 3). O fato de a HSE ser 1,4 vezes mais concentrada de xilana do que o SE, explica as maiores concentrações de Xilos na HSE (Tabelas 7 e 9).

A literatura reporta a hidrólise enzimática de uma hemicelulose extraída do bagaço de cana-de-açúcar com xilanases de *T. reesei*, cujo teor de xilana foi de 80,9% (%massa/massa). O autor reportou que as conversões e concentrações máximas de xilana em XOS na hemicelulose extraída de bagaço de cana-de-açúcar ocorreram nos tempos de 12 e 24h (13,8-18,2% e 2,1-2,7 g.L⁻¹, respectivamente). Porém, no tempo de 72h a conversão de xilana em XOS diminuiu para 10% (%massa/massa) e a conversão de xilana em xilose aumentou para 37,5% (%massa/massa) (6). Assim, a HSE (teor de 20,5% de xilana) apresentou uma conversão e concentração de xilana em XOS nos tempos de 12 e 24h de 10,6-11,5% (%massa/massa) e 0,45-0,54 g.L⁻¹, respectivamente. As conversões obtidas corroboram com os dados da literatura, todavia, as concentrações de XOS dos dados reportados na literatura são 4,8 vezes maiores quando comparado as da HSE (6). Essa diferença foi proporcional a ordem de grandeza do teor de hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar (80,9%, massa/massa) quando comparado ao teor de hemicelulose da HSE (20,5%, massa/massa), ou seja, 3,9 vezes maior. Desta forma, a hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar e a HSE mostraram um comportamento similar frente a hidrólise enzimática, atingindo conversões máximas próximas.

A tabela 10 apresenta os resultados da hidrólise enzimática da HSEP. As conversões de xilana em $>X_6$ foram ranqueadas de acordo com os extratos comerciais utilizados, ao longo dos tempos de hidrólise enzimática (3-72h), como se segue: 6,1-17,4% (Celucast), 2,7-9,2% (Cellulase) e 5,8-15,4% (Xilanases) (%massa/massa). As conversões de xilana em X_4 , X_2 e X_1 também foram ranqueadas, como se segue: 5,5-7,8%, 4,8-14,7% e 7,8-30,1% (Celucast), 6,8-9,2%, 6-15,1% e 3,6-32,3% (Cellulase) e 5,9-7,3%, 6-14% e 4-31% (Xilanases) (%massa/massa), respectivamente. As conversões de xilana em Xilos também foi ranqueada, como se segue: 19-30,8% (Celucast), 18,8-30,1% (Cellulase) e 19,3-29,6% (Xilanases), (%massa/massa). Todavia, não foram detectadas as presenças de X_6/X_5 e X_3 , ao longo da hidrólise enzimática (4-72h) com os extratos em estudo (Tabela 10).

Tabela 10. Conversão de xilana em produtos da HSEP oriunda de *Eucalyptus* gerado no processamento de cavacos de madeira na indústria de celulose. Dados de conversão apresentados em % mássica (gramas/100gramas de material, dados em base seca).

Extrato enzimático	Tempo (h)	Conversão de xilana em produtos (%)					Concentração produtos (g.L ⁻¹)	
		>X ₆	X ₄	X ₂	X ₁	**Xilos	X ₁	**Xilos
Celucast (Novozymes)	3	17,4 ± 1,1	5,5 ± 0,7	4,8 ± 0,7	7,8 ± 0,1	27,7	0,86	3,05
	6	15,8 ± 0,6	7,6 ± 0,1	6,8 ± 0,2	9,4 ± 0,1	30,2	1,03	3,32
	12	11,6 ± 0,2	7,0 ± 0,2	12,1 ± 0,1	13,2 ± 0,1	30,8	1,45	3,39
	24	9,5 ± 0,1	7,0 ± 1,0	14,7 ± 0,5	18,8 ± 0,2	28,4	2,07	3,12
	48	7,8 ± 0,3	7,8 ± 0,1	7,4 ± 0,1	26,4 ± 0,1	23,0	2,90	2,53
	72	6,1 ± 0,2	6,3 ± 0,2	6,6 ± 0,4	30,1 ± 0,1	19,0	3,31	2,09
Celullase (Sigma)	3	9,2 ± 0,6	6,9 ± 0,2	6,0 ± 0,3	3,6 ± 0,3	22,1	0,40	2,43
	6	8,5 ± 0,3	9,2 ± 0,3	8,6 ± 0,6	8,3 ± 0,01	26,3	0,91	2,90
	12	8,6 ± 0,03	8,6 ± 0,5	11,8 ± 0,6	18,9 ± 0,4	29,0	2,16	3,19
	24	7,6 ± 0,1	7,4 ± 0,2	15,1 ± 0,7	21,1 ± 0,2	30,1	2,40	3,31
	48	5,7 ± 0,04	6,8 ± 0,5	10,9 ± 0,5	25,2 ± 0,5	23,4	2,90	2,57
	72	2,7 ± 0,1	7,2 ± 0,4	8,9 ± 0,1	32,3 ± 1,5	18,8	3,70	2,07
Xilanases (Verdartis)	3	15,4 ± 0,4	6,0 ± 0,4	6,0 ± 0,3	4,0 ± 0,3	27,4	0,44	3,01
	6	11,8 ± 0,1	7,3 ± 0,3	6,4 ± 0,6	9,1 ± 1,0	25,5	1,00	2,80
	12	10,7 ± 0,2	6,8 ± 0,4	10,4 ± 0,9	13,0 ± 0,5	27,9	1,43	3,07
	24	9,0 ± 0,4	6,6 ± 0,5	14,0 ± 0,8	19,0 ± 0,8	29,6	2,10	3,26
	48	6,3 ± 0,7	6,2 ± 0,6	9,4 ± 0,1	23,8 ± 0,8	21,9	2,62	2,41
	72	5,8 ± 0,2	5,9 ± 0,2	7,6 ± 0,6	31,0 ± 0,2	19,3	3,41	2,12

(X₁)=Xilose, (X₂)=Xilobiose, (X₃)=xilotriose, (X₄)=Xilotretose, (X₅/X₆)= Xilopentose+Xilohexose e (>X₆)=XOS com mais de seis unidades repetitivas. **Xilos = (>X₆)+(X₄)+(X₂).

A tabela 10 também apresenta as concentrações de X_1 e Xilos resultantes da hidrólise enzimática da HSEP. As concentrações de X_1 e Xilos foram ranqueadas de acordo com os extratos comerciais utilizados, ao longo dos tempos de hidrólise enzimática (3-72h), como se segue: 0,86-3,31 g.L⁻¹ e 2,09-3,39 g.L⁻¹ (Celucast), 0,4-3,7 g.L⁻¹ e 2,07-3,31 g.L⁻¹ (Celullase) e 0,44-3,41 g.L⁻¹ e 2,12-3,26 g.L⁻¹ (Xilanases), respetivamente (Tabela 10). Também não houve diferenças apreciáveis entre os três extratos enzimáticos em relação as conversões e concentrações de Xilos resultantes do processo de hidrólise enzimática da HSEP (Tabela 10).

