UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

JENNIFFER ANDREA TAMAYO PEÑA

PRODUÇÃO DE XILOOLIGOSSACARÍDEOS DE BAIXA MASSA MOLAR A PARTIR DE RESÍDUOS DE EUCALIPTO VISANDO APLICAÇÕES PREBIÓTICAS

PRODUCTION OF LOW MOLECULAR MASS XYLOOLIGOSACCHARIDES FROM EUCALYPTUS RESIDUES FOR PREBIOTIC APPLICATIONS

CAMPINAS – São Paulo

2023

JENNIFFER ANDREA TAMAYO PEÑA

PRODUÇÃO DE XILOOLIGOSSACARÍDEOS DE BAIXA MASSA MOLAR A PARTIR DE RESÍDUOS DE EUCALIPTO VISANDO APLICAÇÕES PREBIÓTICAS

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Engenharia Química.

Orientadora: Profª. Drª. Telma Teixeira Franco

Co-orientador: Prof. Dr. Adilson Roberto Gonçalves

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA JENNIFFER ANDREA TAMAYO PEÑA, E ORIENTADA PELA PROFESSORA Drª. TELMA TEIXEIRA FRANCO.

CAMPINAS – São Paulo

2023

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Rose Meire da Silva - CRB 8/5974

T15p

Tamayo Peña, Jenniffer Andrea, 1988-
Produção de xilooligossacarídeos de baixa massa molar a partir de resíduos de eucalipto visando aplicações prebióticas / Jenniffer Andrea Tamayo Peña. – Campinas, SP : [s.n.], 2023.

Orientador: Telma Teixeira Franco.
Coorientador: Adilson Roberto Gonçalves.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Pré-tratamento. 2. Eucalipto. 3. Xilooligossacarideos. 4. Xilanases. 5. Hidrólise enzimática. I. Franco, Telma Teixeira, 1957-. II. Gonçalves, Adilson Roberto. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Production of low molecular mass xylooligosaccharides from eucalyptus residues for prebiotic applications
Palavras-chave em inglês:
Pretreatment
Eucalyptus
Xylooligosaccharides
Xylanases
Enzymatic hydrolysis
Área de concentração: Engenharia Química
Titulação: Doutora em Engenharia Química
Banca examinadora:
Telma Teixeira Franco [Orientador]
Gustavo Paim Valença
Marcus Bruno Soares Forte
Michel Brienzo
Inês Conceição Roberto
Data de defesa: 14-12-2023
Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)
- ORCID do autor: https://orcid.org/0000-0001-9986-9184
- Currículo Lattes do autor: http://lattes.cnpq.br/2623644217482519

Folha de aprovação da Defesa de Doutorado da aluna Jenniffer Andrea Tamayo Peña aprovada em 14 de dezembro de 2023 pela comissão examinadora da defesa constituída pelos doutores:

Profª. Drª. Telma Teixeira Franco – Presidente e Orientadora
FEQ/UNICAMP
NIPE

Prof. Dr. Gustavo Paim Valença
FEQ/UNICAMP
NIPE

Prof. Dr. Marcus Bruno Soares Forte
FEA/UNICAMP
NIPE

Prof. Dr. Michel Brienzo
Instituto de pesquisa em Bioenergia/Universidade Estadual Paulista
Videoconferência

Profª. Drª. Inês Conceição Roberto
Escola de Engenharia de Lorena/Universidade de São Paulo
Videoconferência

ATA da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

Dedico esta conquista aos meus avós maternos, à minha mãe e ao meu esposo, que com muito carinho me apoiaram e acreditaram em mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sempre me acompanhar e dar me fortaleça diante dos desafios ao longo da minha vida.

Aos meus avós, Jorge Peña Rodriguez e Alicia González Rangel, por seu amor e apoio. Vocês serão sempre uma parte essencial da minha vida das minhas conquistas.

À minha mãe, Edelmira Peña, pelo seu imenso amor, por tudo o que fez e continua fazendo por mim, por ser minha guia e por apoiar-me em minhas decisões e sonhos.

Ao meu irmão, Camilo Andres, e aos meus sobrinhos Valeria e Rafael, pelo amor e incentivo que me proporcionaram nos momentos mais difíceis.

Ao meu esposo, Edgar Andres Patiño, por seu amor, dedicação, sendo minha maior fonte de inspiração e referência na vida pessoal e acadêmica. Agradeço por acreditar em mim, por me proporcionar forças nos momentos desafiadores, e por me encorajar incansavelmente a alcançar meus sonhos.

Aos meus familiares que, mesmo de longe, sempre torceram por mim.

À minha orientadora, Professora Telma Teixeira, pelo seu apoio, confiança e tempo dedicado ao longo dessa jornada. Sua orientação fez parte fundamental do meu crescimento profissional e pessoal.

Ao meu co-orientador, Professor Adilson Roberto Gonçalves, pelo auxílio e apoio no desenvolvimento deste trabalho.

A Lívia Pacheco, por estar ao meu lado nos momentos difíceis e felizes ao longo deste percurso, agradeço por sua constante ajuda em momentos de maior pressão e por tornar a rotina no laboratório mais leve e gratificante. Obrigada pela amizade, compreensão, e por todo o apoio e carinho.

Ao Bruno Pacheco, pela amizade, torcida e pelo suporte fornecido na parte de simulação.

A Astrid Cerón e Laura Plazas, pela amizade ao longo dos anos, apoio emocional e torcida constante mesmo à distância.

A cada um dos meus amigos de Barão Geraldo, que sempre me fizeram sentir como se estivesse perto de casa.

A todos os colegas e amigos do LEBBPOR que conheci ao longo desses anos, pelo companheirismo, ajuda e momentos descontraídos nos períodos de estrese. Cada um de vocês deixou um aprendizado em mim, levo vocês no meu coração.

Ao técnico de laboratório, Dr. Fernando Frederico, pelo essencial auxílio nas análises de cromatografia, sem o qual meus experimentos não teriam sido concluídos.

Ao técnico, Sr. Levi Esmael Madeira, meu reconhecimento pelo constante apoio e suporte na manutenção de equipamentos e infraestrutura do laboratório.

À empresa Suzano Papel e Celulose, pelo fornecimento dos resíduos de eucalipto.

Ao Laboratório Nacional de Biorrenováveis (LNBR), pela colaboração na diminuição do tamanho de partícula das biomassas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processo nº 142363/2016-2, pelo auxílio financeiro.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, fizeram parte desta jornada da minha vida, muito obrigada.

"When I look back over my life, it seems I've been extraordinarily lucky. Although as my mother always says, luck was only part of the story. She's always believed that success comes through determination and hard work and that the fault is not in our stars, but in ourselves that we are underlings. I certainly believe that's true. Yet though I had worked hard all my life, I must admit that the stars seemed to have played their part, too."

Jane Goodall

RESUMO

Os resíduos florestais de eucalipto, como galhos e cascas, representam uma matéria-prima amplamente disponível e de baixo custo, com potencial para a produção de compostos de valor agregado, como xilooligossacarídeos (XOS). Devido ao complexo lignina-carboidrato da biomassa, é necessário empregar métodos que permitam a solubilização dos componentes da biomassa, facilitando sua conversão em bioprodutos. Neste trabalho, foram investigados três métodos de pré-tratamento: hidrotérmico (PTH), ácido diluído (PTD) e combinado(PTC), visando aumentar a produção de XOS nos licores derivados do pré-tratamento de galhos e cascas de eucalipto. Os resultados indicaram que o PTH a 175 ºC, com tempos de reação entre 20 e 25 min, proporcionou os maiores rendimentos de conversão da xilana em XOS, atingindo aproximadamente 50% m/m nos galhos e 40% m/m nas cascas. Posteriormente, ajustando os parâmetros de reação na hidrólise enzimática com xilanase recombinante, foi possível aumentar a produção de XOS de baixo grau de polimerização (GP), os quais tem maior destaque no setor industrial por suas propriedades prebióticas. Sendo assim, os X2+X3 foram aumentados em até 3,63 g/L nos galhos e 2,09 g/L nas cascas, representando um aumento aproximado de sete vezes em comparação com as concentrações iniciais nos licores de pré-tratamento. Finalmente, os licores enriquecidos em XOS de cadeia curta foram utilizados como substrato no crescimento da bactéria *Staphylococcus epidermidis (S. epidermidis)*, demostrando um estímulo ao crescimento de bactérias pertencentes à microbiota da pele. Esses resultados demostram o potencial de aplicação dos resíduos de eucalipto para a produção de XOS com propriedades prebióticas.

Palavras-chave: pré-tratamento; eucalipto; xilooligossacarídeos; xilanases; hidrólise enzimática.

ABSTRACT

The eucalyptus forest residues, such as branches and barks, represent a widely available and low-cost raw material with the potential for producing value-added compounds like xylooligosaccharides (XOS). Due to the complex lignin-carbohydrate composition of the biomass, it is necessary to employ methods that enable the solubilization of biomass components, facilitating their conversion into bioproducts. In this study, three pretreatment methods: hydrothermal (PTH), diluted acid (PTD), and combined (PTC), were investigated to enhance XOS production in liquors derived from the pre-treatment of eucalyptus branches and barks. The results indicated that PTH at 175 ºC, with reaction times between 20 and 25 min, yielded the highest xylan to XOS conversion rates, reaching approximately 50% w/w in branches and 40% w/w in barks. Subsequently, by adjusting the reaction parameters in enzymatic hydrolysis using recombinant xylanase, it was possible to increase the production of low polymerization degree (DP) XOS, which are particularly noteworthy in the industrial sector due to their prebiotic properties. Accordingly, X2+X3 concentrations were increased up to 3.63 g/L in branches and 2.09 g/L in barks, representing an approximate sevenfold increase compared to initial concentrations in the pre-treatment liquors. Finally, liquors enriched in short-chain XOS were utilized as a substrate for the growth of *Staphylococcus epidermidis (S. epidermidis),* demonstrating a stimulation of the growth of bacteria belonging to the skin microbiota. These results underscore the potential application of eucalyptus residues for XOS production with prebiotic properties.

Keywords: pretreatment; eucalyptus; xylooligosaccharides; xylanases; enzymatic hydrolysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema do conceito de biorrefinaria. 26
Figura 2. Descascador de toras a tambor ou king. 30
Figura 3. Harvester utilizado no setor florestal para o descascamento das toras. 30
Figura 4. Componentes da árvore de eucalipto. 31
Figura 5. Estrutura da parede celular da biomassa lignocelulósica e seus principais componentes. 34
Figura 6. Esquema da estrutura molecular da cadeia de celulose. 36
Figura 7. Monômeros que conformam as unidades da hemicelulose. 37
Figura 8. Álcoois precursores da lignina. 38
Figura 9. Estrutura da lignina de eucalipto. 39
Figura 10. Efeito do pré-tratamento na biomassa lignocelulósica. 41
Figura 11. Formação de produtos de degradação das frações de celulose, hemicelulose e lignina no pré-tratamento 42
Figura 12. Ação enzimática na cadeia da xilana. 52
Figura 13. Fatores que afetam a hidrólise enzimática. 53
Figura 14. Estrutura da xilose e XOS. 60
Figura 15. Produção de XOS a partir de materiais lignocelulósicos. 62
Figura 16. Aplicações de XOS em diferentes setores industriais. 68
Figura 17. Camadas e microrganismo da pele. 70
Figura 18. Metodologia geral do projeto. 75
Figura 19. Metodologia empregada para a obtenção de XOS a partir de galhos e cascas de eucalipto. 76
Figura 20. Material com alto conteúdo de terra e descartado do projeto. a) cascas; b) galhos. 77
Figura 21. Biomassa de eucalipto coletada da floresta e triturada na picadora: a) Cascas; b) galhos. 77
Figura 22. Moinho de facas para processamento dos galhos e as cascas de eucalipto. 78
Figura 23. Resíduos de eucalipto moídos com tamanho de partícula de -170 mesh: a) Galhos; b) cascas. 78
Figura 24. Diagrama de processo de caracterização química das biomassas in-natura. 79
Figura 25. Sistema Soxhlet para a determinação dos compostos extrativos. 81
Figura 26. Distribuição do tamanho das partículas dos galhos moídos. 95
Figura 27. Rendimento da recuperação da fração sólida dos galhos após o PTH. 98
Figura 28. Rendimento da recuperação da fração sólida das cascas após o PTH. 99
Figura 29. Solubilização da xilana em arabinose e seus oligômeros, XOS, xilose e furfural pelo PTH dos galhos. 103
Figura 30. Solubilização da xilana em arabinose e seus oligômeros, XOS, xilose e furfural pelo PTH das cascas. 107
Figura 31. Distribuição do GP dos XOS presentes nos HH produzidos pelo PTH dos galhos. 113
Figura 32. Distribuição do GP dos XOS presentes nos HH produzidos pelo PTH das cascas. 115
Figura 33. Rendimento da fração sólida obtida pelo PTD dos galhos e cascas. 120
Figura 34. Caracterização química da fração sólida obtida após PTD dos galhos. 122

Figura 35. Caracterização química da fração sólida obtida após PTD das cascas. 122
Figura 36. Solubilização da xilana em arabinose e seus oligômeros, XOS, xilose e furfural pelo PTD dos galhos. 127
Figura 37. Solubilização da xilana em arabinose e seus oligômeros, XOS, xilose e furfural pelo PTD das cascas. 128
Figura 38. Rendimentos de XOS calculados em relação à biomassa de entrada e na xilana solubilizada no HPH a partir do PTD dos galhos. 130
Figura 39. Rendimentos de XOS calculados em relação à biomassa de entrada e na xilana solubilizada no HPH a partir do PTD das cascas. 131
Figura 40. Distribuição do GP dos XOS presentes nos HH produzidos pelo PTD dos galhos. 132
Figura 41. Distribuição do GP dos XOS presentes nos HH produzidos pelo PTD das cascas. 133
Figura 42. Rendimento da fração sólida obtida pelo PTC dos galhos e cascas de eucalipto. 138
Figura 43. Solubilização da xilana em arabinose e seus oligômeros, XOS, xilose e furfural pelo PTC dos galhos. 142
Figura 44. Solubilização da xilana em arabinose e seus oligômeros, XOS, xilose e furfural pelo PTC das cascas. 143
Figura 45. Distribuição do GP dos XOS presentes nos HH produzidos pelo PTC dos galhos. 147
Figura 46. Distribuição do GP dos XOS presentes nos HH produzidos pelo PTC das cascas. 147
Figura 47. Balanço de massa da obtenção de XOS pelo PTH dos galhos. 150
Figura 48. Balanço de massa da obtenção de XOS pelo PTH das cascas. 151
Figura 49. Perfil de solubilização dos componentes da xilana dos galhos pelo PTH a 175°C: (a) xilana, (b) XOS, (c) xilose e (d) furfural. Dados experimentais representados por símbolos e dados teóricos em linhas. 154
Figura 50. Perfil de solubilização dos componentes da xilana dos galhos pelo PTH a 190°C: (a) xilana, (b) XOS, (c) xilose e (d) furfural. Dados experimentais representados por símbolos e dados teóricos em linhas. 155
Figura 51. Perfil de solubilização dos componentes da xilana dos galhos pelo PTH a 205°C: (a) xilana, (b) XOS, (c) xilose e (d) furfural. Dados experimentais representados por símbolos e dados teóricos em linhas. 156
Figura 52. Micrografias no galho in-natura para ampliações de: A) 100× da superfície, B) 1000× da fratura e C) 5000× da fratura. 160
Figura 53. Micrografias do galho após PTH a 175ºC por 20 min, para ampliações de: A) 100× da superfície, B) 1000× da fratura e C) 5000× da fratura. 162
Figura 54. Micrografias das cascas in-natura: A) ampliação de 500× na superfície, B) ampliação de 5000× na fratura. 164
Figura 55. Micrografias das cascas pré-tratadas pelo PTH a 175 ºC por 25 min: A) ampliação de 500× na superfície, B) ampliação de 5000× na fratura. 164
Figura 56. Composição (g/L) dos hidrolisados das cascas após destoxificação em diferentes tempos: A) Hidrolisado bruto, B) Destoxificado por 30 min, C) Destoxificado por 60 min e D) Destoxificado por 120 min. 171
Figura 57. Seletividade da remoção de compostos de degradação sobre XOS nos HH dos resíduos de eucalipto. 174

Figura 58. Resultados obtidos no cultivo do *A. nidulans* a) Perfil de crescimento celular por gravimetria b) Atividade enzimática da xilanase. 181
Figura 59. Hidrólise enzimática do $HH_{G\text{-}destoxificado}$ com as xilanases: comercial GH11 e recombinante GH10. 189
Figura 60. Hidrólise enzimática com dosagem de enzima em 0,10 U/mg de XOS e variação do $HH_{G\text{-}destoxificado}$ em: a) 2, b) 5 e c) 8% v/v. 191
Figura 61. Hidrólise enzimática do $HH_{G\text{-}destoxificado}$ com concentração de 5% v/v e variação na dosagem de enzima em: a) 0,20 U/mg de XOS e b) 0,340 U/mg de XOS. 193
Figura 62. Hidrólise enzimática do $HH_{C\text{-}destoxificado}$ com concentração de 5% v/v e dosagem de enzima em 0,340 U/mg de XOS. 195
Figura 63. Perfil de crescimento celular e consumo de XOS pela *S. epidermidis* em diferentes meios de cultura: médias dos ensaios em duplicata com desvio padrão inferior a 0,023. 202
Figura 64. Consumo de X2 e X3 e perfil de crescimento da *S. epidermidis* nos meios suplementados com XOS: a) MXS1: 0,70 g/L, b) MXS2: 1,40 g/L e c) MXS3: 2,10 g/L. ... 204

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição de biomassa na árvore de eucalipto com idade de 3 e 7 anos. 32
Tabela 2. Composição química de vários tipos de biomassa lignocelulósica. 35
Tabela 3. Principais métodos de pré-tratamento e seus efeitos gerais na biomassa. 44
Tabela 4. Inibição de enzima por altas concentrações de açúcares no HH. 54
Tabela 5. Obtenção de xilanases a partir de fungos filamentosos por FSm. 59
Tabela 6. Ensaios para o pré-tratamento hidrotérmico em diferentes tempos e temperaturas. 87
Tabela 7. Composição química dos galhos e cascas de eucalipto In-natura. 96
Tabela 8. Solubilização da hemicelulose e lignina nos HH e composição química dos resíduos de eucalipto após PTH. 100
Tabela 9. Concentração de açúcares, ácidos orgânicos e inibidores presentes no HH obtido pelo PTH dos galhos. 105
Tabela 10. Concentração de açúcares, ácidos orgânicos e inibidores presentes no HH obtido pelo PTH das cascas. 109
Tabela 11. Rendimentos (% m/m) de XOS obtidos no PTH dos galhos e cascas, em relação à biomassa de entrada e resultados da seletividade de XOS sobre a xilose (%). 111
Tabela 12. Composição dos HH obtidos pelo PTD dos galhos e cascas e percentagens de seletividade de XOS sobre xilose. 124
Tabela 13. Rendimento e composição química da fração sólida obtida na etapa de desacetilação dos galhos e cascas. 135
Tabela 14. Solubilização das frações da hemicelulose e lignina e composição química dos galhos e cascas obtidos pelo PTC. 140
Tabela 15. Composição dos HH obtidos pelo PTC dos galhos e cascas. 145
Tabela 16. Constantes de velocidade de hidrólise da xilana durante o PTH dos galhos. 157
Tabela 17. Estimação da energia de ativação e o fator pré-exponencial para a hidrólise da xilana durante o PTH dos galhos. 158
Tabela 18. Concentração (g/L) dos compostos de degradação formados na produção de XOS pelo PTH dos galhos e cascas de eucalipto. 168
Tabela 19. Composição do licor dos galhos após a etapa de destoxificação. 170
Tabela 20. Condições de ensaio avaliadas para a produção da xilanase recombinante. 178
Tabela 21. Resultados obtidos no cultivo do *A. nidulans* com 12% de indutor. 184
Tabela 22. Comparação dos resultados de produção de xilanase pela FSm do *A. nidulans* recombinante com dados da literatura. 184
Tabela 23. Concentração de X2-X5 inicial no meio reacional para os ensaios com relação de enzima/substrato de 0,04 v/v. 190
Tabela 24. Composição dos meios de cultura avaliados no crescimento da *S. epidermidis*. 200
Tabela 25. Concentração de carbono nos meios de cultura avaliados no crescimento da *S. epidermidis*. 201
Tabela 26. Variação do pH durante o crescimento da *S. epidermidis* em diferentes condições de meio de cultura. 206

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFEX	Explosão da fibra com amônia
ASTM	American Society for Testing and Materials
CAZy	Carbohydrate Active Enzymes data base
CCT	Coleção de Cultura Tropical
CN	Controle negativo
COS	Celooligossacarídeos
CP	Controle positivo
FES	Fermentação em Estado Sólido
FSm	Fermentação Submersa
G	Guaiacil
GP	Grau de Polimerização
HMF	Hidroximetil furfural
H	p-hidroxifenil
HH	Hidrolisado hemicelulósico
$HH_{G\text{-destoxificado}}$	Licor destoxificado dos galhos
$HH_{C\text{-destoxificado}}$	Licor destoxificado das cascas
HPH	Hidrolisado pós-hidrolise
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HPLC-PAD	Cromatografia líquida de alta eficiência com deteção amperométrica pulsada
LB	Fração líquida alcalina
LNBR	Laboratório Nacional de Biorrenováveis
LHW	Auto-hidrólise
MBS	Massa em base seca
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MX_S	Meio suplementado com XOS
NA	Meio caldo nutriente
$NA_{modificado}$	Meio caldo nutriente modificado
NREL	National Renewable Energy Laboratory
OD	Densidade óptica
PDA	Detetor de Arranjo de Diodo
PIB	Produto Interno Bruto
PTC	Pré-tratamento combinado
PTD	Pré-tratamento com ácido diluído
PTH	Pré-tratamento hidrotérmico
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
S	Siringil
XOS	Xilooligossacarídeos
X1	Xilose
X2	Xilobiose
X3	Xilotriose
X4	Xilotetrose
X5	Xilopentose
X6	Xilohexose
X7	Xiloheptose

LISTA DE SIMBOLOS

A	Fator pré-exponencial
A_{280}	Absorbância da solução solúvel, em g/L
A_{pd280}	Absorbância dos produtos de decomposição dos açúcares (furfural e HMF)
C_{AX}	Conversão da arabinoxilana
$C_{furfural}$	Concentração de furfural, em g/L
C_{HMF}	Concentração de HMF, em g/L
E_a	Energia de ativação, em kJ/mol
$\varepsilon_{furfural}$	Absortividade do furfural
ε_{HMF}	Absortividade do HMF
C_I	Cinzas insolúveis
CLI	Concentração de lignina insolúvel, em g/L
CLS	Concentração de lignina solúvel, em g/L
F_C	Fator de correção
FD	Fator de diluição
I_r	Conteúdo de composto indesejável removido, em g/L
L_I	Lignina insolúvel
L_T	Lignina total
k	Constante de velocidade
M_{BE}	Massa da biomassa livre de compostos extrativos, em gramas
M_C	Massa do cadinho vazio, em gramas
M_{CI}	Massa das cinzas insolúveis em meio ácido, em gramas
M_{CC}	Massa da cadinho com cinzas, em gramas
Mi	Massa da amostra inicial em base seca, em gramas
ML_I	Massa da lignina insolúvel seca, em gramas
MPF	Massa do cadinho contendo fibra de vidro seco, em gramas
$MPFS$	Massa do cadinho contendo fibra de vidro e sólidos retidos seco, em gramas
P_X	Produtividade de biomassa, em g/L.d
Pex	Produtividade d xilanase em U/mL.d
R_0	Fator de severidade
$R_{0}^{'}$	Fator de severidade combinado
T	Temperatura
T_{ref}	Temperatura considerada para iniciar a reação
t	Tempo, em minutos
V_f	Volume filtrado na hidrólise, em g/L
X	Concentração de biomassa, em g/L
XOS_r	XOS totais removidos, em g/L
Y_{pt}	Rendimento do pré-tratamento
Y_{XOS}	Rendimento dos XOS

SUMÁRIO

CAPÌTULO I 21
1. INTRODUÇÃO 21
1.1. Estrutura da tese 21
1.2. Contextualização e motivação 22
1.3. Objetivos 24
1.3.1. Objetivos específicos 24
CAPÍTULO II 26
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 26
2.1. Biorrefinaria 26
2.2. Indústria de eucalipto no Brasil 27
2.2.1. Biomassa residual na floresta 29
2.3. Biomassa lignocelulósica 33
2.3.1. Celulose 36
2.3.2. Hemicelulose 37
2.3.3. Lignina 38
2.4. Pré-tratamento da biomassa lignocelulósica 40
2.4.1. Tipos de pré-tratamento 42
2.4.1.1. Pré-tratamento hidrotérmico (PTH) 45
2.4.1.2. Pré-tratamento com ácido diluído (PTD) 48
2.4.1.3. Pré-tratamento alcalino 50
2.5. Hidrólise enzimática 51
2.5.1. Xilanase 55
2.5.2. Produção de xilanases microbianas 57
2.6. Xilooligossacarídeos 60
2.6.1. Produção de XOS a partir de resíduos lignocelulósicos 61
2.7. Microbiota da pele 69
2.7.1. *Staphylococcus epidermidis* 72
CAPÍTULO III 74
3. PRODUÇÃO DE XOS A PARTIR DE GALHOS E CASCAS DE EUCALIPTO POR DIFERENTES TIPOS DE PRÉ-TRATAMENTO 74
3.1. Introdução 74
3.2. Materiais e métodos 75
3.2.1. Secagem e acondicionamento da biomassa 76
3.2.2. Distribuição do tamanho de partícula 77
3.2.3. Preparo da biomassa para caracterização química 78

3.2.4. Caracterização química da biomassa 79
3.2.4.1. Determinação do teor de umidade 80
3.2.4.2. Determinação de cinzas totais 80
3.2.4.3. Determinação dos compostos extrativos 81
3.2.4.4. Hidrólise ácida da biomassa isenta de compostos extrativos 82
3.2.4.5. Determinação da lignina insolúvel e cinzas insolúveis em meio ácido 83
3.2.4.6. Determinação da lignina solúvel 84
3.2.4.7. Determinação de carboidratos, ácidos orgânicos e inibidores 85
3.2.5. Pré-tratamento dos resíduos de eucalipto 87
3.2.5.1. PTH 87
3.2.5.2. PTD 88
3.2.5.3. Desacetilação e PTC 88
3.2.6. Fator de severidade 89
3.2.6.1. Fator de severidade combinado 89
3.2.7. Caracterização química do hidrolisado por pós-hidrólise ácida 89
3.2.8. Identificação dos XOS nos hidrolisados 90
3.2.9. Balanço de massa 91
3.2.10. Cinética do pré-tratamento 91
3.2.11. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) 93
3.3. Resultados 94
3.3.1. Caracterização físico-química da biomassa in-natura 94
3.3.1.1. Distribuição do tamanho de partícula 94
3.3.1.2. Composição química da biomassa 95
3.3.2. Pré-tratamento dos resíduos de eucalipto 97
3.3.2.1. PTH 97
3.3.2.2. PTD 120
3.3.2.3. Desacetilação e PTC 134
3.3.3. Balanço de massa do pré-tratamento 150
3.3.4. Cinética do pré-tratamento 153
3.3.5. Caracterização morfológica dos resíduos pré-tratados por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) 159
CAPÍTULO IV 166
4. DESTOXIFICAÇÃO DOS HH COM CARVÃO ATIVADO 166
4.1. Introdução 166
4.2. Materiais e métodos 166

4.2.1. Determinação da remoção dos compostos de degradação 167
4.2.2. Determinação do conteúdo de compostos fenólicos totais 167
4.3. Resultados 167
CAPÍTULO V 176
5. PRODUÇÃO DA ENDO-1,4-B-XILANASE DO *Aspergillus nidulans* GENETICAMENTE MODIFICADO 176
5.1. Introdução 176
5.2. Materiais e métodos 176
5.2.1. Microrganismo e condições de cultivo 176
5.2.2. Contagem de esporos 177
5.2.3. Preparo do inóculo 177
5.2.4. Fermentação 178
5.2.5. Determinação da concentração de biomassa 178
5.2.6. Determinação da atividade enzimática 179
5.2.7. Determinação de proteínas totais 180
5.3. Resultados 180
CAPÍTULO VI 187
6. AUMENTO DA PRODUÇÃO DE X2 e X3 ATRAVÉS DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DOS HH DOS RESÍDUOS DE EUCALIPTO 187
6.1. Introdução 187
6.2. Materiais e métodos 187
6.3. Resultados 188
CAPÍTULO VII 197
7.* ATIVIDADE PREBIÓTICA UTILIZANDO XOS COMO SUBSTRATO NO CRESCIMENTO DA *Staphylococcus epidermidis 197
7.1. Introdução 197
7.2. Materiais e métodos 197
7.2.1. Microrganismo e condições de cultivo 197
7.2.2. Preparo do pré-inóculo 197
7.2.3. Preparo do inóculo 198
7.2.4. Crescimento da *S. epidermidis* 198
7.2.5. Metodologia analítica 199
7.3. Resultados 199
7.3.1. Crescimento da *S. epidermidis* 199
7.3.2. Consumo dos XOS durante o cultivo 203
7.3.3. Monitoramento do pH dos meios de cultura 205

CAPÍTULO VIII 209
8. CONCLUSÕES E SUGESTOES PARA TRABALHOS FUTUROS 209
8.1. Conclusões gerais 209
8.2. Sugestões para trabalhos futuros 210
REFERÊNCIAS 211
ANEXO: Distribuição do tamanho das partículas dos galhos triturados. 231

CAPÌTULO I

1. INTRODUÇÃO

1.1. Estrutura da tese

A tese de doutorado está subdividida em oito capítulos além dos anexos. O Capítulo I apresenta a introdução, os objetivos e a produção bibliográfica derivada deste projeto de doutorado.

O Capítulo II aborda a revisão bibliográfica, acerca dos resíduos de eucalipto no setor florestal, a necessidade da aplicação de processos de conversão de matérias-primas lignocelulósicas, aprofundando no pré-tratamento para produção de XOS, além dos conceitos de hidrólise enzimática, e os microrganismos presentes na microbiota da pele para subsequente determinação da atividade prebiótica dos XOS.

O Capítulo III exibe a produção de XOS, empregando diferentes abordagens de pré-tratamento dos resíduos de eucalipto, além das caracterizações químicas e morfológicas das frações sólidas pré-tratadas e a cinética da conversão da hemicelulose durante o pré-tratamento.

O Capítulo IV descreve o processo de destoxificação com carvão ativado para remoção de compostos de degradação nos licores obtidos pelo pré-tratamento.

O Capítulo V relata a produção da enzima xilanase a partir do fungo *A. nidulans* recombinante.

O Capítulo VI exibe o aumento de XOS de baixa massa molecular pela ação da enzima xilanase na etapa de hidrólise enzimática nos licores dos resíduos de eucalipto.

O Capítulo VII apresenta o crescimento da bactéria *S. epidermidis* utilizando XOS como fonte de substrato.

O Capítulo VIII apresenta as conclusões gerais obtidas no presente trabalho e relata sugestões para trabalhos futuros.

1.2. Contextualização e motivação

O setor florestal brasileiro desempenha um papel importante na matriz econômica do país. Em 2021, o Brasil possuía aproximadamente 7,53 milhões de hectares de árvores plantadas de eucalipto para fins industriais, com contribuição de 6,9% do PIB (IBÁ, 2022).

Grande parte das florestas plantadas de eucalipto é destinada principalmente às indústrias de celulose e papel, seguida pelo setor de energia, madeira serrada, produtos de madeira maciça e madeira processada (IBÁ, 2017). No entanto, a indústria madeireira gera grandes quantidades de resíduos ao longo de seus processos, com aproximadamente 33,6 milhões de toneladas, incluindo cascas, galhos e folhas (ABRAF, 2016; IBÁ, 2017).

Parte desses resíduos florestais permanece no campo para proporcionar proteção, estabilidade e adubação do solo (NEIVA et al., 2018) e, frequentemente, representam um desafio devido às limitadas alternativas econômicas para sua reutilização (CANETIERI et al., 2007). Assim, se faz necessário o desenvolvimento de processos que valorizem esses materiais, já que apresentam baixo custo e alta disponibilidade (BRAGATTO, 2010; IBÁ, 2017). O conceito de biorrefinaria permite a obtenção de biocombustíveis e produtos químicos a partir de biomassa, o que possibilita o tratamento de acúmulo de resíduos em diversos setores industriais. Esta estratégia apresenta uma vantagem econômica, pois leva a uma indústria sustentável baseada no uso e aproveitamento de resíduos lignocelulósicos, os quais não competem com o suprimento de alimentos para a produção de compostos de valor agregado (AMORIM et al., 2019).

A madeira de eucalipto é composta principalmente por celulose, hemicelulose e lignina, o que a torna uma fonte de biomassa para a produção de diferentes produtos (BRAGATTO, 2010; PARAJÓ; DOMÍNGUEZ; DOMÍNGUEZ, 1998). No contexto da biorrefinaria, a conversão de materiais lignocelulósicos em biocombustíveis e outros produtos químicos requer várias etapas entre elas: o pré-tratamento, hidrólise ácida/enzimática e fermentação (ZHUANG et al., 2016). O pré-tratamento é uma etapa necessária devido à forte ligação entre a celulose, hemicelulose e lignina. Por meio desse procedimento é possível obter uma modificação físico-química no material, já que permite quebrar a estrutura da lignina, solubilizar a hemicelulose e diminuir a cristalinidade da celulose, permitindo aumentar a acessibilidade das enzimas na etapa de hidrólise (MOSIER et al., 2005a). Existem diferentes tipos de pré-tratamentos (físico, químico, biológico, combinado) (KUMAR et al., 2009), no entanto, a escolha do tipo e suas

condições operacionais dependem dos produtos de interesse (FITZPATRICK et al., 2010). A fração hemicelulósica pré-tratada, contém açúcares em forma de monômeros e oligômeros e a partir deles diferentes produtos podem ser obtidos, como xilooligossacarídeos (XOS), os quais possuem um alto valor no mercado (CARVALHO et al., 2013).

Os XOS são oligômeros formados por monômeros de xilose, com aplicação em áreas como alimentos, farmacêutica, agrícola e cosmética. Esses compostos apresentam características adequadas para sua utilização devido aos benefícios à saúde humana (OTIENO; AHRING, 2012a; PARAJÓ et al., 2004; VÁZQUEZ et al., 2000). Os XOS de cadeia curta como xilobiose (X2) e xilotriose (X3) possuem um maior destaque no setor industrial pelo potencial prebiótico e as propriedades biológicas. Por tanto, se faz necessário o uso de enzimas que atuem na hidrólise da cadeia da xilana, com a finalidade de obter XOS de menor grau de polimerização (GP) (CARVALHO et al., 2018; ROBERTO PAZ CEDENO et al., 2022; UÇKUN KIRAN; AKPINAR; BAKIR, 2013).

Os resíduos de eucalipto são uma matéria-prima renovável, altamente disponível, e econômica para produzir bioprodutos de alto valor agregado. Diversos resíduos agroindústrias tem sido investigados para a produção de XOS, incluindo a madeira de eucalipto (GULLÓN et al., 2011; NETO et al., 2020; PARAJÓ et al., 2004; PENÍN et al., 2019). Contudo, a pesquisa têm priorizado resíduos de madeira industrial e serragem gerada durante sua produção, negligenciando os resíduos do setor florestal, como galhos e cascas. Essa lacuna ressalta a importância de explorar o potencial desses recursos e agregar valor a esses resíduos subutilizados.

Neste sentido, no presente projeto foi estudada a eficiência do pré-tratamento com baixa severidade (segundo a definição dada no item 3.2.6) a partir de galhos e cascas de eucalipto, visando à máxima solubilização das hemiceluloses e a recuperação dos XOS no licor pré-tratado, minimizando formação de produtos de degradação. Posteriormente, foi avaliado o aumento de XOS de menor GP pela ação da xilanase recombinante na etapa de hidrólise enzimática. Este projeto visou gerar um produto nobre com destaque no mercado prebiótico, aproveitando matérias-primas pouco valorizadas e contribuindo para alternativas no tratamento do acúmulo de resíduos no setor florestal.

1.3. Objetivos

O objetivo deste trabalho foi determinar o potencial de resíduos de eucalipto como matéria-prima para a produção de XOS, por meio de diferentes tipos de pré-tratamento: hidrotérmico, ácido diluído e combinado. Além disso, aumentar a concentração de XOS de baixa massa molecular pela ação da enzima xilanase recombinante, visando valorizar esses recursos florestais mediante sua aplicação prebiótica.

1.3.1. Objetivos específicos

- Caracterizar as biomassas com a finalidade de conhecer a composição química dos materiais e determinar os balanços de massa durante os processos.

- Determinar as melhores condições de pré-tratamento dos galhos e cascas in-natura para aumentar a recuperação dos açúcares da fração hemicelulósica na forma de oligômeros de xilose.

- Remover os grupos acetila dos resíduos de eucalipto pelo pré-tratamento alcalino e avaliar o efeito do pré-tratamento combinado para a produção dos XOS.

- Destoxificar os licores gerados no ponto ótimo do pré-tratamento, com a finalidade de remover produtos de degradação que possam ter efeito inibitório nas etapas subsequentes.

- Produzir a enzima endoxilanase a partir do fungo filamentoso *Aspergillus nidulans* (*A. nidulans*) geneticamente modificado.

- Incrementar a concentração dos XOS de baixa massa molar por meio da hidrólise enzimática, utilizando a endoxilanase recombinante, nos licores produzidos na etapa de pré-tratamento.

- Avaliar o potencial prebiótico dos XOS pelo crescimento da *Staphylococcus epidermidis (S. epidermidis)* utilizando XOS como substrato.

1.4. Produção bibliográfica

Trabalhos apresentados em congressos

- Tamayo-Peña, J.A.; Felix, T.C.; Pacheco, L.C.A.; Brenelli, L.B.; Gonçalves, A.R., Franco, T.T. Hydrothermal Pre-treatment of Eucalyptus Forestry Residues Previously to Obtaining Xylooligosaccharides. BBEST/BIOFUTURE - Biofuture Summit II and the Brazilian Bioenergy Science and Technology Conference, 2020, São Paulo (SP), Brazil.

Artigos publicados

- Fernanda Lopes de Figueiredo; Ana Carolina Piva de Oliveira; Cesar RF Terrasan; Thiago A Gonçalves; Jaqueline A Gerhardt; Geizecler Tomazetto; Gabriela F Persinoti; Marcelo V Rubio; Jennifer AT Peña; Michelle F Araújo; Maria AC Silvello; Telma T Franco; Sarita C Rabelo; Rosana Goldbeck; Fabio Squina; André Damásio. Multi-omics analysis provides insights into lignocellulosic biomass degradation by *Laetiporus sulphureus* ATCC 52600. Biotechnology for Biofuels, 14:96, p, 1-17, 2021.

- MOREIRA, M. G.; PEÑA, J. A. T.; FRANCO, T. T. Estratégias para recuperação de xilooligossacarídeos do licor de resíduos de eucalipto para avaliação do seu efeito estimulante em *Staphylococcus xylosus*. Revista do Instituto Adolfo Lutz, v. 3814, p. 1–19, 2023.

Artigos em revisão

- Tamayo-Peña, J.A; Tovar, L.P; Pacheco, L; Gonçalves, A.R; Franco, T. T. Exploring the Potential for Xylooligosaccharides Production from *Eucalyptus grandis* Forestry Residues through Different Pretreatment Approaches. BioEnergy Research.

Artigos em andamento

- Hemicellulosic Valorization of Eucalyptus Forestry Residues from the Pulp and Paper Industry: Thermochemical and Biological Approaches for Efficient Production of Xylobiose and Xylotriose for Prebiotic Applications.

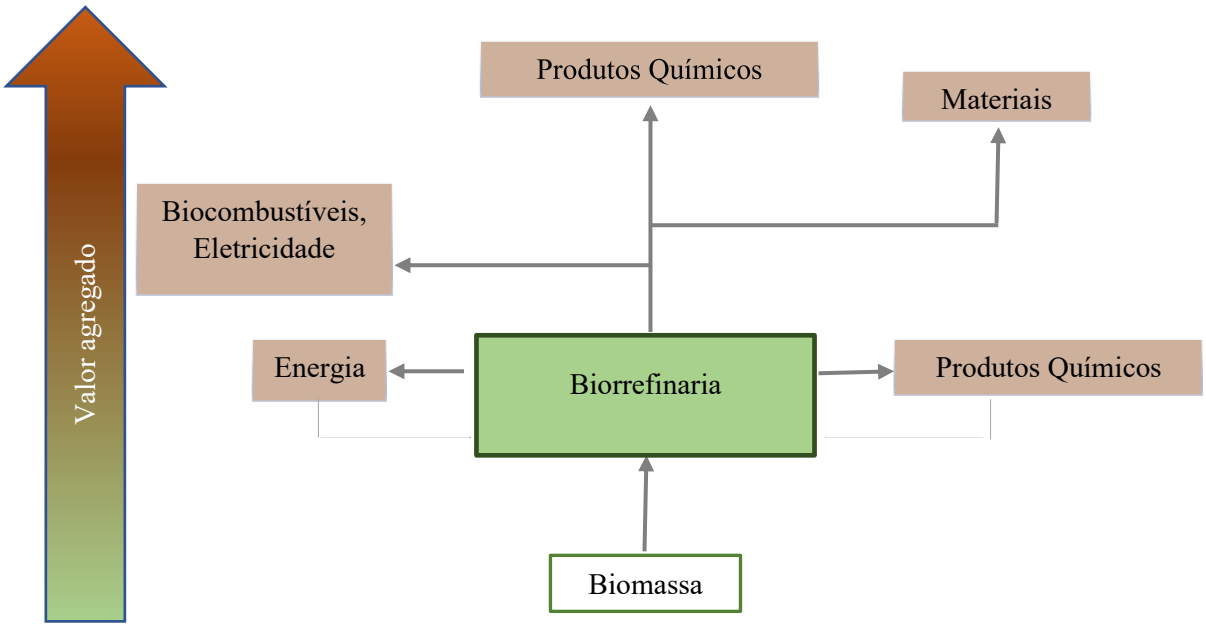
CAPÍTULO II

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Biorrefinaria

O conceito de biorrefinaria visa aproveitar integralmente as frações da biomassa lignocelulósica, por meio de processos de conversão para produzir combustíveis, energia e produtos químicos com a mínima geração de resíduos (FITZPATRICK et al., 2010), como exemplificado na Figura 1. De fato, a biorrefinaria é considerada como uma planta de processamento industrial, a qual permite a separação seletiva e a utilização eficiente dos componentes da biomassa para produzir diversos produtos, tendo um papel semelhante à refinaria do petróleo (CHERUBINI, 2010; MONCADA; ARISTIZÁBAL; CARDONA, 2016).

Figura 1. Esquema do conceito de biorrefinaria.



Fonte: Adaptado de (CARVALHEIRO; DUARTE; GÍRIO, 2008).

As matérias primas utilizadas na biorrefinaria são principalmente culturas agrícolas e seus resíduos, biomassa florestal, resíduos de processos industriais, resíduos sólidos urbanos e biomassas aquáticas como microalgas (CHERUBINI, 2010). Dessa maneira, a biorrefinaria pode ser classificada de acordo com a fonte da biomassa, a rota para a conversão do material

(bioquímica, termoquímica, oleoquímica e biogás) ou os produtos de interesse (KAMM; KAMM, 2007). As biorrefinarias por rota bioquímica direcionam o aproveitamento de açúcares das biomassas lignocelulósicas para serem posteriormente fermentados. Esse processo envolve a conversão do material em açúcares, a adição de catalisadores biológicos e a conversão em produtos desejados com valor comercial (CARVALHEIRO; DUARTE; GÍRIO, 2008).

Para que uma biorrefinaria seja considerada sustentável, é necessário que atenda a determinados critérios. Dentre eles, destacam-se: minimizar os impactos ambientais, não comprometer necessidades críticas (como a produção de alimentos e ração animal), contribuir para a regeneração da biomassa e a biodiversidade, utilizar diferentes tipos de biomassa ou materiais alternativos para reduzir a dependência de uma única fonte de matéria-prima e implementar processos flexíveis que possam se adaptar as variações da demanda do mercado (ÖZDENKÇI et al., 2017).

Os resíduos de biomassa lignocelulósica abundantes podem ser aproveitados com o uso de tecnologias para desconstrução da biomassa e conversão eficiente de suas diferentes frações em produtos de interesse (SILVEIRA et al., 2014).

2.2. Indústria de eucalipto no Brasil

O Brasil possuí aproximadamente 15,98 milhões de hectares de árvores plantadas, sendo que 9,93 milhões de hectares são dedicadas ao uso industrial e 6,05 milhões de hectares de vegetação destinada para conservação. Da floresta destinada para fins industrias, 7,53 milhões de hectares correspondem a plantações de eucalipto (75,8% da área plantada) e as demais são ocupadas por pinus, seringueira, acácia, teca e paricá (IBÁ, 2022). As plantações de eucalipto encontram-se localizadas principalmente nos estados de Minas Gerais, seguido por São Paulo e em terceiro lugar Paraná (IBÁ, 2022).

As espécies de eucalipto mais cultivadas no Brasil são dos gêneros de *Eucalyptus grandis (E. grandis), Eucalyptus saligna (E. saligna), Eucalyptus urophylla (E. urophylla)* e *Eucalyptus viminalis (E. viminalis),* incluindo híbridos de algumas dessas espécies (GARCIA & PIMENTEL - GOMES, 1992). Dentre essas espécies o *E. grandis* é a espécie mais cultivada para fins industriais (SANTOS et al., 2017).

A indústria florestal brasileira se destaca por atingir altas produtividades por área plantada, devido a vários fatores como o avanço tecnológico nos processos de corte e colheita, bem como a criação de programas de melhoramento genético dirigidos ao aumento da produtividade e qualidade da madeira, e desenvolvimento de clones mais resistentes a doenças e pragas (PÖYRY, 2016).

Neste sentido, o eucalipto brasileiro é reconhecido por possuir um crescimento contínuo e um rápido acúmulo de biomassa, apresentando rotação dos plantios entre cinco e sete anos. Já países como Portugal e Espanha, esse tempo de rotação varia entre doze e quinze anos (BRACELPA, 2014; apud LONGUE JÚNIOR; COLODETTE, 2014). Em 2016, o país foi classificado como líder no ranking de produtividade florestal, apresentando uma produtividade média das plantações de eucalipto de 35,7 m³/ha.ano (IBÁ, 2017). Em 2021, a produtividade média das florestas aumentou para 38,9 m³/há/ano (IBÁ, 2022).

A madeira de eucalipto tem diversas aplicações na indústria, sendo que grande parte do eucalipto plantado é destinado para o setor de celulose e papel que aumentou o fornecimento de produtos a partir de matérias-primas lignocelulósicas (IBÁ, 2017). Em 2020, o Brasil continuou se posicionando como o segundo maior produtor de celulose do mundo, produzindo 21,0 milhões de toneladas de celulose a partir de eucalipto e pinus (IBÁ, 2021).

Outros consumidores das florestas plantadas são o siderúrgico a carvão vegetal; o segmento industrial de madeira serrada; e o setor produtor de painéis de madeira e pisos laminados. Este último setor apresentou um aumento na sua produção de 8,5% durante a época da pandemia da Covid-19. Devido às restrições de distanciamento social para diminuir o ritmo de contagio do vírus, se adoptaram medidas de trabalho em acesso remoto, aumentando a necessidade por ter espaços de trabalho adequados dentro dos ambientes de casa (IBÁ, 2021).

A produção de papel diminuiu em 2,8% após a pandemia, no ano 2019 era de 10,5 milhões de toneladas e em 2020 correspondeu a 10,2 milhões de toneladas. Porém, o Brasil continua dentro dos 10 principais produtores mundiais de papel, exportando 2,1 milhões de toneladas (IBÁ, 2021).

O setor de arvores plantadas contribui significativamente na economia nacional e na exportação, na arrecadação de tributos (0,9 % da arrecadação nacional), na geração de novos

empregos, além de proteger e conservar habitat naturais. O setor é responsável por aproximadamente 6,9% do PIB industrial e 1,3% do PIB nacional (IBÁ, 2021; VITAL, 2007).

Quantidades consideráveis de resíduos são geradas no setor florestal e industrial nos processos de corte e colheita da floresta e podem ser explorados na obtenção de produtos de maior valor agregado, já que essa biomassa contêm alto percentual de material orgânico e conteúdo energético (STEINER et al., 1990; apud BRAGATTO, 2010).

2.2.1. Biomassa residual na floresta

Segundo o relatório IBÁ, (2017), a indústria da madeira gerou 47,8 milhões de toneladas de resíduos, sendo que 70,5 % desses resíduos foram provenientes dos processos de corte e colheita das toras da madeira e 29,5 % corresponderam ao pátio industrial. Os resíduos florestais encontram-se distribuídos da seguinte maneira: 99,7% (33,6 milhões de toneladas) pertencem a casca, galhos e folhas. Outros resíduos como óleos, graxas e embalagens de agroquímicos foram também gerados na atividade florestal e esse valor atende a 0,3% (0,1 milhão de tonelada) dos resíduos gerados no campo. Por outro lado, no setor industrial, os principais resíduos gerados foram cavacos, serragem e licor negro com 14,1 milhões de toneladas.

Segundo o relatório de 2022, o setor das árvores plantadas reportou que 63,6% dos resíduos foram destinados para cogeração de energia. No entanto, esses recursos podem ser utilizados no desenvolvimento de outros produtos de valor agregado, diferentes da finalidade energética, uma vez que com isso se promove a maximização do uso dos recursos, a inovação e o empreendedorismo (IBÁ, 2022).

A indústria de celulose e papel é responsável por grande parte dos resíduos de florestas plantadas, estima-se que cerca de 480 kg de resíduos são gerados para cada tonelada de celulose produzida, como resultado do processo de corte e descascamento (STEINER et al., 1990; apud BRAGATTO, 2010).

O processo de descascamento da madeira de eucalipto pode ser feito tanto na floresta quanto no pátio industrial. No caso do descascamento na unidade fabril, as cascas são retiradas em unidades fixas utilizando descascadores a tambor ou *king* (Figura 2), sendo aproveitadas para geração de energia requerida em outros processos, ou para fabricação de fertilizantes e compostagem. Por outro lado, quando o descascamento é feito no campo são utilizadas

unidades móveis chamadas *harvesters* (Figura 3), os quais são equipamentos robustos que cortam as árvores com alturas aproximadamente entre 20 e 30 metros. Além disso, se encarregam de desgalhar, descascar e seccionar em toras longas com comprimentos entre 4 e 6 metros e toras curtas entre 2 a 2,5 metros (FOELKEL, 2010).

Figura 2. Descascador de toras a tambor ou king.

Fonte: https://www.serenamaquinas.com.br/produto/descascador-de-toras/

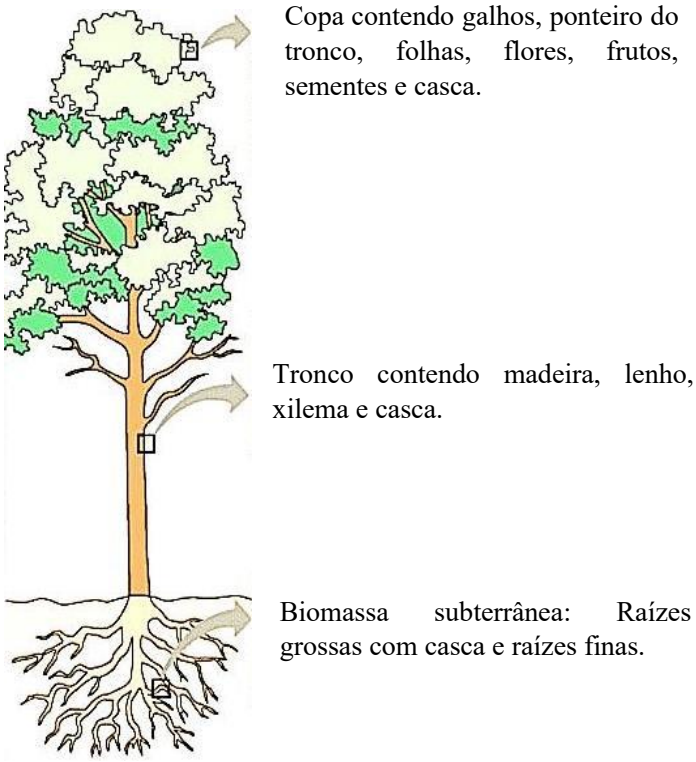
Figura 3. Harvester utilizado no setor florestal para o descascamento das toras.

Fonte: Autor, 2018.

Assim, a eficiência do descascamento varia de acordo com o tipo de espécie de eucalipto, as dimensões das toras e o tempo entre o corte da árvore e o descascamento da tora, uma vez que conforme a umidade da casca vai diminuindo, ela se contrai e dificulta o processo

de remoção. Desta maneira a eficiência do descascamento varia entre 95% para as melhores condições e entre 85% e 65% para as condições intermediárias e inferiores, respectivamente (AMABILINI, 1991; FOELKEL, 2010). Portanto, a quantidade de resíduos gerados nos processos de corte e colheita da madeira vai depender tanto da eficiência das máquinas utilizadas nesta etapa como das condições da árvore. A Figura 4 mostra a distribuição dos componentes arbóreos do eucalipto.

Figura 4. Componentes da árvore de eucalipto.



Fonte: (FOELKEL, 2017).

A biomassa da árvore de eucalipto é constituída por tronco, raízes, galhos e folhas e a proporção de cada uma destas partes é influenciada por fatores como a espécie, idade, produtividade de crescimento, diâmetro do tronco, tamanho da árvore, arquitetura da copa, e condições ambientais. Desta maneira, árvores jovens ou de pequenas dimensões possuem grandes quantidades de galhos, folhas, raízes e casca em comparação com o tronco. A percentagem de casca neste tipo de árvore é alta já que reveste a todos os componentes da árvore como os galhos, raízes e ponteiros. Conforme a idade da floresta vai aumentado, a quantidade

de tronco na madeira aumenta chegando a atingir entre 75 e 80% da massa seca da árvore incluindo as raízes e a percentagem de galhos, folhas e raízes diminui (FOELKEL, 2017).

Na literatura são encontradas diferentes proporções de biomassa para árvore de eucalipto. Segundo BEULCH, (2013), a quantidade de casca e galhos em *E. saligna* corresponde a 9,3% e 7,9% respectivamente. Já para FOELKEL, (2010), a percentagem de casca é de 9 a 12% em árvores geneticamente modificadas, e entre 10 a 18% para espécies comerciais de reflorestamento. Em trabalhos reportados por COUTO E BRITTO, (1980) apud LONGUE JÚNIOR; COLODETTE, (2014), em árvores de eucalipto com 8 anos de idade a percentagem de casca equivale a 12% e 17% representa os galhos e folhas. Assim, a Tabela 1 apresenta a média da distribuição da biomassa na árvore de eucalipto com idades de 3 e 7 anos de corte em condições ideais com produtividade de 40 /hectare. ano.

Tabela 1. Distribuição de biomassa na árvore de eucalipto com idade de 3 e 7 anos.

Idade florestal	**Biomassa integral da árvore (%)**		**Biomassa aérea (%)**	
	7 anos	**3 anos**	**7 anos**	**3 anos**
Tronco	72 – 80	60 – 68	82 – 90	72 – 78
- Madeira	65 – 75	50 – 60	75 – 84	60 – 65
- Casca	5 – 7	8 – 10	6 – 8	10 – 12
Copa	7 – 12	15 – 20	9 – 15	20 – 24
- Galhos	4 – 8	8 – 10	6 – 11	10 – 14
- Folhas	2 – 5	7 – 9	3 – 6	8 – 12
Raízes	12 – 18	15 – 20	N. A	N. A

* Valores em % de massa seca; N. A: não aplica.
Fonte: (FOELKEL, 2017).

As cascas desenvolvem um papel importante na atividade fisiológica da planta. A sua função é de proteger ao tronco, galhos e raízes contra ameaças ambientais e mecânicas. Além disso, o floema (tecido interno da casca) se encarrega de conduzir a seiva elaborada pelas folhas composta por açúcares, compostos extrativos e minerais para toda a estrutura da árvore. Enquanto os galhos têm a função de sustentar as folhas e aumentar a ocupação de espaço na floresta, com finalidade de facilitar a captação solar da planta por meio do crescimento lateral

das ramas. A quantidade de galhos gerados na estrutura da árvore vai depender das condições de plantio, assim como o seu genótipo (FOELKEL, 2010, 2017).

Resíduos lignocelulósicos, como galhos e cascas de eucalipto, são considerados biomassa para obtenção de diversos produtos a partir da celulose, hemicelulose e lignina. Desse fato, existe uma grande disponibilidade de cascas e galhos gerados no campo, os quais contêm na sua composição química conteúdos importantes de glicose, xilose, manose, galactose, arabinose, ramnose, lignina, ácidos orgânicos, cinzas e compostos extrativos (CANETTIERI et al., 2007).

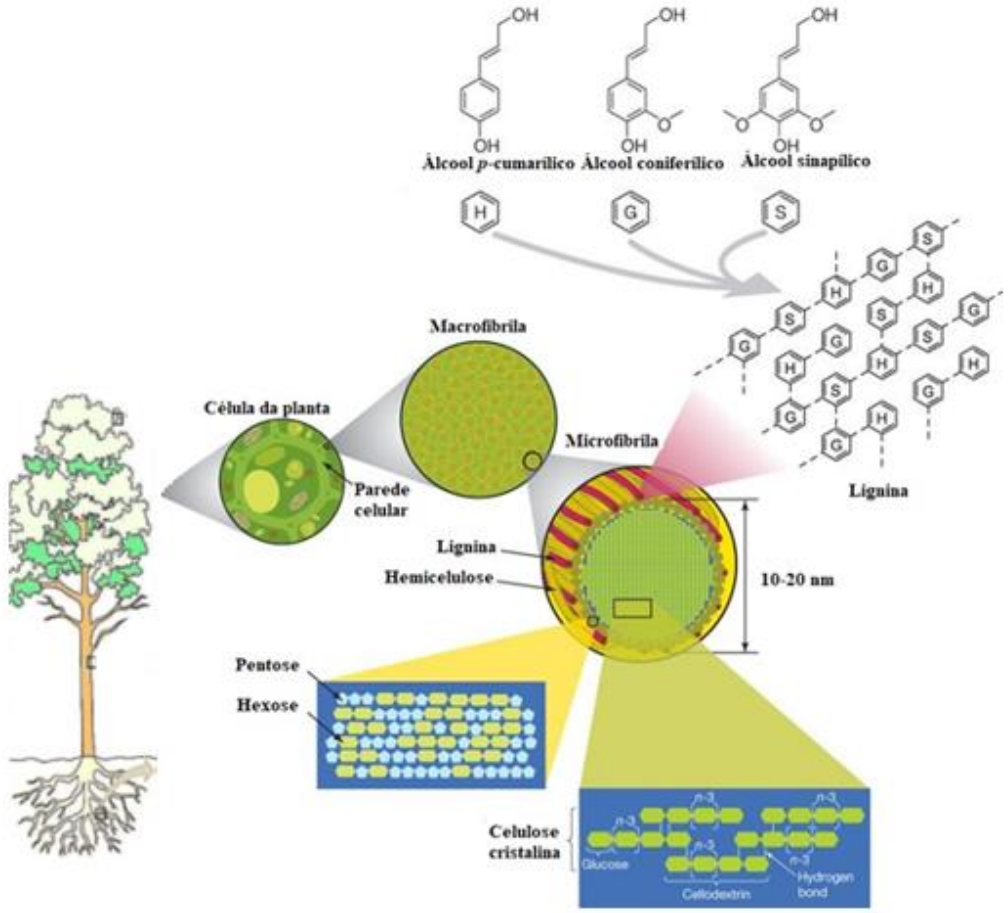
Os resíduos gerados nesse setor são pouco valorizados, uma vez que, os resíduos produzidos no abate das árvores como cascas, galhos e folhas, são mantidos principalmente na floresta para cobrir o solo após o processo de colheita, fornecendo proteção e fertilização ao solo para as futuros plantios (DOMINGUES et al., 2010; FOELKEL, 2010, 2016; IBÁ, 2017; NEIVA et al., 2018). Por essa razão, o uso de diferentes frações de madeira de eucalipto e seus resíduos são um recurso em potencial a serem explorados para novas aplicações e diversificação de seu uso, como fonte de bio-produtos para a indústria (BRAGATTO, 2010; FENG et al., 2013).

2.3. Biomassa lignocelulósica

A lignocelulose é o principal e mais abundante componente da biomassa e considerado um recurso natural e renovável com grande potencial para a obtenção de vários produtos de alto valor agregado (BRIDGWATER, 2006; CAO et al., 2017; RAGAUSKAS et al., 2006).

Os principais componentes presentes na biomassa lignocelulósica são a celulose, hemicelulose e lignina, as quais são responsáveis pela sustentação mecânica e defesa das plantas contra agentes externos. Essas macromoléculas são compostas por átomos de carbono, hidrogênio e oxigênio e encontram-se configuradas na parede celular vegetal conforme a Figura 5. Outros componentes como pectina, compostos de nitrogênio e componentes inorgânicos podem pertencer à sua composição (BARTA; FORD, 2014; MOHAN; PITTMAN; STEELE, 2006).

Figura 5. Estrutura da parede celular da biomassa lignocelulósica e seus principais componentes.



Fonte: Adaptado de (RUBIN, 2008).

A biomassa lignocelulósica inclui matérias-primas como resíduos agrícolas, resíduos florestais e materiais lenhosos (KUMAR et al., 2009). O conteúdo de celulose, hemicelulose e lignina varia segundo a origem do material: gramíneas, hardwood (madeira de folhosas) ou softwood (madeira de coníferas); espécie da planta; idade e etapa de crescimento (ANWAR; GULFRAZ; IRSHAD, 2014; REDDY; YANG, 2005). Para exemplificar, na Tabela 2 é descrita a composição química de vários tipos de biomassa lignocelulósica.

Tabela 2. Composição química de vários tipos de biomassa lignocelulósica.

Biomassa	Celulose (%)	Hemi-celulose (%)	Lignina (%)	Compostos extrativos (%)	Cinzas (%)	Referência
Bagaço de cana-de-açúcar	42,8	25,9	22,1	6,1	1,4	(ROCHA et al., 2013)
Cavaco *E. urophylla* × *E. grandis*	49,89	20,30	27,35	2,30	0,16	(CARVALHO et al., 2015)
Casca *E. grandis*	65,2		16,8	13,7	3,8	(LIMA et al., 2018b)
Galhos *Eucalyptus globulus (E. globulus)*	39, 74	24,79	25,74	3,09	0,14	(GALLINA et al., 2016)
Madeira *E. grandis* × *E. urophylla*	43,9	17,4	28,5	3,4	0,7	(NETO et al., 2020)
Madeira *Eucalyptus. nitens (E. nitens)*	40,7	31,16	23,72	2,25	0,19	(PENÍN et al., 2019)
Miscanthus sinensis	33,96	26,47	21,63	n.d	5,50	(OTIENO; AHRING, 2012)
Palha de arroz	39	27	12	n.d	11	(KARIMI; KHERADMANDINIA; TAHERZADEH, 2006)
Palha de cana	39,8	28,6	22,5	6,2	2,4	(OLIVEIRA et al., 2013)
Palha de trigo	32,64	24,87	16,85	12,95	10,22	(CARROLL; SOMERVILLE, 2009)

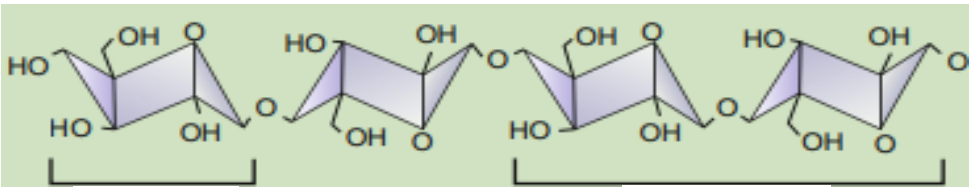
n.d: não determinado.
Fonte: Autor, 2023.

2.3.1. Celulose

A celulose é o principal componente na parede celular vegetal e é considerado o recurso renovável de maior disponibilidade na natureza. Se caracteriza por ser um polissacarídeo resistente, fibroso e insolúvel em água, fornecendo desta maneira resistência mecânica e estabilidade à estrutura da parede celular da planta (BRINGMANN et al., 2012; CHEN, 2014).

A celulose é um homopolímero de glicose, composta por longas cadeias desse monômero, as quais se agrupam por meio de ligações β-1,4-glicosídicas, resultando em moléculas de alta massa molar. Sendo que por meio da hidrólise desta macromolécula obtêm-se a glicose e o dímero celobiose, o qual é constituído por unidades de glicose. A molécula de celulose pode conter até dez mil unidade de glicose, e a fórmula química é $(C_6H_{10}O_5)_n$, onde n corresponde ao grau de polimerização (CHEN, 2014; FENGEL; WEGENER, 1989). Na Figura 6 encontra-se a representação da estrutura de um fragmento de celulose.

Figura 6. Esquema da estrutura molecular da cadeia de celulose.



Glicose **Celobiose**

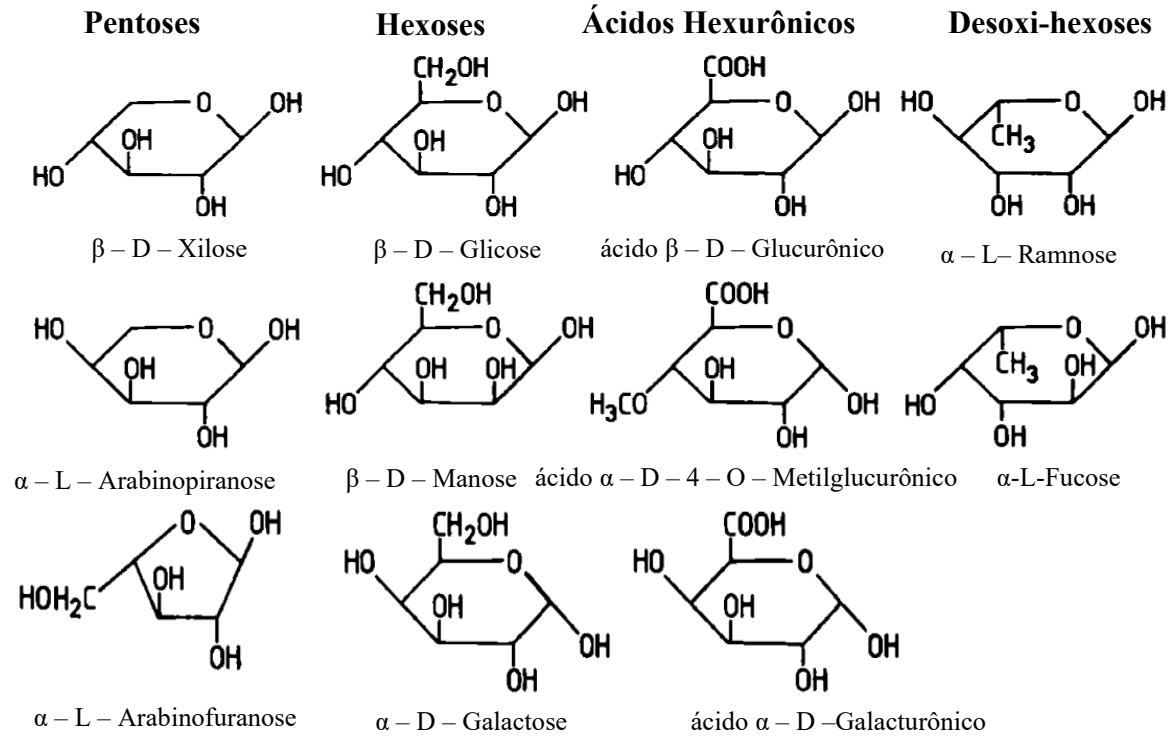
Fonte: Adaptado de (FENGEL; WEGENER, 1989)

Essa macromolécula é organizada na parede celular em longas cadeias lineares ligadas por pontes de hidrogênio e forças de *van der Waals* intramoleculares. Essas cadeias conformam as microfibrilas, cada uma composta aproximadamente por 36 cadeias lineares de glicose. Na estrutura microfibrilar, são formadas regiões tanto cristalinas quanto amorfas. Os regiões cristalinas são caracterizados por uma organização ordenada ao longo da fibra, proporcionando uma grande resistência ao processo de hidrólise. Entretanto, as regiões amorfas são menos organizadas na estrutura, apresentando maior flexibilidade e por conseguinte mais suscetíveis à degradação (DELMER, 1999; EMONS; SCHEL; MULDER, 2002; MOHAN; PITTMAN; STEELE, 2006).

2.3.2. Hemicelulose

A hemicelulose é considerada um polímero heterogêneo com cadeias ramificadas de monômeros de açúcares. Esses incluem pentoses (xilose, arabinose), hexoses (glicose, manose e galactose), como também, ácidos orgânicos conforme a Figura 7 (FENGEL; WEGENER, 1989; MOHAN; PITTMAN; STEELE, 2006).

Figura 7. Monômeros que conformam as unidades da hemicelulose.



Fonte: Adaptado de (FENGEL; WEGENER, 1989).

Na parede celular da biomassa, a hemicelulose encontra-se ligando as microfibrilas da celulose com a lignina. Os açúcares que compõe as hemiceluloses encontram-se conectados por meio de ligações glicosídicas β (1-4) conformando uma estrutura principal de um tipo de resíduo com ramificações de outros açúcares. Desta maneira, a classificação do polissacarídeo que conforma a hemicelulose dependerá do monossacarídeo mais predominante na cadeia principal e das ramificações, como por exemplo: as xilanas, arabinoxilanas e galactomananas (DA-SILVA; FRANCO; GOMES, 1997; SHALLOM; SHOHAM, 2003).

As xilanas são os polissacarídeos principais da fração hemicelulósica. Elas são formadas por unidades de xilose, sendo este o monômero mais abundante na fração hemicelulósica da

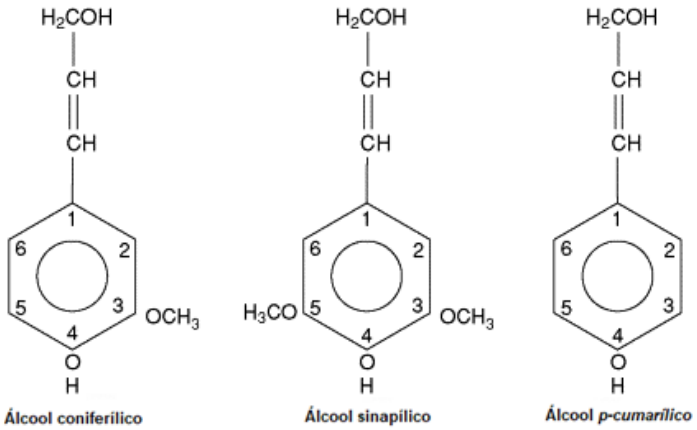
biomassa. No entanto, algumas ramificações das cadeias das xilanas são substituídas por grupos de arabinose, acetila, ácidos glucurônico e 4-O-metilglucurônico (MAFEI et al., 2020). Essa substituição varia segundo a natureza da biomassa e a idade de corte da mesma (CHEN, 2014; KUHAD; SINGH, 1993; QING et al., 2013). Por exemplo, no caso das madeiras folhosas ou *hardwoods*, como o eucalipto, o ácido glucurônico apresenta-se em maior proporção. Já nas madeiras coníferas ou *softwoods* o grupo substituinte é principalmente a arabinose (SJÖSTRÖM; ALÉN, 1999).

A hemicelulose se caracteriza por apresentar baixo GP, menor massa molecular, ausência de sítios cristalinos na estrutura, possuindo assim somente regiões amorfas. Essas propriedades fazem com que a estrutura seja mais suscetível a despolimerização em condições de menor severidade durante o pré-tratamento se comparado com a celulose (CHEN, 2014; MOHAN; PITTMAN; STEELE, 2006).

