

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta **Dissertação** será disponibilizado somente a partir de 29/05/2022.

**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

087o Otaviano, Cecilia Aline.
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

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: 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

AUTORA: CECÍLIA ALINE OTAVIANO

ORIENTADOR: FERNANDO MASARIN

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

Prof. Dr. FERNANDO MASARIN (Participação Virtual)

Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP Araraquara

Prof. Dr. ELIAS DE SOUZA MONTEIRO FILHO (Participação Virtual)

Departamento de Engenharia, Física e Matemática / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Profa. Dra. KELLY JOHANA DUSSAN MEDINA (Participação Virtual)

Departamento de Engenharia Física e Matemática / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Araraquara, 29 de novembro de 2021

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.

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 estímulo 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).

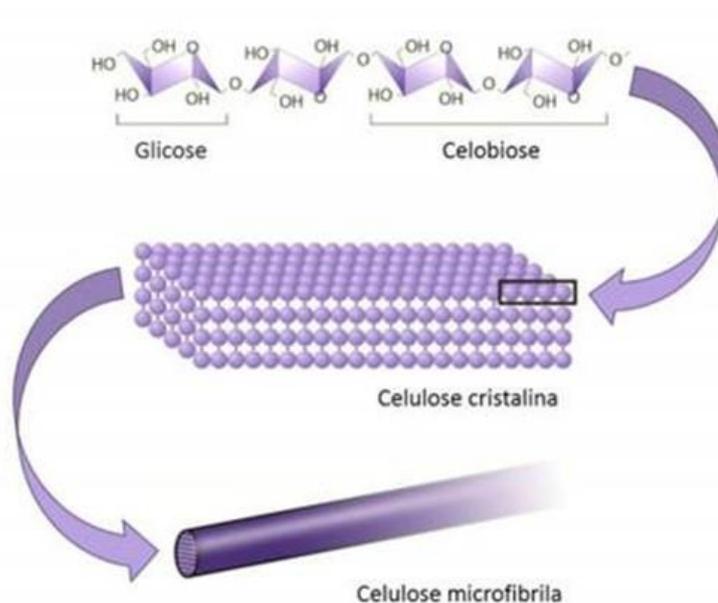


Figura 1. Representação da estrutura de um fragmento de celulose. Adaptado de Fonseca, 2015.

A massa molar da celulose varia consideravelmente (50.000 - 2,5 milhões $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$), dependendo da origem da amostra. Por tratar-se de um polímero autêntico, o tamanho das cadeias é usualmente especificado como grau de polimerização, que é a razão entre a massa molar média da celulose e a massa molar de uma unidade de 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 contêm 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), dependendo 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).

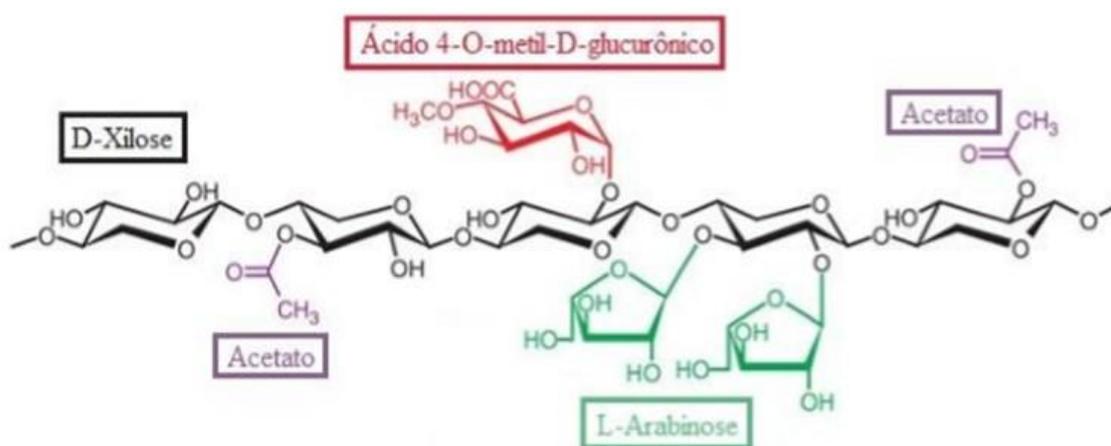


Figura 2. Estrutura de uma xilana de *Eucalyptus*. Tipos de ligações presentes em uma molécula de xilana. Adaptado de Fonseca, 2015.