De um modo geral a formação de Xilos no processo de hidrólise enzimática foi mais eficiente frente à HSEP quando comparado a HSE. Um exemplo foi a conversão máxima de xilana em Xilos de 30,8% e 10,9% (%massa/massa) para as HSEP e HSE, respetivamente (ambos com o extrato Celucast, em 12h de hidrólise enzimática) (Tabelas 9 e 10). Assim, a HSEP foi convertida 2,8 vezes mais do que a HSE (Tabelas 9 e 10). Além disso, o efeito aumenta ainda mais quando comparamos a concentração de Xilos da HSE (0,45 g.L⁻¹) com a HSEP (3,39 g.L⁻¹), ou seja, 7,5 vezes maior para a HSEP (Tabela 9 e 10). As diferenças dos efeitos de conversão (2,8 vezes) e da concentração (7,5 vezes) de Xilos para as HSE e HSEP ocorre devido ao teor de xilana de ambos substratos em estudo. Desta forma, a HSE apresentou 20,5% (%massa/massa) de xilana, enquanto a HSEP 55% (%massa/massa) de xilana (Tabela 5). O fato de a HSEP conter 2,7 vezes mais xilana quando comparado a HSE explica as maiores concentrações de Xilos na HSEP (Tabelas 9 e 10).

A literatura reporta vários estudos de hidrólise enzimática de hemiceluloses previamente extraídas de diferentes ML com a finalidade de produzir XOS. Alguns

autores reportaram a hidrólise enzimática de xilana extraída de espiga de milho por processo alcalino onde foi observada uma conversão máxima de 79,2% (%massa/massa) de XOS em 24h de hidrólise, valor acima do obtido na hidrólise da HSEP (conversão máxima de 30,8%, massa/massa, extrato Celuclast em 12h de hidrólise, tabela 10) (86). A tabela 10 mostra que no tempo de 24h a hidrólise da HSEP com extrato Celuclast apresentou uma conversão de xilana em XOS de 28,4% (%massa/massa). Valor semelhante foi encontrado na literatura para o tabaco, onde foi obtida uma conversão de xilana em XOS de 28,6% (%massa/massa) em 24h de hidrólise utilizando-se xilanases proveniente do fungo *Aspergillus niger* (57).

Outro estudo com hemicelulose extraída do bagaço de cana-de-açúcar por meio de processo alcalino foi hidrolisada com xilanases oriundas de *T. reesei* e mostrou uma alta conversão de xilana em xilose (28,7%, massa/massa) e uma baixa conversão de xilana em xilobiose e xilotriose 11,6% e 13% (%massa/massa), respectivamente, ambas em 24h de reação (67). Entretanto, a hidrólise da HSEP com o extrato Cellulase (em 24h de reação), não mostrou a formação de xilotriose, porém as conversões de xilana em xilobiose e xilose foram de 15,1% e 21,1% (%massa/massa), respetivamente (Tabela 10).

Outro estudo foi realizado com a hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar, extraída através de um processo oxidativo em meio ácido, onde a mesma foi hidrolisada com xilanases oriundas de *T. reesei* (6). Nesse estudo o autor reportou uma conversão máxima de xilana em XOS de 20% (%massa/massa) em 6h de reação (6). Os dados da literatura corroboram (considerando o mesmo tempo de reação, 6h) com a hidrólise da HSEP, onde a conversão máxima de xilana em XOS foi de 26,3% (%massa/massa) utilizando o extrato Cellulase (Tabela 10).

A tabela 11 apresenta os resultados da hidrólise enzimática da hemicelulose comercial de madeira de Birchwood. As conversões de xilana em $>X_6$ foram ranqueadas de acordo com os extratos comerciais utilizados, ao longo dos tempos de hidrólise enzimática (3-72h), como se segue: 5,1-15,4% (Celucast), 3,1-8,2% (Cellulase) e 5,1-12,9% (Xilanases) (%massa/massa). As conversões de xilana em X_4 , X_2 e X_1 também foram ranqueadas, como se segue: 4,9-7,7%, 5,3-14,1% e 7-29,2% (Celucast), 6-8,4%, 4,9-13,7% e 6,5-28,1% (Cellulase) e 4,1-6,6%, 5,5-13,5% e 3,5-29,2% (Xilanases) (%massa/massa), respectivamente. As conversões de xilana em Xilos também foi ranqueada, como se segue: 18,3-30% (Celucast), 16,8-27,6% (Cellulase) e 16,4-26,1% (Xilanases), (%massa/massa). Todavia, não foram detectadas as presenças de X_6/X_5 e X_3 , ao longo da hidrólise enzimática (4-72h) com os extratos em estudo (Tabela 11).

A tabela 11 também apresenta as concentrações de X_1 e Xilos resultantes da hidrólise enzimática da hemicelulose comercial de Birchwood. As concentrações de X_1 e Xilos foram ranqueadas de acordo com os extratos comerciais utilizados, ao longo dos tempos de hidrólise enzimática (3-72h), como se segue: 0,81-3,39 g.L⁻¹ e 2,12-3,48 g.L⁻¹ (Celucast), 0,75-3,26 g.L⁻¹ e 1,95-3,20 g.L⁻¹ (Cellulase) e 0,41-3,39 g.L⁻¹ e 1,9-3,03 g.L⁻¹ (Xilanases), respectivamente (Tabela 11). Neste caso também não houve diferenças apreciáveis entre os três extratos enzimáticos em relação as conversões e concentrações de Xilos resultantes do processo de hidrólise enzimática da hemicelulose comercial de Birchwood (Tabela 11).

De um modo geral a formação de Xilos na hidrólise enzimática da hemicelulose comercial de Birchwood foi similar a HSEP. Um exemplo foi a conversão máxima de xilana em Xilos de 30,8% e 30% (%massa/massa) para as hemiceluloses comercial de Birchwood e da HSEP, respectivamente (ambos com o

extrato Celuclast, em 12h de hidrólise enzimática) (Tabelas 10 e 11). Além disso, o efeito também foi similar quando comparamos a concentração de Xilos com a hemicelulose comercial de Birchwood (3,44 g.L⁻¹) com a HSEP (3,39 g.L⁻¹) (Tabelas 10 e 11). Todavia, a formação de Xilos na hidrólise enzimática das hemiceluloses (HSEP e comercial de Birchwood) foram mais eficientes quando comparadas a HSE (Tabelas 9, 10 e 11).

A literatura reporta a hidrólise enzimática da hemicelulose de Birchwood utilizando-se xilanases imobilizadas no derivado Xil-glioxil-agarose (87). O autor reporta que a produção de xilobiose e xilotriose corresponderam a 90% (%massa/massa) dos XOS produzidos e que a produção de xilose foi muito pequena (<0,1%) em 7h de reação (87).

Outro estudo realizado apresenta a produção de XOS a partir da hidrólise enzimática de hemicelulose comercial de Birchwood (88). O autor reportou a hidrólise enzimática da hemicelulose de Birchwood (utilizando o XynM, endoxilanase XynM de *T. amestolkia*). A hidrólise da hemicelulose de Birchwood apresentou uma conversão máxima de xilana em XOS de 28,8% (%massa/massa) em 10h de reação (88), corroborando com os dados de hidrólise enzimática da hemicelulose de Birchwood em estudo (Tabela 11).