2.3.3. Lignina

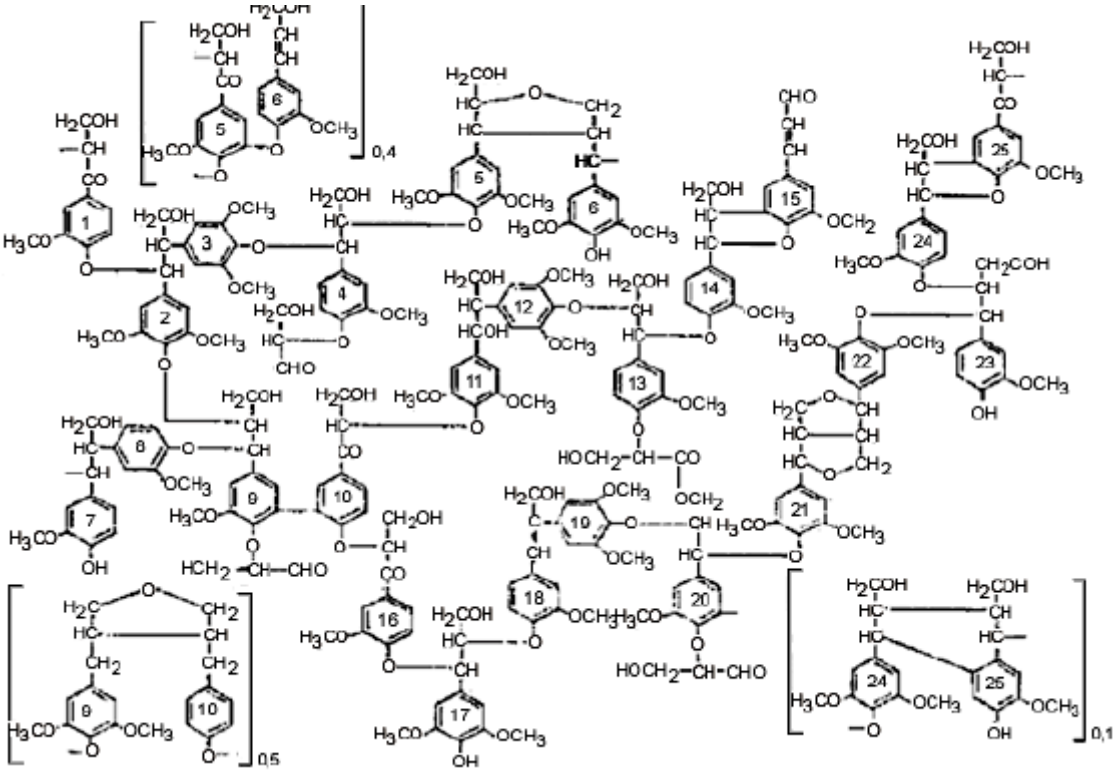
A lignina é uma macromolécula complexa formada pela polimerização dos álcoois aromáticos coniferílico, sinapílico e p-cumarílico (Figura 8). Em sua estrutura, a macromolécula apresenta anéis de benzeno, os quais são conectados por átomos de carbono como exibido na Figura 9. Além disso, a lignina apresenta alta massa molar, uma grande variedade de grupos funcionais e diferentes ligações como: carbono-carbono, éster e éter (CHEN, 2014; FENGEL; WEGENER, 1989; MOHAN; PITTMAN; STEELE, 2006).

Figura 8. Álcoois precursores da lignina.



Fonte: Adaptado de (MACRAE; ROBINSON; SADLER, 1993).

Figura 9. Estrutura da lignina de eucalipto.



Fonte: (Piló-Veloso et al., 1993; apud BRAGATTO, 2010).

Os monômeros presentes na lignina incluem o p-hidroxifenil *(H)* derivado do álcool *p*-cumarílico; guaiacil *(G)* derivado do álcool coniferílico e o siringil *(S)* derivado do álcool sinapílico. Em madeiras folhosas as ligninas encontradas são formadas por unidades de *G* e *S*, enquanto nas madeiras coníferas são encontradas em maior proporção unidades de *G* (CHEN, 2014; DUVAL; LAWOKO, 2014; MOHAN; PITTMAN; STEELE, 2006).

A lignina encontra-se envolvendo a celulose, desempenhando um papel fundamental na proteção da estrutura vegetal contra o ataque de agentes externos. Além disso, contribui no transporte de líquidos e nutrientes à planta, fornece rigidez, impermeabilidade e suporte estrutural à celulose e hemicelulose, apresentando desta maneira alta resistência à degradação química e biológica (DEL RÍO et al., 2007; RUBIN, 2008).

2.3.4. Compostos extrativos e cinzas

A composição da biomassa lignocelulósica apresenta em menor proporção componentes não estruturais da parede celular das plantas, conhecidos como extrativos e cinzas. Os

compostos extrativos são compostos orgânicos que podem ser removidos por meio de solventes polares (água, álcool) e apolares (tolueno, hexano) (MOHAN; PITTMAN; STEELE, 2006). Esses compostos apresentam baixa massa molar e sua proporção varia segundo o tipo de biomassa, podendo mudar desta maneira a quantidade nos diferentes tecidos da mesma planta (ROWELL et al., 2005). Na biomassa de eucalipto, as cascas apresentam maior teor de compostos extrativos se comparado com a madeira (Tabela 2).

Os compostos extrativos atuam na planta como fonte de reserva de energia, além de serem uma defesa contra-ataques de insetos e microrganismos. Entre as diversas substancias que conformam os extrativos encontram-se: pectinas, terpenos, resinas, taninos, gomas, ácidos graxos, podendo incluir também carboidratos de baixa massa molar e lignina solúvel (MOHAN; PITTMAN; STEELE, 2006; SJÖSTRÖM; ALÉN, 1999).

As cinzas são compostos inorgânicos encontrados nas frações não extraíveis da biomassa e obtidas após a queima a elevadas temperaturas. Nas cinzas são encontrados minerais como silício (Si), cálcio (Ca), magnésio (Mg), potássio (K), sódio (Na), fósforo (P) (CHEN, 2014; MOHAN; PITTMAN; STEELE, 2006).

2.4. Pré-tratamento da biomassa lignocelulósica

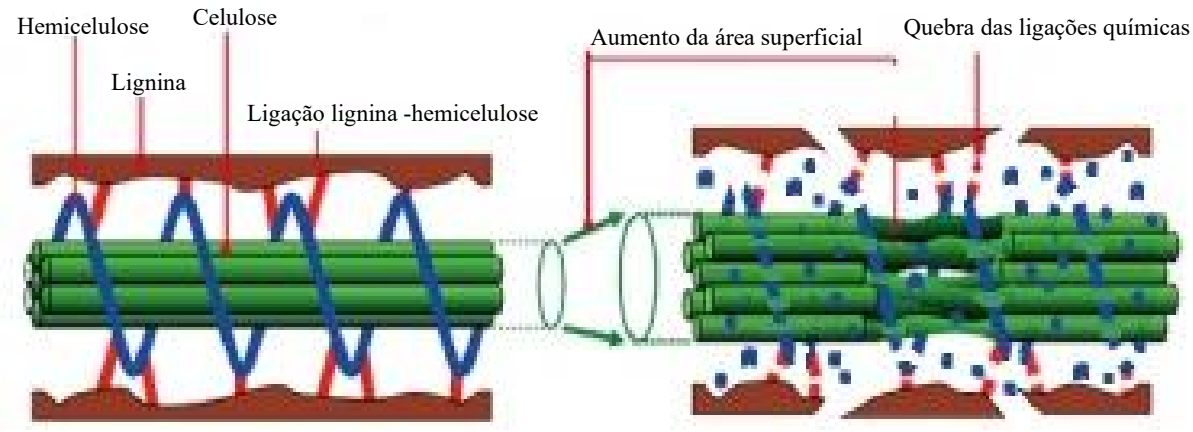
Devido à forte ligação entre os componentes da biomassa lignocelulósica é indispensável empregar metodologias que facilitem a desconstrução do complexo lignina-carboidrato. Desta maneira, o acesso aos materiais contidos na biomassa, como açúcares poliméricos e sua subsequente conversão em monômeros, são facilitados, uma vez que é necessária a separação seletiva destes compostos para a obtenção de diversos produtos. Sendo assim, existem três etapas essências na conversão da biomassa lignocelulósica: pré-tratamento, hidrólise e fermentação (RUBIN, 2008).

O pré-tratamento é uma das principais etapas operacionais na conversão eficiente e competitiva da biomassa, sendo responsável por aproximadamente 18% dos custos de produção na conversão da biomassa lignocelulósica. Além disso, afeta as outras etapas do processo como a hidrólise e fermentação (YANG; WYMAN, 2008).

Na etapa de pré-tratamento, a biomassa sofre uma alteração físico-química da estrutura da parede celular, pela quebra das interações entre a celulose, hemicelulose e lignina, e o

aumento da área superficial. Além de reduzir a cristalinidade das microfibrilas da celulose diminuindo a recalcitrância da biomassa. Esses parâmetros facilitam o acesso dos agentes químicos ou enzimáticos nas posteriores etapas (KUMAR et al., 2009; MOSIER et al., 2005a; ZHAO; ZHANG; LIU, 2012). A Figura 10 mostra os efeitos do processo de pré-tratamento na estrutura da parede celular da biomassa.

Figura 10. Efeito do pré-tratamento na biomassa lignocelulósica.



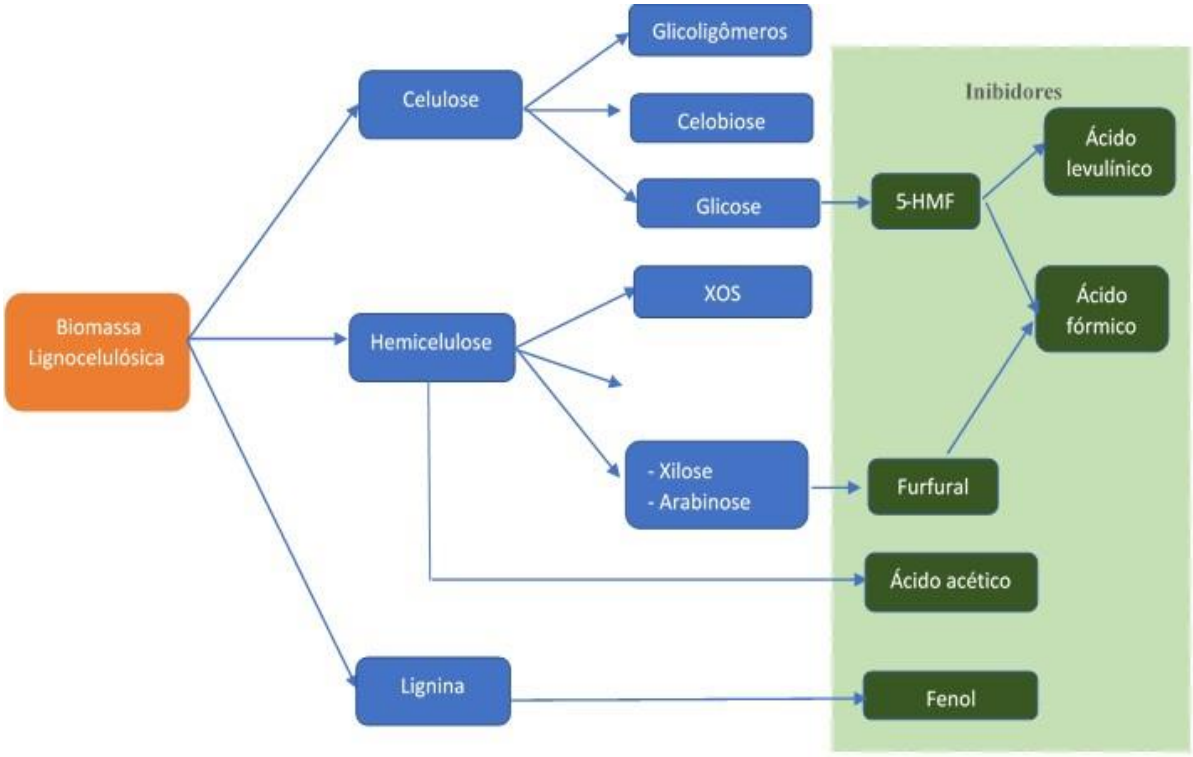
Fonte: Adaptado de (NAKASU, 2015).

A eficiência da etapa de pré-tratamento deve cumprir com certas características (CHANDRA et al., 2007; GALBE; ZACCHI, 2007; SUN; CHENG, 2002):

- Baixas demandas de energia, água e catalisadores;
- Baixo custo de capital e operacional;
- Mínimos requerimentos de preparo ou pré-acondicionamento da biomassa antes do pré-tratamento;
- Habilidade de alterar a parede celular dos materiais lignocelulósicos;
- Alta recuperação das frações da biomassa;
- Geração de baixas quantidades de resíduos;
- Processos pouco corrosivos.

Desta maneira, diversas técnicas de pré-tratamento são utilizadas para desestruturar o complexo lignina – carboidrato. No entanto, a escolha do tipo de pré-tratamento e as condições de operação devem minimizar as perdas de açúcares fermentescíveis, como também reduzir a formação de compostos inibitórios para os processos de hidrólise enzimática e posterior fermentação (Figura 11) (CANETIERI et al., 2007; SUN et al., 2016).

Figura 11. Formação de produtos de degradação das frações de celulose, hemicelulose e lignina no pré-tratamento.



Fonte: Adaptado de (MODENBACH; NOKES, 2012).

2.4.1. Tipos de pré-tratamento

Na escolha do pré-tratamento, parâmetros como tipo de biomassa, produto ou produtos finais de interesse, fatores econômicos e ambientais devem ser considerados (CHANDRA et al., 2007; KUMAR et al., 2009). Entretanto, a severidade do processo também deve ser avaliada, uma vez que condições brandas podem diminuir a acessibilidade das enzimas nas fibras da celulose. Ao contrário, condições drásticas (altas temperaturas e adição de ácidos) propiciam a formação de produtos degradação, os quais apresentam importância econômica, porém, possuem efeito inibitório nos processos biológicos das etapas subsequentes (MODENBACH; NOKES, 2012; RABELO, 2010).

Diferentes métodos de pré-tratamento vêm sendo empregados para desestruturar a matriz da biomassa lignocelulósica, sendo classificados em pré-tratamentos biológicos, físicos, químicos e físico-químicos. Cada um destes métodos tem determinado efeito na biomassa

(GUPTA; VERMA, 2015). A Tabela 3 relaciona diferentes tipos de procedimentos utilizados para o pré-tratamento da biomassa lignocelulósica.

Nos pré-tratamentos por rota biológica são utilizados diferentes tipos de microrganismos principalmente fungos e bactérias capazes de secretar enzimas, como hemicelulases e lacases, as quais atuam na degradação da hemicelulose e lignina respectivamente (SÁNCHEZ, 2009).

Pré-tratamentos físicos utilizam técnicas como moagem ou trituração. Este tipo de pré-tratamento visa aumentar a diminuição do tamanho de partícula do material, aumentando a superfície de contato para as posteriores etapas. Dependo das condições do processo pode-se alterar a cristalinidade das microfibrilas da celulose (TAHERZADEH; KARIMI, 2008).

Os pré-tratamentos químicos vêm sendo estudados amplamente para a deslignificação de materiais lignocelulósicos, sendo utilizados ácidos, bases, agentes oxidantes ou solventes orgânicos (ANWAR; GULFRAZ; IRSHAD, 2014). Assim, os pré-tratamentos químicos incluem técnicas como hidrólise ácida (concentrada/diluída), tratamento alcalino, tratamento com peróxido de hidrogênio e processo organosolv. Esses processos possibilitam a solubilização de uma ou mais frações da biomassa. Porém, a maior solubilização corresponde à fração hemicelulósica devido ao caráter cristalino da celulose. Pré-tratamentos químicos também promovem a diminuição do GP e cristalinidade da celulose (GALBE; ZACCHI, 2007).

Finalmente, os pré-tratamento físico-químicos incluem tecnologias como explosão a vapor, explosão da fibra com amônia (AFEX), e hidrotérmico. Esses processos visam solubilizar ou reduzir a interação entre as diferentes frações da biomassa lignocelulósica, aumentando a suscetibilidade do material ao ataque enzimático (BRODEUR et al., 2011).

Na técnica de explosão a vapor, a biomassa é tratada com vapor saturado a alta pressão e alta temperatura por curtos períodos, seguida de uma despressurização rápida, que quebra a estrutura do material e permite a hidrólise parcial da biomassa (SUN; CHENG, 2002). O pré-tratamento AFEX difere do processo de explosão a vapor, uma vez que a biomassa é tratada com uma solução de amônia a menores temperaturas e tempos de tratamento, seguida da descompressão súbita, que modifica a estrutura lignocelulósica e permite o aumento da área superficial da biomassa para os processos de hidrólise (RODRIGUES et al., 2017). Por fim, no

pré-tratamento hidrotérmico a biomassa é tratada com água a altas temperaturas, promovendo alta recuperação de hemiceluloses (MOSIER et al., 2005a).

Tabela 3. Principais métodos de pré-tratamento e seus efeitos gerais na biomassa.

Pré-tratamento	Processo	Vantagens	Desvantagens	Referência
Físicos	Moagem	Aumento da área superficial e porosidade; e reduz a cristalinidade da celulose.	Altos requerimentos de energia.	(BRODEUR et al., 2011); (GALBE; ZACCHI, 2007); (TAHERZADEH; KARIMI, 2008).
Químicos	Hidrólise ácida	Solubiliza parcial ou totalmente as hemiceluloses; reduz a cristalinidade da celulose; altera a estrutura da lignina.	Formação de inibidores; requer equipamentos resistentes a corrosão; precisa neutralizar as frações para posteriores etapas.	(CHEN, 2014); (KUMAR et al., 2009).
	Hidrólise alcalina	A altas temperaturas cliva as ligações lignina-hemiceluloses; remoção de grupos acetila; aumenta a porosidade do material.	Longos tempos de residência; necessidade de neutralizar o hidrolisado; o conteúdo de lignina no material afeta a eficiência do processo.	(HAGHIGHI et al., 2013); (MENON; RAO, 2012).
	Organosolv	Hidrolisa a hemicelulose e lignina	Condições de processo severas; precisa um sistema de recuperação do solvente; custo elevado.	(KUMAR et al., 2009); (SUN; CHENG, 2002).
Biológicos	Fungos e actinomicetos	Baixo consumo de energia; hidrólise da lignina e hemicelulose.	Longos tempos de processo; requer controle das condições de crescimento.	(ANWAR; GULFRAZ; IRSHAD, 2014); (RODRIGUES et al., 2017).
Físico-químicos	Explosão a vapor	Ataca a hemicelulose e altera a estrutura da	Elevadas temperaturas de processo; formação	(KUMAR et al., 2009); (SUN et al.,

	lignina; aumento do tamanho dos poros.	de compostos inibitórios; desestruturação incompleta do complexo lignina-carboidrato; degradação de uma parte da xilana; consumo elevado de água; custos elevados de equipamentos.	2016); (ZHAO; ZHANG; LIU, 2012).
AFEX	Remoção parcial da lignina e hemicelulose; não produz compostos inibitórios; redução da cristalinidade da celulose.	Utiliza altas quantidades de amônia; limitado para materiais com altos conteúdos de lignina; necessária a etapa de reciclado da amônia.	(KUMAR et al., 2009); (MOSIER et al., 2005); (YANG; WYMAN, 2008).
Hidrotérmico	Alta recuperação da hemicelulose em forma de oligômeros e monômeros; despolimerização parcial da lignina	Alta demanda de água; deslignificação incompleta.	(MODENBACH; NOKES, 2012).

Fonte: Autor, 2023.

Desta maneira, neste trabalho serão estudados os pré-tratamentos por ácido diluído e hidrotérmico para a biomassa de eucalipto em diferentes condições de temperatura, tempo de reação e concentração de ácido, visando maximizar a produção de moléculas nobres como XOS. Além disso será estudado o efeito da desacetilação das biomassas por meio do pré-tratamento alcalino, com a finalidade de avaliar a necessidade de empregar esta etapa prévia aos pré-tratamentos dos resíduos.

2.4.1.1. Pré-tratamento hidrotérmico (PTH)

O pré-tratamento hidrotérmico é um processo amplamente utilizado para aumentar a digestibilidade da celulose contida nos materiais lignocelulósicos. Esse processo é similar ao tratamento por explosão a vapor, uma vez que a biomassa é desestruturada utilizando como meio reacional água quente ou vapor saturado (RODRIGUES et al., 2017). O pré-tratamento hidrotérmico também é chamado de auto-hidrólise, água quente (LHW), pré-hidrólise e hidrotermólise (GARROTE; DOMÍNGUEZ; PARAJO, 1999; ZHAO; ZHANG; LIU, 2012).

As condições de operação reportadas na literatura variam de 120 a 260 °C e tempos reacionais entre 3 a 120 min. Estes parâmetros influenciam o tipo e quantidade de açúcares formados na reação (BRODEUR et al., 2011; WAN; LI, 2011; XIAO et al., 2014).

Vários tipos de biomassa incluindo resíduos agrícolas e florestais, apresentam na sua composição química ácidos orgânicos especialmente ácido acético, os quais são liberados durante o pré-tratamento atuando como catalisadores na reação e facilitando a hidrólise das hemiceluloses (GALBE; ZACCHI, 2010; GARROTE; DOMÍNGUEZ; PARAJO, 1999; MOSIER et al., 2005a). No pré-tratamento hidrotérmico cerca de 40 a 60% da biomassa é solubilizada, com 4 a 22% da celulose, e quase toda a fração hemicelulósica é hidrolisada principalmente na forma de oligômeros na fração líquida. A formação de monômeros a partir das hemiceluloses podem ser limitadas mantendo o pH entre 4 e 7 (MOSIER et al., 2005a). Enquanto a lignina é parcialmente despolimerizada, não sendo possível obter a deslignificação completa dessa fração utilizando apenas água na reação (GARROTE; DOMÍNGUEZ; PARAJO, 1999; ZHAO; ZHANG; LIU, 2012).

Desta maneira, o pré-tratamento hidrotérmico se caracteriza por atingir quase a completa solubilização das hemiceluloses com mínima formação de compostos inibitórios no material pré-tratado, o que possibilita maiores rendimentos do processo (SUN et al., 2016). A área superficial e a porosidade do material são aumentados, facilitando a acessibilidade das enzimas à estrutura da celulose contida na fração sólida pré-tratada (ZENG et al., 2007).

Do ponto de vista ambiental e econômico, este processo apresenta benefícios em comparação com outros tipos de pré-tratamento, uma vez que não requer adição de agentes químicos para o tratamento da biomassa, os quais deveriam ser recuperados ou neutralizados para o desenvolvimento das posteriores etapas. Assim sendo, são geradas menores quantidades de resíduos de neutralização em comparação com outras técnicas. Além disso, neste processo as condições de pH no meio reacional são mais brandas, o que minimiza os problemas de corrosão e diminui os requerimentos de sistemas de reatores de alto custo (BRODEUR et al., 2011; TAHERZADEH; KARIMI, 2008).

O pré-tratamento hidrotérmico vem ganhando atenção e na literatura são reportados diversos trabalhos que utilizam está tecnologia na conversão da biomassa lignocelulósica. MOSIER et al., (2005b), avaliou o pré-tratamento hidrotérmico da palha de milho em faixas temperatura de 170 °C a 200 °C, intervalo de tempo de 5 a 20 min, e suspensão de sólidos de

16%. As condições ótimas do processo foram encontradas a 190°C em 15 min, a solubilização da biomassa foi de 40%, o conteúdo de açúcares recuperados foi de 43,59% de xilana+galactana 33,51% de arabinanas; 7,66% de arabinose; 5,71% de glucanos; 1,83% de xilose+galactose e 0,26% de glicose.

O pré-tratamento hidrotérmico de cavacos de *Eucalyptus globulus* é reportado em trabalhos realizados por ROMANÍ et al., (2010). Os experimentos foram feitos em temperaturas entre 195 e 250 °C, com carga de sólidos de 1: 8 m/m. O hidrolisado obtido a 195 °C resultou na maior obtenção de XOS (13,8 g/L). A concentração de oligômeros diminuiu com o aumento da severidade do pré-tratamento, enquanto a quantidade de xilose e produtos de degradação aumenta. Nas condições mais severas (220 °C, 230 °C, 240 °C e 250 °C) as concentrações de XOS corresponderam a 2,86 g/L, 0, 923 g/L, 0,318 g/L e 0,018 g/L respectivamente. A máxima concentração de xilose (8,97 g/L) foi encontrada em 210 °C, esse conteúdo diminuiu para 0,637 g/L na temperatura de 250 °C, os maiores conteúdos de HMF (3,02 g/L) e furfural (3,53 g/L) foram obtidos também nessa faixa.

No estudo conduzido por MILESSI et al., (2021) sobre o uso do PTH do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de XOS, foram avaliados intervalos de temperatura de 155 °C e 195 °C e tempos de reação de 10 e 20 min, a carga de sólidos foi fixada em 1:10 m/v. Observou-se que as maiores concentrações de XOS foram obtidas nas temperaturas de 185 °C e 195 °C com tempos de 10 min, alcançando valores de 9,2 g/L e 11,3 g/L, respectivamente. Em contrapartida, o uso de 195 °C por 20 min resultou em concentrações significativamente menores de XOS, de apenas 0,3 g/L. A formação de monômeros e produtos de degradação aumentou com o aumento da severidade do processo, atingindo valores de até 6,4 g/L de xilose, 0,48 g/L de HMF e 4,50 g/L de furfural.

De acordo com os trabalhos reportados pela literatura é possível verificar que sob condições brandas no pré-tratamento hidrotérmico os XOS encontram-se mais disponíveis no hidrolisado hemicelulósico. Com tudo, utilizando condições mais severas, a estrutura da celulose torna-se mais acessível ao ataque enzimático, uma vez que parte da blindagem da biomassa lignocelulósica é removida.

2.4.1.2. Pré-tratamento com ácido diluído (PTD)

No pré-tratamento com ácido são utilizados ácidos fortes para quebrar a estrutura rígida dos materiais lignocelulósicos, sendo estes: ácido clorídrico (HCl), ácido fosfórico (H_3PO_4), ácido nítrico (HNO_3) e principalmente o ácido sulfúrico (H_2SO_4) (BRODEUR et al., 2011). Os tratamentos com ácidos podem ser realizados a baixas temperaturas e maiores concentrações de ácido (pré-tratamento com ácido concentrado), ou, pelo contrário, utilizando elevadas temperaturas e menores concentrações de ácido (pré-tratamento com ácido diluído) (TAHERZADEH; KARIMI, 2008).

O tratamento com ácido diluído vem ganhando atenção ao longo dos anos e é considerado como uns dos principais métodos para o pré-tratamento da biomassa (LOOW et al., 2016; ZHAO; ZHANG; LIU, 2012), atingindo altas percentagens de remoção da fração hemicelulósica (80 a 100%) (MOSIER et al., 2005a; SUN; CHENG, 2002). A remoção da hemicelulose incrementa a porosidade do material e facilita a posterior hidrólise do material pré-tratado. No entanto, o tratamento com ácido diluído causa pouca solubilização da lignina e da celulose, permanecendo quase intactas na fração sólida residual. Apesar disso, a estrutura da lignina é quebrada o que favorece a digestibilidade da celulose na posterior hidrólise enzimática (TAHERZADEH; KARIMI, 2008).

Em condições brandas, o pré-tratamento com ácido diluído promove a hidrólise da hemicelulose a açúcares em forma de monômeros e oligômeros (HIMMEL et al., 2007). Os oligômeros formados no pré-tratamento podem ser hidrolisados completamente a monossacarídeos, adequando as condições do processo, embora produtos de degradação são também gerados como resultado da solubilização dos oligômeros (ZHENG; PAN; ZHANG, 2009).

A formação de compostos de degradação deve ser minimizada por meio da seleção das melhores condições de pré-tratamento para atingir a máxima conversão da hemicelulose com mínima formação de inibidores (MUSSATTO, 2016). Uma vez que, condições ideias para obter a máxima solubilização das hemiceluloses podem não resultar nas condições eficientes para a posterior etapa de hidrólise enzimática (TAHERZADEH; KARIMI, 2008).

Na literatura são encontrados diversos trabalhos utilizando ácido diluído no pré-tratamento de diversas matérias primas como hardwood, softwood, resíduos de cultivos

agrícolas, culturas herbáceas e resíduos sólidos urbanos (ZHENG; PAN; ZHANG, 2009). As faixas de temperaturas do processo encontram-se principalmente entre 120 a 190 °C, utilizando uma concentração de ácido entre 0,1 a 1% (TAHERZADEH; KARIMI, 2008), com tempos de reação de minutos a 1 hora (GALBE; ZACCHI, 2007).

A produção de furfural a partir de madeira de E. globulus pré-tratada com ácido diluído foi estudado por LÓPEZ et al., (2014). As condições de operação analisadas foram temperatura 130, 150 e 170 °C; tempo de 30, 45 e 60 min; concentração de ácido de 0,5%, 1,25% e 2% de ácido sulfúrico; a carga de sólidos foi fixada para 8 kg de água/kg de biomassa seca para todas as condições avaliadas. Na condição de 150 °C, 30 min e 1,25% de concentração de ácido, o hidrolisado apresentou 6,93 % de XOS e 4,59% de xilose, sendo obtido neste ensaio a maior solubilização da xilana presente da biomassa em forma de oligômeros de xilose. Entretanto, as condições ótimas encontradas pelos autores foram 170 °C, 30 min e 2% de ácido para obter a maior concentração de furfural e xilose e menores concentrações de oligômeros, sendo o alvo daquele estudo.

KABEL et al., (2007) analisou o efeito da severidade do pré-tratamento com ácido diluído na solubilização da xilana e a hidrólise enzimática da celulose proveniente do resíduo sólido da palha de trigo. Os ensaios foram realizados com temperatura de 160 °C a 200 °C, com intervalos de tempo de 1 min a 35 min e concentração de ácido sulfúrico de 0 a 2,5 %, a carga de sólidos foi de 1/10 g/g (biomassa/água deionizada) para todas as condições. Foi observado que com o aumento do fator de severidade, quantidades menores de xilana são liberadas no resíduo sólido pré-tratado e maior conteúdo de xilana de baixo GP (< 9) são encontradas no hidrolisado hemicelulósico, assim como, a maioria dos XOS formados no hidrolisado não apresentaram ramificações de arabinose.

Já para CARA et al., (2008), o pré-tratamento com ácido diluído para posterior conversão em açúcares fermentescíveis a partir dos resíduos de poda de oliveira foram avaliados nas faixas de temperatura de 170 °C até 210 °C e concentração de ácido sulfúrico de 0,2 a 1,4%, o tempo utilizado foi de 10 min para todos os ensaios. A maior conversão da hemicelulose (83%) a monômeros de xilose, galactose, arabinose e manose foi obtida a 170 °C com 1% de ácido. Ao passo que, o conteúdo dos inibidores no hidrolisado foi de 4,2% (ácidos acético e fórmico, furfural e HMF).

Em síntese, no pré-tratamento com ácido diluído, condições severas de processo e altas concentrações de ácido podem promover a formação de produtos de degradação assim como ter efeitos sobre a hidrólise da celulose (STEINBACH; KRUSE; SAUER, 2017; SUN; CHENG, 2002). Em comparação com o pré-tratamento com ácido concentrado, o uso de ácido diluído apresenta benefícios em relação ao menor consumo de reagentes; menor formação de HMF e furfural; menor demanda de energia para recuperação do ácido e menores problemas relacionados com a corrosão dos equipamentos (ALVIRA et al., 2010; CANETTIERI et al., 2007; LOOW et al., 2016; MUSSATTO, 2016). O pH do hidrolisado obtido no processo deve ser ajustado antes de ser utilizado como meio nos processos de fermentação para evitar inibição dos microrganismos (MOSIER et al., 2005a).

2.4.1.3. Pré-tratamento alcalino

A remoção dos grupos acetila, pode ser realizada por meio do pré-tratamento alcalino, efeito conhecido como desacetilação da biomassa (INALBON; MOCCHIUTTI; ZANUTTINI, 2009). Em condições brandas, a maioria dos grupos acetila das hemiceluloses são removidos junto com uma pequena fração da lignina. Entretanto, sob condições mais severas o tratamento alcalino promove a deslignificação extensiva do material (CASTRO et al., 2017; LIMA et al., 2018a), o que facilita a hidrólise das hemiceluloses e celulose nos sequentes processos. Além disso, o uso de agentes alcalinos no pré-tratamento da biomassa permite a expansão das fibras e aumento da porosidade da biomassa (CARVALHO et al., 2015).

No pré-tratamento alcalino são utilizadas várias bases incluindo o hidróxido de sódio (NaOH), hidróxido de cálcio ($Ca(OH)_2$), hidróxido de potássio (KOH) e hidróxido de amônio (NH_4OH). O NaOH é o agente mais utilizado nesse pré-tratamento devido à alta capacidade de deslignificação, sendo um parâmetro essencial para atingir alta digestibilidade da biomassa (SINGH; SUHAG; DHAKA, 2015; ZHENG; PAN; ZHANG, 2009). A efetividade desse tratamento varia de acordo com o tipo de biomassa e as condições do processo. De acordo com ZHENG; PAN; ZHANG, (2009), o pré-tratamento alcalino tem se mostrado mais efetivo em madeiras folhosas, culturas herbáceas e em resíduos agrícolas com baixo conteúdo de lignina, em comparação com madeiras coníferas com alto teor de lignina.

As condições empregadas em meio alcalino oferecem vantagens em comparação com outros métodos de pré-tratamentos. Isso ocorre porque os tratamentos realizados em condições

mais brandas ocorrem em faixas de temperatura e pressão mais baixas, embora exijam longos períodos de tempo durante a reação (MOSIER et al., 2005a). Além disso, requer o uso de equipamentos menos complexos. Após a etapa de desacetilação, os açúcares permanecem na forma de polissacarídeos na fração sólida, resultando em uma baixa formação de produtos de degradação para as etapas subsequentes (BRODEUR et al., 2011; LIMA et al., 2018a).

A desacetilação do bagaço e palha da cana-de-açúcar foi estudada por LIMA et al., (2018a). Os experimentos foram realizados nas temperaturas de 55, 70 e 85°C; com concentração de NaOH de 0,1, 0,4 e 0,7% (m/m) e tempo de reação de 1, 3 e 5h. Para os testes, 25 g de biomassa e 300 mL de solução alcalina, representado uma carga de sólidos de 1:12 (g/mL), foram adicionados ao reator de 0,5 L. Os autores encontraram uma remoção de grupos acetila de aproximadamente 90% para ambas as biomassas, a lignina atingiu uma remoção de 20% para o bagaço e 30% para a palha de cana. Enquanto, na remoção de xilanas e glicanas, o tratamento alcalino apenas apresentou remoção na palha de cana com aproximadamente 20% de solubilização desses componentes e as cinzas apresentaram uma remoção entre 15% e 13% para o bagaço e palha, respectivamente.

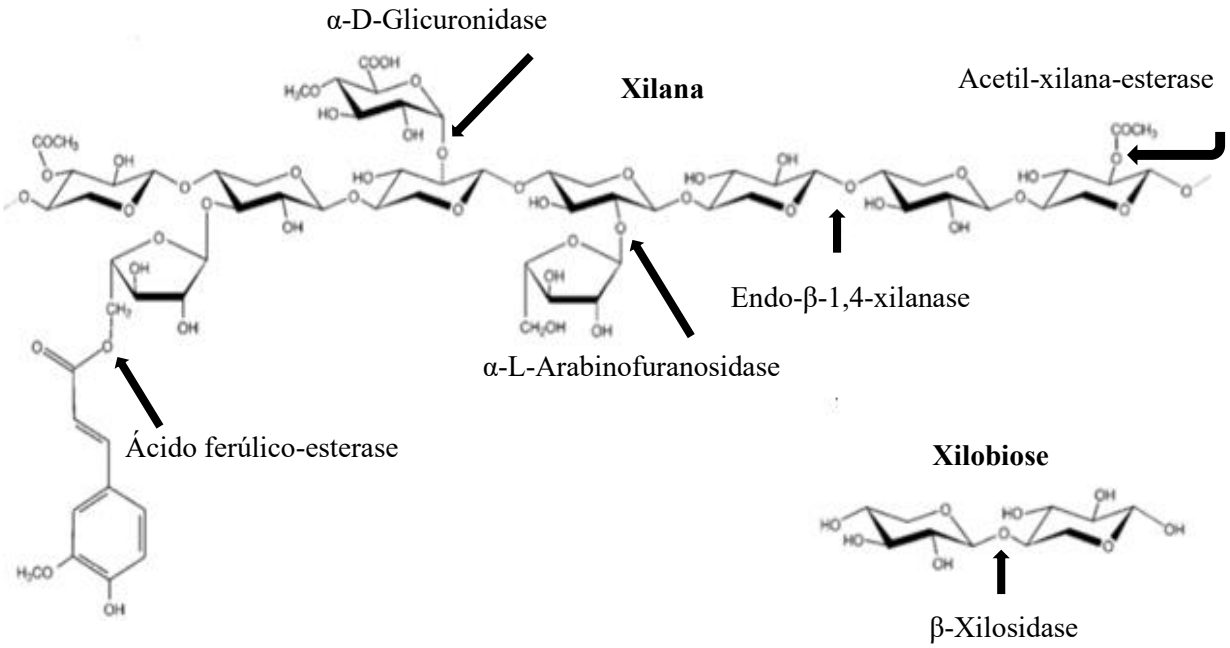
2.5. Hidrólise enzimática

Após o pré-tratamento, a biomassa lignocelulósica tem sua estrutura físico-química modificada. Em condições adequadas os açúcares são liberados da fração hemicelulósica e disponibilizados na forma de XOS de diferentes tamanhos de cadeia e na sua unidade monomérica (ZHANG; XU; YU, 2017). Os XOS de menor GP (2 e 3) são considerados moléculas mais atraentes devido ao seu potencial prebiótico e propriedades biológicas. Sendo assim, é necessário o uso de enzimas capazes de degradar a cadeia da xilana em oligômeros de menor GP, devido às diversas aplicações destes compostos (CARVALHO et al., 2018; UÇKUN KIRAN; AKPINAR; BAKIR, 2013).

As xilanases são enzimas que atuam no fracionamento da cadeia da xilana, dependendo do mecanismo de ação podem se dividir em dois grupos: endo e exo-enzimas. As endo-enzimas atuam na degradação da cadeia principal da xilana em XOS e xilose. Neste grupo encontram-se as endo-1,4-β-xilanases consideradas o maior grupo de enzimas hidrolíticas, as quais hidrolisam a fração da xilana em XOS de diferentes GP. Já a β-xilosidase hidrolisa as extremidades não redutoras dos XOS para a formação de xilose. O mecanismo de ação das exo-

enzimas é a hidrólise das ramificações da cadeia, sendo as α-L-arabinofuranosidase, α-glicuronidase, acetilxilana esterase, esterase de ácido ferúlico e de ácido ρ-cumárico alguns exemplos. As arabinofuranosidases removem os grupos substituintes de arabinose; α-glicuronidase removem os ácidos glicurônicos; as esterases hidrolisam as ligações ésteres da cadeia de xilana, removendo grupos como ácido acético, ácido ferúlico e ρ-cumárico (LINARES-PASTEN; ARONSSON; KARLSSON, 2018; RASHID; SOHAIL, 2021). A Figura 12 representa a estrutura da xilana e os pontos da cadeia onde as diferentes enzimas xilanases atuam na sua degradação.

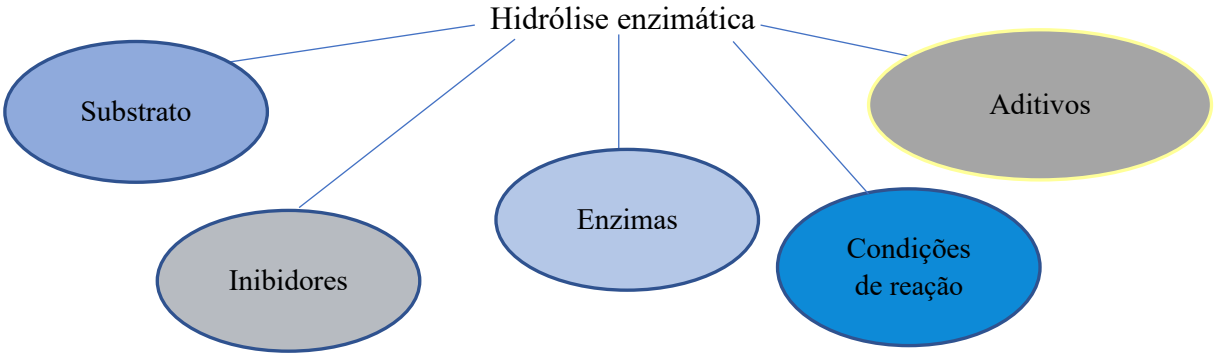
Figura 12. Ação enzimática na cadeia da xilana.



Fonte: Adapato de (WU et al., 2017).

Algumas das características das xilanases são alta especificidade, elevado poder catalítico, hidrólises de substratos em condições brandas de reação, perdas de substrato não significativas e ausência de produtos de degradação da cadeia da xilana (CHAPLA et al., 2013; MALGAS et al., 2019). A eficiência da hidrólise enzimática pode ser afetada por diversos fatores os quais estão descritos na Figura 13.

Figura 13. Fatores que afetam a hidrólise enzimática.



Fonte: Adaptado de (AMIT et al., 2018).

Os fatores que afetam a hidrólise enzimática relacionados com o substrato estão associados diretamente com a composição físico-química da biomassa e com o pré-tratamento empregado. Quantidades significativas de lignina e os sítios cristalinos da celulose promovem a recalcitrância da biomassa, atuando como uma barreira ao ataque enzimático. Outros fatores como o tamanho de partícula, GP, aumento da área superficial e carga de sólidos também podem limitar a eficiência da conversão de substrato em produto pela via enzimática (ALVIRA et al., 2010; AMIT et al., 2018).

O pré-tratamento é uma etapa crucial já que afeta de maneira direta a eficiência da hidrólise enzimática, pois o complexo lignina-carboidrato deve ser desconstruído para facilitar a exposição da fração da xilana e assim facilitar a acessibilidade das enzimas ao substrato (ANTOV; ĐORĐEVIĆ, 2017). Após o pré-tratamento da biomassa alguns compostos de degradação são formados, concentrações consideráveis destes compostos podem ter efeito inibitório na hidrólise enzimática (AMIT et al., 2018; ROHMAN; DIJKSTRA; PUSPANINGSIH, 2019). No entanto, altas concentrações de monômeros, dissacarídeos e oligômeros podem causar também inibição (Tabela 4).

Tabela 4. Inibição de enzima por altas concentrações de açúcares no HH.

Microrganismo	Concentração de açúcar no hidrolisado	Efeito	Referência
Bacillus subtilis M015	3 g/L de xilose	45% de inibição da β-xilosidase	(BANKA; ALBAYRAK GURALP; GULARI, 2014)
Lactobacillus brevis ATCC 14869	15 g/L de xilose	20% de inibição da β-xilosidase	(MICHLMAYR et al., 2013)
Geobacillus thermoleovorans IT-08	3,67 g/L de X2 e 2,07 g/L de X3	Completa inibição da β-1,4-xilosidase	(ROHMAN et al., 2018)

Fonte: Autor, 2023.

Os fatores referentes à enzima estão relacionados com a dosagem enzimática, o tipo de sinergia e o reciclo da enzima. A dosagem de enzima depende do substrato, da sua composição e do tipo de pré-tratamento empregado para sua obtenção (AMIT et al., 2018). Substratos resultantes de pré-tratamentos com baixa severidade podem conter altas concentrações de lignina, o que pode dificultar a hidrólise das partes digestíveis, limitando a taxa de conversão enzimática. Isso implica maior dosagem enzimática e uso de diferentes tipos de enzimas para a degradação eficiente do substrato (ALVIRA et al., 2010).

A eficiência da bioconversão do substrato em produtos de interesse pode ser aumentada pela combinação adequada de enzimas na hidrólise enzimática e pelo tipo de sinergia do consórcio de enzimas utilizado (LINARES-PASTEN; ARONSSON; KARLSSON, 2018). A quantidade de enzima necessária na hidrólise é um parâmetro crítico, devido a seu alto custo. Nesse sentido, estratégias como a recuperação da enzima e seu posterior reciclo, o aumento gradual da carga de substrato ou hidrolisado, e a redução da formação de compostos inibitórios pela continua remoção do produto são métodos que podem contribuir para a otimização do processo e redução de custos (AMIT et al., 2018; VAN DYK; PLETSCHKE, 2012).

Da mesma forma, trabalhar em condições ideais de temperatura, pH e agitação na hidrólise enzimática são aspectos relevantes na conversão do substrato. As enzimas atuam eficientemente em condições especificas de temperatura e pH. Neste sentido, otimizar estes parâmetros pode aumentar o rendimento da conversão, bem como, resultar em um processo de conversão mais econômico. Pelo contrário, condições ineficientes de temperatura e pH pode gerar uma maior demanda de enzima para atingir o mesmo rendimento na conversão do substrato em produtos desejáveis, aumentando assim os custos do processo (AMIT et al., 2018; DE FREITAS; CARMONA; BRIENZO, 2019).

O uso de aditivos, por exemplo, surfactantes Tween 20, Tween 80, Triton X-100, polímeros sintéticos como PEG-4000, PEG-6000 e proteínas (albumina do soro bovino, BSA) podem aumentar o rendimento da hidrólise enzimática, aumentar a acessibilidade da enzima ao substrato para sua posterior conversão e aumento da estabilidade da enzima (ROCHA-MARTÍN et al., 2017; VERGARA et al., 2021).

2.5.1. Xilanase

As enzimas endo-1,4-β-xilanases (EC 3.2.1.8) são capazes de quebrar aleatoriamente as ligações glicosídicas do tipo β-(1,4) dentro da cadeia da xilana, em monômeros de xilose e XOS de menor GP (DE FREITAS; CARMONA; BRIENZO, 2019). A enzima pode ser produzida a partir de fontes microbianas e plantas, de acordo com as semelhanças nas sequências de proteínas, a base de dados Carbohydrate Active Enzymes (CAZy) agrupa as xilanases em diferentes grupos de famílias GH, como por exemplo, GH8, GH10, GH11, GH30, GH43 e GH51 (MATHEW; KARLSSON; ADLERCREUTZ, 2017; WALIA et al., 2017).

As endoxilanases estão agrupadas principalmente nas famílias GH10 e GH11. Estes dois grupos diferem no mecanismo de ação e na especificidade de substrato e vem sendo estudados na produção de XOS (RASHID; SOHAIL, 2021). As endoxilanases GH10 possuem a capacidade de produzir XOS de menor GP, já que quebram principalmente XOS com GP ≥ 4, em comparação com as da família GH11 que atuam em XOS com GP ≥ 5. Os produtos hidrolíticos pelas endoxilanases GH10 são X2, X3, porém também podem ser detectados xilose e xilopentose (X5). Já as GH11 produzem XOS com GP entre 2 e 6 e ausência de xilose na maioria das vezes (CAPETTI et al., 2021; DE FREITAS; CARMONA; BRIENZO, 2019).

Além disso, as GH10 têm a capacidade de hidrolisar xilanas ramificadas, produzindo XOS com grupos substituintes no terminal não redutor da cadeia. No entanto, apresentam maior afinidade com xilana não substituída e solúvel. Já as GH11 conhecidas como as xilanases verdadeiras, hidrolisam a xilana insolúvel, e são altamente ativas em regiões não ramificadas da xilana (MALGAS et al., 2019). Ou seja, as endoxilanases da família GH10 tem maior tolerância a grupos laterais na cadeia da xilana, requerendo só duas unidades consecutivas de xilose não ramificadas para poder quebrar a ligação glicosídica. Entretanto, as pertencentes a família GH11 necessitam de pelo menos três unidades consecutivas de xilose sem grupos substituintes para hidrolisar a cadeia principal da xilana (BIELY; SINGH; PUCHART, 2016).

Existe um grande interesse na produção da xilanase devido ao seu amplo emprego industrial, incluindo aplicações nos setores de papel e celulose, biocombustíveis, na indústria têxtil, e alimentícia (GOWDHAMAN; PONNUSAMI, 2015; UÇKUN KIRAN; AKPINAR; BAKIR, 2013). Só para ilustrar, na indústria de papel a enzima xilanase é utilizada para melhorar a qualidade do papel pelo processo de branqueamento da polpa. Em comparação com o processo de branqueamento convencional, o uso da enzima diminui o impacto ambiental neste processo, uma vez que reduz o uso de agentes químicos que finalmente seriam liberados ao ambiente (RODRIGUES, 2016).

Em processos de conversão da biomassa lignocelulósica, a xilanase é utilizada na etapa de hidrólise enzimática para a solubilização da xilana em oligômeros e monômeros como precursores de produtos de valor agregado (XOS, xilitol, xilose, biocombustíveis líquidos, entre outros) derivados de diferentes origens de biomassa vegetal (CAPETTI et al., 2021; EL ENSHASY et al., 2016; LIAVOGA; BIAN; SEIB, 2007; UÇKUN KIRAN; AKPINAR; BAKIR, 2013). Entretanto, no setor de alimentos a enzima é utilizada em diferentes processos, como: na panificação, se usa para melhorar a qualidade da massa; na fabricação de bebidas, a xilanase é utilizada na etapa de clarificação de sucos de fruta; na indústria cervejeira, é usada para aumentar a filtrabilidade do mosto; no processamento do café é empregada para a remoção da mucilagem do grão despolpado; na fabricação de ração animal, se utiliza para aumentar a digestibilidade e absorção dos nutrientes (GOWDHAMAN; PONNUSAMI, 2015; UÇKUN KIRAN; AKPINAR; BAKIR, 2013).

As aplicações da xilanase na indústria tem aumentado com o tempo, aumentando sua demanda e o crescimento no mercado. Atualmente, o mercado global da enzima se encontra avaliado entre 200 e 300 milhões de dólares e se estima que esse valor chegue a atingir 500

milhões de dólares para 2023 (CHADHA et al., 2019). Alguns dos fornecedores comerciais da enzima são MEGAZYME, NZYTech e PROZOMIX ("Carbohydrate Active Enzymes (CAZy)").

A evolução da biotecnologia ampliou o espectro de usos da xilanase, mostrando um papel importante tanto na produção de derivados de alto valor agregado a partir de recursos renováveis de baixo custo, quanto em processos já estabelecidos em diferentes setores industriais (UÇKUN KIRAN; AKPINAR; BAKIR, 2013). Por conseguinte, existe um interesse em desenvolver pesquisas que otimizem os processos de obtenção da enzima, os quais possam atender às crescentes necessidades do mercado (CHADHA et al., 2019). Existem diferentes metodologias para aumentar a produção enzimática e obter enzimas mais favoráveis para seu uso na indústria. Algumas incluem a otimização dos parâmetros operacionais para atingir maiores rendimentos da produção da enzimática e o uso de cepas geneticamente modificadas capazes de secretar altas quantidades da enzima (EL ENSHASY et al., 2016).

2.5.2. Produção de xilanases microbianas

As xilanases podem ser isoladas a partir de diferentes fontes microbianas como bactérias, fungos e leveduras. As espécies de fungos mais utilizadas para a produção da xilanase são Aspergillus, Trichoderma e Penicillum (MALGAS et al., 2019). Já as cepas de bactérias mais reportadas na literatura para a produção da xilanase são Bacillus e Clostridium (LINARES-PASTEN; ARONSSON; KARLSSON, 2018).

Do ponto de vista industrial, os fungos filamentosos secretam a enzima extracelularmente e apresentam maior produção da enzima em comparação com outras espécies de microrganismos como bactérias e leveduras. Além disso, algumas espécies têm a capacidade de produzir enzimas auxiliares, requeridas para quebrar as cadeias laterais da xilana, desramificando as xilanas com grupos substitutos (CHAPLA et al., 2013; EL ENSHASY et al., 2016; NIETO-DOMÍNGUEZ et al., 2017).

Os avanços tecnológicos no campo da biologia molecular e a engenharia genética têm permitido o desenvolvimento de técnicas que melhorem a qualidade e o rendimento da produção enzimática, por meio do ajuste de características específicas das cepas de microrganismos (RODRIGUES, 2016). Um desses métodos empregados são a tecnologia do DNA recombinante, que permite a expressão em maiores quantidades da enzima alvo em

hospedeiros pela expressão homologa ou heteróloga. Os fungos filamentosos *Aspergillus* e *Trichoderma* são amplamente empregados como hospedeiros para a produção de xilanases recombinantes (EL ENSHASY et al., 2016; JUTURU; WU, 2012).

A produção da xilanase é realizada pela fermentação de microrganismos que secretem a enzima. Esta fermentação pode ser do tipo fermentação em estado sólido (FES) ou a fermentação submersa (FSm) (WALIA et al., 2017). Em comparação com a FSm, a FES apresenta certas vantagens como por exemplo: baixa ou pouca atividade aquosa, requer do uso de substratos mais simples, permitindo assim o uso de resíduos agroindustriais de diferente natureza como meio de cultivo, menores necessidades de água, energia e de processos de esterilização e alta produção volumétrica. Estes fatores resultam em menores investimentos operacionais, sendo um processo fermentativo mais econômico do que a FSm (BHARGAVA et al., 2008; RODRIGUES, 2016).

No entanto, a FES depende de muitos fatores para obter uma produção adequada da enzima, tais como: tipo de microrganismo, quantidade de inóculo, tipo de substrato e seu pré-tratamento, tamanho de partícula, pH, temperatura, tempo de cultivo, oxigenação do meio e atividade aquosa do substrato a qual afeta a produção de esporos e metabolitos secretados. Já a FSm os fatores mais críticos que afetam a produção da enzima são pH, temperatura, O_2 dissolvido e agitação (EL ENSHASY et al., 2016; RODRIGUES, 2016; WALIA et al., 2017).

Além disso, a FSm permite um maior controle de contaminação e dos parâmetros do processo (pH, temperatura, agitação, aeração), o que facilita manter as condições ótimas de crescimento do microrganismo e a homogeneidade ao longo da fermentação. Portanto, a recuperação do produto alvo e sua purificação são mais fáceis (SOCCOL et al., 2017). As bases tecnológicas deste método fermentativo se encontram bem estabelecidas, o que facilita seu dimensionamento a escala industrial, a maioria dos processos fermentativos para a produção comercial da xilanase é realizado mediante a FSm (EL ENSHASY et al., 2016; HANSEN et al., 2015; RAVINDRAN; JAISWAL, 2016). A Tabela 5 apresenta alguns trabalhos reportados na literatura com o uso de fungos para a produção da xilanase utilizando diferentes substratos na FSm.

Tabela 5. Obtenção de xilanases a partir de fungos filamentosos por FSm.

Microrganismo	**Substrato**	**pH**	**Temperatura (°C)**	**Atividade enzimática (U/mL)**	**Tempo de cultivo (h)**	**Referência**
Aspergillus fumigatus R1	Casca de trigo	n.r	37	152	96	(JAGTAP et al., 2017)
Aspergillus nidulans KK-99	Farelo de trigo	10	37	40	144	(TANEJA; GUPTA; CHANDER KUHAD, 2002)
Aspergillus niger BCC14405	Farelo de trigo, soja e farelo de arroz	6	30	89,5	168	(KHONZUE et al., 2011)
Aspergillus niger SS7	Casca de sabugo de milho	7	43	294	120	(BAKRI et al., 2020)
Penicillium canescens F58	Birchwood	6,5	30	54,01	120	
Talaromyces amestolkiae	Beechwood	5,6	26 - 28	~ 85	72	(NIETO-DOMÍNGUEZ et al., 2017)

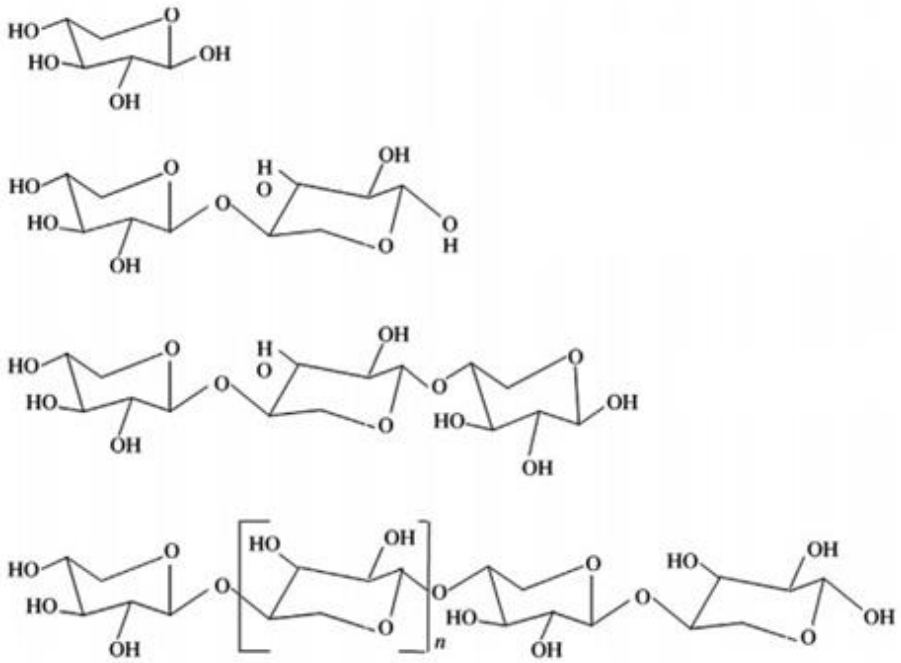
n.r: não reportado.
Fonte: Autor, 2023.

2.6. Xilooligossacarídeos

Os xilooligossacarídeos (XOS) são oligômeros derivados da hidrólise da xilana, constituídos por unidades de xilose conectados por ligações β-1,4 (OTIENO; AHRING, 2012a). De acordo com o método empregado para sua produção e a fonte de extração da xilana, as estruturas dos XOS variam no GP, nas unidades monoméricas e grupos substituintes como acetila, ácidos urônicos e fenólicos (AACHARY; PRAPULLA, 2011; SINGH; BANERJEE; ARORA, 2015).

Os XOS que apresentam baixa massa molecular, são açúcares intermediários entre polissacarídeos e monossacarídeos (PATEL; GOYAL, 2011), não são digeríveis, são não-cancerígenos e vem ganhando importância uma vez que são considerados como fibras alimentares com potencial prebiótico (CARVALHO et al., 2013; GULLÓN et al., 2011). Geralmente, sua estrutura é formada por cadeias curtas de 2 a 10 unidades de xilose como ilustrado na Figura 14. No entanto, moléculas com GP ≤ 20 também são considerados como XOS (SINGH; BANERJEE; ARORA, 2015; VÁZQUEZ et al., 2000).

Figura 14. Estrutura da xilose e XOS.



Fonte: Adaptado de (AHMAD; ZAKARIA, 2019).

Esses compostos podem ser empregados para diversas finalidades baseados na sua atividade biológica, propriedades prebióticas e efeitos na saúde, com potencial aplicação na obtenção de produtos cosméticos, farmacêuticos, alimentícios e agrícolas (CAPETTI et al., 2021; VÁZQUEZ et al., 2000).

Os prebióticos são ingredientes alimentares não digeríveis pelo sistema digestivo e chegam intactos ao intestino grosso, onde são degradados pela microbiota intestinal e apresentam benefícios para o hospedeiro (GIBSON et al., 2004; MOURE et al., 2006). Como resultado, promovem o crescimento de bactérias do cólon que geram produtos de fermentação, como ácido fólico, vitamina B_{12} (AHMAD; ZAKARIA, 2019; DEGUCHI; MORISHITA; MUTAI, 1985) e ácidos de graxos de cadeia curta, os quais diminuem o pH do cólon e inibem o crescimento de microrganismos patógenos (SAMANTA et al., 2015).

A importância dos XOS para o mercado é devido às suas propriedades prebióticas, além de conferir características organolépticas aos alimentos, como sabor e aroma. Podem ser aplicados como aditivos de alimentos funcionais (PARAJÓ et al., 2004), que atuam no crescimento seletivo de bactérias no cólon como Bifidobactérias e *Lactobacillus*, as quais são responsáveis por manter uma microbiota intestinal saudável (MOURE et al., 2006). Ademais, apresentam capacidade para suprimir o crescimento de bactérias como *Clostridium* e mostram ação bacteriostática contra o *Vibrio anguillarum* (IZUMI; AZUMI, 2001; apud VÁZQUEZ et al., 2005).

O GP dos XOS é também considerado em trabalhos reportados na literatura. Porém, não existe um consenso sobre qual faixa de GP apresenta maior atividade prebiótica. Segundo REDDY; KRISHNAN, (2016), os XOS com GP de 1 a 6 são benéficos para serem utilizados para aplicações prebióticas. Por outro lado, outros trabalhos ressaltam o uso de XOS com GP de 2-3, pois estimulam o crescimento de Bifidobactérias (GULLÓN; GONZÁLEZ-MUÑOZ; PARAJÓ, 2011; JAYAPAL et al., 2013; JIANG et al., 2004).

2.6.1. Produção de XOS a partir de resíduos lignocelulósicos

Os XOS podem ser obtidos a partir de diversas matérias primas lignocelulósicas, as quais se destacam hardwoods (madeira de bétula, madeira de faia), bagaços e palhas de cana, cascas de arroz e farelo de trigo, espigas de milho, talo de algodão (cotton stalks), talo de tabaco (tobacco stalks) e palha de trigo (QING et al., 2013; VÁZQUEZ et al., 2000). A madeira de

eucalipto também tem sido explorada para produção destas biomoléculas (GARROTE; DOMÍNGUEZ; PARAJO, 1999; GULLÓN et al., 2011; PARAJÓ et al., 2004; VÁZQUEZ et al., 2005), as quais tem apresentado potencial para serem fermentadas por bactérias benéficas do trato gastrointestinal (KABEL et al., 2002).

Os XOS são encontrados principalmente no hidrolisado do pré-tratamento. As metodologias empregadas na sua produção basicamente incluem processos químicos, enzimáticos ou a combinação deles, ou por auto-hidrólise direta a alta temperatura e pressão (SAMANTA et al., 2015) como ilustrado na Figura 15.

Figura 15. Produção de XOS a partir de materiais lignocelulósicos.

Fonte: Adaptado de (SAMANTA et al., 2015).

Para atingir altos rendimentos de XOS é essencial realizar uma etapa de desacetilação previamente ao pré-tratamento (CASTRO et al., 2017), devido, aos grupos acetila presentes nas hemiceluloses que podem ser liberados na forma de íon de acetato e dependendo da sua

concentração podem atuar como catalisador, promovendo a solubilização dos polissacarídeos em produtos de degradação (QING et al., 2013).

Os pré-tratamentos termoquímicos mais utilizados na produção dos XOS são auto-hidrólise com água quente ou vapor, processos hidrolíticos com ácidos minerais diluídos ou soluções alcalinas diluídas (QING et al., 2013).

Em processos de auto-hidrólise a reação acontece em pH ≤ 4 devido à quebra dos grupos acetila, desta maneira o conteúdo de grupos acetila das hemiceluloses, a temperatura e tempo de reação influenciam a concentração de XOS totais do processo (NABARLATZ; EBRINGEROVÁ; MONTANÉ, 2007).

Nos tratamentos com ácido diluído para produzir XOS, o ácido sulfúrico em concentrações de 0,1 a 0,5 mol/L é o mais utilizado. Nesse processo, a concentração de ácido utilizada na reação, temperatura e tempo irão afetar o GP dos XOS (AKPINAR; ERDOGAN; BOSTANCI, 2009a; QING et al., 2013). Um dos limitantes desse pré-tratamento é a formação de monômeros e furfural. Não obstante, diminuindo o tempo de reação e a concentração do ácido, pode ser controlado a formação dos inibidores e monômeros (AKPINAR; ERDOGAN; BOSTANCI, 2009a). Uma das vantagens da extração de XOS com ácido diluído é o requerimento de menores tempos de reação para atingir a mesma conversão da xilana em XOS, se comparado com outras técnicas, como por exemplo a hidrólise enzimática (AKPINAR; ERDOGAN; BOSTANCI, 2009a).

Os pré-tratamentos em soluções alcalinas geram cadeias da xilana de alto GP, portanto, requerem um posterior tratamento podendo ser ácido diluído ou enzimático, para obter oligômeros com menor tamanho de cadeia (VÁZQUEZ et al., 2000). Embora, meios extremamente alcalinos, os grupos acetila e ácidos urônicos podem ser removidos da biomassa, mas a hemicelulose pode sofrer despolimerização, o que pode afetar o rendimento da produção desses oligossacarídeos (NABARLATZ; EBRINGEROVÁ; MONTANÉ, 2007).

Os XOS também podem ser obtidos por tratamentos enzimáticos. No entanto, a solubilização da xilana a oligossacarídeos deve ser feita em dois estágios, primeiramente uma etapa química e em seguida a hidrólise enzimática, pois o complexo lignina-carboidrato limita a degradação da xilana, já que apresenta resistência ao ataque enzimático (AKPINAR; ERDOGAN; BOSTANCI, 2009a).

Dessa forma, a massa molecular dos XOS contidos nos hidrolisados obtidos por processos de pré-tratamento são afetados pelo grau de severidade do processo (SABIHA-HANIM; NOOR; ROSMA, 2011). Diferentes tipos de GP podem ser obtidos dependendo do tipo de pré-tratamento utilizado para sua extração (BRAGATTO; SEGATO; SQUINA, 2013). Assim sendo, a estrutura, o GP e o rendimento dos XOS dependem do tipo de biomassa e os métodos de extração utilizados para sua produção (AHMAD; ZAKARIA, 2019).

A produção de XOS por meio de auto-hidrólise de madeira de eucalipto foi estudada por GARROTE; DOMÍNGUEZ; PARAJO, (1999), em temperatura de 145, 160, 175 e 190 °C, por tempo de 0 a 7,5 h e variação de carga de sólidos de 6 a 10 kg de água/kg de biomassa seca. A recuperação de xilanas incluindo xilose e XOS aumentaram com a temperatura (71,5% a 80,1%), a variação na carga de sólidos não teve influência significante na solubilização da xilana e a maior concentração de XOS (19 g XOS/kg licor) foi encontrada a 175 °C por 18,2 min. Entretanto, foi observado que a concentração de HMF e furfural foi maior com o aumento da temperatura e o tempo. Com relação a carga de sólidos, afetou a geração de inibidores nos maiores tempos de retenção.

O efeito do pré-tratamento sequencial foi avaliado por VÁZQUEZ et al., (2005) na etapa de purificação do hidrolisado obtido por auto-hidrólise. A primeira etapa foi feita para retirar os compostos extrativos da biomassa em temperaturas de 130 até 165 °C, e a segunda etapa visou solubilizar a hemicelulose em faixas de temperatura de 200 a 212°C. No primeiro pré-tratamento, a concentração de grupos acetila da biomassa diminuiu e tanto o rendimento do processo quanto a conversão das xilanas aumentaram com o aumento da severidade do processo. Na segunda fase, as maiores concentrações de XOS foram obtidas a 203°C para todas as biomassas pré-tratadas na etapa anterior. Sendo assim, os autores observaram que por meio do pré-tratamento sequencial os compostos extrativos foram removidos facilmente na primeira etapa. Entretanto, esse método promoveu a decomposição parcial da hemicelulose e da lignina, o que resultou na fragmentação de polímeros suscetíveis a degradação em condições mais severas de processo. Devido a isto, o pré-tratamento sequencial teve maior efeito nos compostos eliminados do que com o grau de purificação atingido.

O pré-tratamento com ácido diluído e hidrotérmico da palha de cana energia desacetilada foram empregados para produção de XOS por BAZETTO, (2018). No pré-tratamento hidrotérmico, as temperaturas estudadas foram de 190 até 210 °C e tempos de 5 a 30 min. Já a hidrólise ácida diluída foi analisada em temperaturas de 170 a 190 °C por 5, 10 e

15 min, e concentração de H_2SO_4 de 0; 0,2 e 0,4 % v/v. A carga de sólidos no meio foi de 10 % m/m, utilizando 25 g de biomassa em solução de ácido diluído ou água deionizada. No pré-tratamento hidrotérmico (10 min a 190 °C) foi encontrada a máxima recuperação de XOS e esse valor atingiu 88,9% (10,5 g/L) com GP de X2 a X6, já a arabinose e oligômeros de arabinose foi 12,7%, a xilose foi de 2,4% e 0,7% corresponderam a furfural. No tratamento com ácido diluído, aproximadamente 80% da xilana foi solubilizada em forma de monômeros. Nos ensaios a 190°C por 15 min na ausência de ácido, a concentração de XOS encontrada foi de 8,6 g/L o que representou 75,6% da recuperação da xilana em oligômeros de xilose.

Os processos de produção de XOS por diferentes rotas químicas ou enzimáticas, requerem uma etapa de purificação da xilana extraída, para remover os monossacarídeos e outros compostos indesejáveis e obter a maior quantidade de XOS com o GP adequados para sua aplicação industrial (VÁZQUEZ et al., 2005). Algumas técnicas de purificação são: extração com solvente (etanol, acetona, 2-propanol), adsorção (carvão ativado, argila ácida e materiais sintéticos porosos), separação por coluna cromatográfica, separação por membranas (ultrafiltrarão e nanofiltração). A escolha do tipo de metodologia empregada na etapa de purificação deve ser eficiente em termos de alta purificação, econômica e ambientalmente favorável (BURUIANĂ; CAMELIA VIZIREANU, 2014; MOURE et al., 2006; QING et al., 2013).

2.6.2. Aplicação de XOS

Os XOS foram incorporados no mercado pelo Japão, sendo o país pioneiro em aproveitá-los como prebióticos em produtos alimentícios. Em 2001 foram produzidos mais de 100 produtos que continham XOS como ingrediente em sua composição, alguns deles com caráter prebiótico (AHMAD; ZAKARIA, 2019; VÁZQUEZ et al., 2000). Atualmente esse país é o maior produtor e consumidor de XOS no mundo. Algumas das empresas japonesas produtoras de XOS são Longlive, Henan e HFsugar, entre outras (PINALES-MÁRQUEZ et al., 2021).

A procura por produtos relacionados com a saúde na dieta tem aumentado, chamando a atenção por prebióticos no setor de alimentos funcionais ao redor do mundo (SAMANTA et al., 2015; ZHAO et al., 2017). Em 2017, o mercado mundial de ingredientes prebióticos foi estimado em US$ 4,07 bilhões (MARKETSANDMARKETS^{TM}, 2018) e para 2024 prevê-se

que esse valor seja de US$ 7,11 bilhões (RASHID; SOHAIL, 2021). Nos últimos anos, a demanda pela obtenção de novos tipos de prebióticos como XOS tem aumentado (CARVALHO et al., 2013). O preço comercial dos XOS vaia entre 25 US$/kg a 200 US$/kg, dependo da sua pureza, sendo este valor maior em comparação com outros tipos de oligossacarídeos (SINGH; BANERJEE; ARORA, 2015; TRAMONTINA et al., 2023). Para 2023, é esperado que os XOS atinjam 130 milhões de dólares no mercado de alimentos prebióticos (PINALES-MÁRQUEZ et al., 2021; THE MARKET REPORTS, 2018).

Os XOS possuem diversos efeitos benéficos relacionados com sua ingestão na dieta alimentar, além do estímulo da flora intestinal seletiva (OTIENO; AHRING, 2012a). Desta maneira, o consumo controlado de XOS tem impacto positivo nas funções fisiológicas da saúde humana, entre elas encontram-se: redução do colesterol (AKPINAR; ERDOGAN; BOSTANCI, 2009b), evitar doenças intestinais como gastrite, tem propriedades antialérgica, antimicrobiana, anti-infeciosa e antioxidante (AACHARY; PRAPULLA, 2009; GUPTA et al., 2018; MOURE et al., 2006).

Em estudo anterior os XOS mostraram a capacidade de melhorar a estrutura microbiana do intestino e aumentar a proporção de microrganismos produtores de ácidos graxos de cadeia curta, aumentando assim os níveis destes ácidos, importantes para manter a saúde intestinal. Nesse estudo, os XOS mostraram um efeito positivo no alívio da inflamação do cólon, provocado pelo consumo de alimentos ricos em gordura o que induz a obesidade, doença que afeta aproximadamente dois bilhões de pessoas no mundo e aumenta o risco de câncer (FEI et al., 2020).

Em testes *in vitro,* os XOS mostraram capacidade de reduzir o crescimento de linhas celulares de leucemia (ANDO et al., 2004), aliviar o estresse e reduzir sintomas associados a doenças como o câncer (SAMANTA et al., 2015), diminuir o risco de câncer de cólon (KABEL et al., 2002) e exibiram efeitos positivos em tratamentos de diabetes mellitus tipo 2 (SHEU et al., 2008).

Na indústria de alimentos, os XOS apresentam propriedades químicas e biológicas adequadas para sua utilização, como por exemplo: odor, sabor e cor aceitáveis, são hipocalóricos, o que permite sua utilização em dietas anti-obesidade (VÁZQUEZ et al., 2000). Além disso, apresentam resistência aos ácidos e ao calor, podendo ser utilizados na produção de sucos de baixo pH e bebidas carbonatadas (MODLER, 1994). Nas propriedades biológicas,

pode-se citar as suas propriedades anti-cariogênicas, prebióticas, melhora dos lipídios séricos e glicemia (NAKAKUKI, 2002). A X2 tem ganhado destaque para ser utilizado como ingrediente ativo em produtos alimentares, pois apresenta maior efeito adoçante, equivalente a 30% da sacarose, em comparação com outros tipos de XOS (VÁZQUEZ et al., 2000).

Assim como no trato gastrointestinal existem diversos microrganismos que fazem parte da microflora do intestino, a pele humana é também coberta por uma comunidade diversificada de microrganismos, sendo a segunda microbiota mais abundante do corpo humano. Quando o equilíbrio entre os microrganismos comensais e patógenos é alterado, o sistema imunológico do hospedeiro é afetado, favorecendo o desenvolvimento de microrganismos patogênicos (CAPETTI et al., 2021) e, portanto, o surgimento de doenças, como por exemplo dermatites atópica, rosácea e acne (BUSTAMANTE et al., 2020).

A aplicação de prebióticos na pele ainda é pouco explorado, na literatura são poucos os trabalhos focados nos efeitos do uso tópico dos prebióticos (CAPETTI et al., 2021). Uma vez que a definição de prebiótico se encontra mais relacionada aos benefícios gastrointestinais. Porém, o conceito prebiótico foi recentemente redefinido, ganhando novos espaços para aplicações extra intestinais (AMORIM et al., 2019).

Em formulações cosméticas, a definição de prebiótico encontra-se mais relacionada com o uso de carboidratos (frutooligossacarídeos, XOS, isomalto-oligossacarídeos, lactossacarose, rafinose, entre outros) que ajudam a restaurar ou manter o crescimento de microrganismos benéficos para a saúde da pele (AL-GHAZZEWI; TESTER, 2014).