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

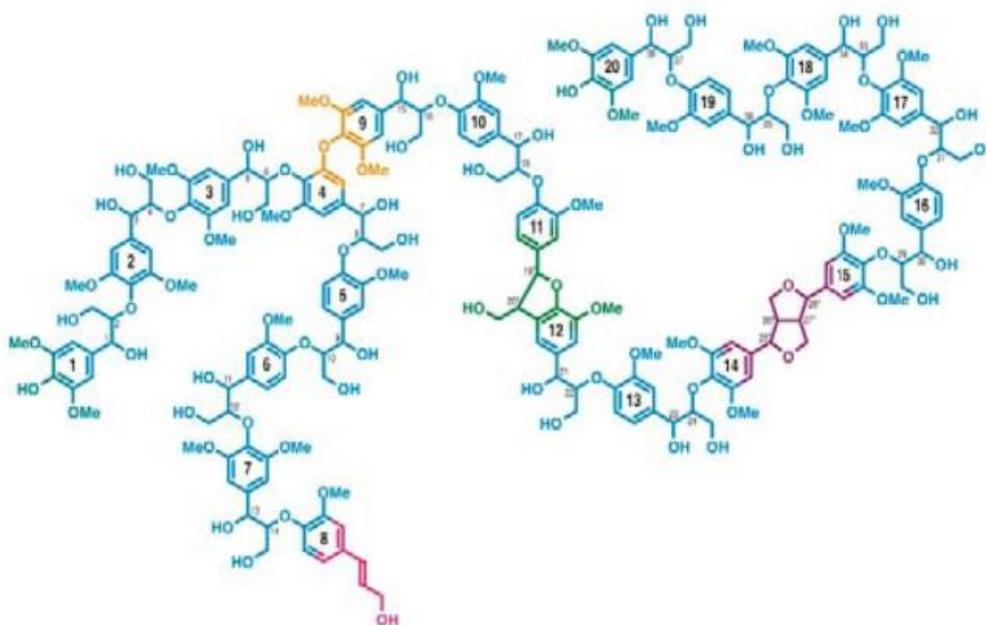


Figura 3. Estrutura - modelo da lignina (22).

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 glicosídico; 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 C₉ 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.