Tabela 11. Conversão de xilana em produtos de hemicelulose comercial de Birchwood. Dados de conversão apresentados em % mássica (gramas/100gramas de material, dados em base seca).

Extrato enzimático	Tempo (h)	Conversão de xilana em produtos (%)					Concentração produtos (g.L ⁻¹)	
		>X ₆	X ₄	X ₂	X ₁	**Xilos	X ₁	**Xilos
Celucast (Novozymes)	3	15,4 ± 0,3	4,9 ± 0,1	5,3 ± 0,03	7,0 ± 0,2	25,6	0,81	2,97
	6	14,4 ± 0,3	5,9 ± 0,03	7,2 ± 0,2	9,1 ± 0,3	27,5	1,05	3,19
	12	10,4 ± 0,3	6,5 ± 0,03	12,8 ± 0,2	13,4 ± 0,2	29,7	1,55	3,44
	24	8,2 ± 0,3	7,7 ± 0,1	14,1 ± 0,2	18,3 ± 0,2	30,0	2,12	3,48
	48	6,4 ± 0,2	7,1 ± 0,2	7,7 ± 0,2	25,6 ± 0,4	21,2	2,97	2,46
	72	5,1 ± 0,1	6,4 ± 0,2	6,8 ± 0,2	29,2 ± 0,2	18,3	3,39	2,12
Celullase (Sigma)	3	8,2 ± 0,2	6,2 ± 0,2	4,9 ± 0,3	6,5 ± 0,2	19,3	0,75	2,24
	6	7,8 ± 0,2	8,4 ± 0,1	7,5 ± 0,2	7,2 ± 0,1	23,7	0,83	2,75
	12	7,3 ± 0,3	8,2 ± 0,1	10,3 ± 0,2	16,9 ± 0,2	25,8	1,96	3,00
	24	6,6 ± 0,2	7,3 ± 0,05	13,7 ± 0,05	20,4 ± 0,3	27,6	2,37	3,20
	48	4,9 ± 0,3	6,6 ± 0,1	10,4 ± 0,3	23,7 ± 0,2	21,9	2,75	2,54
	72	3,1 ± 0,03	6,0 ± 0,1	7,7 ± 0,2	28,1 ± 0,7	16,8	3,26	1,95
Xilanases (Verdatis)	3	12,9 ± 0,1	4,9 ± 0,1	5,5 ± 0,2	3,5 ± 0,1	23,3	0,41	2,70
	6	9,7 ± 0,1	6,6 ± 0,1	6,8 ± 0,1	7,8 ± 0,3	23,1	0,90	2,68
	12	8,9 ± 0,03	6,0 ± 0,1	9,3 ± 0,2	11,4 ± 0,1	24,2	1,32	2,81
	24	7,4 ± 0,2	5,2 ± 0,1	13,5 ± 0,3	18,3 ± 0,3	26,1	2,12	3,03
	48	5,8 ± 0,04	4,6 ± 0,1	9,6 ± 0,1	22,4 ± 0,2	20,0	2,60	2,32
	72	5,1 ± 0,05	4,1 ± 0,1	7,2 ± 0,3	29,2 ± 0,1	16,4	3,39	1,90

(X₁)=Xilose, (X₂)=Xilobiose, (X₃)=xilotriose, (X₄)=Xilotreaose, (X₅/X₆)= Xilopentaose+Xilohexose e (>X₆)=XOS com mais de seis unidades repetitivas. **Xilos = (>X₆)+(X₄) +(X₂).

O SE e o SEP apresentaram conversões limitadas de Xilos (Tabela 7 e 8). Desta forma, as hemiceluloses previamente extraídas (HSE e HSEP, oriundas do SE e SEP) e uma comercial (madeira de Birchwood) foram selecionadas para uma avaliação do comportamento cinético em função das conversões de Xilos e Xilose.

A figura 18 apresenta o comportamento cinético da hidrólise enzimática da HSE. De uma maneira geral, as figuras 18ABC, mostram um aumento na formação de Xilos até 3h de reação (aproximadamente 10% de conversão) (%massa/massa) permanecendo neste patamar até 48h. Porém, após 48h de reação há uma diminuição da formação dos Xilos. Entretanto, as figuras 18ABC também mostram um aumento contínuo da formação de Xilose ao longo do tempo de reação (3-72h), atingindo uma conversão máxima de 20% (%massa/massa). As conversões de xilana em Xilos e Xilose tornaram-se equivalentes no tempo de reação de 48h para os extratos comerciais Celuclast (Figura 18A) e Xilanases (Figura 18C). Todavia, no caso do extrato comercial Celullases, as conversões de xilana em Xilos e Xilose tornaram-se equivalentes no tempo de reação de 24h (Figura 18B).

