Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho"

Faculdade de Ciências
Farmacêuticas

Obtenção e purificação de hidrolisado de xilo-oligossacarídeos obtidos por pré-tratamento hidrotérmico de um subproduto de *Eucalyptus* utilizando a técnica de extração líquido-líquido

Cecília Aline Otaviano

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

Coorientador: Prof. Dr. Jorge F. Brandão Pereira

Araraquara
2021

Obtenção e purificação de hidrolisado de xilo-oligossacarídeos obtidos por pré-tratamento hidrotérmico de um subproduto de *Eucalyptus* utilizando a técnica de extração líquido-líquido

Cecília Aline Otaviano

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

Coorientador: Prof. Dr. Jorge F. Brandão Pereira

Araraquara
2021

Otaviano, Cecilia Aline.

O87o Obtenção e purificação de hidrolisado de xilo-oligossacarídeos obtidos por pré-tratamento hidrotérmico de um subproduto de Eucalyptus utilizando a técnica de extração líquido-líquido / Cecilia Aline Otaviano. – Araraquara, 2020.

62 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição. Área de Concentração em Ciência dos Alimentos.

Orientador: Fernando Masarin.
Coorientador: Jorge Fernando Brandão Pereira.

1. Subproduto de Eucalyptus. 2. Pré-tratamento hidrotérmico. 3. Hidrolisado hemicelulósico. 4. Xilo-oligossacarídeos. 5. Extração e purificação . I. Masarin, Fernando, orient. II. Pereira, Jorge Fernando Brandão, coorient. III. Título.

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

CAPES: 33004153070P3
Esta ficha não pode ser modificada

Dedico esse trabalho aos meus pais Geraldo e Girlene,
pelo tempo roubado e apoio permanente.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil;

Ao Prof. Dr. Fernando Masarin, pela orientação, oportunidade, paciência, dedicação e conhecimento compartilhado durante toda a condução deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Jorge Brandão, pela coorientação nesse trabalho compartilhando toda sua sabedoria e conhecimento sobre as técnicas de purificação;

Ao Programa de Pós-graduação em Alimentos e Nutrição e ao Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, por toda a infraestrutura e suporte;

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Campus Araraquara- UNESP;

À Seção Técnica da Pós-graduação;

Aos técnicos de laboratório e colegas Pós-graduandos em especial ao Fernando Paz que me auxiliou em diversos momentos na escrita desse trabalho.

E a todas as outras pessoas que fizeram parte da minha vida nesse período e não menos importantes.

"Diante de coisa tão doida
Conservemo-nos serenos
Cada minuto da vida
Nunca é mais, é sempre menos
Ser é apenas uma face
Do não ser, e não do ser
Desde o instante em que se nasce
Já se começa a morrer."
Cassiano Ricardo

RESUMO

O processamento da indústria de celulose de cavacos de madeira *Eucalyptus* gera um subproduto (“serragem”). O subproduto de *Eucalyptus (SE)* representa fonte de matéria-prima pouco explorada, seu uso resume-se à cogeração de energia. O SE contém mais de 60% de celulose e hemicelulose e baixa eficiência energética, sendo uma alternativa para a produção de produtos com alto valor agregado. Dentre muitas aplicações, a hemicelulose pode ser utilizada para produção de xilo-oligossacarídeos (XOS) para fins terapêuticos e prebióticos. O pré-tratamento hidrotérmico (PTH) vem sendo aplicado a subprodutos de *Eucalyptus* visando à produção de um hidrolisado hemicelulósico (HH) rico em XOS. Todavia, o HH oriundo de PTH também contém compostos indesejáveis que devem ser removidos a fim de se formular um produto contendo mistura de XOS com potencial para aplicação como prebiótico. **Objetivo:** Avaliar metodologias de refino de HH rico em XOS obtido por PTH sobre SE. **Métodos:** A parte experimental envolveu à produção de um HH rico em XOS a partir de PTH previamente otimizado de SE. O HH rico em XOS foi submetido a processos de evaporação sob vácuo e extração líquido-líquido (ELL) com acetato de etila. **Resultados:** Ambas as técnicas de refino utilizadas apresentaram potencial na remoção dos componentes não desejados (principalmente aromáticos, incluindo hidroximetilfurfural (HMF) e furfural). A evaporação sob vácuo resultou em diminuição dos aromáticos (56%), ácido acético (66%) e ácido fórmico (68%) em resposta à perda de 23,8% de XOS. A ELL com acetato de etila se mostrou eficaz em todas as condições avaliadas resultando em 64-83% de remoção de aromáticos em resposta a 22-31% de perda de XOS. Por fim, a evaporação sob vácuo combinada com ELL potencializou a remoção dos aromáticos (69,6%), furfural (95,4%), no entanto, potencializou à perda de XOS (37%). **Conclusão:** A evaporação à vácuo é um processo capaz de remover consideravelmente compostos aromáticos e ácido acético que podem ser considerados inibidores de crescimento celular de diversos microrganismos. A ELL com acetato de etila se mostrou bastante eficaz na remoção de aromáticos, além de quinonas e seus derivados em resposta a perda inferior de 30% de XOS. Ambas técnicas ELL e evaporação sob vácuo, bem como a combinação destas, foram eficientes na purificação do HH rico em XOS, apresentando potencial para o aprimoramento de futuras etapas de um processo industrial.

Palavras-chave: Subproduto de *Eucalyptus;* Pré-tratamento hidrotérmico; Hidrolisado hemicelulósico; Xilo-oligossacarídeos; Extração e purificação.

ABSTRACT

The pulp industry's processing of *Eucalyptus* wood chips generates a by-product ("sawdust"). The Eucalyptus by-product (EB) represents an underexplored source of raw material; its use is limited to energy cogeneration. The EB contains more than 60% cellulose and hemicellulose and is low in energy efficiency, making it an alternative for the production of products with high added value. Among many applications, hemicellulose can be used to produce xylooligosaccharides (XOS) for therapeutic and prebiotic purposes. The hydrothermal pretreatment (HP) has been applied to EB aiming at the production of an XOS-rich hemicellulosic hydrolysate (HH). However, HH from HP also contains undesirable compounds that must be removed in order to formulate a product containing a mixture of XOS with potential for application as a prebiotic. **Objective:** To evaluate methodologies for refining XOS-rich HH obtained by HP over EB. **Methods:** The experimental part involved the production of HH XOS-rich previously optimized by HP from EB. The HH XOS-rich was subjected to processes of evaporation under vacuum and liquid-liquid extraction (LLE) with ethyl acetate. **Results:** Both refining techniques used had the potential to remove unwanted components (mainly aromatics, including hydroxymethylfurfural (HMF) and furfural). Vacuum evaporation resulted in a decrease in aromatics (56%), acetic acid (66%) and formic acid (68%) in response to a loss of 23.8% XOS. LLE with ethyl acetate was effective under all conditions evaluated resulting in 64-83% removal of aromatics in response to 22-31% loss of XOS. Finally, evaporation under vacuum combined with LLE enhanced the removal of aromatics (69.6%), furfural (95.4%), however, it enhanced the loss of XOS (37%). **Conclusion:** Vacuum evaporation is a process capable of considerably removing aromatic compounds and acetic acid that can be considered cell growth inhibitors of several microorganisms. LLE with ethyl acetate has been shown to be very effective in removing aromatics, as well as quinones and their derivatives in response to less than 30% loss of XOS. Both LLE and vacuum evaporation techniques, as well as their combination, were efficient in the purification of HH XOS-rich, showing potential for the improvement of future steps in an industrial process.

Keywords: *Eucalyptus* by-product; Hydrothermal pretreatment; Hemicellulose hydrolysate; Xylooligosaccharides; Extraction and purification.

LISTA DE TABELAS

1. INTRODUÇÃO **PÁGINA**

Tabela 1. Possíveis etapas de refino de hidrolisado hemicelulósico (HH) rico em XOS oriundo de pré-tratamento hidrotérmico (PTH) de materiais lignocelulósicos 25

2. CAPÍTULO 1

Tabela 1. Razão de absorbâncias dos espectros de varredura na região do UV-Visível dos hidrolisados hemicelulósicos (HH) nas diferentes condições experimentais. 41

Tabela 2. Concentração de compostos desejados e não desejados no hidrolisado hemicelulósico (HH, hidrolisado bruto e concentrado), fator de concentração de cada componente e seus respectivos índices de remoção ou perda após etapa de evaporação sob vácuo e evaporação sob vácuo + ELL com acetato de etila. 48

LISTA DE FIGURAS

1. INTRODUÇÃO **PÁGINA**

Figura 1. Representação da estrutura de um fragmento de celulose 16

Figura 2. Estrutura de uma xilana de *Eucalyptus*. Tipos de ligações presentes em uma molécula de xilana 17

Figura 3. Estrutura - modelo da lignina 18

Figura 4. Principais tipos de ligações entre carboidratos e lignina em complexos lignina-carboidrato: (A) fenol glicosídeo, (B) éster e (C) éter benzílico 19

Figura 5. (A) Corte ilustrativo do sistema de camadas na parede das células de madeira. (B) Microscopia eletrônica de transmissão das células de madeira mostrando as camadas da parede celular: ML = lamela média, P = parede primária, S_1 = parede secundária, S_2 = parede secundária e T = parede terciária 20

Figura 6. (A) Microscopia eletrônica de lignocelulósico. (B) Modelo didático que explica como as microfibrilas de celulose estão organizadas e encaixadas em uma matriz de hemicelulose e lignina presente em um lignocelulósico 20

Figura 7. Estrutura dos xilo-oligossacarídeos (XOS) 22

Figura 8. Aplicações comerciais de xilo-oligossacarídeos (XOS) 23

2. CAPÍTULO 1

Figura 1. (a) Subproduto de *Eucalyptus* (SE). (b) Hidrolisado hemicelulósico (HH) obtido após pré-tratamento hidrotérmico (PTH) sobre SE. 37

Figura 2. Teor de componentes desejados (XOS) e indesejáveis em hidrolisado hemicelulósico (HH) obtido por pré-tratamento hidrotérmico (PTH) em subproduto de *Eucalyptus* (SE). 37

Figura 3. Extração líquido-líquido com solvente orgânico de hidrolisado hemicelulósico (HH). (a) Hidrolisado bruto. (b) Fase aquosa 2:1. (c) Fase aquosa 1:1. (d) Fase aquosa 1:2. (e) Fase aquosa 1:4. (f) Fase orgânica 2:1. (g) Fase orgânica 1:1. (h) Fase orgânica 1:2. (i) Fase orgânica 1:4. 39

Figura 4. Espetros de varredura na região do UV-Visível de 40

Hidrolisado hemicelulósico (HH) em diferentes condições de extração líquido-líquido (ELL) com solvente orgânico. (a) Espectro de varredura na região do UV. (b) Espectro da varredura da região Visível do HH em diferentes condições experimentais.

Figura 5. Perfil cromatográfico em coluna com fase estacionário do tipo apolar (C_{18}) de hidrolisado hemicelulóico (HH) em diferentes condições de extração líquido-líquido (ELL) com solvente orgânico. 42

Figura 6. Remoção no hidrolisado hemicelulósico (HH) (%massa/massa) dos componentes não desejáveis em diferentes condições de extração líquido-líquido (ELL) com solvente orgânico. 43

Figura 7. Balanço de massa correspondente ao percentual de remoção dos compostos aromáticos, furfural e HMF. 45

Figura 8. Perda no hidrolisado hemicelulósico (HH) (%massa/massa) dos componentes desejáveis em diferentes condições de extração líquido-líquido (ELL) com solvente orgânico. 46

Figura 9. Espetros de varredura na região do UV-Visível de hidrolisado hemicelulósico (HH) e do hidrolisado pós evaporação. (a) Espectro de varredura na região do UV. (b) Espectro da varredura da região Visível. 50

LISTA DE SIGLAS

ELL - Extração líquido-líquido

HH - Hidrolisado hemicelulósico

HMF - Hidroximetilfurfural

PTH - Pré-tratamento hidrotérmico

SE - Subproduto de *Eucalyptus*

XOS - Xilo-oligossacarídeos

CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 13

2. CAPÍTULO 1 28

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS 56

4. REFERÊNCIAS 57

1. INTRODUÇÃO

A madeira proveniente do gênero *Eucalyptus* é a principal fonte de fibras para a produção de celulose e papel dos países da América do Sul (1). Segundo o relatório do IBÁ (Instituto Brasileiro de Árvores, 2019), o Brasil se manteve como o segundo maior produtor mundial de celulose de fibra curta, atingindo 19,7 milhões de toneladas e nesse mesmo ano houve uma alta na produção de papel de 1%, somando 10,5 milhões de toneladas (2). Por se tratar da principal matéria-prima brasileira no processamento de madeira, a indústria de celulose gera inúmeros subprodutos, como por exemplo: costaneiras, refilos, aparas, cascas, serragem, cepilhos, dentre outros. Parte desses subprodutos provenientes do processamento de madeira de *Eucalyptus* é utilizada para cogeração de energia (3).

Durante o processamento de toras de *Eucalyptus* na indústria de celulose é gerado uma grande quantidade de um subproduto (“serragem”), tendo em sua composição mais de 60% de celulose e hemicelulose. Essas frações contêm baixa eficiência energética, sendo uma alternativa utilizá-las na produção de bioprodutos de interesse comercial com alto valor agregado. A hemicelulose é o segundo polissacarídeo natural mais abundante em madeira de *Eucalyptus* e possui diversas aplicações tecnológicas, como confecções de biofilmes e aditivos de papel. Além disso, a hemicelulose na sua forma hidrolisada, principalmente como xilo-oligossacarídeos (XOS) é aplicada para fins nutricionais, terapêuticos, analíticos, dentre outros (4-6).

Atualmente há uma grande preocupação mundial com a qualidade de vida e a saúde, desta forma, havendo maior seletividade com os alimentos consumidos. Há um grande interesse mundial no consumo de alimentos saudáveis ou substâncias funcionais, ou seja, aquelas que auxiliam no bom funcionamento do organismo. Essas substâncias podem estar presentes naturalmente em alimentos ou podem ser adicionados aos produtos industrializados. Por esse motivo há uma grande demanda de consumidores por alimentos mais saudáveis e de calorias controladas (7,8).

Assim, um grande número de variedades em compostos alternativos vem surgindo, dentre eles se destacam os XOS, prebióticos, que são definidos segundo a Associação Científica Internacional de Probióticos e Prebióticos (ISAPP) como: *“um substrato que é utilizado seletivamente por microrganismos*

hospedeiros conferindo um benefício à saúde" que possuem atividades funcionais significativas, estimulando o crescimento seletivo de probióticos em condições intestinais, além de possuírem a vantagem de serem obtidos através de fontes altamente disponíveis e de baixo custo, como os subprodutos florestais e agroindustriais (16).

Os XOS são oligossacarídeos de cadeias curtas (2-12 unidades de xilose) conectados através de ligações do tipo β-(1-4). Esses compostos são responsáveis por diversos efeitos benéficos relacionados à saúde, como por exemplo: prevenção de cáries, diminuição de níveis séricos de colesterol e o estimulo de crescimento de bifidobactérias no trato gastrointestinal (4,5,9-14). Os efeitos benéficos à saúde estão relacionados com as suas propriedades físico-químicas, uma vez que são moderadamente doces, estáveis em uma ampla faixa de pH, temperatura, e ainda conferem características sensoriais aos alimentos. Os XOS são empregados em vários produtos alimentícios para humanos e animais, em alguns países como o Japão (4). Além do efeito prebiótico, os XOS têm outras aplicações, tais como: antioxidantes, antialérgicos e prevenção de anemia e arteriosclerose (4,5,14).

