

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 23/05/2019.



Universidade Estadual Paulista

“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição



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

Thamyres Del Torto Mafei

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

Área de concentração: Ciência dos
Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Fernando Masarin

Araraquara

2017

Thamyres Del Torto Mafei

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

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

Área de concentração: Ciência dos
Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Fernando Masarin

Araraquara

2017



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

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

AUTORA: THAMYRES DEL TORTO MAFEI

ORIENTADOR: FERNANDO MASARIN

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

Prof. Dr. FERNANDO MASARIN

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

Prof. Dr. MICHEL BRIENZO

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

Prof. Dr. GUILHERME PEIXOTO

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

Araraquara, 23 de novembro de 2017

Dedico esse trabalho:

Aos meus pais;

Ao meu namorado;

Aos meus amigos

Pela paciência, carinho e incentivo

Agradecimentos

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

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

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

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

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

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

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

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

Martin Luther King Jr.

RESUMO

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

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

ABSTRACT

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

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

LISTA DE ABREVIações

CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência

DNS: Ácido dinitrossalicílico

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

HSE: hemicelulose extraída do subproduto moído-extraído

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

KOH: hidróxido de potássio

ML: Materiais lignocelulósicos

NaOH: hidróxido de sódio

SBA: soro de albumina bovina

SE: subproduto moído-extraído

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

SO: subproduto original

SOM: subproduto original moído

XOS: Xilooligossacarídeos

X₁: xilose

X₂: xilobiose

X₃: xilotriose

X₄: xilotetrose

X₅: xilopentose

X₆: xiloheXOSe

XynM: endoxilanases purificada

LISTA DE TABELAS

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

LISTA DE FIGURAS

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

LISTA DE EQUAÇÕES

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

Sumário

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

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

1. Introdução

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

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

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

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

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

Os xilooligossacarídeos (XOS) são oligômeros constituídos principalmente por unidades de xilose, e são responsáveis por diversos efeitos benéficos como a prevenção de cáries, a diminuição de níveis séricos de colesterol, o estímulo do crescimento de bifidobactérias no trato gastrointestinal, dentre outros (7,8). Os efeitos benéficos dos XOS à saúde estão relacionados às propriedades físico-químicas, por serem moderadamente doces, estáveis em uma ampla faixa de pH e temperatura, além de conferirem características organolépticas aos alimentos (9). Além do efeito prebiótico, os XOS têm apresentado uma variedade de aplicações, tais

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

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

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

5. Conclusão

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

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

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

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

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

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

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

6. Perspectivas futuras

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

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

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

Referências

1. Silva Magaton A, Piló-Veloso D, Colodette JL. "Caracterização das O-acetil-(4-O-metilglicurono) xilanas isoladas da madeira de *Eucalyptus urograndis* Characterization of O-acetil-(4-O-methylglucurono) xylans from *Eucalyptus urograndis*." *Química Nova* 2008;31(5): 1085-1088.
2. Farinha e Silva CA, Bueno JM, Neves MR. A Indústria de celulose e papel no Brasil: A inovação é o que faz a diferença entre um líder e um seguidor. Innovation distinguishes between a leader and a follower. In: Guia ABTCP: Fornecedores e Fabricantes: celulose e papel. 19a.ed. São Paulo: ABTCP; 2017:16–28.
3. Marques ML, da Silva EJ, Velasco FG, Fornari Júnior CCM. Potencialidades do uso de resíduos de celulose (DREGS / GRITS) como agregado em argamassas. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, Campos Grande- MS, 2014;16(4):423–31.
4. Pereira DEP. Análise de celulasas e xilanases por fungo isolado a partir do Bioma Cerrado. [Dissertação]. Goiânia: Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás; 2013.
5. Figueiredo FC. "Efeito prebiótico de xilo-oligossacarídeos produzidos a partir da hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar utilizando extração alcalina e hidrólise de xilanases fúngicas." [Dissertação]. Rio Claro: Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista; 2016.
6. Brienzo M. Extração da hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar para

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

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

Química, UFSCar; 2015.