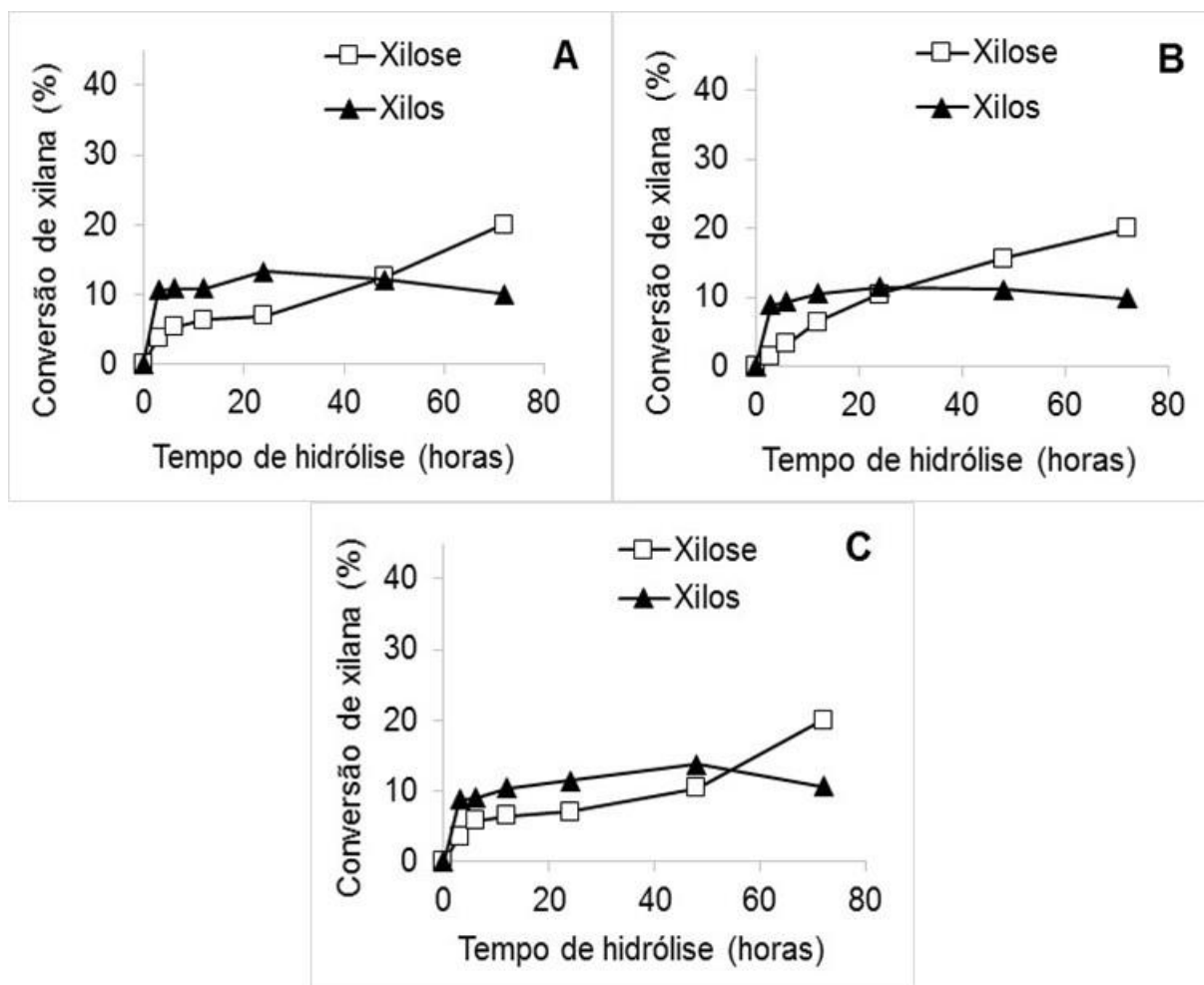


Figura 18. Hidrólise enzimática da HSE. Extratos enzimáticos (A) Celucast, (B) Celullase e (C) Xilanases. Conversão de xilana em Xilose e Xilos. Xilos = $(>X_6) + (X_4) + (X_2)$. Dados de conversão apresentados em porcentagem mássica (gramas/100gramas de material, dados em base seca).

A figura 19 apresenta o comportamento cinético da hidrólise enzimática da HSEP. De uma maneira geral, as figuras 19ABC, mostram um aumento na formação de Xilos até 12h de reação (aproximadamente 30% de conversão) (%massa/massa) permanecendo neste patamar até 24h. Porém, após 24h de reação há uma diminuição da formação dos Xilos. Entretanto, as figuras 19ABC também mostram um aumento contínuo da formação de Xilose ao longo do tempo de reação (3-72h), atingindo uma conversão máxima de aproximadamente 31%

(%massa/massa). As conversões de xilana em Xilos e Xilose tornaram-se equivalentes no tempo de reação de 48h, para ambos os extratos comerciais em estudo (Figuras 19ABC).

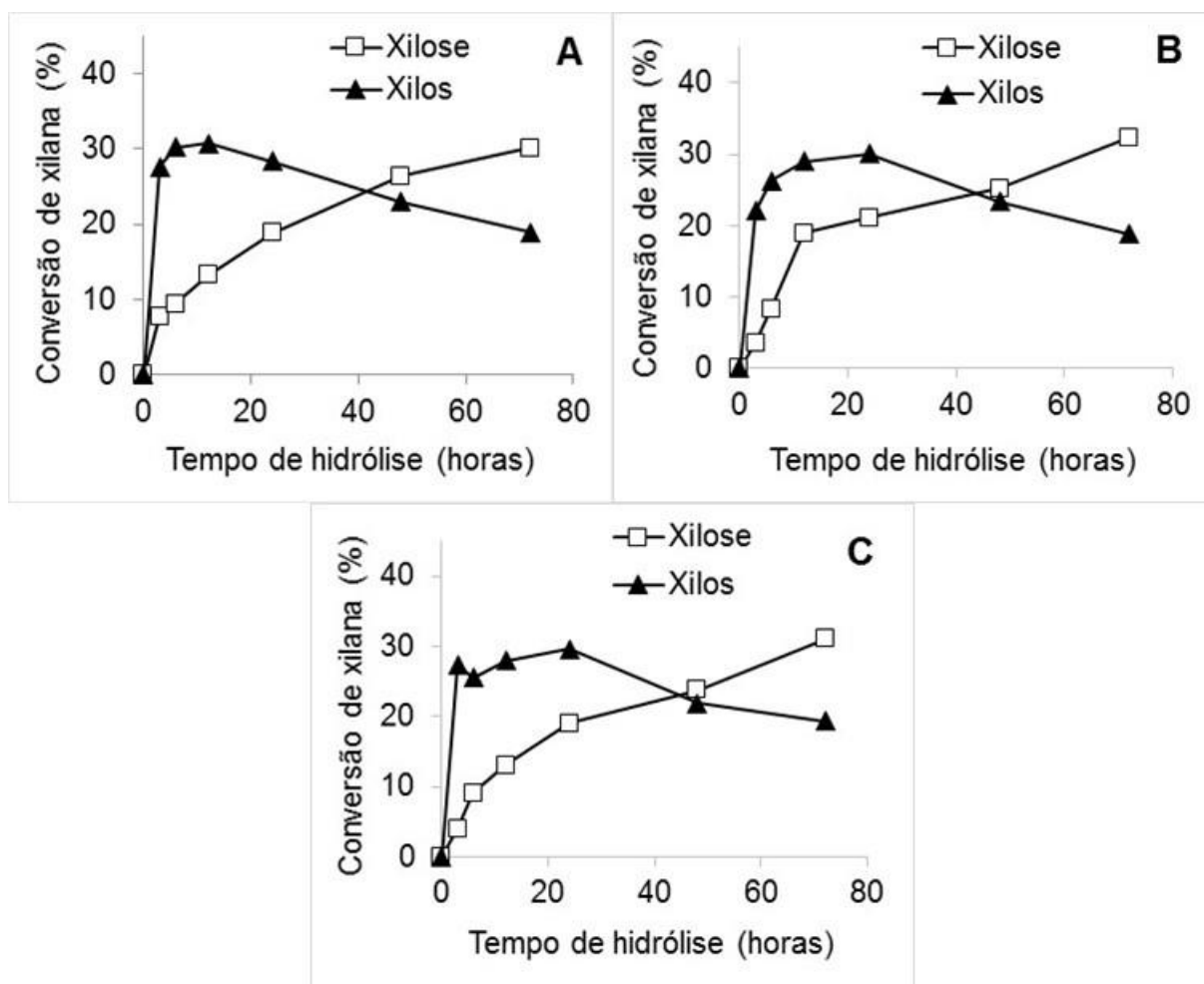


Figura 19. Hidrólise enzimática da HSEP. Extratos enzimáticos (A) Celucast, (B) Celullase e (C) Xilanases. Conversão de xilana em Xilose e Xilos. Xilos = ($>X_6$) + (X_4) + (X_2). Dados de conversão apresentados em porcentagem mássica (gramas/100gramas de material, dados em base seca).