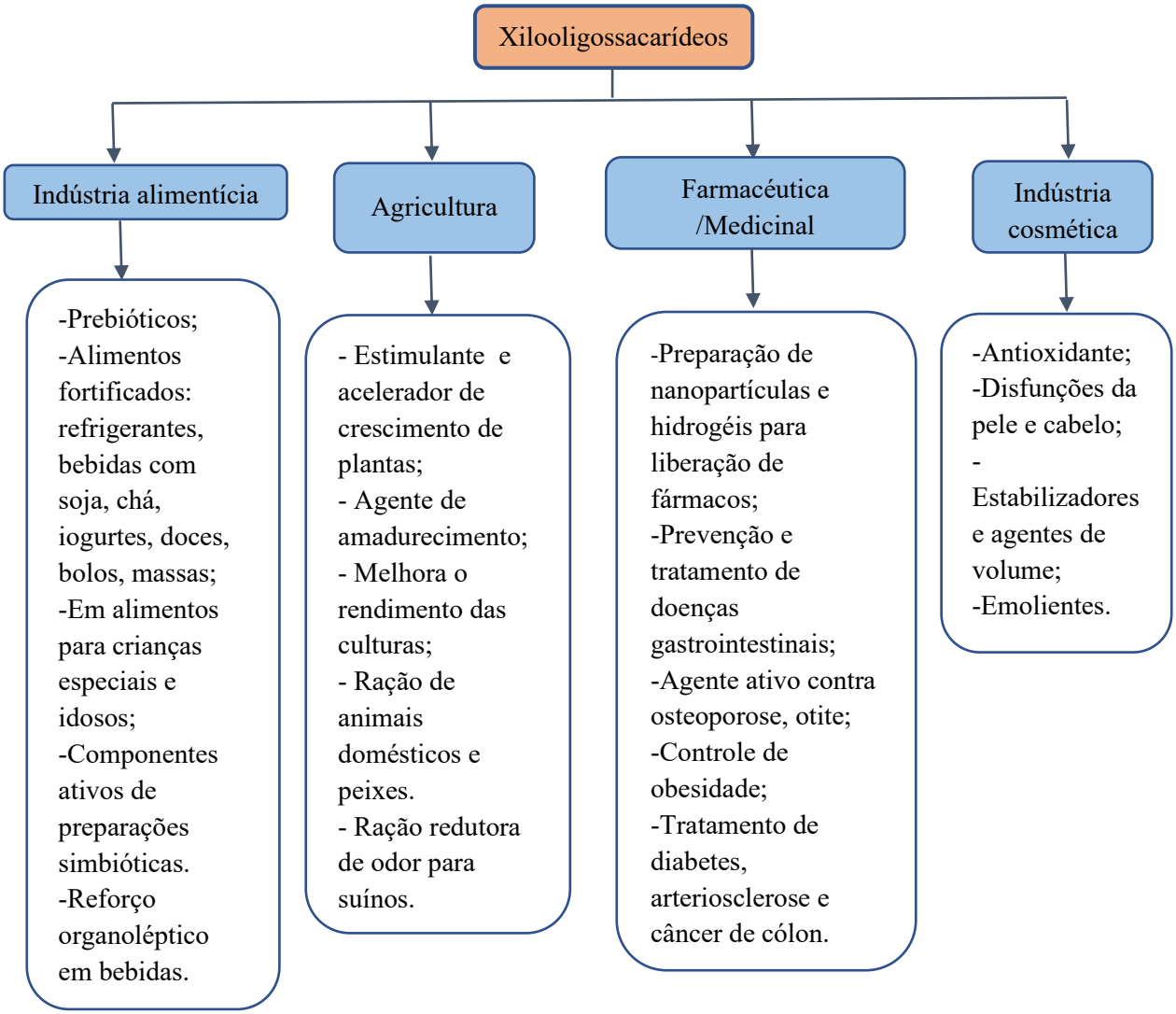
No entanto, além de sua propriedade prebiótica, os XOS apresentam outras características interessantes para serem utilizados na indústria cosmética, estes incluem: o efeito hidratante, estabilizante, a capacidade antioxidante e emulsificante. Alguns dos benefícios dermatológicos são o efeito anti-inflamatório, ajuda a aliviar a irritação, promove a hidratação, melhora as propriedades reológicas e de resistência da pele (AMORIM et al., 2019; CAPETTI et al., 2021).

No mercado de cuidados para a pele existe uma gama de produtos que contêm prebióticos e/ou probióticos. Porém, esse mercado tem uma abordagem mais focada na ingestão destes ingredientes ativos do que na sua aplicação tópica. Alguns dos produtos disponíveis no mercado que contêm nas suas formulações um destes ingredientes ativos ou a preparação

simbiótica são em forma de cremes e loções para o tratamento e na prevenção de doenças da pele, como erupções cutâneas, dermatite seborreica, coceira, e alguns são direcionados para o cuidado das mãos e unhas contra bactérias (AL-GHAZZEWI; TESTER, 2014).

Em síntese, os XOS são biomoléculas versáteis apontando diversas utilidades em diferentes áreas. Para exemplificar, a Figura 16 descreve algumas das suas aplicações, como na produção de alimentos, na indústria de cosméticos, usos medicinais e no setor agrícola (AHMAD; ZAKARIA, 2019; GUPTA et al., 2018; SAMANTA et al., 2015; VÁZQUEZ et al., 2000).

Figura 16. Aplicações de XOS em diferentes setores industriais.



Fonte: Autor, 2023.

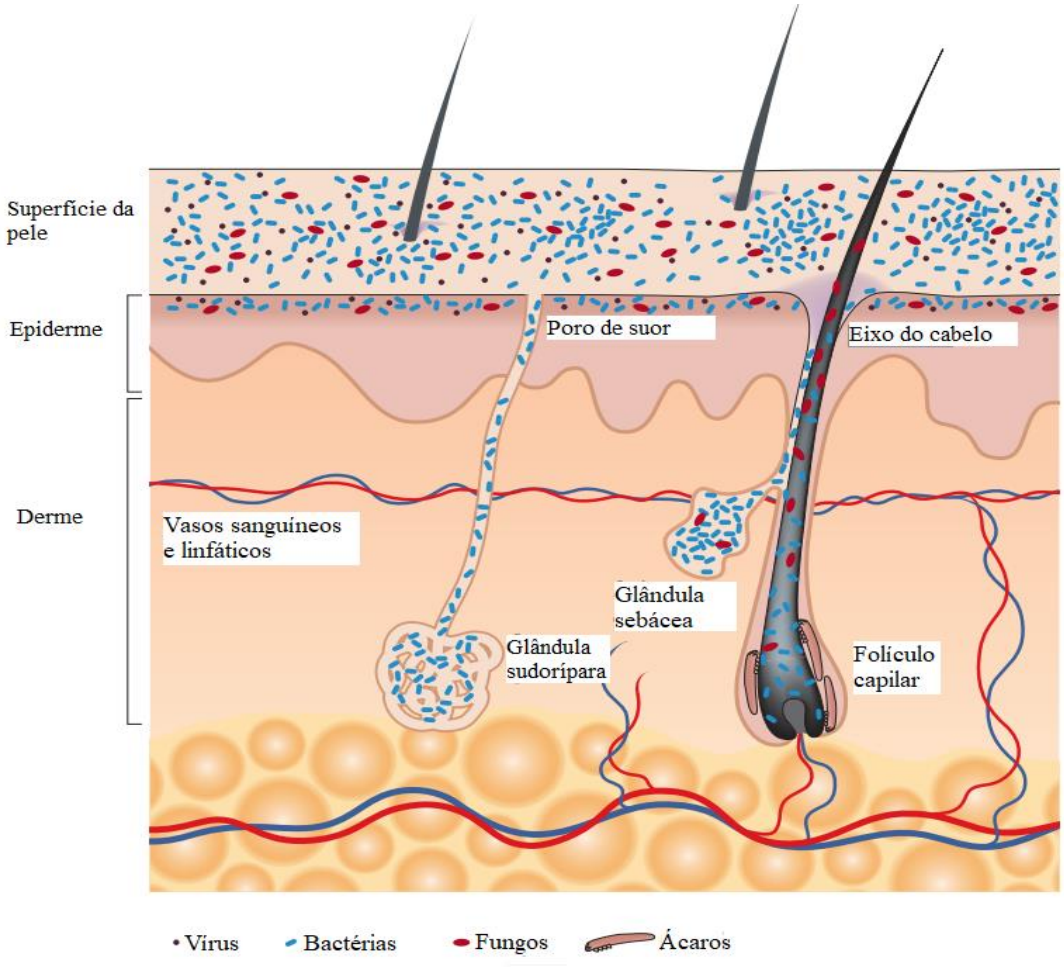
Apesar da crescente demanda dos XOS, seus múltiplos benefícios para a saúde e suas diversas aplicações na indústria, o seu custo de produção ainda é relativamente alto (OTIENO; AHRING, 2012b; VÁZQUEZ et al., 2000) e um dos motivos é o fato da xilana comercial ter um elevado custo e ser de difícil obtenção. Portanto, a produção dos XOS a partir de resíduos lignocelulósicos, representa uma oportunidade para obter hidrolisados ricos em xilanas que diminuam seu custo de produção, uma vez que são matérias primas abundantes e de baixo custo (AMORIM et al., 2019; PATEL; GOYAL, 2011). Além disso, um dos métodos para aumentar a produção de compostos de alto valor agregado, como XOS, seria desenvolver tecnologias mais eficientes, aplicando estratégias de integração de processos que possam ser incluídos sob o conceito de biorrefinaria (ÁLVAREZ et al., 2017; AMORIM et al., 2019; CARVALHEIRO et al., 2016; QING et al., 2013).

2.7. Microbiota da pele

A pele é o maior órgão a qual cobre todas as partes do corpo humano, sua principal função é de proteger o corpo contra agentes externos, atuando como uma barreira física resistente contra substâncias tóxicas e a colonização de microrganismos patógenos, os quais podem causar potenciais danos ao indivíduo. Também tem outras funções essenciais como ajudar a regular a temperatura corporal e auxiliar no armazenamento de lipídios e água (BUSTAMANTE et al., 2020; LOLOU; PANAYIOTIDIS, 2019).

A Figura 17 ilustra as camadas da pele, vista em corte transversal, e os tipos de microrganismos que conformam sua microbiota. A estrutura da pele se encontra composta por duas camadas principais, uma camada externa chamada de epiderme, a qual é formada por queratinócitos conhecidos como escamas. Estas escamas são constituídas por fibrilas de queratina as quais se dispõem em forma de tijolos para conformar o tecido cutâneo. A pele tem a capacidade de se renovar, com isso, estas escamas são constantemente eliminadas. Na camada da epiderme se encontram os poros de suor, o eixo do cabelo, as glândulas sebáceas, sudoríparas, as unhas e pelos. Já a segunda camada, a camada interna, é nomeada de derme e é formada por fibras de colágeno e elastina. A derme tem a funcionalidade de fornecer resistência e elasticidade à pele. Nesta camada se encontram os vasos sanguíneos, os vasos linfáticos, o folículo capilar, como também as glândulas sudoríparas e sebáceas (GRICE; SEGRE, 2011; LAI-CHEONG; MCGRATH, 2013).

Figura 17. Camadas e microrganismo da pele.



Fonte: Adaptado de (GRICE; SEGRE, 2011).

Devido a sua estrutura em camadas e à exposição de fatores ambientais, a pele é um sistema complexo e dinâmico, colonizado por um ecossistema diverso de microrganismos. Porém, essa colonização varia dependendo da parte do corpo e das características da pele, o que fornece diferentes microambientes para o crescimento seletivo dos microrganismos (AL-GHAZZEWI; TESTER, 2014).

Baseados nas características da pele, os locais do corpo podem ser ambiente úmido, sebáceos ou oleosos e o ambiente seco. Nesse sentido, as glândulas sebáceas, sudoríparas e os folículos capilares influenciam as características e funcionalidades desses ambientes. Por exemplo, em ambientes úmidos as glândulas sudoríparas ajudam na termorregulação por meio da evaporação da água. Nesse processo a pele é acidificada, inibindo a colonização de alguns microrganismos. Por outro lado, o suor contém moléculas antimicrobianas como ácidos graxos

livres e peptídeos. Em ambientes oleosos, as glândulas sebáceas secretam lipídeos formando uma capa protetora para o cabelo e à pele contra certos agentes microbianos (BYRD; BELKAID; SEGRE, 2018).

Entre os organismos que compõem a microbiota da pele, existe uma forte relação simbiótica, a qual ajuda a conformar o sistema imunológico do corpo. A microbiota da pele além de ajudar na produção de compostos antimicrobianos, responsáveis por proteger o corpo contra infeções, auxilia na ativação de processos de sinalização e na modulação da resposta à infecção (LOLOU; PANAYIOTIDIS, 2019).

Como ilustrado na Figura 17 a microbiota é composta por bactérias, fungos, vírus e ácaros. Estas espécies podem ser residentes ou transitórias. Os microrganismos residentes estão aderidos constantemente à superfície da pele e são capazes de sobreviver e se reproduzir nesse ambiente. Esses microrganismos apresentam uma relação simbiótica com o indivíduo, tendo como funcionalidades inibir microrganismos patógenos e processar ácidos graxos livres, proteínas e sebo da pele. Em contraste, os microrganismos transitórios permanecem por breves períodos e são depositados na pele devido ao contato com agentes externos e são conhecidos como espécies contaminantes capazes de produzir doenças. Eles possuem pouca ou nenhuma capacidade de crescimento e colonização, sendo eliminados da pele por meio de procedimentos de limpeza e o uso de sustâncias antimicrobianas (AL-GHAZZEWI; TESTER, 2014; BUSTAMANTE et al., 2020).

A estabilidade da pele depende da interação entre os tipos de microrganismos presentes na microbiota e sua relação com o hospedeiro. Da mesma forma, fatores como: genética, idade, dieta, hormônios, conteúdo de água, lipídeos, proteínas, pH, temperatura, umidade, teor de sebo, higiene, uso de maquiagem, tipo de roupas e exposição à luz influenciam na população de microrganismos que podem colonizar à pele e conformar sua microbiota (AL-GHAZZEWI; TESTER, 2014; BYRD; BELKAID; SEGRE, 2018).

As bactérias que compõem a microbiota da pele pertencem principalmente aos filos Actinobactéria, Firmicutes, Proteobactéria e Bacteroidetes. Nesse sentido, alguns dos microrganismos presentes na pele que faz parte da microbiota residente são pertencentes às bactérias *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*), *Staphylococcus hominis (S. hominis), Staphylococcus haemolyticus (S. haemolyticus), Staphylococcus capitis (S. capitis), Corynebacterium simulans (C. simulans), Dermatobacter, Brevibacterium, Propionibacterium*

acnes (P. acnes), *Propionibacterium avidum* (*P. avidum)*, *Propionibacterium granulosum (P.granulosum), Micrococci luteus (M. luteus), Acinetobacter,* e fungos como *Malassezia furfur (M. furfur).* Enquanto os microrganismos transitórios pertencem aos gêneros de *Staphylococcus aureus (S. aureus), Bacillus, Escherichia coli (E. coli), Streptococcus pyogenes (S. pyogenes)* e *Pseudomonas aeruginosa (P. aeruginosa)* (AL-GHAZZEWI; TESTER, 2014; BYRD; BELKAID; SEGRE, 2018; FOURNIÈRE et al., 2020).

2.7.1. *Staphylococcus epidermidis*

A *S. epidermidis* é uma das bactérias mais comuns presentes na microbiota saudável da pele humana e das membranas mucosas. Esta espécie é uma bactéria Gram-positiva e esférica. A bactéria pertencente ao gênero Staphylococcus, à família Staphylococcaceae e ao filo de Firmicutes, aeroanaeróbia facultativa e coagulase negativa. As condições de faixa de crescimento são temperatura entre 30 a 37 ºC e pH entre 4,2 a 7,9 (FOURNIÈRE et al., 2020; PODGÓRSKA; KĘDZIA, 2018).

Esta bactéria tem uma função importante no ecossistema da pele, pois ajuda a prevenir o desequilíbrio da microbiota, promovendo o crescimento da microbiota benéfica e protegendo contra a colonização de patógenos, como por exemplo *S. aureus* e *Streptococcus* do grupo A. Além disso, ajuda ao mecanismo de homeostase da pele, secretando metabolitos benéficos para manter o funcionamento do corpo (FOURNIÈRE et al., 2020; GRICE; SEGRE, 2011), os quais incluem ácidos orgânicos e glicerina, compostos que ajudam a manter baixa acidez na superfície da pele, favorecem a retenção de umidade e melhoram a textura áspera da pele (NODAKE et al., 2015).

A *S. epidermidis* tem a capacidade de crescer em diferentes microambientes, portanto se encontra tanto nas regiões secas quanto nas úmidas, sebáceas e nos pés (BYRD; BELKAID; SEGRE, 2018). Por ser uma bactéria anaeróbia facultativa, pode sobreviver e se reproduzir tanto na superfície da pele quanto em ambientes com a disponibilidade de oxigênio reduzido, como, por exemplo, nos folículos capilares (PODGÓRSKA; KĘDZIA, 2018).

Além disso, a *S. epidermidis é* capaz de se adaptar as alterações físico-químicas do ambiente, portanto em condições saudáveis a *S. epidermidis* é inofensiva. Porém, em ambientes hostis, a bactéria sofre uma alteração no seu metabolismo, convertendo-a em um microrganismo patógeno oportunista formando biofilmes, responsáveis de afetar a homeostase da microbiota

dérmica e o surgimento de afeções da pele. Em ambientes hospitalares, esta bactéria está altamente relacionada com infecções de cânulas e implantes em pacientes. (CLAUDEL et al., 2019; FOURNIÈRE et al., 2020; PODGÓRSKA; KĘDZIA, 2018; SEVERN; HORSWILL, 2022).

Recentemente no ramo da dermatologia e na indústria cosmética despertou-se o interesse em aumentar pesquisas sobre a microbiota da pele e seu efeito na saúde. Uma vez que está diretamente relacionado ao equilíbrio ou distúrbio entre o indivíduo e o ecossistema de microrganismos que habitam a pele. Portanto, a utilização de ingredientes ativos e compostos que promovam a viabilidade e reprodutibilidade de microrganismos benéficos, reduzindo suas formas patogênicas, são um objetivo para o desenvolvimento de novos produtos cosméticos e de cuidado para a pele. Alguns desses ingredientes podem ser prebióticos, probióticos e produtos residuais produzidos pela fermentação dos probióticos (FOURNIÈRE et al., 2020).

Em conclusão parcial, este segundo capítulo permitiu a contextualização da indústria de eucalipto e a geração de resíduos gerados no corte e colheita das árvores. Ademais, o aproveitamento destes materiais lignocelulósicos por meio de processos de conversão química (pré-tratamento alcalino e ácido diluído), físico-químico (pré-tratamento hidrotérmico) e por rota biológica (hidrólise enzimática), para a obtenção de bioprodutos como XOS, os quais possuem alto valor agregado no mercado prebiótico.

CAPÍTULO III

3. PRODUÇÃO DE XOS A PARTIR DE GALHOS E CASCAS DE EUCALIPTO POR DIFERENTES TIPOS DE PRÉ-TRATAMENTO

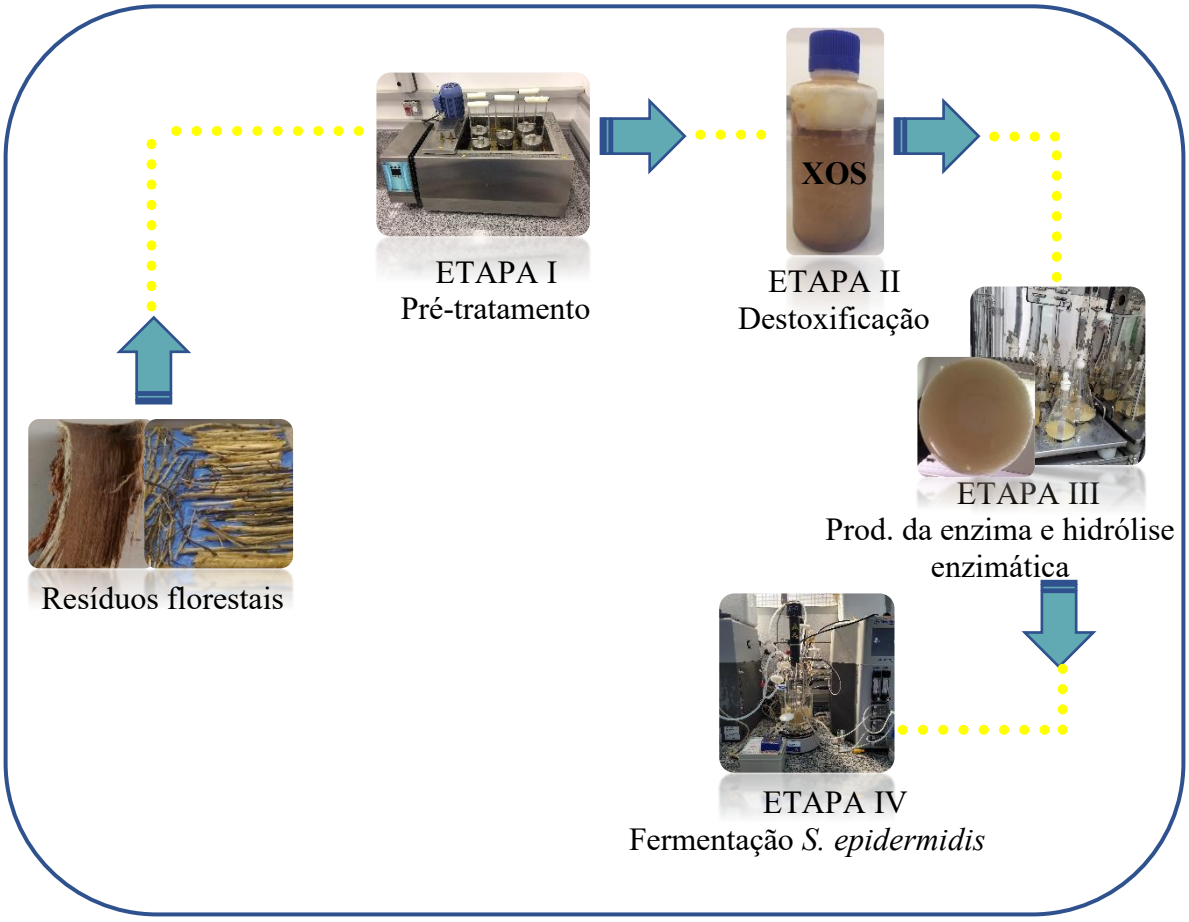
3.1. Introdução

Os XOS são naturalmente presentes nos tecidos vegetais, mas em menor abundância se comparados aos principais polissacarídeos, como celulose e hemicelulose. O pré-tratamento da biomassa lignocelulósica possibilita a conversão da hemicelulose em diferentes oligossacarídeos. Contudo, a concentração e a estrutura das cadeias variam de acordo com o método de pré-tratamento empregado e as condições do processo (QING et al., 2013).

Nesse contexto, o Capítulo III investigou o impacto de diferentes abordagens de pré-tratamento em galhos e cascas de eucalipto, com o objetivo de aumentar a produção de XOS. A eficiência dos pré-tratamentos foi avaliada em diferentes condições reacionais. Além disso, foi analisada a cinética do pré-tratamento e as mudanças estruturais nos resíduos após a etapa de pré-tratamento, proporcionando uma maior compreensão da conversão dos galhos e cascas, evidenciando o potencial para a obtenção de biocompostos, como os XOS, a partir de uma matéria-prima altamente disponível.

Este trabalho está inserido no projeto temático da FAPESP /BBSRC *"An integrated approach to explore a novel paradigm for biofuel production from lignocellulosic feedstocks"* (processo: 15/50612-8). A Figura 18 apresenta a metodologia geral do projeto, dividida em quatro etapas, que envolveram a produção de XOS por meio do pré-tratamento dos resíduos de eucalipto e sua posterior hidrólise enzimática para obtenção de XOS de baixa massa molar pela ação da enzima recombinante endo-1,4-β-xilanases de *A. nidulans*. Finalmente, a prova de conceito foi realizada por meio da avaliação da propriedade prebiótica, por meio da fermentação do hidrolisado rico em XOS (X2+X3) utilizado como substrato no cultivo do *S. epidermidis.*

Figura 18. Metodologia geral do projeto.

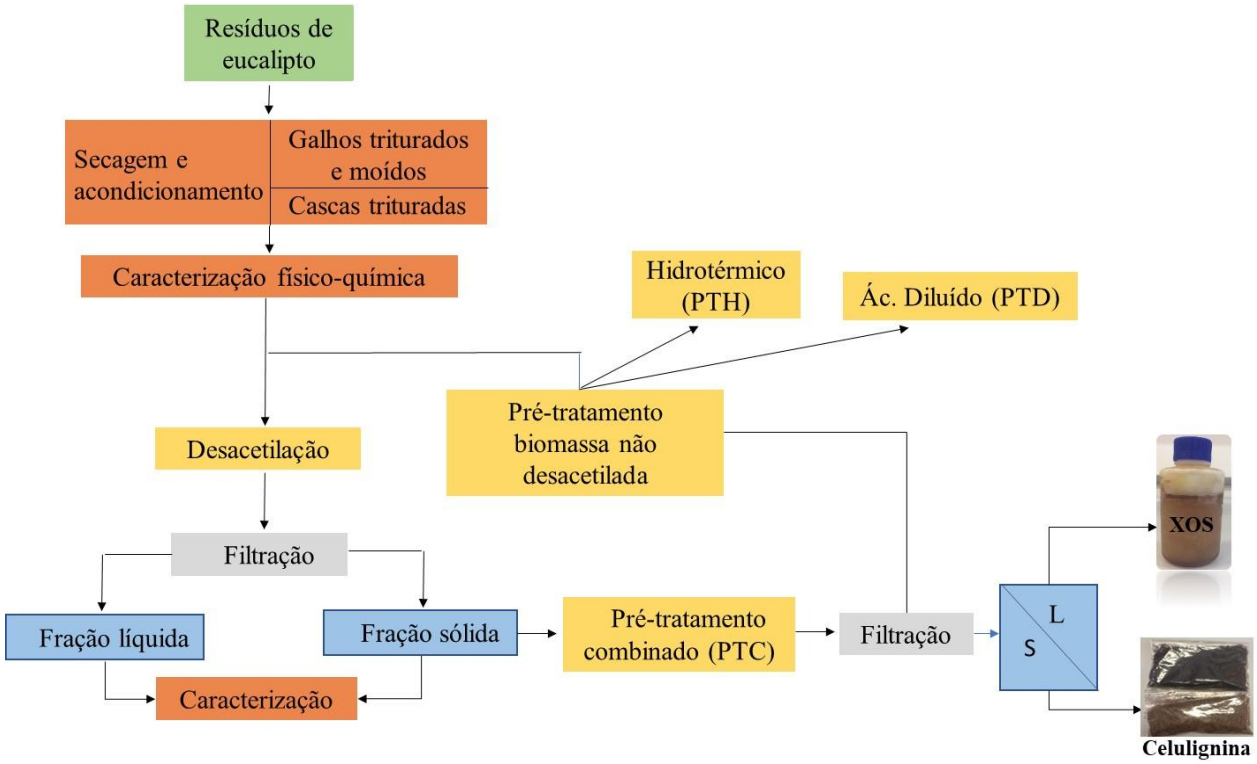


Fonte: Autor, 2023.

3.2. Materiais e métodos

A primeira etapa do projeto consistiu no acondicionamento e caracterização do material de entrada e o posterior pré-tratamento dos resíduos florestais de eucalipto. As condições de processo para obtenção de XOS foram selecionadas pela avaliação de três tipos de pré-tratamento. As correntes do processo foram caracterizadas para posterior determinação dos balanços de massa dos processos. A Figura 19 ilustra um resumo das etapas que compreendem a obtenção de XOS a partir do pré-tratamento, como também as correntes geradas em cada etapa.

Figura 19. Metodologia empregada para a obtenção de XOS a partir de galhos e cascas de eucalipto.



Fonte: Autor, 2023.

Os resíduos florestais (cascas e galhos) pertencem ao clone comercial de eucalipto 1002 (*Eucalyptus grandis*): 16 kg de galhos e 6 kg de cascas coletados no mês de fevereiro de 2018, no município São Miguel Arcanjo, São Paulo, onde se localiza o setor florestal da Suzano Papel e Celulose, diretamente do campo de plantio, após descascamento mecânico.

3.2.1. Secagem e acondicionamento da biomassa

Primeiramente a matéria-prima foi separada manualmente, pois no setor florestal não é realizada uma etapa de separação dos resíduos gerados no processo de corte e colheita da madeira. O material foi seco ao ar livre até atingir uma percentagem de umidade de 10%, para evitar a degradação por microrganismos. A seguir o material foi selecionado para retirada de resíduos contendo excesso de terra (Figura 20) e em seguida os galhos foram descascados. Posteriormente, os resíduos foram trituradas em um triturador de Resíduos Orgânicos (TR200, Trapp, Brasil) (Figura 21). Após, os galhos foram moídos em um moinho de facas equipado com uma peneira trapezoidal de abertura de malha de 1,5 mm de diâmetro. Após secagem e acondicionamento as amostras foram armazenadas em bolsas hermeticamente fechadas para

posterior caracterização e pré-tratamento, a percentagem de umidade foi monitorada trimestralmente.

Figura 20. Material com alto conteúdo de terra e descartado do projeto. a) cascas; b) galhos.

a) b)

Figura 21. Biomassa de eucalipto coletada da floresta e triturada na picadora: a) Cascas; b) galhos.

a)

b)

3.2.2. Distribuição do tamanho de partícula

A composição das biomassas in-natura foi determinada por meio de análises físico-químicas. Na caracterização física foi feita a distribuição do tamanho de partícula por análise granulométrica. Esta análise foi realizada apenas para os galhos, pois as cascas após o processo de trituração apresentaram uma textura fibrosa o que impossibilitou o peneiramento, como ilustrado na Figura 21 - a.

A análise granulométrica foi feita em agitador de peneiras mecânico (Produtest, T, Brasil). Os ensaios foram realizados em dois estágios, primeiro, utilizando peneiras da série de Tyler de ¼, 6, 10, 20, 35, 65, 150 mesh e fundo, e o segundo estágio, por meio de peneiras de

8, 10, 14, 20, 28, 35 mesh e fundo. As peneiras foram previamente pesadas e empilhadas em ordem decrescente. Amostras homogeneizadas de aproximadamente 50 g de galhos moídos foram adicionadas na parte superior da série de peneiras e agitadas durante 10 min. Em seguida, as peneiras foram pesadas e a fração mássica retida em cada peneira foi calculada.

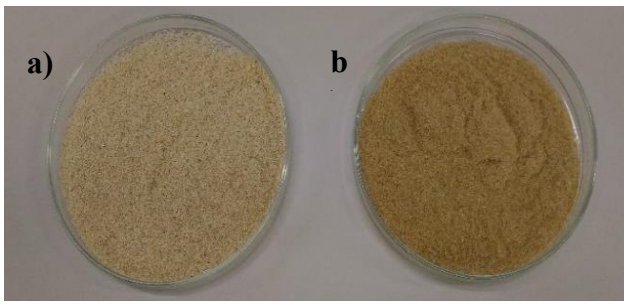
3.2.3. Preparo da biomassa para caracterização química

Para análise da composição dos galhos e as cascas, certa quantidade de cada material foi moída em moinho de facas (Marconi, MA 680, Brasil), apresentado na Figura 22.

Figura 22. Moinho de facas para processamento dos galhos e as cascas de eucalipto.

Amostras foram moídas em duas etapas, a primeira utilizando uma abertura de malha de 35 mesh, para atingir partículas menores que a 0,5 mm e posterior determinação de cinzas totais e compostos extrativos. A segunda etapa utilizou uma abertura de malha de 170 mesh na moagem da biomassa isenta de compostos extrativos, até atingir partículas inferiores a 0,08mm (Figura 23), para garantir maior área de contato com o ácido sulfúrico na digestão da amostra.

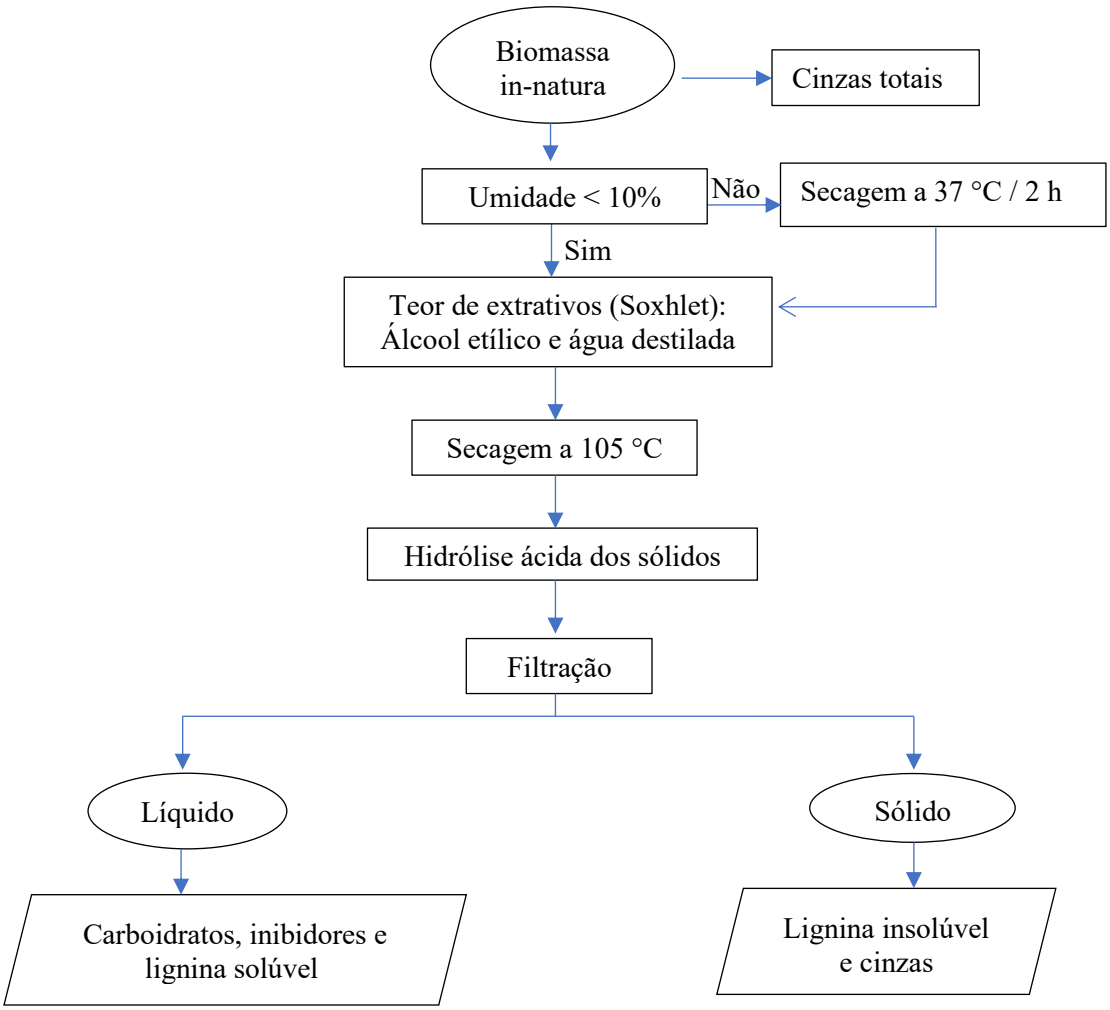
Figura 23. Resíduos de eucalipto moídos com tamanho de partícula de -170 mesh: a) Galhos; b) cascas.



3.2.4. Caracterização química da biomassa

Os procedimentos adotados para a caracterização química da biomassa são descritos na Figura 24.

Figura 24. Diagrama de processo de caracterização química das biomassas in-natura.



Fonte: Autor, 2023.

A caracterização química tem por objetivo determinar a composição do material em relação aos conteúdos de celulose, hemicelulose, lignina, extrativos e cinzas, como mostrado na Figura 24. Os procedimentos adotados seguem as normativas do NREL (*National Renewable Energy Laboratory*), ASTM *(American Society for Testing and Materials)* e de acordo com a metodologia descrita por GOUVEIA; SOUTO-MAIOR; ROCHA, (2009) para a caracterização do bagaço de cana-de-açúcar.

3.2.4.1. Determinação do teor de umidade

O teor de umidade foi determinado segundo a normativa NREL (SLUITER et al., 2008a). Amostras de 1 g de biomassa homogeneizada foram pesadas em béqueres de 50 mL previamente tarados e suas massas anotadas. As amostras foram secas em estufa a 105 ºC por 24 h. Após este período, as amostras foram resfriadas em dessecador até temperatura ambiente. Os béqueres contendo o material seco foram pesados até massa constante (mudança de ± 0,1 % na umidade atual após 1 h de reaquecimento) em balança analítica e suas massas anotadas.

O teor de umidade foi calculado como:

$$\%\, umidade = \ 100 - \left(\left(\frac{M_3 - M_1}{M_2} \right) \times 100 \right) \qquad (1)$$

M1 = massa do béquer vazio, em g;
M2 = massa da amostra úmida, em g;
M3 = massa do béquer + massa da amostra seca, em g

3.2.4.2. Determinação de cinzas totais

A metodologia empregada nesta análise foi baseada na normativa NREL (SLUITER et al., 2008b) e os procedimentos de (GOUVEIA; SOUTO-MAIOR; ROCHA, 2009). Cadinhos de porcelana de 50 mL foram levados a mufla a 800 ºC por 2 h, para eliminar resíduos remanescentes de anteriores análises. Posteriormente, os cadinhos foram transferidos para um dessecador e pesados após o resfriamento. Amostras de 1 g, em base seca (MBS) de biomassa foram pesadas em cadinhos de porcelana previamente tarados e calcinados em mufla a 400 ºC por 1 h e em seguida a 800 ºC por 2 h. Após este período, a mufla foi desligada e quando a mufla alcançou 200 ºC, os cadinhos foram transferidos para um dessecador e resfriados até temperatura ambiente. A seguir, o teor de cinzas foi determinado por pesagem e calculado como:

$$\%Cinzas\ totais\ = \frac{M_{CC} - \ M_C}{M_i} \qquad (2)$$

M_C = massa do cadinho vazio, em g;
M_{CC} = massa do cadinho com cinzas, em g;
M_i = massa da amostra inicial em base seca, em g.

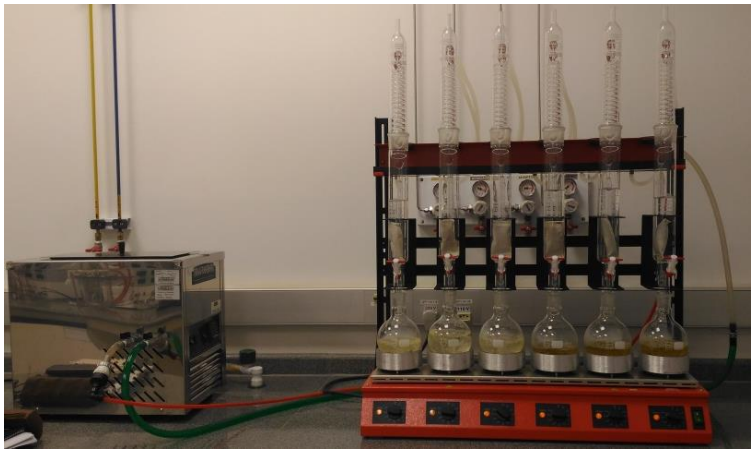
Cálculo da Massa em Base Seca da amostra (MBS):

$$MBS\ (g) = \frac{Massa_{seca\ (g)}\ x\ 100}{100 - umidade_{(\%)}} \quad (3)$$

3.2.4.3. Determinação dos compostos extrativos

O teor de extrativos foi determinado segundo a normativa NREL (SLUITER et al., 2008c) utilizando um sistema Soxhlet (Figura 25). A umidade da biomassa foi determinada de acordo com o procedimento descrito no item 3.2.4.1.

Figura 25. Sistema Soxhlet para a determinação dos compostos extrativos.



Aproximadamente 4,00 g de amostra, em base seca, foram adicionadas em cartuchos de papel filtro quantitativo, previamente secados e pesados em frascos peça filtros. Em seguida, os cartuchos foram transferidos para os tubos de extração Soxhlet. A remoção dos extrativos foi realizada em duas etapas: A primeira etapa consiste em adicionar 200 mL de uma solução de ciclohexano-etanol 1:1 (v/v) a cada balão de fundo redondo juntamente com pérolas de vidro. Em seguida, os balões foram acoplados no sistema de extração e ajustada a temperatura da manta de aquecimento (mantendo de 4 a 5 ciclos no sifão por hora), a extração foi realizada por 24 h.

A segunda etapa consistiu em adicionar 200 mL de água destilada a cada balão do extrator. Após o primeiro ciclo de extração, o material foi extraído por um período de 8 h por 5 dias, com troca de água diária. A extração foi realizada por mais 4 h para garantir a remoção de

todos os extrativos. Finalizada a etapa de extração, os cartuchos contendo os resíduos de biomassa foram transferidos para cadinhos de vidro de fundo poroso (4-5 μm) para filtração, previamente tarados. As amostras foram secas em estufa a 105 ºC até alcançar massa constante. Em seguida, os cadinhos foram resfriados em dessecador até temperatura ambiente e pesados. A quantidade de compostos extrativos foi determinada por análise gravimétrica e calculada como:

$$\%\ compostos\ extrativos = \frac{(M_i - M_{BE})}{M_i} \times 100 \quad (4)$$

M_i = massa da biomassa inicial em base seca com compostos extrativos, em g;
M_{BE} = massa da biomassa livre de compostos extrativos, em g.

3.2.4.4. Hidrólise ácida da biomassa isenta de compostos extrativos

Os principais componentes da parede celular foram determinados nas amostras das biomassas isentas de extrativos, (SLUITER et al., 2012).

Amostras com 0,3 g de biomassa em base seca, com tamanho de partícula inferior a 0,08 mm foram pesadas em tubos de pressão. Em seguida, em cada tubo se adicionaram 3 mL de ácido sulfúrico 72 % (m/m), posteriormente, os tubos contendo a biomassa foram incubados em banho termostático a 30 ºC por 1 h. Para aumentar a homogeneidade durante a hidrólise ácida concentrada, a biomassa foi agitada com auxílio de bastão de teflon em dois intervalos (durante 3 min iniciando a reação e 3 min contínuos antes de finalizar a hidrólise). Finalizado o tempo de reação, os tubos de ensaio foram removidos do banho termostático e resfriados a temperatura ambiente.

Finalizada a etapa de hidrólise ácida concentrada, a solução final foi diluída para uma concentração de 4% (m/m), mediante a adição de 84 mL de água destilada a cada tubo de ensaio. Em seguida, as amostras foram pesadas em balança e autoclavadas a 121 ºC por 1 h. Encerrado o tempo, os tubos contendo o hidrolisado foram resfriados em banho de gelo para cessar a reação e pesados para determinação do fator de evaporação. Os resíduos provenientes da hidrólise ácida diluída foram filtrados em cadinhos de porcelana de fundo poroso, contendo uma membrana de vidro, previamente tarados. A fração sólida foi utilizada para determinação

da lignina insolúvel e a fração liquida foi armazenada no congelador para posteriores análises de carboidratos, lignina solúvel, ácidos, furfural e 5-HMF.

3.2.4.5. Determinação da lignina insolúvel e cinzas insolúveis em meio ácido

Os sólidos retidos no cadinho de porcelana foram lavados com água destilada até atingir o pH da água de lavagem. A seguir os cadinhos foram secos em estufa a 105 ºC até massa constante e resfriados em dessecador até temperatura ambiente para pesagem em balança analítica.

Para evitar interferências nos resultados, foi determinado o teor de cinzas insolúveis em meio ácido para cada uma das amostras, por meio da incineração dos cadinhos contendo a fibra de vidro e os resíduos sólidos. Os cadinhos foram levados para a mufla e aquecidos por 12 min a 105 ºC, posteriormente incinerados por 30 min a 250 ºC e por último por 180 min a 575 ºC. Este valor deve foi descontado do conteúdo de lignina insolúvel:

$$\mathrm{ML_I} = \mathrm{MPFS} - \mathrm{MPF} \tag{5}$$

ML_I = massa da lignina insolúvel seca, em g;
MPFS = massa do cadinho contendo fibra de vidro e sólidos retidos seco, em g;
MPF = massa do cadinho contendo fibra de vidro seco, em g.

A percentagem de lignina insolúvel foi calculada como:

$$\%\ L_I = \frac{ML_I - M_{CI}}{M_{BE}} \times \left[1 - \left(\frac{\%\ Extrativos}{100}\right)\right] \tag{6}$$

MLI = massa da lignina insolúvel seca, em g;
MCI = massa das cinzas insolúveis em meio ácido, em g;
M_{BE} = massa da biomassa livre de extrativos utilizada na hidrólise, em g.

Sendo que,

$$\mathrm{M}_{CI} = (\mathrm{M}_{CC} - \mathrm{M}_C) - \mathrm{C}_P \tag{7}$$

M_{CC} = massa do cadinho com cinzas insolúveis em meio ácido e fibra de vidro, em g;
M_C = massa do cadinho e fibra de vidro vazio, em g;

C_P = Cinzas da fibra de vidro, em g.

A percentagem de cinzas insolúveis em meio ácido foi calculada como:

$$\%\ C_I = \frac{M_{CI}}{M_{BE}} \times 100 \quad (8)$$

3.2.4.6. Determinação da lignina solúvel

A lignina solúvel foi determinada no filtrado do hidrolisado. Esta análise deve ser feita máximo dentro das primeiras 6 h após a hidrólise ácida diluída. Alíquotas de 1 mL da fração liquida foram diluídas em balões de 25 mL com pH do meio ajustado entre 12,5 e 13 com NaOH 6,5 N. Para determinar a concentração de lignina solúvel, as amostras tiveram sua densidades óticas determinadas a 280 nm em espectrofotômetro, utilizando cubetas de quartzo.

Considerando os valores de absortividade da lignina estabelecidos por GOUVEIA; SOUTO-MAIOR; ROCHA, (2009), que consideramos mais adequados para os resíduos aqui estudados, para o cálculo da lignina solúvel temos:

$$CLS = 4{,}187 \times 10^{-2}\left(A_{280} - A_{pd}280\right) - 3{,}279 \times 10^{-4} \quad (9)$$

Sendo que,

$$A_{pd280} = (C_{furfural} \times \varepsilon_{furfural}) + (C_{HMF} \times \varepsilon_{HMF}) \quad (10)$$

CLS = concentração de lignina solúvel, em g/L;

A_{280} = absorbância da solução de lignina em 280 nm;

A_{pd280} = absorbância dos produtos de decomposição dos açúcares (furfural e HMF);

$C_{furfural}$ e C_{HMF} = concentrações de furfural e HMF determinada por HPLC previamente;

$\varepsilon_{furfural}$ e ε_{HMF} = as absortividades do furfural e HMF, sendo respectivamente, 146,85 e 114,00 L g^{-1} cm^{-1}.

A percentagem de lignina solúvel foi calculada como:

$$\%\ CLS = \left[\frac{CLS \times V_f \times FD}{M_{BE}}\right] \times \left[1 - \left(\frac{\%\ Extrativos}{100}\right)\right] \times 100 \quad (11)$$

CLS = concentração de lignina solúvel, em g/L;

V_f = volume filtrado na hidrólise = 0,087 L;

FD = fator de diluição

M_{BE} = massa da biomassa livre de extrativos utilizada na hidrólise, em g.

O valor da lignina total é a soma dos teores de lignina insolúvel e solúvel:

$$\% L_T = \% CLS + \% CLI \quad (12)$$

3.2.4.7. Determinação de carboidratos, ácidos orgânicos e inibidores

O conteúdo de celulose e hemicelulose foi determinado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Curvas de calibração foram preparadas previamente com padrões de concentração de glicose, xilose, celobiose, arabinose, ácido acético, ácido fórmico, ácido levulínico, HMF e furfural.

Amostras de cada hidrolisado obtido no item 3.2.4.4, com a devida diluição foram filtradas em membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) com tamanho de poro de 0,45 µm (Millex) e transferidos para tubos vials para posterior leitura no HPLC, de acordo com as seguintes condições:

Açúcares:

Alíquotas de 20 µL das amostras foram injetadas no cromatógrafo Waters, com modulo de bomba Waters 515 e modulo injetor autoamostrador 717 plus, software Empower pro 2. Detetor de índice de refração Waters 410, coluna Biorad Aminex HPX-87H 300 × 7,8 mm. A fase móvel foi composta de H_2SO_4 5 mM, vazão 0,6 mL/min, temperatura da coluna 55 ºC, temperatura do detetor 40 ºC, tempo de corrida 15 min.

O conteúdo dos açúcares foi calculado como:

$$\% Açúcares = \frac{C_{HPLC} \times F_C \times V_F}{M_{BE}} \quad (13)$$

C_{HPLC} = concentração determinada para cada açúcar no HPLC, em g/L;

F_C = Fator de correção de cada composto: 0,9 glicose; 0,95 celobiose; 0,88 xilose e arabinose.

V_f = volume filtrado na hidrólise = 0,087 L;

M_{BE} = massa da biomassa livre de extrativos utilizada na hidrólise, em g.

Ácidos orgânicos:

As amostras de 196 µL foram injetadas no cromatógrafo de Troca iônica, marca Metrohm, modelo 850 Professional IC, com autoamostrador compacto 863, software: MagicIC Net 3.2. Detetor de condutividade elétrica, coluna MetroSep ácidos orgânicos (300 × 7,8 mm) e pré-coluna. Fase móvel H_2SO_4 0,5 mM, supressor cloreto de lítio (LiCl) 50 mM vazão 0,5 mL/min, temperatura da coluna 30 ºC, tempo de corrida 25 min.

O conteúdo dos ácidos foi calculado como:

$$\%\ Ácidos = \frac{C_{HPLC} \times F_C \times V_F}{M_{BE}} \quad (14)$$

C_{HPLC} = concentração determinada para cada ácido no HPLC, em g/L;
F_C = Fator de correção de cada composto: 3,52 ácido fórmico; 1,40 ácido levulínico e 0,72 ácido acético;
V_f = volume filtrado na hidrólise = 0,087 L;
M_{BE} = massa da biomassa livre de extrativos utilizada na hidrólise, em g.

Inibidores (5-HMF e Furfural):

As amostras previamente diluídas em fase móvel e filtradas, foram injetadas no cromatógrafo Thermo Scientific, modelo 850 Professional IC, com modulo de bomba ACCELA 600, com autoamostrador compacto ACCELA, software CromQuest. Detetor de Arranjo de Diodo (PDA), coluna C18 Thermo 50 × 2,1 mm. Volume de injeção de 20 µL, fase móvel Acetonitrila (C_2H_3N) 2,5 % e ácido fosfórico (H_3PO_4) 2 mM, vazão 100 µL/min, temperatura da coluna 30 ºC, comprimento de onda 280 nm, tempo de corrida 10 min.

O conteúdo dos inibidores foi calculado como:

$$\%\ Inibidores = \frac{C_{HPLC} \times F_C \times V_F}{M_{BE}} \quad (15)$$

C_{HPLC} = concentração determinada para cada inibidor no HPLC, em g/L;
F_C = Fator de correção de cada composto: 1,29 5-HMF e 1,37 furfural;
V_f = volume filtrado na hidrólise = 0,087 L;

M_{BE} = massa da biomassa livre de extrativos utilizada na hidrólise, em g.

3.2.5. Pré-tratamento dos resíduos de eucalipto

Para a maximização do conteúdo de XOS totais a partir dos galhos e casas de eucalipto foram avaliados diferentes tipos de pré-tratamento: o pré-tratamento hidrotérmico foi denominado de PTH, o pré-tratamento com ácido diluído (ácido sulfúrico) denominado de PTD e o pré-tratamento alcalino com NaOH foi chamado de desacetilação, etapa anterior ao pré-tratamento combinado, denominado PTC.

A seleção das condições estudadas nos pré-tratamentos para produção de XOS foram selecionadas conforme dados reportados na revisão bibliográfica para a madeira de eucalipto e bagaço de cana-de-açúcar e segundo condições ótimas encontradas no pré-tratamento da palha de cana no projeto BBSRC.

3.2.5.1. PTH

Os pré-tratamentos foram desenvolvidos em reatores de aço inox, com capacidade de 500 mL. Aproximadamente 20 g, em MBS, de cada material foram pesados em balança analítica e transferidos para o reator junto com a solução água deionizada, a carga de sólidos no meio foi de 10 % m/m. Neste pré-tratamento foi avaliado a temperatura de reação e o tempo de residência, como apresentado na Tabela 6.

Tabela 6. Ensaios para o pré-tratamento hidrotérmico em diferentes tempos e temperaturas.

Temperatura (°C)	Tempo (min)
175	10, 15, 20, 25
190	7,5 15, 22,5
205	5, 10, 15

As reações foram feitas em banho termostático de glicerina na condição de cada experimento. Após o tempo de reação, os reatores foram transferidos para banho de gelo para cessar a reação e posteriormente as amostras foram filtradas em filtros de tecido. A fração sólida

foi lavada até atingir o pH da água da lavagem e em seguida centrifugadas para remoção do excesso de água e posterior secagem em estufa a 37 ºC até atingir um conteúdo de umidade de até 10%. A biomassa pré-tratada foi armazenada em sacolas herméticas para posterior moagem e caracterização para determinar o conteúdo de cinzas totais, celulose, hemicelulose e lignina, como apresentado nos itens 3.2.4.2 e 3.2.4.4.

A fração líquida obtida contendo os XOS foi a partir de agora denominada hidrolisado hemicelulósico (HH), refrigerada para posterior quantificação dos principais componentes estruturais da biomassa por HPLC. Esta fração foi analisada antes e depois de passar pelo processo de pós-hidrólise ácida, metodologia que será descrita no item 3.2.7.

3.2.5.2. PTD

O procedimento foi desenvolvido conforme o descrito no item 3.2.5.1. O meio reacional foi composto pela carga de sólidos de 10 % m/m, diluído em 0,1 % v/v de H_2SO_4, a temperatura fixada em 170 °C, e o tempo foi variado em 5, 10 e 15 min. Após o tempo de reação, os reatores foram resfriados em banho de gelo, as amostras foram filtradas em filtros de tecido e o pH dos HH foi determinado. As correntes líquidas e sólidas foram caracterizadas.

3.2.5.3. Desacetilação e PTC

A desacetilação dos galhos e cascas foi feita em triplicata, aproximadamente 20 g de biomassa em MBS, foi transferida para frascos SCHOTT com capacidade de 500 mL, a carga de sólidos foi de 10 % m/m. A seguir, a biomassa foi homogeneizada com auxílio de bastão de teflon e impregnada por 40 min em uma solução alcalina, contendo NaOH em concentração de 80 mg/g de biomassa. A reação foi feita em banho termostático a 60 °C e incubadas por 30 min. Finalizado o tempo de reação, os frascos foram resfriados em banho de gelo e foram seguidos os procedimentos descritos anteriormente no item 3.2.5.1 para a filtração das correntes do processo e posterior lavagem, secagem, armazenamento e caracterização dos sólidos. A fração líquida, denominada (LB) foi refrigerada para posterior quantificação por HPLC e pós-hidrolise.

Posteriormente, os ensaios de PTC foram realizados a partir dos galhos e cascas previamente desacetilados, seguindo o procedimento de pré-tratamento descrito no item 3.2.5.1.

O teor de sólidos foi mantido em 10 % m/m, a temperatura variou entre 175 ºC e 190 ºC e tempo entre 7,5 e 25 min. As correntes do processo foram posteriormente caracterizadas.

3.2.6. Fator de severidade

O fator de severidade (R_0) é um parâmetro importante a ser quantificado, sendo utilizado para comparar os resultados dos diferentes processos de pré-tratamento. Apesar de não fornecer com precisão a real severidade, ele pode ser utilizado para estimativas aproximadas dos processos de tratamento. O R_0 considera as variáveis do processo tempo (t, em min), temperatura (T, em °C), como descrito por ABATZOGLOU; CHORNET; KHALED, (1992); OVEREND; CHORNET; GASCOIGNE, (1987), e calculado como:

$$\log_{10}(R_0) = \log_{10}\left(t \cdot exp\left(\frac{T - T_{ref}}{14{,}75}\right)\right) \quad (16)$$

Onde:
t: tempo de residência, em min; T: temperatura, em °C; Tref : 100 °C, temperatura considerada para iniciar a reação.

3.2.6.1. Fator de severidade combinado

Nos pré-tratamentos em condições ácidas (concentrado o diluído), o efeito do pH deve ser consideração na severidade do processo ajustando a equação com o valor do pH do licor dos pré-tratamentos. Esse ajuste pode ser determinado por meio do fator de severidade combinado ($R_{0}^{'}$), pela seguinte equação (CHUM et al., 1990):

$$R_{0}^{'} = log(R_0) - pH \quad (17)$$

3.2.7. Caracterização química do hidrolisado por pós-hidrólise ácida

As frações líquidas obtidas nos pré-tratamentos (PTH, PTD, desacetilação e PTC) foram hidrolisadas para quantificação de carboidratos, ácidos e inibidores, de acordo com os procedimentos por NREL (SLUITER et al., 2008d). Assim, o pH dos HH e LB foi determinado para calcular a quantidade necessária de H_2SO_4 72% v/v requerida na hidrolise, para atingir uma concentração final de ácido de 4% v/v em cada amostra. Amostras de 20 mL (HH, LB) foram

transferidas para tubos de pressão e acidificadas com a quantidade necessária de H_2SO_4, homogeneizadas em agitador magnético e a seguir autoclavados a 121 ºC por 1 h. Finalizado o tempo a reação, os tubos foram resfriados em banho de gelo e as amostras foram filtradas sendo o licor denominado de hidrolisado pós-hidrolise (HPH).

Os HPH foram congelados para posterior quantificação de carboidratos (glicose, xilose, celobiose, arabinose), ácidos (acético, fórmico e levulínico), produtos de degradação (5-HMF e furfural) por cromatografia liquida nas condições descritas no item 3.2.4.7. O teor de oligômeros totais foi calculado como a diferença entre o teor de monômeros antes e após o processo de pós-hidrólise.

3.2.8. Identificação dos XOS nos hidrolisados

A concentração de cada oligômero foi determinada utilizando uma curva de calibração previamente construída com padrões de xilobiose, xilotriose, xilotetrose e xilopentose, adquiridos da MEGAZYME ® segundo metodologia descrita por BAZETTO, (2018) com pequenas modificações.

Os HH advindos dos pré-tratamentos PTH, PTD e PTC dos galhos e cascas, assim como os hidrolisados resultantes do processos de hidrólise enzimática foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência com deteção amperométrica pulsada (HPLC-PAD). Os XOS foram identificados e quantificados por HPLC em cromatógrafo de troca iônica Metrohm (850 Professional IC), com autoamostrador compacto 863, software: MagicIC Net 3.2. Detetor amperométrico, coluna CarboPac PA100 (4 mm × 250 mm) e pré-coluna CarboPac PA100 (4mm × 50 mm). Volume de injeção de 20 µL, fluxo da fase móvel de 1 mL/min, tempo de corrida de 30 min. Para a composição da fase móvel foi adotado um sistema de gradiente de solvente contendo: solvente A (água), solvente B (NaOH 80 mM e acetato de sódio 500 mM) e solvente C (NaOH 500 mM). Na primeira etapa de 0 – 10 min foi utilizado 2% da solução B e 15% da solução C. Na segunda etapa de 10 a 20 min, foi variando de 2 -20% da solução B e de 15 a 50% da solução C. A terceira etapa de 20 a 28 min, foi utilizado 20% da solução B e 50% da solução C. Na última etapa, de 28 a 30 min foi variando de 20 a 2% da solução B e de 50 a 15% da solução C.

3.2.9. Balanço de massa

Após o pré-tratamento, foram conduzidas análises nas frações resultantes a fim de avaliar o teor de celulose, hemicelulose, lignina e cinzas totais, valores necessários para a determinação do balanço de massa. As concentrações dos açúcares, ácidos e compostos de degradação da celulose e hemicelulose foram ajustadas individualmente de acordo com seus respectivos fatores estequiométricos (SLUITER et al., 2008d, 2012).

A conversão da arabinoxilana (C_{AX}), os rendimentos do pré-tratamento (Y_{pt}) e dos XOS (Y_{xos}) foram calculados de acordo com as equações 18 – 20:

$$C_{AX}(\%) = \frac{compostos\ solubilizados\ (g)}{massa\ da\ arabinoxilana\ no\ material\ de\ entrada\ \ (g)} \times 100 \qquad (18)$$

$$Y_{pt}(\%) = \frac{MBS_{material\ pré-tratado}}{MBS_{material\ de\ entrada}} \times 100 \qquad (19)$$

$$Y_{xos}(\%) = \frac{XOS\ (g)}{MBS_{material\ de\ entrada}} \times 100 \qquad (20)$$

Onde:

MBS: Massa em base seca, em g.

3.2.10. Cinética do pré-tratamento

Os dados experimentais gerados durante o pré-tratamento hidrotérmico foram utilizados para desenvolver um modelo cinético para compreender a conversão da hemicelulose presente nos resíduos de eucalipto ao longo do processo. Diversos modelos têm sido propostos para descrever os mecanismos de dissolução da biomassa durante o pré-tratamento. Desde a descrição do modelo cinético originalmente proposto por SAEMAN, (1945) para a hidrólise ácida da celulose em açúcares redutores, seguida pela formação de compostos de degradação, várias abordagens tem sido desenvolvidas para a conversão da biomassa a partir desse modelo,

incluindo o estudo da hidrólise da hemicelulose (LU; MOSIER, 2008; SHAO; LYND, 2013; ZHUANG et al., 2009).

BORREGA; NIEMINEN; SIXTA, (2011); DOS SANTOS ROCHA et al., (2017) e GARROTE; DOMÍNGUEZ; PARAJÓ, (2001) incluíram a formação de oligômeros e propuseram a formação de mais de um composto de degradação durante a conversão da hemicelulose.

NAKASU et al., (2017) sugiram o modelo cinético para a conversão dos XOS durante a etapa de pós-hidrólise em diferentes meios ácidos.

SANTUCCI et al., (2015) propuseram um modelo cinético simplificado para a conversão da hemicelulose durante o pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de cana-de-açúcar. Nesse modelo, considera todos os açúcares, incluindo oligômeros e monômeros, presentes no hidrolisado, bem como furfural e ácidos orgânicos, na determinação dos parâmetros cinéticos.

Neste trabalho, é sugerido um modelo pseudo-homogêneo de processos irreversíveis de primeira ordem para a conversão da hemicelulose dos resíduos de eucalipto seguindo o mecanismo reportado por SANTUCCI et al., (2015). No entanto, neste estudo foi assumida a hidrólise da xilana em XOS totais, posteriormente em xilose e furfural, como descrito a seguir:

$$Xilana \overset{k_1}{\rightarrow} XOS \overset{k_2}{\rightarrow} Xilose \overset{k_3}{\rightarrow} Furfural$$

A variação de cada componente ao longo do tempo pode ser teoricamente calculada para o modelo cinético sugerido pelas equações diferenciais 21 – 24:

$$\frac{d[Xilana]}{dt} = -k_1[Xilana] \tag{21}$$

$$\frac{d[XOS]}{dt} = k_1[Xilana] - k_2[XOS] \tag{22}$$

$$\frac{d[Xilose]}{dt} = k_2[XOS] - k_3[Xilose] \tag{23}$$

$$\frac{d[Furfural]}{dt} = k_3[xilose] \tag{24}$$

Onde:

k_1: é a constante de velocidade de formação de xilana para XOS totais.

k_2: é a constante de velocidade de XOS totais para xilose.

k_3: é a constante de velocidade de xilose para formação de furfural.

Para determinar as constantes de velocidade k_1, consideram-se as concentrações de hemicelulose remanescente nos resíduos pré-tratados. As concentrações de oligômeros e monômeros de xilose e o conteúdo de furfural nos hidrolisados resultantes do pré-tratamento, foram utilizados para calcular k_2 e k_3. A partir dos valores encontrados para as constantes de velocidade, foram calculados o fator pré-exponencial (A) e a energia de ativação (E_a), conforme a equação de Arrhenius (eq. 25):

$$k = Ae^{\frac{-E_a}{RT}} \tag{25}$$

As constantes de velocidade (k_1, k_2 e k_3) foram determinadas minimizando a soma dos erros quadráticos entre as curvas experimentais e teóricas (equações 21-24). O conjunto de equações diferenciais foi resolvido utilizando o software MATLAB® (R2014b) para a estimativa dos parâmetros do modelo junto com o solucionador ODE4 (Runge-Kutta).

3.2.11. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Foram examinadas amostras de resíduos in-natura e das frações sólidas recuperadas após o PTH usando um equipamento MEV (Leo 440i, LEO Electron Microscopy, Oxford, Inglaterra), equipado com detector de energia dispersiva de raios X (EDS: 6070, LEO Electron Microscopy, Cambridge, Inglaterra). As amostras foram fixadas em porta amostra com fita dupla face de carbono. Para aumentar a condutividade das amostras, foi feito um recobrimento metálico com ouro (Sputter Coater K450, EMITECH, Kent, Reino Unido), espessura da camada de ouro estimada em 200 Aº. Para obtenção das micrografias foi utilizada uma tensão de 10 kV e uma corrente de 100 pA. A ampliação utilizada para visualização das superfícies das amostras foi de 500×. Além disso, foram obtidas imagens das seções transversais das amostras, obtidas por fraturamento prévio com nitrogênio líquido, e analisadas em ampliações de 1000× e 5000×.

3.3. Resultados

3.3.1. Caracterização físico-química da biomassa in-natura

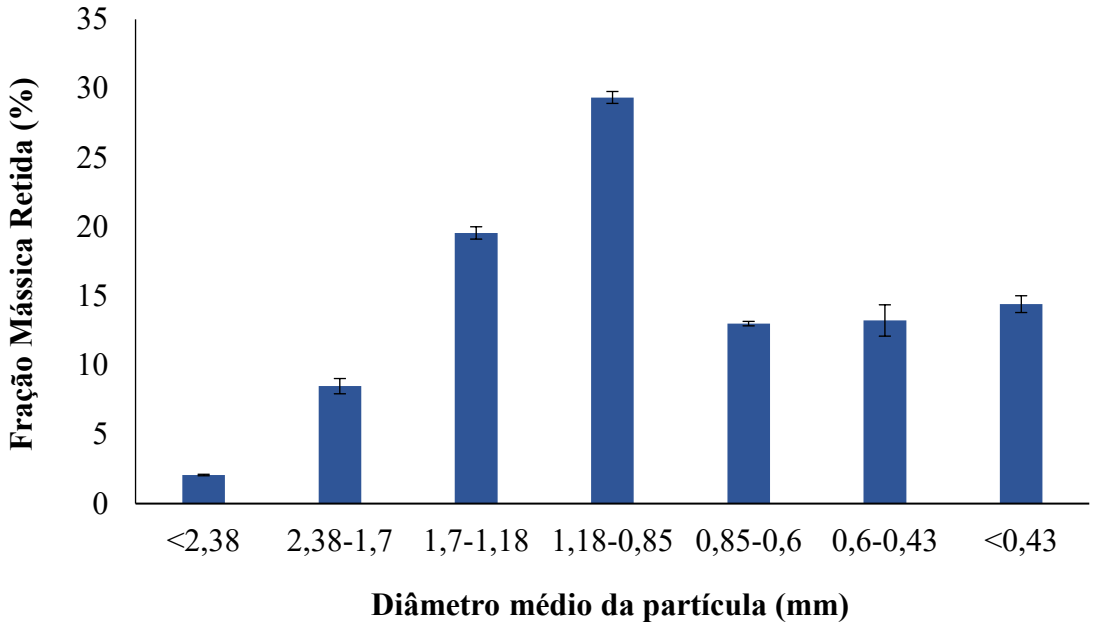
3.3.1.1. Distribuição do tamanho de partícula

Após a trituração dos galhos foi feita a determinação do tamanho de partícula das amostras (Anexo I), os galhos mostraram que 40,89 ± 0,97% das partículas apresentaram um diâmetro superior a 6,35 mm e 30,74 ± 0,37% dos galhos triturados ficaram em um diâmetro médio de 3,35 mm.

Foi feito um teste preliminar de desacetilação utilizando os galhos triturados e foi observado que nessa faixa de diâmetro o meio reacional não conseguiu impregnar a biomassa, devido ao grande tamanho das partículas. Portanto, foi decidido realizar uma nova etapa de fracionamento da biomassa com o objetivo de diminuir o tamanho das amostras. Uma vez que, o uso de tamanho de partículas menores durante a etapa de pré-tratamento aumenta a homogeneização das amostras em escala de laboratório. Além disso, diminui a cristalinidade da celulose e aumenta a área superficial geométrica da biomassa, estes aspectos facilitam a liberação dos açúcares e leva a um aumento nos rendimentos do processo (ROCHA-MARTÍN et al., 2017).

Dessa forma, os galhos triturados passaram por uma etapa de moagem em moinho de facas, utilizando uma peneira trapezoidal de 1,5 mm de diâmetro. Posteriormente foi determinado o tamanho das partículas como apresentado na Figura 26.

Figura 26. Distribuição do tamanho das partículas dos galhos moídos.



Os galhos moídos mostraram uma redução do tamanho das partículas significativa, a maior fração mássica retida foi de aproximadamente 30 ± 0,43% com um tamanho médio das partículas entre 1,18 e 0,85 mm, embora os galhos tenham apresentado uma variabilidade nas faixas dos diâmetros, as amostras utilizadas ao longo dos experimentos foram homogeneizadas por quarteamento para garantir a utilização dos diferentes diâmetros das partículas e assim evitar perdas no uso da matéria prima.

3.3.1.2. Composição química da biomassa

A análise da composição química do material de entrada é uma etapa fundamental já que fornece informação necessária para a execução do processo como por exemplo, necessidades de etapas de pré-tratamento previas a hidrólise das moléculas de interesse (PEREIRA et al., 2018). Além disso, permite a seleção cuidadosa da matéria-prima dependendo da sua composição. A caracterização química dos galhos e cascas de eucalipto usados neste projeto de pesquisa encontra-se apresentada na Tabela 7.

Tabela 7. Composição química dos galhos e cascas de eucalipto In-natura.

Composição química (% m/m)	**Biomassa**	
	Galhos	**Cascas**
Celulose	45,09 ± 0,28	50,31 ± 0,34
Arabinoxilana	16,10 ± 0,10	12,94 ± 0,06
Ácido acético	3,51 ± 0,03	2,52 ± 0,01
Lignina	27,20 ± 0,39	15,72 ± 0,98
Cinzas	0,63 ± 0,01	8,75 ± 0,04
Compostos extrativos	1,30 ± 0,21	10,32 ± 0,42

A madeira é caracterizada por apresentar um baixo teor de compostos extrativos e de material inorgânico (CARVALHO et al., 2015). Esta característica foi confirmada pelos resultados obtidos na análise da composição química dos resíduos de eucalipto, evidenciando que as cascas possuem um maior teor de componentes não estruturais em comparação com os galhos. Sendo assim, as cascas tiveram 10,32% de compostos extrativos e 8,75% de cinzas totais, enquanto nos galhos esses valores atingiram apenas 1,30% e 0,63%, respectivamente. Segundo NEIVA et al., (2018), as cascas de eucalipto tendem a apresentar uma maior proporção de compostos extrativos polares em comparação com a madeira, além de concentrações mais elevadas de cálcio e ferro nas cinzas totais. O alto conteúdo cálcio nas cinzas totais de cascas de eucalipto também foi relatado em trabalhos anteriores desenvolvidos por LIMA et al., (2013), que descreveram que o material inorgânico presente nessas cascas é principalmente composto por cristais de oxalato de cálcio.

Ao comparar os resultados deste trabalho com a literatura, foi observado que o teor de cinzas totais encontrado nas cascas foi superior aos valores reportados na Tabela 2. No entanto, é importante ressaltar que o conteúdo de componentes não estruturais nas cascas pode ser influenciado por vários fatores, como o tipo de casca (interna, externa ou com alto conteúdo de córtex), a origem do material coletado (industrial ou florestal) e a redução mecânica do tamanho da amostra (NEIVA et al., 2018).

Por outro lado, o teor de lignina foi maior nos galhos (27,20%) do que as cascas das toras (15,72%), sendo estes valores similares aos encontrados por MAFEI et al., 2020 e LIMA

et al., 2018b. A fração da celulose foi o maior componente encontrado em ambos os resíduos com aproximadamente 45 e 50%, estes valores concordam com o reportado por CARVALHO et al., 2015 para o cavaco de madeira híbrida de *E. urophylla* × *E. grandis*. Os teores de hemicelulose (arabinoxilana + grupos acetila) foram próximos entre as duas amostras.

Os resultados obtidos para a composição química dos resíduos de eucalipto apresentam pequenas diferenças em comparação com os dados reportados na revisão bibliográfica (Tabela 2). Porém, a variação na composição da biomassa pode ser explicada devido a diferenças no tipo de espécie da planta, idade e condições de cultivo (CARVALHO et al., 2020; PEREIRA et al., 2018). Além disso, a composição química da biomassa é determinada por várias medições que carregam erros específicos e diferentes para cada uma delas. O balanço de massa raramente alcança 100%, e uma forma de avaliar a evolução dos diferentes constituintes ao longo dos processos empregados é por meio da relação entre eles. Assim, observou-se uma relação de 0,60 entre lignina/celulose nos galhos, enquanto para as cascas essa relação foi de 0,31. Já a relação entre hemicelulose/celulose foi de 0,44 e 0,31, respectivamente, evidenciando a grande diferença entre os dois materiais, apesar de terem a mesma origem vegetal.