Naturalmente presentes no mel, frutas, vegetais e outros, mas não em quantidades suficientes para causar efeitos prebióticos, os XOS exibem uma temperatura (até 100°C) e a estabilidade a acidez (pH 2,5-8), o que explica uma necessidade de produção em escala industrial de material ricos em xilana, como biomassa lignocelulósica. Deste modo a indústria está focada no desenvolvimento de diferentes processos de produção de XOS com maior eficiência e valor agregado para cumprir as necessidades do mercado (17).

A biomassa lignocelulósica usada como matéria-prima para produção de XOS utiliza os seguintes métodos: auto-hidrolítico, químico ou enzimático ou ainda usando uma abordagem combinatória. Os métodos químico e auto-hidrolítico produzem XOS com graus imprevisíveis de formação de subprodutos indesejáveis, como furfural e hidroximetilfurfural (HMF), além de exigirem uma alta temperatura e pressão e suportar altas concentrações de álcais e/ou ácidos (57). Em contraste a hidrólise enzimática pode ser realizada em condições mais suaves, todavia, em tempos mais longos e o custo da enzima, recuperação ou reciclagem devem ser consideradas para aplicações em grande escala se tornando menos vantajosos (18).

A produção de XOS por pré-tratamento hidrotérmico (PTH) gera uma grande quantidade de compostos indesejáveis (incluindo monossacarídeos, ácido acético, produtos derivados da oxidação de monossacarídeos e aromáticos). Desse modo, o refino de HH ricos em XOS oriundos de PTH é complexo, exigindo a integração de diversas etapas de processamento "*downstream*", como por exemplo, evaporação, precipitação, extração líquido-líquido (ELL) e adsorção (15). Dentre essas técnicas, a extração ELL surge como uma técnica bastante versátil, tendo sido amplamente aplicada para a separação e purificação parcial de uma ampla variedade de biomoléculas. A proposta de purificar XOS para aplicação como prebiótico a partir de subprodutos agroindustriais baseia-se no fato desses produtos terem maior valor agregado (U$$ 22-50 Kg de XOS) quando comparado à polpa de celulose e energia elétrica (19). Com o desenvolvimento de uma metodologia eficiente para a purificação de XOS a partir de materiais lignocelulósicos, como o subproduto de *Eucalyptus* espera-se impulsionar ainda mais o desenvolvimento de estudos relacionados às suas aplicações.

Madeira: composição química e estrutura

A composição química da madeira pode ser dividida em frações de baixa e elevada massas molares. A fração de baixa massa molar é composta por substâncias orgânicas, geralmente denominadas de extrativos, e substâncias inorgânicas, que são sais de íons metálicos. Os extrativos compreendem vários compostos químicos, que podem ser extraídos com solventes orgânicos, embora alguns deles também sejam solúveis em água. Estes compostos são responsáveis por características como odor, cor e sabor dos materiais lignocelulósicos e estão presentes em pequenas quantidades (entre 2-8%). Como exemplos de extrativos, podemos citar: ceras, flavonóides, terpenos, ligninas e ácidos graxos, que são encontrados livres ou esterificados. Os compostos inorgânicos estão presentes em quantidades ainda menores nos materiais lignocelulósicos (de 1-2%) (20).

As macromoléculas representam a quase totalidade dos tecidos vegetais e compreendem apenas três classes de compostos: celulose, polioses (hemicelulose) e lignina. A celulose é o componente mais abundante na madeira (cerca de 50%), sendo um polímero linear, com regiões amorfas e cristalinas,

formado exclusivamente por moléculas de anidro-glicose, que se associam por ligações β-(1-4) glicosídicas (Figura 1) (20).

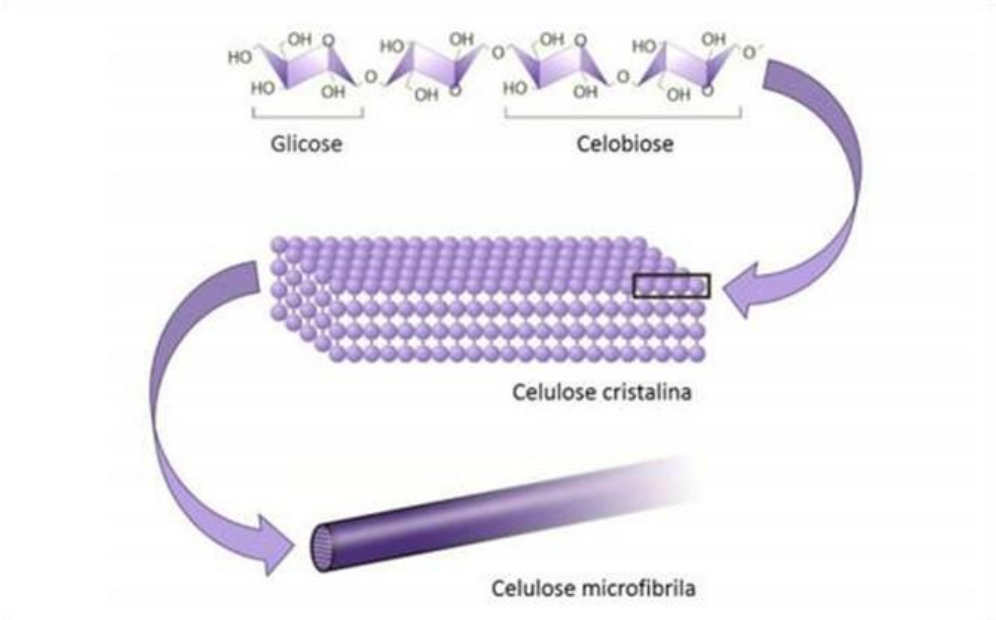


Figura 1. Representação da estrutura de um fragmento de celulose. Adaptado de Fonseca, 2015.

A massa molar da celulose varia consideravelmente (50.000 - 2,5 milhões $g.mol^{-1}$), 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 anidro-glicose. 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. Outra característica da celulose é a possibilidade de formar ligações de hidrogênio intra e intermoleculares, dando origem às microfibrilas. Na parede celular dos materiais lignocelulósicos, as microfibrilas de celulose estão paralelamente organizadas e encaixadas em uma matriz de hemicelulose e lignina (20).

As hemiceluloses representam um tipo de polissacarídeo de menor grau de polimerização (100-200 unidades). As hemiceluloses são polissacarídeos lineares, porém contem grupos substituintes ao longo de sua cadeia principal (Figura 2). As cadeias principais das hemiceluloses podem ser compostas por glicose, manose e galactose (hexoses) além de xilose (pentose), dependo do

tipo e origem da hemicelulose. Desta forma, as hemiceluloses podem ser homopolímeros (por exemplo, xilana, formado por anidro-xilose na cadeia principal) ou heteropolímeros (por exemplo, glucomanana, formado por anidro-glicose e anidro-manose na cadeia principal). Os grupos substituintes podem apresentar quantidades variáveis de arabinose (grupo arabinosil), ácido acético (grupo acetil), além de ácidos urônicos e desoxi-hexoses em alguns tipos de madeira e gramíneas. O teor de hemiceluloses em diferentes tipos de madeiras e gramíneas é bastante variável, podendo-se admitir um valor médio de cerca de 20% (20).

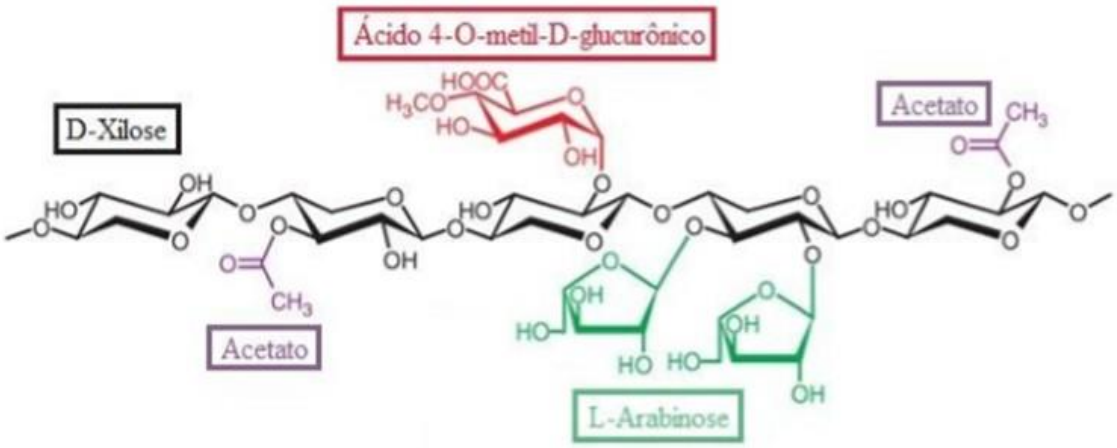


Figura 2. Estrutura de uma xilana de *Eucalyptus*. Tipos de ligações presentes em uma molécula de xilana. Adaptado de Fonseca, 2015.

A lignina é o segundo componente em maior quantidade nos materiais lignocelulósicos e sua presença proporciona toda a complexidade existente nos processos de polpação. A lignina é uma macromolécula formada pela polimerização desidrogenativa de álcoois hidroxicinamílicos (p-cumarílico, coniferílico e sinapílico). Devido ao processo de polimerização ser aleatório, a macromolécula de lignina possui estrutura bastante complexa, como mostra o modelo da Figura 3 (22).

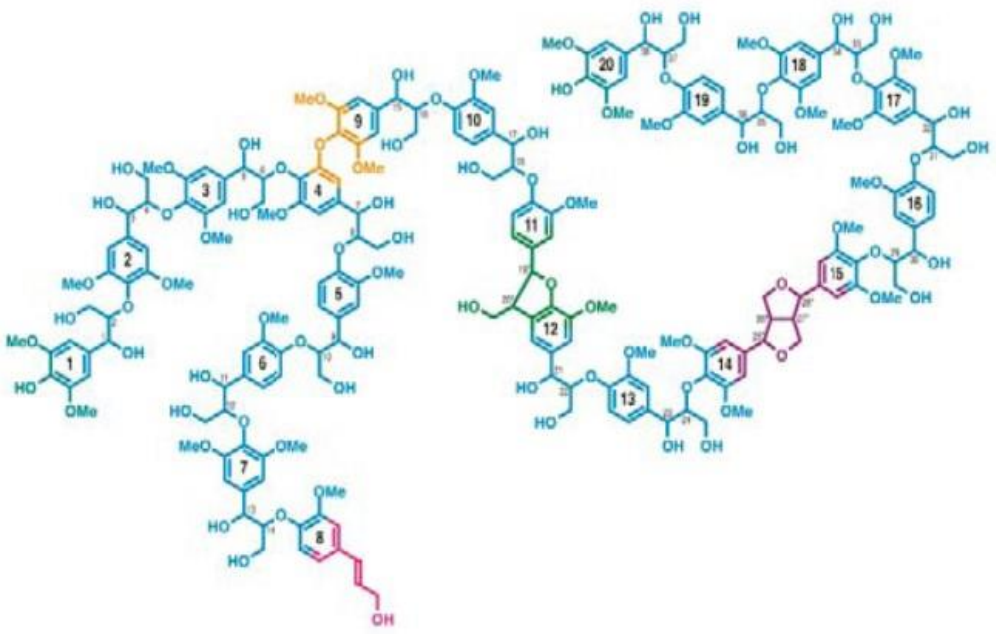


Figura 3. Estrutura - modelo da lignina (22).

A molécula de lignina está ligada quimicamente com a hemicelulose, 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 4C 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 C_9 da lignina.

A grande complexidade estrutural da lignina faz dela uma das macromoléculas naturais mais difíceis de caracterizar quimicamente. A maior parte da lignina não pode ser removida da matriz lignocelulósica sem que haja alterações estruturais durante a etapa de extração. Além disso, nenhum método de caracterização "*in situ*" é informativo o suficiente para ser empregado de forma conclusiva sem o auxílio de outras metodologias.

Portanto, a melhor maneira de estudar a estrutura dessa macromolécula é através do emprego de vários métodos complementares, que forneçam resultados corroborativos.

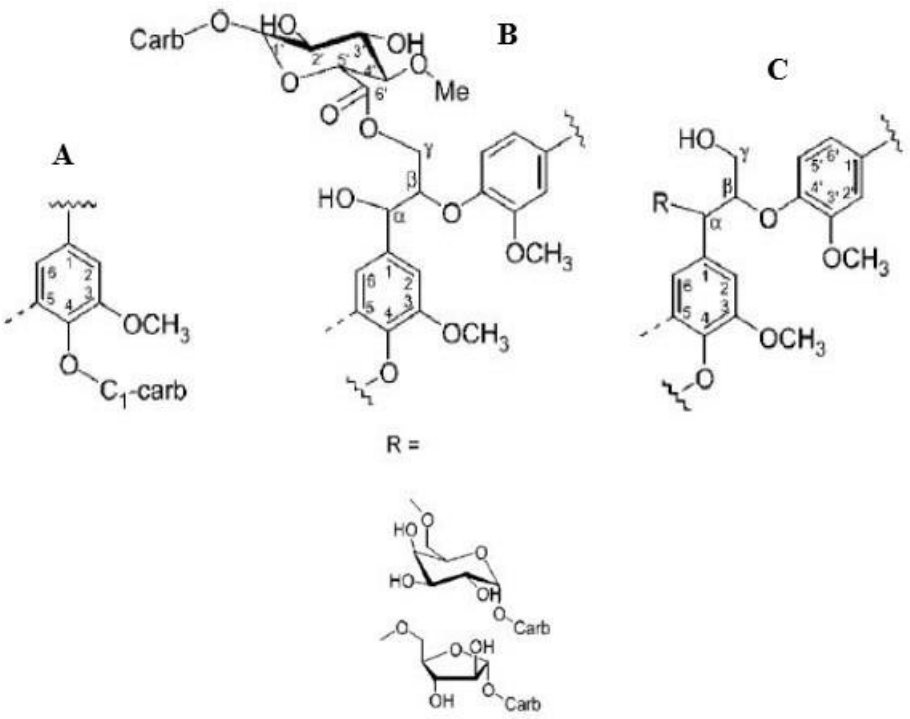


Figura 4. Principais tipos de ligações entre carboidratos e lignina em complexos lignina-carboidrato: (A) fenol glicosídeo, (B) éster e (C) éter benzílico (23).

É importante ressaltar que os componentes da madeira se encontram intimamente associados, para assim constituir o complexo celular da biomassa vegetal. Na parede celular do vegetal, tais compostos se organizam formando diferentes camadas. Desde a lamela média (ML) até o lúmen da célula, encontram-se as paredes primária, secundária, formada pelas camadas S_1, S_2 e terciária (ou S_3). A lignina ocorre, em maior quantidade, na parede S_2 e apresenta concentração elevada na lamela média. As hemiceluloses dispõem-se rodeando as microfibrilas de celulose (20). A Figura 5 AB mostra as várias camadas da parede celular e ilustram como a lamela média envolve as células, funcionando como sustentador do complexo celular que forma uma árvore. A Figura 6 AB mostra a microscopia eletrônica

e um modelo didático de como as microfibrilas de celulose estão organizadas e encaixadas em uma matriz de hemicelulose e lignina (20).