A figura 20 apresenta o comportamento cinético da hidrólise enzimática da hemicelulose comercial de Birchwood. Neste caso os três extratos em estudos mostraram comportamento distintos. A hidrólise enzimática com o extrato

Celucast mostrou um aumento na formação de Xilos até 6h de reação (aproximadamente 30% de conversão) (%massa/massa). Porém, após 6h de reação houve uma diminuição da formação dos Xilos (Figura 20A). Todavia, a figura 20A também mostra um aumento contínuo da formação de Xilose ao longo do tempo de reação (3-72h), atingindo uma conversão máxima de 15,5% (%massa/massa). As conversões de Xilos e Xilose não se tornaram equivalentes mesmo após 72h de reação (Figura 20A).

A hidrólise enzimática com o extrato Celullase mostrou um aumento na formação de Xilos até 3h de reação (aproximadamente 25% de conversão) (%massa/massa), permanecendo neste patamar até 24h de reação. Entretanto, após 24h de reação houve uma diminuição da formação dos Xilos (Figura 20B). Porém, a figura 20B também mostra um aumento contínuo da formação de Xilose ao longo do tempo de reação (3-72h), atingindo uma conversão máxima de 20,7% (%massa/massa). As conversões de Xilos e Xilose tornaram-se equivalentes somente no tempo de 58h de reação (Figura 20B).

A hidrólise enzimática com o extrato Xilanases mostrou um aumento na formação de Xilos até 24h de reação (aproximadamente 35% de conversão) (%massa/massa). Todavia, após 24h de reação houve uma diminuição da formação dos Xilos (Figura 20C). Porém, a figura 20C também mostra um aumento contínuo da formação de Xilose ao longo do tempo de reação (3-72h), atingindo uma conversão máxima de 14,5% (%massa/massa). As conversões de Xilos e Xilose não se tornaram equivalentes mesmo após 72h de reação (Figura 20C).

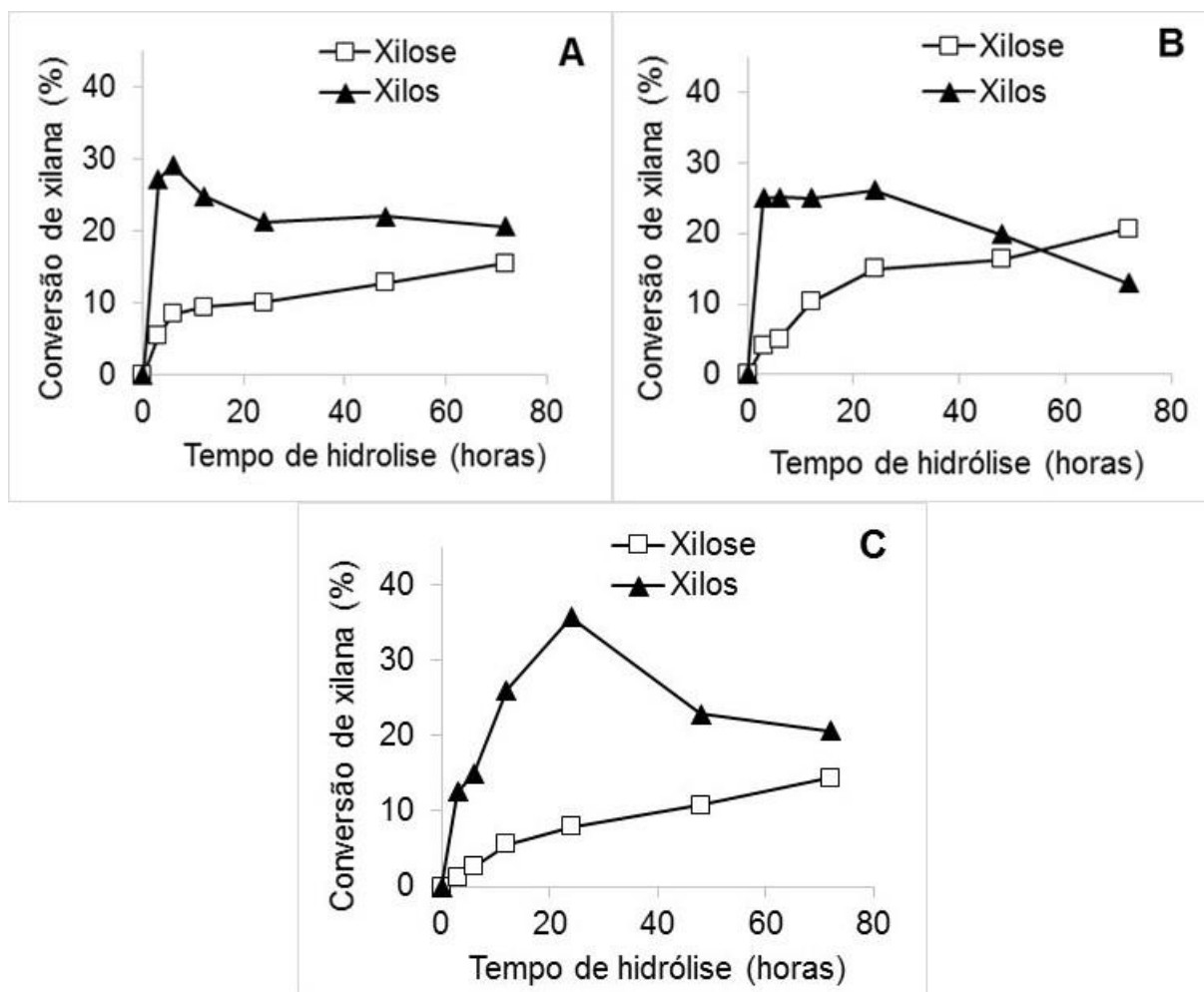


Figura 20. Hidrólise enzimática de hemicelulose comercial de Birchwood. Extratos enzimáticos (A) Celucast, (B) Celullase e (C) Xilanases. Conversão de xilana em Xilose e Xilos. Xilos = $(>X_6) + (X_4) + (X_2)$. Dados de conversão apresentados em porcentagem mássica (gramas/100gramas de material, dados em base seca).

De uma maneira geral (considerando os três extratos enzimáticos avaliados) as conversões de xilana em XOS das hemiceluloses (HSE e HSEP) ao longo do tempo de hidrólise enzimática (independente do extrato enzimático utilizado) diminui, enquanto as conversões de xilana em xilose aumentam (Figuras 18, 19 e 20). Esse aumento na conversão de xilana em xilose ao longo do tempo de hidrólise enzimática é indesejado durante o processo de geração

de XOS. Esses dados corroboram com dados reportados na literatura onde ocorre o mesmo efeito nas conversões de xilana em XOS e xilose sobre uma hemicelulose extraída do bagaço de cana-de-açúcar (6) e hemicelulose extraída da espiga de milho (86).

5. Conclusão

O subproduto em estudo mostrou uma composição química similar à de madeira de *Eucalyptus*, mostrando que esta biomassa pode ser melhor aproveitada dentro do setor celulósico.

A composição química do SE e do SEP apresentaram teores de 14,6% e 16% de xilana, respectivamente. Além disso, o SEP apresentou um teor de lignina cerca de 50% inferior ao SE, o que confirma a eficiência deste pré-tratamento no processo de deslignificação. Assim o SEP foi considerado um modelo comparativo frente a processos de extração de hemicelulose, pois o pré-tratamento com clorito de sódio é considerado muito agressivo ao meio ambiente para ser implementado na indústria.