3.3.2. Pré-tratamento dos resíduos de eucalipto

Foram investigados três tipos de pré-tratamento: PTH, PTD e PTC para cada um dos resíduos de eucalipto (galhos e cascas).

3.3.2.1. PTH

O estudo das melhores condições de processo para a produção de XOS envolveu a avaliação de três tipos de pré-tratamento para cada um dos resíduos de eucalipto. No caso do PTH, a recuperação da hemicelulose foi avaliada em dez diferentes condições, variando a temperatura e o tempo de tratamento. A Figura 27 e Figura 28 apresentam o rendimento da fração sólida recuperada dos galhos e cascas após o PTH e o fator de severidade para cada condição.

Os resultados mostraram que, em geral, as cascas apresentaram maior perda de massa da fração sólida em comparação com os galhos. A porcentagem de recuperação dos sólidos nas cascas foi menor do que 60% a partir de 190ºC e 15 min, enquanto nos galhos isto acorreu a

205ºC com intervalos de tempo de 10 e 15 min. Portanto, as amostras dos galhos precisaram de ser submetidos a condições mais severas de tratamento para apresentar uma maior solubilização da biomassa. Isso pode ser explicado pela maior área superficial geométrica das cascas, o que facilita a interação do meio reacional com a amostra.

Nos experimentos PTH-08, PTH-09 e PTH-10 submetidos à maior faixa de temperatura (205 °C), os galhos mostraram uma diferença mais acentuada no rendimento da fração sólida em comparação com as cascas. A máxima solubilização da biomassa foi atingida em 205 °C e 15 min (PTH-10), correspondendo a 54,67% nos galhos e 49,44 % nas cascas. Com o aumento da severidade do pré-tratamento, maior foi a percentagem de sólidos dissolvidos da biomassa, permitindo uma maior recuperação da fração de hemicelulose no licor, o que concorda com estudos anteriores realizados com cavacos de madeira hibrida de *E. grandis* × *E. urophylla* desenvolvido por JÚNIOR; COLODETTE, (2011).

Figura 27. Rendimento da recuperação da fração sólida dos galhos após o PTH.

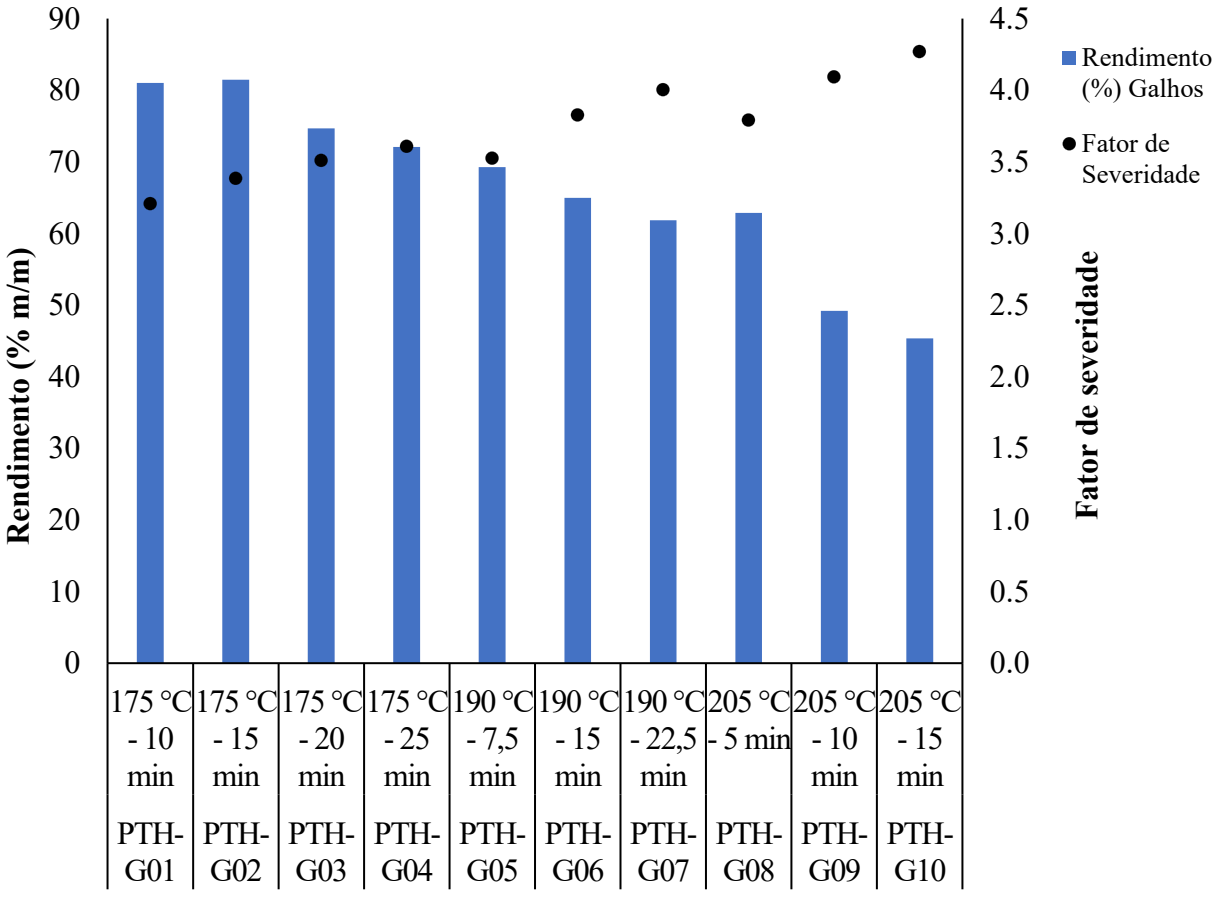
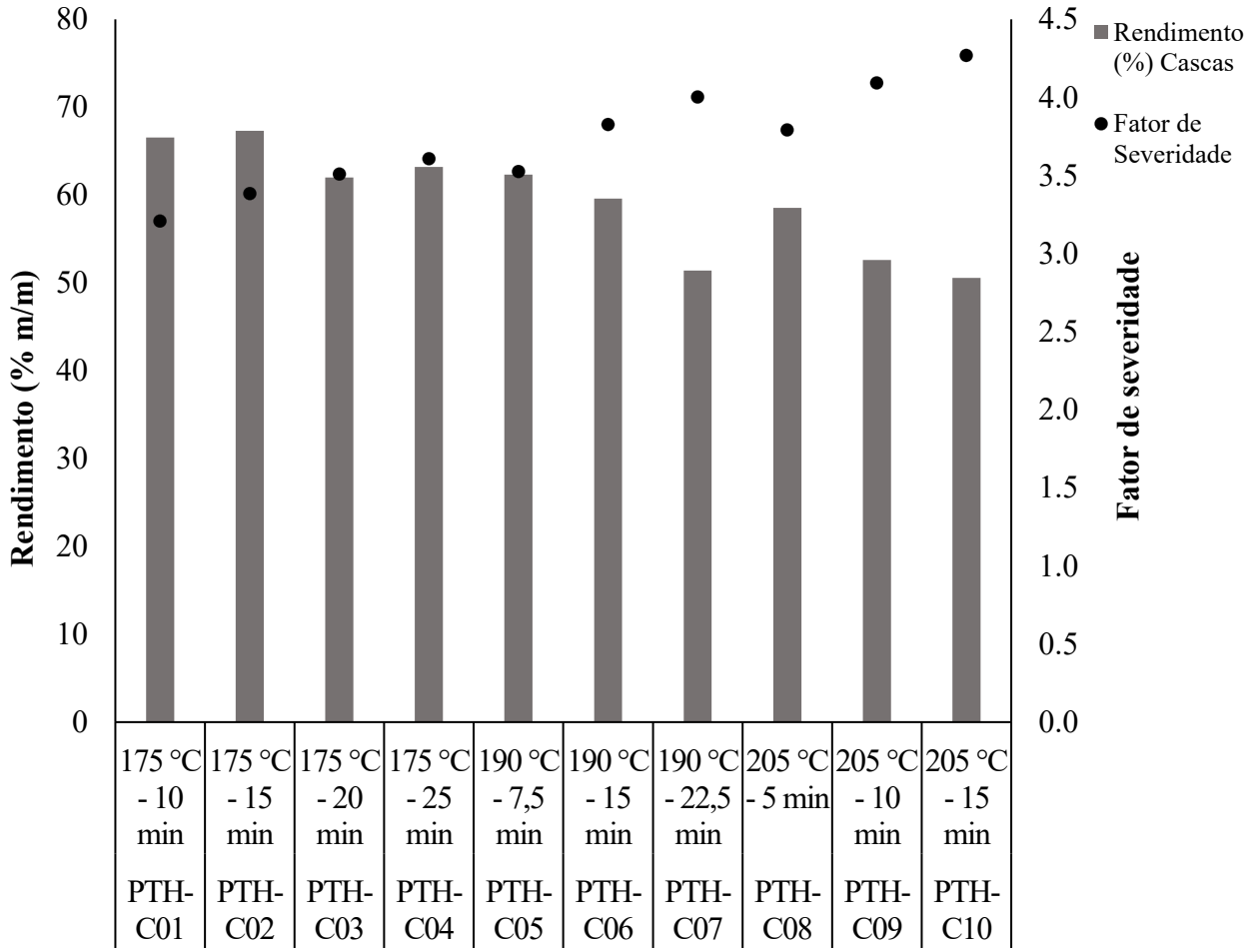


Figura 28. Rendimento da recuperação da fração sólida das cascas após o PTH.



O pré-tratamento da biomassa lignocelulósica por meio da hidrólise ácida, hidrotérmica e ácido diluído promove mudanças estruturais na parede celular da biomassa, como o aumento do tamanho dos poros e da área superficial geométrica das fibras, além de solubilizar as frações de hemicelulose e lignina, favorecendo a diminuição do índice de cristalinidade da celulose (CARVALHO et al., 2015). Por isso, é importante realizar a caracterização química da fração sólida pré-tratada para analisar o impacto das condições do processo na alteração da composição química da biomassa.

Na Tabela 8, é possível verificar as percentagens de solubilização da hemicelulose e lignina e a composição química dos galhos e cascas pré-tratados pelo PTH. Esses dados fornecem uma base para a elaboração do modelo cinético, possibilitando uma compreensão mais aprofundada dos mecanismos de dissolução dos componentes e a obtenção de derivados durante o pré-tratamento da biomassa.

Tabela 8. Solubilização da hemicelulose e lignina nos HH e composição química dos resíduos de eucalipto após PTH.

Amostra	Temperatura (°C)	Tempo (min)	HH		Composição Química da biomassa pré-tratada (% m/m)			
			Solubilização Hemicelulose (% m/m)	Solubilização Lignina (% m/m)	Celulose	Hemicelulose	Lignina	Cinzas
					Galhos			
PTH-G01	175	10	46,94	25,02	60,00 ± 0,22	11,83 ± 0,03	28,23 ± 0,62	0,43 ± 0,01
PTH-G02		15	64,79	30,82	60,32 ± 1,32	9,34 ± 0,41	30,99 ± 1,55	0,28 ± 0,00
PTH-G03		20	65,33	26,31	61,66 ± 1,18	8,3 ± 0,17	29,81 ± 0,31	0,23 ± 0,01
PTH-G04		25	71,98	38,72	63,33 ± 0,19	8,12 ± 0,11	30.00 ± 0,23	0,23 ± 0,01
PTH-G05	190	7,5	80,57	31,46	67,00 ± 0,29	4,73 ± 0,21	28,20 ± 0,66	0,07 ±0,00
PTH-G06		15	86,63	30,55	66,78 ± 0,48	3,39 ± 0,22	29,74 ± 0,51	0,09 ± 0,02
PTH-G07		22,5	89,61	34,02	67,40 ± 1,25	2,78 ± 0,01	29,78 ± 0,60	0,04 ± 0,01
PTH-G08	205	5	99,10	40,79	72.19 ± 0,28	0,26 ± 0,00	29,28 ± 0,27	0,17 ± 0,00
PTH-G09		10	99,30	51,81	68.80 ± 1,70	0,27 ± 0,01	31.19 ± 1,17	0,14 ± 0,01
PTH-G10		15	99,52	58,50	71,16 ± 0,99	0,20 ± 0,02	29,05 ± 0,55	0,15 ± 0,01
					Cascas			
PTH-C01	175	10	67,91	13,37	65,28 ± 1,54	7,55 ± 0,11	24,76 ± 0,10	2,41 ± 0,00
PTH-C02		15	65,28	4,33	64,98 ± 0,10	7,17 ± 0,19	23,99 ± 0,06	3,87 ± 0,00
PTH-C03		20	72,95	5,64	63,14 ± 0,43	6,36 ± 0,06	26,96 ± 0,42	3,53 ± 0,01
PTH-C04		25	76,79	4,04	59,62 ± 1,47	5,22 ± 0,11	26,21 ± 0,66	3,43 ± 0,14
PTH-C05	190	7,5	89,83	3,16	66,60 ± 0,56	2,59 ± 0,14	30,02 ± 0,38	2,69 ± 0,05
PTH-C06		15	88,37	3,66	61,89 ± 0,42	2,85 ± 0,06	28,64 ± 0,26	4,89 ± 0,57
PTH-C07		22,5	98,50	27,44	71,18 ± 0,44	0,43 ± 0,02	25,09 ± 0,10	3,30 ± 0,01
PTH-C08	205	5	99,31	25,21	69,67 ± 1,36	0,20 ± 0,01	26,59 ± 0,55	2,81 ± 0,06
PTH-C09		10	99,13	27,05	67,61 ± 1,04	0,25 ± 0,04	25,41 ± 0,78	2,90 ± 0,02
PTH-C10		15	99,16	10,61	66,70 ± 0,55	0,22 ± 0,00	28,28 ± 0,02	4,21 ± 0,07

Os sólidos remanescentes após o processo de pré-tratamento (celulignina) mostraram que o PTH resultou em perdas consideráveis de hemicelulose da biomassa, ou seja, as condições escolhidas para pré-tratar os resíduos de eucalipto se mostraram efetivas para recuperar a hemicelulose. Segundo a Tabela 8, na condição inicial e de menor severidade os galhos apresentaram uma solubilização da hemicelulose de 46,94%. Conforme aumentou-se a temperatura e o tempo, maior foi a recuperação da hemicelulose no hidrolisado. Nas cascas, o pré-tratamento de menor severidade alcançou a remover 67,91% da hemicelulose contida na biomassa, a partir da temperatura de 195 °C e 22,5 min a hemicelulose apresentou 98,50% de solubilização. Além disso, nos ensaios realizados na faixa de temperatura de 205 °C a fração da hemicelulose foi solubilizada em aproximadamente 99% tanto nos galhos quanto nas cascas.

Um dos principais efeitos observados nas condições de processo estudadas durante o PTH dos galhos e cascas é além da quase a completa remoção da hemicelulose (dependendo da severidade do processo), também certa quantidade da lignina pode ser removida. Isto concorda com a literatura, uma vez que, por meio do PTH não é possível alcançar a deslignificação do material, já que que na reação é apenas empregado água a altas temperaturas (ZHAO; ZHANG; LIU, 2012). Sendo assim, os resultados reportados mostraram que no ensaio com menor severidade a lignina teve um 25,02% de solubilização nos galhos frente a 13,37% das cascas. Além disso, os galhos mostraram que com o aumento do fator de severidade, maior foi a solubilização da lignina, atingindo até 58,50% na condição mais severa (205 °C, 15 min).

Nas amostras das cascas, a maior percentagem de remoção da lignina foi na faixa de 190 °C e 22,5 min com 27,44%. Na condição de maior severidade (205 °C, 15 min), a lignina alcançou apenas 10,61% de solubilização. Isto pode ser devido a formação de pseudo-lignina depositada nas fibras do material pré-tratado, como resultado de reações de condensação de fragmentos solubilizados da lignina e de produtos de degradação dos carboidratos (HMF e furfural). Com isso, um material com características semelhantes à lignina é redistribuído sobre a superfície da biomassa, o que contribui com o aumento da lignina insolúvel no resíduo sólido pré-tratado e pode afetar a digestibilidade da celulose (HE et al., 2020; SUN et al., 2022). A formação de pseudo-lignina tem sido reportada em pré-tratamentos incluindo ácidos na reação. Porém, segundo SANNIGRAHI et al., (2011), está pode ser produzida em qualquer tipo de pré-tratamento realizado sob condições de baixo pH.

Os resultados obtidos (Tabela 8) são similares aos reportados por ROCHA et al., (2013) para o PTH do bagaço de cana-de-açúcar. Nesse estudo, o tempo foi fixado em 10 min e a temperatura foi variada entre 180 ºC e 195 °C. A fração da hemicelulose aumentou a solubilização com o aumento da severidade, em 180 ºC a solubilização foi de 63,1% e em 195 °C atingiu 88,7%. Enquanto a fração da lignina, na temperatura de 190 °C foi atingida a maior percentagem de remoção com 41,8%, na menor faixa de temperatura a lignina foi removida em 26,4%.

Já o PTH da madeira de *E.globulus* reportado por GALLINA et al., (2016) a maior solubilização da hemicelulose (91,01%) foi encontrada na temperatura de 285 ºC, com tempo de 4,12 min. Esse resultado é menor do que o obtido no presente trabalho que é aproximadamente 99% de recuperação da hemicelulose, utilizando menor temperatura.

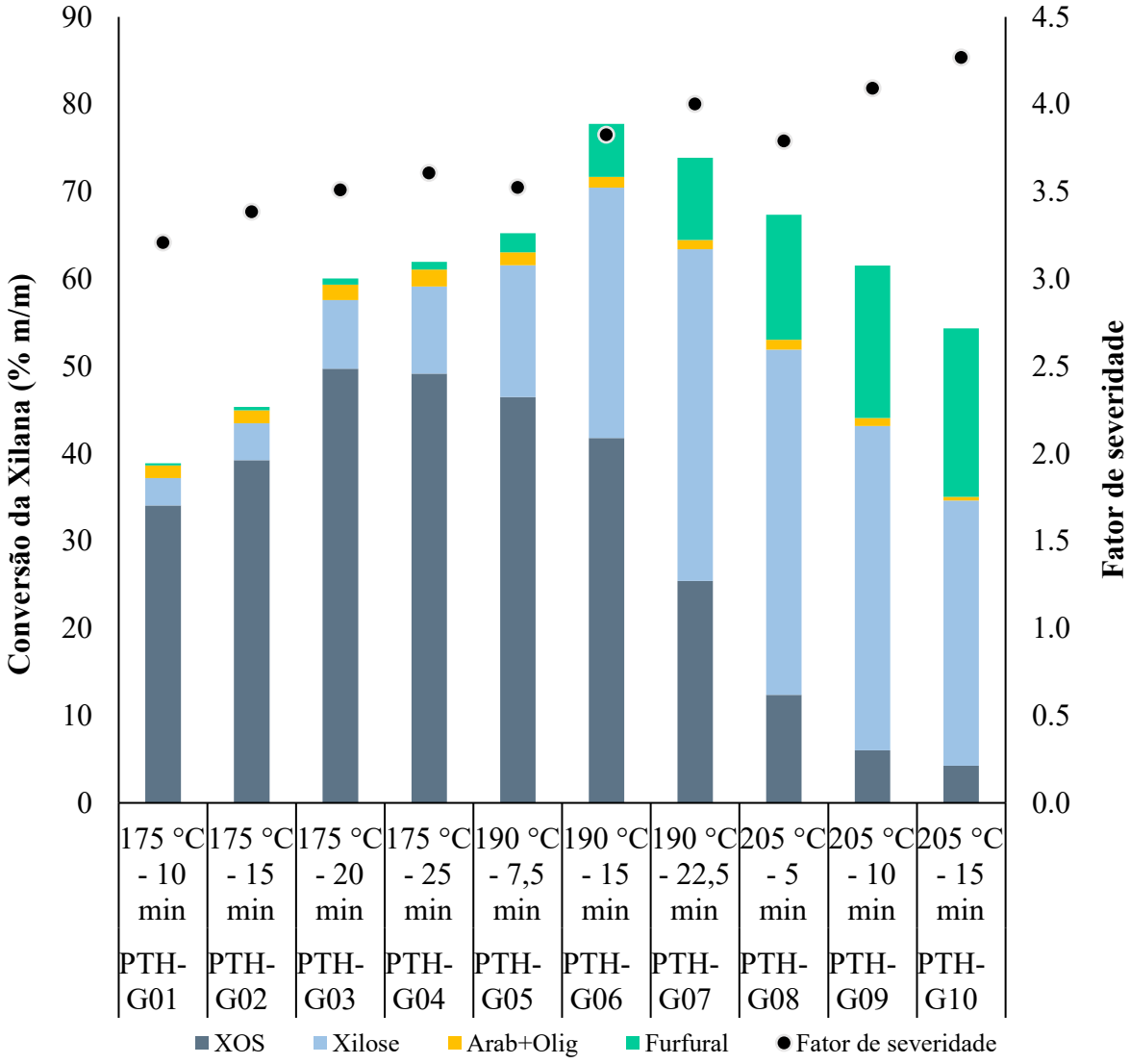
A fração insolúvel obtida após o processo de PTH dos resíduos de eucalipto resultou em uma biomassa com alto conteúdo de celulose. Uma vez que, na composição química a biomassa pré-tratada mostrou entre 60 ± 0,22% e 72,19 ± 0.28% de celulose nos galhos. Nas cascas pré-tratadas as percentagens de celulose encontradas foram entre 59,62 ± 1,47% e 71,18 ± 0,44%. Além disso, nas condições estudadas no PTH, as biomassas apresentaram uma diminuição da concentração da lignina e a quase a completa remoção de hemicelulose, esses fatores favorecem a digestibilidade da celulose.

Dessa maneira, os sólidos obtidos após o PTH dos galhos e cascas podem ser hidrolisados para fraccionar a celulose em subprodutos, como por exemplo celo-oligossacarídeos (COS) (CHU et al., 2014), glicose, HMF, ácido fórmico e ácido levulínico. No entanto, devido à formação de pseudo-lignina nas cascas à temperatura de 205 ºC, durante a etapa de pré-tratamento devem ser empregados condições de baixa severidade, para diminuir a formação desse componente e garantir uma maior acessibilidade à estrutura da celulose contida no resíduo sólido pré-tratado.

Em síntese, por meio do PTH dos galhos e cascas foi possível obter alta recuperação da hemicelulose no HH, onde as condições de maior severidade resultaram em uma maior recuperação dessa fração, sendo está de interesse no presente trabalho. No entanto, a escolha das melhores condições de pré-tratamento (temperatura e tempo) foi baseada priorizando a concentração dos XOS com menor formação de xilose e produtos de degradação.

Desse modo, a Figura 29 descreve as percentagens de solubilização da fração da xilana (arabinoxilana) em açúcares monoméricos, XOS e produtos de degradação, presentes no HH obtido pelo PTH dos galhos. Para calcular a percentagem de solubilização foi considerada a quantidade de xilana contida nos galhos de entrada na reação de pré-tratamento.

Figura 29. Solubilização da xilana em arabinose e seus oligômeros, XOS, xilose e furfural pelo PTH dos galhos.



Por meio da análise da Figura 29, foi possível avaliar o impacto das condições de PTH dos galhos na conversão da xilana. Verificou-se que a temperatura de reação e tempo de residência são parâmetros cruciais para obter uma alta recuperação de XOS.

Nos primeiros seis ensaios, a fração da xilana foi solubilizada ou convertida principalmente em XOS. Na faixa de temperatura de 175 °C, os XOS aumentaram com o aumento do fator de severidade, atingindo 34,07% de conversão em XOS no fator de severidade de 3,21 e 49,70% quando o fator de severidade aumentou para 3,51. Entretanto, no mesmo intervalo de temperatura, quando o fator de severidade aumentou para 3,61, a conversão da xilana em XOS diminuiu para 49,14%. No ensaio com fator de severidade de 3,52, correspondente a 190 °C e 7,5 min, a solubilização da xilana em XOS foi para 46,47%. Com tudo, os ensaios PTH-G03, G04 e G05, apresentaram as maiores percentagens de recuperação da fração da xilana em oligômeros de xilose, resultando em concentrações de 9,05 g/L, 8,78 g/L e 8,37 g/L, respectivamente.

Observou-se que a recuperação da xilana na forma de XOS sofreu uma drástica redução quando foram empregadas combinações de temperatura e tempo que resultaram em fatores de severidade a partir de 4. Desse modo, no ensaio sob 190 °C e 22,5 min a recuperação de XOS foi de 25,42% (4,52 g/L) e, na temperatura de 205°C por 15 min, a condição mais severa de todos os ensaios, apenas uma pequena fração de 4,24% (0,74 g/L) foi possível obter na forma de XOS.

Com relação à solubilização da xilana em monômeros e compostos de degradação durante o PTH dos galhos, verificou-se que valores entre 3,12% e 39,53% correspondiam à conversão da xilana em xilose durante as diferentes condições avaliadas. Além disso, a degradação da xilana em furfural variou entre 0,26% e 19,29%. Segundo JACOBSEN; WYMAN, (2002) o pré-tratamento realizado em condições moderadas de severidade favorece o fracionamento da xilana em XOS. Ao contrário, fatores de severidade maiores que 5,0 promovem a degradação de oligômeros e monômeros em compostos de degradação, os quais podem apresentar efeitos inibitórios.

A Tabela 9 apresenta a composição de cada um dos HH obtidos pelo PTH dos galhos, incluindo as concentrações em g/L dos compostos recuperados a partir da fração da hemicelulose, como XOS, xilose, arabinose, furfural e ácido acético. Também estão listados os compostos gerados a partir da conversão da celulose, como glicose, celobiose, HMF e ácido fórmico. O ácido levulínico também foi analisado como resultado da decomposição da celulose, mas não foi detectado em nenhum dos hidrolisados.

Tabela 9. Concentração de açúcares, ácidos orgânicos e inibidores presentes no HH obtido pelo PTH dos galhos.

Ensaio	Condições	Fator de severidade	Celulose (g/L)					Hemicelulose (g/L)				
			Açúcares		Compostos de degradação			Açúcares			Compostos de degradação	
			Glicose	Celobiose	HMF	Ácido fórmico	Ácido Levulínico	Xilose	Arabinose	XOS	Furfural	Ácido acético
PTH-G01	175 °C / 10 min	3,21	0,13	n.d*	0,02	0,12	n.d**	0,65	0,21	6,25	0,03	0,34
PTH-G02	175 °C / 15 min	3,38	0,11	n.d*	0,02	0,16	n.d**	0,87	0,23	7,10	0,05	0,43
PTH-G03	175 °C / 20 min	3,51	0,12	n.d*	0,03	0,16	n.d**	1,63	0,37	9,05	0,09	0,61
PTH-G04	175 °C / 25 min	3,61	0,12	n.d*	0,04	0,20	n.d**	2,03	0,39	8,78	0,11	0,68
PTH-G05	190 °C / 7,5 min	3,52	0,05	n.d*	0,07	0,19	n.d**	3,09	0,31	8,37	0,28	0,82
PTH-G06	190 °C / 15 min	3,83	0,07	0,13	0,17	0,25	n.d**	5,85	0,23	7,51	0,80	1,64
PTH-G07	190 °C / 22,5 min	4,00	0,11	0,23	0,23	0,29	n.d**	7,67	0,21	4,52	1,22	2,37
PTH-G08	205 °C / 5 min	3,79	0,34	0,16	0,36	0,37	n.d**	8,02	0,23	2,21	1,86	3,26
PTH-G09	205 °C / 10 min	4,09	0,76	0,24	0,51	0,39	n.d**	7,97	0,19	1,14	2,40	3,98
PTH-G10	205 °C / 15 min	4,27	0,72	0,18	0,53	0,46	n.d**	6,05	0,08	0,74	2,46	3,62

n.d*: não detectado, concentração menor do que 50 ppm.

n.d**: não detectado, concentração menor do que 10 ppm.

Como apresentado anteriormente, o PTH dos galhos teve um maior efeito na degradação da hemicelulose e lignina, resultando em baixas concentrações de glicose devido à degradação da celulose. A menor concentração de glicose, de 0,05 g/L, foi obtida a 190 °C por 7,5 min, enquanto no ensaio realizado a 205 °C por 10 min, a concentração de glicose foi de 0,76 g/L. A baixa concentração de glicose e arabinose nos hidrolisados estão em conformidade com estudos anteriores realizados por NETO et al., (2020) e TESTOVA et al., (2011), que relataram baixos teores desses açúcares, mesmo nas condições mais severas de PTH de madeiras folhosas, como eucalipto e birch wood.

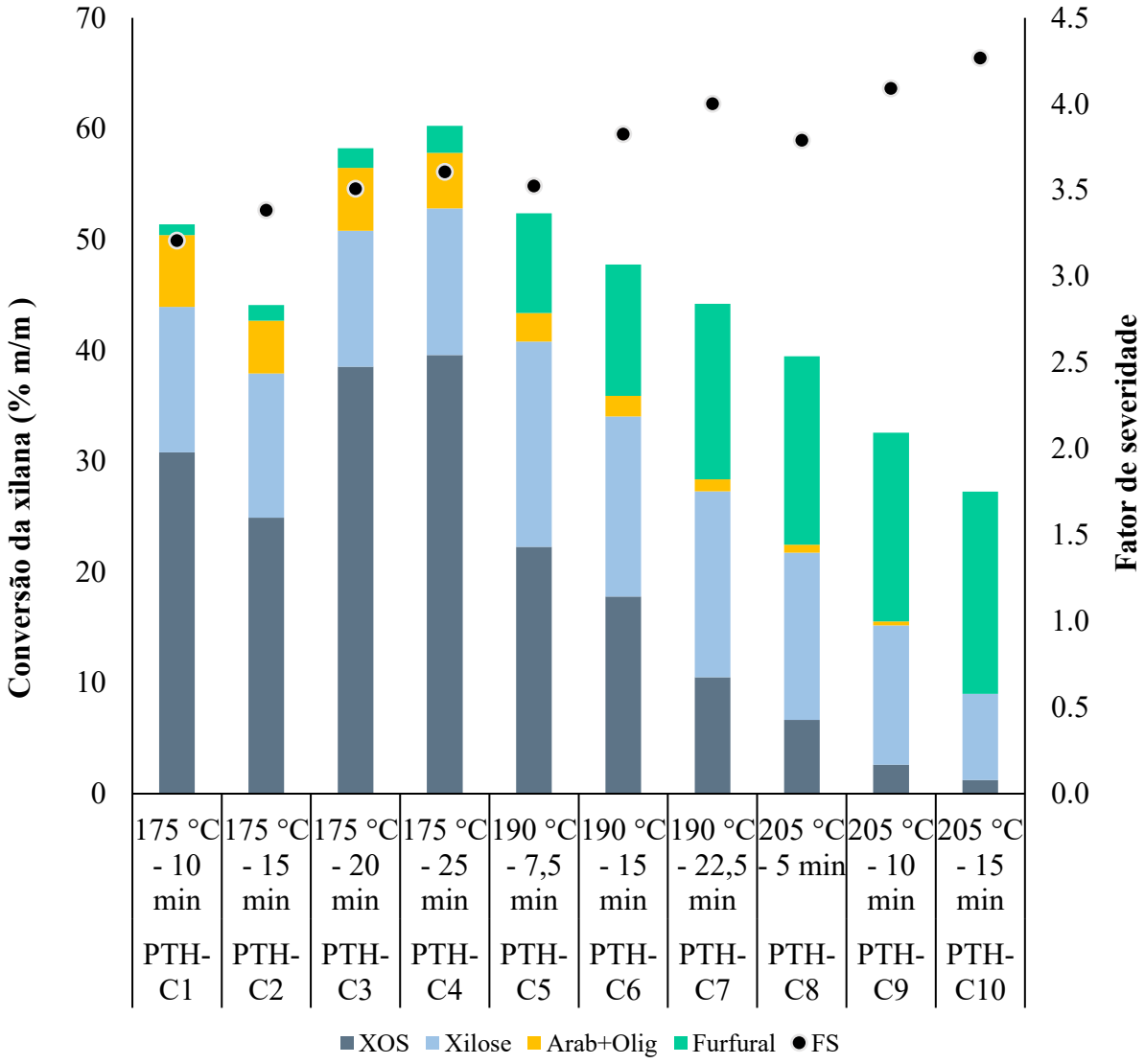
Por outra parte, durante os primeiros cinco ensaios, não foi detectada a presença da celobiose, sendo sua deteção observada apenas a partir de 190 °C e 15 min, com concentrações variando entre 0,13 g/L e 0,24 g/L. O aumento da severidade dos pré-tratamentos resultou em um aumento na formação de produtos de degradação da glicose, como HMF e ácido fórmico. As concentrações de HMF começaram em 0,02 g/L e atingiram 0,53 g/L no ensaio com maior severidade, enquanto as concentrações de ácido fórmico variaram entre 0,12 g/L e 0,46 g/L.

A produção de ácido acético foi quantificada em cada um dos HH, apresentando um aumento com a variação da temperatura e/ou o tempo. Em todos os experimentos realizados na temperatura de 175 °C e no ensaio a 190 °C com 7,5 min, foram encontradas concentrações de ácido acético menores que 1 g/L. Em contraste, nos demais HH, a concentração do ácido acético aumentou expressivamente, atingindo seu valor máximo de 3,62 g/L no PTH com maior severidade. Segundo GARROTE; DOMÍNGUEZ; PARAJO (1999), no PTH da biomassa lignocelulósica, os ácidos presentes no material são liberados durante o processo, os quais auxiliam na degradação da fração hemicelulósica em oligômeros e monômeros. Entretanto, a formação de xilose pode ser minimizada mantendo o pH em faixas entre 4 e 7. Nos experimentos realizados, o pH dos hidrolisados dos galhos variou entre 3 e 3,7, sendo as menores faixas encontradas nos HH em que foram produzidas maiores concentrações de ácido acético e fórmico.

Considerando que o objetivo do pré-tratamento dos resíduos foi obter a máxima recuperação de XOS com mínima formação de compostos indesejados, como monômeros e produtos de degradação, a condição de PTH escolhida para a produção do HH dos galhos e seu uso nas etapas posteriores do projeto foi o PTH-G03, que consistiu em 175 °C por 20 min.

A conversão da xilana em oligossacarídeos, monômeros e furfural pelo PTH das cascas de eucalipto está descrita na Figura 30. As percentagens de conversão foram calculadas em relação ao total da xilana quantificada nas cascas de entrada em cada um das reações de PTH.

Figura 30. Solubilização da xilana em arabinose e seus oligômeros, XOS, xilose e furfural pelo PTH das cascas.



Os resultados dos HH produzidos a partir do PTH das cascas demostraram que a recuperação de arabinose e seus oligômeros foi afetada pelo aumento da severidade do pré-tratamento, apresentando uma diminuição significativa de 6,47% para 0,37%. Na condição mais severa não foi detectada a recuperação de arabinose nem de seus oligômeros.

Em relação à recuperação de oligômeros de xilose, o ensaio com 175 °C e 10 min (menor severidade) apresentou 30,80% de conversão da xilana em XOS, valor próximo ao encontrado para a fração dos galhos (34,07%). Aumentando o tempo de residência para 20 e 25 min, a recuperação de XOS das cascas aumentou, atingindo os valores máximos de 38,51% e 39,59%, respectivamente, com concentrações de 5,58 g/L e 5,68 g/L.

No entanto, em faixas de temperatura mais elevadas (190 °C e 205 °C), a recuperação de XOS diminuiu à medida que o fator de severidade aumentou. A recuperação de XOS caiu para 22,28% (3,18 g/L) na condição de 190 °C com 7,5 min e apenas 1,24% (0,18 g/L) foi recuperado na forma de oligômeros de xilose com 205 °C e 15 min. Portanto, o aumento do fator de severidade promoveu maior degradação da fração da xilana em xilose e maior formação de furfural do que os valores encontrados para os ensaios realizados na temperatura de 175 °C.

A Tabela 10 descreve as concentrações dos açúcares, ácidos e produtos de degradação presentes em diferentes hidrolisados obtidos por meio do PTH das cascas. Não foi detectada a presença de ácido levulínico em nenhum dos dez hidrolisados, e a celobiose foi identificada apenas nos experimentos PTH: C01, C09 e C10.

Os hidrolisados produzidos pelas cascas apresentaram concentrações de glicose entre 0,31 e 1,34 g/L, com uma diminuição observada à medida que a severidade da reação aumentou. Além disso, nos experimentos do PTH:C01 até o C07, as cascas apresentaram uma concentração de glicose maior em comparação com a relatada anteriormente nos galhos.

No ensaio PTH-C08, a concentração de glicose foi próxima à encontrada no HH dos galhos. Em contraste, nas últimas duas condições do PTH (C09 e C10), a concentração de glicose foi menor nas cascas do que no HH dos galhos. Estes resultados estão de acordo com os obtidos anteriormente para o rendimento da fração sólida dos galhos e cascas (conforme demostrado na Figura 27 e Figura 28, respectivamente), indicando um comportamento semelhante na solubilização da biomassa. Esses resultados sugerem que, durante o PTH nas condições de operação de 175 °C e 190 °C, as cascas apresentaram um efeito maior na solubilização de hemicelulose e celulose da biomassa (Tabela 8).

Tabela 10. Concentração de açúcares, ácidos orgânicos e inibidores presentes no HH obtido pelo PTH das cascas.

Ensaio	Condições	Fator de severidade	Celulose (g/L)					Hemicelulose (g/L)				
			Açúcares		Compostos de degradação			Açúcares			Compostos de degradação	
			Glicose	Celobiose	HMF	Ácido fórmico	Ácido Levulínico	Xilose	Arabinose	XOS	Furfural	Ácido acético
PTH-C01	175 °C / 10 min	3,21	1,34	0,17	0,13	0,27	n.d**	2,13	0,68	4,38	0,01	0,53
PTH-C02	175 °C / 15 min	3,38	1,27	n.d*	0,15	0,31	n.d**	2,13	0,78	3,58	0,15	0,67
PTH-C03	175 °C / 20 min	3,51	1,06	n.d*	0,18	0,34	n.d**	2,02	0,74	5,58	0,19	0,79
PTH-C04	175 °C / 25 min	3,61	1,10	n.d*	0,24	0,42	n.d**	2,15	0,79	5,68	0,25	0,97
PTH-C05	190 °C / 7,5 min	3,52	0,58	n.d*	0,47	0,52	n.d**	3,00	0,37	3,18	0,93	1,87
PTH-C06	190 °C / 15 min	3,83	0,59	n.d*	0,55	0,57	n.d**	2,63	0,30	2,53	1,23	2,22
PTH-C07	190 °C / 22,5 min	4,00	0,34	n.d*	0,60	0,60	n.d**	2,69	n.d	1,48	1,63	2,59
PTH-C08	205 °C / 5 min	3,79	0,31	n.d*	0,67	0,77	n.d**	2,43	n.d	0,94	1,75	2,54
PTH-C09	205 °C / 10 min	4,09	0,40	0,15	0,70	0,85	n.d**	2,05	n.d	0,37	1,77	2,88
PTH-C10	205 °C / 15 min	4,27	0,33	0,11	0,81	0,92	n.d**	1,25	n.d	0,18	1,88	3,00

n.d*: não detectado, concentração menor do que 50 ppm.

n.d**: não detectado, concentração menor do que 10 ppm.

Durante a degradação da celulose, a formação de compostos como HMF e o ácido fórmico aumentaram com o aumento do fator de severidade. Ademais, todos os hidrolisados produzidos pelo PTH das cascas mostraram concentrações mais elevadas desses compostos em comparação aos galhos.

No que se refere à hidrólise da hemicelulose, a concentração de xilose aumentou de 2,13 g/L para seu valor máximo de 3 g/L no experimento feito 190 °C por 7,5 min. No entanto, com o aumento da temperatura e tempo para 205 °C e 15 min, a concentração de xilose diminuiu para 1,25 g/L, sendo a menor concentração encontrada no hidrolisado das cascas. Ao comparar as concentrações de xilose nos HH dos resíduos de eucalipto estudados, foi observado que as cascas apresentaram maiores concentrações apenas nos ensaios conduzidos a 175 °C.

Os compostos de degradação da hemicelulose, como o furfural e o ácido acético, tiveram suas concentrações aumentadas com o aumento da severidade. As concentrações de furfural variaram de 0,01 g/L e 1,88 g/L, enquanto o ácido acético iniciou com 0,53 g/L e alcançou 3 g/L na maior severidade. Além disso, esses dois compostos de degradação apresentaram comportamento semelhante ao observado na glicose, uma vez que, nas temperaturas de 175 °C e 190 °C, as cascas apresentaram maior concentração em comparação com os hidrolisados dos galhos.

Quanto à concentração de XOS, os resultados indicaram que a temperatura de 175 °C, com tempos de residência de 20 e 25 min, são condições adequadas para a obtenção desses compostos a partir das cascas de eucalipto. Embora o ensaio de 25 min tenha apresentado um leve aumento na concentração de XOS em comparação com o tempo de 20 min, o aumento do tempo para 25 min promoveu maior formação de monômeros e compostos de degradação da celulose e hemicelulose, conforme pode ser verificado na Tabela 10. Com isso, para a produção do hidrolisado a partir dos resíduos das cascas, foi selecionado o tempo de residência de 20 min e a temperatura de 175 °C.

Na Tabela 11, estão listados os rendimentos obtidos na produção de XOS para as diferentes condições estudadas no PTH dos resíduos de eucalipto, calculados em relação à biomassa de entrada em cada uma das reações. Assim como, a percentagem de seletividade dos XOS.

Tabela 11. Rendimentos (% m/m) de XOS obtidos no PTH dos galhos e cascas, em relação à biomassa de entrada e resultados da seletividade de XOS sobre a xilose (%).

Condições	Fator de severidade	Rendimento XOS (% m/m) em relação à biomassa de entrada		Seletividade XOS (%)	
		Galhos	Cascas	Galhos	Cascas
175°C, 10 min	3,21	5,49	3,99	91,62	70,01
175°C, 15 min	3,38	6,32	3,22	90,25	65,65
175°C, 20 min	3,51	8,00	4,98	86,30	75,82
175°C, 25 min	3,61	7,91	5,12	83,09	74,98
190°C, 7.5 min	3,52	7,48	2,88	75,47	54,62
190°C, 15 min	3,83	6,73	2,30	59,31	52,23
190°C, 22.5 min	4,00	4,09	1,36	40,09	38,53
205°C, 5 min	3,79	1,99	0,86	23,83	30,62
205°C, 10 min	4,09	0,97	0,34	13,95	17,16
205°C, 15 min	4,27	0,68	0,16	12,26	13,75

Os resultados da seletividade dos XOS nos galhos mostraram uma diminuição devido à formação de xilose que variou conforme a alteração do intervalo de temperatura ou tempo, com faixas de valores entre 91,62% e 12,26%. Por outro lado, os rendimentos apresentaram variações entre 5,49%, 8,00% e 0,68%. Analisando a Tabela 11, observou-se que, nas amostras dos galhos, o experimento de menor severidade (3,21 a 175 ºC por 10 min) resultou na maior percentagem de seletividade dos XOS sobre a xilose (91,62%). Porém, o rendimento de XOS obtido foi de apenas 5,49%. Esses resultados são consistentes com estudos anteriores desenvolvidos por CARVALHO et al., (2018), que demostrou que as maiores percentagens de

seletividade foram obtidas sob condições de baixo rendimento de XOS durante o pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar por explosão a vapor.

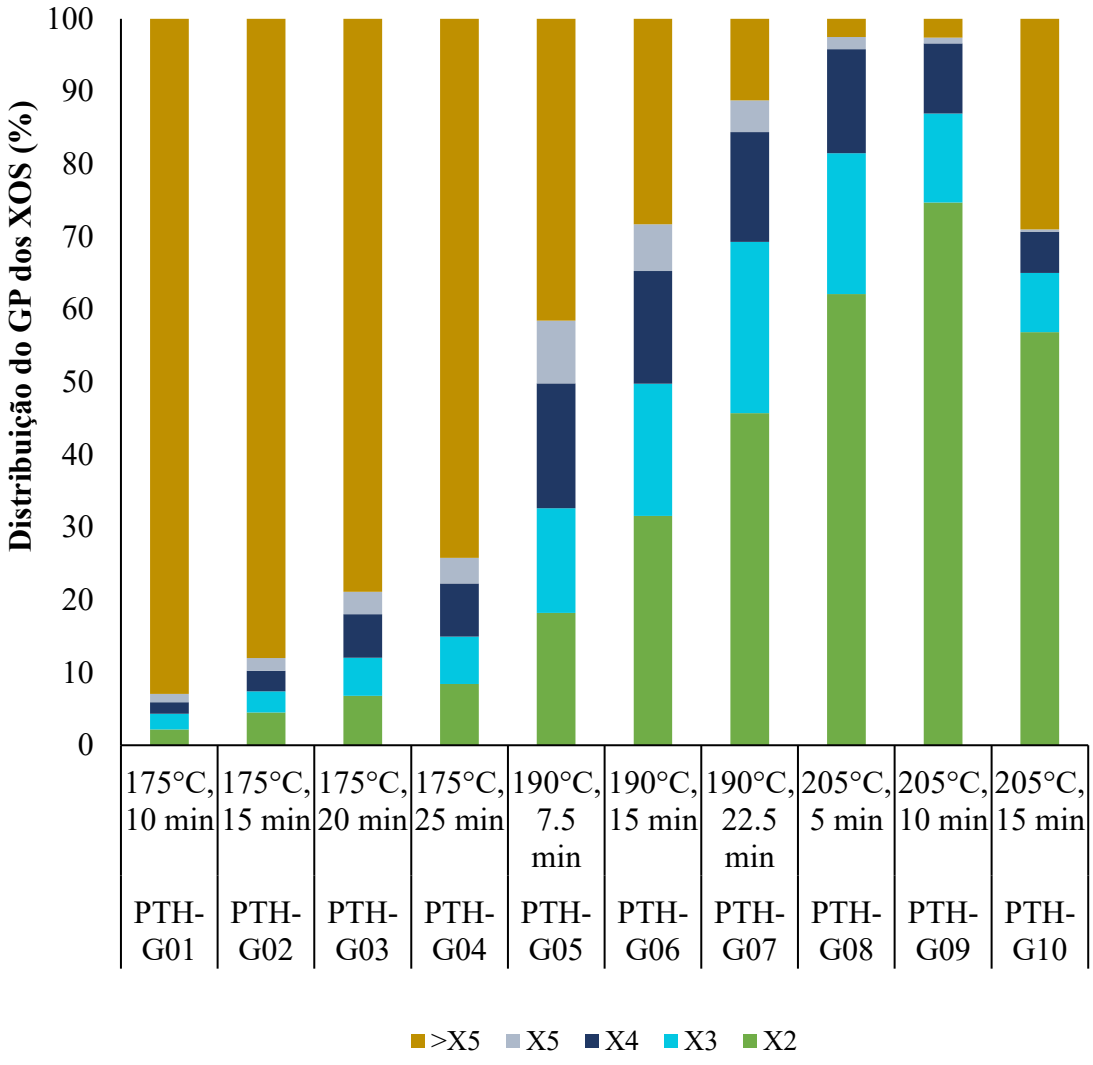
No resíduo das cascas, a condição selecionada para produzir o licor dos XOS para as posteriores etapas (175 °C e 20 min) apresentou a maior seletividade de XOS sobre xilose, atingindo 75,82% com um rendimento de 4,98%. Entretanto, para o tempo de 25 min, a seletividade encontrada foi de 74,98% com um rendimento de XOS de 5,12%. As percentagens de seletividade obtidas nas cascas variaram entre 70,01%, 75,82% e 13,75%, enquanto os rendimentos de XOS em referência à biomassa de entrada na reação oscilaram entre 3,99%, 5,12% e 0,16%.

Os resultados para os resíduos de eucalipto apontam que a produção de XOS totais nos galhos foi superior à obtida nas cascas para o mesmo intervalo de temperatura e tempo de residência, resultando em concentrações de 9,05 g/L e 5,58 g/L, respectivamente, as quais apresentaram rendimentos de 8,00% (m/m) de XOS nos galhos e 4,98% nas cascas, com percentagens de seletividade de XOS sobre xilose de 86,30% e 75,82%, respectivamente. Além disso, verificou-se que os galhos apresentam maiores rendimentos de produção de XOS (5,49%, 6,32% e 8,00%) em fatores de severidade mais baixos (3,21, 3,38 e 3,51) do que o maior rendimento alcançado pelas cascas (5,12%) na severidade de 3,61.

Em resumo, os resultados indicam que as condições de temperatura e tempo de reação afetam significativamente a seletividade e rendimento de produção de XOS em resíduos de eucalipto. Adicionalmente, a composição química do material de entrada é um fator crucial nos processos de conversão da biomassa. Nesse sentido, os galhos de eucalipto podem ser uma matéria-prima mais adequada para a produção de XOS, principalmente em condições de severidade mais brandas. Isso se deve, em parte, ao teor mais elevado de arabinoxilana e uma proporção maior de grupos acetila presente nos galhos, o que pode ter facilitado a obtenção de concentrações mais altas de XOS em comparação com as cascas. Além disso, os galhos apresentaram um teor reduzido de compostos extrativos em comparação com as cascas, o que pode facilitar etapas subsequentes de conversão, pois os fenólicos presentes nos compostos extrativos podem ter efeitos nocivos nos processos biológicos (JÖNSSON; MARTÍN, 2016). De acordo com NEIVA et al., (2020), esses compostos extrativos contribuem para a recalcitrância do material, dificultando a deslignificação e as etapas subsequentes de conversão.

Nos diferentes hidrolisados obtidos durante os ensaios de PTH dos galhos e cascas foi analisada a distribuição do tamanho das cadeias dos XOS produzidos durante o processo termoquímico, análise realizada por HPLC-PAD. Assim, foram identificadas as percentagens de X2, X3, X4, X5 e XOS com GP >5, em relação ao total de XOS produzido nas diferentes condições experimentais. A Figura 31 descreve a fração dos XOS presentes nos HH dos galhos.

Figura 31. Distribuição do GP dos XOS presentes nos HH produzidos pelo PTH dos galhos.



Observa-se que, em 175 °C houve um aumento progressivo na concentração dos XOS de tamanho de cadeia X2, X3, X4 e X5 ao longo do tempo. Por exemplo, em 10 min, a concentração de X2 foi de 2,17% (0,14 g/L), aumentando para 8,44% (0,74 g/L) em 25 min. Já a concentração de X3 iniciou em 2,18% (0,14 g/L) e atingiu 6,53% (0,57 g/L) após 25 min. A

concentração de X4 também a175presentou um aumento significativo, passando de 1,56% (0,10 g/L) para 7,29% (0,64 g/L). X5 foi encontrado em menor concentração, com valores que variaram de 1,17% (0,07 g/L) até 3,54% (0,31 g/L). Por outro lado, os XOS com tamanho de cadeia maior do que X5 apresentaram comportamento inverso, com uma concentração de 92,93% em 10 min e uma redução para 74,20% após 25 min.

Os resultados da produção de XOS com tamanho de cadeia X2 e X3 na temperatura de 190 °C mostraram comportamento semelhante ao observado na faixa de temperatura de 175 °C. Em 7,5 min, a concentração de X2 aumentou de 18,22% (1,53 g/L) para 45,72% (2,06 g/L), enquanto a concentração de X3 iniciou em 14,43% (1,21 g/L) e finalizou em 23,56% (1,06 g/L). É importante destacar que a concentração total de XOS em 7,5 min foi de 8,37 g/L e, após 22,5 min, correspondeu a 4,52 g/L.

Além disso, ao analisar a temperatura de 190 °C, foi notado um comportamento de degradação significativa dos XOS de GP X4, X5 e >X5 com o aumento do tempo de residência. A concentração de X4 caiu de 17,17% (1,44 g/L) ao tempo de 7,5 min para 15,14% (0,68 g/L) ao tempo de 22,5 min. Já a concentração de X5 decresceu de 8,64% (0,72 g/L) a 7,5 min para 4,37% (0,20 g/L) a 22,5 min. Ainda, houve uma forte redução da concentração dos XOS correspondentes a GP >X5, que passou de 41,54% (3,48 g/L) a 7,5 min para 11,21% (0,51 g/L) a 22,5 min.

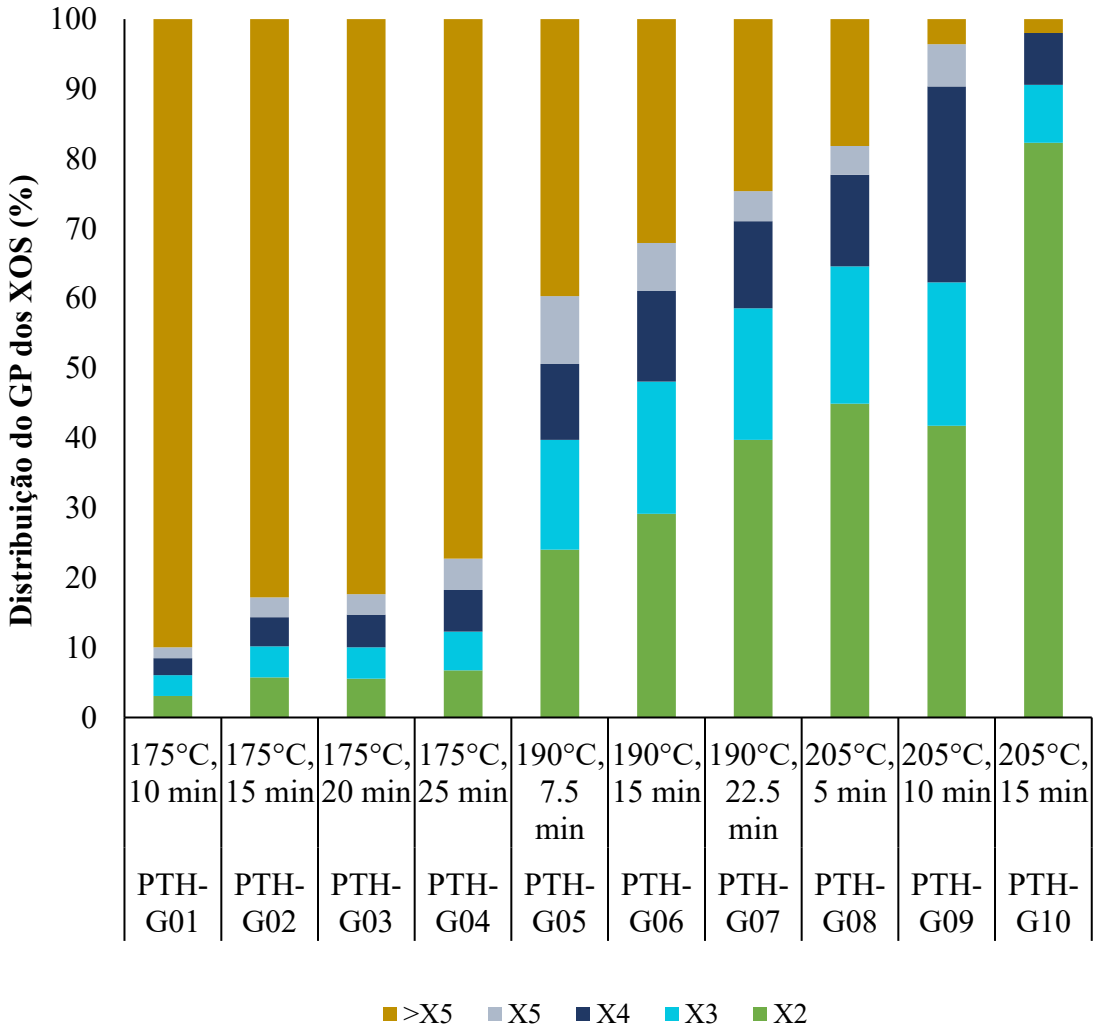
Resultados obtidos na temperatura de 205 °C indicam que houve uma degradação progressiva dos XOS de maior tamanho (X3 a X5) para moléculas menores, como X2, xilose e compostos de degradação. A concentração total de XOS produzidos foi de 2,21 g/L em 5 min, 1,14 g/L em 10 min e 0,53 g/L em 15 min (Tabela 9).

A percentagem de X2 apresentou um comportamento diferenciado dos demais XOS, aumentando de 62,09% em 5 min para 74,71% em 10 min, mas diminuindo para 56,86% em 15 min. Por outro lado, os compostos X3, X4 e X5 apresentaram uma redução nas percentagens com o aumento do tempo de reação, passando de 19,40% para 8,17% em X3, de 14,33% para 5,66% em X4 e de 1,67% para 0,33% em X5.

Entretanto, os XOS com GP >5, apresentaram um incremento nos três tempos de reação, em 5 min teve 2,51%, em 10 min correspondeu a 2,60%, e em 15 min os XOS >5 corresponderam a 28,97% do total de XOS quantificados neste ensaio. Na Figura 32 estão

representados os resultados obtidos para a distribuição do GP dos XOS produzidos pelo PTH das cascas.

Figura 32. Distribuição do GP dos XOS presentes nos HH produzidos pelo PTH das cascas.



Na Figura 32, observa-se os XOS com GP >5 como os compostos maioritários nos quatro tempos estudados à temperatura de 175 °C, como também, nos intervalos de tempo de 7,5 min e 15 min realizados a 190 °C. Enquanto com 22,5 min a 190 ºC e nos tempos de 5 a 15 min em 205 °C, a maioria foi de X2. Os resultados obtidos das cascas mostraram um comportamento diferente aos encontrados no licor dos galhos, já que em todos os hidrolisados das cascas foi observado que os XOS de maior GP (>X5) diminuíram a percentagem com o aumento dos intervalos de tempo e/ou temperatura.

O comportamento da distribuição do GP dos XOS nos licores das cascas à temperatura de 175 °C mostraram que nos tempos de 10 min até 25 min, as percentagens de X2 até X5 aumentaram ao longo do tempo. Nesta temperatura, as percentagens encontradas foram: X2 de 3,10% a 6,73; X3 de 2,96% a 5,58%; X4 de 2,44% a 5,93% e X5 de 1,53% a 4,50%. Por outro lado, a percentagem de >X5 começou em 89,97% no tempo de 10 min e terminou em 77,26% com 25 min.

A temperatura de 190°C resultou em um aumento progressivo de X2 de 24,01% para 39,73%. X3 e X4 também apresentaram aumento das percentagens dos 7,5 min para 15 min, mas houve uma pequena diminuição em 22,5 min. As percentagens encontradas para X3 foram de 15,75%, 18,92% e 18,86%, e para X4, de 10,86%, 12,96% e 12,48%. Por outro lado, X5 e os XOS com GP >5 apresentaram uma diminuição ao longo dos ensaios, com X5 passando de 9,72% em 7,5 min para 4,32% em 22,5 min e os >X5 iniciando com 39,66% e finalizando com 24,61%.

As condições de temperatura de 205°C resultaram em baixas concentrações de XOS. Entre os XOS totais quantificados em cada intervalo de tempo, X2 apresentou 44,91% no tempo de 5 min, com uma pequena queda para 41,76% no tempo de 10 min e aumento para 82,30% no tempo de 15 min. Por outro lado, a formação de X3 e X4 apresentaram uma inicial elevação, seguida de uma diminuição significativa após o aumento do tempo de reação. Esses valores foram de 19,70%, 20,57% e 8,28% para X3 e 13,09%, 28,04% e 7,44% para X4, respectivamente, nos tempos de 5, 10 e 15 min. Além disso, as percentagens de X5 e >X5 foram diminuindo com o aumento do tempo, sendo que X5 apresentou 4,13% em 5 min e não foi detectada em 15 min, indicando sua completa degradação. Já os >X5 foram inicialmente 18,17% e terminaram com 1,97%.

Como destacado previamente na seção anterior, 175°C e o tempo de reação de 20 min foi a condição escolhida para produzir licores ricos em XOS a partir dos resíduos de eucalipto. A seguir, são apresentados os resultados detalhados da análise de distribuição percentual do GP dos XOS e as concentrações de cada uma das frações (X2 a >X5) destes dois hidrolisados.

A hemicelulose na biomassa dos galhos foi solubilizada em 65,33% no HH, sendo que 49,70% disso foi xilana solubilizada em XOS totais, com uma concentração de 9,05 g/L. Principalmente na forma de XOS com GP maior que 5, representando 78,86% (7,14 g/L). O restante de 21,14% (1,91 g/L) foi distribuído entre X2 (6,82%, 0,62 g/L), X3 (5,25%, 0,47 g/L),

X4 (6%, 0,54 g/L) e X5 (3,08%, 0,28 g/L). A seletividade para a produção de XOS sobre xilose obtida neste ensaio foi de 86,30%.

No estudo utilizando as cascas, foi verificado que 65,33% da hemicelulose foi solubilizada no licor. Deste valor, 38,51% corresponderam à fração da xilana que foi recuperada na forma de XOS, apresentando uma percentagem de seletividade de XOS sobre xilose de 75,82%. A concentração total de XOS obtida foi de 5,58 g/L, sendo que 82,36% (4,59 g/L) se apresentaram como XOS de alto GP (>X5) e 17,64% (0,98 g/L) como XOS de menor GP, incluindo X2 (5,54% com 0,31 g/L), X3 (4,49% com 0,25 g/L), X4 (4,67% com 0,26 g/L) e X5 (2,93% com 0,16 g/L).

Em trabalhos anteriores reportado por PENÍN et al., (2019) foi analisado o fracionamento da hemicelulose durante o processo de pré-tratamento da madeira de *E. nitens.* Diferentes intervalos de temperatura (170 °C a 220 °C) foram aplicados, com fatores de severidade variando entre 2,88 e 4,36. Os resultados indicaram que as temperaturas de 190 °C e 195 °C, com severidades de 3,47 e 3,62, produziram os maiores rendimentos de XOS, cerca de 8 e 9 g de XOS por 100 g de madeira tratada, respectivamente. Esses resultados são semelhantes ao rendimento máximo obtido no presente trabalho, durante o estudo dos galhos, que foi de 8,00% a uma temperatura de 175 °C e uma severidade de 3,51. Vale ressaltar que a espécie do eucalipto neste estudo pertence a espécie comercial *E. grandis* e a matéria prima é um resíduo florestal e não resíduo gerado no plantio industrial. O que sugere, que os resíduos produzidos no setor florestal também podem ser uma fonte promissora para a produção de XOS.

Outro estudo desenvolvido utilizando a biomassa de eucalipto para produção de XOS foi reportado por NETO et al., (2020). O estudo otimizou a produção de XOS a partir de duas frações de biomassa: mistura dos cavacos de madeira de *E. grandis com E. urophylla (1:1)* in-natura e a mistura da madeira livre de compostos extrativos. Foram avaliadas faixas de temperatura de 140 a 193,6 ºC, com intervalos de tempos de residência de 30 a 110,4, e cargas de sólidos de 5 a 18,4 %. Em condições otimizadas (161 °C, 65 min e 10% de carga de sólidos), a remoção do teor de compostos extrativos não apresentou diferença significativa em relação aos resultados obtidos para a biomassa in-natura. Os rendimentos de XOS obtidos foram de 0,061 g/g biomassa in-natura e 0,063 g/g de biomassa livre de extrativos. Cerca de 42,3% e 43,5% da xilana foi convertida em XOS. Para ambas as biomassas, a formação de xilose e furfural foi de aproximadamente 0,02 e 0,002 g/g biomassa, respectivamente, e o ácido acético formado pelo PTH da biomassa in-natura foi de 0,08 g/g e 0,09 g/g para a biomassa livre de

extrativos. Em comparação com os resultados obtidos nos HH produzidos pelos resíduos de eucalipto deste estudo, as cascas apresentaram um rendimento de XOS similar (0,05 g /g) ao reportado por NETO et al., (2020) para os cavacos, enquanto que os galhos alcançaram um maior rendimento (0,08 g /g) em condições não otimizadas e utilizando menor tempo de reação durante o pré-tratamento (apenas 20 min), o que resultou em menores concentrações de produtos indesejados como xilose, furfural e ácido acético do que os obtidos para a mistura de cavacos de *E. grandis com E. urophylla.*

GULLÓN et al., (2011) estudou a produção de XOS a partir da madeira de *E. globulus,* previamente a biomassa foi submetida a 130 ºC para a remoção dos extrativos, seguido de pré-tratamento a 175 ºC por 9 min, com uma a carga de sólidos de 8 g de água / g de madeira seca. Nesse experimento, a concentração de XOS no hidrolisado foi de 10,31 g/L, com a produção de glicose, xilose, arabinose e ácido acético em concentrações de 0,07 g/L, 0,58 g/L, 0,18 g/L e 0,29 g/L, respectivamente. Os resultados obtidos para os açúcares monoméricos e o ácido acético são similares ao encontrados no ensaio PTH-G01 (175 ºC, 10 min), como ilustrado na Tabela 9. No entanto, a concentração de XOS foi ligeiramente maior do que o valor máximo atingido no PTH dos galhos e aproximadamente duas vezes maior da concentração encontrada nas cascas.

Os resultados do estudo de HUANG et al., (2017) sobre o pré-tratamento do resíduo sólido da polpação da palha de trigo mostraram que o rendimento de XOS variou entre 0,3 ± 0,0 e 4,9 ± 0,2 g de XOS g por 100 gramas de biomassa em faixas de temperatura de 140 ºC a 220 °C e tempo de residência de 20 a 80 min. O máximo rendimento de XOS (4,9 ± 0,2 g de XOS g por 100 gramas de biomassa) foi obtido na temperatura de 180 ºC e tempo de residência de 40 min. As frações de X2 a X6 tiveram concentrações de 0,1 g/L e o conteúdo de ácido fórmico e acético foi de 0,5 ± 0,00 g/L e 1,0 ± 0,1 g/L, respectivamente. No presente trabalho, ao utilizar menor temperatura e tempo de residência durante o PTH dos resíduos de eucalipto, observou-se um rendimento próximo nos resíduos das cascas (5,12%), mas os galhos atingiram um rendimento superior (8,00%), em comparação com os resultados da palha de trigo obtidos por HUANG et al., (2017). Além disso, os resíduos de eucalipto apresentaram maiores concentrações de X2 a X5 e menores concentrações de compostos de degradação como o ácido fórmico e acético do que os observados na melhor condição de pré-tratamento da palha de trigo.

A concentração máxima de XOS produzida no presente trabalho foi de 9,05 g/L no resíduo dos galhos, resultado maior do que o reportado por YU et al., (2015) para o hidrolisado

do bagaço de cana-de-açúcar obtido pelo pré-tratamento realizado a 180 °C por 20 min, onde a concentração de XOS foi de 7,50 g/L, a formação de xilose foi de 2 g/L, e compostos de degradação como furfural, ácido fórmico, ácido acético foram produzidos em 0,60 g/L, 0,15 g/L e 1 g/L, respectivamente. Sendo estes compostos indesejados produzidos em maior concentração do que os obtidos no HH dos galhos na melhor condição de PTH.

Os resultados obtidos pelo PTH dos galhos e cascas de eucalipto mostraram que a temperatura e o tempo de reação são fatores importantes que influenciam a concentração de XOS obtida a partir do pré-tratamento de biomassas lignocelulósicas. No entanto a fonte da matéria-prima desempenham um papel fundamental na sua produção, como foi observado com a comparação com resultados prévios reportados na literatura. Isto está em concordância com o reportado por QING et al., (2013), que descreve que tanto as condições de pré-tratamento quanto a fonte da biomassa podem influenciar nas características dos hidrolisados contendo os XOS, como a distribuição do GP e a concentração de ácido acético.

De acordo com a literatura, a despolimerização da xilana ocorre por meio da combinação de reações rápidas e lentas, formando inicialmente XOS de alta massa molecular, que se decompõem em XOS de baixa massa molecular. Estes últimos são então fracionados em xilose, que pode ser decomposta em furfural e outros produtos. No entanto, os oligômeros podem sofrer hidrólise direta em produtos de degradação, porém o uso de ácido no pré-tratamento pode acelerar a hidrólise, o que pode evitar o reduzir a degradação direta dos XOS em furfural ou outros produtos indesejados (KUMAR; WYMAN, 2008; QING et al., 2013). Com isso, se faz interessante avaliar o efeito do uso de ácido durante o PTH dos resíduos de eucalipto e determinar se a concentração de monômeros de xilose e produtos de degradação pode ser diminuída.

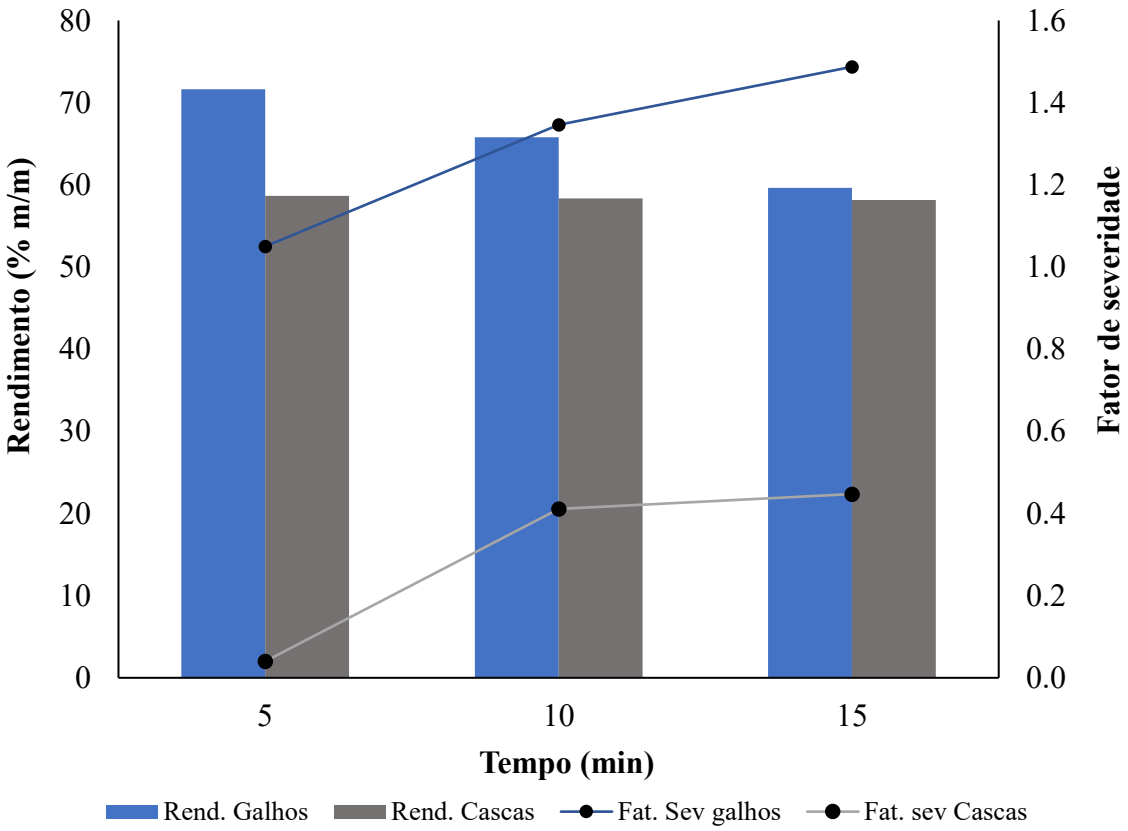
Uma outro método para aumentar a concentração de XOS é remover o ácido acético da biomassa, conforme relatado no estudo desenvolvido por BRENELLI et al., (2020). Nesse estudo, a palha da cana-de-açúcar foi submetida previamente ao pré-tratamento alcalino e posteriormente pré-tratada em diferentes condições de temperatura (170 °C a 210 °C) e tempo (5 a 25 min), com uma carga de sólidos de 10% m/m. A fração da hemicelulose apresentou 79,46% de solubilização a 190 °C por 20 min de tempo de reação, alcançando a máxima concentração de XOS totais de 13,5 ± 0,24 g/L, sendo que a distribuição do GP dos XOS foram de 8,6% de X2, 6,4% de X3, 8,3% de X4, 8,1% de X5 e 9,5% de X6 e 59,1% corresponderam a XOS com GP >6. Estes resultados são maiores do que os encontrados no presente trabalho

para os galhos e cascas de eucalipto. Com base nesses resultados, foi avaliado o efeito da remoção do ácido acético presente nos galhos e cascas para verificar se essa abordagem pode ser uma estratégia para aumentar a produção de XOS a partir dos resíduos de eucalipto.

3.3.2.2. PTD

A Figura 33 apresenta o rendimento da fração sólida obtida após o pré-tratamento com ácido diluído dos galhos e cascas de eucalipto a 170 ºC e 0,1 % v/v de H_2SO_4 na reação. O tempo de pré-tratamento foi variado em 5, 10 e 15 min para avaliar seu efeito na solubilização da xilana em XOS. O fator de severidade utilizado nos galhos variou de 1,05 a 1,49, enquanto nas cascas variou de 0,04 a 0,45. É importante destacar que a diferença no fator de severidade nos resíduos, mesmo com as mesmas condições de pré-tratamento, é devido à diferença no valor do pH dos licores gerados durante o processo. Os licores produzidos a partir dos galhos apresentaram faixas de pH menores em comparação com os obtidos a partir das cascas, sendo entre 1,71 -1,75 e 2,72 – 2,79, respectivamente.

Figura 33. Rendimento da fração sólida obtida pelo PTD dos galhos e cascas.



Nos ensaios de PTD das amostras das cascas foi observado que a variação do tempo de reação não resultou em diferenças significativas no rendimento da fração sólida pré-tratada. Os resultados mostraram que, independentemente do tempo de reação utilizado (5, 10 ou 15 min), as porcentagens de rendimento foram semelhantes, atingindo valores de 58,63%, 58,35% e 58,14%, respectivamente. Além disso, os resultados mostraram que, apesar do fator de severidade do PTD das cascas ter sido menor em comparação com os galhos, as cascas conseguiram atingir uma maior solubilização da fração solida nos três tempos de reação estudados.