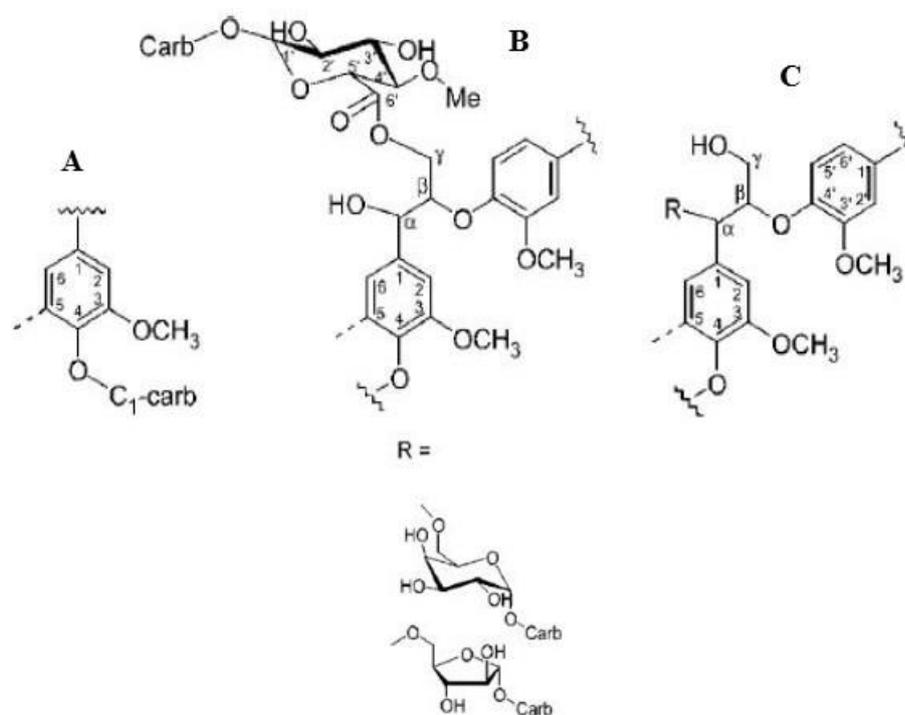


Figura 4. Principais tipos de ligações entre carboidratos e lignina em complexos lignina-carboidrato: (A) fenol glicosídeo, (B) éster e (C) éter benzílico (23).

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 S₁, S₂ e terciária (ou S₃). A lignina ocorre, em maior quantidade, na parede S₂ 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).

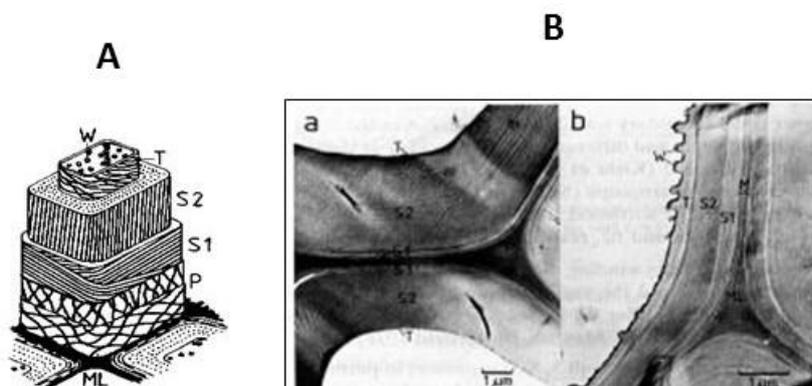


Figura 5. (A) Corte ilustrativo do sistema de camadas na parede das células de madeira. (B) Microscopia eletrônica de transmissão das células de madeira mostrando as camadas da parede celular: ML = lamela média, P = parede primária, S₁ = parede secundária, S₂ = parede secundária e T = parede terciária (20,24).

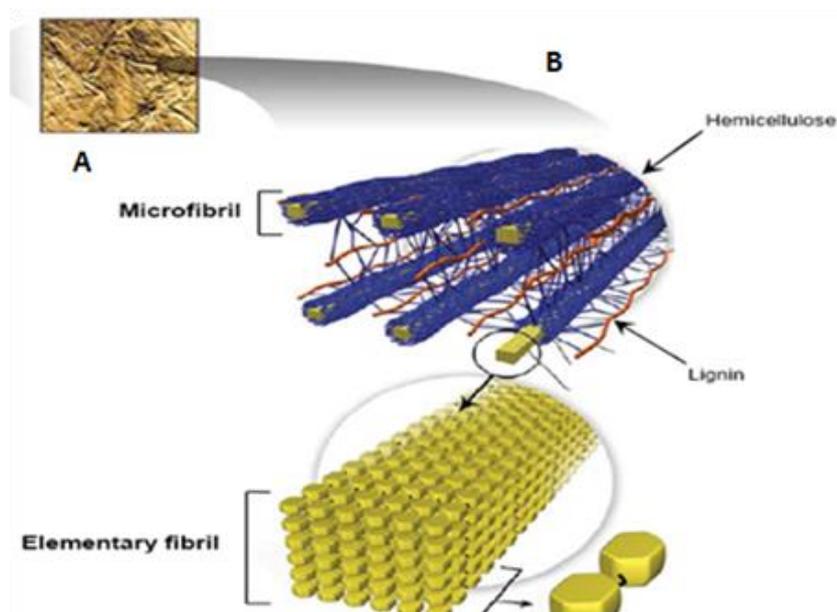


Figura 6. (A) Microscopia eletrônica de lignocelulósico. (B) Modelo didático que explica como as microfibrilas de celulose estão organizadas e encaixadas em uma matriz de hemicelulose e lignina presente em um lignocelulósico (20,25).