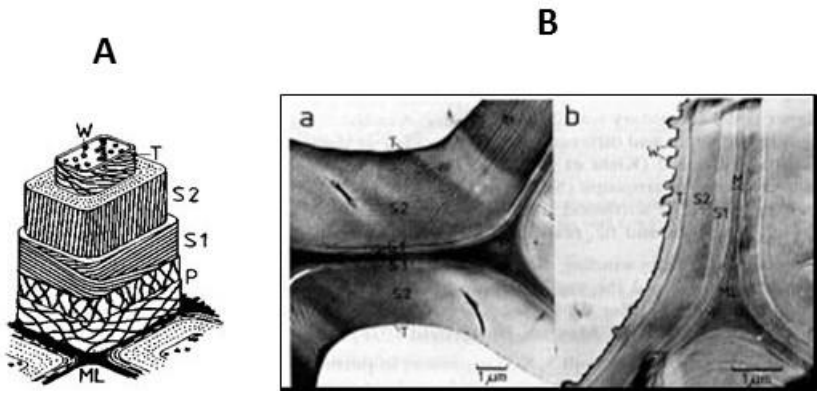


Figura 5. (A) Corte ilustrativo do sistema de camadas na parede das células de madeira. (B) Microscopia eletrônica de transmissão das células de madeira mostrando as camadas da parede celular: ML = lamela média, P = parede primária, S_1 = parede secundária, S_2 = parede secundária e T = parede terciária (20,24).

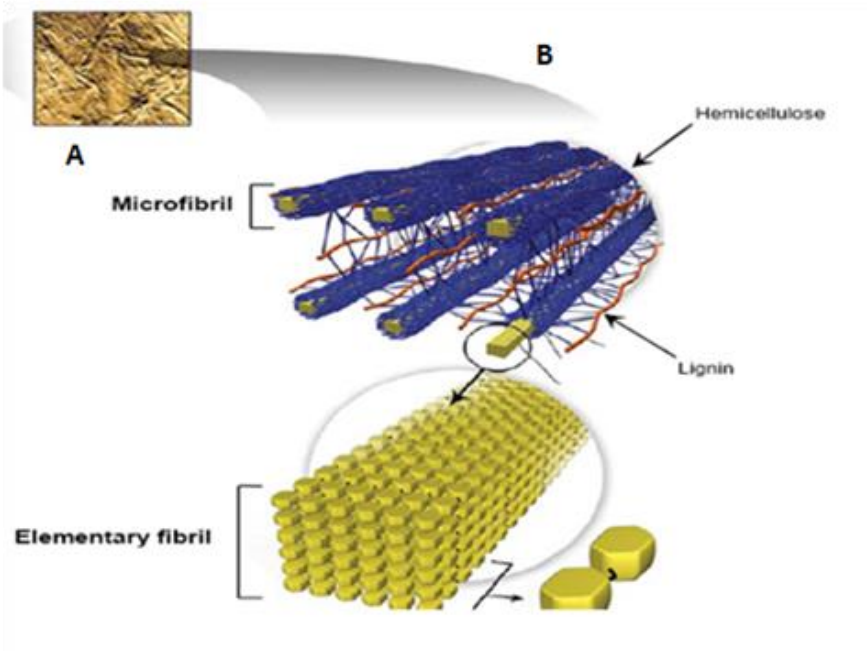


Figura 6. (A) Microscopia eletrônica de lignocelulósico. (B) Modelo didático que explica como as microfibrilas de celulose estão organizadas e encaixadas em uma matriz de hemicelulose e lignina presente em um lignocelulósico (20,25).

Produção de xilo-oligossacarídeos (XOS) via pré-tratamento hidrotérmico (PTH) de materiais lignocelulósicos

Os XOS são oligômeros constituídos de monômeros de xilose ligados por ligações do tipo β-(1-4) glicosídicas e apresentam variedades na proporção e tipo de grupos substituintes, como grupos acetil, arabinosil e ácidos urônicos. A composição depende da origem do material e do processo de obtenção (26). Os materiais lignocelulósicos utilizados para a produção de XOS são oriundos de uma grande variedade de subprodutos, como por exemplo: florestais (madeira de *Eucalyptus*) e agroindustriais (sabugo de milho, amêndoas, oliva, cascas de arroz, cevada e aveia) (27-30).

O PTH é considerado uma reação de auto hidrólise realizada em temperaturas entre 120-220°C, em reatores operados em modo contínuo ou em batelada, com controle de temperatura e pressão (30,31). O reator é preenchido com o material no estado sólido e adicionado água (permitindo o controle da consistência da reação, ou seja, a relação sólido/líquido). Além disso, as reações são conduzidas em temperaturas e tempos pré-fixados (32,33). Desta forma, o PTH é capaz de fracionar o material lignocelulósico (34). Os XOS obtidos por PTH apresentam estrutura mais conservada quando comparado a outros métodos. Por exemplo, no PTH somente parte dos grupos ésteres são removidos, enquanto que em processos alcalinos ocorre saponificação desse grupo (15).

A temperatura, o tempo e a consistência são as principais variáveis no processo de auto hidrólise. Através da relação entre essas variáveis se determina o fator de severidade do processo, o qual apresenta efeito direto sobre a acidificação do meio pela clivagem dos grupos acetil, geração dos produtos de oxidação de monossacarídeos e grau de polimerização dos XOS (34-38).

Uma avaliação de PTHs em uma mistura de madeira de folhosas foi reportada na literatura (37). Nesse trabalho, os autores avaliaram o efeito da temperatura e do tempo no PTH, variando a temperatura de 130-170°C, e o tempo de 15-500 min. Os resultados previamente reportados apresentaram conversões de xilana em XOS da ordem de 13-53% (37).

Garrote *et al*. (2002) avaliaram o PTH em madeira de *Eucalyptus globulus*. Nesse trabalho os autores realizaram um pré-tratamento hidrotérmico a uma temperatura de 181°C, tempo de 37,5 min e em uma relação sólido/líquido de

1:6, respectivamente. Nessas condições a conversão média de xilana em XOS foi de aproximadamente 52% (massa/massa). Entretanto, as conversões de xilana em xilose e furfural foram apenas de 6% e 1%, respectivamente (massa/massa) (35). Outro estudo também reportou um PTH em madeira de *Eucalyptus globulus*, variando a temperatura entre 150-190°C e o tempo entre 24-34 min, obtendo conversões de xilana em XOS da ordem de 12-60% (% massa/massa) (36).

Propriedades e aplicações dos xilo-oligossacarídeos (XOS)

XOS são oligômeros constituídos por unidades de xilose unidas por ligações glicosídicas do tipo β-1,4, formando oligossacarídeos entre 2-12 unidades de xilose, como por exemplo, xilobiose (X_2), xilotriose (X_3), xilotetraose (X_4), xilopentose (X_5), xilohexaose (X_6), xiloheptaose (X_7), dentre outros (Figura 6) (41).

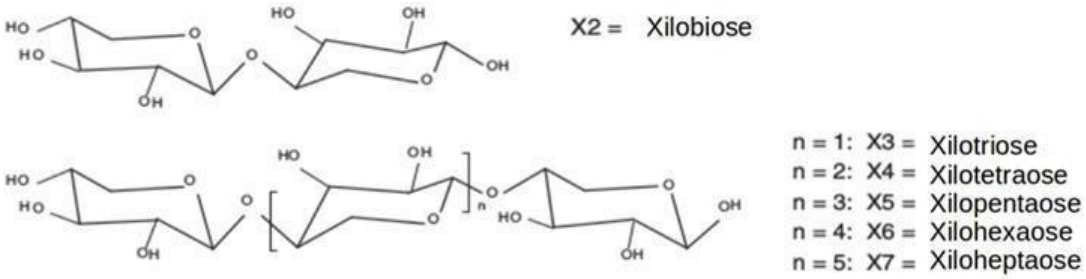


Figura 7. Estrutura dos xilo-oligossacarídeos (XOS) (39).

Os XOS apresentam importante potencial para serem utilizados no setor alimentício (alimentos funcionais, prebióticos, aditivos em ração de animais domésticos e peixes), setor farmacêutico (controle da obesidade, tratamento de infecções gastrointestinais, agente ativo contra osteoporose, otite e disfunções na pele e cabelo) e na agricultura (estimulante e acelerador de crescimento). As aplicações mais importantes, em termos de mercado, correspondem à sua utilização como ingredientes de alimentos funcionais, como por exemplo, em combinação com extrato solúvel de soja, refrigerantes, chá, produtos derivados de leite (iogurtes, doces, bolos, biscoitos, massas e em alimentos especiais para

idosos e crianças) ou como componentes ativos de preparações simbióticas (5, 15,40). A Figura 8 resume as principais aplicações dos XOS.

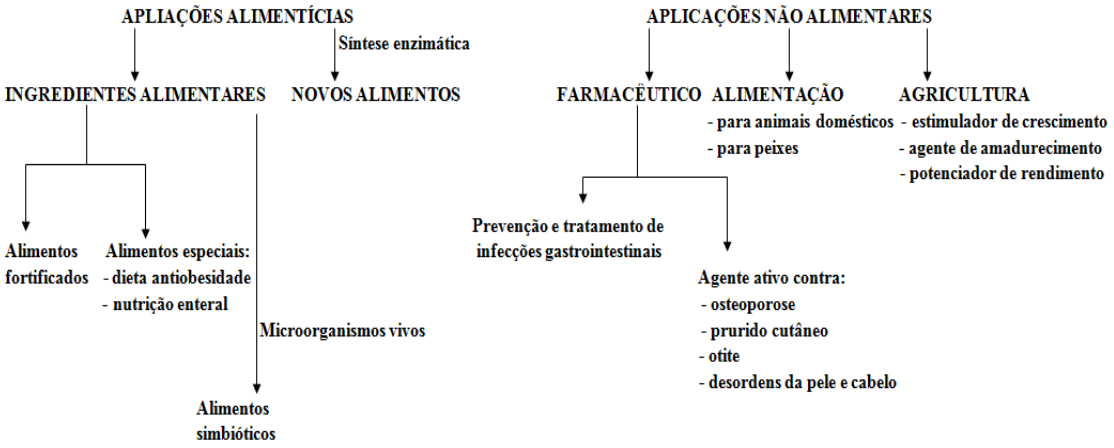


Figura 8. Aplicações comerciais de xilo-oligossacarídeos (XOS). (5).

O mercado japonês foi o primeiro a incorporar XOS nos alimentos, e hoje é responsável pela fabricação de 650 toneladas de XOS por ano (4,15) e em 2001 já existiam aproximadamente 60 empresas utilizando XOS em cerca de 100 produtos alimentícios, sendo alguns de caráter prebiótico (5). Os prebióticos podem ser definidos como “ingredientes seletivamente fermentescíveis que permitem mudanças específicas na composição e ou atividade da microbiota gastrointestinal que conferem benefícios ao hospedeiro” (55).

Os XOS fornecem modificações úteis ao sabor e as características físico-químicas dos alimentos, muitos destes oligômeros possuem propriedades que são favoráveis à saúde dos consumidores, pois não são cariogênicos, possuem baixo valor calórico e estimulam o crescimento de bactérias benéficas no trato gastrointestinal. Além disso, são estáveis em meio ácido, resistentes ao calor e oferecerem menor disponibilidade de energia para alcançar efeitos biológicos significativos com baixas ingestões diárias (15,40).

Estudos recentes mostram que ésteres e éteres de XOS têm sido utilizados como matérias-primas na produção de compostos termoplásticos biodegradáveis, filmes solúveis em água, cápsulas e hidrogéis de quitosana-xilana. Esses produtos apresentam alto valor agregado e são biodegradáveis, sendo vantajosos para o meio ambiente. Na área da saúde tem sido avaliada a

síntese de compostos a base de xilana e XOS com atividade contra vírus e processos carcinogênicos (15).

Refino de hidrolisados hemicelulósicos (HHs) rico em xilo-oligossacarídeos (XOS)

O processo de extração e refino de bioprodutos visando uma aplicação industrial deve ser facilmente escalonável e capaz de remover impurezas que estão sobrepostas com o produto principal de interesse. O nível de purificação, a velocidade do processo e o rendimento global de recuperação dos bioprodutos de interesse devem ser levados em consideração durante todo o processo de purificação, os quais devem ser adequados aos valores do produto de interesse final (42).

Neste sentido, considerando a complexidade e diversidade dos XOS obtidos de PTH, e tal como outras biomoléculas, a extração e purificação destes exige o desenho e otimização das etapas de "*downstream*". Particularmente, se a finalidade for à aplicação de XOS nos setores alimentício e farmacêutico, estes devem ser refinados, pois o HH oriundo do PTH produz uma variedade de outros compostos indesejáveis, como por exemplo: monossacarídeos, produtos derivados de lignina (aromáticos solúveis), ácido acético, produtos de degradação de monossacarídeos (furfural, ácido levulínico e fórmico), dentre outros. Para fins comerciais, a porcentagem de pureza do hidrolisado concentrado rico em XOS deve estar entre 75-95% (15).

A literatura reporta trabalhos relacionados à ELL de HH ricos em XOS oriundos de materiais lignocelulósicos serem ainda muito limitados, nas próximas subseções são sucintamente apresentados os principais processos de refino de bioprodutos utilizando técnicas de ELL com solvente orgânico.

Estratégias de refino de hidrolisados hemicelulósicos (HHs) ricos em xilo-oligossacarídeos (XOS)

Dependendo do grau de pureza desejado, uma sequência de diferentes métodos pode ser empregada, como por exemplo: evaporação sob vácuo, responsável por aumentar a concentração de XOS e remover componentes voláteis; ELL com solvente orgânico, separação de frações não sacarídeas, além

de separações cromatográficas, para separação e quantificação do bioproduto (5). A Tabela 1 apresenta as principais etapas de refino reportadas na literatura.

Tabela 1. Possíveis etapas de refino de hidrolisado hemicelulósico (HH) rico em XOS oriundo de pré-tratamento hidrotérmico (PTH) de materiais lignocelulósicos (15).

Substrato	Etapas de purificação de XOS
Madeira de *Eucalyptus*	Concentração; extração líquido-líquido (ELL) com solvente orgânico (acetato de etila); extração líquido-líquido (ELL) com solvente orgânico (etanol, 2 propanol, acetona); precipitação.
Madeira de *Eucalyptus*	Extração líquido-líquido (ELL) com solvente orgânico (acetato de etila); evaporação; liofilização; extração líquido-líquido (ELL) com solvente orgânico (etanol, 2 propanol, acetona).

Adaptada pelo autor.

Extração líquido-líquido (ELL) utilizando solventes orgânicos

A purificação de soluções pelo método de ELL é amplamente aplicada a inúmeros processos industriais, com o objetivo de recuperar bioprodutos solúveis e/ou remover impurezas indesejáveis. Esse método envolve a mistura de dois líquidos imiscíveis ou líquidos parcialmente imiscíveis, e sua subsequente separação. Devido à alta imiscibilidade, este processo permite a fácil recuperação dos solventes utilizados, além de ser possível atingir um alto grau de recuperação dos bioprodutos de interesse (43). Entretanto, muitos fatores devem ser considerados na avaliação do uso de solventes, como por exemplo: avaliação do uso de solventes potenciais para uma extração em particular, processo com capacidade de particionamento do bioproduto, afinidade ou seletividade para o bioproduto alvo sobre outros constituintes, além de uma seleção de solventes ambientalmente aceitos (44). Outros fatores, como o tipo de solvente, concentração do hidrolisado, pH da solução aquosa e vazão do processo, também influenciam a seletividade e o coeficiente de partição das biomoléculas-alvo. A literatura recente reporta trabalhos que aplicaram o método de ELL com acetato de etila para remoção efetiva de ácido acético a partir de hidrolisados hemicelulósicos oriundos de madeira de *Eucalyptus* (44,45).