Por outro lado, os resultados obtidos para as amostras dos galhos evidenciaram uma diferença acentuada nas percentagens de rendimento da fração sólida em relação ao tempo de reação no PTD. No tempo de residência mais curto (5 min), os galhos apresentaram um rendimento de 71,63%. No entanto, com o aumento do tempo de reação para 10 e 15 min, observou-se uma maior solubilização da amostra dos galhos, resultando em uma diminuição drástica nos rendimentos da fração sólida para 65,79% e 59,64%, respectivamente.

Os ensaios utilizando ácido sulfúrico diluído no pré-tratamento das cascas apresentaram rendimentos da fração sólida similares ao obtido no PTH com fator de severidade de 3,79, (PTH-C08, 205 ºC e 5 min). No caso dos galhos, o maior rendimento obtido no PTD (59,64%) foi próximo ao encontrado no PTH dos galhos com fator de severidade de 4,00 (PTH-G07, 190 °C com tempo de residência de 22,5 min). Os resíduos pré-tratados foram caracterizados para determinar a composição química dos resíduos após a etapa de PTD, como ilustrado na Figura 34 e Figura 35.

Figura 34. Caracterização química da fração sólida obtida após PTD dos galhos.

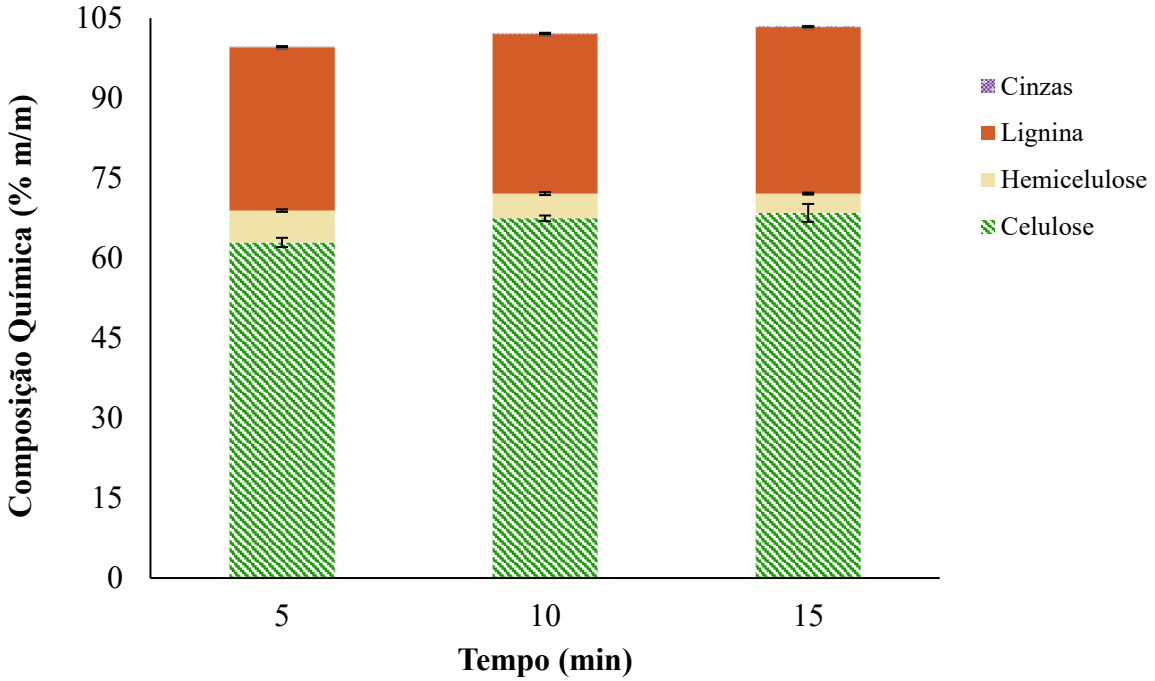
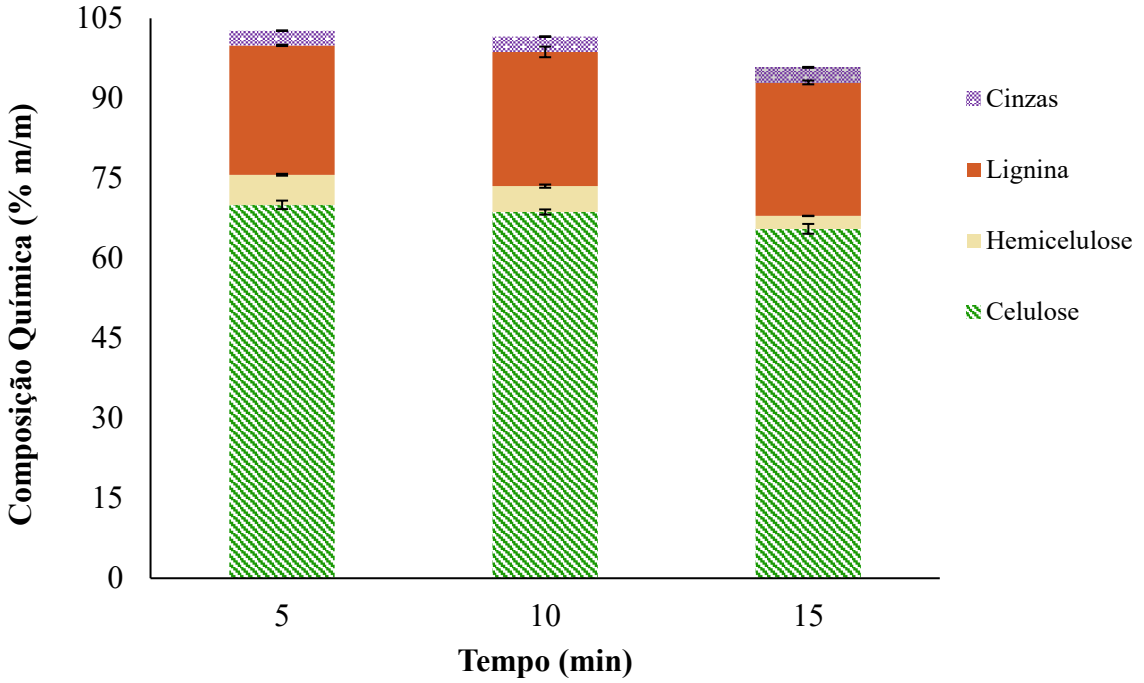


Figura 35. Caracterização química da fração sólida obtida após PTD das cascas.



Após o PTD dos galhos e cascas foram observadas valores próximos de celulose nos tempos de reação de 10 e 15 min, sendo 67,45% e 68,48% nos galhos e 68,68% e 65,52% para as cascas, respectivamente. No entanto, as cascas pré-tratadas com 5 min de tempo de reação apresentaram na sua composição química um maior conteúdo de celulose (70,02%) em comparação com os galhos (62,93%).

O uso de ácido sulfúrico na concentração de 0,1% v/v no pré-tratamento alcançou altas percentagens de solubilização da hemicelulose em ambas as amostras. Nos galhos, os valores foram de 74%, 81,44% e 86,97% para os tempos de 5, 10 e 15min, respectivamente. Enquanto nas cacas, a hemicelulose foi solubilizada em 75,82%, 79,21% e 89,31% nos mesmos tempos de reação. Nesse sentido, a fração sólida pré-tratada apesentou valores de hemicelulose remanescente de apenas 5,98% a 3,61% nos galhos e entre 5,65% e 2,42% nas cascas.

Em relação à fração da lignina, o PTD teve um maior impacto na solubilização nas amostras dos galhos, aumentando com o tempo de reação para valores de 21,24%, 29,16% e 33,32% nos tempos de 5, 10 e 15 min, respectivamente. Na composição química dos galhos pré-tratados a lignina remanescente foi de 30,58% a 31,21%. Já nas cascas houve uma diminuição na solubilização da lignina com o aumento do tempo de reação, com percentagens de 14,47%, 11,24% e 9,06% em 5, 10 e 15 min, respectivamente. A composição química das cascas pré-tratadas com ácido diluído apresentou de 24,26% a 25,03% de lignina. O aumento do conteúdo de lignina insolúvel (Klason) pode ser atribuído à formação de pseudo-lignina nas fibras do resíduo pré-tratado, isto também foi observado anteriormente no trabalho desenvolvido por CARVALHO et al., (2015) para o PTD da palha e bagaço de cana-de-açúcar.

O conteúdo de cinzas dos resíduos sólidos obtidos após o PTD foi uma das principais diferenças encontradas na composição química, sendo assim, as cascas apresentaram maiores percentagens de cinzas em comparação com os galhos. Os valores de cinzas encontrados nas cascas foram de 2,76%, 2,87% e 2,82%, enquanto nos galhos os valores foram de 0,16%, 0,12% e 0,11% para os tempos de 5, 10 e 15 min de pré-tratamento, respectivamente.

As composições dos hidrolisados obtidos em cada uns dos tempos de reação do PTD dos galhos e cascas estão descritos na Tabela 12, nela também se encontram as percentagens de seletividade dos XOS sobre xilose. O ácido levulínico não foi detectado em nenhum dos hidrolisados produzidos durante os ensaios de PTD de ambos os resíduos.

Tabela 12. Composição dos HH obtidos pelo PTD dos galhos e cascas e percentagens de seletividade de XOS sobre xilose.

Tempo (min)	Fator de severidade	Celulose (g/L)				Hemicelulose (g/L)					Seletividade XOS (%)
		Açúcares		Compostos de degradação		Açúcares			Compostos de degradação		
		Glicose	Celobiose	HMF	Ácido fórmico	Arabinose	Xilose	XOS	Furfural	Ácido acético	
					Galhos						
5	1,05	0,47	0,21	0,03	0,04	0,32	9,24	3,03	0,08	2,67	27,17
10	1,35	0,69	0,46	0,05	0,08	0,35	12,50	1,84	0,19	2,98	14,36
15	1,49	1,05	0,50	0,07	0,11	0,41	14,66	1,08	0,32	3,20	7,73
					Cascas						
5	0,04	1,62	n.d*	0,33	0,06	1,53	4,56	4,37	0,15	0,44	52,14
10	0,41	1,59	n.d*	0,41	0,07	1,63	5,54	4,07	0,23	0,60	45,51
15	0,45	1,82	n.d*	0,51	0,09	1,77	6,62	4,01	0,34	0,75	40,75

n.d*: não detectado, concentração menor do que 50 ppm.
Ácido levulínico não detectado em concentração menor do que 10 ppm.

Foram observadas concentrações elevadas de glicose nas amostras de cascas dos HH produzidos a partir do PTD, mesmo com um fator de severidade menor. As cascas alcançaram uma concentração de glicose entre 1,62 g/L e 1,82 g/L, enquanto nos galhos a concentração foi de 0,47 g/L a 1,05 g/L. Além disso, o PTD das cascas resultou em maiores concentrações de glicose em comparação com todos os ensaios realizados no mesmo resíduo durante o PTH. Apenas os HH produzidos a partir das amostras de galhos detectaram a presença de celobiose, com concentrações entre 0,21 g/L e 0,50 g/L.

Durante o PTD, foram encontradas altas concentrações de arabinose nos HH das cascas, sendo entre 1,53 g/L e 1,77 g/L, enquanto nos galhos, as concentrações variaram de 0,32 g/L a 0,41 g/L. O uso de ácido diluído no pré-tratamento das cascas resultou em maiores concentrações de arabinose do que as observadas em todos os ensaios de PTH para ambos os resíduos de eucalipto.

Em relação à formação de xilose, os galhos produziram concentrações mais elevadas deste monômero do que as amostras das cascas. A concentração máxima de xilose nos galhos foi de 14,66 g/L, enquanto nas cascas, correspondeu a 6,62 g/L, representando uma diferença de até 54,84%. Além disso, o uso de ácido diluído nos ensaios de pré-tratamento promoveu uma maior degradação da cadeia da hemicelulose em xilose em comparação com os ensaios realizados em condições de PTH.

Após a utilização de ácido diluído nas reações de pré-tratamento dos galhos e cascas nas condições estudadas a 170°C, não foi possível observar um aumento na concentração dos XOS, produtos alvo do estudo, em relação à concentração máxima obtida pelo método PTH. Por meio do método PTD dos galhos, foram produzidos XOS em concentrações de 3,03 g/L em um tempo de 5 min, com uma seletividade de XOS em relação à xilose de 27,17%. Com um aumento no tempo de reação para 15 min, a concentração diminuiu para 1,08 g/L, apresentando uma seletividade de XOS de apenas 7,73%. A concentração máxima de galhos produzidos em um tempo de reação de 5 min foi menor do que as concentrações obtidas nas reações de PTH, exceto na temperatura de 205°C.

Os resultados indicaram que a concentração de XOS nas cascas apresentou pequenas variações com o aumento do tempo de reação, em contraste com o que ocorreu nos galhos. No tempo de 5 min, as cascas produziram 4,37 g/L de XOS com uma seletividade de 52,14%. Já

no tempo de 10 min, a concentração de XOS foi de 4,07 g/L com uma seletividade de 45,51%. Enquanto no tempo de 15 min, os XOS foram produzidos em 4,01 g/L, apresentando uma seletividade de 40,75% em relação à xilose.

Comparando com os resultados obtidos nos galhos, o PTD das cascas resultou em uma maior concentração de XOS em todos os tempos de reação estudados. Pelo contrário, nos ensaios de PTH, as amostras dos galhos foram as que atingiram maiores concentrações desses compostos. Ademais, as concentrações obtidas no PTD das cascas foram superiores às alcançadas no PTH do mesmo resíduo nas temperaturas de 190°C e 205°C, bem como nos ensaios realizados a 175°C por 15 min.

A concentração máxima de XOS atingida pelas cascas no PTD foi semelhante à obtida a 175°C por 10 min, porém menor do que as concentrações máximas alcançadas nos tempos de 20 e 25 min, também utilizando uma temperatura de 175°C. É importante destacar que a diferença na concentração máxima de XOS obtida no PTD para cada resíduo em comparação com a maior concentração alcançada pelo PTH foi de 23,07% nas cascas e 66,52% nos galhos.

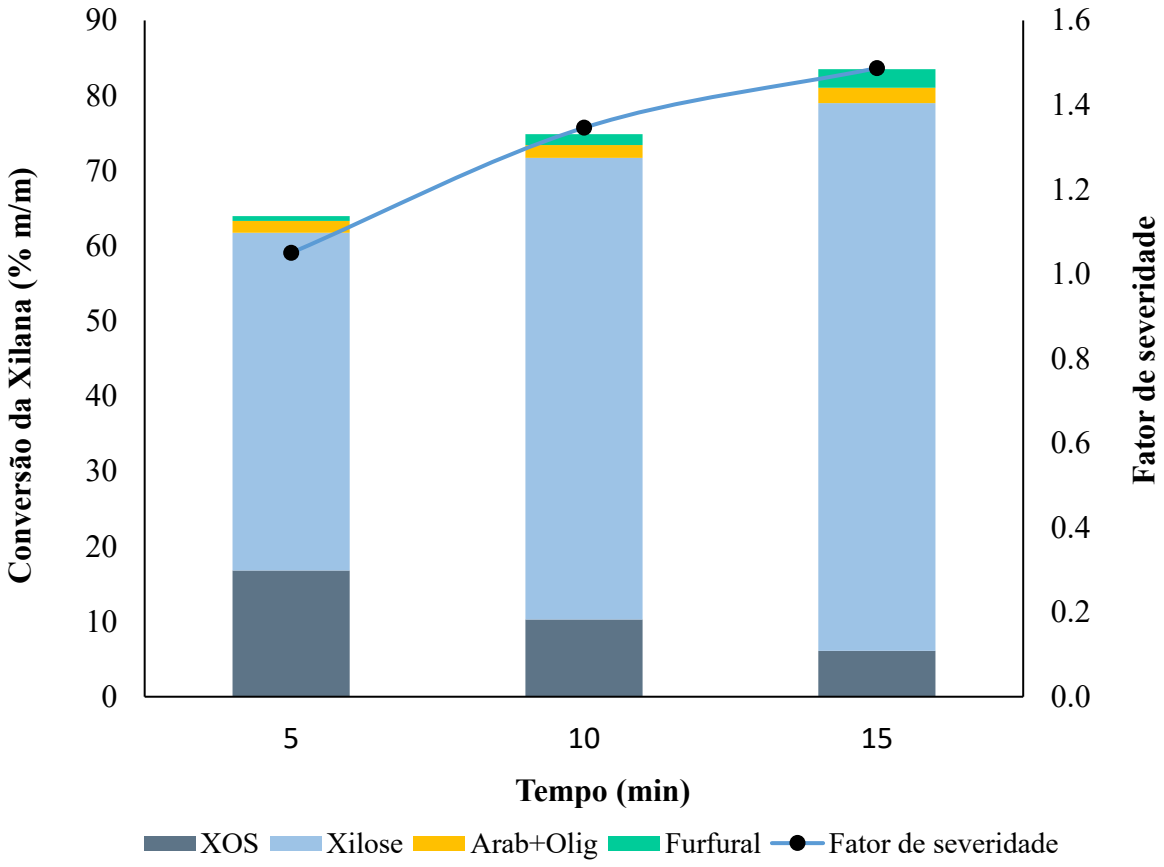
Segundo CHEN et al., (2017), os compostos presentes no hidrolisado produzido sob condições ácidas são complexos e variam conforme o aumento da severidade do processo, devido ao aumento da concentração de ácido, do tempo e/ou a temperatura, onde a cadeia da hemicelulose também pode sofrer desacetilação, e os compostos de maior tamanho podem ser hidrolisados em HMF, furfural e outros ácidos orgânicos. Nesse sentido, nas condições estudadas, a produção de furfural foi encontrada nos galhos em valores de 0,08 g/L a 0,32 g/L, enquanto nas cascas esse composto foi produzido em concentrações de 0,15 a 0,34 g/L. O ácido acético foi produzido em altas concentrações nos HH dos galhos, com valores de 2,67 g/L a 3,20 g/L, pelo contrário nas cascas, as concentrações atingidas foram de apenas 0,44 g/L a 0,75 g/L.

Enquanto ao HMF, este foi produzido em baixas concentrações pelas amostras dos galhos (0,03 g/L e 0,07 g/L) em comparação com as cascas (0,33 g/L a 0,51 g/L). Quanto ao ácido fórmico, foram encontradas concentrações próximas em ambos os resíduos, sendo de 0,04 g/L a 0,11 g/L nos galhos e 0,06 g/L a 0,09 g/L nas cascas. Mesmo com o uso de ácido diluído no pré-tratamento tanto dos galhos quanto das cascas, a produção de compostos de degradação da cadeia da celulose, como o ácido fórmico, foi menor do que a observada nas reações de PTH.

Além disso, observou-se que os galhos apresentaram concentrações próximas de ácido acético às atingidas no PTH a 190 °C/ 22, 5 min e 205 °C/ 5 min, enquanto o furfural foi produzido em baixas concentrações em relação aos ensaios realizados a partir de 190 ºC/ 15 min. Por sua vez, as máximas concentrações de ácido acético e furfural formados pelas cascas foram significativamente menores do que as concentrações obtidas a 190 °C e 205 °C no PTH.

Como foi observado anteriormente nos resultados dos ensaios de PTH, o tempo mostrou ser um fator que tem uma grande influência na solubilização do material lignocelulósico, como por exemplo, na solubilização da fração da xilana em XOS, bem como na formação de produtos de degradação, isto pode ser evidenciado por meio da Figura 36 e Figura 37, onde são apresentadas as percentagens de conversão da xilana em relação aos monômeros de xilose, arabinose e oligômeros, e compostos de degradação, como o furfural, produzidos pelo processo de PTD dos galhos e cascas.

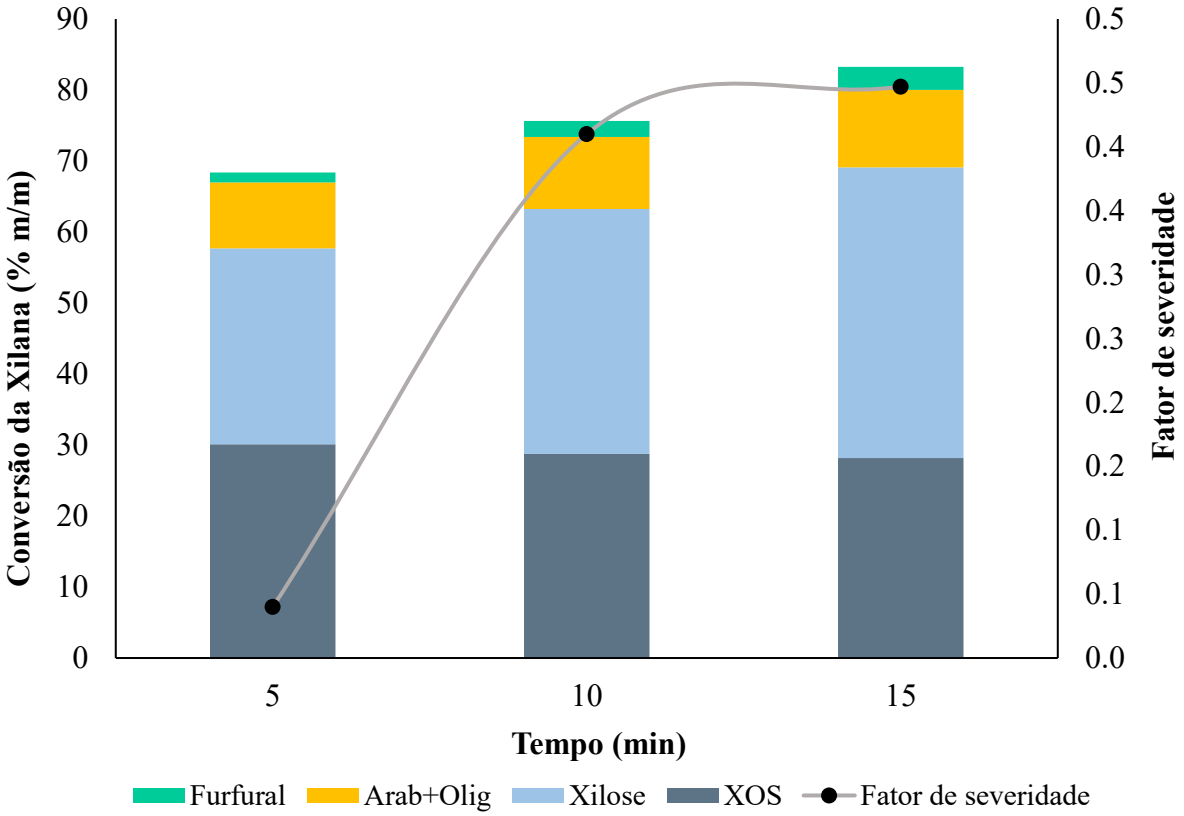
Figura 36. Solubilização da xilana em arabinose e seus oligômeros, XOS, xilose e furfural pelo PTD dos galhos.



A solubilização da fração da xilana foi determinada em relação à quantidade de xilana presente no material de entrada para cada condição avaliada. Dessa forma, o estudo de PTD nos resíduos de eucalipto mostrou que a conversão da xilana nas amostras dos galhos ocorreu predominantemente na forma de xilose. Em apenas 5 min, houve uma conversão de 44,98%, que aumentou para 61,41% e 72,91% em 10 e 15 min, respectivamente.

Além disso, foi observado que o aumento do tempo de reação resultou em um aumento na formação de furfural, com uma conversão que variou de 0,64% em 5 minutos para 2,50% em 15 min. Os valores para arabinose e seus oligômeros também aumentaram com o tempo de reação, de 1,57% em 5 min para 2,02% em 15 min. Em contraste, a solubilização da xilana em produtos de interesse, como XOS, foi relativamente baixa, com apenas 16,78% de conversão em 5 min. Esse valor diminuiu ainda mais para 10,30% em 10 min e 6,11% em 15 min de reação.

Figura 37. Solubilização da xilana em arabinose e seus oligômeros, XOS, xilose e furfural pelo PTD das cascas.



Os resultados obtidos a partir das amostras das cascas no PTD mostraram que, em apenas 5 min de reação, houve uma conversão considerável da xilana em XOS, com uma percentagem de 30,08%, tornando-os os compostos maioritários nesse tempo de reação, seguidos pela xilose com 27,61%. Com o aumento do tempo para 10 min, houve uma pequena queda na conversão em XOS, que foi de 28,77%, enquanto a conversão em xilose aumentou para 34,46%. No tempo de reação de 15 min, a percentagem de conversão em XOS mudou apenas ligeiramente para 28,15%, enquanto a conversão da xilana em xilose teve um incremento para 40,94%.

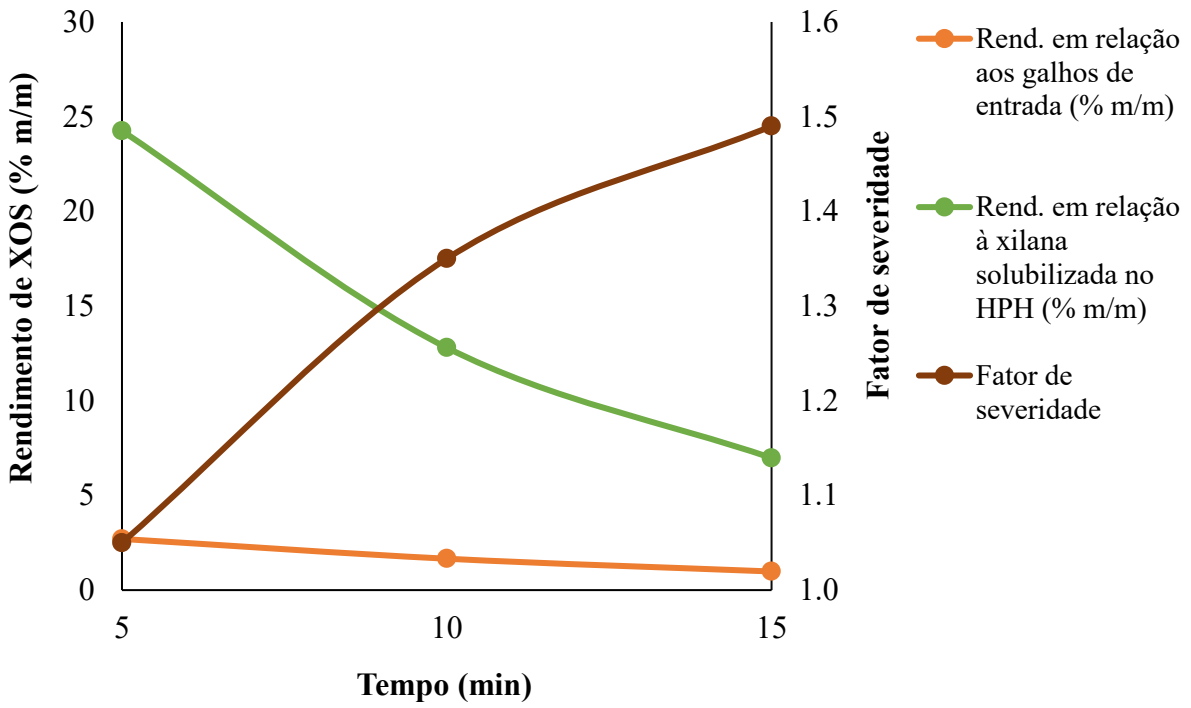
Por outro lado, os oligômeros de arabinose e sua unidade monomérica apresentaram valores de 9,28% a 10,92%, e a conversão nesses compostos aumentou com o incremento do tempo de reação. Observou-se também que a degradação da xilana em furfural aumentou de 1,39% em 5 min para 2,27% em 10 min e 3,27% em 15 min.

Comparando os resultados obtidos no presente estudo com outras pesquisas, CARVALHO et al., (2018) avaliou a produção de XOS a partir do bagaço utilizando dois métodos diferentes: PTD em autoclave e em reator pressurizado. Para o primeiro método, foram testadas duas temperaturas (121°C e 132°C) por 60 min e 0,1% de H_2SO_4. Para o segundo método, foram utilizadas duas concentrações de ácido (0,1% e 0,5% de H_2SO_4) e duas temperaturas (130°C por 30 min e 150°C por 15 min). Os rendimentos obtidos na conversão de xilana em XOS foram de 12,8% e 25% no método de autoclave e 2,3%, 5,7% e 24,9% no método de reator pressurizado. Estes resultados foram inferiores aos obtidos pelo PTD das cascas nas três condições estudadas no presente trabalho, porém, a conversão máxima atingida pelo bagaço foi maior do que a percentagem máxima alcançada utilizando os galhos como matéria-prima.

Enquanto, os resultados obtidos do rendimento da conversão de xilana em XOS dos galhos e cascas de eucalipto foram menores do que os reportados por MARCONDES; MILAGRES; ARANTES, (2020) para o PTD do bagaço de cana feito em duas etapas. Onde foram atingidos valores máximo de 36,76% e 40,21% com 0,5% e 1% de H_2SO_4, nas temperaturas de 170 °C e 150ºC por tempos de 5,5 e 15 min, respectivamente.

A seguir, nas Figura 38 e Figura 39 estão apresentados os resultados dos rendimentos dos XOS em relação a quantidade de matéria-prima utilizada em cada uma das reações, assim como em relação à xilana solubilizada no HPH.

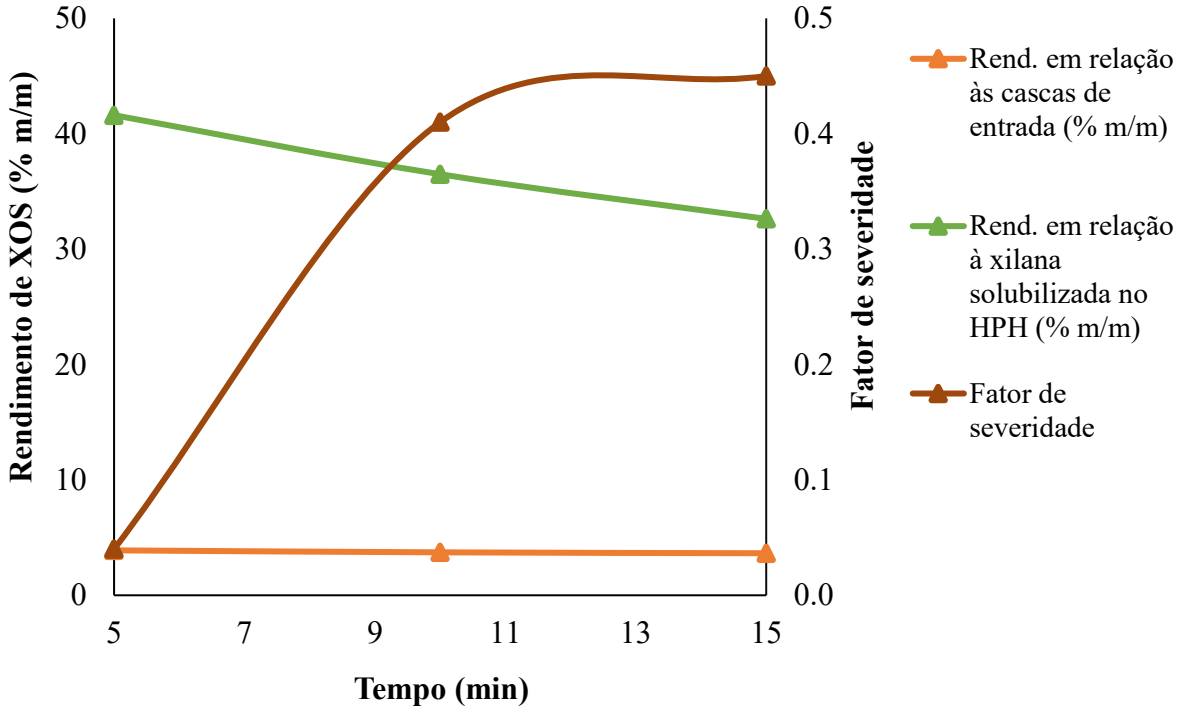
Figura 38. Rendimentos de XOS calculados em relação à biomassa de entrada e na xilana solubilizada no HPH a partir do PTD dos galhos.



Os resultados obtidos indicaram que PTD dos galhos resultou em um baixo rendimento máximo de XOS em relação à quantidade de biomassa de entrada na reação, atingindo apenas 2,70%. O máximo rendimento em relação à quantidade de xilana solubilizada no HPH foi de 24,25%, também inferior aos valores alcançados pelo PTH nas temperaturas de 175°C e 190°C. Além disso, os rendimentos de XOS foram significativamente reduzidos com o aumento do fator de severidade no PTD, atingindo apenas 0,98% e 6,98% em relação à biomassa de entrada e no HPH, respectivamente, após um tempo de reação de 15 min. Esses valores foram inferiores aos obtidos pelos galhos nas condições de pré-tratamento na ausência de ácido para as maiores severidades (3,79 - 4,27).

Os resultados também demonstraram que o PTD causou uma degradação significativa da xilana em xilose nos galhos, indicando que o uso de ácido diluído no pré-tratamento foi mais severo na biomassa dos galhos do que nas amostras das cascas. Além disso, a variação do tempo de reação foi um fator crítico na formação de XOS nos HH deste tipo de resíduo. Os resultados obtidos sugerem que no PTD dos galhos provavelmente devem ser utilizados a combinação de fatores que resultem em severidades menores do que as estudadas neste trabalho.

Figura 39. Rendimentos de XOS calculados em relação à biomassa de entrada e na xilana solubilizada no HPH a partir do PTD das cascas.

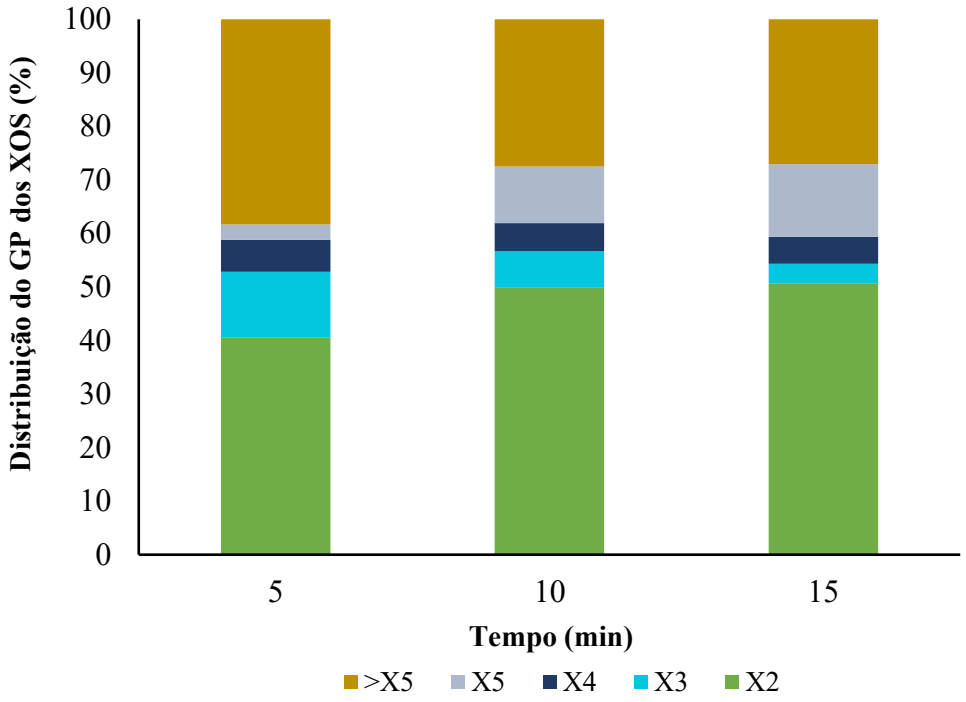


Durante a análise das amostras de cascas, foi constatado que, nos intervalos de tempo de 5 a 15 min, os rendimentos de XOS em relação à quantidade de biomassa utilizada apresentaram uma média de 3,9% a 3,7%. Já os rendimentos de XOS em relação à xilana solubilizada nos HPH foram de 41,61% aos 5 min, 36,49% aos 10 min e 32,62% aos 15 min. Esses resultados indicam que o tempo de reação é um fator crucial para a conversão eficiente da xilana em diferentes produtos, e que é fundamental ajustar as condições de reação para obter altos rendimentos de XOS ou xilose, dependendo das necessidades do processo.

Um outro trabalho utilizando a madeira de eucalipto (*E. globulus)* no PTD foi reportada por LÓPEZ et al., (2014). Nesse estudo, foram testadas concentrações de H_2SO_4 de 0,5%, 1,25% e 2%, em períodos de 30 a 60 min nas temperaturas de 130ºC a 170 °C. Os rendimentos de XOS obtidos variaram de 0,38% a 6,93%, sendo que a máxima solubilização da biomassa em XOS foi alcançada a 150 °C, 30 min e concentração de H_2SO_4 em 1,25%. Os rendimentos obtidos no presente estudo para as amostras dos galhos e cascas foram inferiores aos encontrados por LÓPEZ et al., (2014). Isso pode estar relacionado às diferenças na composição da matéria-prima e nas condições experimentais utilizadas em cada estudo.

Na Figura 40 e Figura 41 estão apresentadas as percentagens de distribuição do GP dos XOS para cada HH produzido a partir do PTD dos galhos e cascas.

Figura 40. Distribuição do GP dos XOS presentes nos HH produzidos pelo PTD dos galhos.



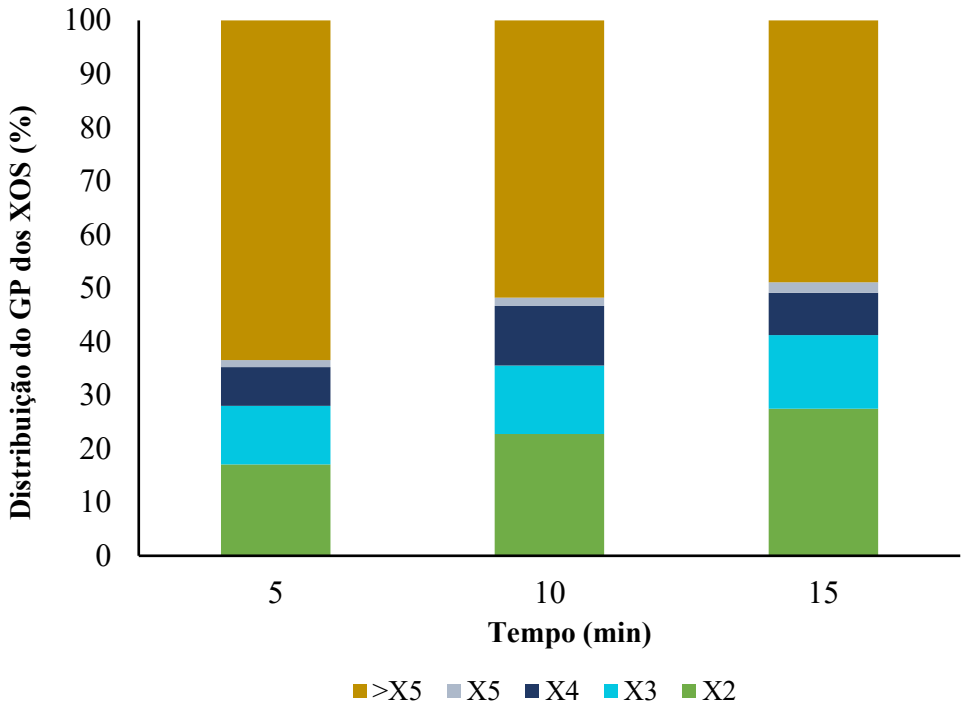
Dentro da distribuição do GP dos XOS os resultados revelaram que o X2 é o principal composto presente nos XOS produzidos pelo PTD dos galhos em todos os tempos de reação, com a sua percentagem aumentando significativamente com o incremento do tempo de reação. Na condição inicial, o X2 representou 40,51% das moléculas, aumentando para 49,87% e 50,69% nos tempos de reação de 10 e 15 min, respectivamente. Além disso, foi observado que os XOS com tamanho de cadeia de 5 também aumentaram com a variação do tempo de reação, com os X5 apresentando valores de 2,86%, 10,64% e 13,60% em 5, 10 e 15 min, respectivamente.

Em contrapartida, os compostos X3, X4 e >X5 apresentaram diminuição significativa com o incremento do tempo de reação. A concentração de X3 reduziu de 12,34% em 5 min para 6,78% e 3,67% em 10 e 15 min, respectivamente. Os valores de X4 foram 6,00%, 5,26% e 4,97% nos tempos de 5, 10 e 15 min, respectivamente. Enquanto os XOS de maior tamanho de

cadeia (>X5) corresponderam ao segundo componente de maior presença nos três tempos de reação, com valores de 38,30% em 5 min, 27,46% em 10 min e 27,07% no tempo de 15 min.

Com relação aos tamanhos de cadeia de interesse como X2, nos tempos de 5 e 10 min os galhos atingiram concentrações de X2 de 1,23 g/L e 0,92 g/L, respectivamente, sendo esta maior em comparação com a melhor condição obtida pelo PTH dos galhos, que apresentou apenas 0,62 g/L (6,82%).

Figura 41. Distribuição do GP dos XOS presentes nos HH produzidos pelo PTD das cascas.



Na análise de distribuição do GP dos XOS produzidos a partir das cascas, observou-se que os X4 e XOS com tamanho maior do que 5 (>X5) sofreram diminuição quando o tempo de reação foi aumentado. Apesar da queda na percentagem de distribuição dos >X5, estes foram os componentes de maior presença nos HH durante o PTD, representando 63,47%, 51,76% e 48,89% das frações nos tempos de 5, 10 e 15 min, respectivamente. Já os X4 tiveram uma presença inicial de 7,92% no tempo de 5 min, que aumentou para 11,01% no tempo de 10 min, porém diminuíram para 7,92% com 15 min de reação.

Enquanto as demais frações analisadas como X2, X3 e X5, tiveram suas percentagens de distribuição aumentadas com o aumento do tempo de reação. Os X2 foram o segundo maior componente das frações de XOS nos HH, iniciando com 17,08% e atingindo 27,44% no tempo

de 15 min. Os X3 tiveram um incremento de 10,93% para 13,76% no mesmo período, entretanto os X5 apresentaram um pequeno incremento de 1,28% para 1,99%.

Nos três HH das cascas produzidos utilizando ácido diluído na reação foram detectados maiores concentrações de XOS de menor tamanho de cadeia como X2 e X3 do que os obtidos na melhor condição de PTH do mesmo resíduo. As concentrações de X2 obtidas no PTD foram de 0,75 g/L, 0,93 g/L e 1,10 g/L, ao mesmo tempo que X3 foi produzida em concentrações de 0,48 g/L, 0,52 g/L e 0,55 g/L nos tempos de 5, 10 e 15 min, respectivamente. Em contraste, durante o PTH, as cascas apresentaram apenas 0,31 g/L de X2 e 0,25 g/L de X3, utilizando 20 min de reação e 175 °C.

Os XOS com tamanho de cadeia de 2 e 3 (X2 e X3) são considerados como moléculas de maior interesse no mercado, devido às suas propriedades biológicas e seu potencial prebiótico (CARVALHO et al., 2018; UÇKUN KIRAN; AKPINAR; BAKIR, 2013). Assim, o presente estudo apresenta uma importante contribuição, pois por meio do PTD dos resíduos de eucalipto foi possível obter maiores frações de X2 e X3 em curtos tempos de reação do que as atingidas por meio do PTH. Além disso, em condições não otimizadas, os XOS totais produzidos pelas cascas mostraram uma proximidade moderada com os resultados previamente atingidos no PTH.

3.3.2.3. Desacetilação e PTC

A hemicelulose proveniente de madeiras hardwood, como o eucalipto, é geralmente considerada como uma fração acetilada, assim como em alguns outros tipos de biomassa (INALBON; MOCCHIUTTI; ZANUTTINI, 2009). Sendo que, a remoção de grupos acetila da biomassa é conhecida como desacetilação e pode ser realizada através do pré-tratamento alcalino (LIMA et al., 2018a).

O pré-tratamento alcalino pode promover mudanças significativas no material, como por exemplo, quebrar as ligações éter entre a lignina e a hemicelulose, como também as ligações éster entre a lignina, a hemicelulose e os ácidos ferúlico e p-cumárico. Além disso, é possível aumentar a acessibilidade à parede celular da biomassa, diminuir a cristalinidade da celulose e aumentar a área de superfície. Adicionalmente, a redução do conteúdo de acetil e ácidos

urônicos na fração da xilana pode diminuir o possível efeito inibitório na etapa de hidrólise enzimática (CARVALHO et al., 2015; JAYAPAL et al., 2013; QING et al., 2013).

Neste trabalho, o principal objetivo de realizar o pré-tratamento alcalino foi remover parcialmente os grupos acetila presente nos galhos e cascas de eucalipto, uma vez que uma quantidade residual pode auxiliar na hidrólises da hemicelulose. Dessa forma, o ensaio foi conduzido como uma etapa preliminar para avaliar o efeito da desacetilação dos resíduos de eucalipto na produção de XOS pelo PTH.

Os parâmetros utilizados na desacetilação, como temperatura, tempo de reação e concentração de NaOH, foram baseados nos resultados previamente obtidos dentro do projeto temático (FAPESP /BBSRC *"An integrated approach to explore a novel paradigm for biofuel production from lignocellulosic feedstocks"*, processo: 15/50612-8) do qual este trabalho encontra-se inserido, e reportados por BRENELLI et al., (2020). Portanto, ambas frações dos resíduos de eucalipto foram submetidas a um tratamento alcalino com 80 mg de NaOH/ g de biomassa (8% m/m), a uma temperatura de 60 ºC por 30 min, com uma carga de sólidos de 10% m/m. Os resultados dos rendimentos das frações sólidas obtida após a etapa de desacetilação, assim como sua caracterização química encontram-se descritos na Tabela 13.

Tabela 13. Rendimento e composição química da fração sólida obtida na etapa de desacetilação dos galhos e cascas.

Amostra	**Rendimento da fração sólida (% m/m)**	**Remoção de grupos acetila (% m/m)**	**Composição química da fração sólida pré-tratada (% m/m)**			
			Celulose	**Hemicelulose**	**Lignina**	**Cinzas**
Galhos	91,95 ± 0,18	83,55 ± 0,11	49,15 ± 0,46	16,00 ± 0,30	28,38 ± 0,34	0,68 ± 0,00
Cascas	74,79 ± 0,18	64,54 ± 0,69	58,05 ± 0,62	14,82 ± 0,51	20,26 ± 0,23	3,86 ± 0,16

Durante a etapa de desacetilação dos resíduos de eucalipto, observou-se uma diferença acentuada no rendimento da fração sólida entre os galhos e as cascas. Os galhos apresentaram um rendimento de 91,95 ± 0,18%, enquanto as cascas apresentaram um rendimento de 79,79 ± 0,18 %, indicando uma maior solubilização da biomassa nas cascas. Nos galhos, a perda de massa nas fração sólida foi principalmente devido à solubilização da hemicelulose (10,77%), seguida da lignina (6,31%), cinzas totais (3,92%) e a celulose foi o componente que apresentou menor solubilização no licor (2,14%).

Já nas cascas, os compostos estruturais, como hemicelulose e celulose, foram mais afetados pelo pré-tratamento alcalino, com remoções de 16,51% e 15,86%, respectivamente. A lignina apresentou baixa solubilização sendo de 6,02%, semelhante à observada nos galhos. Estes resultados são consistentes com a literatura, que sugere que em condições de baixa severidade, a maioria dos grupos acetil da biomassa é removida, juntamente com uma pequena fração da lignina. No entanto, em condições mais severas, ocorre uma deslignificação mais intensa do material (LIMA et al., 2018a). A remoção de compostos não estruturais, como as cinzas totais, foi mais significativa nas cascas em comparação com os galhos. Sendo que, nas cascas foi reduzido uma grande parte destes compostos sendo atingido 67,89% de solubilização das cinzas no licor.

Por outro lado, foi observado que tanto os galhos quanto as cascas sofreram alterações estruturais na fração da lignina após a desacetilação. No material in-natura, a maior parte da lignina (92,24% nos galhos e 85,82% nas cascas) era insolúvel, enquanto uma porção menor (7,76% nos galhos e 14,18% nas cascas) era solúvel. Após a desacetilação, houve uma redução no teor de lignina insolúvel em ambas as amostras, com valores de 88,85% nos galhos e 82,55% nas cascas, enquanto a lignina solúvel correspondeu a 11,15% nos galhos e 17,45% nas cascas. Essa variação na composição da lignina indicam que a desacetilação teve o efeito de tornar parte da lignina mais solúvel durante o pré-tratamento alcalino das duas biomassas. Esse resultado é positivo, pois as alterações na composição da lignina podem influenciar a eficiência e seletividade dos processos de conversão e valorização da biomassa em diferentes aplicações.

Com relação à eficiência da remoção de grupos acetila, o pré-tratamento alcalino teve um maior impacto na desacetilação das amostras dos galhos, com uma remoção média de 83,55 ± 0,11%. Nas amostras das cascas, a remoção média foi de 64,54 ± 0,69%. Os licores obtidos pelo pré-tratamento alcalino apresentaram concentrações de ácido acético de 4,60 g/L no licor produzido pelos galhos e 2,51 g/L no licor das cascas. Além disso, na condição de desacetilação

estudada, foram detectados pequenos conteúdos de XOS (0,48 ± 0,02 g/L) nos licores alcalinos dos galhos, enquanto nas cascas foram observados apenas oligômeros de arabinose (0,47 ± 0,03 g/L). O conteúdo de açúcares monoméricos foi de 0,13 ± 0,01 g/L nos galhos e de 3,19 ± 0,17 g/L nas cascas.

Após a etapa de desacetilação, as frações sólidas obtidas foram caracterizadas para determinar sua composição química, tanto nas amostras dos galhos quanto nas cascas. As concentrações de ácidos orgânicos foram abaixo do limite de deteção em ambas as amostras. Os galhos apresentaram uma composição de 49,15 ± 0,46% de celulose, 16,00 ± 0,30% de hemicelulose, 28,38 ± 0,34% de lignina e 0,68 ± 0,00% de cinzas totais. Enquanto isso, as cascas apresentaram uma composição de 58,05 ± 0,62% de celulose, 14,82 ± 0,51% de hemicelulose, 20,26 ± 0,23% de lignina e 3,86± 0,16% de cinzas totais.

A perda de hemicelulose nas amostras dos galhos foi próxima à reportada por JAYAPAL et al., (2013) para o pré-tratamento alcalino do bagaço de cana. Nesse estudo, a remoção da fração da hemicelulose variou entre 9,15% e 11,91% em reações com 8% e 12% de NaOH, respectivamente.

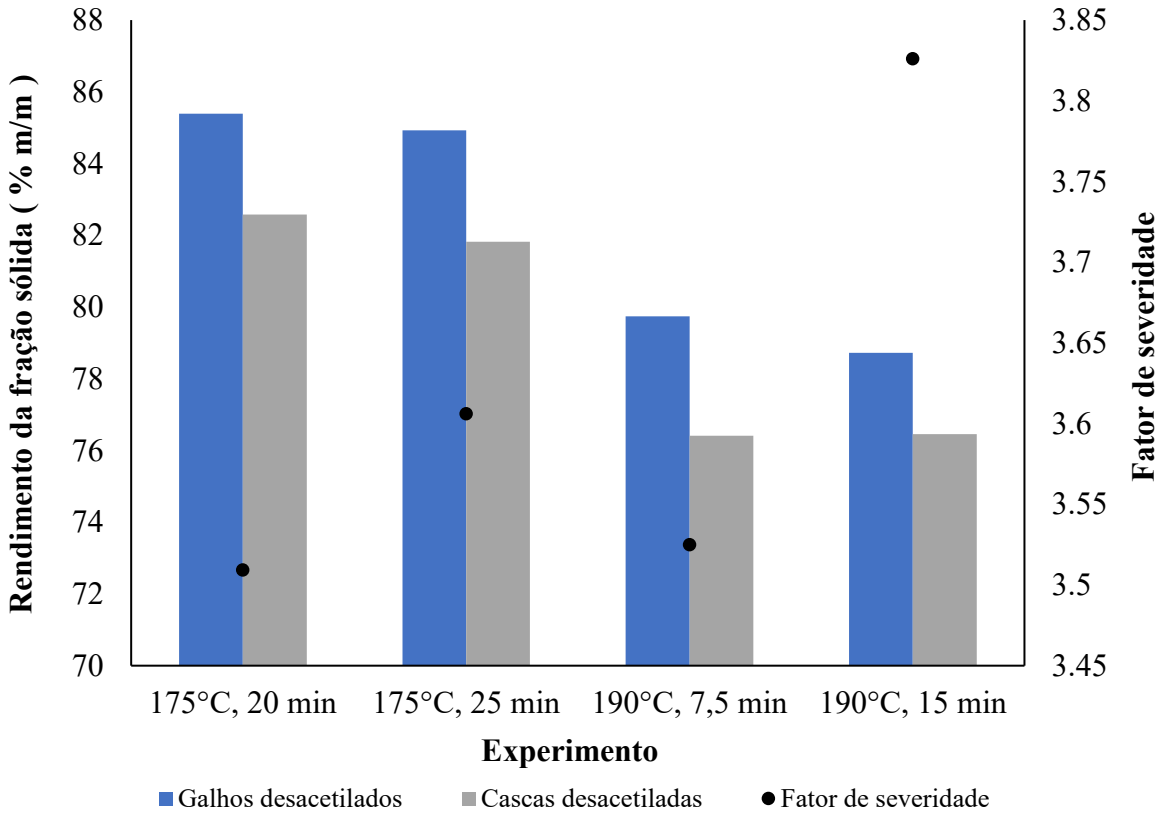
Quanto à remoção de grupos acetila, os resultados obtidos para os galhos e cascas foram similares aos reportados por CHEN et al., (2012) para a desacetilação da palha de milho, em que a desacetilação foi avaliada nos intervalos de temperatura de 60 ºC e 80 ºC, no tempo de reação de 20 min e concentração de NaOH foi de 0,4% m/m. Nesse estudo, a remoção de grupos acetila na palha de milho foi de 73% na temperatura de 60 ºC e a percentagem de remoção aumentou para 80% na temperatura de 80 ºC. Em comparação com BRENELLI et al., (2020), que realizaram a desacetilação da palha de cana nas mesmas condições deste trabalho e atingiram uma remoção de 80% dos grupos acetila. Os galhos de eucalipto apresentaram uma percentagem de remoção de grupos acetila similar, porém nas cascas a remoção foi menor do que as obtidas para os galhos e a reportada para a palha de cana.

Em geral, os resultados obtidos pela desacetilação dos resíduos de eucalipto indicam que o pré-tratamento alcalino foi eficiente na remoção de grupos acetila, com diferenças observadas entre os galhos e cascas em termos de solubilização da biomassa e na composição dos licores produzidos. Além disso, tanto os resultados obtidos quanto os dados reportados pela literatura sugerem que a eficiência da desacetilação pode depender do tipo de biomassa

empregado no pré-tratamento e não apenas dos parâmetros escolhidos na reação (temperatura, tempo e concentração de NaOH).

Por outro lado, após a desacetilação dos resíduos de eucalipto, a recuperação de XOS foi avaliada pelo PTC. Nesta etapa, o meio reacional consistiu em 10% m/m de cada fração sólida obtida na etapa de desacetilação e tratada com água a altas temperaturas (175 ºC e 190 ºC, em tempos de retenção de 20 a 25 min e 7,5 a 15 min, respectivamente). Os rendimentos das frações sólidas obtidas após a etapa de PTC dos galhos e cascas, relacionados com o fator de severidade de cada condição de ensaio estão apresentados na Figura 42.

Figura 42. Rendimento da fração sólida obtida pelo PTC dos galhos e cascas de eucalipto.



O pré-tratamento de galhos e cascas de eucalipto utilizando o PTC resultou em rendimentos significativamente superiores das frações sólidas pré-tratadas em comparação com os outros dois métodos de pré-tratamento (PTH e PTD) utilizados na biomassa in-natura (sem desacetilar). Observou-se que o aumento do tempo de tratamento em cada faixa de temperatura para ambos os resíduos apresentou pouca variação na percentagem de solubilização da fração

sólida. Especificamente, os galhos apresentaram rendimentos de aproximadamente 85% a uma temperatura de 175 ºC, e de 80 e 79%, respectivamente, a uma temperatura de 190 °C. Em contrapartida, as cascas apresentaram maior perda de massa em comparação com as amostras dos galhos em ambos os intervalos de temperatura. A 175 °C, as percentagens de rendimento encontradas foram entre 83 e 82%, respectivamente, enquanto na faixa de temperatura de 190 °C, as percentagens de recuperação da fração sólida foram de aproximadamente 76%. As percentagens de solubilização da fração da hemicelulose e lignina pelo PTC, bem como a composição da fração sólida pré-tratada dos galhos e cascas estão descritos na Tabela 14.

Tabela 14. Solubilização das frações da hemicelulose e lignina e composição química dos galhos e cascas obtidos pelo PTC.

Amostra	Temperatura (°C)	Tempo (min)	HH		Composição Química da biomassa pré-tratada (% m/m)			
			Solubilização da hemicelulose (% m/m)	Solubilização da lignina (% m/m)	Celulose	Hemicelulose	Lignina	Cinzas
Galhos								
PTC-G01	175	20	47,20	10,85	58,54 ± 0,25	10,20 ± 0,94	30,54 ± 0,67	0,47 ± 0,02
PTC-G02		25	50,31	9,03	58,52 ± 0,59	9,65 ± 0,54	31,34 ± 1,45	0,48 ± 0,00
PTC-G03	190	7,5	56,85	19,08	61,40 ± 0,79	8,94 ± 0,03	29,72 ± 0,13	0,33 ± 0,02
PTC-G04		15	64,08	19,41	61,68 ± 0,77	7,51 ± 0,49	29,87 ± 1,02	0,31 ± 0,01
Cascas								
PTC-C01	175	20	36,21	31,25	68,70 ± 0,84	11,89 ± 0,07	17,52 ± 0,41	2,28 ± 0,09
PTC-C02		25	39,51	25,12	67,17 ± 0,79	11,40 ± 0,20	19,29 ± 1,34	2,46 ± 0,07
PTC-C03	190	7,5	51,81	35,32	70,30 ± 1,08	9,69 ± 0,16	17,79 ± 0,85	2,46 ± 0,13
PTC-C04		15	55,00	33,88	69,98 ± 1,30	9,06 ± 0,17	18,20 ± 0,07	2,76 ± 0,13

Ao analisar a Tabela 14, foi possível observar que os galhos apresentaram uma recuperação maior da fração da hemicelulose no licor quando comparado às cascas. Os galhos obtiveram uma solubilização de 47,20% no início dos experimentos, que aumentou para 64,08% no ensaio com maior severidade. Já as cascas apresentaram percentagens de solubilização da hemicelulose entre 36,21% e 55%, nos ensaios de menor e maior severidade, respectivamente.

Além disso, os resultados mostraram que a remoção de grupos acetil atingida na etapa de desacetilação de cada resíduo seguido do PTC, promoveu uma baixa recuperação ou solubilização da fração da hemicelulose no licor em comparação com os resultados obtidos no PTH, sem passar pela etapa de desacetilação. Uma vez que sob as mesmas condições de ensaio nos resíduos in-natura (PTH: G03 - G06 e C03 – C06), as percentagens de solubilização foram de aproximadamente 65% a 87% nos galhos e aproximadamente 77% a 88% nas cascas, respectivamente.

Com relação à solubilização da fração da lignina, os galhos apresentaram uma remoção máxima de até 19,41% a 190 ºC com 15 min, valor menor do que o alcançado nas amostras das cascas, que corresponderam a 35,32% no mesmo intervalo de temperatura, mas com 7,5 min de tempo de reação. Nos ensaios PTC-G02 e PTC-C02 e C04, foi observada a formação de pseudo-lignina na fração sólida obtida após o PTC, o que resultou em uma queda nas percentagens de solubilização da lignina.

Ao comparar os resultados da biomassa sem desacetilar, a combinação do pré-tratamento alcalino seguido do tratamento hidrotérmico favoreceu a solubilização da lignina nas cascas, apresentando uma alta remoção deste componente da fração sólida, pois os valores alcançados foram superiores aos obtidos na biomassa apenas utilizando uma etapa de pré-tratamento (PTH), a qual apresentou percentagens de remoção da lignina de 3% a 6% nos mesmos intervalos de temperatura e tempo. Porém, o PTC nas amostras dos galhos não apresentou um aumento da remoção da lignina em relação aos dados obtidos no PTH dos galhos in-natura, que apresentaram uma remoção de até 38,72% a 175 ºC no tempo de 25 min.

Quanto à composição química das frações sólidas geradas após o PTC em cada condição de ensaio avaliada por este método, tanto os galhos quanto as cascas pré-tratadas apresentaram um alto conteúdo de componentes estruturais (celulose, hemicelulose e lignina). Portanto, esses

resíduos recuperados podem ser reaproveitados em outros processos como uma fonte de matéria- prima para obtenção de subprodutos, como por exemplo açúcares C5, C6, e derivados da lignina.

A seguir, na Figura 43 e Figura 44 estão apresentados os resultados da conversão da fração da arabinoxilana em açúcares monoméricos e oligômeros, bem como em compostos de degradação, em função do fator de severidade. As percentagens de conversão foram determinada em relação à quantidade de arabinoxilana presente na biomassa de entrada em cada uma das condições de ensaio.

Figura 43. Solubilização da xilana em arabinose e seus oligômeros, XOS, xilose e furfural pelo PTC dos galhos.

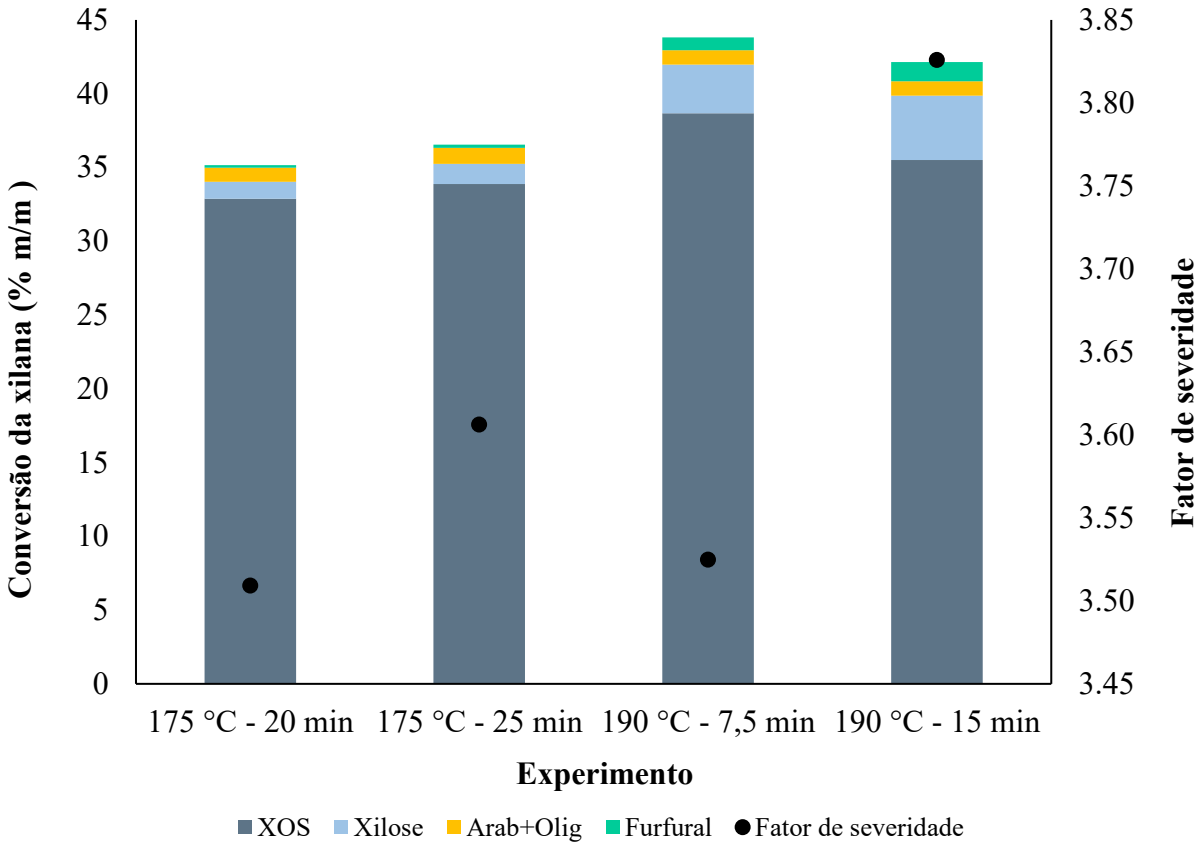
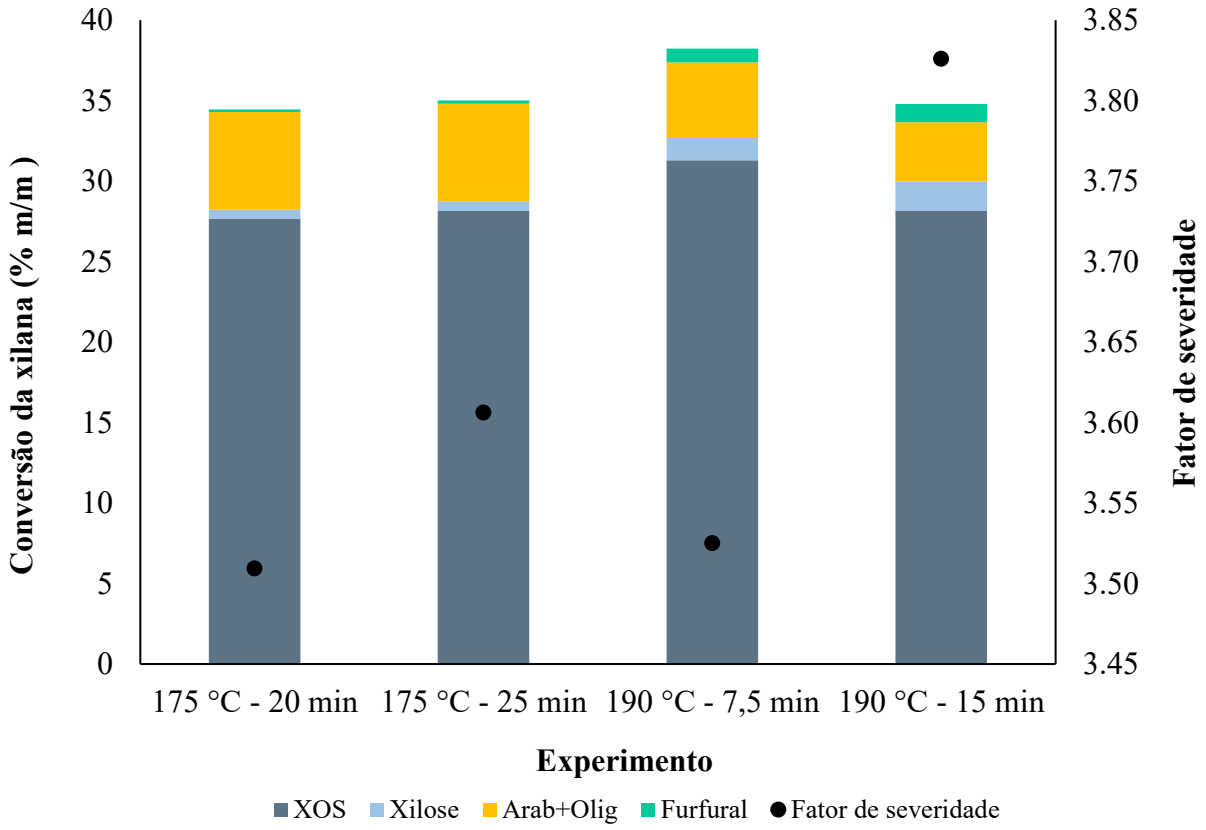


Figura 44. Solubilização da xilana em arabinose e seus oligômeros, XOS, xilose e furfural pelo PTC das cascas.



A conversão da arabinoxilana durante o PTC dos resíduos de eucalipto se deu principalmente na forma de XOS em ambos os tipos de resíduos. Entretanto, os galhos foram a matéria-prima que apresentou maior hidrólise dessa fração em oligômeros de xilose, com um valor de 38,67%, frente a 31,29% alcançado pelas cascas. Nas condições de ensaio estudadas, os galhos e cascas mostraram o mesmo comportamento na obtenção dos XOS, sendo que na temperatura de 175 ºC os XOS apresentaram um pequeno incremento com o aumento do tempo de 20 min para 25 min. Já na temperatura de 190 °C com 7,5 min (severidade de 3,52) foram atingidas as maiores conversões em XOS, as quais diminuíram para 35,51% nos galhos e 28,17% nas cascas quando o tempo foi aumentado para 15 min (severidade de 3,83).

Por outro lado, foi observada uma diferença significativa na formação de xilose e em arabinose e seus oligômeros. A xilose apresentou uma maior presença nos HH dos galhos, sendo este o segundo componente de maior presença neste resíduo com valores de 1,14%, que aumentaram com o aumento da temperatura e/ou do tempo até atingir 4,6%. Já nos HH das

cascas, a xilose teve percentagens de conversão de 0,55% até 1,81% na maior severidade, enquanto o segundo componente de maior presença neste resíduo foi a arabinose e seus oligômeros, com valores aproximadamente de 6,07% na temperatura de 175 °C, que diminuíram para 4,69% e 3,69% em 190 ºC com 7,5 min e 15 min de reação, respectivamente. Nos galhos, a formação de arabinose e oligômeros de arabinose foi no máximo de 1,08%, obtido no ensaio com 175 °C e 25 min, enquanto a menor percentagem obtida foi de aproximadamente 0,97% no tempo de 20 min, valor que foi igual para os dois ensaios feitos na temperatura de 190 °C.

Enquanto a hidrólise da arabinoxilana em compostos de degradação, como o furfural, apresentou o mesmo comportamento e valores próximos de conversão entre os dois resíduos, o furfural foi incrementado com o aumento das condições de reação (tempo e/ou temperatura). Nos galhos, as percentagens de conversão em furfural foram de 0,16% até 1,32%, enquanto nas cascas a conversão em furfural foi de 0,16% até 1,13%. Os resultados obtidos mostraram que o método de PTC foi mais eficiente do que o método de PTD para converter a xilana em XOS em ambos os resíduos, galhos e cascas. No entanto, foram observadas diferenças significativas nas conversões da fração da arabinoxilana em XOS no PTC dos galhos em comparação com o PTH dos galhos sem desacetilar (50% e 42%), usando os mesmos intervalos de temperatura e tempo.

Em contraste, no PTC das cascas, não foi observada uma diferença tão acentuada na percentagem máxima de conversão da xilana em XOS do que a alcançada pelas cascas sem desacetilar empregando o método de PTH (39,59%, a 175 ºC/ 25 min). Além disso, foi observado que no intervalo de temperatura de 190 ºC e nos tempos de 7,5 e 15 min, as cascas desacetiladas apresentaram maiores percentagens de XOS (31,29% e 28,17%) do que os valores atingidos na casca sem passar pela etapa de desacetilação e tratados pelo PTH (22,28% e 17,78%). Isso pode ser explicado pelo fato de que os resíduos das cascas, durante a etapa de pré-tratamento alcalino, sofreram menor remoção de grupos acetil do que os galhos, e, portanto, o conteúdo remanescente de grupos acetil nas cascas serviu como catalisador para hidrolisar a fração da xilana em XOS, alcançando uma conversão máxima de XOS próxima à atingida na casca sem passar pela desacetilação e tratados pelo PTH.

Em contrapartida, a limitada disponibilidade de grupos acetila nos galhos foi ineficiente para promover uma maior solubilização da hemicelulose e atingir uma maior conversão de fração da xilana nos compostos desejados (XOS). Além disso, a remoção parcial de grupos

acetila de ambos os resíduos também resultou em um aumento da temperatura de reação durante o PTC, já que tanto os galhos quanto as cascas, pelo PTC, alcançaram os maiores rendimentos em XOS na temperatura de 190 ºC frente ao método de PTH dos resíduos in-natura (sem desacetilar) que produziram os maiores conteúdos de XOS, bem como maiores percentagens de solubilização da hemicelulose e dos sólidos no licor na temperatura de reação de 175 ºC. Isto concorda com o encontrado por VÁZQUEZ et al., (2005), quem descreve que em pré-tratamentos sequenciais, a desacetilação parcial da biomassa durante a primeira etapa de pré-tratamento resulta numa cinética mais lenta no posterior pré-tratamento devido à pouca disponibilidade de catalisador. A composição dos hidrolisados obtidos em diferentes condições durante o PTC dos galhos e cascas de eucalipto está apresentada na Tabela 15.

Tabela 15. Composição dos HH obtidos pelo PTC dos galhos e cascas.

Compostos	**Galhos**				**Cascas**			
	PTC-G01	**PTC-G02**	**PTC-G03**	**PTC-G04**	**PTC-C01**	**PTC-C02**	**PTC-C03**	**PTC-C04**
Glicose	0,02	0,04	0,03	0,03	0,03	0,03	n.d*	n.d*
Celobiose	n.d*	n.d*	n.d*	n.d*	n.d*	n.d*	n.d*	n.d*
HMF	0,02	0,02	0,04	0,05	0,04	0,04	0,06	0,05
Ácido fórmico	0,04	0,04	0,05	0,04	0,02	0,03	0,03	0,03
Ácido levulínico	n.d**	n.d**	n.d**	n.d**	0,73	0,83	1,43	1,70
Xilose	0,24	0,28	0,68	0,89	0,10	0,11	0,27	0,34
Arabinose	0,06	0,06	0,10	0,10	0,18	0,18	0,19	0,21
XOS	5,99	6,14	7,06	6,39	4,63	4,71	5,27	4,70
Furfural	0,02	0,03	0,12	0,17	0,02	0,02	0,11	0,14
Ácido acético	0,22	0,24	0,48	0,59	0,85	0,84	1,27	1,56

n.d*: não detectado, concentração menor do que 50 ppm.

n.d**: não detectado, concentração menor do que 10 ppm.