A extração da hemicelulose do SEP foi mais eficiente (62,6%) quando comparado ao SE (22,8%). Além disso, a HSEP apresentou um maior teor de xilana (55%) quando comparado a HSE (20,5%). As diferenças nos rendimentos de extração de hemicelulose dos subprodutos (SE e SEP) e dos teores de xilana das hemiceluloses obtidas (HSE e HSEP) indicam a necessidade de remoção de parte da lignina do SE (prévio ou concomitante aos procedimentos de extração de hemicelulose).

Os três extratos enzimáticos, Cellulase, Celluclast e Xilanases utilizados na hidrólise enzimática apresentaram altas atividades específicas de xilanases e baixas atividades específicas de β -xilosidases, o que os tornou bons candidatos para a realização da hidrólise enzimática das HSE e HSEP visando a produção de XOS.

O SE foi pouco eficiente frente a hidrólise enzimática da fração de xilana, enquanto a produção de XOS a partir do SEP foi mais intensa. Entretanto, ambos substratos (SE e SEP) mostraram conversões máximas de xilana em XOS da ordem de 10%.

A HSE mostrou melhor eficiência na formação de XOS frente a hidrólise enzimática com xilanases comerciais (2,4 vezes superior) quando comparada ao SE. Entretanto, a formação de XOS no processo de hidrólise enzimática foi mais eficiente na HSEP quando comparado a HSE (2,8 vezes superior).

O processo de produção de XOS a partir da HSE pode ser uma estratégia para o aproveitamento da fração de hemicelulose do subproduto de *Eucalyptus* gerado no setor celulósico. Entretanto, testes adicionais como otimização da extração de hemicelulose e da hidrólise enzimática da hemicelulose extraída, ainda são fundamentais para o melhor entendimento do processo em estudo.

6. Perspectivas futuras

Realizar testes adicionais na extração de hemicelulose do SE com o objetivo de encontrar condições ideais para otimizar esse processo.

Realizar testes adicionais na hidrólise enzimática da HSE com o objetivo de encontrar condições ideais para otimizar esse processo.

O “resíduo” rico em celulose e lignina gerado no processo de produção de XOS a partir do subproduto de *Eucalyptus* poderá ser caracterizado e avaliado frente a outras aplicações importantes. Por exemplo, a produção de glucooligossacarídeos e/ou nanocelulose. Desta forma, ao final do processo um material rico em lignina (“resíduo final”) poderá ser utilizado para cogeração de energia.

Referências

1. Silva Magaton A, Piló-Veloso D, Colodette JL. "Caracterização das O-acetil-(4-O-metilglicurono) xilanas isoladas da madeira de *Eucalyptus urograndis* Characterization of O-acetil-(4-O-methylglucurono) xylans from *Eucalyptus urograndis*." *Química Nova* 2008;31(5): 1085-1088.
2. Farinha e Silva CA, 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. In: Guia ABTCP: Fornecedores e Fabricantes: celulose e papel. 19a.ed. São Paulo: ABTCP; 2017:16–28.
3. Marques ML, da Silva EJ, Velasco FG, Fornari Júnior CCM. Potencialidades do uso de resíduos de celulose (DREGS / GRITS) como agregado em argamassas. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, Campos Grande- MS, 2014;16(4):423–31.
4. Pereira DEP. Análise de celulasas e xilanases por fungo isolado a partir do Bioma Cerrado. [Dissertação]. Goiânia: Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás; 2013.
5. Figueiredo FC. "Efeito prebiótico de xilo-oligossacarídeos produzidos a partir da hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar utilizando extração alcalina e hidrólise de xilanases fúngicas." [Dissertação]. Rio Claro: Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista; 2016.
6. Brienzo M. Extração da hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar para

- produção de xilo-oligossacarídeos. [Tese]. Lorena: Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo; 2010;137. Available from: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/97/97132/tde-04102012-121938/>
7. Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr.* 1995;125(6):1401–12.
 8. Vázquez MJ, Alonso JL, Domínguez H, Parajó JC. Xylooligosaccharides: Manufacture and applications. *Trends Food Sci Technol.* 2001;11(11):387–93.
 9. Brienzo M, Arantes V, Milagres AMF. Enzymology of the thermophilic ascomycetous fungus *Thermoascus aurantiacus*. *Fungal Biol Rev* [Internet]. 2008;22(3–4):120–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbr.2009.04.001>
 10. Álvarez C, González A, Negro MJ, Ballesteros I, Oliva JM, Sáez F. Optimized use of hemicellulose within a biorefinery for processing high value-added xylooligosaccharides. *Ind Crop Prod* [Internet]. 2017;99:41–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.01.034>
 11. 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* [Internet]. 2014;155:359–65. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.050>

12. Carvalho AFA, Neto P de O, da Silva DF, Pastore GM. Xylo-oligosaccharides from lignocellulosic materials: Chemical structure, health benefits and production by chemical and enzymatic hydrolysis. *Food Res Int.* 2013;51:75–85.
13. Seok J, Lee YY, Hyun T. Bioresource Technology A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass. *Bioresour Technol* [Internet]. 2016;199:42–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.085>
14. Fengel D, Wegener G. Wood: chemistry, ultrastructure, reactions. Wood: chemistry, ultrastructure, reactions. 1989. 450 p.
15. Gellerstedt G, Ek M, Henriksson G. Wood Chemistry and Wood Biotechnology. Berlin: De Gruyter; 2009. 320p. (Pulp and Paper Chemistry and Technology Series).
16. Sjöström E, Westermark U. Chemical composition of wood and pulps: basic constituents and their distribution. In: Analytical methods in wood chemistry, pulping and papermaking [Internet]. 1998. p. 1–20. Available from: http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=U-0k4NCbbNQC&oi=fnd&pg=PA1&dq=Analytical+Methods+in+Wood+Chemistry,+Pulping,+and+Papermaking&ots=38DL0qbMh_&sig=7v--RmANcXxMeyBaVdH9GtgYx1o%5Cnhttp://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=U-0k4NCbbNQC&oi=fnd&pg=PA1
17. Fonseca MA. Avaliação da produção de xilo-oligossacarídeos a partir de casca de soja. [Dissertação]. São Carlos: departamento de Engenharia

Química, UFSCar; 2015.

18. Keshwani DR, Cheng JJ. Microwave-based alkali pretreatment of switchgrass and coastal bermudagrass for bioethanol production. *Biotechnol Prog* [Internet]. 2010;26(3):644–52. Available from: <http://doi.org/10.1002/btpr.371>
19. Saha BC. Hemicellulose bioconversion. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2003;30(5):279–91.
20. Ogeda LT, Petri DFS. Hidrólise enzimática de biomassa. *Química Nova*, São Paulo; 2010;33(7):1549–58.
21. 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>
22. Ralph J, Lundquist K, Brunow G, Lu F, Kim H, Paul F, et al. Lignins : Natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenyl- propanoids. *Phytochem Rev*. 2004;3(1-2):29–60.
23. Chang H. MWL fraction with a high concentration of lignin-carbohydrate linkages : Isolation and 2D NMR spectroscopic analysis MWL fraction with a high concentration of lignin- carbohydrate linkages : Isolation and 2D NMR spectroscopic analysis. 2007;(December 2014).
24. Brandt A, Gräsvik J, Hallett JP, Welton T. Deconstruction of lignocellulosic biomass with ionic liquids. *Green Chem* [Internet]. 2013;15(3):550.

Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c2gc36364j>

25. Of A, Fibers L, Polymer IN. *Quim. Nova*,. 2009;32(3):661–71.
26. Converse AO, Ooshima H, Burns DS. Kinetics of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials based on surface area of cellulose accessible to enzyme and enzyme adsorption on lignin and cellulose - Scientific note. *Appl Biochem Biotechnol*. 1990;24–25(1):67–73.
27. Mosier N, Wyman C, Dale B, Elander R, Lee YY, Holtzapple M, et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresour Technol*. 2005;96:673–86.
28. Lynd LR, Elander RT, Wyman CE. Likely features and costs of mature biomass ethanol technology. Vols. 57–8, *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 1996. p. 741–61.
29. Sun Y, Cheng J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production : a review q. *Bioresour Technol*. 2002;83:1–11.
30. Siqueira G, Várnai A, Ferraz A, Milagres AMF. Enhancement of cellulose hydrolysis in sugarcane bagasse by the selective removal of lignin with sodium chlorite. *Appl Energy* [Internet]. 2013;102:399–402. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.07.029>
31. Publishers ES. Comparative strutural studies of lignin-carbohydrate complexes from. *Carbohydr Res*. 1986;147:101-17.
32. Browning B. *Methods of wood chemistry* [Internet]. Volume II. 1967. 889 p. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19943419>
<http://www.cabdirect.org/abstracts/19670602970.html>

33. Morgante CM, Bonturi N, Campinas UE De. Fração Hemicelulósica Cavacos De Madeira Visando Sua Aplicação Em. 2011;(2006):2006–11.
34. Fang JM, Sun RC, Salisbury D, Fowler P, Tomkinson J. Comparative study of hemicelluloses from wheat straw by alkali and hydrogen peroxide extractions. *Polym Degrad Stab*. 1999;66(3):423–32.
35. Curreli N, Fadda MB, Rescigno A, Rinaldi AC, Soddu G, Sollai F, et al. Mild alkaline/oxidative pretreatment of wheat straw. *Process Biochem*. 1997;32(8):665–70.
36. Liu S. Chemical kinetics of alkaline peroxide brightening of mechanical pulps. *Chem Eng Sci* [Internet]. 2003;58(11):2229–44. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009250903000897>
37. Weil J, Westgate P, Kohlmann K, Ladisch MR. Cellulose pretreatments of lignocellulosic substrates. *Enzyme Microb Technol* [Internet]. 1994;16(11):1002–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11536655>
38. Xu F, Sun JX, Liu CF, Sun RC. Comparative study of alkali- and acidic organic solvent-soluble hemicellulosic polysaccharides from sugarcane bagasse. *Carbohydr Res*. 2006;341(2):253–61.
39. Liu S. A simplistic mechanistic model and effect of consistency on alkaline peroxide brightening of mechanical pulps. *Chem Eng Sci*.

2004;59(20):4377–83.

40. Sun RC, Tomkinson J, Ma PL, Liang SF. Comparative study of hemicelluloses from rice straw by alkali and hydrogen peroxide treatments. *Carbohydr Polym.* 2000;42(2):111–22.
41. Yang B, Boussaid A, Mansfield SD, Gregg DJ, Saddler JN. Fast and efficient alkaline peroxide treatment to enhance the enzymatic digestibility of steam-exploded softwood substrates. *Biotechnol Bioeng.* 2002;77(6):678–84.
42. Kadla JF, Chang H. The Reactions of Peroxides with Lignin and Lignin Model Compounds. *Oxidative delignification Chem.* 2001;108–29.
43. Xiang Q, Lee YY. Oxidative cracking of precipitated hardwood lignin by hydrogen peroxide. *Appl Biochem Biotechnol.* 2000;84–86(May 1999):153–62.
44. Guay DF, Cole BJW, Fort RC, Hausman MC, Genco JM, Elder TJ. Mechanisms of oxidative degradation of carbohydrates during oxygen delignification. Part III: Reaction of photochemically generated hydroxyl radicals with 1,5-anhydrocellobitol and cellulose. *J Pulp Pap Sci.* 2002;28(7):217–21.
45. Miller JG, Fry SC. Characteristics of xyloglucan after attack by hydroxyl radicals. *Carbohydr Res.* 2001;332(4):389–403.
46. Wang B, Wang X, Feng H. Deconstructing recalcitrant *Miscanthus* with alkaline peroxide and electrolyzed water. *Bioresour Technol.*

2010;101(2):752–60.

47. Silverstein RA, Chen Y, Sharma-Shivappa RR, Boyette MD, Osborne J. A comparison of chemical pretreatment methods for improving saccharification of cotton stalks. *Bioresour Technol.* 2007;98(16):3000–11.
48. Harris AD, Ramalingam C. Xylanases and its Application in Food Industry: A Review. *J Exp Sci [Internet]*. 2010;1(7):1–11. Available from: www.jexpsciences.com
49. Wong KK, Tan LU, Saddler JN. Multiplicity of beta-1,4-xylanase in microorganisms: functions and applications. *Microbiol Rev.* 1988;52(3):305–17.
50. Passarinho ATP. Produção e caracterização de xilanases derivadas do gene XynA de *Orpinomyces* PC-2 e avaliação da eficiência para hidrólise de farinha e clarificação de sucos. [Dissertação]. Ouro Preto: NUPEB, Universidade Federal de Ouro Preto; 2014;
51. Michelin M, Michelin M, Ruzene DS, Ruzene DS, Silva DP, Silva DP. A new strategy for xylanase production using wheat straw autohydrolysis liquor as substrate. *Proc 10th Int Chem Biol Eng Conf - CHEMPOR 2008.* 2008;2043–8.
52. Liab K, Azadi P, Collins R, Tolan J, Kim JS, Eriksson KEL. Relationships between activities of xylanases and xylan structures. *Enzyme Microb Technol.* 2000;27(1–2):89–94.
53. Fenel F, Zitting A-J, Kantelinen A. Increased alkali stability in *Trichoderma*

- reesei endo-1, 4-beta-xylanase II by site directed mutagenesis. J Biotechnol [Internet]. 2006;121(1):102–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16139382>
54. Maslen SL, Goubet F, Adam A, Dupree P, Stephens E. Structure elucidation of arabinoxylan isomers by normal phase HPLC-MALDI-TOF/TOF-MS/MS. Carbohydr Res. 2007;342(5):724–35.
 55. Universidade de São Paulo FFCLRP - Departamento de Química Programa de Pós-Graduação em Química Purificação , caracterização bioquímica e potencial de aplicação biotecnológica de uma xilanase halotolerante e termoestável de Colletotrichum graminicola Sibe. 2016;
 56. Puchart V, Biely P. Simultaneous production of endo- β -1,4-xylanase and branched xylooligosaccharides by Thermomyces lanuginosus. J Biotechnol. 2008;137(1–4):34–43.
 57. Akpinar O, Erdogan K, Bostanci S. Enzymatic production of Xylooligosaccharide from selected agricultural wastes. Food Bioprod Process. 2009;87(2):145–51.
 58. Ikeda R, Yamamoto T, Funatsu M. Purification and some physical properties of acid-cellulase from aspergillus niger. Agric Biol Chem. 1973;37(5):1153–9.
 59. Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam - Printed in The Netherlands. 1981;95.
 60. Diogo JA. Bioprospecção e construção de hemicelulases para produção

de xilose a partir do licor de xilo-oligossacarídeos e sua utilização na produção de xilitol via fermentativa. [Tese]. Campinas: Faculdade de engenharia de Alimentos-FEA, UNICAMP; 2016;1–105.