18. Keshwani DR, Cheng JJ. Microwave-based alkali pretreatment of switchgrass and coastal bermudagrass for bioethanol production. *Biotechnol Prog* [Internet]. 2010;26(3):644–52. Available from: <http://doi.org/10.1002/btpr.371>
19. Saha BC. Hemicellulose bioconversion. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2003;30(5):279–91.
20. Ogeda LT, Petri DFS. Hidrólise enzimática de biomassa. *Química Nova*, São Paulo; 2010;33(7):1549–58.
21. Limayem A, Ricke SC. Lignocellulosic biomass for bioethanol production : Current perspectives , potential issues and future prospects. *Prog Energy Combust Sci* [Internet]. 2012;38(4):449–67. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pecs.2012.03.002>
22. Ralph J, Lundquist K, Brunow G, Lu F, Kim H, Paul F, et al. Lignins : Natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenyl- propanoids. *Phytochem Rev*. 2004;3(1-2):29–60.
23. Chang H. MWL fraction with a high concentration of lignin-carbohydrate linkages : Isolation and 2D NMR spectroscopic analysis MWL fraction with a high concentration of lignin- carbohydrate linkages : Isolation and 2D NMR spectroscopic analysis. 2007;(December 2014).
24. Brandt A, Gräsvik J, Hallett JP, Welton T. Deconstruction of lignocellulosic biomass with ionic liquids. *Green Chem* [Internet]. 2013;15(3):550.

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

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

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

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

2004;59(20):4377–83.

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

2010;101(2):752–60.

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

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

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

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

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

74. Sluiter A, Hames B, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter J, Templeton D. Determination of ash in biomass: Laboratory Analytical Procedure (LAP). Nrel/Tp-510-42622 [Internet]. 2008;(April 2005):18. Available from: <http://www.nrel.gov/docs/gen/fy08/42622.pdf>
75. Ferraz A, Baeza J, Rodriguez J, Freer J. Estimating the chemical composition of biodegraded pine and eucalyptus wood by DRIFT spectroscopy and multivariate analysis. *Bioresour Technol.* 2000;74(3):201–12.
76. Bailey MJ, Biely P, Poutanen K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *J Biotechnol.* 1992;23(3):257–70.
77. Tan LUL, Mayers P, Saddler JN. Purification and characterization of a thermostable xylanase from a thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. *Can J Microbiol* [Internet]. 1987;33(8):689–92. Available from: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/m87-120>
78. Hartree EF. Determination of protein: A modification of the lowry method that gives a linear photometric response. *Anal Biochem.* 1972;48(2):422–7.
79. Kalogeris E, Christakopoulos P, Vršanská M, Kekos D, Biely P, Macris BJ. Catalytic properties of the endoxylanase I from *Thermoascus aurantiacus*. *J Mol Catalysis - B Enzymatic.* 2001;11(4-6):491–501.
80. Sun JX, Sun XF, Sun RC, Su YQ. Fractional extraction and structural characterization of sugarcane bagasse hemicelluloses. *Carbohydr Polym.* 2004;56(2):195–204.

81. Sluiter JB, Ruiz RO, Scarlata CJ, Sluiter AD, Templeton DW. Compositional analysis of lignocellulosic feedstocks. 1. Review and description of methods. *J Agric Food Chem*. 2010;58(16):9043–53.
82. Vena PF, García-Aparicio MP, Brienzo M, Görgens JF, Rypstra T. Effect of alkaline hemicellulose extraction on kraft pulp fibers from eucalyptus grandis. *J Wood Chem Technol*. 2013;33(3):157–73.
83. DODD D, CANN IKO. Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. *GCB Bioenergy* [Internet]. 2009;1(1):2–17. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1757-1707.2009.01004.x>
84. Sun HJ, Yoshida S, Park NH, Kusakabe I. Preparation of (1→4)- β -D-xylooligosaccharides from an acid hydrolysate of cotton-seed xylan: Suitability of cotton-seed xylan as a starting material for the preparation of (1→4)- β -D-xylooligosaccharides. *Carbohydr Res*. 2002;337(7):657–61.
85. Balakshin MY, Capanema EA, Chang HM. MWL fraction with a high concentration of lignin-carbohydrate linkages: Isolation and 2D NMR spectroscopic analysis. *Holzforschung*. 2007;61(1):1–7.
86. Aachary AA, Prapulla SG. Bioresource Technology Value addition to corncob : Production and characterization of xylooligosaccharides from alkali pretreated lignin-saccharide complex using *Aspergillus oryzae* MTCC 5154. *Bioresour Technol* [Internet]. 2009;100(2):991–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2008.06.050>
87. Aragon CC, Santos AF, Ruiz-matute AI, Corzo N, Guisan JM, Monti R, et al. *Journal of Molecular Catalysis B : Enzymatic Continuous production of*

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

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