Foi observado que tanto os HH dos galhos quanto os das cascas apresentaram baixas concentrações de glicose. A quantidade de glicose gerada pelos galhos foi similar à das cascas na temperatura de 175 ºC, mas na temperatura de 190 ºC, a presença deste açúcar não foi detectada nos HH produzidos pelos resíduos das cascas. Os compostos de degradação da fração da celulose, como o HMF e ácido fórmico, foram detectados em baixas concentrações em todos os HH gerados pelo PTC dos dois tipos de resíduos, com valores próximos entre eles. Já ácido levulínico foi detectado apenas nos HH das cascas, com concentrações de 0,73 e 0,83 g/L na temperatura de 175 ºC, e valores mais elevados de 1,43 e 1,70 g/L com o aumento da temperatura para 190 ºC.

As baixas concentrações de açúcares e compostos de degradação da celulose indicaram que as condições avaliadas durante o PTC dos galhos e cascas foram ineficientes ou tiveram um baixo impacto na solubilização da celulose. Isto é respaldado pela diferença na composição química da biomassa desacetilada utilizada como matéria prima para os ensaios de PTC e a composição obtida após a caracterização química dos resíduos sólidos gerados após o PTC. Os resultados mostraram que a celulose remanescente na biomassa pré-tratada dos galhos foi de 98,11% e 96,10% nas temperaturas de 175 ºC e 190 ºC, respectivamente, enquanto nas amostras das cascas essa quantidade variou entre 90,98% e 88,73%.

Com relação às concentrações de açúcares e compostos de degradação da cadeia da hemicelulose, os resultados indicaram que durante o PTC dos galhos e cascas, foram geradas menores concentrações de arabinose, xilose e furfural em comparação com outros métodos de pré-tratamento avaliados. As concentrações de XOS produzidas pelos PTC dos galhos variaram de 5,99 g/L e 7,06 g/L, valores maiores do que o PTD, porém menores do que o PTH. Já nas cascas, as concentrações de XOS atingiram valores de 4,63 g/L a 5,27 g/L, sendo maiores do que o PTD, mas ligeiramente menores do que o valor máximo atingido pelo PTH. Além disso, como era esperado, o ácido acético foi gerado em maiores concentrações nos HH das cascas, uma vez que esta amostra havia sofrido uma menor desacetilação durante a etapa de pré-tratamento alcalino. As concentrações de ácido acético nos HH das cascas pelo PTC foram menores do que no PTH, mas maiores do que o PTD. Por outro lado, em todos os HH produzidos pelo PTC dos galhos, o ácido acético foi formado em menores concentrações em comparação com outros tipos de pré-tratamento da biomassa in-natura avaliados neste trabalho.

Finalmente, as frações de XOS presentes nos HH obtidos pelos ensaios realizados no PTC dos resíduos de eucalipto estão apresentadas na Figura 45 e Figura 46.

Figura 45. Distribuição do GP dos XOS presentes nos HH produzidos pelo PTC dos galhos.

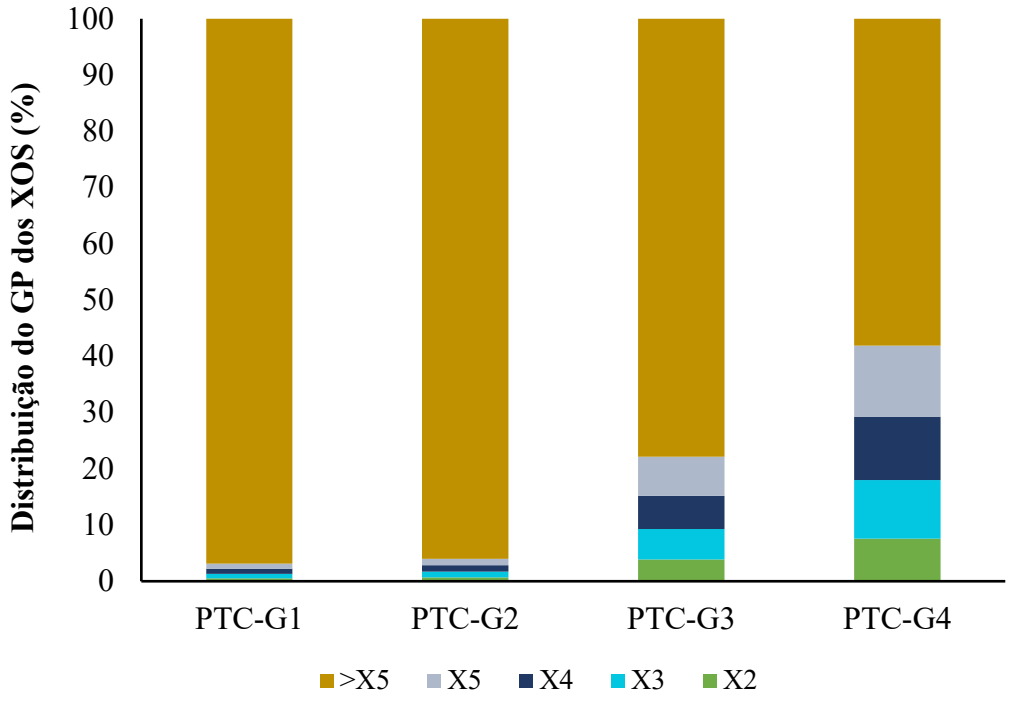
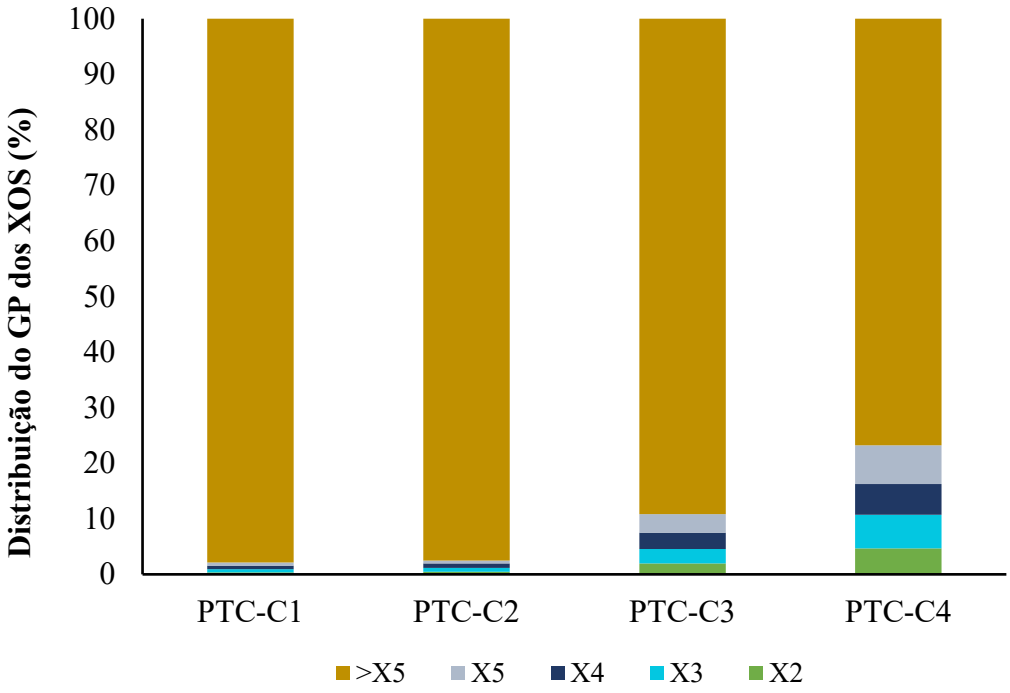


Figura 46. Distribuição do GP dos XOS presentes nos HH produzidos pelo PTC das cascas.



Durante a obtenção dos HH a partir dos resíduos de eucalipto tratados pelo PTC, foi observado que a maioria dos XOS consistia principalmente em oligômeros de xilose de alta massa molecular. Em todas as condições de ensaio avaliadas, os XOS com GP maior que 5

foram os mais abundantes tanto nos galhos quanto nas cascas. A temperatura de 175 ºC apresentou valores similares entre os galhos e cascas, com cerca de 97% - 98%, respectivamente. Esses valores diminuíram com o aumento da temperatura e/ou o tempo, resultando em redução significativa para os galhos (78 - 58,01%) em comparação com as cascas (89 -77%).

Os XOS de GP de X2 a X5 aumentaram em relação à severidade do pré-tratamento. Os galhos apresentaram uma maior percentagem de X4 (0,91-11,28%) em comparação com as cascas (0,65-5,53%), enquanto o X5 variou de 0,88% a 12,64% nos galhos e de 0,55% a 6,96% nas cascas. Em relação aos outros métodos de pré-tratamento estudados, o aumento da severidade do PTC teve pouco efeito na degradação de oligômeros de xilose de maior massa molecular em XOS de menor tamanho como X2 e X3, sendo estes os compostos de menos abundantes nos licores. Nesse sentido, os galhos apresentaram um pequeno aumento na percentagem de X2 (0,53% -7,57%) e de X3 (0,81-10,42%), enquanto nas cascas apresentaram um aumento de X2 de apenas 0,37% para 4,69% e os X3 de 0,55% para 6,03%.

Os ensaios PTC-G3 e PTC-C3 (190 ºC/7,5 min) resultaram nas maiores concentrações de XOS para as biomassas desacetiladas, a concentração das frações de XOS nos licores foi de 1,56 g/L de X2 a X5 e de 5,49 g/L para XOS com GP >X5 nos galhos. Já nas cascas, a concentração das frações X2 a X5 foi significativamente menor, com apenas 0,57 g/L, enquanto a concentração de XOS com GP >X5 foi de 4,70 g/L.

A respeito dos rendimentos de XOS obtidos em relação à quantidade de biomassa desacetilada utilizada para o PTC, observou-se que na temperatura de 190 ºC/7,5 min os rendimentos foram de 6,19% nos galhos e de 4,64% nas cascas, tendo uma diminuição desses rendimentos com o aumento do tempo para 15 min, alcançando valores de 5,68% e 4,47% para os galhos e cascas, respectivamente. Para a temperatura de 175 ºC, os dois tempos avaliados apresentaram rendimentos similares, com valores de 5,26% e 5,42% nos galhos, enquanto nas cascas esses rendimentos foram de 4,10% e 4,17%, próximos aos atingidos no tempo de 15 min com a temperatura de 190 ºC.

Além disso, os rendimentos de XOS em função da xilana solubilizada no HPH foram determinados para os dois resíduos, apresentando valores de 88,11% e 87,20% nos galhos pré-tratados nas condições avaliadas na temperatura de 175 ºC e de 82,88% e 79,06% nos ensaios realizados em 190 ºC. Para as cascas, os rendimentos de XOS quantificados pelo HPH foram

similares na temperatura de 175 ºC (76,04% e 76,06%), e em 190 ºC foram de 77,55% e 76,56%. Os rendimentos calculados pela quantidade de xilana solubilizada no HPH pelo PTC dos galhos e cascas foram maiores do que os obtidos para as mesmas condições durante o PTH das biomassas sem passar pela desacetilação, bem como para a biomassa tratada pelo PTD.

Os HH produzidos nas condições avaliadas no PTC apresentaram uma alta seletividade de XOS sobre a xilose, sendo que os galhos tiveram uma percentagem de seletividade de 96,64% e 96,15% nos tempos de 20 e 25 min à temperatura de 175 ºC. Na temperatura de 190 ºC, as percentagens de seletividade apresentaram uma pequena diminuição para 92,15% em 7,5 min de reação, entretanto, no ensaio feito com 15 min na mesma faixa de temperatura, a seletividade teve uma diminuição mais acentuada, caindo para 89,07%. Já as amostras das cascas apresentara uma maior seletividade para as quatro condições avaliadas (98,06%, 97,93%, 95,75% e 93,95%, respectivamente) do que as obtidas pelos galhos durante o PTC.

Em comparação com os outros métodos de pré-tratamento testados, o PTC das cascas apresentou maiores percentagens de seletividade do que as obtidas em ambos os resíduos sem desacetilar e tratados pelo PTH e PTD. Enquanto os galhos tratados pelo PTC atingiram maiores seletividades de XOS do que as obtidas nas três condições de PTD, porém menores do que as alcançadas pelos galhos sem desacetilar e tratados a 175 ºC por 10 e 15 min durante o PTH.

Os resultados obtidos neste capítulo forneceram informações importantes sobre a eficiência do pré-tratamento dos galhos e cascas de eucalipto em relação à hidrólise da arabinoxilana e permitiram avaliar a influência das condições de operação na obtenção dos produtos de interesse deste trabalho, como os XOS, bem como na composição de outros produtos obtidos a partir dessa fração. Nesse sentido, a pesar da desacetilação prévia dos galhos e cascas pelo pré-tratamento alcalino tenha apresentado relativamente um baixo impacto na solubilização da fração da hemicelulose e tenha apresentado vantagens em termos de diminuição de componentes de degradação, os quais podem apresentar efeito inibitório nas subsequentes etapas, os resultados sugerem que a quantidade remanescente de grupos acetila não foram eficientes para aumentar a conversão de arabinoxilana em XOS nas condições estudadas durante o PTC. Dessa forma, pode ser realizado um estudo utilizando menores faixas de temperatura e/ou tempo para o PTC dos resíduos desacetilados, com o intuito de avaliar a possibilidade de aumentar a concentração de XOS nos licores produzidos.

3.3.3. Balanço de massa do pré-tratamento

O balanço de massa foi apresentado com maior detalhe para as frações obtidas na condição escolhida de pré-tratamento para a produção dos licores ricos em XOS a partir dos resíduos de eucalipto. A Figura 47 e Figura 48 descrevem o esquema das correntes do processo obtidas durante o PTH dos galhos e cascas, respectivamente.

Figura 47. Balanço de massa da obtenção de XOS pelo PTH dos galhos.

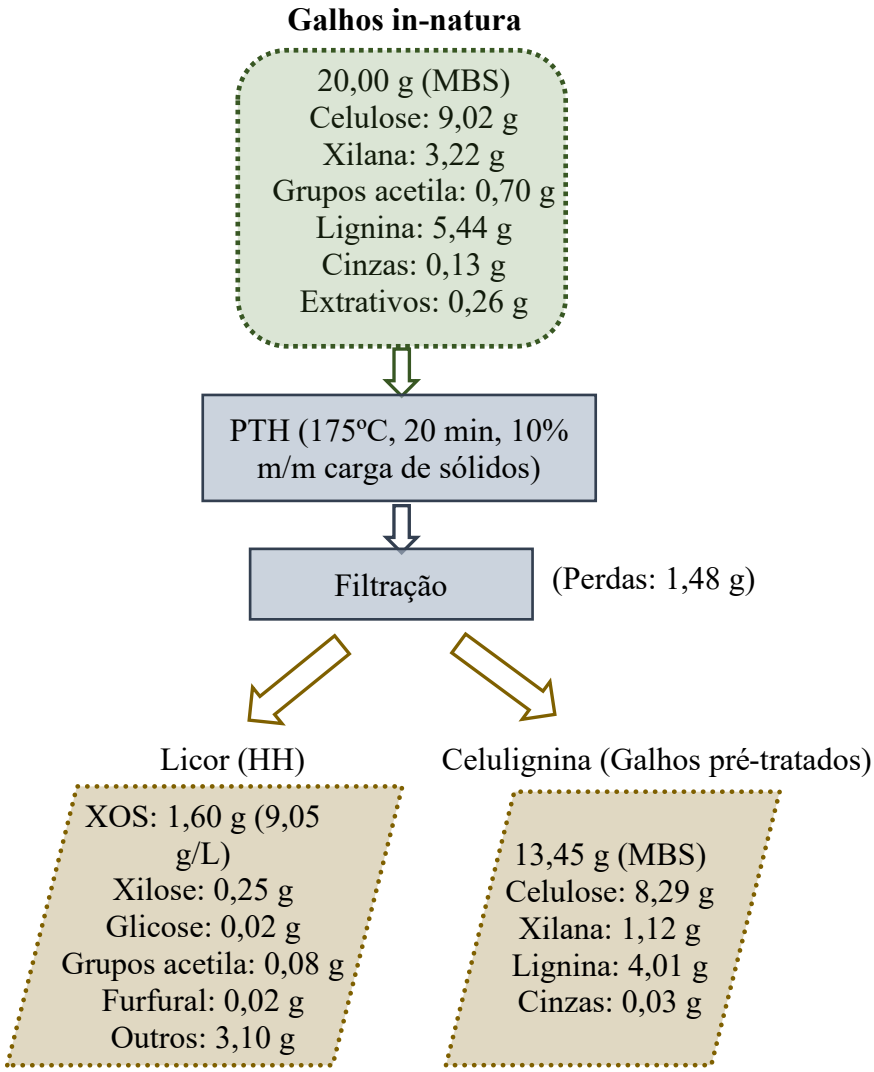
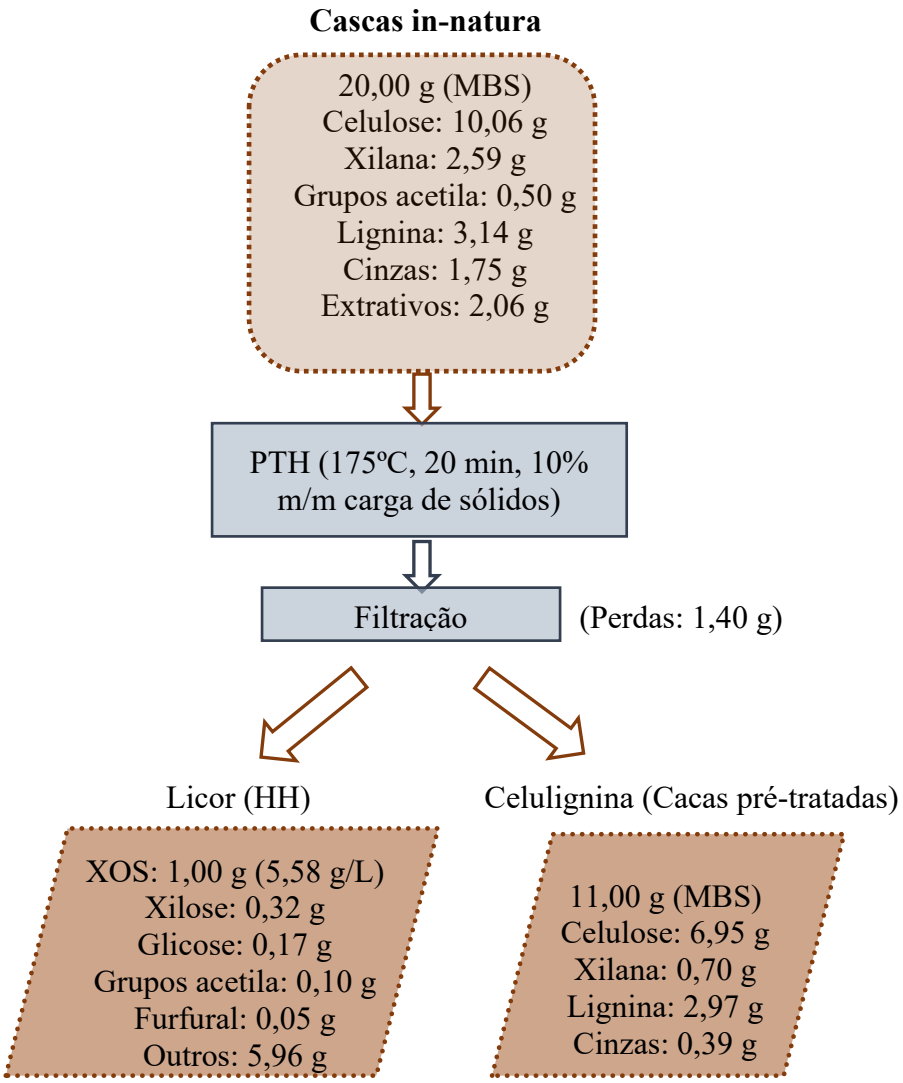


Figura 48. Balanço de massa da obtenção de XOS pelo PTH das cascas.



Determinar a composição química das correntes de processo geradas durante o pré-tratamento é crucial para valorizar a biomassa lignocelulósica (CARVALHO et al., 2018). Durante o pré-tratamento dos resíduos de eucalipto para a produção de XOS, a determinação do balanço de massa do processo pode fornecer informações relevantes sobre os componentes presentes tanto no hidrolisado hemicelulósico quanto na fração sólida pré-tratada, que é considerada um resíduo. Essa biomassa tratada pode ser posteriormente hidrolisada para obtenção de subprodutos valiosos, como celo-oligossacarídeos (COS) (CHU et al., 2014), monossacarídeos, lignina, composto fenólicos e ácidos orgânicos (MODENBACH; NOKES, 2012), oferecendo oportunidades para a coprodução de produtos de valor agregado e bioenergia.

Após a filtração das frações obtidas durante o pré-tratamento, os galhos de eucalipto (in-natura) pré-tratados nas condições de PTH de 175 ºC por 20 min resultaram em uma fração sólida com alto teor de celulose remanescente de 91,92%, juntamente com quantidades consideráveis de lignina (73,69%), xilana (34,67%), e cinzas (23,98%), conforme Figura 47. A recuperação de sólidos após o PTH dos galhos resultou em 13,45 g, contendo 8,29 g de celulose, 4,01 g de lignina, 1,12 g de xilana e 0,03 g de cinzas totais. No licor, foi possível recuperar monômeros de glicose e xilose em 0,02 g e 0,25 g, respectivamente. Além disso, furfural e grupos acetila, totalizaram um conteúdo de 0,10 g. Outros componentes solubilizados no HH, como lignina, cinzas e extrativos, entre outros, corresponderam a 3,10 g. Ademais, 1,60 g de XOS totais foram recuperados no HH, dos quais 0,11 g corresponderam a X2, 0,08 g a X3, 0,10 g a X4, 0,05 g a X5 e 1,26 g às frações de XOS de maior GP (> X5). A partir dos galhos de eucalipto, foram obtidos rendimentos de XOS de 8% em relação à quantidade de biomassa de entrada e de 49,70% em relação à quantidade de xilana contida no material, além de 77,13% em relação à xilana solubilizada no HPH.

Por outro lado, como ilustrado na Figura 48, após o PTH das cascas foram recuperados 11,00 g no resíduo sólido pré-tratado. Esse resíduo é composto de 6,95 g de celulose, 2,97 g de lignina, 0,70 g de xilana e 0,39 g de cinzas, representando percentagens remanescentes de 69,04%, 94,36%, 27,05% e 22,17%, respectivamente. No licor, foram recuperados 0,32 g de xilose, 0,17 g de glicose, 0,10 g de grupos acetila e 0,05 g de furfural. Além disso, outros componentes estruturais e não estruturais da biomassa das cascas foram solubilizados, totalizando 5,96 g. Com relação à produção de XOS, 1,00 g de XOS totais foi recuperado no HH, sendo 0,06 g de X2, 0,04 g de X3, 0,05 g de X4, 0,03 g de X5 e 0,82 g de XOS >X5. Os rendimentos de XOS obtidos a partir das cascas foram de 4,98% em relação às quantidade de cascas de entrada, 38,51% em relação à xilana presente no resíduo e de 63% em relação à xilana quantificada no HPH.

Portanto, a partir de 1 kg de resíduo de eucalipto pré-tratado pode-se obter 80 g de XOS totais a partir dos galhos e 50 g de XOS a partir das cascas. Essas variações nas composições das frações resultantes do pré-tratamento dos galhos e cascas, que foram submetidos ao mesmo processo e às mesmas condições de reação, destacam as características distintivas de cada parte da biomassa.

Os resultados obtidos neste trabalho apresentam um potencial para a exploração dos galhos e cascas para a produção de XOS pelo PTH, uma vez que este método de pré-tratamento

se mostra interessante em virtude que é realizado sem a adição de produtos químicos o que reduz os custos operacionais (VAN DER POL et al., 2015). Além disso, a hidrólise enzimática pode ser empregada posteriormente para aumentar a recuperação de XOS de menor tamanho, como X2 e X3, já que estes compostos são mais valorizados na indústria por apresentarem potencial prebiótico.

Em comparação com a literatura, a produção de XOS obtida pelos galhos supera outras fontes de biomassa, como serragem de álamo (SU et al., 2021), palha de milho (ZHANG et al., 2022), madeira de bétula (ZHU et al., 2022) e bagaço de cana (MONTEIRO et al., 2022). Embora o valor produzido pelas cascas de eucalipto seja menor do que o dos galhos, ainda é comparável aos resultados encontrados em outros estudos, como a partir da planta de bambu (GUO et al., 2022) e dos cavacos de madeira hibrida de eucalipto *E. grandis* × *E. urophylla* (NETO et al., 2020).

Os resultados apresentados neste capítulo demonstram o potencial dos resíduos florestais de eucalipto, provenientes dos processos de corte e abate das árvores na indústria de papel e celulose, como matérias-primas viáveis para a produção de XOS e outros bioprodutos. A utilização de galhos e cascas possibilita não apenas a geração de valor adicionado para o setor industrial, mas também oferece alternativas para a reutilização e redução do acúmulo de resíduos nas florestas, promovendo assim a economia circular e gerando benefícios ambientais e econômicos. Essa prática está em conformidade com as novas políticas de gestão de resíduos, que estão cada vez mais voltadas para a valorização de resíduos lignocelulósicos por meio da produção de bioprodutos e bioenergia. Essas abordagens não só contribuem para a sustentabilidade e a gestão de resíduos em diversos setores industriais, mas também ajudam a reduzir a competição por terras aráveis (MARTINS et al., 2023).

3.3.4. Cinética do pré-tratamento

Por outro lado, os dados obtidos durante as caracterizações das frações resultantes durante o PTH foram utilizados no desenvolvimento do modelo cinético para a conversão da hemicelulose presente nos resíduos de eucalipto. Assim nas Figuras 49 - 51 encontram-se apresentados os perfis de solubilização dos componentes da fração da xilana durante o PTH dos galhos.

Figura 49. Perfil de solubilização dos componentes da xilana dos galhos pelo PTH a 175°C: (a) xilana, (b) XOS, (c) xilose e (d) furfural. Dados experimentais representados por símbolos e dados teóricos em linhas.

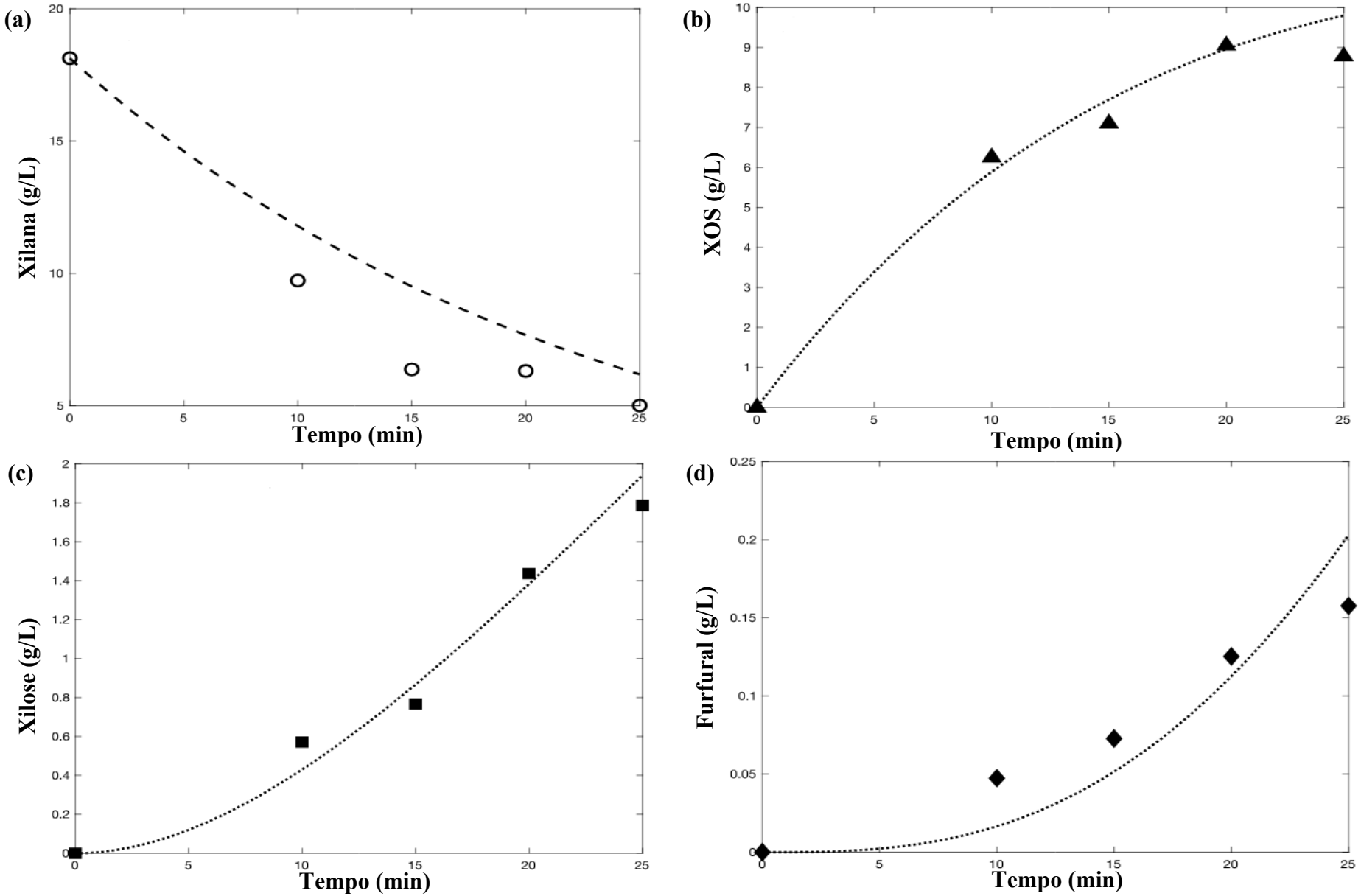


Figura 50. Perfil de solubilização dos componentes da xilana dos galhos pelo PTH a 190°C: (a) xilana, (b) XOS, (c) xilose e (d) furfural. Dados experimentais representados por símbolos e dados teóricos em linhas.

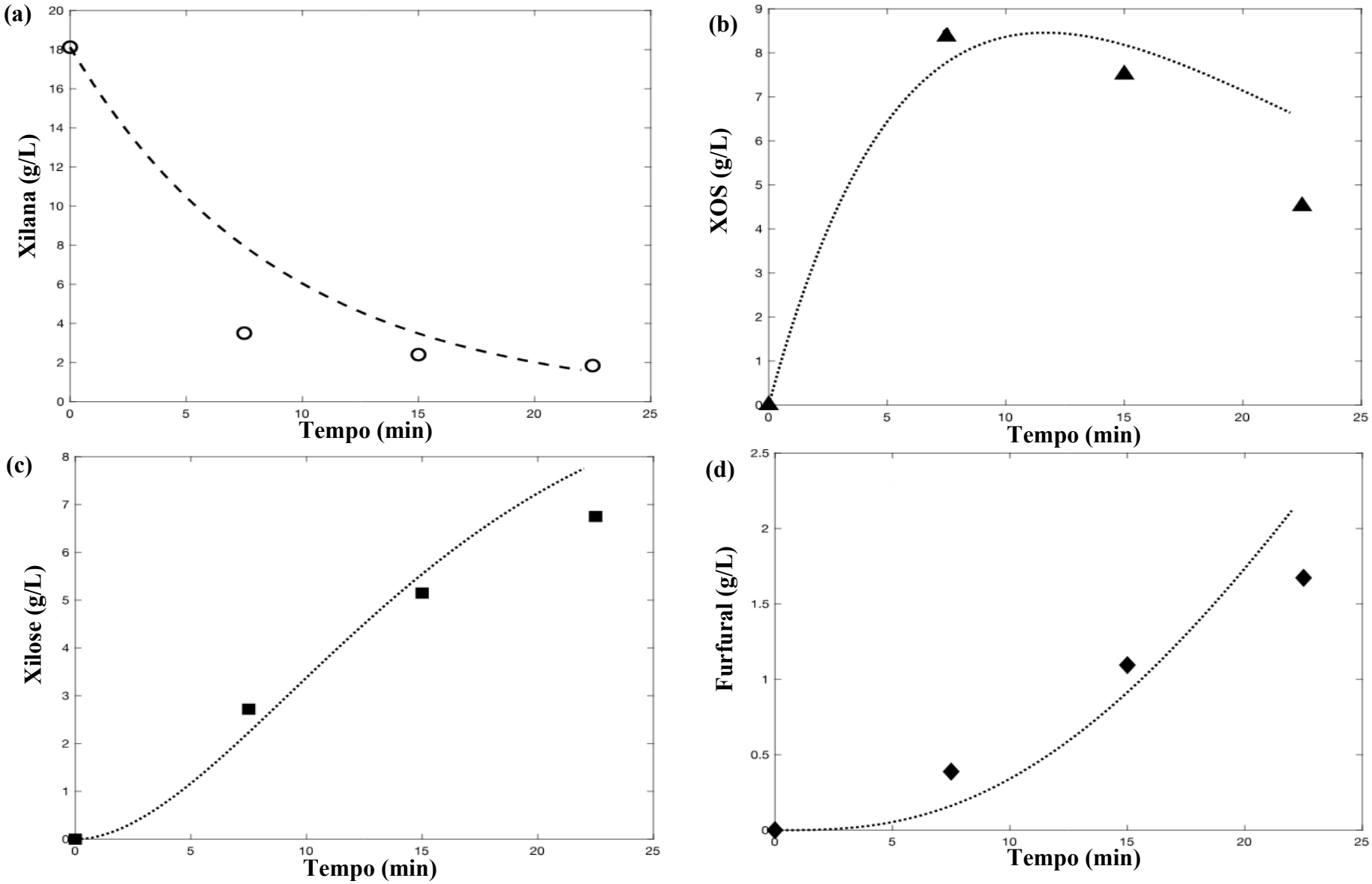
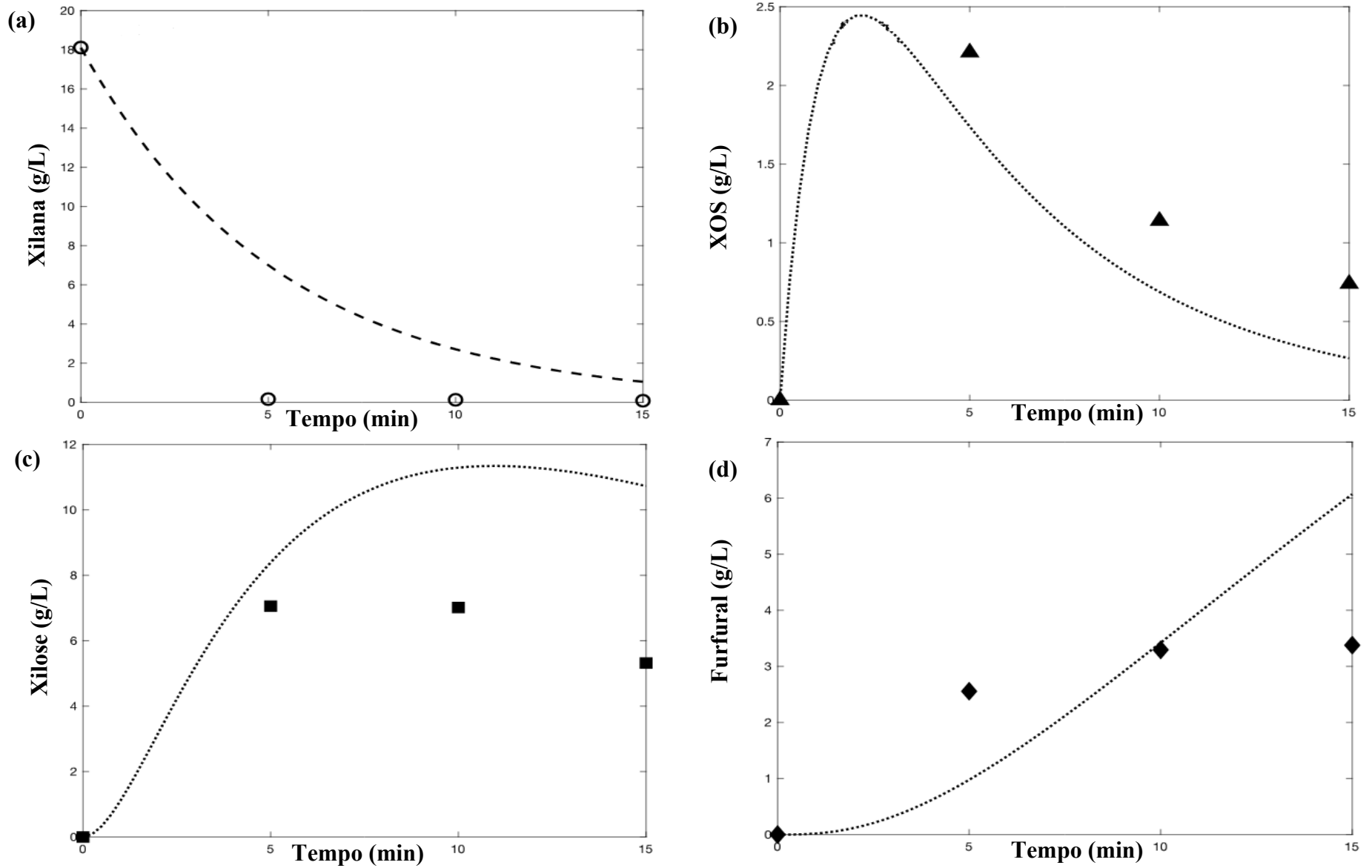


Figura 51. Perfil de solubilização dos componentes da xilana dos galhos pelo PTH a 205°C: (a) xilana, (b) XOS, (c) xilose e (d) furfural. Dados experimentais representados por símbolos e dados teóricos em linhas.



As Figura 49 - Figura 51 mostraram os valores experimentais e os valores preditos pelo modelo cinético para a degradação da fração da xilana em XOS, xilose e furfural em diferentes temperatura durante o PTH dos galhos. Esses resultados indicam que as condições avaliadas no pré-tratamento foram eficazes na remoção da xilana, a qual foi aumentando a solubilização com o aumento da temperatura de reação. Na Tabela 16 são apresentados os valores das constantes de velocidade relacionadas à degradação da xilana. A constante k_1 está associada à conversão da xilana em XOS, a constante k_2 refere-se à solubilização de XOS em monômeros de xilose e, por fim, a constante k_3 descreve o processo de degradação da xilose em furfural.

Tabela 16. Constantes de velocidade de hidrólise da xilana durante o PTH dos galhos.

Temperatura (ºC)	k_1 **(min^{-1})**	k_2 **(min^{-1})**	k_3 **(min^{-1})**
175	0,0430	0,0138	0,0109
190	0,1099	0,0653	0,0255
205	0,1900	0,9372	0,0475

Foi observado que as constantes k_1, k_2 e k_3 aumentaram à medida que a temperatura de reação é incrementada. As temperaturas de 175°C e 190°C se mostram mais adequadas para a formação de XOS durante o PTH, uma vez que a constante k_1 é maior do que as constantes k_2 e k_3. Entretanto, à temperatura de 205°C, ocorre uma mudança nas reações predominantes. Essa temperatura se mostra ser alta para a formação dos XOS, favorecendo, em vez disso, a degradação dos XOS em xilose, com a constante k_2 superando a constante k_1 nessa temperatura.

O aumento da temperatura de reação de 175ºC para 205ºC resultou em um aumento de 4,42 vezes na constante de velocidade relacionada à transformação da xilana em XOS (k_1) e um aumento de 67,91 vezes na formação de xilose a partir dos XOS (k_2).

Além disso, em todas as faixas de temperatura avaliadas, a degradação de xilose em compostos de degradação, como o furfural, é a etapa que ocorre com menor velocidade, conforme indicado pelas menores constantes k_3. Isso implica que a formação de furfural a partir da xilose é um processo mais lento em comparação com as outras transformações químicas

envolvidas na degradação da xilana. Quando a temperatura de pré-tratamento foi aumentada de 175ºC para 205ºC, foi observado um aumento de 4,36 vezes na constante de velocidade relacionada com a degradação da xilose em furfural (k_3). A partir dos dados obtidos das constantes de velocidade foram calculados os parâmetros cinéticos de acordo com a equação de Arrhenius (eq. 25), os resultados estão apresentados na Tabela 17.

Tabela 17. Estimação da energia de ativação e o fator pré-exponencial para a hidrólise da xilana durante o PTH dos galhos.

Velocidade de reação	E_a **(kJ/mol)**	**ln (*A*)**	$\mathbf{R^2}$
k_1	88,45	20,65	0,983
k_2	236,62	59,06	0,979
k_3	87,53	19,00	0,995

A energia de ativação é um parâmetro crucial na avaliação de estudos cinéticos, uma vez que influencia o comportamento cinético da etapa de reação (NAKASU et al., 2017). Os resultados obtidos para o PTH dos resíduos de eucalipto mostraram que a formação de xilose pode exigir de uma etapa subsequente de hidrólise, uma vez que a energia de ativação na etapa de degradação dos XOS em monômeros teve um valor de 236,62 kJ/mol, sendo este valor superior aos obtidos para a conversão da xilana em oligômeros de xilose e na formação de furfural a partir da xilose.

Os resultados obtidos indicam uma concordância entre o modelo proposto e os dados experimentais. Os valores de R^2 variaram entre 0,979 e 0,995 para os parâmetros cinéticos, sugerindo que o modelo é confiável e pode ser aplicado na otimização de processos que envolvem a conversão da biomassa durante o pré-tratamento.

Por outro lado, os resultados encontrados são consistentes com estudos prévios reportados na literatura, confirmando a influência da temperatura nas reações de conversão da xilana nos diferentes produtos intermediários, como oligossacarídeos, monossacarídeos e produtos de degradação. Os valores encontrados na etapa 1 (k_1) para E_a, e lnA foram próximos

aos valores obtidos para a auto-hidrólise da xilana do bagaço de agave com valores de 75,02 kJ/mol e 16,88, respectivamente (SHIVA et al., 2023). DOS SANTOS ROCHA et al., (2017) reportaram valores de 220,23 kJ/mol para a E_a e de 53,66 para o lnA durante a etapa 2 (k_2) no PTH da palha de cana-de-açúcar. Entretanto, (BORREGA; NIEMINEN; SIXTA, 2011; GULLÓN et al., 2010; SANTUCCI et al., 2015) apresentaram valores superiores para os parâmetros cinéticos como a energia de ativação e o fator pré-exponencial para a conversão da xilana em XOS durante o pré-tratamento de diferentes tipos de biomassas.

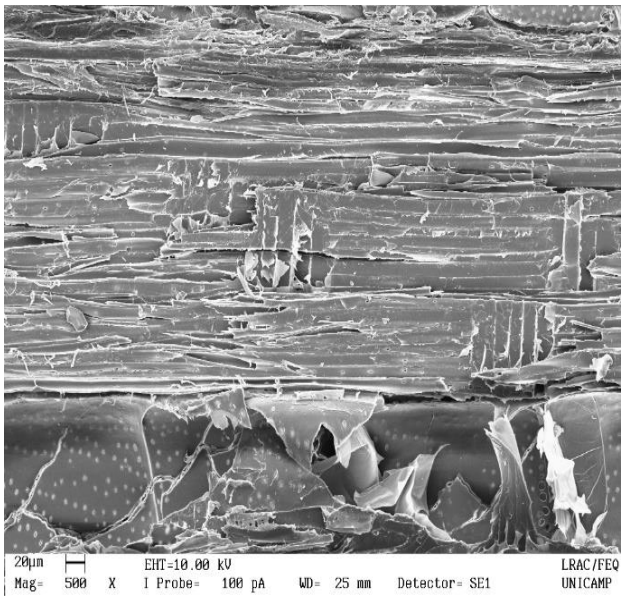
3.3.5. Caracterização morfológica dos resíduos pré-tratados por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Os resíduos de eucalipto in-natura e os sólidos recuperados nas condições de reação que resultaram nas maiores concentrações de XOS (PTH: G03 e C04) foram analisados por MEV para investigar as alterações na morfologia dos galhos e cascas após a etapa pré-tratamento. No entanto, é importante ressaltar que o aprofundamento das mudanças estruturais dos resíduos de eucalipto não era o objetivo principal desta tese.

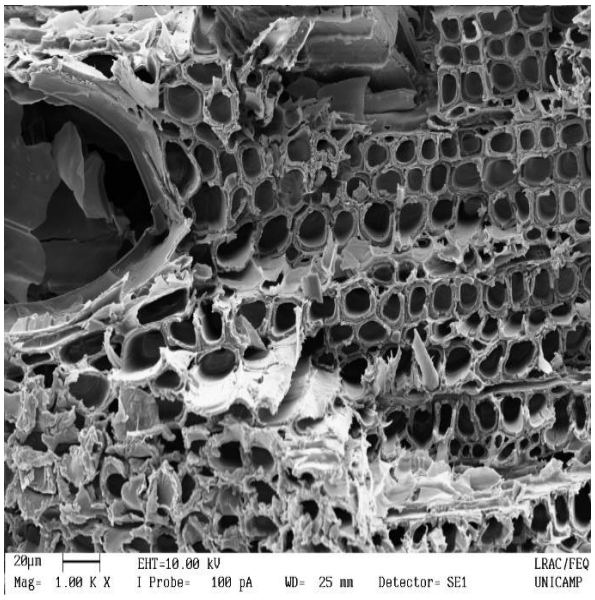
A seguir na Figura 52 estão apresentadas as micrografias para a amostra dos galhos in-natura, com ampliações de 500× na superfície, e de 1000× e 5000× na fratura.

Figura 52. Micrografias no galho in-natura para ampliações de: A) 100× da superfície, B) 1000× da fratura e C) 5000× da fratura.

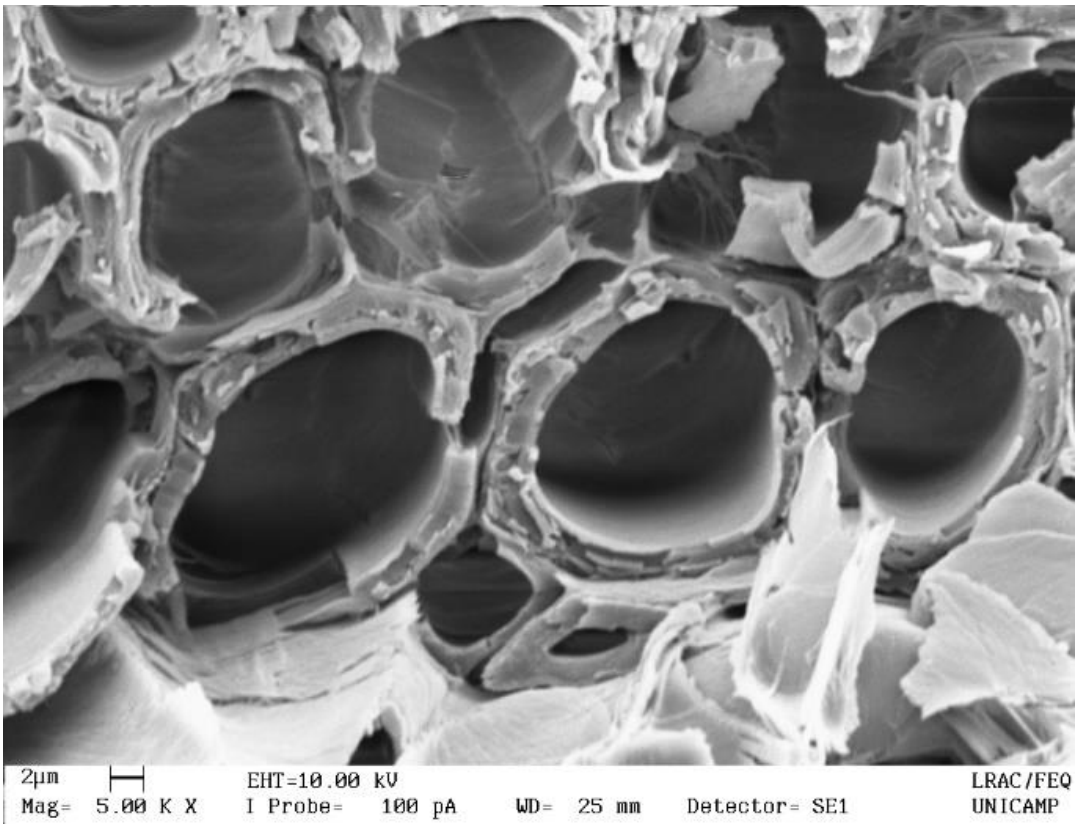
A)



B)



C)



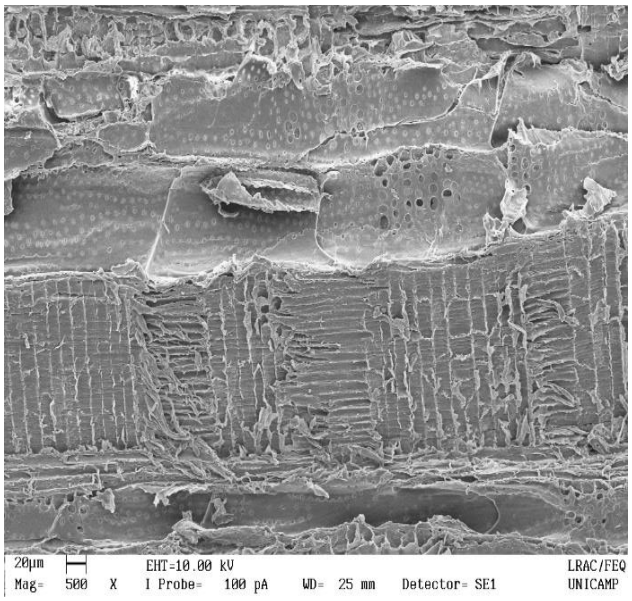
Através da análise de MEV, foi possível obter informações detalhadas sobre a morfologia dos resíduos de eucalipto. Na amostra dos galhos in-natura (Figura 52), pode ser observado que a amostra apresenta uma maior organização na matriz lignocelulósica presente nesse material. Os galhos apresentam uma superfície rígida, sugerindo uma forte interligação dos componentes da matriz lignocelulósica. Os feixes das microfibrilas da celulose, que compõem parte importante da matriz, estão compactos e dispostos predominantemente de forma paralela, o que indica uma maior organização da fibrilas da celulose.

Por meio da Figura 52-A, foram observadas alterações em algumas regiões da superfície dos galhos. Essas alterações podem estar atribuídas à etapa de acondicionamento das amostras, na qual os galhos foram submetidos a uma etapa prévia de moagem para a diminuição do tamanho de partícula para posterior pré-tratamento. Durante o processo de moagem, é possível que ocorra a quebra de algumas partes da matriz lignocelulósica, resultando na desestruturação do material original (HAGHIGHI et al., 2013). Portanto, é possível que a moagem esteja relacionada aos fragmentos detectados na superfície da amostra dos galhos in-natura.

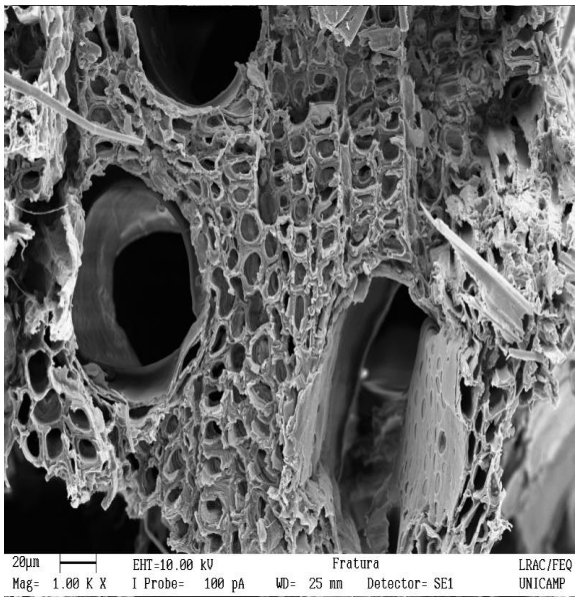
Na Figura 53 estão apresentadas as micrografias para os galhos submetidos ao pré-tratamento na temperatura de 175ºC por 20 min. Nessa análise foram feitas ampliações para a superfície em 500× e de 1000× e 5000× para a fratura.

Figura 53. Micrografias do galho após PTH a 175ºC por 20 min, para ampliações de: A) 100× da superfície, B) 1000× da fratura e C) 5000× da fratura.

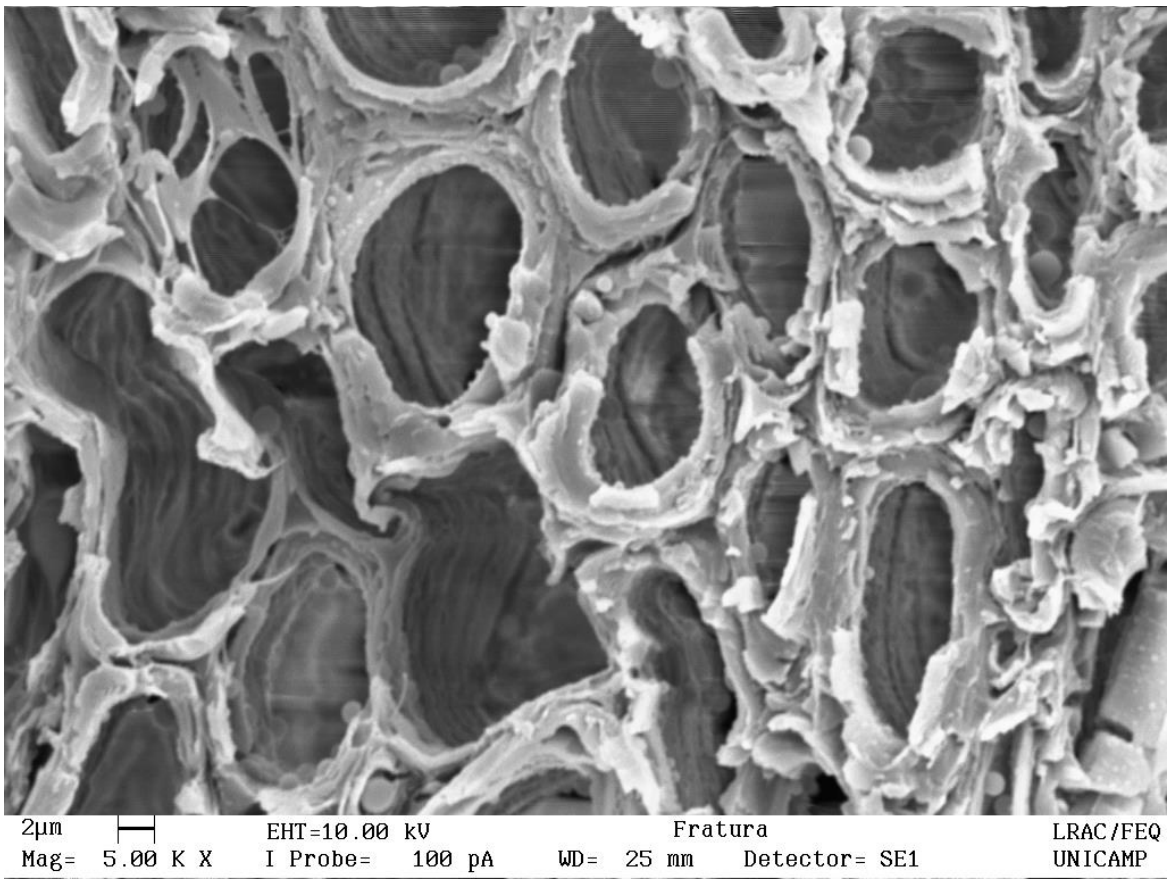
A)



B)



C)



As micrografias dos galhos pré-tratados pelo PTH mostraram modificações na estrutura dos resíduos sólidos recuperados, evidenciando rupturas e desestruturação na superfície da amostra. Essa superfície se apresentou mais corrugada do que a dos galhos não pré-tratados, com as microfibrilas da celulose mais expostas e as fibras alongadas desorganizadas. Essas alterações possivelmente ocorreram devido à expansão das fibras e a mudanças na cristalinidade da matriz lignocelulósica.

Além disso, foi observado um aumento na porosidade do material. Conforme indicado por JAICHAKAN et al., (2021), o processo de PTH pode resultar na hidrólise das regiões amorfas das microfibrilas, contribuindo para esse aumento na porosidade do material. Esses espaços vazios podem estar relacionados à solubilização de componentes da celulose com baixa cristalinidade e componentes da fração da hemicelulose (CANILHA et al., 2012). Na Figura 53-C, é possível observar a presença de formações esféricas, de acordo com GALLINA et al., (2016), podem estar relacionadas a gotículas de lignina-carboidrato que migram da parede celular da biomassa e se depositam na superfície do material pré-tratado.

Por outro lado, nas Figura 54 e Figura 55, estão apresentadas as micrografias das amostras das cascas in-natura e pré-tratadas pelo PTH a 175ºC por 25 min respectivamente. Para essas amostras, são mostradas ampliações de 500× na superfície de 5000× na fratura.

Figura 54. Micrografias das cascas in-natura: A) ampliação de 500× na superfície, B) ampliação de 5000× na fratura.

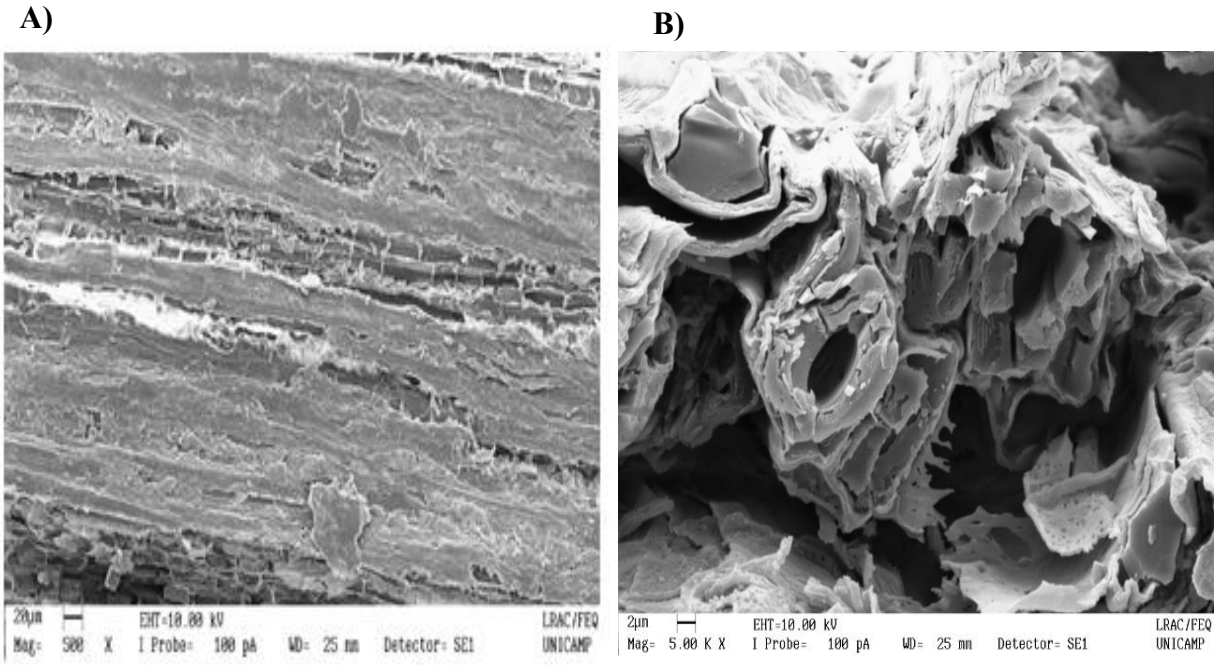
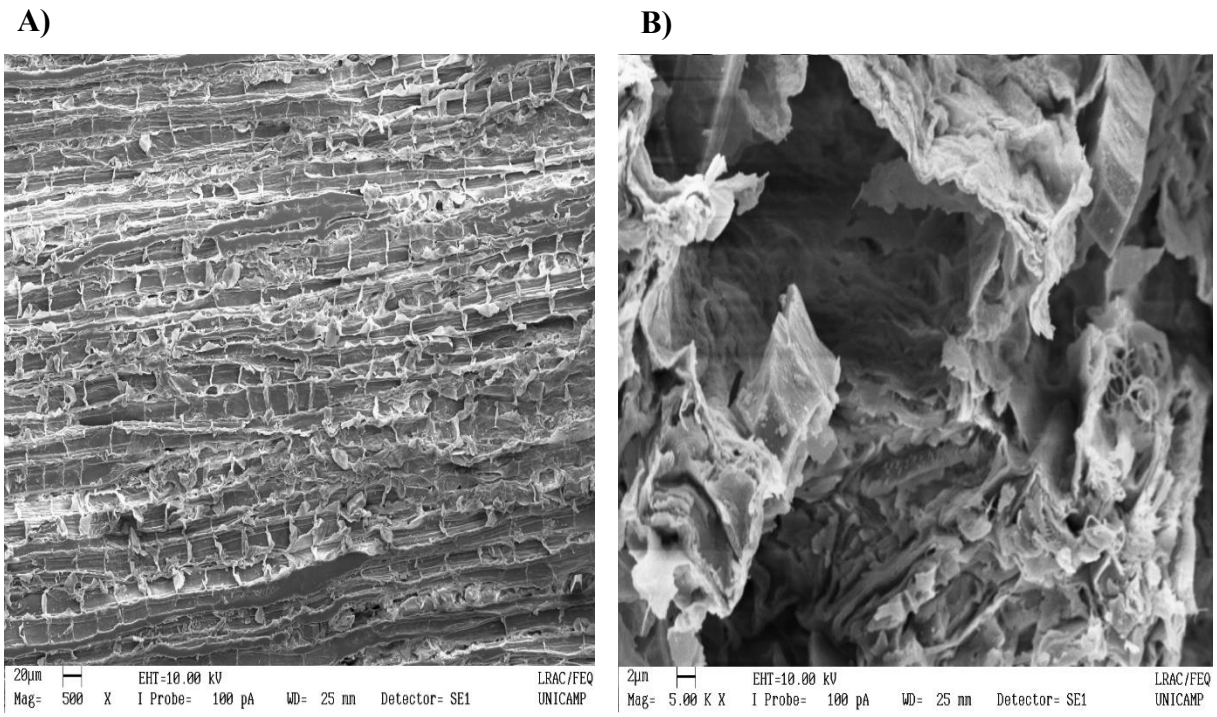


Figura 55. Micrografias das cascas pré-tratadas pelo PTH a 175 ºC por 25 min: A) ampliação de 500× na superfície, B) ampliação de 5000× na fratura.



As micrografias da amostra das cascas in-natura (Figura 54) mostram uma superfície lisa e uma notável organização das microfibrilas unidas pelo complexo lignina-carboidrato. Entretanto, após o pré-tratamento (Figura 55), a superfície das cascas se torna mais desordenada, com as fibras desmanteladas e as microfibrilas mais expostas, sugerindo alterações na organização dos componentes da matriz lignocelulósica e na cristalinidade do material. Na Figura 55-B, pode ser observado espaços vazios no meio das fibras, resultantes da remoção de componentes da celulose e hemicelulose.

A análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) proporcionou uma maior compreensão das transformações que ocorreram na estrutura da lignocelulose dos galhos e cascas, ampliando as informações sobre o impacto nas características morfológicas dos resíduos de eucalipto submetidos ao PTH.

CAPÍTULO IV

4. DESTOXIFICAÇÃO DOS HH COM CARVÃO ATIVADO

4.1. Introdução

Os XOS são considerados compostos promissores devido às suas propriedades e estão sendo amplamente investigados para diversas aplicações, incluindo na formulação de alimentos e em produtos relacionados à saúde (PINALES-MÁRQUEZ et al., 2021; QING et al., 2013). Para garantir a obtenção de XOS puros a partir de hidrolisados hemicelulósicos, pode ser necessário empregar técnicas de separação ou purificação, que podem envolver várias etapas. A complexidade desse processo pode variar consideravelmente, dependendo do grau de pureza desejado. Dentre essas técnicas, destaca-se a adsorção por materiais ativos de superfície, como o carvão ativado (GULLÓN et al., 2011; QING et al., 2013; VÁZQUEZ et al., 2005) que tem sido amplamente empregada para separar açúcares monoméricos e oligômeros, desempenhando uma função primordial na remoção de compostos indesejados presentes nos hidrolisados, como extrativos, componentes derivados da lignina e produtos de degradação dos carboidratos (QING et al., 2013).

4.2.Materiais e métodos

O HH rico em XOS derivados do pré-tratamento dos galhos e das cascas foram destoxificados empregando carvão ativado. As condições para destoxificar o HH dos galhos foram desenvolvidas em colaboração com o trabalho previamente publicado em parceria com MOREIRA; PEÑA; FRANCO, (2023). No caso do HH proveniente das cascas, foram avaliados os tempos de destoxificação de 30, 60 e 120 min.

Os ensaios foram realizados em Erlenmeyer de 100 mL contendo 30 mL do HH e 4% m/v de carvão ativado em pó P.A da Synth (Lote: 235611), sob agitação em incubadoras a 150 rpm, mantidos a 30 ºC pelo período de cada ensaio. Finalizado o tempo de adsorção, as amostras foram transferidas para tubos falcom de 50 mL e centrifugadas por 20 min a 4200 rpm. Posteriormente, com auxílio de uma pipeta Pasteur o sobrenadante (HH) foi cuidadosamente coletado e filtrado com papel filtro qualitativo, o HH coletado em tubos falcom e novamente centrifugado nas mesmas condições. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes para

completa remoção do remanescente do carvão ativado. Finalmente, as amostras foram congeladas para posteriores análises.

4.2.1. Determinação da remoção dos compostos de degradação

A eficiência da destoxificação do HH das cascas foi determinada pela quantificação da lignina solúvel por espectrofotometria (item 3.2.4.6). Também foi verificado a concentração de compostos fenólicos totais, como apresentado a seguir no item 4.2.2. Ácido acético, ácido fórmico, ácido levulínico, furfural e 5-HMF foram determinados por HPLC (item 3.2.4.7). Foi verificada por pós-hidrolise (item 3.2.7) a possível adsorção dos XOS totais pelo carvão ativado, posteriormente o conteúdo de xilose foi quantificado por HPLC (item 3.2.4.7).

4.2.2. Determinação do conteúdo de compostos fenólicos totais

Os compostos fenólicos totais (presente no HH destoxificado e sem destoxificar) foram determinados utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu, segundo a metodologia de SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENT6S, 1999. Uma curva de calibração foi construída utilizando ácido gálico monoidratado ($C_7H_6O_5H_2O$) em concentrações de 1 a 30 ppm, água destilada foi utilizada como branco.

Alíquotas de 3 mL do HH na diluição adequada, foram transferidas para tubos de ensaio, em seguida, foi adicionado 0,2 mL do reagente de Folin-Ciocalteu, após 5 min, adicionou- se 0,8 mL da solução 15% m/v do Na_2CO_3, os tubos foram agitados por 1 min em vórtex e depois incubados no escuro por 30 min a 26 °C. Finalmente, em ambiente com baixa luminosidade, foi feita a leitura da densidade ótica a 760 nm.

4.3. Resultados

A produção de XOS a partir de biomassa lignocelulósica têm sido objeto de estudos recentes, empregando diferentes métodos de pré-tratamento e fontes variadas de matéria-prima (ÁLVAREZ et al., 2023; BRENELLI et al., 2020; CORBETT et al., 2019; XU et al., 2017). O pré-tratamento hidrotérmico é um método adequado, mas as altas temperaturas empregadas durante o processo resultam na formação de uma mistura de monossacarídeos e oligômeros provenientes das frações da celulose e hemicelulose, bem como uma variedade de compostos

de degradação ou subprodutos (VÁZQUEZ et al., 2005), os quais dependendo da sua origem podem ser divididos em:

1. Ácido acético, formado pela desacetilação da fração da hemicelulose;
2. Fenólicos e outros compostos aromáticos, formados a partir da degradação parcial da lignina;
3. 5-HMF e furfural, furanos formados pela degradação de pentoses e hexoses.

Além disso, outros ácidos orgânicos como fórmico e levulínico podem ser formados devido à degradação de furanos. Esses compostos podem ser tóxicos ou inibitórios em processos de fermentação, tornando-se um dos principais gargalos em biorrefinarias lignocelulósicas. Portanto, para que os hidrolisados possam ser utilizados em processos de bioconversão de forma efetiva, é necessário que os compostos de degradação sejam removidos ou que suas concentrações sejam reduzidas (AMIT et al., 2018; MARTON et al., 2006; MODENBACH; NOKES, 2012).

Nesse contexto, após encontrar a condição ideal para a produção de XOS a partir dos resíduos de eucalipto, várias bateladas de pré-tratamento hidrotérmico foram realizadas para aumentar a quantidade de licor disponível para as próximas etapas, como o aumento de X2 e X3 por meio da hidrólise enzimática e a avaliação da atividade prebiótica. Durante o processo de produção dos hidrolisados, foram identificados compostos indesejados nos licores resultantes, conforme apresentado na Tabela 18.

Tabela 18. Concentração (g/L) dos compostos de degradação formados na produção de XOS pelo PTH dos galhos e cascas de eucalipto.

Composto de degradação	**HH galhos (g/L)**	**HH cascas (g/L)**
Ácido acético	0,44	0,79
Ácido fórmico	0,58	0,34
Compostos fenólicos totais	0,98	2,91
HMF	0,04	0,18
Furfural	0,13	0,19
Lignina solúvel	0,02	0,02

Ambos os hidrolisados apresentaram altas concentrações de compostos fenólicos totais, sendo que as cascas exibiram um conteúdo aproximadamente 66,32% maior em comparação com os galhos. Esse alto conteúdo de compostos fenólicos concorda com MONTANÉ et al., (2006), que relata que os compostos formados pela degradação da lignina são as principais impurezas encontradas na produção de XOS através do pré-tratamento de biomassa lignocelulósica. Os ácidos orgânicos foram o segundo maior componente nos hidrolisados, seguidos pela lignina solúvel, furfural e HMF, que foram encontrados em concentrações relativamente baixas.

Na literatura são reportadas diferentes concentrações dos compostos de degradação para serem considerados inibitórios, porém a maioria dos dados reportados são para a plataforma de produção de biocombustíveis, como o etanol. Além disso, não há consenso sobre o limite de concentração desses compostos, já que a toxicidade depende de vários fatores, como o tipo de composto, a concentração, o efeito sinérgico entre os compostos presentes no hidrolisado, o tipo de microrganismo e o método de fermentação empregado (MUÑOZ-PÁEZ et al., 2019).

As concentrações mínimas reportadas como inibitórias à ação de microrganismos em trabalhos desenvolvidos por PARAJÓ; DOMINGUEZ; DOMINGUEZ, (1997) e PARAJÓ; DOMÍNGUEZ; DOMÍNGUEZ, (1998) foram de 0,35 - 1,3 g/L e de 0,25 - 0,5 g/L para o furfural e ácido acético, respectivamente. DO NASCIMENTO et al., (2021) relata que concentrações de furanos de aproximadamente 1 g/L apresentam efeito nocivo, sendo que o HMF apresenta uma maior toxicidade do que o furfural. Enquanto aos compostos fenólicos, apresentam uma alta toxicidade com concentrações de 0,2 g/L e incluso concentrações inferiores a 0,1 g/L consideradas como inibitórias, considerando-se como compostos com efeito mais tóxico do que os furanos (JÖNSSON; MARTÍN, 2016; PARAJÓ; DOMÍNGUEZ; DOMÍNGUEZ, 1998).

Os produtos de degradação presentes nos hidrolisados hemicelulósicos utilizados em processos de downstream podem ocasionar diferentes efeitos nos microrganismos (VAN DER POL et al., 2015). Dentre eles, os furanos, dependendo da sua concentração no meio de cultivo e do tipo de microrganismo empregado na fermentação, podem promover um estresse químico para as células, resultando em um aumento da duração da fase lag durante o crescimento celular (HEER; HEINE; SAUER, 2009). Enquanto os compostos fenólicos, considerados os principais subprodutos inibitórios em substratos de origem lignocelulósica, os efeitos tóxicos estão relacionados com a diminuição da permeabilidade da membrana celular o que impede atuar

como barreira seletiva, além de reduzir o metabolismo dos açúcares utilizados como substrato e diminuir o crescimento celular (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000).