A ELL utilizando solventes orgânicos é eficiente para remoção de componentes não-sacarídeos de por PTH, permitindo a obtenção de uma fase aquosa seletivamente refinada (rica em XOS), e uma fase orgânica contendo principalmente compostos aromáticos e extrativos. Os principais solventes orgânicos utilizados neste tipo de extração são etanol, acetona e 2-propanol. O etanol tem mostrado potencial no refino de XOS em HH oriundos de madeira proveniente de *Eucalyptus*, podendo inclusive separar açúcares monoméricos (xilose e glicose) dos XOS (15, 45). No entanto, é importante destacar que o grau de purificação dos bioprodutos de HH oriundos de materiais lignocelulósicos e a recuperação e reciclagem do solvente são muito dependentes do solvente empregado e da origem da matéria-prima (material lignocelulósico). Desse modo, a integração desse tipo de extração com outras operações unitárias, como por exemplo, a indução da precipitação com solventes em por PTH, pode ser utilizada como uma abordagem eficiente para o refino de XOS.

OBJETIVO

O objetivo principal deste estudo foi avaliar uma metodologia de refino de um hidrolisado hemicelulósico (HH) rico em xilo-oligossacarídeos (XOS) obtido a partir de subproduto de *Eucalyptus* (SE) utilizando as técnicas de evaporação e de extração líquido-líquido (ELL) com solvente orgânico. A seguir segue os objetivos específicos que foram estabelecidos para atingir a meta deste trabalho:

- Obter o HH a partir de pré-tratamento hidrotérmico (PTH) na forma de subproduto de *Eucalyptus* (SE);
- Caracterizar o HH frente aos teores de produtos desejados (XOS) e produtos indesejados;
- Submeter o HH à extração líquido-líquido (ELL) com diferentes proporções de acetato de etila e avaliar o grau de refino em relação aos compostos desejados (XOS) e indesejados;
- Submeter o HH selecionado pós-ELL à evaporação sob vácuo seguido de ELL e avaliar o grau de concentração e grau de refino em relação aos e compostos desejados (XOS) e indesejados.

2. CAPÍTULO 1

Avaliação do refino de hidrolisado hemicelulósico rico em xilo-oligossacarídeos obtido por pré-tratamento hidrotérmico a partir de subproduto de *Eucalyptus*

[a]São Paulo State University (UNESP), School of Pharmaceutical Science (FCF), Department of Bioprocess Engineering and Biotechnology. Araraquara-SP, Brazil. 14800-903

[b] University of Coimbra (UC) Departament of Chemical Engineering Faculty of Sciences and Technology. Coimbra-Portugal. 3030-790.

[a]Cecília Aline Otaviano, [a]Cassamo U. Mussagy, [a]Fernando Roberto Paz-Cedeno, [b]Jorge Fernando Brandão Pereira and [a]Fernando Masarin[*]

(*) Corresponding author

Email addresses:

CAO: cecilia.otaviano@unesp.br
CUM: cassamo.mussagy@unesp.br
FRPC: fernando.paz@unesp.br
JFBP: jfbpereira@eq.uc.pt
FM: fernando.masarin@unesp.br

RESUMO

Os xilo-oligossacarídeos (XOS) são bioprodutos alimentares altamente eficazes no mercado de prebióticos. O pré-tratamento hidrotérmico (PTH) em condições adequadas sob subproduto de *Eucalyptus* (SE) possibilita a produção de hidrolisados hemicelulósicos (HH) ricos em XOS. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar uma metodologia eficiente para refinar o HH rico em XOS e impulsionar ainda mais o desenvolvimento de estudos relacionados às suas aplicações. O HH foi submetido a processos de extração líquido-líquido (ELL) com solvente orgânico, evaporação sob vácuo e a combinação das duas técnicas. Ambas as técnicas de refino utilizadas apresentaram potencial eficiente na remoção dos componentes não desejados (principalmente aromáticos totais, incluindo hidroximetilfurfural (HMF) e furfural). A ELL com acetato de etila se mostrou eficaz em todas proporções avaliadas resultando em uma faixa de índice de remoção de aromáticos totais de 63-82%, além da perda pouco expressiva para os XOS (média 15%), no entanto a condição 1:1 (HH:acetato de etila) apresentou-se como melhor opção, pois as proporções com maiores volumes de acetato de etila em relação ao HH (1:2 e 1:4) não mostram um aumento substancial no índice de remoção de interferentes em relação a proporção 1:1, para se aumentar o volume de solvente orgânico na extração. A evaporação sob vácuo do HH promoveu o aumento do índice de remoção dos aromáticos totais (55,4%) com perda média de XOS de 17,8%. A evaporação sob vácuo do HH combinada com ELL (proporção 1:1) resultou em aumento do índice de remoção dos aromáticos totais (69,6%) com perda média de XOS de 37%. Ambas técnicas ELL e evaporação sob vácuo, bem como a combinação destas, foram eficazes no refino do HH rico em XOS, apresentando potencial para o aprimoramento de futuras etapas de um processo industrial.

PALAVRAS-CHAVE: Xilo-oligossacarídeos; Purificação; Extração líquido-líquido; Evaporação sob vácuo.

HIGHLIGHTS

- O pré-tratamento hidrotérmico otimizado em subproduto de *Eucalyptus* foi aplicado para a obtenção de hidrolisado hemicelulósico rico em xilo-oligossacarídeos
- O hidrolisado hemicelulósico foi refinado por extração líquido-líquido com diferentes proporções de acetato de etila
- O hidrolisado hemicelulósico foi concentrado e refinado utilizando-se a técnica de evaporação sob vácuo combinada com extração líquido-líquido com aceto de etila

INTRODUÇÃO

A madeira proveniente do gênero *Eucalyptus* é a principal fonte de fibras para a produção de celulose e papel dos países da América do Sul (1). Segundo o relatório do IBÁ (Instituto Brasileiro de Árvores, 2019), o Brasil se manteve como o segundo maior produtor mundial de celulose de fibra curta, atingindo 19,7 milhões de toneladas (2). Por se tratar da principal matéria-prima brasileira no processamento de madeira, a indústria de celulose gera inúmeros subprodutos, como por exemplo: costaneiras, refilos, aparas, cascas, serragem, cepilhos, dentre outros (3). O grande volume de resíduos de materiais lignocelulósicos gerados pela indústria de celulose despertou interesse no aprimoramento em sua utilização, já que representam uma fonte de matérias-primas ainda pouco exploradas e geralmente são usados apenas na cogeração de energia (4).

A consciência sobre a saúde vem aumentando consideravelmente ao longo dos anos e os consumidores estão mais atentos ao uso de produtos naturais como medicina preventiva, priorizando cada vez mais suas preferências alimentares a alimentos funcionais (5). Suplementos alimentares biologicamente ativos receberam grande atenção e uma demanda crescente de consumo, como os xilo-oligossacarídeos (XOS), prebióticos que podem ser produzidos a partir de materiais lignocelulósicos como matéria-prima (6).

O interesse na utilização de XOS como ingrediente para alimentos funcionais é baseado nos múltiplos efeitos benéficos a saúde entre eles destacam-se: crescimento de bifidobactérias e lactobacilos no trato

gastrointestinal, prevenção de cáries e diminuição de níveis séricos de colesterol, alta capacidade antioxidante, inibidor de neurotoxicidade, diabetes, inflamação no cólon resultando em uma utilização potencial na área cosmética, médica e farmacêutica (6,7).

Os XOS são oligossacarídeos não digeríveis que contém de 2-12 unidades de xilose ligadas através de ligações do tipo β-(1-4) (8,9). São produzidos a partir de materiais lignocelulósicos ricos em xilana e os recursos de biomassa são potencialmente recuperáveis, renováveis e prontamente disponíveis em grande escala, o tipo de abundância encontrada desse componente vai depender da matéria-prima em questão, por esse motivo é importante um conhecimento prévio da composição de um determinado material lignocelulósico (7,10).

XOS tem um alto valor alto de mercado custando em média US$ 22-50 dólares por quilograma de produto, variando com base do seu grau de pureza. Estima-se que o mercado global alcance a marca de US$ 130 milhões de XOS no ano de 2023, dado ao crescente valor de mercado e seu crescente interesse dentro da cadeia de prebióticos (4,10).

O pré-tratamento hidrotérmico (PTH) em materiais lignocelulósicos é ecologicamente correto operado de forma simples e não causa problemas de corrosão em equipamentos devido o único reagente a ser utilizado é a própria água, no entanto pode causar o abuso dos recursos de água se não for devidamente utilizada e recuperada de forma adequada. Além disso, o PTH em materiais lignocelulósicos promove a formação de um hidrolisado hemicelulósico (HH) rico em XOS e uma gama de outros compostos indesejáveis (incluindo monossacarídeos, ácido acético, produtos derivados da oxidação de monossacarídeos e aromáticos). Desse modo, o refino de HH ricos em XOS oriundos de PTH é complexo, exigindo a integração de diversas etapas de processamento (4,11,12).

Desta forma, o processo de extração e refino de bioprodutos (por exemplo XOS oriundos de HH) visando aplicação industrial deve compreender um processo pouco oneroso na etapa de aumento de escala (upstream) e ser capaz de remover impurezas que estão sobrepostas com o produto principal de interesse (downstream). O nível de purificação, a velocidade do processo e o rendimento global de recuperação dos bioprodutos de interesse devem ser levados em consideração durante o processo de refino (13). Particularmente, se

a finalidade for à aplicação de XOS nos setores alimentício e farmacêutico, estes devem ser refinados/purificados, pois o HH oriundo do PTH produz uma variedade de outros compostos indesejáveis como descrito anteriormente. Para fins comerciais, a pureza do HH concentrado ou sólido seco rico em XOS deve estar entre 75-95% (11).

Dependendo do grau de pureza desejado, uma sequência de diferentes métodos pode ser empregada para promover o refino do HH, como por exemplo: evaporação sob vácuo, responsável por aumentar a concentração de XOS e remover componentes voláteis; extração líquido-líquido (ELL) com solvente orgânico, separação de frações não sacarídeas, além de separações cromatográficas, para separação e quantificação do bioprodutos (9).

A purificação de soluções pelo método de ELL com solventes orgânicos é amplamente aplicada a inúmeros processos industriais, com o objetivo de recuperar bioprodutos solúveis e/ou remover impurezas indesejáveis. Esse método envolve a mistura de dois líquidos imiscíveis ou líquidos parcialmente imiscíveis, e sua subsequente separação. Devido à alta imiscibilidade, este processo permite a fácil recuperação dos solventes utilizados, além de ser possível atingir um alto grau de recuperação dos bioprodutos de interesse (14). Entretanto, muitos fatores devem ser considerados na avaliação do uso de solventes orgânicos, como por exemplo: avaliação do uso potencial em extração, processo com capacidade de particionamento do bioproduto, afinidade ou seletividade para o bioproduto alvo sobre outros constituintes, além de uma seleção de solventes ambientalmente aceitos (15). Outros fatores, como o tipo de solvente, concentração do HH, pH da solução aquosa e vazão do processo, também influenciam a seletividade e o coeficiente de partição das biomoléculas-alvo. A literatura recente reporta trabalhos que aplicaram o método de ELL com acetato de etila para remoção efetiva de ácido acético a partir de HH oriundos de madeira de *Eucalyptus* (15,16).

A ELL utilizando solventes orgânicos é eficiente para remoção de componentes não-sacarídeos em HH oriundos de PTH, permitindo a obtenção de uma fase aquosa seletivamente refinada/purificada (rica em XOS), e uma fase orgânica contendo principalmente compostos aromáticos e extraíveis (11,16).

Dentro do âmbito do conceito apresentado, o objetivo deste trabalho foi desenvolver uma metodologia eficiente para refinar o HH rico em XOS obtido a

partir de subproduto de *Eucalyptus* (SE) e impulsionar ainda mais o aprimoramento de estudos relacionados às suas aplicações.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção do material

Neste estudo foi utilizado uma mistura de espécies de *Eucalyptus (E. grandis e E. urophylla)*, em uma proporção média de 1:1, que são as madeiras processadas diariamente na Empresa Fibria Celulose, localizada em Jacareí-SP. Ao cortar as toras de *Eucalyptus* para produzir cavacos de madeira, simultaneamente um material com menor granulometria é gerado (serragem de *Eucalyptus*) o qual denominamos de subproduto de *Eucalyptus* (SE) (4).

Obtenção de hidrolisado hemicelulósico por pré-tratamento hidrotérmico (PTH) do subproduto de *Eucalyptus* (SE)

O PTH foi realizado em equipamento munido de quatro reatores individuais de 1,5 L de capacidade (Reator da Regmed) dotado de controle de agitação mecânica, temperatura e monitoramento de pressão. Foram pesados aproximadamente 50 g (base seca) de SE em béquer de polipropileno de 1L que foram transferidos para os reatores de aço inoxidável. Após a transferência do material foi adicionado 500 mL de água destilada em cada reator, resultando em uma carga mássica ou consistência (razão sólido:líquido, massa/volume) de 10% Os reatores foram fechados. Para a impregnação do material, o equipamento foi ligado, ajustado a 160ºC ligado em uma rampa de aquecimento de aproximadamente 40 min. Após atingir a temperatura desejada os reatores permaneceram por 65 min. Ao final das reações os reatores foram desconectados e resfriados naturalmente por aproximadamente 6h. O hidrolisado hemicelulósico (HH) obtido pós-PTH foi filtrado em filtros de vidro sintetizados de porosidade número 3 de 250 mL (4). O filtrado foi recolhido e estocado em *freezer* a -20ºC até o momento do uso.

Extração líquido-líquido (ELL) dos hidrolisados hemicelulósicos (HH) utilizando solvente orgânico

A ELL com solvente orgânico foi realizado com o acetato de etila nas seguintes proporções volumétricas: 2:1, 1:4, 1:2 e 1:1 (solvente orgânico:HH, v/v, respetivamente). O procedimento com razão 1:1 também foi realizado com o HH previamente concentrado por evaporação sob vácuo. Sucintamente, 50 mL acetato de etila foi adicionado a 50 mL de HH (1:1), 50 mL de acetato de etila para 25 mL de HH (1:2), 100 mL de acetato de etila para 25 mL de HH (1:4) e 25 mL de acetato de etila e 50 mL de HH (2:1). As fases orgânicas e aquosas foram então misturadas em um tubo de centrífuga de 50 mL tipo *Falcon*® por 5 min a 25ºC utilizando-se agitador magnético à 300 rpm, e na sequencia separadas por funil de separação, repousadas por 30 min, de forma a atingir o estado de equilíbrio para separação das duas fases (11,14). Após a separação das fases, as amostras da fase orgânica e aquosa foram coletadas, medidos seus volumes em proveta e armazenadas em *freezer* a -20ºC até o momento do uso.