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).

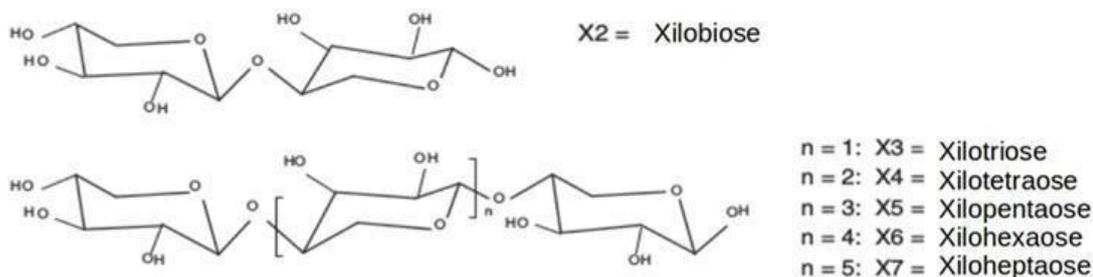


Figura 7. Estrutura dos xilo-oligossacarídeos (XOS) (39).

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.

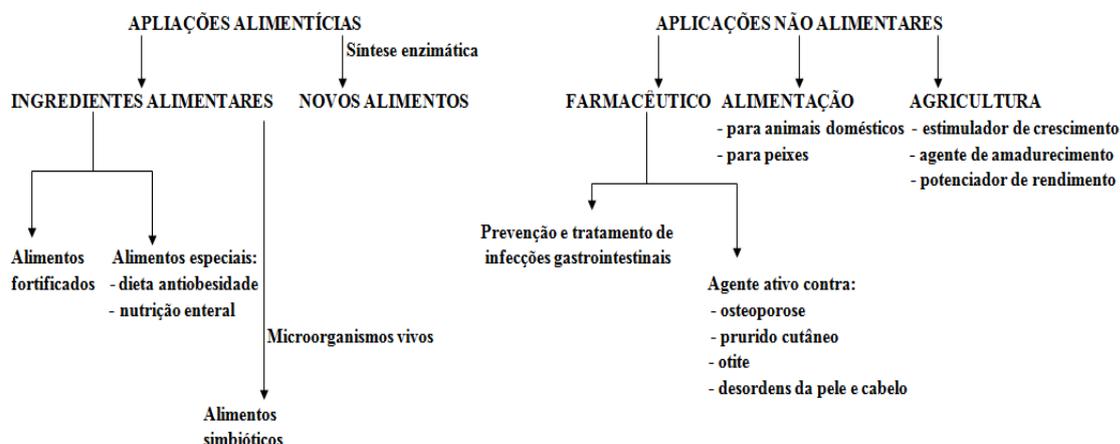


Figura 8. Aplicações comerciais de xilo-oligossacarídeos (XOS). (5).

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 oferecem 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 xiloligossacarídeos (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 xiloligossacarídeos (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 <i>Eucalyptus</i>	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 <i>Eucalyptus</i>	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.

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. Xilooligosacarídeos: 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, Hatfield RD, Ralph AS, Christensen JH, Boerjan W. Lignins: natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxy phenylpropanoids. *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. Sjoström E, Westermarck 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 Technology*. 2007;40(6):963-972.
29. Nabarlantz 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 bioethanol and high added-value compounds of second and third generation biomass. Springer. 2017.
31. Garrote G, Domínguez 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: *Symposium on 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: an 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-value 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.