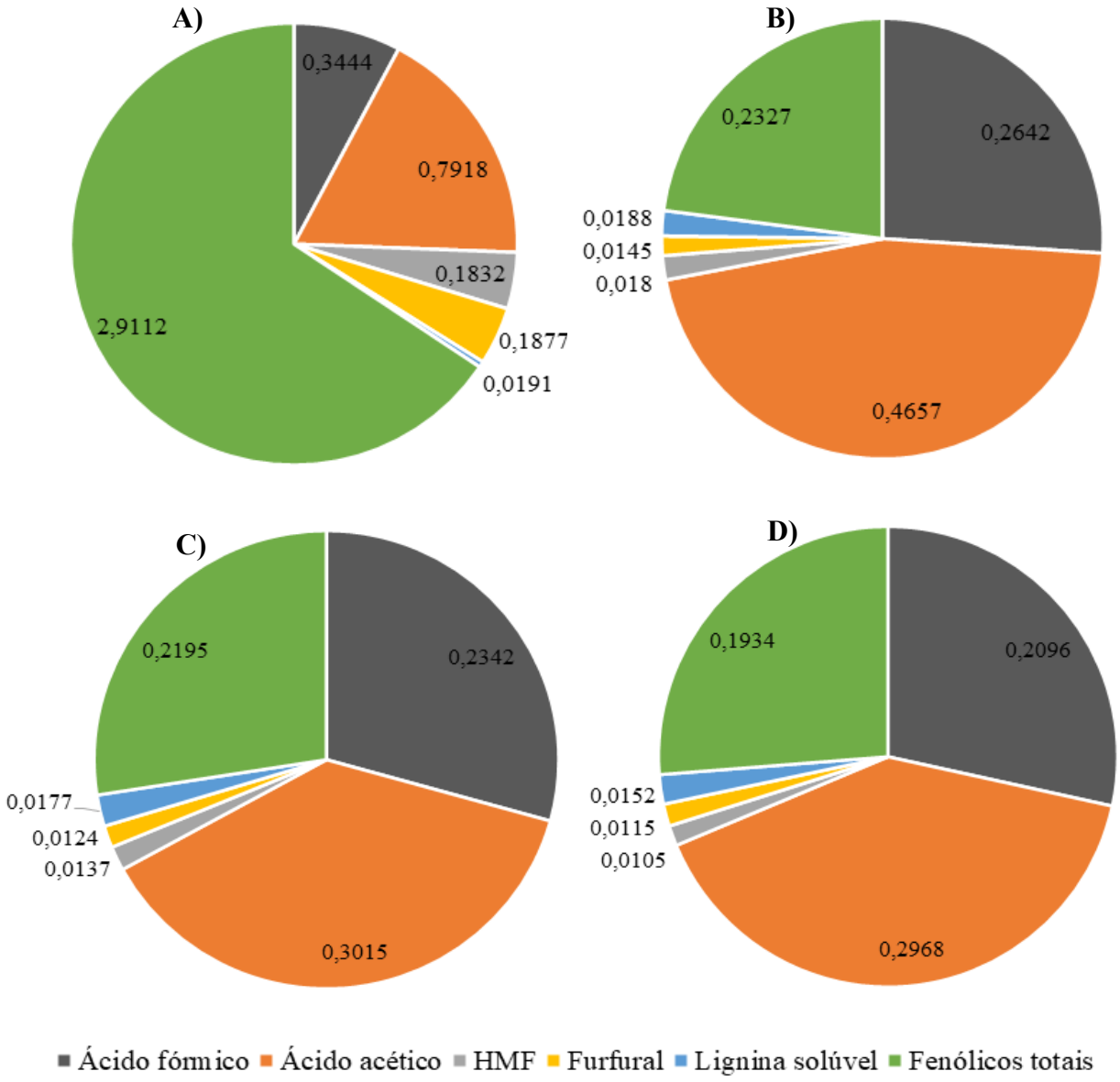
Para mitigar esses efeitos, nos HH dos resíduos de eucalipto produzidos na melhor condição de pré-tratamento para produção de XOS foi utilizado carvão ativado para a destoxificação, uma vez que esse método apresenta uma alta eficiência na remoção de compostos indesejáveis e é considerado de fácil operação e de baixo custo (PREECHAKUN et al., 2022). Em colaboração com MOREIRA; PEÑA; FRANCO, (2023), foram avaliadas as condições para a remoção desses compostos no licor dos galhos, sendo 4% (m/v) de carvão ativado em pó, sem necessidade de ativação prévia, combinada com uma temperatura de 30 ºC e tempo de adsorção de 120 min, a condição ideal para remover compostos indesejados presentes no licor obtido no pré-tratamento PTH-G03, os resultados encontram-se descritos na Tabela 19.

Tabela 19. Composição do licor dos galhos após a etapa de destoxificação.

Composto	**HH Bruto**	**HH destoxificado**	**Remoção (%)**
	Concentração (g/L)		
Ácido acético	0,44	0,20	54,82
Ácido fórmico	0,58	0,04	92,92
Compostos Fenólicos totais	0,98	0,06	93,57
HMF	0,04	< 0,001	> 99
Furfural	0,13	< 0,001	> 99
Lignina solúvel	0,02	$2{,}2 \times 10^{-5}$	99,89
XOS totais	9,00	7,82	13,08

A partir da condição ótima identificada para o HH dos galhos, foram conduzidos ensaios em duplicata para testar diferentes tempos de adsorção (30, 60 e 120 min) no HH das cascas (obtido no pré-tratamento hidrotérmico PTH-C03). A eficácia da destoxificação foi avaliada pela remoção de compostos como ácidos orgânicos, HMF, furfural, fenólicos totais e lignina solúvel, segundo ilustrado na Figura 56.

Figura 56. Composição (g/L) dos hidrolisados das cascas após destoxificação em diferentes tempos: A) Hidrolisado bruto, B) Destoxificado por 30 min, C) Destoxificado por 60 min e D) Destoxificado por 120 min.



No HH das cascas, a destoxificação realizada por 30 min mostrou uma remoção de 23,29 ± 0,04% de ácido fórmico e de 41,19 ± 0,01% de ácido acético. Nesse mesmo tempo, foram atingidas altas percentagens de remoção de HMF e furfural, sendo 90,17 ± 0,12% e 92,26 ± 0,20%, respectivamente, bem como a redução do conteúdo de compostos fenólicos totais em 92,01 ± 0,08%, enquanto a lignina solúvel foi reduzida em apenas 1,27 ± 0,09%.

Já a destoxificação realizada por 60 min apresentou um aumento considerável na remoção de ácidos orgânicos e lignina solúvel. Assim, o ácido fórmico foi removido em 32 ± 0,16%, o ácido acético atingiu uma redução de 60,56 ± 0,03% e o conteúdo de lignina solúvel alcançou uma remoção de 7,21 ± 0,03%. Entretanto, o HMF, furfural e os compostos fenólicos totais mostraram um pequeno incremento na remoção de suas concentrações, alcançando 92,52 ± 0,02%, 93,38 ± 0,05% e 92,46 ± 0,06%, respectivamente.

Após a destoxificação com carvão ativado por 120 min, as percentagens de remoção dos ácidos foram de 39,15 ± 0,87% do fórmico e o acético teve uma redução considerável de 62,51 ± 0,08%. O HMF, furfural e compostos fenólicos mostraram um pequeno aumento na remoção em comparação com os outros tempos de destoxificação, atingindo 94,29 ± 0,52%, 93,88 ± 0,01% e 93,36 ± 0,04%. A concentração de lignina solúvel apresentou uma redução significativa em comparação com os valores atingidos nos tempos de 30 e 60 min de adsorção, sendo a percentagem removida de 20,13 ± 0,02%.

Além disso, foi observado que independentemente do tempo de adsorção empregado, o carvão ativado apresentou uma alta capacidade de remoção das concentrações de furanos e compostos fenólicos, sendo que em um curto período (30 min) foram atingidas altas percentagens de remoção desses componentes, com valores superiores a 90%. Esses compostos foram os principais removidos nos três tempos de adsorção. Isto pode ser explicado devido que os furanos e os compostos derivados da lignina apresentam uma forte hidrofobicidade. Essa propriedade promoveu uma maior eficiência na remoção em comparação com outras espécies de compostos (ZHANG et al., 2018). Ademais, a adsorção com carvão ativado de misturas de solutos orgânicos envolve uma dinâmica complexa influenciada por vários fatores inter-relacionados como a química da superfície do carvão, as interações entre os solutos e a superfície do carvão, a massa molar do soluto e a distribuição dos diâmetros dos poros do carvão, todos esses fatores desempenham um papel importante na acessibilidade do soluto à superfície do carvão (MONTANÉ et al., 2006).

Os resultados indicam que a destoxificação do HH das cascas de eucalipto com o carvão ativado foi eficiente, reduzindo consideravelmente as concentrações dos compostos indesejados. O tempo de 120 min foi escolhido para realizar a destoxificação, e o hidrolisado destoxificado foi submetido a uma pós-hidrolise ácida para quantificar o conteúdo de XOS totais. A concentração final encontrada de XOS no HH destoxificado foi de 4,75 g/L, o que representa uma perda no conteúdo de XOS totais de 14,78% ± 0,05%. Essa perda é

aproximadamente duas vezes menor do que a relatada para a destoxificação com carvão ativado do hidrolisado de bagaço de cana (PREECHAKUN et al., 2022; YU et al., 2015b). De acordo com LLANO; QUIJORNA; COZ, (2017) a perda de carboidratos é um efeito inerente a qualquer técnica de destoxificação empregada.

Houve algumas diferenças na remoção dos compostos indesejados entre as amostras das cascas e dos galhos. Em particular, nas cascas o ácido fórmico e a lignina solúvel apresentaram uma menor afinidade com o carvão, com valores de remoção de cerca de 39% e 20%, respectivamente, em comparação com valores superiores a 90% nos galhos. Por outro lados, a remoção do ácido acético foi maior nas cascas (cerca de 63%). A remoção de compostos fenólicos totais, HMF, furfural e a perda de XOS totais apresentaram valores próximos entre as duas amostras.

Comparando com a literatura, os resultados deste estudo são comparáveis com os dados reportados na literatura para a destoxificação de hidrolisados hemicelulósicos com carvão ativado. PREECHAKUN et al., (2022) empregou 5% m/v de carvão ativado no hidrolisado de bagaço de cana, removendo apenas 17,1% de ácido acético e 43,8% de ácido fórmico, a remoção de furanos alcançada foi de 85,5% de HMF e de 92,8% de furfural, os compostos fenólicos foram reduzidos em 61,1%. Com o aumento da carga de carvão ativado para 10% m/v, foram obtidos maiores remoções de impurezas no hidrolisado aumentando as percentagens em 45,3%, 60,7%, 98,9%, 98,6% e 77%, respectivamente, porém foi apresentada uma perda de XOS de 28,6%.

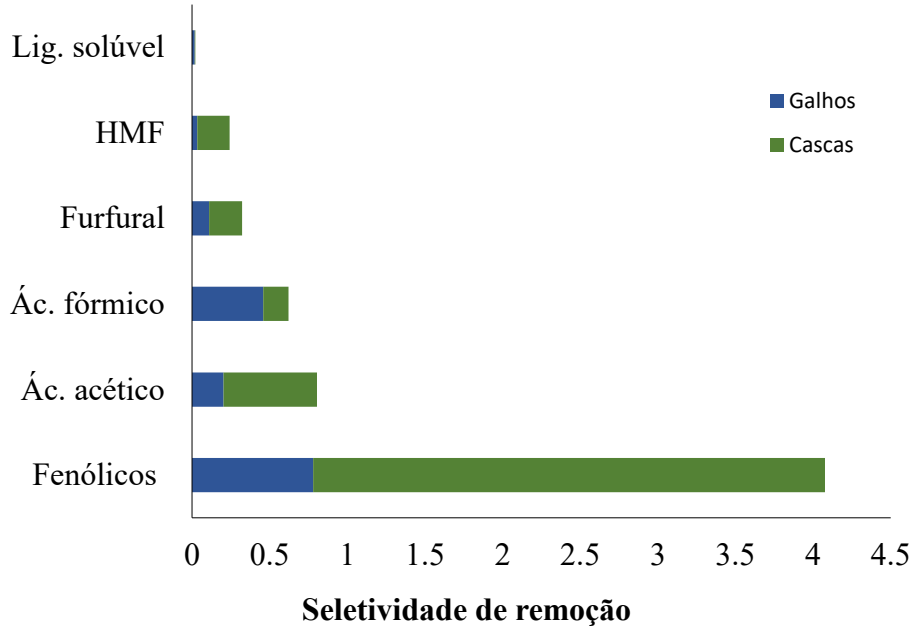
A remoção de compostos de degradação do hidrolisado do bagaço de sisal com 7% m/v de carvão ativado foi investigada por DO NASCIMENTO et al., (2021), nesse trabalho o ácido acético foi removido em 40,39%, o furfural diminuiu a sua concentração em 52,83%, enquanto o HMF foi totalmente removido do hidrolisado, as perdas de arabinoxilana foram de 16,94%.

Finalmente, para o hidrolisado destoxificado no tempo de 120 min, foram calculadas as seletividades de remoção dos compostos indesejáveis (Figura 57) sobre o conteúdo de XOS por meio da equação reportada por CORBETT et al., (2019):

$$Seletividade\ da\ remoção\ = \frac{I_r}{XOS_r} \tag{26}$$

I_r = Conteúdo de composto indesejável removido, em g/L; XOS_r = Conteúdo XOS totais removidos, em g/L.

Figura 57. Seletividade da remoção de compostos de degradação sobre XOS nos HH dos resíduos de eucalipto.



Na destoxificação dos HH dos resíduos de eucalipto a lignina solúvel apresentou as menores seletividades de remoção em relação aos XOS. Nos galhos, a seletividade correspondeu a 0,02, enquanto nas cascas, esse valor foi ainda menor, correspondendo a 0,005. Isso sugere que a adsorção da lignina solúvel foi menor do que a quantidade de XOS adsorvida pelo carvão. Nas amostras das cascas, a remoção desse compostos indesejável foi ainda menos seletiva com o material adsorvente empregado na destoxificação.

Os furanos apresentaram seletividades próximas na amostra das cascas (0,21), enquanto nos galhos esses valores foram inferiores, correspondendo a 0,03 de HMF e 0,11 de furfural. Com relação as seletividades da remoção dos ácidos orgânicos, o ácido acético teve seletividades de 0,60 e 0,2034 e o fórmico apresentou 0,16 e 0,46 para as cascas e galhos, respectivamente.

Por outro lado, foi possível obter altas percentagens de remoção de compostos fenólicos com uma alta seletividade. Isto é um fator importante, já que a presença desses compostos nos hidrolisados hemicelulósicos podem apresentar uma maior toxicidade à ação dos microrganismos. Nos galhos, a seletividade teve um valor de 0,78, enquanto nas cascas, a seletividade de remoção desses compostos foi de 3,30, indicando que a quantidade de

compostos derivados da lignina removidos foi aproximadamente três vezes maior do que a quantidade de XOS adsorvida.

Na produção de XOS, a destoxificação com carvão ativado pode ser uma oportunidade para a recuperação de subprodutos que são considerados impurezas nesse processo. Essa prática está alinhada com o conceito de biorrefinaria, que visa o aproveitamento máximo dos recursos disponíveis e gerar produtos de valor em diversas áreas. Conforme relatado por BAKTASH; AHSAN; NI, (2015), o furfural é um produto químico verde que possui diversas aplicações em diversos setores, desde plásticos até resinas furânicas. Desse modo, a produção de XOS a partir de resíduos florestais de eucalipto e a destoxificação do hidrolisado hemicelulósico com carvão ativado pode trazer benefícios possibilitando a utilização de subprodutos para gerar oportunidades de negócio em diferentes setores industriais.

CAPÍTULO V

5. PRODUÇÃO DA ENDO-1,4-B-XILANASE DO *Aspergillus nidulans* GENETICAMENTE MODIFICADO

5.1. Introdução

No presente Capítulo V, foi explorada a produção da enzima endo-1,4-β-xilanase, pertencente à família GH10, por meio do cultivo em shaker do fungo *A. nidulans*, geneticamente modificado para super expressar a xilanase no meio de cultivo sob a influência da maltose. A produção enzimática a partir de açúcares purificados pode ser economicamente desafiadora, dado o alto custo desses substratos (XIA et al., 2015).

Sendo assim, neste trabalho foi avaliado o potencial de uma alternativa à maltose purificada como indutor, explorando a high maltose, derivada do milho e amplamente empregada na fabricação de alimentos, conforme relatado por HADNAĐEV; DAPČEVIĆ-HADNAĐEV; L. DOKIĆ, (2018). Para aumentar a atividade enzimática da xilanase durante o cultivo do *A. nidulans*, foram variadas a concentração de high maltose e a concentração de esporos. Desta forma, este estudo não apenas teve como objetivo a produção da xilanase, mas também buscou identificar alternativas mais econômicas para a fonte de indutor no processo de fermentação, visando aprimorar a eficiência da produção enzimática.

5.2. Materiais e métodos

5.2.1. Microrganismo e condições de cultivo

A enzima foi produzida pelo cultivo da cepa recombinante do *Aspergillus nidulans A773 (pyrG89; wA3; pyroA4)*, cedida pelo laboratório de Biologia Sintética e Molecular do Prof. Dr. Fernando Segato do Departamento de Biotecnologia da Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. O fungo *A. nidulans A773 (pyrG89; wA3; pyroA4)* foi transformado utilizando o plasmídeo de expressão pEXPYR. O gene heterólogo inserido no vector foi do *Aspergillus fumigatus* var *niveus* (AFUMN-GH10) que codifica a enzima endo-1,4-β-xilanase da família GH10. O vector pEXPYR contém um gene pyrG e um promotor de glicoamilase, usados para selecionar, super expressar e secretar a enzima no meio, utilizando a maltose como indutor (COUGER et al., 2018).

- Condições de cultivo:

Os esporos foram mantidos numa solução estoque em criotubos, contendo 20% de glicerol e 10% de lactose e congelados no ultrafreezer a -80 °C. Os criotubos foram descongelados e a cultura foi inoculada com auxílio de swab em placas de Petri contendo 15 g/L de ágar e meio mínimo de glicose (MG) em pH 6,5 e previamente autoclavado a 121 °C por 20 min. O meio MG é composto por: 15 g/L de glicose, 50 mL/L da solução de Clutterbuck (240 g/L de $NaNO_3$, 40 g/L de KCL, 20 g/L de $MgSO_4$ $7H_2O$, 10 g/L de KH_2PO_4), 2 mL/L da solução de elementos traços (22 g/L de $ZnSO_4$ $7H_2O$, 11 g/L de H_3BO_3, 5 g/L de $MnCl_2$ $4H_2O$, 5 g/L de $FeSO_4$ $7H_2O$, 1,6 de g/L de $CoCl_2$ $5H_2O$, 1,6 g/L de $CuSO_4$ $5H_2O$, 1,1 g/L de Na_2MoO_4 $4H_2O$, 50 g/L de Na_2EDTA) e 1 mL/L da solução 1000× de piridoxina (ABDELLA; SEGATO; WILKINS, 2019; SEGATO et al., 2012). As placas foram incubadas a 37 °C por 72 a 96 h.

5.2.2. Contagem de esporos

Finalizado o período de incubação do *A. nidulans* nas Placas de Petri, os esporos foram contados no fluxo laminar. Foram adicionados 5 mL de água estéril a cada placa de Petri para a suspensão dos esporos e a superfície da placa foi cuidadosamente raspada com alça de inoculação estéril. Para separar os micélios dos esporos, a fase liquida foi filtrada em filtro Miracloth da Millipore® e o filtrado coletado em tubos falcom de 50 mL estéreis e a fase sólida retida no filtro (contendo os micélios) foi descartada. Um sistema de filtração (Miracloth + tubo falcom) foi usado para cada 5 placas de petri. Os tubos falcom contendo os esporos foram centrifugados a 5000 rpm por 10 min, o sobrenadante foi removido e os esporos sedimentados foram resuspensos em vórtex em 1,5 mL de água estéril. Posteriormente, foi misturado o conteúdo de 2 falcom para obter a solução mãe de esporos com volume final de 3 mL. Finalmente, em tubos Eppendorf foram feitas diluições de 10, 100 e 1000 vezes da solução mãe para a contagem dos esporos em Câmara de Neubauer.

5.2.3. Preparo do inóculo

O inóculo foi preparado em triplicata, em frascos Erlenmeyer de 500 mL, com volume de trabalho de 100 mL contendo o meio MG com pH 6,5, esterilizado em autoclave a 121 °C por 20 min. Após, em ambiente estéril foi adicionado a cada Erlenmeyer o volume necessário da solução mãe de microrganismos (obtida no item 5.2.2) para ter a concentração de esporos

no cultivo nas condições definidas para cada ensaio. As culturas foram incubadas em shaker por 48 h a 37 °C, mantidas sob agitação a 225 rpm.

5.2.4. Fermentação

O aumento da produção da enzima xilanase foi avaliada variando a concentração de esporos e a concentração de indutor no meio, conforme apresentado na Tabela 20. A percentagem de inóculo foi mantida em 10 % (v/v) para todos os experimentos. O meio MG contém glicose, sendo utilizada como fonte carbono para crescimento celular, e a high maltose como indutor do promotor do gene para expressar a endoxilanase.

Os ensaios foram realizados em Erlenmeyer de 100 mL, com volume de trabalho de 10 mL. Em ambiente estéril, foi adicionado a cada Erlenmeyer o meio MG previamente autoclavado, contendo a high maltose na percentagem de cada ensaio (Tabela 20). Posteriormente, foi adicionado 1 mL do inóculo obtido anteriormente com a concentração de esporos definida para cada experimento (Tabela 20). O fungo foi incubado em shaker sob agitação a 225 rpm, com temperatura de 37 °C, por 120 h.

Tabela 20. Condições de ensaio avaliadas para a produção da xilanase recombinante.

Ensaios	Concentração de esporos (esporos/mL)	Concentração de high maltose (% m/v)
1	5×10^4	4
2	5×10^6	4
3	5×10^4	20
4	5×10^6	20
5	5×10^5	12
6	5×10^5	12
7	5×10^5	12

5.2.5. Determinação da concentração de biomassa

Na etapa de fermentação do *A. nidulans* foi utilizado o sistema de Erlenmeyer de sacrifício para facilitar a retirada dos pontos e manter homogeneidade na amostragem, devido

a variação dos pellet formados ao longo do período de fermentação. A retirada dos pontos foi feita as 0, 6, 24, 36 h e posteriormente cada 24 h.

Para a determinação da concentração celular o conteúdo do Erlenmeyer (de cada intervalo de tempo) foi transferido para tubos falcom de 50 mL, previamente pesados. As amostras foram centrifugadas a 5000 rpm por 10 min. Em seguida, o sobrenadante foi coletado com pipeta Pasteur e armazenado no congelador para posteriores análises de atividade enzimática, proteínas totais, atividade específica da enzima e consumo de substrato.

Os pellet foram lavados duas vezes com 10 mL de água destilada e centrifugados nas mesmas condições. Posteriormente, as amostras foram mantidas na estufa a 60 °C até massa constante, depois resfriadas em dessecador e pesadas. A massa celular é calculado como:

$$C = m_{FA} - m_F \tag{27}$$

Onde:
C= Massa celular, em g; m_{FA}= Massa do tubo falcom com a amostra seco, em g; m_F= Massa do tubo falcom vazio seco, em g.

5.2.6. Determinação da atividade enzimática

A quantificação da atividade enzimática da xilanase foi realizada colorimetricamente, testes em triplicata. A reação foi feita em placas de 96 poços contendo 50 µL (amostra da enzima e tampão de acetato de sódio 100 mM em pH 5,0) e 50 µL de substrato 0,5% m/v de Beechwood xylan (xilana de faia) da Megazyme® diluído em tampão. As placas foram incubadas em termociclador (Gene Pro BIOER®) a 50 °C / 10 min. A reação foi interrompida pela adição de 100 µL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), e fervida a 99 °C / 5 min no termociclador. Para medir os açúcares redutores liberados, foram transferidos 100 µL da reação para placas Eliza e feita a leitura da absorbância a 540 nm no espectrofotômetro. Previamente às análises foi realizada uma curva de calibração utilizando xilose como padrão. Uma unidade (U) de atividade de xilanase foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de xilose por minuto nas condições do ensaio.

5.2.7. Determinação de proteínas totais

A quantificação de proteínas totais da xilanase foi realizada utilizando o kit BCA Protein Assay (Thermo ScientificTM), segundo o método estabelecido por SMITH et al., 1985. Em placas de 96 poços foram adicionados 25 µL da amostra diluída e 200 µL de BCA e imediatamente incubadas no termociclador a 37 ºC por 30 min. Posteriormente, foram transferidos 100 µL da amostra da reação para placas Eliza para leitura espectrofotométrica a 560 nm. Uma curva de calibração utilizando o soro de albumina bovina (BSA) com padrão foi construída previamente.

5.3. Resultados

A enzima endo-1,4-β-xilanase, a partir de agora denominada xilanase, foi produzida a partir do fungo filamentoso *A. nidulans A773,* que foi transformado através da expressão heteróloga no trabalho anterior desenvolvido por (COUGER et al., 2018), onde o fungo é capaz de expressar a xilanase na presença de maltose.

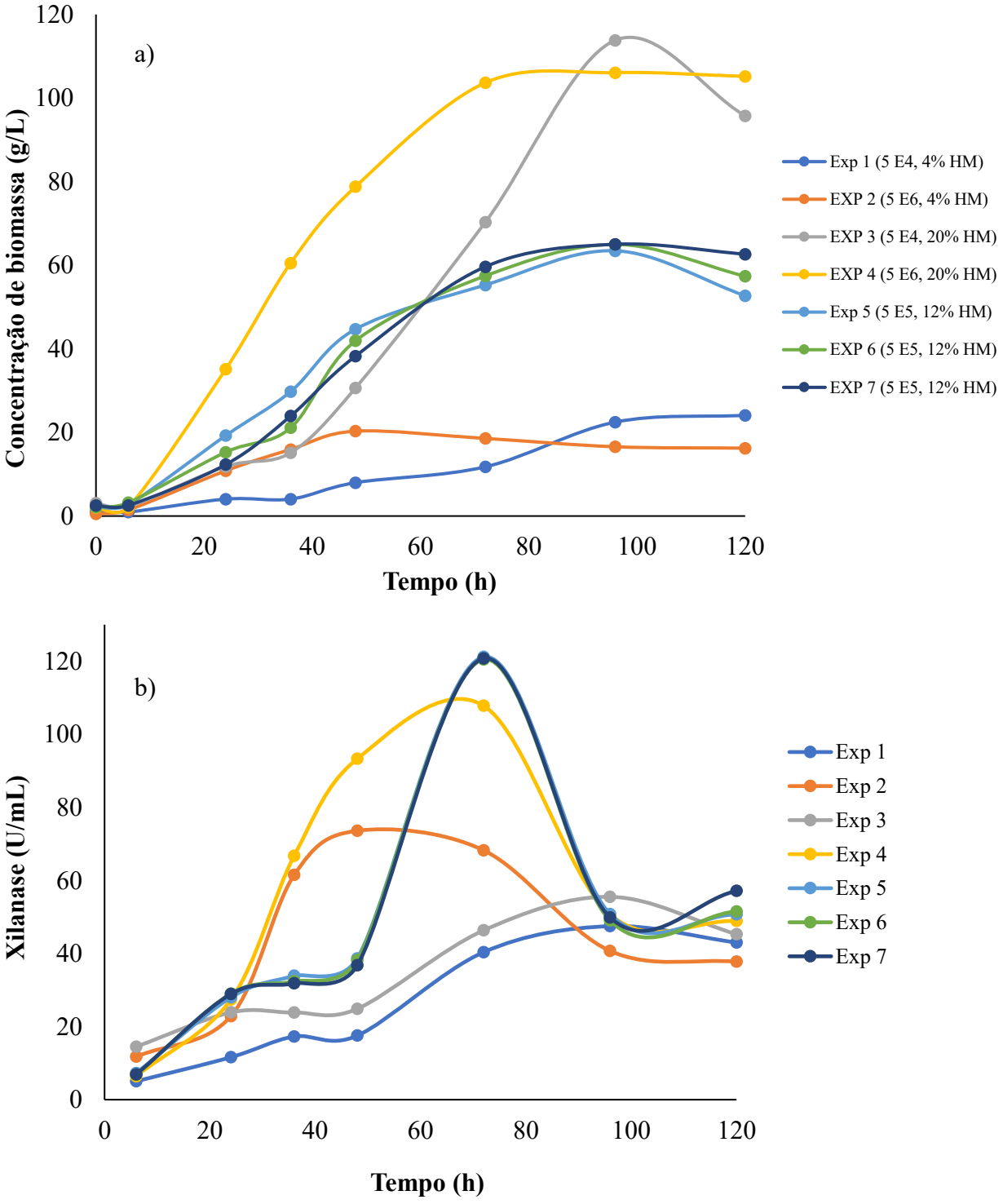
Em processos fermentativos, os açúcares refinados, como glicose, sacarose e maltose, são considerados uns dos principais componentes nutricionais. No entanto, em escala industrial, o uso desses açúcares refinados não são uma fonte de substrato econômica (XIA et al., 2015). A maltose, em particular, possui um alto valor de mercado (R$ 2476/kg, SIGMA-ALDRICH®), o que aumenta significativamente o custo de produção da xilanase, uma vez que esse dissacarídeo é utilizado como indutor. Portanto, neste estudo, foi investigado o uso de high maltose (Cargill® - glicose de milho) como uma alternativa mais econômica à maltose pura.

A high maltose é comumente utilizada na indústria alimentícia como substituta da maltose na fabricação de doces, panificação, molhos, entre outros (HADNAĐEV; DAPČEVIĆ-HADNAĐEV; L. DOKIĆ, 2018). Sua composição inclui maltose, glicose, maltotriose e outros oligossacarídeos (OH et al., 2022). Neste estudo, a high maltose adquirida da Lamas Brew Shop® (R$ 14,75/ kg) foi analisada por HPLC para determinar as concentrações de maltose e glicose, que corresponderam a 10% e 16% , respectivamente.

Com o objetivo de aumentar a produção da xilanase no cultivo do *A. nidulans*, foram avaliadas a quantidade de esporos e a concentração de indutor (high maltose). A concentração de esporos foi variada entre 5×10^4, 5×10^5 e 5×10^6 (esporos/mL), enquanto a concentração

de indutor foi ajustada para 4, 12 e 20% m/v. Na Figura 58, estão apresentados os resultados de concentração de biomassa e atividade enzimática obtidos para cada condição de ensaio.

Figura 58. Resultados obtidos no cultivo do *A. nidulans* a) Perfil de crescimento celular por gravimetria b) Atividade enzimática da xilanase.



Os resultados obtidos do cultivo do *A. nidulans* demostraram que as menores concentrações de biomassa foram apresentadas nos ensaios com 4% de high maltose (Experimento 1 e 2). No experimento 1, utilizando a menor concentração de esporos, o *A. nidulans* apresentou tanto a menor concentração de biomassa quanto a menor produção de xilanase. Durante as primeiras horas de cultivo, houve um pequeno aumento na concentração de biomassa, e a fase exponencial começou após 48 h, em 96 h o fungo apresentou uma concentração de biomassa de 22,47 g/L. Essa concentração teve um ligeiro aumento para 24,10 g/L no tempo de 120 h, indicando estabilização do crescimento celular. A atividade enzimática da xilanase foi de 5,05 U/mL às 6 h, aumentando para 47,49 U/mL às 96 h e terminando em 43,02 U/mL após 120 h.

Com o aumento da concentração de esporos (Experimento 2), o fungo entrou na fase exponencial em 24 h, atingindo uma concentração de biomassa de 10,84 g/L, que atingiu o máximo de 20,31 g/L em 48 h e diminuiu ligeiramente para 16,24 g/L em 120 h. A concentração máxima de biomassa neste ensaio foi 15,73% menor do que no ensaio com menor quantidade de esporos e 4% de high maltose. No entanto, foi observado que o Experimento 2 conseguiu aumentar a atividade enzimática da xilanase para 73,60 U/mL em 48 h, que foi quando a maior concentração de biomassa foi alcançada neste ensaio. O aumento da concentração de esporos com 4% de high maltose resultou em um incremento de aproximadamente 55% em comparação com o Experimento 1.

Nos experimentos realizados com 20% de high maltose (Experimentos 3 e 4), foi observado que, em 96 h, o fungo atingiu as maiores concentrações de biomassa. O aumento da concentração de biomassa pode ser atribuído ao fato de que o produto usado como substituto da maltose (high maltose) também contém glicose em sua composição. Portanto, é provável que o aumento na concentração de glicose proveniente da high maltose tenha contribuído para o aumento na concentração de biomassa, uma vez que a glicose é utilizada pelo fungo para o crescimento celular. No Experimento 3, utilizando a menor concentração de esporos, a concentração de biomassa começou em 3,08 g/L e aumentou progressivamente até atingir a concentração máxima de 113,83 g/L. No entanto, a atividade enzimática máxima alcançada nesse ensaio (55,52 U/mL) foi apenas ligeiramente maior do que o experimento 1 (utilizando as menores concentrações de indutor e esporos). Isso pode ser devido de que a alta concentração de maltose pode ter reprimido o gene responsável pelo metabolismo dessa fonte de carbono,

resultando em um metabolismo mais lento da maltose e, consequentemente, em uma menor produção da xilanase (PEREIRA et al., 2018).

Por outro lado, no Experimento 4, no qual a concentração de esporos foi aumentada para 5×10^6 esporos/mL, a concentração máxima de biomassa atingiu 106,08 g/L, um valor próximo ao máximo alcançado no experimento 3. No entanto, neste ensaio, a xilanase apresentou uma alta atividade enzimática de 107,79 U/mL em 72 h de cultivo, superando as obtidas nas condições estudadas nos ensaios 1 a 3.

A condição de ensaio com 12% de indutor e 5×10^5 esporos/mL foi avaliada em triplicata (Experimentos 5 a 7). Nessa condição, o *A. nidulans* apresentou, em média, uma concentração máxima de biomassa de 64,49 g/L em 96 h. Apesar de apresentar uma menor concentração celular em comparação aos resultados obtidos com 20% de high maltose, os resultados indicaram que 12% de indutor e 5×10^5 esporos/mL foram os melhores parâmetros para a produção da xilanase. A atividade enzimática foi aumentada para 120,82 ± 0,35 U/mL em 72 h de cultivo, um valor aproximadamente 12% maior do que o atingido no Experimento 4, que utilizou uma maior concentração de high maltose. Esse resultado representa uma opção mais econômica devido à menor necessidade de consumo de substrato.

Durante a produção da xilanase do *A. nidulans,* foi observado que a duração do cultivo afetou a produção da enzima. Após cada ensaio atingir a máxima atividade enzimática (48, 72 ou 96 h), a atividade da xilanase diminuiu com o incremento do tempo de fermentação. Essa diminuição pode ser devido que, em processos de crescimento celular com durações prolongadas de cultivo, os fungos filamentosos podem produzir proteases que têm a capacidade de degradar a xilanase, resultando na diminuição da atividade enzimática. No entanto, a redução na produção da xilanase durante o cultivo não é exclusivamente causada pela ação das proteases, uma vez que a produção de enzimas durante a fermentação é um processo complexo que depende de diferentes fatores, como disponibilidade de nutrientes no meio de cultivo, pH, temperatura, composição do meio, entre outros (EL ENSHASY et al., 2016; HECK; HERTZ; AYUB, 2002; MARTÍNEZ-PACHECO et al., 2020).

Por outro lado, nos experimentos 5 a 7, o cultivo do *A. nidulans* apresentou, em média, uma concentração de proteína total de 14,82 ± 0,72 mg/mL, enquanto a atividade específica da xilanase foi de 8,17 ± 0,38 U/mg. A Tabela 21 apresenta os resultados obtidos para as produtividades do cultivo do fungo nos ensaios utilizando 12% de high maltose.

Tabela 21. Resultados obtidos no cultivo do *A. nidulans* com 12% de indutor.

Experimento	$X_{inicial}$ (g/L)	X_{max} (g/L)	Atividade enzimática (U/mL)	P_x (g/L.d)	P_{ex} (U/mL.d)
5	2,24	63,46	121,18	15,30	40,39
6	2,19	64,98	120,50	15,70	40,17
7	2,52	65,02	120,77	15,63	40,26
Média	2,32± 0,18	64,49 ± 0,89	120,82 ± 0,35	15,54 ± 0,21	40,27 ± 0,12

$X_{inicial}$ (g/L): concentração inicial de biomassa; X_{max} (g/L): máxima concentração de biomassa; P_x (g/L.d): produtividade de biomassa; P_{ex} (g/L.d): produtividade da xilanase.

A Tabela 22 apresenta os resultados obtidos neste trabalho para os valores máximos de produção de xilanase pelo *A. nidulans* recombinante comparada com dados reportados na literatura.

Tabela 22. Comparação dos resultados de produção de xilanase pela FSm do *A. nidulans* recombinante com dados da literatura.

Microrganismo	Condições de cultivo	Produção de xilanase	Referência
A. nidulans A773 recombinante	12% m/v de high maltose, 5×10^5 esporos/mL, pH 6,5, 37 ºC, 225 rpm, 72 h.	120,82 U/mL, produtividade 40,27 U/mL.d	Neste trabalho
A. nidulans A773 recombinante	20% m/v de high maltose, 5×10^6 esporos/mL, pH 6,5, 37 ºC, 225 rpm, 72 h.	107,79 U/mL, produtividade 35,93 U/mL.d	Neste trabalho
Aspergillus aculeatus URM 4953 (*A. aculeatus*)	0,5% m/v de bagaço de cana, 1×10^4 esporos/mL, pH 8, 30 ºC, 180 rpm, 72 h.	30,05 U/mL, produtividade 10,02 U/mL.d	(SALES et al., 2010)

A. fumigatus M51	3% m/v de arabinoxilana, 1×10^6 esporos/mL, pH 5, 31,5 ºC, 180 rpm, 144 h.	40,2 U/mL, produtividade 6,7 U/mL.d	(CARVALHO et al., 2020)
A. fumigatus R1	1% m/v de casca de trigo, 1×10^5 esporos/mL 37 ºC, 100 rpm, 96 h.	152 U/mL, produtividade 38 U/mL.d	(JAGTAP et al., 2017)
A. nidulans A773 recombinante	12% m/v de maltose pura, 4×10^5 esporos/mL, pH 6,5, 37 ºC, 225 rpm, 120 h.	1620 U/mL, produtividade 324 U/mL.d	(ABDELLA; SEGATO; WILKINS, 2019)
Aspergillus niger (A. niger) SS7	Cascas de espigas de milho, 1×10^6 esporos/mL, pH 8, 43 ºC, 120 rpm, 120 h.	294 U/mL, produtividade 58,8 U/mL.d	(BAKRI et al., 2020)
Pichia stipitis (*P. stipitis*)	5% m/v de hemicelulose purificada de bagaço de cana, 30ºC, 168 h,	10 U/mL, produtividade 1,43 U/mL.d	(BIAN et al., 2013)

Fonte: Autor, 2023.

Os resultados obtidos para o cultivo do fungo recombinante *A. nidulans A773* utilizando high maltose como indutor demostraram seu potencial para a produção da xilanase. A máxima atividade enzimática e produtividade da xilanase atingida neste trabalho mostraram um aumento significativo em comparação com os resultados obtidos para os cultivos do *A. aculeatus*, *A. fumigatus* M51 e *P. stipitis* desenvolvidos por BIAN et al., (2013), CARVALHO et al., (2020) e SALES et al., (2010), respectivamente.

Além disso, a atividade e produtividade da xilanase foram próximas às obtidas por JAGTAP et al., (2017) no cultivo do *A. fumigatus* R1. Embora a atividade enzimática alcançada por BAKRI et al., (2020) no cultivo do *A. niger* seja maior, a diferença observada na produtividade enzimática da xilanase foi apenas 1,5 vezes, uma vez que o *A. nidulans* neste estudo atingiu a máxima produção da enzima em apenas 72 h de cultivo, em comparação com as 120 h de fermentação do *A. niger.*

No entanto, os resultados para a produção da enzima foram superados por ABDELLA; SEGATO; WILKINS, (2019) no cultivo do *A. nidulans* A773 utilizando 12% m/v de maltose pura em 120 h de fermentação. Neste estudo, a enzima foi produzida utilizando high maltose como indutor do promotor de gene para expressar e secretar a xilanase no meio de cultivo, sendo este um substrato mais econômico (R$ 14,75/ kg), o que resultou em uma alta atividade xilanasica com um custo aproximadamente 167,86 vezes menor do que a maltose pura (R$ 2476/kg) e em um período de cultivo mais curto (72 h). Os resultados obtidos neste trabalho destacam as condições ideais de concentração de esporos e concentração de indutor para o crescimento do *A. nidulans* recombinante visando a produção de xilanase utilizando uma fonte de substrato econômica e substituta à maltose pura.

CAPÍTULO VI

6. AUMENTO DA PRODUÇÃO DE X2 e X3 ATRAVÉS DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DOS HH DOS RESÍDUOS DE EUCALIPTO

6.1. Introdução

A composição dos HH produzidos neste trabalho, por meio do pré-tratamento dos resíduos de eucalipto apresentou XOS de diferentes GP. Os XOS, amplamente utilizados em diferentes setores industriais, com destaque os XOS de baixa massa molar, como X2 e X3, devido ao potencial prebiótico (CAPETTI et al., 2021; UÇKUN KIRAN; AKPINAR; BAKIR, 2013). Aproveitando essa abordagem, no contexto industrial se faz necessário a hidrólise da xilana em moléculas de menor tamanho de cadeia, o qual pode ser atingida por meio da hidrólise enzimática.

Nesse contexto, o presente Capítulo apresenta os resultados atingidos na hidrólise enzimática dos HH provenientes de galhos e cascas de eucalipto, visando o aumento da concentração de X2 e X3, moléculas consideradas nobres. Neste trabalho, foram inicialmente avaliadas duas enzima xilanase, uma pertencente à família GH10 e outra à GH11. A partir do melhor resultado, foi investigado o aumento da produção de XOS de baixa massa molar, explorando variações no substrato e na dosagem enzimática em diferentes concentrações.

6.2. Materiais e métodos

O HH com o maior conteúdo de XOS obtido a partir de resíduos de eucalipto e posteriormente destoxificado (descrito no item 4.3) foi hidrolisado visando aumentar a concentração de X2 e X3. Para a escolha das condições de processo enzimático foi feito um teste preliminar utilizando os parâmetros reportados por BRENELLI et al., 2020 (0,075 U/mg de XOS e 1% v/v de HH). A enzima comercial endo-1,4-β-xilanase de *Neocallimastix patriciarum* (GH11) da Megazyme® e a enzima endo-1,4- β-xilanase de *A. nidulans* recombinante (GH10) produzida no presente trabalho (CAPÍTULO V) foram empregadas.

Os ensaios foram feitos em Erlenmeyer de 125 mL, com volume de trabalho de 60 mL contendo tampão citrato-fosfato (50 mM, pH 5,0), HH previamente filtrado em filtro estéril PVDF 0,22 μm (Millex) e azida sódica (0,02% v/v). A seguir os frascos foram transferidos para o agitador a 220 rpm e mantidos a 50 ºC por 30 min. Após ambientação, foi adicionado o volume

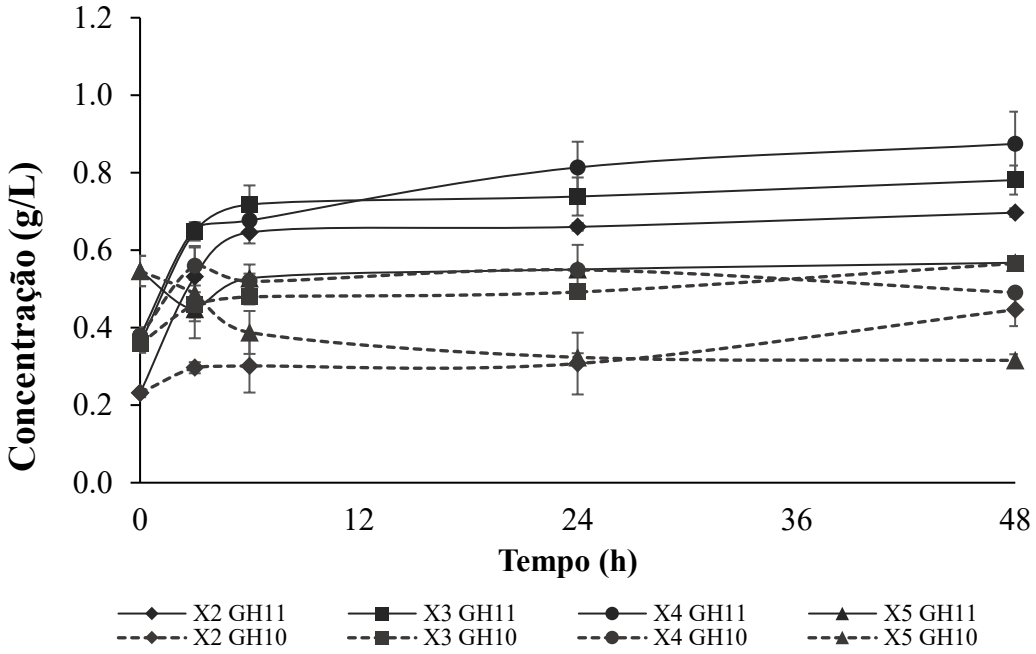
adequado de enzima, com atividades enzimáticas de 11,74 U/mL da enzima comercial e de 15 U/mL da enzima recombinante, e a rotação foi aumentada para 250 rpm. Alíquotas de 3 mL foram coletadas nos intervalos de tempo de 0, 3, 6, 24, e 48 h, e transferidas para tubos Eppendorf e fervidas a 99 ºC por 5 min para a desnaturação da enzima. As amostras foram centrifugadas a 3500 rpm por 10 min e o sobrenadante foi coletado e armazenado no congelador para posterior análise no HPLC.

6.3. Resultados

As xilanases desempenham um papel fundamental na conversão da hemicelulose em XOS (ÁVILA et al., 2020a; WAN AZELEE et al., 2016). O mecanismo de ação dessas enzimas varia, e dependendo dele, a xilanase pode romper a xilana em locais distintos ao longo de sua cadeia. Isso resulta na obtenção de uma variedade de XOS com diferentes GP e estruturas (MALGAS et al., 2019). O estudo preliminar de hidrólise enzimática utilizou duas xilanases: a enzima comercial da família GH11 e uma xilanase recombinante da família GH10, produzida neste trabalho a partir do fungo *A. nidulans.*

Para avaliar o aumento na concentração de X2 e X3 no licor destoxificado dos galhos ($HH_{G\text{-}destoxificado}$), foram empregadas as seguintes condições de reação: uma dosagem de enzima de 0,075 U/mg de XOS e uma proporção de 1% v/v de $HH_{G\text{-}destoxificado}$. Esses parâmetros foram estabelecidos por BRENELLI et al., (2020) para a produção de XOS de baixo GP a partir da palha de cana-de-açúcar. A Figura 59 apresenta os resultados da hidrólise enzimática utilizando a xilanase comercial (GH11) e a xilanase recombinante do *A. nidulans* (GH10).

Figura 59. Hidrólise enzimática do $HH_{G\text{-destoxificado}}$ com as xilanases: comercial GH11 e recombinante GH10.



O $HH_{G\text{-destoxificado}}$ continha inicialmente 7,82 g/L de XOS totais. Dessa quantidade, X2 correspondeu a 0,23 g/L, X3 e X4 foram encontrados em concentrações de 0,34 g/L e X5 em 0,51 g/L. No ensaio de hidrólise enzimática com a enzima comercial, após 48h, a concentração de X2 e X3 aumentou significativamente, atingindo 1,48 ± 0,05 g/L, o que representou um aumento de 159,65% em relação à concentração inicial de 0,57 g/L de X2+X3. Os XOS com GP de X4 aumentaram de 0,34 g/L para 0,87 ± 0,08 g/L, enquanto os XOS de GP X5 finalizaram com 0,57 ± 0,01 g/L, um pequeno incremento de aproximadamente 0,06 g/L em relação ao conteúdo inicial de X5.

O ensaio de hidrólise enzimática usando a xilanase produzida pelo fungo filamentoso *A. nidulans* (GH10) mostrou resultados promissores para a produção de X2 e X3. Após 48 h de tratamento enzimático, a concentração de X2 e X3 atingiu 1,01 ± 0,04 g/L, uma diferença de 0,47 g/L em comparação com a concentração obtida pela xilanase purificada (GH11). Em relação aos XOS de GP X4 e X5, esses compostos apresentaram concentrações menores em comparação com o resultado obtido pela enzima GH11. Isso é favorável, pois os principais produtos desejados neste trabalho são os XOS de menor GP (X2 e X3).

A diferença na formação dos diferentes XOS após a hidrólise enzimática pode ser explicada pelos diferentes mecanismos de ação destas classes de enzimas, atuando em posições especificas ao longo da cadeia da xilana (BIELY; SINGH; PUCHART, 2016). As xilanases da família GH10 têm maior afinidade por ligações em xilanas de cadeia curta, resultando na produção de XOS com menor GP (X2 a X5), enquanto as enzimas da família GH11 têm melhor acesso a estruturas complexas da xilana, o que resulta na formação de XOS de maior GP (X2 a X6) (LINARES-PASTEN; ARONSSON; KARLSSON, 2018).

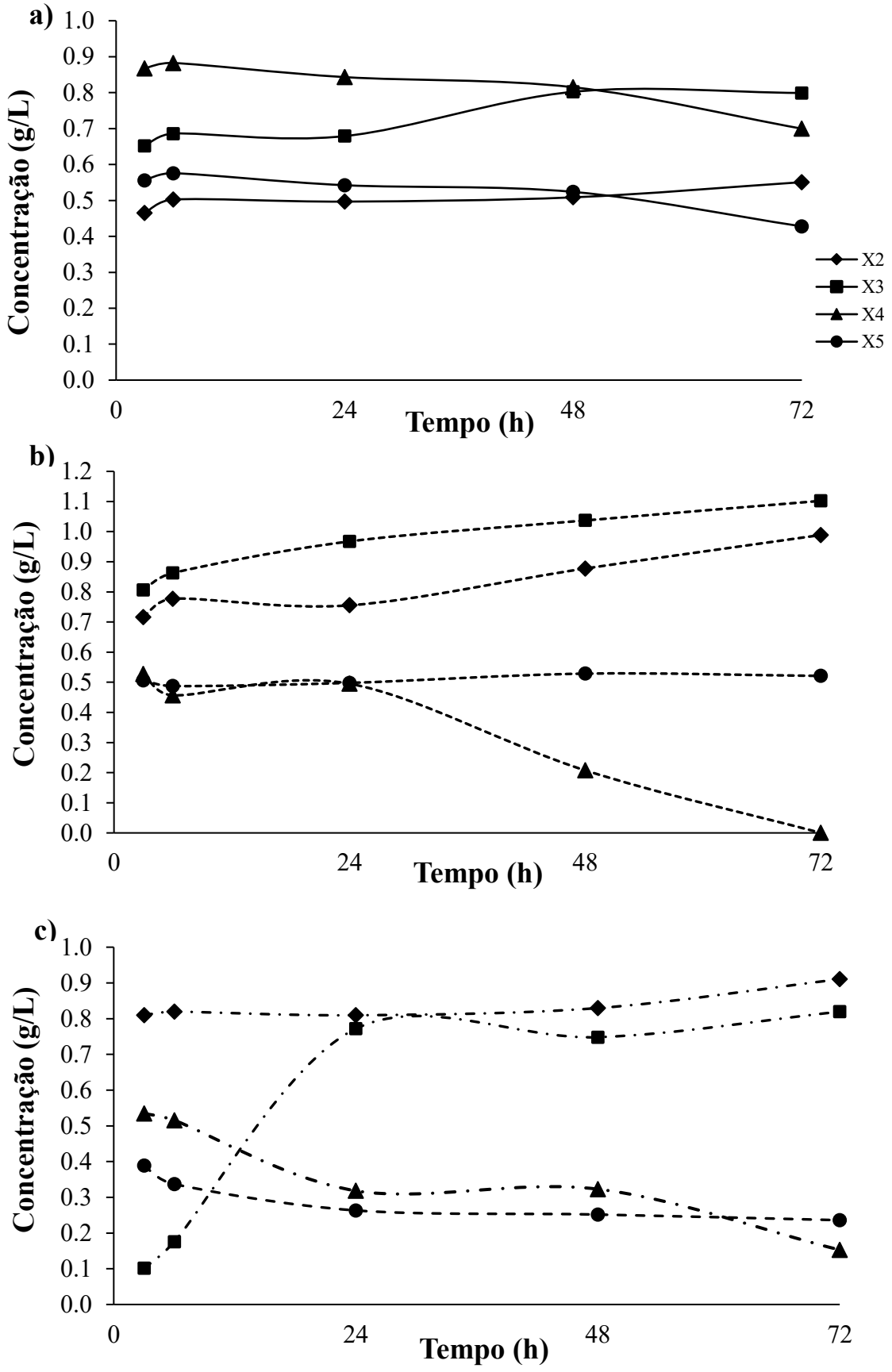
Devido a menor concentração de XOS com GP > X3 obtida pela enzima produzida pelo *A. nidulans,* essa xilanase foi selecionada para os ensaios posteriores, variando a dosagem de enzima em 0,1 a 0,34 U/mg de XOS e o volume de HH em 2 a 8% v/v. Assim, inicialmente o efeito da dosagem de enzima foi avaliado fixando a relação entre enzima e XOS em 0,04 v/v (Tabela 23).

Tabela 23. Concentração de X2-X5 inicial no meio reacional para os ensaios com relação de enzima/substrato de 0,04 v/v.

Dosagem de enzima (U/mg de XOS)	**Concentração de $HH_{G\text{-}destoxificado}$ (% v/v)**	**Concentração (g/L) inicial no meio reacional da hidrólise enzimática**			
		X2	**X3**	**X4**	**X5**
0,10	2	0,0046	0,0068	0,0068	0,0102
	5	0,0115	0,0170	0,0170	0,0255
	8	0,0184	0,0272	0,0272	0,0408

Os resultados obtidos para a hidrólise enzimática do licor dos galhos ($HH_{G\text{-}destoxificado}$) utilizando uma dosagem da enzima em 0,10 U/mg de XOS estão apresentados na Figura 60.

Figura 60. Hidrólise enzimática com dosagem de enzima em 0,10 U/mg de XOS e variação do $HH_{G\text{-destoxificado}}$ em: a) 2, b) 5 e c) 8% v/v.



Os resultados obtidos após a hidrólise enzimática com a xilanase GH10 em uma dosagem de 0,10 U/mg de XOS mostrou que com 2% v/v de $HH_{G\text{-}destoxificado}$ foi possível atingir uma concentração de X2+X3 em até 1,31 e 1,35 g/L após 48 e 72h de tratamento enzimático, respectivamente (Figura 60 - a). Esses valores representam aumentos significativos em comparação com a concentração de X2+X3 presente no licor advindo da etapa de destoxificação (0,57 g/L), sendo esses aumentos de aproximadamente 128,90% (48h) a 135,89% (72h). No entanto, a concentração final de X2+X3 obtida com 2% de substrato foi menor do que as alcançadas com os volumes maiores de hidrolisado (Figura 60: b e c). Isso pode ser devido, a que com 2% de $HH_{G\text{-}destoxificado}$, o substrato apresenta uma menor quantidade de ligações de xilana disponíveis para a ação da enzima, resultando em uma menor formação dos compostos de interesse como os X2 e X3.

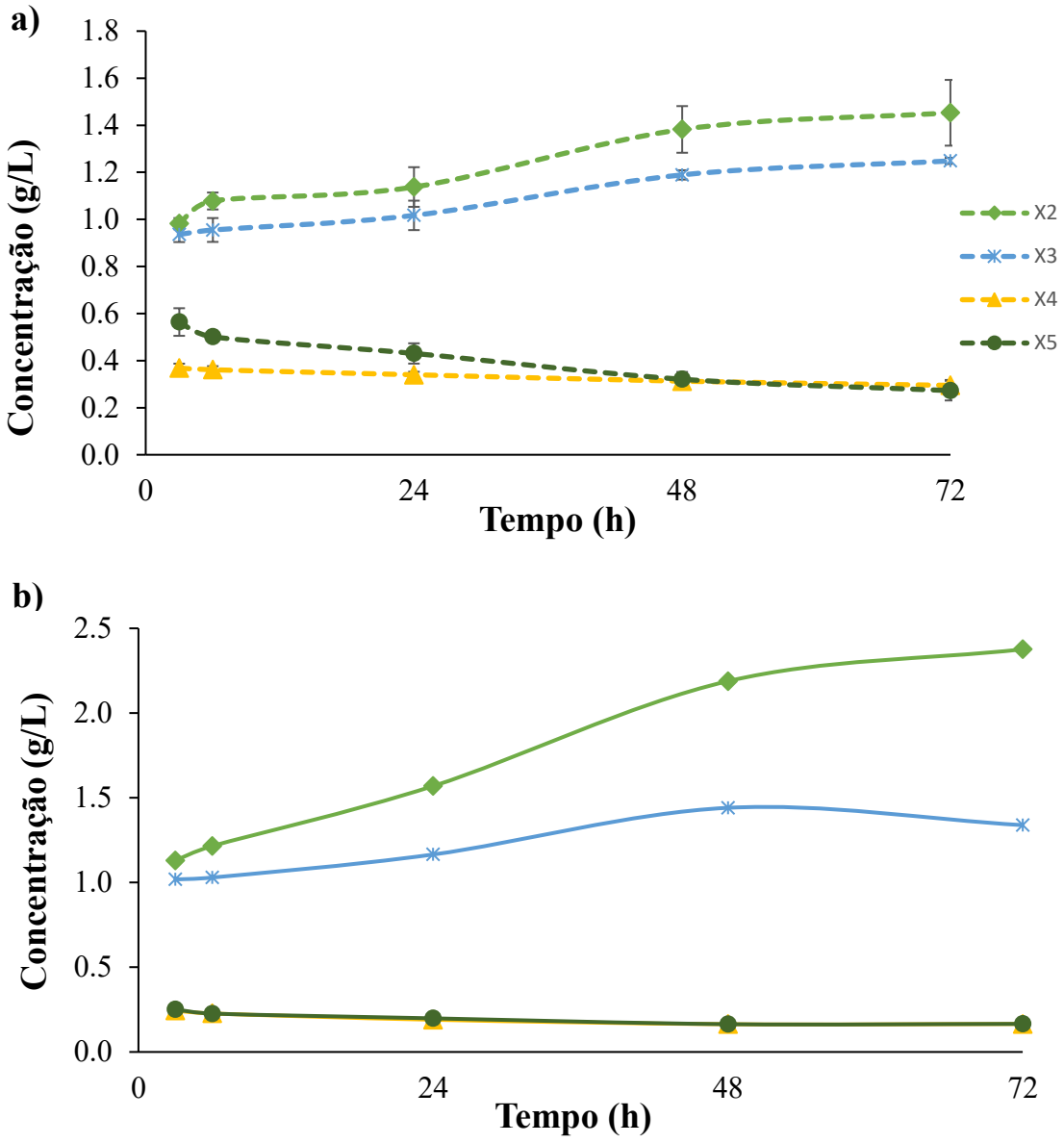
Enquanto, utilizando o substrato em 5%, a somatória de X2 e X3 atingiu valores de 1,91 g/L em 48h, o qual aumentou para 2,09 g/L após 72h de tratamento (Figura 60b). Em comparação com o $HH_{G\text{-}destoxificado}$ sem passar pela etapa de hidrólise enzimática, a concentração de X2+X3 teve um aumento expressivo. Após 48h de hidrólise, houve um aumento de 233,74%, o que significa que a concentração de X2+X3 foi mais do que 3 vezes maior em relação ao teor inicial. Após 72h, o aumento foi ainda maior, chegando a 265,19%. Comparando esse ensaio com o conduzido com 2% de $HH_{G\text{-}destoxificado}$, foi observado que a concentração de X2+X3 após 48h teve um incremento de 45,80% e após 72h, esse incremento chegou a 54,81%.

Entretanto, quando o substrato foi aumentado para 8%, a concentração de X2+X3 após 48h de hidrólise foi de 1,58 g/L e de 1,73 g/L após 72h (Figura 60c). Embora tenha um aumento em relação à concentração inicial no $HH_{G\text{-}destoxificado}$, foi observada uma diminuição de aproximadamente 17% em comparação com os valores obtidos no ensaio anterior, onde foi utilizando um menor volume de hidrolisado, 5%. Essa diminuição na formação de X2+X3 pode ser devido à possibilidade de que a dosagem de enzima (0,10 U/mg de XOS) não tenha sido suficiente para atuar com a maior quantidade de xilana presente quando 8% de $HH_{G\text{-}destoxificado}$ foi utilizado como substrato, o que pode requerer uma dosagem maior de xilanase para hidrolisar uma maior quantidade de substrato nos compostos de interesse durante o tratamento enzimático.

Os resultados obtidos indicaram que a concentração de 5% de substrato proporcionou as melhores concentrações de X2+X3, além disso, a formação de XOS de maior GP como X4+X5, foi relativamente baixa, apresentando concentrações de apenas 0,74 a 0,52 g/L após

48 e 72h de hidrólise enzimática. Com isso, posteriormente foi avaliado o aumento de X2+X3 por meio da variação da dosagem de enzima em 0,2 U/mg de XOS (Figura 61a) e 0,34 U/mg de XOS (Figura 61b), enquanto a concentração volumétrica de $HH_{G\text{-destoxificado}}$ foi fixado em 5% v/v, resultando em relações de enzima/substrato de 0,08 e 0,14 v/v, respectivamente.

Figura 61. Hidrólise enzimática do $HH_{G\text{-destoxificado}}$ com concentração de 5% v/v e variação na dosagem de enzima em: a) 0,20 U/mg de XOS e b) 0,340 U/mg de XOS.



Por meio da Figura 61a, pode ser observado que a concentração de substrato em 5% e o aumento da dosagem enzimática para 0,2 U/mg de XOS permitiu obter altas concentrações dos

produtos de interesse em comparação com os anteriores ensaios. Sendo assim, foram obtidas em média concentrações de 2,57 g/L de X2+X3 após 48h de tratamento enzimático, essa concentração foi aumentada para 2,70 g/L após 72h. Enquanto, sob os mesmos tempos de hidrólise as concentrações de X4+X5 resultaram em 0,63 g/L e 0,57 g/L, respectivamente. Os resultados obtidos para o conteúdo de X2+X3 nessa condição de ensaio foi aproximadamente 5 vezes maior em comparação com o conteúdo de X2+X3 no hidrolisado de entrada e de até 1,35 vezes maior do que o obtido utilizando 0,1U/mg de XOS na mesma concentração de substrato.

Quando a dosagem de enzima foi utilizada em 0,34 U/mg de XOS (Figura 61b) foram atingidas as maiores concentrações dos XOS de interesse. Isso pode ser devido a que o aumento na concentração da enzima permitiu uma maior quantidade de enzimas disponíveis para degradar o hidrolisado, resultando em uma maior quebra das ligações da xilana de maior tamanho, levando a uma maior produção de X2+X3. Sendo assim, após 48h de hidrólise os X2+X3 foram produzidos em 3,63 g/L. Essa concentração teve um pequeno incremento quando o tempo de tratamento enzimático foi estendido para 72h, apresentando um conteúdo final de 3,71 g/L. Enquanto aos XOS de maior tamanho quantificados (X4+X5) finalizaram em baixas concentrações, aproximadamente 0,33 g/L.

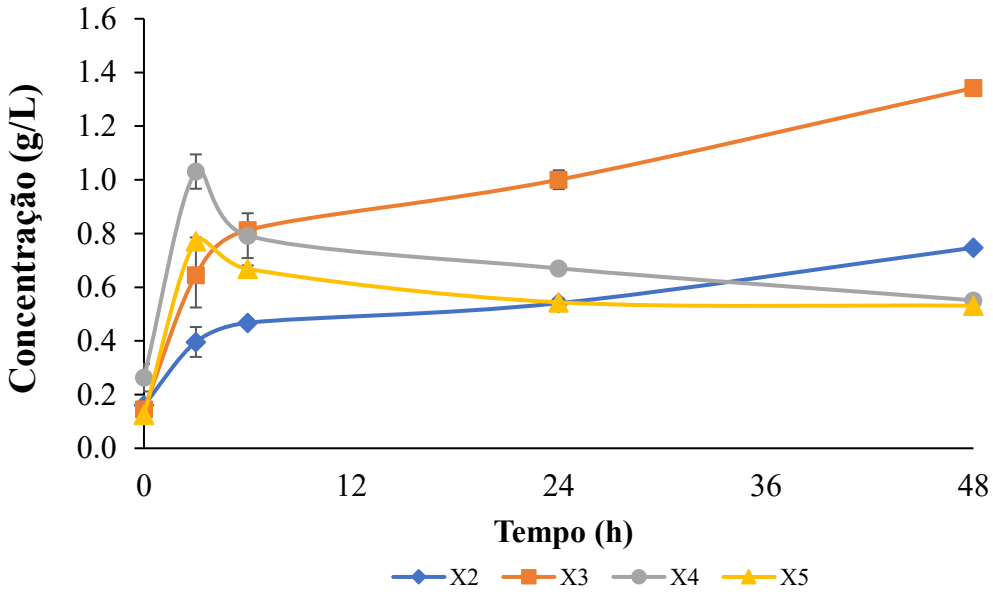
Os resultados alcançados com 5% de $HH_{G\text{-destoxificado}}$ e 0,34 U/mg de XOS se mostraram ser mais eficientes na produção de XOS de cadeia curta (X2+X3) em comparação com as diferentes condições avaliadas anteriormente neste trabalho. Aumentar a dosagem de enzima de 0,2 U/mg de XOS para 0,34 U/mg de XOS resultou em um incremento de até 41,25% na concentração de X2+X3. Além disso, essa concentração foi aproximadamente 6,5 vezes maior do que a encontrada no $HH_{G\text{-destoxificado}}$ inicial.

Por outro lado, durante a avaliação de diferentes condições de hidrólise enzimática, foi observado que estender o tempo de tratamento de 48h para 72h resultou em um aumento ligeiro na concentração de X2+X3. No entanto, segundo a literatura, embora seja possível obter um rendimento um pouco maior dos produtos de interesse com um tempo de reação mais longo, essa abordagem não é economicamente vantajosa na produção em grande escala. Isso se deve ao fato de que um tempo de hidrólise enzimática maior do que 48h resultaria em custos adicionais de capital, pois seria necessário investir em capacidade adicional de armazenamento para manter o substrato por um período prolongado (WAN AZELEE et al., 2016). Portanto, o

tempo 48h foi escolhido para o tratamento enzimático do $HH_{destoxificado}$ dos resíduos de eucalipto.

Além disso, devido à maior produção de X2+X3 obtida com 5% de substrato e 0,34 U/mg de XOS, esses parâmetros foram escolhidos para produzir uma maior quantidade de hidrolisado dos galhos, para ser utilizado posteriormente como substrato para o crescimento da bactéria *S. epidermidis*. Esses mesmos parâmetros também foram empregados na hidrólise enzimática do HH destoxificado das cascas ($HH_{C\text{-}destoxificado}$) (Figura 62).

Figura 62. Hidrólise enzimática do $HH_{C\text{-}destoxificado}$ com concentração de 5% v/v e dosagem de enzima em 0,340 U/mg de XOS.



Os resultados obtidos na hidrólise enzimática das cascas demostraram a obtenção de altas concentrações de XOS de cadeia curta (X2+X3). Após 48h de tratamento, a concentração final desses compostos desejados foi de 2,09 ± 0,05 g/L, sendo está concentração aumentada em até 6,74 vezes em relação ao conteúdo desses componentes no $HH_{C\text{-}destoxificado}$ (0,31 g/L). Enquanto, os X4+X5 finalizaram com uma concentração de 1,08 ± 0,03 g/L.

Comparando esses resultados com os obtidos no tratamento enzimático dos galhos sob as mesmas condições de análise, foi observado que as cascas apresentaram um padrão distinto na formação dos XOS. Essa variação pode ser devido ao fato de que os hidrolisados iniciais possuíam concentrações diferentes de XOS totais, bem como diferentes conteúdos de X2 a X5.

Além disso, a fração da xilana provém de fontes distintas de matéria-prima, mesmo que ambas pertençam à mesma espécie vegetal, o que pode resultar em características diferentes na cadeia da xilana.

Além disso, durante o pré-tratamento da biomassa lignocelulósica, podem ser gerados outros compostos derivados das frações da celulose e lignina. Esses compostos secundários também podem afetar a eficiência da hidrólise enzimática (MALGAS et al., 2019). A variação nos resultados encontrados entre ambos os resíduos pode ser justificada pelo que foi previamente relatado por LINARES-PASTEN; ARONSSON; KARLSSON, (2018), que descreve que a eficiência da hidrólise enzimática pode variar não apenas devido às condições de reação, mas também em função da estrutura da xilana empregada.

CAPÍTULO VII

7. ATIVIDADE PREBIÓTICA UTILIZANDO XOS COMO SUBSTRATO NO CRESCIMENTO DA *Staphylococcus epidermidis*

7.1. Introdução

A avaliação da atividade prebiótica dos XOS foi conduzida por meio do crescimento da bactéria *S. epidermidis* utilizando o $HH_{G\text{-}destoxificado}$ rico em XOS de cadeia curta como substrato, obtido por meio da hidrólise enzimática (descrito no item 6.3). Neste estudo, foi empregado o meio de cultura caldo nutriente (NA), no qual as concentrações dos seus componentes foram reduzidas em três vezes ($NA_{modificado}$), com o propósito de obter um meio basal com menor disponibilidade de carbono e nutrientes. O efeito dos XOS adicionados em diferentes concentrações ao meio $NA_{modificado}$ no crescimento da bactéria foi avaliado.

7.2. Materiais e métodos

7.2.1. Microrganismo e condições de cultivo

S. epidermidis ATCC 12228 foi adquirida da Coleção de Cultura Tropical (CCT) da fundação André Tosello, Campinas, São Paulo, Brasil.

- Condições de cultivo

S. epidermidis ATCC 12228 foi mantida em uma solução estoque em criotubos, contendo meio líquido NA e glicerol (15%) e congelados no ultrafreezer a -80 ºC. Em ambiente estéril, os criotubos foram descongelados e 75 µL da cultura foi inoculada em placas de Petri contendo meio sólido NA, previamente esterilizado a 121 ºC por 20 min. A composição do meio consistiu em 15 g/L de ágar nutriente, 1 g/L de extrato de carne, 2 g/L de extrato de levedura, 5 g/L de cloreto de sódio e 5 g/L de peptona A (peptic digest of animal tissue), pH 7,2. As placas foram incubadas a 37 °C por um período de 48 a 72h.

7.2.2. Preparo do pré-inóculo

O pré-inóculo foi preparado em triplicata, em frascos Erlenmeyer de 1000 mL, com volume de trabalho de 250 mL contendo meio líquido $NA_{modificado}$ com pH ajustado para 7,2, previamente esterilizado em autoclave a 121 ºC por 20 min. O meio $NA_{modificado}$ é composto

por: 0,33 g/L de extrato de carne, 0,67 g/L de extrato de levedura, 1,67 g/L de cloreto de sódio e 1,67 g/L de peptona A. Em ambiente estéril as células cultivadas em placas de Petri foram transferidas com auxílio de alças de inoculação descartáveis para cada Erlenmeyer. Posteriormente, as culturas foram incubadas em shaker a 37 °C por 24h, mantidas sob agitação a 250 rpm. Amostras foram retiradas a cada 12h para leitura da densidade óptica por espectrofotometria a 600 nm.

7.2.3. Preparo do inóculo

O inóculo foi preparado em triplicata, em frascos Erlenmeyer de 1000 mL, com volume de trabalho de 250 mL. Em ambiente estéril foi adicionado a cada Erlenmeyer o volume necessário de meio líquido $NA_{modificado}$ com pH 7,2, previamente esterilizado e 30% (v/v) do pré-inóculo. As culturas foram incubadas em shaker a 37 °C, mantidas sob agitação a 250 rpm por 24h e posteriormente foi feita leitura da absorbância a 600 nm.

7.2.4. Crescimento da *S. epidermidis*

O sistema de "Erlenmeyer de sacrifício" foi utilizado para facilitar a amostragem ao longo do crescimento microbiano e evitar uma diluição significativa dos XOS no meio e dificuldades analíticas por cromatografia líquida. Assim, o crescimento da *S. epidermidis* foi avaliado em diferentes composições de meios de cultura:

- Controle negativo (CN): meio $NA_{modificado}$ sem suplementação de fonte de carbono.

- Controle positivo (CP): meio suplementado com glicose em 3 g/L.

- Meio suplementado com XOS (MX_{S1}): X2+X3 em 0,70 g/L.

- Meio suplementado com XOS (MX_{S2}): X2+X3 em 1,40 g/L.

- Meio suplementado com XOS (MX_{S3}): X2+X3 em 2,10 g/L.

O crescimento bacteriano foi conduzido em duplicata, utilizando frascos Erlenmeyer de 100 mL, com volume de trabalho de 10 mL. Em ambiente estéril, foi adicionado o meio de cultura com pH 7,2, previamente esterilizado, na proporção adequada para cada ensaio. Em

seguida, foi adicionado 30% (v/v) do inóculo obtido anteriormente e incubados em shaker sob agitação a 250 rpm e 37 °C por 48h.

7.2.5. Metodologia analítica

A atividade prebiótica dos XOS produzidos neste trabalho foi por análise da concentração celular, das variações no pH e do consumo de XOS durante o crescimento da *S. epidermidis*. Durante o período de cultivo, foram coletadas amostras em intervalos de tempo de 0, 2, 4, 6, 12, 24, 36 e 48h.

- Concentração celular

A determinação da concentração celular foi realizada por medida da densidade óptica (OD) (TAPIA V et al., 2012), com a leitura da absorbância a 600 nm usando um espectrofotômetro digital UV-VIS, (Genesys-10 UV). Água destilada foi utilizada como referência de calibração. Uma curva de calibração foi previamente construída a partir de certa quantidade do inóculo, estabelecendo uma correlação entre a absorbância e o peso seco das células liofilizadas.

- pH e consumo dos XOS

Os sobrenadantes coletados em cada intervalo de tempo tiveram valor de pH monitorados visando avaliar o consumo de XOS. As leituras foram feitas em um pHmetro digital (K39-1014B, Kasvi, Brasil). Enquanto o consumo dos XOS foi quantificado por HPLC, seguindo a metodologia anteriormente descrita no item 3.1.8.