Evaporação sob vácuo

Consistiu na evaporação sob vácuo da solução do HH obtido do pré-tratamento PTH. O equipamento utilizado no processo foi um rota-evaporador de aço-inox (Heidolph), munido de bomba de vácuo operado em duas condições: PV_1 temperatura de 50ºC, pressão de 200 mBar por 10 min e 100 mBar por 50 min (21). Após a concentração do HH a amostra foi coletada, medido seu volume em proveta e armazenada em *freezer* a -20ºC até o momento do uso.

Procedimentos analíticos

O HH bruto, concentrado e as frações aquosas pós-ELL em solvente orgânico foram avaliadas em resposta à quantificação dos seguintes compostos: carboidratos (oligômeros e monômeros), ácido acético, aromáticos totais e derivados da oxidação de carboidratos (furfural, hidroximetilfurfural (HMF) e ácido fórmico). Aas frações orgânicas pós-ELL foram avaliadas em resposta aos aromáticos totais, furfural e HMF.

Determinação de XOS e xilose: Os teores de XOS e xilose foram determinados por cromatografia em fase líquida de alta eficiência (CLAE, SHIMADZU modelo NEXERA XR). A coluna utilizada foi uma BIO-RAD Aminex HPX-87C (300 x 7.8

mm): temperatura de forno de 80°C: eluente composto de água ultrapura com fluxo 0.6 mL.min^{-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. O pH dos HH foram ajustados para 6,5 com NaOH 1M, filtrado em cartuchos tipo SEP-PACK C_{18} e membrana de 0,45 µm prévio à análise. A quantificação dos XOS foi realizada com os seguintes padrões, de grau analítico, secos sob pentóxido de fósforo e vácuo: xilose (X_1), xilobiose (X_2), xilotriose (X_3), xilotetraose (X_4), xilopentaose (X_5) e xilohexaose (X_6). Sendo X_1 da SIGMA e X_2-X_6 da Megazyme-Irlanda. O cálculo do teor de XOS>6 foi realizado através de uma curva analítica com mistura equivalente dos seguintes padrões analíticos: xiloheptaose (X_7), xilooctaose (X_8) e xilonanaose (X_8) (ambos da Megazyme-Irlanda), os quais coeluem da coluna em um tempo de retenção de 6,7 min (4). Os experimentos foram realizados em triplicata.

Determinação de HMF e furfural: A determinação foi conduzida por CLAE (SHIMADZU modelo NEXERA XR). A análise foi realizada com um fluxo de 0,8 ml.min^{-1} a 25ºC com detecção em 276 nm. A coluna utilizada foi a ODS Hypersil com 250 mm de comprimento, 4,0 mm de diâmetro, preenchida com octadecil (C_{18}) como fase estacionária (5 um de diâmetro da partícula e 120A^{o} de diâmetro do poro, Marca Thermo). A fase móvel foi composta de acetonitrila:água (1:8) com ácido acético 1% (massa/volume) com tempo de análise de 12 min. Uma pequena alíquota dos HH foram filtradas em membrana de 0,45 µm prévio à análise. Os experimentos foram realizados em triplicata. Os padrões utilizados foram de grau analítico (SIGMA), secos sob pentóxido de fósforo e vácuo prévio a análise (4). Os experimentos foram realizados em triplicata.

Determinação de aromáticos totais: Os aromáticos solúveis totais foram quantificados através da leitura de absorbância em um espectrofotômetro UV-visível a 280 nm (Marca Thermo Scientfic, modelo Genesys 10S UV-Vis). Para a determinação da concentração dos aromáticos foi utilizado o coeficiente de extinção de 20 L.g^{-1}.cm^{-1} (4). Os experimentos foram realizados em triplicata.

Determinação de açúcares e ácidos orgânicos: Os teores de açúcares monoméricos e ácidos orgânicos (glicose, xilose, arabinose, ácido fórmico e ácido acético) foram determinados por CLAE. Para isso, uma pequena alíquota dos HH foram filtradas em cartuchos do tipo SEP-PACK C_{18} e membrana de 0,45 µm prévio à análise. A análise cromatográfica foi realizada em cromatógrafo da

marca SHIMADZU, modelo NEXERA XR nas seguintes condições: coluna BIO-RAD Aminex HPX-87H (300 x 7.8 mm); temperatura do forno: 60º C; eluente: H_2SO_4 5 mM com fluxo 0.6 mL.min^{-1}; volume de amostra: 20 µL; detector: índice de refração a 60ºC (SHIMADZU, modelo RID-20A) com um tempo de análise de 17 min. Os padrões utilizados foram de grau analítico (SIGMA), secos sob pentóxido de fósforo e vácuo prévio a análise (4). Os experimentos foram realizados em triplicata.

Varredura no UV-Visível: Uma pequena alíquota do filtrada em membrana de 0,45 µm prévio à análise e então submetidas a espectros de varredura em espectrofotômetro (Marca Thermo Scientfic; Modelo Genesys 10S UV-Vis) na região do UV-Visível (190-700 nm) e obtidas as absorbâncias em função do comprimento de onda.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Obtenção de hemicelulósico (HH) por pré-tratamento hidrotérmico (PTH) de subproduto de *Eucalyptus* (SE) e caracterização dos produtos formados

O PTH foi realizado com o objetivo de hidrolisar a fração hemicelulósica do SE para a confirmação da produção de XOS no HH, conforme reportado na literatura (4). Os autores determinaram as condições ótimas de temperatura, tempo e da carga mássica (razão massa/volume do meio reacional) também denominada de consistência por delineamento experimental do tipo central composto visando à produção máxima de XOS a partir de subproduto de *Eucalyptus*. A Figura 1 apresenta o aspecto visual do subproduto de *Eucalyptus* (a) e do HH obtido após PTH sobre o SE (b).

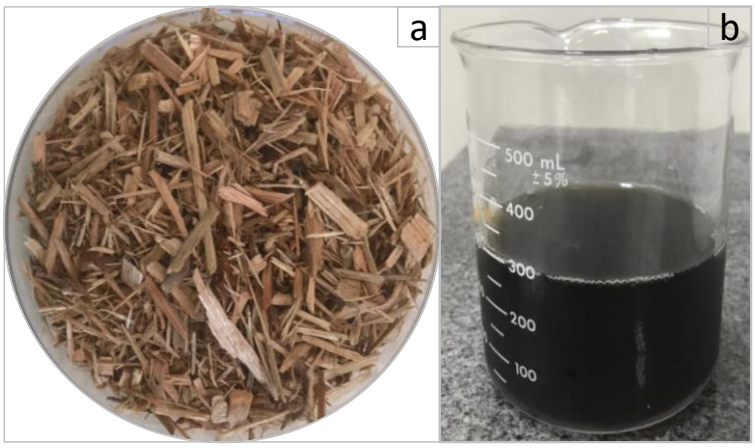


Figura 1. (a) Subproduto de *Eucalyptus* (SE). (b) Hidrolisado hemicelulósico (HH) obtido após pré-tratamento hidrotérmico (PTH) sobre SE.

Os principais compostos formados no HH após a aplicação do PTH no SE em condição previamente otimizada foram os seguintes produtos: aromáticos totais, xilose e XOS, conforme apresentado na Figura 2. Os dados são apresentados em miligramas de produtos formados por grama de SE (base seca).

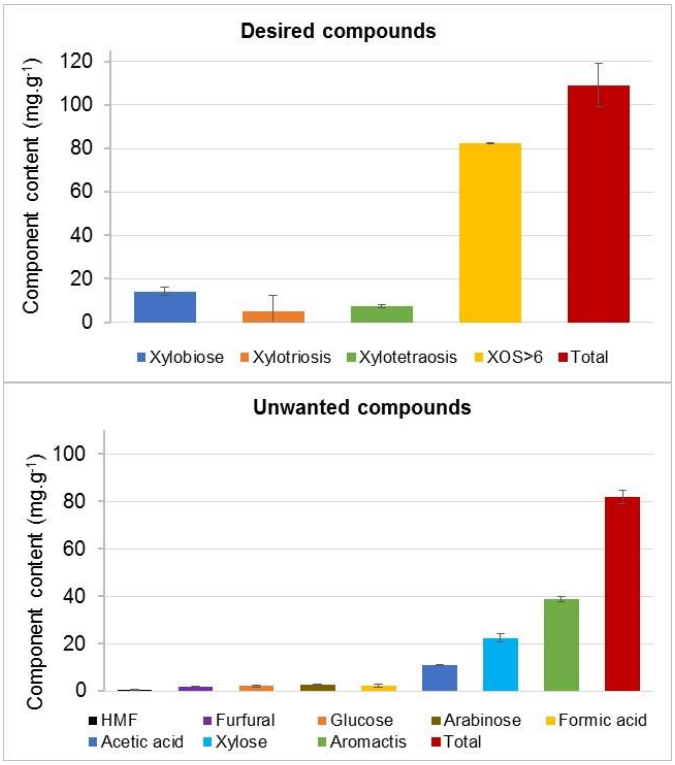


Figura 2. Teor de componentes desejados (XOS) e indesejáveis em hidrolisado hemicelulósico (HH) obtido por pré-tratamento hidrotérmico (PTH) em subproduto de *Eucalyptus* (SE).

Os teores de HMF, furfural, glicose, arabinose, ácido fórmico, ácido acético, xilose e aromáticos totais (compostos não desejáveis) no HH obtido após PTH foram de 0.5; 1.9; 2.1; 2.7; 2.3; 10.9; 22.5; 38.8 $mg.g^{-1}$, respectivamente. A soma de todos os compostos foi de aproximadamente 81.8 $mg.g^{-1}$ (Figura 3). Os teores dos compostos não desejados resultaram em valores semelhantes ao reportado em literatura por Neto *et al*. (2020).

A Figura 2 também apresenta os teores dos produtos desejados (XOS) formados no HH após o PTH sobre o SE. Os teores de xilobiose, xilotriose, xilotetraose e XOS>6 (XOS com 6 ou mais unidades de xilose) foram de aproximadamente 14.2; 5.1; 7.3; 82.4 $mg.g^{-1}$, respectivamente. A soma total de XOS foi de 109.1 $mg.g^{-1}$. Os teores dos compostos desejados resultaram em valores semelhantes ao reportado por Neto *et al*. (2020), com exceção do teor de XOS>6. Os valores médios dos produtos desejados formados no hidrolisado hemicelulósico reportados pelos autores foram: xilobiose (16.5 $mg.g^{-1}$), xilotriose (9.4 $mg.g^{-1}$), xilotetraose (7.4 $mg.g^{-1}$) e XOS>6 (28.1 $mg.g^{-1}$). A soma total dos XOS foi de 61.3 $mg.g^{-1}$. Desta forma, o teor de XOS>6 conferido no presente trabalho resultou em maior quantidade ao verificado por Neto *et al*. (2020). Entretanto, o teor de XOS>6 do presente trabalho foi calculado a partir de uma curva analítica contendo uma mistura dos seguintes padrões analíticos: xiloheptaose, xilooctaose e xilonanaose, os quais coeluem em um tempo de retenção de 6.7 min (mesmo tempo de retenção conferido no HH). No entanto, Neto *et al*. (2020) obteve o teor dos XOS>6 a partir do cálculo de uma curva analítica contendo uma mistura dos seguintes padrões analíticos: xilopentaose e xilohexaose, os quais coeluem no tempo de retenção de 7.0 min (diferente tempo de retenção do HH). Assim, considerando a diferença do método analítico utilizado o teor de XOS>6 obtidos no presente trabalho foram 34% superior ao reportado por Neto *et al*. (2020). Desta forma, foi confirmado que o método utilizado no presente trabalho foi mais adequado, pois utilizou-se os três padrões analíticos que coeluiram no mesmo tempo de retenção do HH.

O HH contendo compostos indesejáveis e desejáveis (XOS) oriundo do SE se apresentou contaminado principalmente por compostos aromáticos derivados de lignina e xilose. Dessa forma, com o objetivo de remover os compostos não desejáveis no HH e dar continuidade a este trabalho foram avaliadas técnicas de

purificação, especificamente extração com solvente orgânico e evaporação sob vácuo do HH em estudo.

Avaliação da técnica de extração líquido-líquido (ELL) com acetato de etila em resposta ao hidrolisado hemicelulósico (HH)

O potencial de remoção dos compostos indesejáveis e desejáveis (XOS) utilizando-se solvente orgânico (acetato de etila) foi avaliado e comparado de acordo com as proporções aplicadas de solvente orgânico e HH. A Figura 3 apresenta o aspecto visual do HH bruto e pós-ELL (frações solvente e aquosa) nas diferentes condições avaliadas.

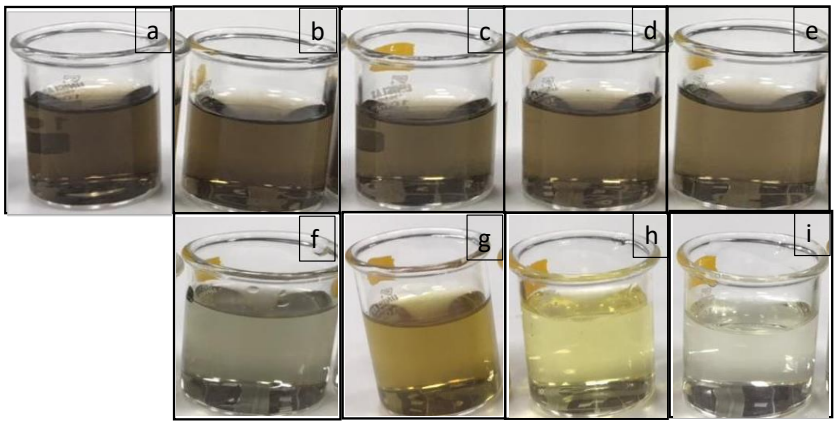


Figura 3. Extração líquido-líquido com solvente orgânico de hidrolisado hemicelulósico (HH). (a) Hidrolisado bruto. (b) Fase aquosa 2:1. (c) Fase aquosa 1:1. (d) Fase aquosa 1:2. (e) Fase aquosa 1:4. (f) Fase orgânica 2:1. (g) Fase orgânica 1:1. (h) Fase orgânica 1:2. (i) Fase orgânica 1:4.

Pode-se observar uma alteração no aspecto visual do HH após etapas de ELL com acetato de etila. Foi conferido um leve clareamento na fase aquosa do HH em todos os ensaios da ELL comparado ao hidrolisado bruto. Em contra partida, a fase orgânica mostrou aumento da intensidade de cor, principalmente nas extrações com proporções 1:1 e 1:2. Este resultado indica que o acetato de etila é eficiente na remoção de compostos coloridos derivados da lignina (Figura 3).