61. Samanta AK, Jayapal N, Jayaram C, Roy S, Kolte AP, Senani S, et al. Xylooligosaccharides as prebiotics from agricultural by-products: Production and applications. *Bioact Carbohydr Dietary Fibre*. 2015;5(1):62–71.
62. Dumon C, Song L, Bozonnet S, Fauré R, O'Donohue MJ. Progress and future prospects for pentose-specific biocatalysts in biorefining. *Process Biochem*. 2012;47:346–57.
63. Juhász T, Szengyel Z, Réczey K, Siika-Aho M, Viikari L. Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. *Process Biochem*. 2005;40(11):3519–25.
64. Gullón P, Salazar N, Muñoz MJG, Gueimonde M, Ruas-Madiedo P, de los Reyes-Gavilán CG, et al. Assessment on the fermentability of xylooligosaccharides from rice husks. *BioResources*. 2011;6(3):3096–114.
65. Kabel MA, Carnevalheiro F, Garrote G, Avgerinos E, Koukios E, Parajó JC, et al. Hydrothermally treated xylan rich by-products yield different classes of xylo-oligosaccharides. *Carbohydr Polym*. 2002;50(1):47–56.
66. Brenelli, Lívia Beatriz. "Desenvolvimento de estratégias para produção biotecnológica de ácido ferúlico e xilooligossacarídeos a partir do bagaço de cana-de-açúcar." (2013).

67. de Figueiredo FC, Carvalho AFA, Brienzo M, Campioni TS, de Oliva-Neto P. Chemical input reduction in the arabinoxylan and lignocellulose alkaline extraction and xylooligosaccharides production. *Bioresour Technol.* 2017;228:164–70.
68. Fooks LJ, Gibson GR. In vitro investigations of the effect of probiotics and prebiotics on selected human intestinal pathogens. *FEMS Microbiol Ecol.* 2002;39(1):67–75.
69. Nakakuki T. Present status and future of functional oligosaccharide development in Japan. *Pure Appl Chem.* 2002;74(7):1245–51.
70. OKAZAKI M, FUJIKAWA S, MATSUMOTO N. Effect of xylooligosaccharide on the growth of bifidobacteria. *Bifidobact Microflora.* 1990;9(2):77–86.
71. Crittenden RG, Playne MJ. Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. *Trends Food Sci Technol.* 1996;7:353–61.
72. Moure A, Gullón P, Domínguez H, Parajó JC. Advances in the manufacture, purification and applications of xylo-oligosaccharides as food additives and nutraceuticals. *Process Biochem.* 2006;41:1913–23.
73. Masarin F, Gurgilhares DB, Baffa DC, Barbosa MH, Carvalho W, Ferraz A, et al. Chemical composition and enzymatic digestibility of sugarcane clones selected for varied lignin content. *Biotechnol Biofuels* [Internet]. 2011;4(1):55. Available from: <http://biotechnologyforbiofuels.biomedcentral.com/articles/10.1186/1754-6834-4-55>

74. 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>
75. Ferraz A, Baeza J, Rodriguez J, Freer J. Estimating the chemical composition of biodegraded pine and eucalyptus wood by DRIFT spectroscopy and multivariate analysis. *Bioresour Technol.* 2000;74(3):201–12.
76. Bailey MJ, Biely P, Poutanen K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *J Biotechnol.* 1992;23(3):257–70.
77. Tan LUL, Mayers P, Saddler JN. Purification and characterization of a thermostable xylanase from a thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. *Can J Microbiol* [Internet]. 1987;33(8):689–92. Available from: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/m87-120>
78. Hartree EF. Determination of protein: A modification of the lowry method that gives a linear photometric response. *Anal Biochem.* 1972;48(2):422–7.
79. Kalogeris E, Christakopoulos P, Vršanská M, Kekos D, Biely P, Macris BJ. Catalytic properties of the endoxylanase I from *Thermoascus aurantiacus*. *J Mol Catalysis - B Enzymatic.* 2001;11(4-6):491–501.
80. Sun JX, Sun XF, Sun RC, Su YQ. Fractional extraction and structural characterization of sugarcane bagasse hemicelluloses. *Carbohydr Polym.* 2004;56(2):195–204.

81. 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(16):9043–53.
82. Vena PF, García-Aparicio MP, Brienzo M, Görgens JF, Rypstra T. Effect of alkaline hemicellulose extraction on kraft pulp fibers from eucalyptus grandis. *J Wood Chem Technol*. 2013;33(3):157–73.
83. DODD D, CANN IKO. Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. *GCB Bioenergy* [Internet]. 2009;1(1):2–17. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1757-1707.2009.01004.x>
84. Sun HJ, Yoshida S, Park NH, Kusakabe I. Preparation of (1→4)- β -D-xylooligosaccharides from an acid hydrolysate of cotton-seed xylan: Suitability of cotton-seed xylan as a starting material for the preparation of (1→4)- β -D-xylooligosaccharides. *Carbohydr Res*. 2002;337(7):657–61.
85. Balakshin MY, Capanema EA, Chang HM. MWL fraction with a high concentration of lignin-carbohydrate linkages: Isolation and 2D NMR spectroscopic analysis. *Holzforschung*. 2007;61(1):1–7.
86. Aachary AA, Prapulla SG. Bioresource Technology Value addition to corncob : Production and characterization of xylooligosaccharides from alkali pretreated lignin-saccharide complex using *Aspergillus oryzae* MTCC 5154. *Bioresour Technol* [Internet]. 2009;100(2):991–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2008.06.050>
87. Aragon CC, Santos AF, Ruiz-matute AI, Corzo N, Guisan JM, Monti R, et al. *Journal of Molecular Catalysis B : Enzymatic Continuous production of*

xylooligosaccharides in a packed bed reactor with immobilized – stabilized biocatalysts of xylanase from *Aspergillus versicolor*. "Journal Mol Catal B, Enzym [Internet]. 2013;98:8–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.09.017>

88. Nieto-Domínguez M, de Eugenio LI, York-Durán MJ, Rodríguez-Colinas B, Plou FJ, Chenoll E, et al. Prebiotic effect of xylooligosaccharides produced from birchwood xylan by a novel fungal GH11 xylanase. Food Chem. 2017;232:105–13.