A Figura 4 apresenta os espectros de varredura na região do UV- Visível do HH em estudo (hidrolisado bruto), bem como das diferentes condições de ELL visando à remoção dos componentes não desejáveis presentes no HH. O perfil

do espectro de varredura na região do UV do HH (hidrolisado bruto, Figura 4) mostra duas bandas características que são correspondentes a compostos aromáticos e/ou lignina (220 nm e 280 nm). Na região do visível a alta intensidade de absorção na região em 405 nm que se refere a compostos derivados de aromáticos e/ou lignina, como, por exemplo, quinonas. Esse resultado foi semelhante ao relatado para madeira de folhosas (incluindo *Eucalyptus*), bem como para HHs obtidos por PTH desses materiais (11,17,18)

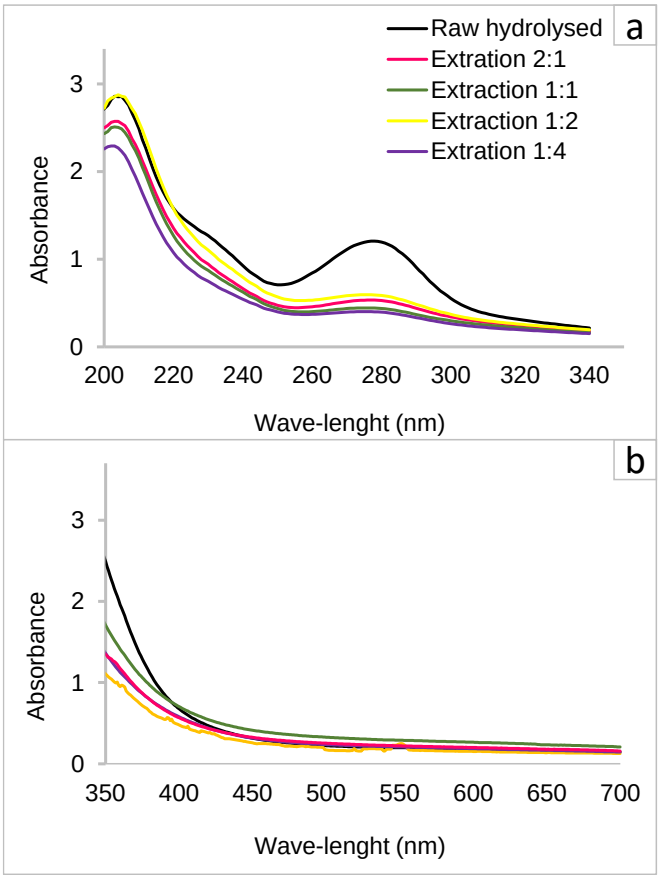


Figura 4. Espetros de varredura na região do UV-Visível de hidrolisado hemicelulósico (HH) em diferentes condições de extração líquido-líquido (ELL) com solvente orgânico. (a) Espectro de varredura na região do UV. (b) Espectro da varredura da região Visível do HH em diferentes condições experimentais.

Após a realização dos procedimentos de EEL foi constatada diminuição de intensidade em toda região do espectro UV-visível, incluindo as bandas em 220 nm e 280 nm, além da absorbância em 405 nm, corroborando com a diminuição dos teores de aromáticos, quinonas e seus derivados, respectivamente. Desta forma, os resultados indicam que a variável solvente orgânico nas ELL avaliadas têm potencial na remoção destes compostos quando comparado ao controle

(hidrolisado bruto), os quais são indesejáveis no HH em estudo. Nota-se que quanto maior a proporção de acetato de etila maior a remoção dos aromáticos totais, com exceção da condição de extração 1:2 (Tabela 1). Além disso, o quantitativo das frações, aquoso:orgânico (1:1 e 2:1) são as mais indicadas, pois resultam em menor quantidade de acetato de etila somado ao fato de o índice de remoção ser semelhante à outras condições (Figura 5). Os resultados dos índices de remoção de quinonas e seus derivados (405 nm) conferidos pelos espectros na região do visível corroboram com o aspecto visual das fases aquosas e orgânicas apresentadas na Figura 3, ou seja, quanto maior o índice de remoção de quinonas e seus derivados menor a intensidade de cor das fases aquosas.

Uma análise semi-quantitativa do potencial de remoção de compostos aromáticos em relação a quinonas e seus derivados (aromáticos/quinonas) foi realizada a partir da razão entre as absorbâncias (280 nm e 405 nm, Tabela 1), que são correspondentes as absorbâncias obtidas nos espectros de varredura discutidos anteriormente (Figura 5).

Tabela 1. Razão de absorbâncias dos espectros de varredura na região do UV-Visível dos hidrolisados hemicelulósicos (HH) nas diferentes condições experimentais.

Condições [#]Experimentais	***280 nm**	***405 nm**	**Razão (280 nm/405 nm)**
Hidrolisado bruto	1.19	0.61	1.95
2:1	0.52	0.52	1.00
1:1	0.43	0.65	0.66
1:2	0.58	0.44	1.31
1:4	0.39	0.53	0.73

**Valores apresentados em unidades de absorbância (adimensional).*
[#]As proporções das extrações líquido-líquido (ELL) sempre referem-se ao solvente orgânico seguido do hidrolisado bruto (solvente orgânico: hidrolisado bruto).

A razão entre as absorbâncias em 280 nm e 405 nm indica o quantitativo do índice de remoção de aromáticos em função de quinonas e seus derivados entre as diferentes condições de refino em estudo. Os dados revelam que em todas condições avaliados e principalmente na condições de extração 1:1 e 1:4, foi verificado maior taxa na remoção de aromáticos em relação a quinonas e seus derivados, ou seja, as extrações com acetato de etila são eficientes na remoção de compostos aromáticos. Nota-se também que o aumento da

quantidade de solvente em relação a fase aquosa resulta em aumento do índice de remoção de aromáticos.

A Figura 5 mostra o perfil cromatográfico do HH analisado em coluna contendo fase estacionário do tipo apolar (C_{18}).

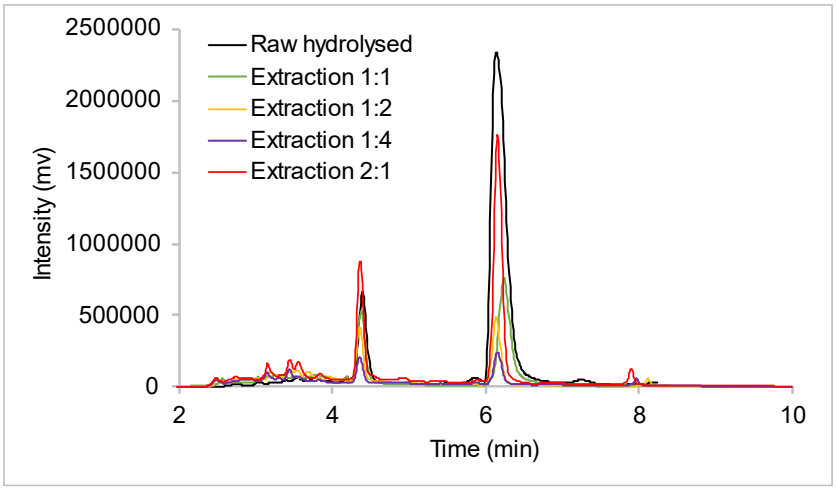


Figura 5. Perfil cromatográfico em coluna com fase estacionário do tipo apolar (C_{18}) de hidrolisado hemicelulóico (HH) em diferentes condições de extração líquido-líquido (ELL) com solvente orgânico.

Os dois picos mais intensos dos respectivos cromatogramas são correspondentes ao HMF 4,7 min e furfural 6,0 min, no entanto, é possível verificar à presença de outros compostos do tipo fenólicos presentes no HH (tempos de retenção de 2-4 min). É possível constatar uma diminuição da intensidade dos picos principais (HMF e furfural) em todas as condições de ELL avaliadas, exceto a 2:1 para o HMF (Figura 5). Além disso, a extração 1:4 mostrou uma diminuição superior na intensidade dos picos principais corroborando com os dados apresentados na Tabela 1 e Figura 6.

A Figura 6 apresenta a intensidade de remoção dos compostos indesejáveis em função das diferentes condições de ELL com solvente orgânico avaliadas.

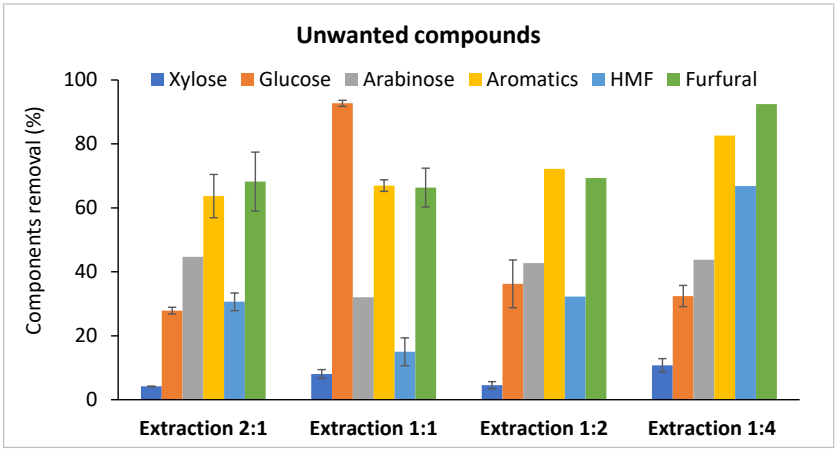


Figura 6. Remoção no hidrolisado hemicelulósico (HH) (%massa/massa) dos componentes não desejáveis em diferentes condições de extração líquido-líquido (ELL) com solvente orgânico.

Os aromáticos foram removidos com sucesso em todas as condições de ELL avaliadas (remoções entre 64-83%, massa/massa). As condições 1:2 e 1:4 foram as mais eficientes, atingindo um índice de remoção de aromáticos de aproximadamente 72 e 82% (massa/massa), no entanto, a condição 1:4 exige uso de maior volume de solvente orgânico, não havendo um ganho substancial comparado às outras condições. Além disso, salienta-se que os aromáticos representam a maior fatia da fração correspondente aos compostos não desejados no HH em estudo, conforme apresentado na Figure 2.

Assim como os aromáticos, o furfural também foi removido com sucesso em todas as condições de ELL avaliadas (remoções entre 66-92%, massa/massa). A condição 1:4 foi a mais eficiente atingindo um índice de remoção de 92%, enquanto as outras condições (1:2, 2:1 e 1:1) resultaram em valores semelhantes, em média 67.7% (%massa/massa). A condição 1:4 foi a mais eficiente em relação ao índice de remoção de HMF e furfural, culminando em aproximadamente 66% (%massa/massa), seguido das condições 1:2, 2:1 e 1:1, 32, 30 e 15% (%massa/massa), respectivamente (Figura 6).

Cruz et al.[20] reportaram ELL com acetato de etila em HH oriundo de pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído em cavacos de madeira de *Eucalyptus globulus*. Os autores demostraram remoção de compostos derivados de lignina (aromáticos solúveis totais) de 74.5% (massa/massa) utilizando-se uma proporção de HH:acetato de etila de 1:1, além disso, os autores mostraram que o aumento da proporção de acetato de etila em relação ao HH promoveu

aumento do índice de remoção dos aromáticos totais (atingindo 83.5%). Os resultados apresentados foram semelhantes aos obtidos no presento trabalho (67% de remoção, proporção 1:1), além de aumento do índice de remoção dos aromáticos totais em função do aumento da carga de acetato de etila (atingindo 82.6% de remoção, proporção 1:4) (Figura 6).

A glicose, arabinose e xilose mostraram um índice de redução menos intenso quando comparado ao furfural, HMF e aromáticos, corroborando com a maior capacidade do acetato de etila em extrair compostos com características mais hidrofóbicas (20). O maior índice de remoção de glicose foi de 92% (%massa/massa), condição 1:1, no entanto as condições 1:2, 1:4 e 2.1 resultaram em uma faixa de redução (27-36%, massa/massa). A arabinose apresentou uma faixa de índice de remoção de 32-44%. A xilose, no entanto, resultou em uma faixa mais estreita de índice de remoção, dentre os compostos discutidos anteriormente (4-10%, massa/massa) (Figura 6)

Cebreiro et al.[16] reportaram um pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído (4% w/w), a 121°C por 60 min sob cavacos de madeira de *Eucalyptus grandis.* O HH obtido foi submetido a ELL com acetato de etila na proporção de 1:3 (HH:acetato de etila) resultando na remoção de 5% de xilose e glicose. A remoção de xilose apresentada pelos autores corrobora com o presente estudo (4-10% de remoção), no entanto, a remoção de glicose foi mais intensa neste trabalho (27-36% de remoção).

A Figura 7 apresenta o balanço de massa em relação as fases aquosas e orgânicas para os seguintes compostos indesejados (aromáticos, furfural e HMF). Os ácidos fórmico e acético não puderam ser quantificados em função de interferências no detector (índice de refração, RID) na presença de acetato de etila ou traços deste solvente o qual eluiu entre 13-15 min na corrida cromatográfica da coluna HPX-87H, interferindo na integração da área dos picos dos ácidos fórmico e acético, os quais eluem exatamente nessa região, desta forma, havendo sobreposição dos picos dos ácidos e acetato de etila, inviabilizando suas quantificações.

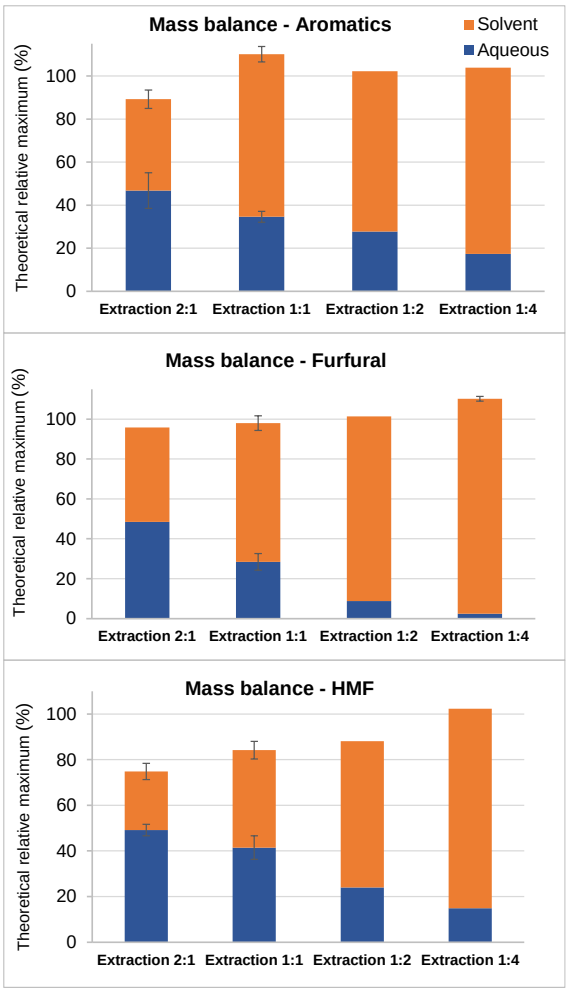


Figura 7. Balanço de massa correspondente ao percentual de remoção dos compostos aromáticos, furfural e HMF.

O balanço de massa foi realizado a fim de verificar se qual o quantitativo dos compostos que foram extraídos da fase aquosa encontrava-se na fase solvente. Em ambos compostos analisados (HMF, furfural e aromáticos totais) é possível verificar um perfil semelhante, como se segue: quanto maior a proporção de solvente orgânico na ELL menor a quantidade de HMF, furfural e aromáticos totais na fração aquosa, este comportamento pode ser explicado em função dos compostos aromáticos terem maior afinidade com o solvente orgânico (acetato de etila, hidrofóbico) quando comparado à água (hidrofílica).

A Figura 8 apresenta a porcentagem de perda dos compostos desejáveis (XOS) em função das diferentes ELL com solvente orgânico.

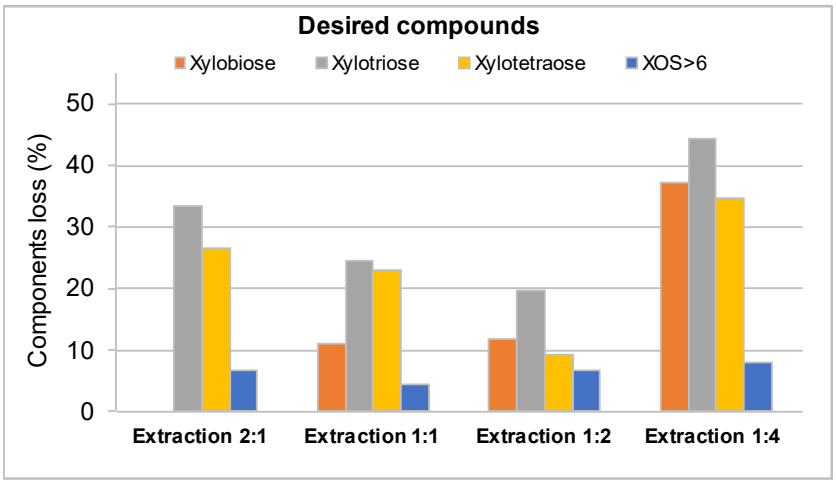


Figura 8. Perda no hidrolisado hemicelulósico (HH) (%massa/massa) dos componentes desejáveis em diferentes condições de extração líquido-líquido (ELL) com solvente orgânico.

Os compostos desejados (XOS) foram parcialmente removidos em todas as condições de ELL avaliadas, com exceção da xilobiose na condição de 2:1. Nota-se que a condição 1:4 foi a que mais apresentou perda para os XOS, valores acima de 30% (%massa/massa), com exceção dos XOS>6 que apresentaram uma perda inferior a 10% (%massa/massa). A xilobiose não apresentou perda na condição 2:1, já as condições 1:1 e 1:2 mostraram perdas semelhantes, média de 11% (%massa/massa), enquanto a condição 1.4 resultou em perda de aproximadamente 37.3% (%massa/massa). A xilotriose nas condições 2:1 e 1:4 resultaram em perdas de 33.3 e 44.2% (%massa/massa), respectivamente. No entanto, nas condições 1:1 e 1:2 mostraram índices menores de perda, 24.5 e 19.6% (%massa/massa), respectivamente. A xilotetraose resultou em perda menor quando comparado à xilotriose. Assim, os destaques foram: perda de 9.4% (%massa/massa) de xilotetraose (condição de extração 1:2, menor remoção) e perda de 34.8% (%massa/massa) (condição 1:4, maior remoção). As outras condições de ELL apresentaram valores semelhantes de xilotetraose, entre elas (média de 24.7%, massa/massa). Os XOS>6 apresentaram um perfil de perda menor em todas as ELL avaliadas, as quais variaram de 4.4-8% (%massa/massa) (Figura 8).

Vegas *et al.*[20] reportaram a obtenção de XOS por PTH de um subproduto de grãos de cevada (casca de cevada) em uma carga mássica (líquido:sólido 1:8, respectivamente) (base seca) a 207°C. O HH obtido foi submetido em três

estágios sequenciais de ELL com acetato de etila na proporção de 1:1 (HH:acetato de etila, massa/massa) resultando em remoção de aproximadamente 33% (%massa/massa) dos compostos não voláteis, sendo 14% (%massa/massa) destes correspondentes a XOS. Comparando-se com a perda de XOS, deste estudo (proporção HH:acetato de etila 1:1, volume/volume, único estágio) que foi em média 15.7%, os resultados foram semelhantes.

Avaliação da técnica de evaporação sob vácuo seguido de extração líquido-líquido (ELL) com solvente orgânico em resposta ao hidrolisado hemicelulósico (HH)

Após a verificação do efeito do aumento do volume de acetato de etila na extração do HH, foi realizada a técnica de evaporação sob vácuo no HH na condição de 50°C e 100 mBar. Além disso, foi avaliada a combinação da evaporação sob vácuo e EEL com acetato de etila na proporção 1:1, que foi previamente selecionada com base na discussão dos resultados apresentados anteriormente. A Tabela 2 apresenta a concentração dos compostos desejados (XOS) e não desejados no HH (hidrolisado bruto). Além disso, mostra os respectivos índices de remoção (compostos não desejados) e perdas (compostos desejados) após as etapas de evaporação sob vácuo e evaporação sob vácuo + ELL.

Tabela 2. Concentração de compostos desejados e não desejados no hidrolisado hemicelulósico (HH, hidrolisado bruto e concentrado), fator de concentração de cada componente e seus respectivos índices de remoção ou perda após etapa de evaporação sob vácuo e evaporação sob vácuo + ELL com acetato de etila.

	Raw hydrolyzed ($g.L^{-1}$)	***Post-evaporation ($g.L^{-1}$)**	**Concentration factor**	**Post-evaporation removal (%)**	**[#]Post-evaporation + 1:1 extraction removal (%)**
Desired compounds					
Xylobiose	1.96 ± 0.28	11.8 ± 0.67	6.0	18.9 ± 4.6	18.9
Xylotriose	1.50 ± 0.63	9.56 ± 0.49	6.4	nd	27.4
Xylotetraose	1.01 ± 0.08	7.05 ± 0.23	7.0	29.4 ± 1.5	61.3
XOS>6	11.32 ± 0.02	84.79 ± 3.90	7.5	23.0 ± 3.5	40.6
Total	15.79 ± 1.01	119.20 ± 5.29	7.6	-	-
Unwanted compounds ($g.L^{-1}$)					
Total aromatics	5.33 ± 0.16	14.43 ± 0.05	2.7	55.4 ± 0.1	69.6
Xylose	3.10 ± 0.22	17.48 ± 0.23	5.6	6.7 ± 1.2	77.1
Furfural	0.25 ± 0.02	0.083 ± 0.0	0.3	82.5 ± 2.2	95.4
HMF	0.073 ± 0.1	0.47 ± 0.0	0.6	47.2 ± 1.6	nd
Acetic Acid	1.51 ± 0.01	3.10 ± 0.03	2.1	66.2 ± 1.1	nd
Glucose	0.30 ± 0.06	1.96 ± 0.02	6.6	2.5 ± 0.5	74.8
Arabinose	0.37 ± 0.03	2.23 ± 0.04	6.0	1.8 ± 0.7	1.8
Formic Acid	0.32 ± 0.11	0.67 ± 0.10	2.1	68.1 ± 5.2	nd
Total	11.25 ± 0.62	40.00 ± 0.48	3.6	-	-

The concentration factor of the total volume of the evaporated raw hydrolysate was 6.1 (volume/volume).

[*] Vacuum evaporation performed at *50°C and 100 mBar.*

[#] *data reported removal of sum of evaporation steps + extraction 1:1.*

nd = not detected

A etapa de evaporação sob vácuo culminou no efeito de concentração do HH, atingindo um fator de concentração de 6.1 (volume/volume). O HH concentrado resultou em uma tonalidade mais escura quando comparado ao HH bruto. Além disso, o processo de evaporação sob vácuo resultou em perdas não muito expressivas dos compostos de interesse (XOS), com se segue: xilotetraose (29.4%), XOS>6 (23.0%) e xilobiose (18.9%) com destaque para xilotriose que não resultou em perda. No entanto, os compostos indesejáveis apresentaram índices de remoção expressivos para todos os compostos em estudo, o furfural apresentou o maior índice (82.5%), seguido do ácido fórmico, ácido acético, aromáticos e HMF (68.1%, 66.2% 55.4% e 47.2% respectivamente). Entretanto, a xilose, arabinose e glicose apresentaram índices de remoção <7%, valores considerados pouco expressivos. A média do fator de concentração dos compostos desejados (XOS) foi de 6.9 corroborando com o fator de concentração obtido pelo cálculo em unidades de volume (6.1) e com as perdas pouco expressivas destes componentes. No entanto, o fator de concentração dos compostos desejados variou bastante (0.3-6.6), corroborando com os índices de perdas destes componentes, por exemplo, a glicose apresentou perda de 2.5% culminando em um fator de concentração de 6.6, enquanto, que o furfural apresentou perda de 82.5% resultando em um fator de concentração de 0.3 (Tabela 2).

A Figura 9 apresenta os espectros de varredura na região do UV-Visível do HH após a etapa de evaporação sob vácuo.

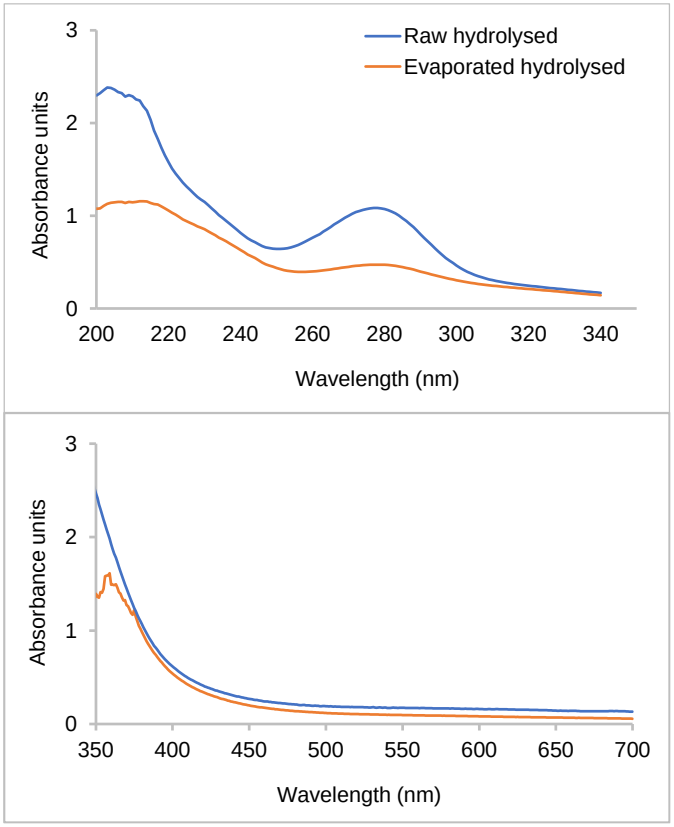


Figura 9. Espetros de varredura na região do UV-Visível de hidrolisado hemicelulósico (HH) e do hidrolisado pós evaporação. (a) Espectro de varredura na região do UV. (b) Espectro da varredura da região Visível.

O espectro de varredura na região do UV (280 nm, aromáticos totais) mostra que houve redução destes compostos, sugerindo que os mesmos são relativamente voláteis (18) quando aplicado vácuo e 50°C, corroborando com os dados reportados na Tabela 2 (ou seja, remoção de 55.4% dos aromáticos totais). Já o espectro na região do visível (405 nm, quinonas e seus derivados) mostra que não houve remoção expressiva destes compostos, sugerindo que esses compostos são menos voláteis que os aromáticos totais resultando em permanência dos mesmos no HH após a etapa de evaporação, portanto sendo estáveis a temperatura de 50°C (18). A razão 280nm/405nm do HH bruto (1.9) comparado a razão do HH evaporado (1.0), além da tonalidade mais escura do HH evaporado corroboram com a permanência de quinonas e seus derivados no HH evaporado.

Santos e Prata[21] reportaram a produção de HH obtido a partir de aparas de *Eucalyptus* (folhas, galhos e pontas) através do processo de hidrólise ácida com solução de ácido sulfúrico a 0.8% (volume/volume) e operado nas seguintes

condições: temperatura de 160°C, 20 min de reação e carga mássica sólido/líquido de 1:3. O HH foi submetido a evaporação sob vácuo nas seguintes condições: temperatura de 61.5°C e vácuo de 86 kPa. Nestas condições 96% (massa/massa) de furfural presente no HH concentrado foi removido, enquanto o HMF não foi detectado. Esse resultado corrobora com o presente trabalho, salienta-se que o HH do presente trabalho foi obtido por PTH, ou seja, não é adicionado ácido sulfúrico no meio reacional, todavia, o ácido acético presente na molécula de hemicelulose do subproduto de *Eucalyptus* é liberado no meio reacional atuando de forma semelhante ao pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído.

Cebreiro et al.[16] reportaram a evaporação sob vácuo a 60°C do HH oriundo de pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído (4% w/w), a 121°C por 60 min sob cavacos de madeira de *Eucalyptus grandis.* Os autores reportaram remoção de 74% (massa/massa) de ácido acético no HH. A remoção de ácido acético apresentada pelos autores corrobora com o obtido no presente estudo (66.2% de remoção).

A etapa de evaporação sob vácuo combinada com EEL com acetato de etila resultou em aumento de perdas dos compostos de interesse (XOS), com se segue: xilotetraose (61.3%), XOS>6 (40.6%), xilotriose (27.4%), apenas a xilobiose não apresentou perda na etapa de ELL com acetato de etila, permanecendo valor de perda de 18.9% obtido da etapa de evaporação sobre vácuo (Tabela 2). A EEL com HH bruto apresentou os seguintes índices de perda de XOS: xilobiose (11.1%), xilotriose (24.5%), xilotetraose (22.9%) e XOS>6 (4.4%), ou seja, aumento expressivo de perda de xilotetraose e XOS>6 em relação a EEL em HH previamente concentrado (62.2 e 89.1%, respectivamente) (Figura 8).

No entanto, etapa de evaporação sob vácuo combinada com EEL com acetato de etila resultou em índices de remoção expressivos para os compostos não desejáveis em estudo, o furfural apresentou o maior índice (95.4%, aumento de 13.5% em relação ao HH concentrado) seguido dos aromáticos totais (69.6%, aumento de 20.4% em relação ao HH concentrado). A arabinose e glicose apresentaram índices de remoção de 77.1 e 74.8% resultando em aumento de 91.3 96.6% em relação ao HH concentrado (Figura 6).

De forma geral, a combinação da etapa de evaporação sob vácuo combinada o com ELL com aceto a de etila resultou em aumento de perdas expressivas de xilotetraose e XOS>6, porém em contra partida também resultou em aumentos expressivos no índice de remoção de xilose, arabinose e aromáticos totais.

CONCLUSÃO

A ELL com acetato de etila se mostrou eficaz na remoção de compostos aromáticos (incluindo HMF e furfural), além de quinonas e seus derivados resultando em perda não expressiva de XOS (produtos de interesse). A evaporação sob vácuo é um processo capaz de remover consideravelmente compostos aromáticos (incluindo HMF e furfural) sem perdas expressivas dos XOS. A evaporação sob vácuo combinada com ELL com acetato de etila resultou em aumento do índice de remoção de compostos aromáticos (incluindo HMF e furfural), todavia, também foi conferido maior índice de perda dos XOS. Ambas técnicas, ELL e evaporação sob vácuo bem como a combinação destas, foram eficazes no refino do HH rico em XOS, apresentando potencial para o aprimoramento de futuras etapas de processo industrial para a recuperação dos bioprodutos de interesse (XOS).

DECLARATIONS SECTION

List of abbreviations

Subproduto de *Eucalyptus* (SE). Extração líquido-líquido (ELL). Hidrolisado Hemicelulósico (HH). Hidroximetilfurfural (HMF). Pré-tratamento hidrotérmico (PTH). Xilo-oligossacarídeos (XOS). Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

Ethical Approval and Consent to participate

Not applicable.

Consent for publication

All authors read and approved the final manuscript.

Availability of supporting data.

We are providing a document with supplementary information.

Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

Funding

São Paulo State Research Support Foundation (FAPESP) contract number 2018/06241-3 funding this work. Coordination of Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) funding the doctoral scholarship of Cecília Aline Otaviano.

Authors' contributions

CAO and FRPC performed the pretreatments, obtained the hemicellulose hydrolysate and purified by different techniques. CAO, CUM, FRPC, JFBP and FM, participated in the reviewed the manuscript and data interpretation. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

FAPESP, contract number 2018/06241-3 funding this paper. Coordination of Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) financed the Master scholarship of Cecília Aline Otaviano in Brazil

REFERÊNCIAS

1. Magaton AS, Piló-Veloso D, Colodette JL. Caracterização das O-acetil (4-O-metilglicurono) xilanas isoladas da madeira de Eucalyptus urograndis.Química Nova. 2008;31(5):1085–8.

2. IBÁ. Brazilian Tree Industry Annual Report - base year 2019. Associação Brasileira de Árvores [Internet]. 2020;160. Available from: http://abpa-br.org/relatorios/

3. Iwakiri S, DA Cunha AB, Albuquerque CEC, Gorniak E, Mendes LM. Resíduos De Serrarias Na Produção De Painéis De Madeira Aglomerada De Eucalipto. Scientia Agraria. 2000;1(1):23.

4. Neto FSPP, Roldán IU, Galán JPM, Monti R, De Oliveira SC, Masarin F. Model-based optimization of xylooligosaccharides production by hydrothermal pretreatment of Eucalyptus by-product. Industrial crops e products. 2020;154.

5. Amorim C, Silvério SC, Prather KLJ, Rodrigues LR. From lignocellulosic residues to market: Production and commercial potential of xylooligosaccharides. Biotechnol Adv. 2019;37(7):107-397.

6. Zhao S, Zhang GL, Chen C, Yang Q, Luo XM, Wang ZB, et al. A combination of mild chemical pre-treatment and enzymatic hydrolysis efficiently produces xylooligosaccharides from sugarcane bagasse. J Clean Prod. 2021;291:125-972.

7. Parajó JC, Garrote G, Cruz JM, Dominguez H. Production of xylooligosaccharides by autohydrolysis of lignocellulosic materials. Trends in Food Science &Technology. 2004;15:115-120.

8. Gibson, GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. The journal of Nutrition. 1995;125:1401-1412.

9. Vázquez J, Alonso JL, Dominguez H, Parajó, JC. Xylooligosaccharides: manufacture and applications. Trends in Food Science and Technology. 2001;11:387-393

10. Ghosh D, Vir AB, Garnier G, Patti AF, Tanner J. Continuous flow production of xylooligosaccharides by enzymatic hydrolysis. Chem Eng Sci. 2021;244:116-789

11. Moure A, Gullón P, Domínguez H, Parajó JC. Advances in the manufacture, purification and applications of xylo-oligosaccharides as food additives and nutraceuticals. Process Biochemistry. 2006;41(9):1913-1923.

12. Zhang X, Zhang W, Lei F, Yang S, Jiang J. Coproduction of xylooligosaccharides and fermentable sugars from sugarcane bagasse by seawater hydrothermal pretreatment. Bioresour Technol. 2020;309:123-385.

13. Rosa PAJ, Ferreira IF, Azevedo AM, Aires-Barros MR. Aqueous two phase systems: A viable platform in the manufacturing of Biopharmaceuticals. Journal of Chromatography. 2010:2296–2305.

14. Mussatto SI, Santos C, Filho WCR, Silva SS. Purification of xylitol from fermented hemicellulosic hydrolyzate using liquid – liquid extraction and precipitation techniques. Biotechnology letters. 2005;10:1113–1115.

15. Bokhary A, Leitch M, Gao WJ, Fatehi P, Liao BQ. Separation of hemicelluloses and lignins from synthetic hydrolyzate and thermomechanical pulp mill process water via liquid-liquid extraction. Separation and Purification Technology. 2019;215:508–515.

16. Cebreiro F, Guigou MD, Cabrera MN. Integrated forest biorefineries: Recovery of acetic acid as a by-product from eucalyptus wood hemicellulosic hydrolysates by solvent extraction. Industrial Crops and Products. 2017;109:101–108.

17. Gellerstedt EKM, Henriksson G. Wood Chemistry and Wood Biotechnology (Vol. 1) and Pulping Chemistry and Technology (Vol. 2). Walter de Gruyter. 2009.

18. Ruiz HA, Thomsen MH, Trajano HL. Hydrothermal processing in biorefineries. Production of bioetanol and high added-valeu compounds of second and third generation biomass. Springer. 2017.

19. Cruz JM, Domínguez JM, Domínguez H, Parajó JC. Solvent extraction of hemicellulosic wood hydrolysates: A procedure useful for obtaining both detoxified fermentation media and polyphenols with antioxidant activity. Food Chem. 1999;67(2):147–53.

20. Vegas R, Alonso JL, Dominguéz H, Parajó JC. Manufacture and Refining of Oligosaccharides from Industrial Solid Wastes. Industrial & Engineering Chemistry Research.2005; 44 (3): 614–620.

21. Santos RS, Prata AMR. Caracterização do hidrolisado hemicelulósico de eucalipto para a produção fermentativa de ácido cítrico por *Aspergillus niger*. Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia em resíduos e desenvolvimento sustentável. Florianópolis, 2004.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O HH oriundo de PTH otimizado sobre SE para produção máxima de XOS foi obtido com sucesso. As técnicas de refino avaliadas resultaram em potencial de remoção dos componentes não desejados (principalmente aromáticos e ácido acético) que representam quantitativamente os principais contaminantes presente no HH. Esses compostos são considerados inibidores de crescimento celular de diversos microrganismos.

Por fim, os resultados apresentados podem guiar novos rumos no aprimoramento do refino de HH oriundo de PTH. O trabalho dá suporte para novas investigações, como uso de solventes orgânicos mais ambientalmente corretos, bem como o aumento de escala do processo e viabilidade econômica.

4. REFERÊNCIAS

1. Magaton AS, Piló-Veloso D, Colodette JL. Caracterização das O-acetil (4-O-metilglicurono) xilanas isoladas da madeira de Eucalyptus urograndis.Química Nova. 2008;31(5):1085–8.

2. IBÁ. Brazilian Tree Industry Annual Report - base year 2019. Associação Brasileira de Árvores [Internet]. 2020;160. Available from: http://abpa-br.org/relatorios/

3. Iwakiri S, DA Cunha AB, Albuquerque CEC, Gorniak E, Mendes LM. Resíduos De Serrarias Na Produção De Painéis De Madeira Aglomerada De Eucalipto. Scientia Agraria. 2000;1(1):23.

4. Gibson, GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. The journal of Nutrition. 1995;125:1401-1412.

5. Vázquez J, Alonso JL, Dominguez H, Parajó, JC. Xylooligosaccharides: manufacture and applications. Trends in Food Science and Technology. 2001;11:387-393

6. Xu J, XIA R, Yuan T, Sun R. Use of xylooligosaccharides (XOS) in hemicelluloses/chitosan-based films reinforced by cellulose nanofiber: Effect on physicochemical properties. Food Chemistry. 2019;298.

7. Menezes CR, Durrant LR. Xilooligossacarídeos: produção, aplicações e efeitos na saúde humana. Ciência Rural. 2008:587-592.

8. Hong C, Corbett D, Venditti R, Jamell H, Park S. Xylooligosaccharides as prebiotics from biomass autohydrolyzate. Food Science and Technology.2019;111:703-710.

9. Nakakuki T. Present status and future of functional oligosaccharide development in Japan. Pure Applied Chemistry. 2002;74(7):1245-1251.

10. Singh RD, Banerjee J, Arora A. Prebiotic potential of oligosaccharides: A focus on xylan derived oligosaccharides. Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre. 2015;5:19-30.

11. Samanta AK, Jayapal N, Jayaram C, Roy S, Kolte AP, Senani S, Sridhar M. Xylooligosaccharides as prebiotics from agricultural by-products: Production and applications. Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre. 2015;5:62-70.

12. De Figueiredo FC, Carvalho AFA, Brienzo M, Campioni TS, De Oliveira-Neto P. Chemical input reduction in the arabino xylan and lignocellulose alkaline extraction and xylooligosaccharides production. Bioresource Technology. 2017;228:164-170.

13. Domínguez MN, Eugenio LI, York-Durán ML, Rodríguez-Colinas B, Plou FJ, Chenoll E, Pardo E, et al. Prebiotic effect of xylooligosaccharides produced from birch wood xylan by a novel fungal GH11 xylanase. Food chemistry. 2017;232:105-113.

14. Hasan T, Je W, Seunghan J, Kang L, Kim W, Han B, et al. Effect of b - glucooligosaccharides as a new prebiotic for dietary supplementation in olive flounder (Paralichthys olivaceus). Aquaculture Research. 2018:1310–1319.

15. Moure A, Gullón P, Domínguez H, Parajó JC. Advances in the manufacture, purification and applications of xylo-oligosaccharides as food additives and nutraceuticals. Process Biochemistry. 2006;41(9):1913-1923.

16. Gibson GR, Hutkins R, Sanders ME, Prescott SL, Reimer RA, Salminen SJ, Scott K, Stanton C, Swanson KS, Cani PD, Verbeke K, Reid G. 2017. The international scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. Nature Reviews Gastroenterology e Hepatology. 2017;14:491–502.

17. Amorim C, Silvério SC, Prather KLJ, Rodrigues LR. From lignocellulosic residues to market: Production and commercial potential of xylooligosaccharides. Biotechnol Adv. 2019;37(7):107-397.

18. Ghosh D, Vir AB, Garnier G, Patti AF, Tanner J. Continuous flow production of xylooligosaccharides by enzymatic hydrolysis. Chem Eng Sci. 2021;244:116-789

19. Chen M, Bowman MJ, Dien BS, Rausch KD, Tumbleson ME, Sing V. Autohydrolysis of Miscanthus x giganteus for the production of xylooligosaccharides (XOS): Kinetics, characterization, and recovery. Bioresource Technology. 2014;155:359–365.

20. Gellerstedt EKM, Henriksson G. Wood Chemistry and Wood Biotechnology (Vol. 1) and Pulping Chemistry and Technology (Vol. 2). Walter de Gruyter. 2009.

21. Fonseca MA. Avaliação da produção de xilo-oligossacarídeos a partir de casca de soja. Dissertação - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2015:15.

22. Ralph J, Lundquist K, Brunow G, Lu F, Kim H, Schatz PF, Marita JM, Hatfild RD, Ralph AS, Christensen JH, Boerjan W. Lignins: natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxy phenyl-propanoids. Phytochemistry Reviews. 2004;3:29-60.

23. Balakshi MY, Capanema EA, Chang HMWL. Fraction with a high concentration of lignin carbohydrate linkages: Isolation and 2D NMR spectroscopic analysis. Holzforschung. 2007;61:1-7.

24. Fengel D, Wegener G. Wood: chemistry, ultrastructure, reactions. Walter de Gruyter. 1989:613.

25. Sjostrom E, Westermark U. Chemical composition of wood and pulps: basic constituents and their distribution. In: Eds. Sjöström E.; Alén R. Analytical methods in wood chemistry, pulping and paper making. Springer Series in Wood Science. 1999:1-20.

26. Kabel MA, Carvalheiro 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.

27. Evtuguin DV, Toma JL, Silva AMS, Neto CP. Characterization of an acetylated heteroxylan from. Carbohydrate Polymers. 2003;338:597-604.

28. Moura P, Barata R, Carvalheiro F, Gírio F, Loureiro-Dias MC, Esteves MP. In vitro fermentation of xilooligosaccharides from corn cobs autohydrolysis by Bifidobacterium and Lactobacillus strains. Food Science and Tecnology. 2007;40(6):963-972.

29. Nabarlatz D, Ebringerová A, Montané D. Autohydrolysis of agricultural by products for the production of xylooligosaccharides. Carbohydrate Polymers. 2007;69:20–28.

30. Ruiz HA, Thomsen MH, Trajano HL. Hydrothermal processing in biorefineries. Production of bioetanol and high added-valeu compounds of second and third generation biomass. Springer. 2017.

31. Garrote G, Dominguéz H, Parajó JC. Interpretation of deacetylation and hemicellulose hydrolysis during hydrothermal treatments on the basis of the severity factor. Process Biochemistry. 2002;37(10):1067–1073.

32. Ladisch M, Brewer R, Hendrickson R. Pretreatment of lignocellulosic materials by pressure cooking in water: experimental results and engineering analysis, In: Symposiumon Biotechnology for Fuels and Chemicals. 1997;19.

33. Lynd LR, Elander RT, Wyman CE. Likely features and costs of mature biomass ethanol technology. Applied Biochemistry and Biotechnology. 1996;57/58:741-761.

34. Garrote G, Domínguez H, Parajó JC. Mild autohydrolysis: na environmentally friendly technology for xylooligosaccharide production from wood. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 1999;74:1101-1109.

35. Garrote G, Eugenio ME, Díaz MJ, Ariza J, López F. Hydrothermal and pulpprocessing of Eucalyptus. Bioresource Technology. 2003;88(1):61–68.

36. Parajó JC, Garrote G, Cruz JM, Dominguez H. Production of xylooligosaccharides by autohydrolysis of lignocellulosic materials. Trends in Food Science &Technology. 2004;15:115-120.

37. Tuc MS, Van Heininguen ARP. Autohydrolysis of mixed southernard woods: Efect of P-factor. Nordic Pulp and Paper Research Journal. 2009;24:42-47.

38. Ruiz HA, Thomsen MH, Trajano HL. Hydrothermal processing in biorefineries. Production of bioetanol and high added-valeu compounds of second and third generation biomass. Springer. 2017.

39. Carvalho AFA, Neto PO, Silva DF, Pastore GM. Xylo-oligosaccharides from lignocellulosic materials: Chemical structure, health benefits and production by chemical and enzymatic hydrolysis. Food Research International. 2013;51(1):75–85.

40. Crittenden RG, Playne MJ. Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. Trends in Food Science and Technology. 1996;71.

41. De Freitas C, Carmona E, Brienzo M. Xylooligosaccharides production process from lignocellulosic biomass and bioactive effects. Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre. 2019;18: 100184.

42. Rosa PAJ, Ferreira IF, Azevedo AM, Aires-Barros MR. Aqueous two-phase systems: A viable platform in the manufacturing of Biopharmaceuticals. Journal of Chromatography. 2010:2296–2305.

43. Mussatto SI, Santos C, Filho WCR, Silva SS. Purification of xylitol from fermented hemicellulosic hydrolyzate using liquid – liquid extraction and precipitation techniques. Biotechnology letters. 2005;10:1113–1115.

44. Bokhary A, Leitch M, Gao WJ, Fatehi P, Liao BQ. Separation of hemicelluloses and lignins from synthetic hydrolyzate and thermomechanical pulp mill process water via liquid-liquid extraction. Separation and Purification Technology. 2019;215:508–515.

45. Cebreiro F, Guigou MD, Cabrera MN. Integrated forest biorefineries: Recovery of acetic acid as a by-product from eucalyptus wood hemicellulosic hydrolysates by solvent extraction. Industrial Crops and Products. 2017;109:101–108.

46. Zhao S, Zhang GL, Chen C, Yang Q, Luo XM, Wang ZB, et al. A combination of mild chemical pre-treatment and enzymatic hydrolysis

efficiently produces xylooligosaccharides from sugarcane bagasse. J Clean Prod. 2021;291:125-972.