7.3. Resultados

7.3.1. Crescimento da *S. epidermidis*

A *S. epidermidis* é uma bactéria naturalmente presente na pele saudável que libera metabolitos benéficos essenciais para manter o equilíbrio da microbiota cutânea e proteger contra patógenos (BYRD; BELKAID; SEGRE, 2018; FOURNIÈRE et al., 2020). A relação entre a saúde da pele e sua microbiota despertou o interesse crescente da indústria cosmética no uso de ingredientes ativos, como os prebióticos. Em formulações cosméticas, esses ingredientes podem ser usados topicamente servindo como nutrientes específicos para

microrganismos benéficos, contribuindo para a preservação da saúde cutânea (AL-GHAZZEWI; TESTER, 2014; FOURNIÈRE et al., 2020).

Nesse contexto, os XOS apresentam propriedades adequadas para aplicações em produtos cosméticos, que incluem potencial prebiótico, capacidade antioxidante, propriedades emoliente e hidratantes (AMORIM et al., 2019; CAPETTI et al., 2021). Sendo assim a atividade prebiótica dos XOS derivados da melhor condição de hidrólise enzimática (5% $HH_{G\text{-destoxificado}}$ e 0,34 U/mg de XOS de enzima) foi avaliada por meio da comparação do crescimento celular da *S. epidermidis* ATCC 12228 em diferentes concentrações de X2 e X3 presentes no meio de cultura. Além disso, foram avaliados meios de cultura com ou sem adição a suplementação da fonte de substrato, como ilustrado na Tabela 24.

Tabela 24. Composição dos meios de cultura avaliados no crescimento da *S. epidermidis*.

Meios avaliados	**Concentração dos componentes (g/L) nos diferentes meios**						
	Extrato de carne	**Extrato de levedura**	**NaCl**	**Peptona A**	**Glicose**	**X2**	**X3**
CN	0,33	0,67	1,67	1,67	n.a*	n.a*	n.a*
CP	0,33	0,67	1,67	1,67	3	n.a*	n.a*
MX_{S1}	0,33	0,67	1,67	1,67	n.a*	0,42	0,28
MX_{S2}	0,33	0,67	1,67	1,67	n.a*	0,84	0,55
MX_{S3}	0,33	0,67	1,67	1,67	n.a*	1,26	0,83

n.a*: não adicionado no meio de cultura

A quantificação da concentração de carbono, originada tanto dos componentes do meio de cultura $NA_{modificado}$ quanto dos XOS adicionados nos meios suplementados, foi devidamente calculada e está apresentada na Tabela 25.

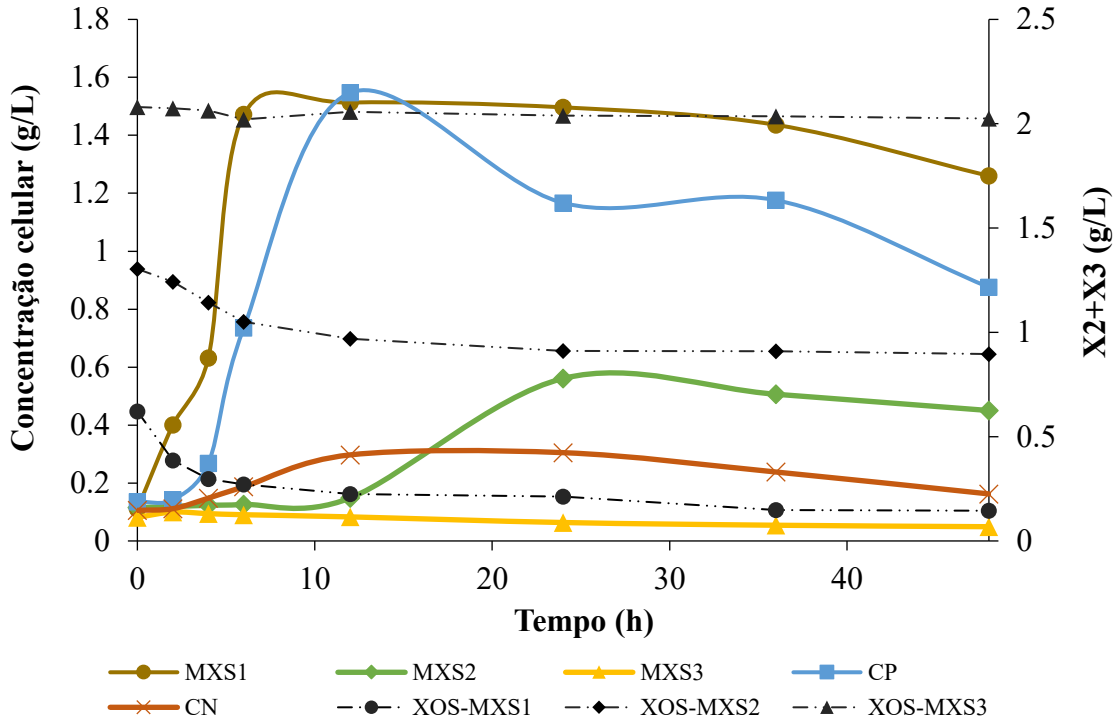
Tabela 25. Concentração de carbono nos meios de cultura avaliados no crescimento da *S. epidermidis*.

Componentes no meio de cultura	**Fração mássica de carbono (%)**	**Concentração de carbono (g/L) nos diferentes meios avaliados**				
		CN	**CP**	**MXS1**	**MXS2**	**MXS3**
Extrato de carne	50	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17
Extrato de levedura	50	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34
NaCl	n.a*	n.a*	n.a*	n.a*	n.a*	n.a*
Peptona A	50	0,84	0,84	0,84	0,84	0,84
Glicose	40	n.a*	1,20	n.a*	n.a*	n.a*
X2	42,26	n.a*	n.a*	0,18	0,36	0,53
X3	43,48	n.a*	n.a*	0,12	0,24	0,36
Carbono total		1,35	2,55	1,65	1,95	2,24

n.a*: não adicionado no meio de cultura

Na Figura 63 encontram-se os resultados para o cultivo da bactéria em diferentes composições de meios de cultura.

Figura 63. Perfil de crescimento celular e consumo de XOS pela *S. epidermidis* em diferentes meios de cultura: médias dos ensaios em duplicata com desvio padrão inferior a 0,023.



No ensaio MX_{S1}, a concentração de carbono total no meio foi de 1,65 g/L, do qual aproximadamente 0,3 g/L foram fornecidos pelos XOS. A concentração de X2+X3 utilizada nesse ensaio, mostrou-se ideal para que a bactéria utilizara eficientemente esses componentes como fonte de substrato resultando em um crescimento notável no cultivo. Nas primeiras 6h, a *S. epidermidis* entrou na fase exponencial, atingindo uma concentração celular de 1,47 ± 0,002 g/L. Após 12h, foi obtida a máxima concentração celular, sendo de 1,51 ± 0,007 g/L, diminuindo ligeiramente para 1,26 ± 0,001 g/L após 48h. A produtividade de biomassa atingida nesse ensaio foi de 2,80 g/L.d.

Por outro lado, no ensaio MX_{S2}, com uma concentração de 1,40 g/L de X2+X3, a concentração de carbono total no meio foi de 1,95 g/L, sendo que 0,6 g/L de carbono foi proporcionado pela suplementação com XOS, onde a bactéria apresentou uma fase lag durante as primeiras 6h de cultivo atingindo a máxima concentração celular em 24h, com apenas 0,56 ± 0,001 g/L, cerca de 63% menos do que o valor máximo no ensaio MX_{S1} e com uma produtividade de biomassa de apenas 0,44 g/L.d.

Entretanto, no ensaio MX_{S3}, com a maior concentração de X2+X3 no meio de cultura (2,10 g/L), a *S. epidermidis* não apresentou crescimento. Os resultados obtidos para os ensaios MX_{S2} e MX_{S3} podem sugerir que as concentrações de XOS estavam em excesso no meio de cultura, o que dificultou a bactéria processá-los de forma efetiva, resultando em um baixo crescimento celular durante o ensaio MX_{S2} e à inibição do crescimento da bactéria no ensaio MX_{S3}.

Nos ensaios realizados como controle, o meio com glicose (CP) apresentou uma concentração máxima celular de 1,55 ± 0,01 g/L, valor próximo ao obtido no ensaio MX_{S1}. A concentração celular caiu progressivamente até finalizar com 0,88 ± 0,01 g/L após 48h. Essa redução pode ser devido pela provável diminuição dos nutrientes disponíveis no meio de cultivo do CP, os quais podem ter sido consumidos nos estágios iniciais do crescimento, quando a bactéria estava se multiplicando ativamente. A concentração de carbono proveniente da glicose foi de 1,20 g/L e 1,35 g/L foi proporcionado pelos componentes do meio. Nesse ensaio a produtividade de biomassa foi de 2,82 g/L.d, valor similar ao atingindo no meio suplementado com XOS em uma concentração de 0,70 g/L (MX_{S1}).

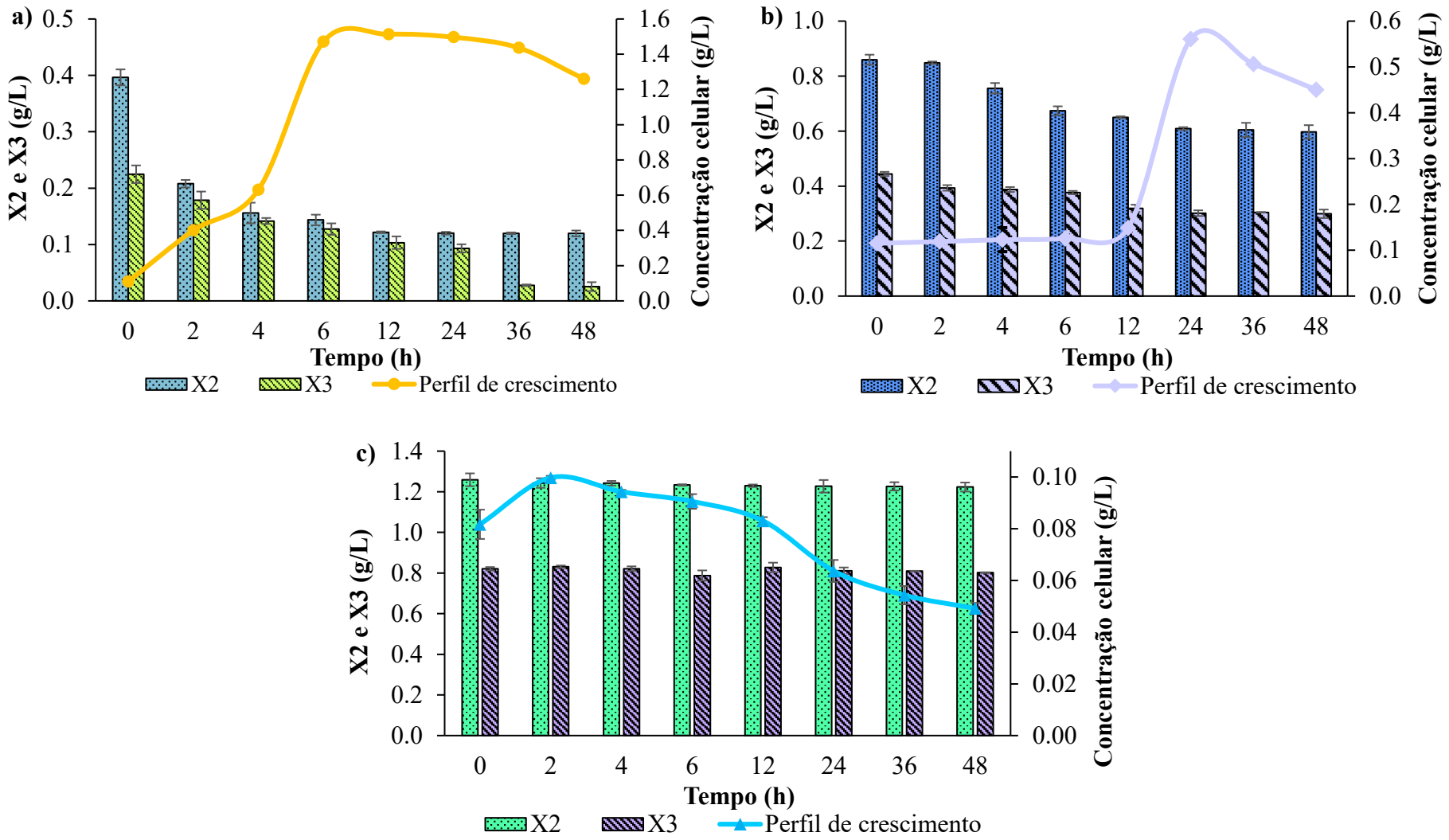
Entretanto, o ensaio realizado como CN a bactéria mostrou um crescimento muito limitado, atingindo apenas 0,30 ± 0,02 g/L em 24h. Isso pode sugerir que os nutrientes no meio de cultura $NA_{modificado}$ podem não ter sido suficientes para sustentar o crescimento da bactéria, destacando a necessidade da suplementação com fontes de carbono, como XOS ou glicose. A máxima concentração celular produzida no ensaio CN foi 80% menor em comparação com o máximo atingido no MX_{S1} e 46,43% inferior em comparação com o máximo valor observado no MX_{S2}. A produtividade de biomassa obtida foi de apenas 0,19 g/L.d.

Os resultados sugerem que os X2+X3 produzidos neste trabalho apresentaram benefícios no crescimento da *S. epidermidis*, especialmente no ensaio MX_{S1}, onde o crescimento foi comparável ao obtido com glicose (CP).

7.3.2. Consumo dos XOS durante o cultivo

A seguir na Figura 64 encontra-se ilustrado o consumo de X2 e X3 e os perfis de crescimento celular durante o cultivo da *S. epidermidis* em meios suplementados com XOS.

Figura 64. Consumo de X2 e X3 e perfil de crescimento da *S. epidermidis* nos meios suplementados com XOS: a) MXS1: 0,70 g/L, b) MXS2: 1,40 g/L e c) MXS3: 2,10 g/L.



Por meio do perfil de consumo dos XOS (Figura 64), pode ser observado que tanto X2 como X3 foram consumidos pela *S. epidermidis* ao longo do tempo de cultivo durante o ensaio MX_{S1}. Nas primeiras 2h de cultivo, a bactéria demostrou um consumo notável de X2, que representou cerca de 47,58% da fonte de substrato consumida, em comparação com 20,50% de X3. Conforme o tempo avançou, a disponibilidade de X2+X3 no meio de cultura diminuiu progressivamente, com aproximadamente 70% de X2 e cerca de 89% de X3 sendo consumidos.

A diferença nas concentrações residuais observadas nos tempos de 36 e 48h entre os dois compostos pode ser atribuída às concentrações iniciais no meio de cultivo. Inicialmente, a concentração de X2 era aproximadamente 1,82 vezes maior em comparação com X3. Isso sugere que a bactéria utilizou preferencialmente X2 em estágios iniciais do cultivo até um tempo de 12h em que o consumo de X2 foi constante e a bactéria passou a consumir mais X3.

Como esperado, no ensaio MX_{S2}, a bactéria apresentou um baixo consumo de X2+X3. Durante o ensaio foi observado que a bactéria demorou um pouco mais para começar a consumir X2. Sendo assim, após 4h de cultivo o consumo de X2 pela bactéria teve início mais pronunciado com um valor aproximado de 12,08% de consumo, e 30,57% ao final de 48h. Em relação a X3, a bactéria consumiu cerca de 11,40% de X2 nas primeiras 2h de cultivo e finalizou com um consumo de 32,63%. O consumo de X2 e X3 observado foi menor em comparação com o ensaio MX_{S1}, isso pode ser atribuído à alta concentração dos XOS adicionados ao meio de cultura, o que pode ter impactado o ritmo de consumo pela bactéria.

Enquanto ao ensaio MX_{S3}, a alta concentração de XOS pode ter atuado de forma inibitória, impedindo o crescimento da bactéria. Como resultado, a bactéria não consumiu esse substrato, apresentando concentrações relativamente estáveis dessas frações dos XOS ao longo do ensaio. O que sugere a importância do uso de concentrações adequadas de X2+X3 para o crescimento da *S. epidermidis.*

7.3.3. Monitoramento do pH dos meios de cultura

Uma maneira de avaliar a atividade metabólica das cepas probióticas é monitorar a variação do pH do meio durante o cultivo (ÁVILA et al., 2020b). Os valores do pH para cada intervalo de tempo avaliado durante o cultivo da bactéria nos diferentes meios de cultura estão apresentados na Tabela 26.

Tabela 26. Variação do pH durante o crescimento da *S. epidermidis* em diferentes condições de meio de cultura.

Tempo (min)	**CP**	**CN**	**MX_{S1}**	**MX_{S2}**	**MX_{S3}**
0	7,40 ± 0,00	7,58 ± 0,01	7,37 ± 0,01	7,54 ± 0,01	7,42 ± 0,01
2	7,31 ± 0,01	7,43 ± 0,02	7,55 ± 0,01	7,58 ± 0,04	7,44 ± 0,01
4	7,16 ± 0,02	7,46 ± 0,04	7,65 ± 0,01	7,59 ± 0,01	7,44 ± 0,01
6	6,93 ± 0,05	7,54 ± 0,00	8,21 ± 0,03	7,73 ± 0,03	7,46 ± 0,02
12	6,53 ± 0,01	7,91 ± 0,01	8,25 ± 0,01	7,91 ± 0,01	7,46 ± 0,02
24	6,43 ± 0,00	8,26 ± 0,04	8,34 ± 0,02	8,02 ± 0,01	7,45 ± 0,01
36	6,33 ± 0,03	8,36 ± 0,06	8,42 ± 0,01	8,15 ± 0,01	7,47 ± 0,01
48	6,05 ± 0,02	8,44 ± 0,01	8,52 ± 0,05	8,14 ± 0,01	7,48 ± 0,01

Durante o cultivo da *S. epidermidis* foi observado variações nos valores de pH nos diferentes meios de cultura. As variações encontradas nos valores de pH neste estudo indicam as diferentes atividades metabólicas da *S. epidermidis* nos diferentes meios de cultura, influenciadas pelos componentes específicos de cada meio.

O meio com glicose (CP) mostrou uma diminuição nos valores do pH, começando em 7,40 ± 0,00 e finalizando com 6,05 ± 0,02. Durante os processos de fermentação podem ser produzidos alguns ácidos graxos de cadeia curta, os quais podem diminuir o valor do pH (NGUYEN et al., 2019). No cultivo de microrganismos prebióticos, esses ácidos têm a capacidade de acidificar o meio e, assim, inibir o crescimento de microrganismos patogênicos. Alguns produtos produzidos pelo metabolismo da *S. epidermidis* são os ácidos acético, butírico láctico e succínico (FOURNIÈRE et al., 2020; LEW; LIONG, 2013).

Por outro lado, no ensaio MX_{S3}, não houve variação significativa nos valores do pH, pois a bactéria não cresceu nesse meio de cultura. Entretanto, nos ensaios MX_{S1} e MX_{S2}, bem

como no CN, houve um aumento acentuado nas faixas dos valores de pH ao longo do tempo de fermentação. O ensaio MX_{S1} apresentou a maior variação de pH, atingindo 8,52 ± 0,05 após 48h de cultivo. Os valores de pH para o ensaio MX_{S2} e CN foram 8,14 ± 0,01 e 8,44 ± 0,01, respectivamente, após o mesmo período. O aumento do valor do pH pode ter ocorrido devido à metabolização das proteínas provenientes dos componentes do meio de cultura pela *S. epidermidis*. Quando essas proteínas são quebradas, liberam aminoácidos que podem ser convertidos em substâncias que elevam o pH do meio. Isso devido à formação de amônia durante a etapa de desaminação, na qual os grupos amino dos aminoácidos são removidos. A amônia atrai prótons, o que resulta no aumento do pH do meio (NELSON; COX, 2014).

A diferença na variação dos valores de pH pode ser atribuída à preferência da bactéria cultivada no meio CP por utilizar a glicose como fonte de substrato, por ser um açúcar mais acessível no meio em comparação com os XOS. O que pode ter levado à produção de metabolitos ácidos que influenciaram a redução do pH no meio de cultura. Por outro lado, no meio CN, a fonte de carbono se originou exclusivamente dos componentes do meio $NA_{modificado}$, o que pode ter resultado no aumento do pH no decorrer desse ensaio.

No meios suplementados com XOS, como MX_{S1} e MX_{S2}, os componentes do meio, como os extratos de carne, levedura e peptona A, contribuíram para uma maior concentração de carbono. Portanto, a bactéria pode ter utilizado para seu crescimento tanto os XOS quanto as fontes de carbono provenientes do próprio meio $NA_{modificado,}$ o que pode ter levado ao aumento das faixas de pH.

Na literatura, a maioria dos estudos relacionados o uso de oligossacarídeos com aplicações prebióticas está focada no estímulo do crescimento seletivo da microbiota intestinal. Isso é alcançado por meio da utilização de oligossacarídeos para promover o crescimento de cepas benéficas, como Lactobacillus e Bifidobactérias (ÁVILA et al., 2020b; CARVALHO et al., 2020; JAICHAKAN et al., 2021; NASCIMENTO et al., 2022; RAJAGOPALAN; SHANMUGAVELU; YANG, 2017; REDDY; KRISHNAN, 2016). Essas pesquisas estão direcionadas à aplicação prebiótica dos XOS visando sua aplicação em produtos funcionais no mercado alimentício.

Apesar do amplo estudo dos XOS e sua atividade prebiótica, o estudo dessas biomoléculas para aplicações cosméticas é escasso. Uma estudo recente desenvolvido por MARTINS et al., (2023) aponta a necessidade desenvolver produtos, entre estes relacionados à

saúde que contenham XOS como parte de sua formulação. Com a finalidade de torná-los mais disponíveis no mercado e realizar pesquisas adicionais para compreender melhor as atividades biológicas e os benefícios dessas biomoléculas, tanto para a saúde quanto para outros usos específicos. Isso envolve a expansão do uso e da pesquisa sobre os XOS em diversas aplicações, aproveitando seu potencial em diferentes setores.

Nesse sentido, os dados produzidos neste trabalho fornecem informações valiosas sobre as metodologias de desconstrução da biomassa dos resíduos de eucalipto para produção de XOS e a avaliação do seu potencial para ser usado como prebióticos. Durante os ensaios do cultivo da *S. epidermidis* demostrou a capacidade da bactéria crescer na presença de concentrações adequadas de XOS de cadeia curta. O que ressaltam o potencial dos XOS, como prebióticos capazes de estimular o crescimento dessa bactéria benéfica. Esses dados fornecem uma base para futuras pesquisas voltadas para a aplicação de XOS no cultivo de microrganismo probióticos presentes na microbiota da pele.

CAPÍTULO VIII

8. CONCLUSÕES E SUGESTOES PARA TRABALHOS FUTUROS

8.1. Conclusões gerais

Os resultados obtidos neste trabalho destacam a importância de uma abordagem cuidadosa e estratégica no pré-tratamento de galhos e cascas de eucalipto, visando maximizar a eficiência na conversão da fração da xilana em produtos de valor agregado como os XOS. Dessa forma, o pré-tratamento hidrotérmico nas condições de temperatura de 175 ºC e tempo de residência de 20 min foi identificado como a melhor estratégia para a produção de XOS a partir dos resíduos de eucalipto. Principalmente, os galhos apresentaram concentrações mais elevadas de XOS totais em comparação com as cascas, indicando seu potencial como uma matéria-prima mais atrativa para a produção de XOS com potencial prebiótico.

Os diferentes métodos de pré-tratamento investigados forneceram informações valiosas sobre a composição dos sólidos recuperados após o pré-tratamento. Esses sólidos podem ser submetidos a hidrólise posterior, resultando na produção de subprodutos a partir da celulose e lignina, contribuindo para o aumento da eficiência global do processo.

A destoxificação utilizando carvão ativado mostrou-se eficiente na remoção de compostos de degradação, principalmente os fenólicos totais, que possuem elevada toxicidade para os microrganismos. Após a destoxificação, esses compostos foram reduzidos em aproximadamente 93,4%. Esta etapa foi crucial para a obtenção de um licor adequado para o aumento da produção de X2 e X3.

A utilização de um produto substituto à maltose como indutor para a produção da xilanase pelo fungo *A. nidulans* mostrou-se eficiente, resultando em uma alta produtividade da enzima. Essa estratégia pode ser uma alternativa promissora para a produção de xilanase a partir de uma fonte de substrato mais econômica.

Os resultados da hidrólise enzimática indicaram que por meio da xilanase recombinante da família GH10, produzida neste trabalho, foi possível aumentar a concentração de X2 e X3 com uma baixa produção de XOS com tamanho de cadeia >X3. A variação dos parâmetros no tratamento enzimático permitiu aumentar a eficiência da enzima produzida na produção de XOS de baixo GP.

Os licores enriquecidos em XOS de cadeia curta foram utilizados como substrato no crescimento da bactéria *Staphylococcus epidermidis (S. epidermidis)*, demostrando um estímulo ao crescimento de bactérias pertencentes à microbiota da pele. Esses resultados demostram o potencial de aplicação dos resíduos de eucalipto para a produção de XOS com propriedades prebióticas.

Os resultados apresentados até o momento fornecem informações relevantes para a obtenção de XOS a partir de resíduos florestais de eucalipto como fonte de matéria-prima. Isto pode contribuir para a redução do acúmulo de resíduos no setor florestal e pode resultar em benefícios tanto para a indústria quanto para a sociedade, através da produção de bioprodutos que valorizam os recursos naturais renováveis.

8.2. Sugestões para trabalhos futuros

- ✓ Avaliar a condição de menor severidade do PTH com a biomassa desacetilada objetivando maiores rendimentos na conversão da hemicelulose em XOS.
- ✓ Avaliar métodos de purificação das frações dos XOS.
- ✓ Estudar a obtenção de oligômeros da fração da celulose a partir dos resíduos sólidos recuperados após a etapa de PTH.
- ✓ Realizar uma análise técnico-econômica do processo de produção de XOS pelo método de PTH e hidrólise enzimática a partir dos galhos e cascas de eucalipto.
- ✓ Avaliar a atividade prebiótica dos XOS através do cultivo de um consorcio reduzido de bactérias da microbiota da pele.

REFERÊNCIAS

AACHARY, A. A.; PRAPULLA, S. G. Value addition to corncob: Production and characterization of xylooligosaccharides from alkali pretreated lignin-saccharide complex using Aspergillus oryzae MTCC 5154. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 2, p. 991–995, 2009.

AACHARY, A. A.; PRAPULLA, S. G. Xylooligosaccharides (XOS) as an Emerging Prebiotic: Microbial Synthesis, Utilization, Structural Characterization, Bioactive Properties, and Applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 10, n. 1, p. 2–16, 2011.

ABATZOGLOU, N.; CHORNET, E.; KHALED, B. Phenomenological kinetics of complex systems: the develpment of a generalized severity parameter and its application to lignocellulosics fractionation. **Chemical Engineering Journal**, v. 47, n. 5, p. 1109–1122, 1992.

ABDELLA, A.; SEGATO, F.; WILKINS, M. R. Optimization of nutrient medium components for production of a client endo-β-1,4-xylanase from Aspergillus fumigatus var. niveus using a recombinant Aspergillus nidulans strain. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 20, n. July, p. 101267, 2019.

ABRAF. **Silvicultura 2016 Brazilian Forestry and Timber Yearbook**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <http://www.abaf.org.br/wp-content/uploads/2016/04/anuario-de-silvicultura-2016.pdf>.

AHMAD, N.; ZAKARIA, M. R. Oligosaccharide From Hemicellulose. In: ARIFFIN, H.; SAPUAN, S. M.; HASSAN, M. A. (Eds.). **Lignocellulose for Future Bioeconomy**. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 135–152.

AKPINAR, O.; ERDOGAN, K.; BOSTANCI, S. Production of xylooligosaccharides by controlled acid hydrolysis of lignocellulosic materials. **Carbohydrate Research**, v. 344, p. 660–666, 2009a.

AKPINAR, O.; ERDOGAN, K.; BOSTANCI, S. Enzymatic production of Xylooligosaccharide from selected agricultural wastes. **Food and Bioproducts Processing**, v. 87, n. 2, p. 145–151, 2009b.

AL-GHAZZEWI, F. H.; TESTER, R. F. Impact of prebiotics and probiotics on skin health. **Beneficial Microbes**, v. 5, n. 2, p. 99–107, 2014.

ÁLVAREZ, C. et al. Optimized use of hemicellulose within a biorefinery for processing high value-added xylooligosaccharides. **Industrial Crops and Products**, v. 99, p. 41–48, 2017.

ÁLVAREZ, C. et al. In Vitro Assessment of the Prebiotic Potential of Xylooligosaccharides from Barley Straw. **Foods**, v. 12, n. 83, p. 1–14, 2023.

ALVIRA, P. et al. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4851–4861, 2010.

AMABILINI, V. D. **Utilização do Harvester na exploração florestal**. SIMPÓSIO

BRASILEIRO SOBRE EXPLORAÇÃO E TRANSPORTE FLORESTAL. **Anais**...Belo Horizonte: 1991.

AMIT, K. et al. A review of factors affecting enzymatic hydrolysis of pretreated lignocellulosic Biomass. **Research Journal of Chemistry and Environment**, v. 22, n. 7, p. 62–67, 2018.

AMORIM, C. et al. From lignocellulosic residues to market: Production and commercial potential of xylooligosaccharides. **Biotechnology Advances**, n. xxxx, p. 0–1, 2019.

ANDO, H. et al. Hot-compressed-water decomposed products from bamboo manifest a selective cytotoxicity against acute lymphoblastic leukemia cells. **Toxicology in Vitro**, v. 18, n. 6, p. 765–771, 2004.

ANTOV, M. G.; ĐORĐEVIĆ, T. R. Environmental-friendly technologies for the production of antioxidant xylooligosaccharides from wheat chaff. **Food Chemistry**, v. 235, p. 175–180, 2017.

ANWAR, Z.; GULFRAZ, M.; IRSHAD, M. Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: A brief review. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 7, n. 2, p. 163–173, 2014.

ÁVILA, P. F. et al. Xylooligosaccharides production from a sugarcane biomass mixture: effects of commercial enzyme combinations on bagasse/straw hydrolysis pretreated using different strategies. **Food Research International**, v. 128, p. 108702, 2020a.

ÁVILA, P. F. et al. Xylooligosaccharides production by commercial enzyme mixture from agricultural wastes and their prebiotic and antioxidant potential. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 24, 1 out. 2020b.

BAKRI, Y. et al. EVALUATION of XYLANASE PRODUCTION from FILAMENTOUS FUNGI with DIFFERENT LIFESTYLES. **Acta Alimentaria**, v. 49, n. 2, p. 197–203, 2020.

BAKTASH, M. M.; AHSAN, L.; NI, Y. Production of furfural from an industrial pre-hydrolysis liquor. **Separation and Purification Technology**, v. 149, p. 407–412, 2015.

BANKA, A. L.; ALBAYRAK GURALP, S.; GULARI, E. Secretory Expression and Characterization of Two Hemicellulases, Xylanase, and β-Xylosidase, Isolated from Bacillus Subtilis M015. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 174, n. 8, p. 2702–2710, 2014.

BARTA, K.; FORD, P. C. Catalytic conversion of nonfood woody biomass solids to organic liquids. **Accounts of Chemical Research**, v. 47, n. 5, p. 1503–1512, 2014.

BAZETTO, M. C. Q. **PRÉ-TRATAMENTO DE BAIXA SEVERIDADE PARA PRODUÇÃO DE XILOOLIGOSSACARÍDEOS A PARTIR DE DUAS VARIEDADES DE CANA-ENERGIA**. [s.l.] Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 2018.

BEULCH, L. DA S. **BIOMASSA E NUTRIENTES EM UM POVOAMENTO DE Eucalyptus saligna Smith SUBMETIDO AO PRIMEIRO DEBASTE**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Maria (UFSM,RS), 2013.

BHARGAVA, S. et al. Solid-state Fermentation : An Overview. **Chemical and Biochemical Engineering Quartely**, v. 22, n. 1, p. 49–70, 2008.

BIAN, J. et al. Structural features and antioxidant activity of xylooligosaccharides enzymatically produced from sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 127, p. 236–241, 2013.

BIELY, P.; SINGH, S.; PUCHART, V. Towards enzymatic breakdown of complex plant xylan structures: State of the art. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 7, p. 1260–1274, 2016.

BORREGA, M.; NIEMINEN, K.; SIXTA, H. Degradation kinetics of the main carbohydrates in birch wood during hot water extraction in a batch reactor at elevated temperatures. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 22, p. 10724–10732, 2011.

BRAGATTO, J. **Avaliação do potencial da casca de Eucalyptus spp. para a produção de bioetanol. (Tese de Doutora**. [s.l.] USP, 2010.

BRAGATTO, J.; SEGATO, F.; SQUINA, F. M. Production of xylooligosaccharides (XOS) from delignified sugarcane bagasse by peroxide-HAc process using recombinant xylanase from Bacillus subtilis. **Industrial Crops and Products**, v. 51, p. 123–129, 2013.

BRENELLI, L. B. et al. An integrated approach to obtain xylo-oligosaccharides from sugarcane straw: From lab to pilot scale. **Bioresource Technology**, v. 313, n. June, p. 123637, 2020.

BRIDGWATER, T. Biomass for energy. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 86, p. 1755–1768, 2006.

BRINGMANN, M. et al. Cracking the elusive alignment hypothesis: The microtubule-cellulose synthase nexus unraveled. **Trends in Plant Science**, v. 17, n. 11, p. 666–674, 2012.

BRODEUR, G. et al. Chemical and Physicochemical Pretreatment of Lignocellulosic Biomass : A Review. **Enzyme Research**, v. 2011, p. 1–17, 2011.

BURUIANĂ, C.-T.; CAMELIA VIZIREANU. PREBIOTIC XYLOOLIGOSACCHARIDES FROM LIGNOCELLULOSIC MATERIALS: PRODUCTION, PURIFICATION AND APPLICATIONS – AN OVERVIEW. **The Annals of the University Dunarea de Jos of Galati Fascicle VI – Food Technology**, v. 38, n. 2, p. 18–31, 2014.

BUSTAMANTE, M. et al. Probiotics and prebiotics potential for the care of skin, female urogenital tract, and respiratory tract. **Folia Microbiologica**, v. 65, n. 2, p. 245–264, 2020.

BYRD, A. L.; BELKAID, Y.; SEGRE, J. A. The human skin microbiome. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 3, p. 143–155, 2018.

CANETIERI, E. et al. Optimization of acid hydrolysis from the hemicellulosic fraction of Eucalyptus grandis residue using response surface methodology. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 2, p. 422–428, 2007.

CANETTIERI, E. V. et al. Evaluation of the kinetics of xylose formation from dilute sulfuric acid hydrolysis of forest residues of eucalyptus grandis. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 46, n. 7, p. 1938–1944, 2007.

CANILHA, L. et al. Bioconversion of sugarcane biomass into ethanol: An overview about composition, pretreatment methods, detoxification of hydrolysates, enzymatic saccharification, and ethanol fermentation. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, 2012.

CAO, L. et al. Hydrothermal liquefaction of agricultural and forestry wastes: state-of-the-art review and future prospects. **Bioresource Technology**, v. 245, n. August, p. 1184–1193, 2017.

CAPETTI, C. C. DE M. et al. Recent advances in the enzymatic production and applications of xylooligosaccharides. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 37, n. 169, p. 1–12, 2021.

CARA, C. et al. Conversion of olive tree biomass into fermentable sugars by dilute acid pretreatment and enzymatic saccharification. **Biomass Fractionation Technologies for a Lignocellulosic Feedstock Based Biorefinery**, v. 99, p. 1869–1876, 2008.

Carbohydrate Active Enzymes (CAZy). Disponível em: <https://www.enzyme-database.org/>. Acesso em: 8 set. 2022.

CARROLL, A.; SOMERVILLE, C. Cellulosic Biofuels. **Annual Review of Plant Biology**, v. 60, p. 165–182, 2009.

CARVALHEIRO, F. et al. Hydrothermal/Liquid Hot WaterPretreatment (Autohydrolysis): A Multipurpose Process for BiomassUpgrading. In: MUSSATTO, S. I. (Ed.). **Biomass Fractionation Technologies for a Lignocellulosic Feedstock Based Biorefinery**. [s.l.] Elsevier, 2016. p. 315–347.

CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; GÍRIO, F. M. Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 67, p. 849–864, 2008.

CARVALHO, A. F. A. et al. Xylo-oligosaccharides from lignocellulosic materials: Chemical structure, health benefits and production by chemical and enzymatic hydrolysis. **Food Research International**, v. 51, n. 1, p. 75–85, 2013.

CARVALHO, A. F. A. et al. The potential of tailoring the conditions of steam explosion to produce xylo-oligosaccharides from sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 250, n. October 2017, p. 221–229, 2018.

CARVALHO, A. F. A. et al. Improvement of some chemical and biological methods for the efficient production of xylanases, xylooligosaccharides and lignocellulose from sugar cane bagasse. **Biomass and Bioenergy**, v. 143, n. October, p. 105851, 2020.

CARVALHO, D. M. DE et al. Assessment of chemical transformations in eucalyptus, sugarcane bagasse and straw during hydrothermal, dilute acid, and alkaline pretreatments. **Industrial Crops and Products**, v. 73, p. 118–126, 2015.

CASTRO, R. C. D. . et al. Alkaline deacetylation as a strategy to improve sugars recovery and ethanol production from rice straw hemicellulose and cellulose. **Industrial Crops & Products**, v. 106, p. 65–73, 2017.

CHADHA, B. S. et al. Thermostable xylanases from thermophilic fungi and bacteria: Current perspective. **Bioresource Technology**, v. 277, n. November 2018, p. 195–203, 2019.

CHANDRA, R. P. et al. Substrate Pretreatment: The Key to Effective Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulosics? In: **Advances in biochemical engineering/biotechnology.** [s.l.] Springer, 2007. v. 108p. 67–93.

CHAPLA, D. et al. Characterization of purified fungal endoxylanase and its application for production of value added food ingredient from agroresidues. **Food and Bioproducts Processing**, v. 91, n. 4, p. 682–692, 2013.

CHEN, H. **Chemical Composition and Structure of Natural Lignocellulose. In: Biotechnology of Lignocellulose**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2014.

CHEN, J. et al. Response of Biomass Species to Hydrothermal Pretreatment. In: RUIZ, H. A.; THOMSEN, M. H.; TRAJANO, H. L. (Eds.). **Hydrothermal Processing in Biorefineries: Production of Bioethanol and High Added-Value Compounds of Second and Third Generation Biomass**. Cham, Switzerland: Springer Nature, 2017. p. 95–140.

CHEN, X. et al. Improved Xylan Hydrolysis of Corn Stover by Deacetylation with High Solids Dilute Acid Pretreatment. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 51, p. 70–76, 2012.

CHERUBINI, F. The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. **Energy Conversion and Management**, v. 51, p. 1412–1421, 2010.

CHU, Q. et al. Functional cello-oligosaccharides production from the corncob residues of xylo-oligosaccharides manufacture. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 8, p. 1217–1222, 2014.

CHUM, H. L. et al. Pretreatment-Catalyst Effects and the Combined Severity Parameter. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 24/25, p. 1–14, 1990.

CLAUDEL, J. P. et al. Staphylococcus epidermidis: A Potential New Player in the Physiopathology of Acne? **Dermatology**, v. 235, n. 4, p. 287–294, 2019.

CORBETT, D. B. et al. Hydrophobic resin treatment of hydrothermal autohydrolysate for prebiotic applications. **Royal Society of Chemistry**, v. 9, p. 31819–31827, 2019.

COUGER, B. et al. The genome of a thermo tolerant, pathogenic albino Aspergillus fumigatus. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. AUG, p. 1–11, 2018.

DA-SILVA, R.; FRANCO, C. M. .; GOMES, E. Pectinases, Hemicelulases e Celulases, Ação, Produção e Aplicação no Processamento de Alimentos: Revisão. **Boletim da SBCTA**, v. 31, n. 2, p. 249–260, 1997.

DE FREITAS, C.; CARMONA, E.; BRIENZO, M. Xylooligosaccharides production process from lignocellulosic biomass and bioactive effects. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 18, n. April, p. 100184, 2019.

DEGUCHI, Y.; MORISHITA, T.; MUTAI, M. Comparative studies on synthesis of water-soluble vitamins among human species of bifidobacteria. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 49, n. 1, p. 13–19, 1985.

DEL RÍO, J. C. et al. Occurrence of naturally acetylated lignin units. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 5461–5468, 2007.

DELMER, D. P. CELLULOSE BIOSYNTHESIS: Exciting Times for A Difficult Field of Study. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 50, p. 245–276, 1999.

DO NASCIMENTO, B. F. et al. Detoxification of sisal bagasse hydrolysate using activated carbon produced from the gasification of açaí waste. **Journal of Hazardous Materials**, v. 409, n. August 2020, 2021.

DOMINGUES, R. M. A. et al. Eucalyptus globulus biomass residues from pulping industry as a source of high value triterpenic compounds. **Industrial Crops and Products**, v. 31, n. 1, p. 65–70, 2010.

DOS SANTOS ROCHA, M. S. R. et al. A kinetic model for hydrothermal pretreatment of sugarcane straw. **Bioresource Technology**, v. 228, p. 176–185, 2017.

DUVAL, A.; LAWOKO, M. A review on lignin-based polymeric, micro- and nano-structured materials. **Reactive and Functional Polymers**, v. 85, p. 78–96, 2014.

EL ENSHASY, H. A. et al. Microbial Xylanases: Sources, Types, and Their Applications. In: GUPTA, V. K. (Ed.). **Biofuel and Biorefinery Technologies 3**. 3. ed. Switzerland: Springer, 2016. p. 151–213.

EMONS, A. M. C.; SCHEL, J. H. N.; MULDER, B. M. The geometrical model for microfibril deposition and the influence of the cell wall matrix. **Plant Biology**, v. 4, p. 22–26, 2002.

FEI, Y. et al. Xylooligosaccharide Modulates Gut Microbiota and Alleviates Colonic Inflammation Caused by High Fat Diet Induced Obesity. **Frontiers in Physiology**, v. 10, n. January, p. 1–12, 2020.

FENG, S. et al. Valorization of bark for chemicals and materials: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 26, p. 560–578, 2013.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood chemistry, ultrastructure, reactions**. Berlin: Walter de Gruyter & CO, 1989.

FITZPATRICK, M. et al. A biorefinery processing perspective: Treatment of lignocellulosic materials for the production of value-added products. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 23, p. 8915–8922, 2010.

FOELKEL, C. Casca da árvore do eucalipto : Aspectos morfológicos , fisiológicos , florestais , ecológicos e industriais , visando a produção de celulose e papel. **Eucalyptus Online Book e Newsletter**, p. 109, 2010.

FOELKEL, C. As Biorrefinarias Integradas no Setor Brasileiro de Fabricação de Celulose e Papel de Eucalipto. **Eucalyptus Online Book & Newsletter**, p. 1–270, 2016.

FOELKEL, C. A Madeira do Eucalipto para Produção de Celulose - Discutindo o Conceito de "Utilização da Árvore Integral" do Eucalipto com Foco na Produção de Celulose Kraft. **Eucalyptus Online Book & Newsletter**, 2017.

FOURNIÈRE, M. et al. Staphylococcus epidermidis and cutibacterium acnes: Two major sentinels of skin microbiota and the influence of cosmetics. **Microorganisms**, v. 8, n. 11, p. 1–31, 2020.

GALBE, M.; ZACCHI, G. Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production. In: **Advances in biochemical engineering/biotechnology.** [s.l.] Springer, 2007. p.

41-65.

GALBE, M.; ZACCHI, G. Produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos. In: CORTEZ (Ed.). **Bioetanol de cana-de-açúcar: PeD para produtividade sustentabilidade**. São Paulo: Blücher, 2010. p. 697–716.

GALLINA, G. et al. Optimal conditions for hemicelluloses extraction from Eucalyptus globulus wood: Hydrothermal treatment in a semi-continuous reactor. **Fuel Processing Technology**, v. 148, p. 350–360, 2016.

GARCIA & PIMENTEL - GOMES. Forest otlines of Brazil. **Revista de Agricultura**, v. 67, p. 105–117, 1992.

GARROTE, G.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJO, J. C. Mild autohydrolysis: an environmentally friendly technology for xylooligosaccharide production from wood. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 74, p. 1101–1109, 1999.

GARROTE, G.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J. C. Generation of xylose solutions from Eucalyptus globulus wood by autohydrolysis-posthydrolysis processes: Posthydrolysis kinetics. **Bioresource Technology**, v. 79, n. 2, p. 155–164, 2001.

GIBSON, G. R. et al. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. **Nutrition Research Reviews**, v. 17, p. 259–275, 2004.

GOUVEIA, E. R.; SOUTO-MAIOR, R. T. DO N. A. M.; ROCHA, G. J. DE M. VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA A CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1500–1503, 2009.

GOWDHAMAN, D.; PONNUSAMI, V. Production and optimization of xylooligosaccharides from corncob by Bacillus aerophilus KGJ2 xylanase and its antioxidant potential. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 79, p. 595–600, 2015.

GRICE, E. A.; SEGRE, J. A. The skin microbiome. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 4, p. 244–253, 2011.

GULLÓN, B. et al. Production of oligosaccharides and sugars from rye straw: A kinetic approach. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 17, p. 6676–6684, 2010.

GULLÓN, P. et al. Structural features and properties of soluble products derived from Eucalyptus globulus hemicelluloses. **Food Chemistry**, v. 127, n. 4, p. 1798–1807, 2011.

GULLÓN, P.; GONZÁLEZ-MUÑOZ, M. J.; PARAJÓ, J. C. Manufacture and prebiotic potential of oligosaccharides derived from industrial solid wastes. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 10, p. 6112–6119, 2011.

GUO, K. N. et al. Efficient fractionation of bamboo residue by autohydrolysis and deep eutectic solvents pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 354, n. April, p. 127225, 2022.

GUPTA, A.; VERMA, J. P. Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 41, p. 550–567, 2015.

GUPTA, P. K. et al. Xylooligosaccharides and Their Anticancer Potential: An Update. In:

AKHTAR, M. S.; SWAMY, M. K. (Eds.). **Anticancer Plants: Natural Products and Biotechnological Implements**. [s.l.] Springer, 2018. v. 2p. 255–271.

HADNAĐEV, M.; DAPČEVIĆ-HADNAĐEV, T.; L. DOKIĆ. Functionality of Starch Derivatives in Bakery and Confectionery Products. In: A. M. GRUMEZESCU; HOLBAN, A. M. (Eds.). **Biopolymers for Food Desing**. [s.l.] Academic Press INC, 2018. p. 279–311.

HAGHIGHI, S. et al. Lignocellulosic biomass to bioethanol , a comprehensive review with a focus on pretreatment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p. 77–93, 2013.

HANSEN, G. H. et al. Production of cellulolytic enzymes from ascomycetes: Comparison of solid state and submerged fermentation. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 9, p. 1327–1341, 2015.

HE, J. et al. The effect of lignin degradation products on the generation of pseudo-lignin during dilute acid pretreatment. **Industrial Crops and Products**, v. 146, n. February, p. 1–8, 2020.

HECK, J. X.; HERTZ, P. F.; AYUB, M. A. Z. Cellulase and xylanase production by isolated amazon Bacillus strains using soybean industrial residue based solid-state cultivation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, n. 3, p. 213–218, 2002.

HEER, D.; HEINE, D.; SAUER, U. Resistance of Saccharomyces cerevisiae to high concentrations of furfural is based on NADPH-dependent reduction by at least two oxireductases. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 24, p. 7631–7638, 2009.

HIMMEL, M. E. et al. Biomass Recalcitrance: Engineering Plants and Enzymes for Biofuels Production. **Science**, v. 315, p. 804–808, 2007.

HUANG, C. et al. An integrated process to produce bio-ethanol and xylooligosaccharides rich in xylobiose and xylotriose from high ash content waste wheat straw. **Bioresource Technology**, v. 241, p. 228–235, 2017.

IBÁ. **Indústria Brasileira de Árvores. Relatório 2017**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <https://www.iba.org/datafiles/publicacoes/pdf/iba-relatorioanual2017.pdf>.

IBÁ. **Indústria Brasilera de Árvores. "Relatório Anual 2021"**. [s.l: s.n.].

IBÁ. **Indústria Brasilera de Árvores. "Relatório Anual 2022"**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <https://www.iba.org/datafiles/publicacoes/relatorios/relatorio-anual-iba2022-compactado.pdf>.

INALBON, M. C.; MOCCHIUTTI, P.; ZANUTTINI, M. The deacetylation reaction in Eucalyptus wood: Kinetics and effects on the effective diffusion. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 7, p. 2254–2258, 2009.

JACOBSEN, S. E.; WYMAN, C. E. Xylose Monomer and Oligomer Yields for Uncatalyzed Hydrolysis of Sugarcane Bagasse Hemicellulose at Varying Solids Concentration. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 41, p. 1454–1461, 2002.

JAGTAP, S. et al. Xylooligosaccharides production by crude microbial enzymes from agricultural waste without prior treatment and their potential application as nutraceuticals. **Bioresource Technology**, v. 245, n. September, p. 283–288, 2017.

JAICHAKAN, P. et al. Two-stage processing for xylooligosaccharide recovery from rice by-products and evaluation of products: Promotion of lactic acid-producing bacterial growth and food application in a high-pressure process. **Food Research International**, v. 147, n. January, p. 110529, 2021.

JAYAPAL, N. et al. Value addition to sugarcane bagasse: Xylan extraction and its process optimization for xylooligosaccharides production. **Industrial Crops and Products**, v. 42, n. 1, p. 14–24, 2013.

JIANG, Z. Q. et al. The recombinant xylanase B of Thermotoga maritima is highly xylan specific and produces exclusively xylobiose from xylans, a unique character for industrial applications. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 27, p. 207–213, 2004.

JÖNSSON, L. J.; MARTÍN, C. Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 103–112, 2016.

JÚNIOR, D. L.; COLODETTE, J. L. Remoção de hemiceluloses da madeira por tratamento de auto-hidrólise. **Ciencia Florestal**, v. 21, n. 3, p. 541–550, 2011.

JUTURU, V.; WU, J. C. Microbial xylanases: Engineering, production and industrial applications. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 6, p. 1219–1227, 2012.

KABEL, M. A. et al. In vitro fermentability of differently substituted xylo-oligosaccharides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 6205–6210, 2002.

KABEL, M. A. et al. Effect of pretreatment severity on xylan solubility and enzymatic breakdown of the remaining cellulose from wheat straw. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2034–2042, 2007.

KAMM, B.; KAMM, M. Biorefineries – Multi Product Processes. In: ULBER, R.; SELL, D. (Eds.). **White Biotechnology. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**. 105. ed. [s.l.] Springer Berlin Heidelberg, 2007. p. 175–204.

KARIMI, K.; KHERADMANDINIA, S.; TAHERZADEH, M. J. Conversion of rice straw to sugars by dilute-acid hydrolysis. **Biomass and Bioenergy**, v. 30, n. 3, p. 247–253, 2006.

KHONZUE, P. et al. Optimization of xylanase production from aspergillus niger for biobleaching of eucalyptus pulp. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 75, n. 6, p. 1129–1134, 2011.

KUHAD, R. C.; SINGH, A. Lignocellulose biotechnology: Current and future prospects. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 13, n. 2, p. 151–172, 1993.

KUMAR, P. et al. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 48, n. 8, p. 3713–3729, 2009.

KUMAR, R.; WYMAN, C. E. The impact of dilute sulfuric acid on the selectivity of xylooligomer depolymerization to monomers. **Carbohydrate Research**, v. 343, p. 290–300, 2008.

LAI-CHEONG, J. E.; MCGRATH, J. A. Structure and function of skin, hair and nails. **Medicine (United Kingdom)**, v. 41, n. 6, p. 317–320, 2013.

LEW, L. C.; LIONG, M. T. Bioactives from probiotics for dermal health: Functions and benefits. **Journal of Applied Microbiology**, v. 114, n. 5, p. 1241–1253, 2013.

LIAVOGA, A. B.; BIAN, Y.; SEIB, P. A. Release of D-xylose from wheat straw by acid and xylanase hydrolysis and purification of xylitol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 19, p. 7758–7766, 2007.

LIMA, C. S. et al. Multiscale Alterations in Sugar Cane Bagasse and Straw Submitted to Alkaline Deacetylation. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 6, n. 3, p. 3796–3804, 2018a.

LIMA, L. et al. Chemical and anatomical characterization, and antioxidant properties of barks from 11 Eucalyptus species. **European Journal of Wood and Wood Products**, v. 76, n. 2, p. 783–792, 2018b.

LIMA, M. A. et al. Effects of pretreatment on morphology , chemical composition and enzymatic digestibility of eucalyptus bark : a potentially valuable source of fermentable sugars for biofuel production – part 1. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 75, p. 1–17, 2013.

LINARES-PASTEN, J. A.; ARONSSON, A.; KARLSSON, E. N. Structural Considerations on the Use of Endo-Xylanases for the Production of prebiotic Xylooligosaccharides from Biomass. **Current Protein & Peptide Science**, v. 19, p. 48–67, 2018.

LLANO, T.; QUIJORNA, N.; COZ, A. Detoxification of a lignocellulosic waste from a pulp mill to enhance its fermentation prospects. **Energies**, v. 10, n. 3, 2017.

LOLOU, V.; PANAYIOTIDIS, M. I. Functional role of probiotics and prebiotics on skin health and disease. **Fermentation**, v. 5, n. 2, 2019.

LONGUE JÚNIOR, D.; COLODETTE, J. L. Importância e versatilidade da madeira de eucalipto para a indústria de base florestal. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 33, n. 76, p. 429–438, 2014.

LOOW, Y. et al. Typical conversion of lignocellulosic biomass into reducing sugars using dilute acid hydrolysis and alkaline pretreatment. **Cellulose**, v. 23, p. 1491–1520, 2016.

LÓPEZ, F. et al. Optimization of furfural production by acid hydrolysis of Eucalyptus globulus in two stages. **Chemical Engineering Journal**, v. 240, p. 195–201, 2014.

LU, Y.; MOSIER, N. S. Kinetic modeling analysis of maleic acid-catalyzed hemicellulose hydrolysis in corn stover. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 101, n. 6, p. 1170–1181, 2008.

MACRAE, R.; ROBINSON, R. K.; SADLER, M. J. **"Encyclopaedia of Food Science," Food Technology and Nutrition**. San Diego: Academic Press INC, 1993.

MAFEI, T. D. T. et al. Extraction and Characterization of Hemicellulose from Eucalyptus By-product: Assessment of Enzymatic Hydrolysis to Produce Xylooligosaccharides. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 190, n. 1, p. 197–217, 2020.

MALGAS, S. et al. A mini review of xylanolytic enzymes with regards to their synergistic interactions during hetero-xylan degradation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 187, p. 1–13, 2019.

MARCONDES, W. F.; MILAGRES, A. M. F.; ARANTES, V. Co-production of xylo-oligosaccharides, xylose and cellulose nano fibrils from sugarcane bagasse. **Journal of Biotechnology**, v. 321, n. July, p. 35–47, 2020.

MARKETSANDMARKETS^{TM}. **Prebiotic Ingredients Market Worth 7.37 Billion USD by 2023**. Disponível em: <https://www.prnewswire.com/news-releases/prebiotic-ingredients-market-worth-737-billion-usd-by-2023-670471503.html>. Acesso em: 20 maio. 2019.

MARTÍNEZ-PACHECO, M. M. et al. Optimization of production of xylanases with low cellulases in Fusarium solani by means of a solid state fermentation using statistical experimental design. **Revista Argentina de Microbiologia**, v. 52, n. 4, p. 328–338, 2020.

MARTINS, M. et al. Recent advances in xylo-oligosaccharides production and applications: A comprehensive review and bibliometric analysis. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 47, n. October 2022, p. 102608, 2023.

MARTON, J. M. et al. Evaluation of the activated charcoals and adsorption conditions used in the treatment of sugarcane bagasse hydrolysate for xylitol production. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 23, n. 1, p. 9–21, 2006.

MATHEW, S.; KARLSSON, E. N.; ADLERCREUTZ, P. Extraction of soluble arabinoxylan from enzymatically pretreated wheat bran and production of short xylo-oligosaccharides and arabinoxylo-oligosaccharides from arabinoxylan by glycoside hydrolase family 10 and 11 endoxylanases. **Journal of Biotechnology**, v. 260, n. March, p. 53–61, 2017.

MENON, V.; RAO, M. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels , platform chemicals & biorefinery concept. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 38, p. 522–550, 2012.

MICHLMAYR, H. et al. Arabinoxylan oligosaccharide hydrolysis by family 43 and 51 glycosidases from Lactobacillus brevis DSM 20054. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 21, p. 6747–6754, 2013.

MILESSI, T. S. et al. Xylooligosaccharides production chain in sugarcane biorefineries : From the selection of pretreatment conditions to the evaluation of nutritional properties. **Industrial Crops & Products**, v. 172, p. 114056, 2021.

MODENBACH, A. A.; NOKES, S. E. The Use of High-Solids Loadings in Biomass Pretreatment — A Review. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, n. 6, p. 1430–1442, 2012.

MODLER, H. W. Bifidogenic factors-sources, metabolism and applications. **International Dairy Journal**, v. 4, n. 5, p. 383–407, 1994.

MOHAN, D.; PITTMAN, C. U.; STEELE, P. H. Pyrolysis of Wood/Biomass for Bio-oil: A Critical Review. **Energy & Fuels**, n. 20, p. 848–889, 2006.

MONCADA, J. .; ARISTIZÁBAL, M. V; CARDONA, A. C. . Design strategies for sustainable biorefineries. **Biochemical Engineering Journal**, v. 116, p. 122–134, 2016.

MONTANÉ, D. et al. Removal of lignin and associated impurities from xylo-oligosaccharides by activated carbon adsorption. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 45, n. 7, p. 2294–2302, 2006.

MONTEIRO, C. R. M. et al. Evaluation of hydrothermal sugarcane bagasse treatment for the production of xylooligosaccharides in different pressures. **Food Process Engineering**, v. 45, n. 2, p. 1–10, 2022.

MOREIRA, M. G.; PEÑA, J. A. T.; FRANCO, T. T. Estratégias para recuperação de xilooligossacarídeos do licor de resíduos de eucalipto para avaliação do seu efeito estimulante em Staphylococcus xylosus. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 3814, p. 1–19, 2023.

MOSIER, N. et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource technology**, v. 96, p. 673–686, 2005a.

MOSIER, N. et al. Optimization of pH controlled liquid hot water pretreatment of corn stover. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 18 SPEC. ISS., p. 1986–1993, 2005b.

MOURE, A. et al. Advances in the manufacture, purification and applications of xylo-oligosaccharides as food additives and nutraceuticals. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 9, p. 1913–1923, 2006.

MUÑOZ-PÁEZ, K. M. et al. Distinct effects of furfural, hydroxymethylfurfural and its mixtures on dark fermentation hydrogen production and microbial structure of a mixed culture. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 4, p. 2289–2297, 2019.

MUSSATTO, S. I. Biomass Pretreatment With Acids. In: MUSSATTO, S. I. (Ed.). **Biomass Fractionation Technologies for a Lignocellulosic Feedstock Based Biorefinery**. [s.l.] Elsevier Inc., 2016. p. 169–185.

NABARLATZ, D.; EBRINGEROVÁ, A.; MONTANÉ, D. Autohydrolysis of agricultural by-products for the production of xylo-oligosaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 69, n. 1, p. 20–28, 2007.

NAKAKUKI, T. Present Status and Future Prospects of Functional Oligosaccharide Development in Japan. **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 7, p. 1245–1251, 2002.

NAKASU, P. Y. S. **CINETICA DA HIDRÓLISE ÁCIDA DO LICOR OBTIDO APÓS PRÉ-TRATAMENTO HIDROTÉRMICO**. [s.l.] UNICAMP, 2015.

NAKASU, P. Y. S. et al. Kinetic Study of the Acid Post-hydrolysis of Xylooligosaccharides from Hydrothermal Pretreatment. **Bioenergy Research**, v. 10, n. 4, p. 1045–1056, 2017.

NASCIMENTO, C. E. DE O. et al. Application of a recombinant GH10 endoxylanase from Thermoascus aurantiacus for xylooligosaccharide production from sugarcane bagasse and probiotic bacterial growth. **Journal of Biotechnology**, v. 347, n. October 2021, p. 1–8, 2022.

NEIVA, D. M. et al. Potential of Eucalyptus globulus industrial bark as a biorefinery feedstock: Chemical and fuel characterization. **Industrial Crops and Products**, v. 123, n. March, p. 262–

270, 2018.

NEIVA, D. M. et al. Fractionation and valorization of industrial bark residues by autohydrolysis and enzymatic saccharification. **Bioresource Technology Reports**, v. 11, 1 set. 2020.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 6. ed. [s.l.] artmed, 2014.

NETO, F. S. P. P. et al. Model-based optimization of xylooligosaccharides production by hydrothermal pretreatment of Eucalyptus by-product. **Industrial Crops & Products**, v. 154, p. 112707, 2020.

NGUYEN, B. T. et al. Probiotic beverage from pineapple juice fermented with Lactobacillus and Bifidobacterium strains. **Frontiers in Nutrition**, v. 6, n. May, p. 1–7, 2019.

NIETO-DOMÍNGUEZ, M. et al. Prebiotic effect of xylooligosaccharides produced from birchwood xylan by a novel fungal GH11 xylanase. **Food Chemistry**, v. 232, p. 105–113, 2017.

NODAKE, Y. et al. Pilot study on novel skin care method by augmentation with Staphylococcus epidermidis, an autologous skin microbe - A blinded randomized clinical trial. **Journal of Dermatological Science**, v. 79, n. 2, p. 119–126, 2015.

OH, Y. R. et al. Whole-cell biocatalysis using genetically modified Pseudomonas taetrolens for efficient production of maltobionic acid from pure maltose and high-maltose corn syrup. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 45, n. 5, p. 901–909, 2022.

OLIVEIRA, F. M. V. et al. Industrial-scale steam explosion pretreatment of sugarcane straw for enzymatic hydrolysis of cellulose for production of second generation ethanol and value-added products. **Bioresource Technology**, v. 130, p. 168–173, 2013.

OTIENO, D. O.; AHRING, B. K. A thermochemical pretreatment process to produce xylooligosaccharides (XOS), arabinooligosaccharides (AOS) and mannooligosaccharides (MOS) from lignocellulosic biomasses. **Bioresource Technology**, v. 112, p. 285–292, 2012a.

OTIENO, D. O.; AHRING, B. K. The potential for oligosaccharide production from the hemicellulose fraction of biomasses through pretreatment processes: Xylooligosaccharides (XOS), arabinooligosaccharides (AOS), and mannooligosaccharides (MOS). **Carbohydrate Research**, v. 360, p. 84–92, 2012b.

OVEREND, R. P.; CHORNET, E.; GASCOIGNE, J. A. Fractionation of Lignocellulosics by Steam-Aqueous Pretreatments. **PHILOSOPHICAL TRANSACTIONS OF THE ROYAL SOCIETY**, v. 321, p. 523–536, 1987.

ÖZDENKÇI, K. et al. A novel biorefinery integration concept for lignocellulosic biomass. **Energy Conversion and Management**, v. 149, p. 974–987, 2017.

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: Inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 25–33, 2000.

PARAJÓ, J. C. et al. Production of xylooligosaccharides by autohydrolysis of lignocellulosic materials. **Trends in Food Science and Technology**, v. 15, n. 3–4, p. 115–120, 2004.

PARAJÓ, J. C.; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J. Biotechnological production of xylitol.

Part 3: Operation in culture media made from lignocellulose hydrolysates. **Bioresource Technology**, v. 66, n. 1, p. 25–40, 1998.

PARAJÓ, J. C.; DOMINGUEZ, H.; DOMINGUEZ, J. M. Improved xylitol production with Debaryomyces hansenii Y-7426 from raw or detoxified wood hydrolysates. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 21, n. 1, p. 18–24, 1997.

PATEL, S.; GOYAL, A. Functional oligosaccharides: Production, properties and applications. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 5, p. 1119–1128, 2011.

PENÍN, L. et al. Assesment on the chemical fractionation of Eucalyptus nitens wood: Characterization of the products derived from the structural components. **Bioresource Technology**, v. 281, n. January, p. 269–276, 2019.

PEREIRA, G. F. et al. Solid-state cultivation of recombinant Aspergillus nidulans to co-produce xylanase, arabinofuranosidase, and xylooligosaccharides from soybean fibre. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 15, n. May, p. 78–85, 2018.

PINALES-MÁRQUEZ, C. D. et al. Circular bioeconomy and integrated biorefinery in the production of xylooligosaccharides from lignocellulosic biomass: A review. **Industrial Crops and Products**, v. 162, n. January, 2021.

PODGÓRSKA, B.; KĘDZIA, D. From a Commensal To a Pathogen – Two Faces of Staphylococcus Epidermidis. **Postępy Mikrobiologii - Advancements of Microbiology**, v. 57, n. 4, p. 338–348, 2018.

PÖYRY. A INDÚSTRIA DE CELULOSE E PAPEL NO BRASIL. p. 16–28, 2016.

PREECHAKUN, T. et al. Detoxification of hemicellulose - enriched hydrolysate from sugarcane bagasse by activated carbon and macroporous adsorption resin. **Biomass Conversion and Biorefinery**, n. 0123456789, 2022.

QING, Q. et al. Xylooligosaccharides Production , Quantification , and Characterization in Context of Lignocellulosic Biomass Pretreatment, in: Aqueous Pretreatment of Plant Biomass for Biological Chemical Conversion to Fuels and Chemicals. In: WYMAN, C. E. (Ed.). **Aqueous Pretreatment of Plant Biomass for Biological Chemical Conversion to Fuels and Chemicals**. 1. ed. [s.l.] John Wiley & Sons, Ltd, 2013. p. 391–415.

RABELO, S. C. **Avaliação E Otimização de Pré-Tratamentos e Hidrólise Enzimática do Bagaço de Cana-de-Açúcar para a Produção de Etanol de Segunda Geração. (Tese de Doutorado)**. [s.l.] Universidade Estaudal de Campinas - UNICAMP, 2010.

RAGAUSKAS, A. J. et al. The Path Forward for Biofuels and Biomaterials. **Science**, v. 311, n. 5760, p. 484–489, 2006.

RAJAGOPALAN, G.; SHANMUGAVELU, K.; YANG, K. Production of prebiotic-xylooligosaccharides from alkali pretreated mahogany and mango wood sawdust by using purified xylanase of Clostridium strain BOH3. **Carbohydrate Polymers**, v. 167, p. 158–166, 2017.

RASHID, R.; SOHAIL, M. Xylanolytic Bacillus species for xylooligosaccharides production:

a critical review. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 8, n. 16, 2021.

RAVINDRAN, R.; JAISWAL, A. K. Microbial enzyme production using lignocellulosic food industry wastes as feedstock: A review. **Bioengineering**, v. 3, n. 4, 2016.

REDDY, N.; YANG, Y. Biofibers from agricultural byproducts for industrial applications. **Trends in biotechnology**, v. 23, n. 1, p. 22–7, 2005.

REDDY, S. S.; KRISHNAN, C. Production of high-pure xylooligosaccharides from sugarcane bagasse using crude β-xylosidase-free xylanase of Bacillus subtilis KCX006 and their bifidogenic function. **LWT - Food Science and Technology**, v. 65, p. 237–245, 2016.

ROBERTO PAZ CEDENO, F. et al. Recovery of cellulose and lignin from Eucalyptus by-product and assessment of cellulose enzymatic hydrolysis. **Renewable Energy**, v. 193, p. 807–820, 1 jun. 2022.

ROCHA-MARTÍN, J. et al. Additives enhancing enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 244, p. 48–56, 2017.

ROCHA, G. J. M. et al. Effect of Xylan and Lignin Removal by Hydrothermal Pretreatment on Enzymatic Conversion of Sugarcane Bagasse Cellulose for Second Generation Ethanol Production. **Sugar Tech**, v. 15, n. 4, p. 390–398, 2013.

RODRIGUES, A. G. Endo- B -1,4-xylanase: An Overview of Recent Developments. In: GUPTA, V. K. (Ed.). **Biofuel and Biorefinery Technologies 3**. 3. ed. Switzerland: Springer, 2016. p. 125–149.

RODRIGUES, C. et al. Materiais lignocelulósicos como matéria-prima para a obtenção de biomoléculas de valor comercial. In: **Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria**. 4. ed. São Paulo: Blucher, 2017. p. 283–314.

ROHMAN, A. et al. Structural basis of product inhibition by arabinose and xylose of the thermostable GH43 β-1,4-xylosidase from Geobacillus thermoleovorans IT-08. **PLoS ONE**, v. 13, n. 4, p. 1–15, 2018.

ROHMAN, A.; DIJKSTRA, B. W.; PUSPANINGSIH, N. N. T. β-xylosidases: Structural diversity, catalytic mechanism, and inhibition by monosaccharides. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 22, p. 7–11, 2019.

ROMANÍ, A. et al. Bioethanol production from hydrothermally pretreated Eucalyptus globulus wood. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 22, p. 8706–8712, 2010.

ROWELL, R. M. et al. **HANDBOOK OF WOOD CHEMISTRY AND WOOD COMPOSITES**. New York: Taylor & Francis, 2005.

RUBIN, E. M. Genomics of cellulosic biofuels. **Nature**, v. 454, n. 7206, p. 841–5, 2008.

SABIHA-HANIM, S.; NOOR, M. A. M.; ROSMA, A. Effect of autohydrolysis and enzymatic treatment on oil palm (Elaeis guineensis Jacq.) frond fibres for xylose and xylooligosaccharides production. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 2, p. 1234–1239, 2011.

SAEMAN, J. F. Kinetics of Wood Saccharification Hydrolysis of Cellulose and Decomposition

of Sugars in Dilute Acid at High Temperature. **Industrial & Engineering Chemistry**, v. 37, n. 1, p. 43–52, 1945.

SALES, M. R. et al. Variáveis que influenciam a produção de celulases e xilanase por espécies de Aspergillus. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 45, n. 11, p. 1290–1296, 2010.

SAMANTA, A. K. et al. Xylooligosaccharides as prebiotics from agricultural by-products: Production and applications. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 5, n. 1, p. 62–71, 2015.

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues : Biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 185–194, 2009.

SANNIGRAHI, P. et al. Pseudo-lignin and pretreatment chemistry. **Energy and Environmental Science**, v. 4, n. 4, p. 1306–1310, 2011.

SANTOS, S. A. O. et al. Secondary metabolites from Eucalyptus grandis wood cultivated in Portugal, Brazil and South Africa. **Industrial Crops and Products**, v. 95, p. 357–364, 2017.

SANTUCCI, B. S. et al. Autohydrolysis of Hemicelluloses from Sugarcane Bagasse During Hydrothermal Pretreatment: a Kinetic Assessment. **Bioenergy Research**, v. 8, n. 4, p. 1778–1787, 2015.

SEGATO, F. et al. Enzyme and Microbial Technology High-yield secretion of multiple client proteins in Aspergillus. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 51, p. 100–106, 2012.

SEVERN, M. M.; HORSWILL, A. R. Staphylococcus epidermidis and its dual lifestyle in skin health and infection. **Nature Reviews Microbiology**, v. 0123456789, 2022.

SHALLOM, D.; SHOHAM, Y. Microbial hemicellulases. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 219–228, 2003.

SHAO, X.; LYND, L. Kinetic modeling of xylan hydrolysis in co- and countercurrent liquid hot water flow-through pretreatments. **Bioresource Technology**, v. 130, p. 117–124, 2013.

SHEU, W. H.-H. et al. Effects of Xylooligosaccharides in Type 2 Diabetes Mellitus. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 54, p. 396–401, 2008.

SHIVA et al. Enzymatic Hydrolysis, Kinetic Modeling of Hemicellulose Fraction, and Energy Efficiency of Autohydrolysis Pretreatment Using Agave Bagasse. **Bioenergy Research**, v. 16, n. 1, p. 75–87, 2023.

SILVEIRA, M. H. . et al. The Essential Role of Plant Cell Wall Degrading Enzymes in the Success of Biorefineries: Current Status and Future Challenges. In: DA SILVA, S.; CHANDEL, A. (Eds.). **Biofuels in Brazil**. [s.l.] Springer, 2014. p. 151–172.

SINGH, J.; SUHAG, M.; DHAKA, A. Augmented digestion of lignocellulose by steam explosion, acid and alkaline pretreatment methods: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 117, p. 624–631, 2015.

SINGH, R. D.; BANERJEE, J.; ARORA, A. Prebiotic potential of oligosaccharides: A focus on xylan derived oligosaccharides. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 5, n. 1, p.

19–30, 2015.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENT6S, R. M. [14] Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. In: **Methods in Enzymology**. [s.l: s.n.]. v. 299p. 152–178.

SJÖSTRÖM, E.; ALÉN, R. (EDS). **Analytical methods in wood chemistry, pulping, and papermaking**. Berlin: Springer, 1999.

SLUITER, A. et al. **Determination of Total Solids in Biomass and Total Dissolved Solids in Liquid Process Samples.** National Renewable Energy Laboratory (NREL), , 2008a.

SLUITER, A. et al. **Determination of Ash in Biomass.** National Renewable Energy Laboratory (NREL), , 2008b.

SLUITER, A. et al. **Determination of Extractives in Biomass.** National Renewable Energy Laboratory (NREL), , 2008c.

SLUITER, A. et al. **Determination of Sugars , Byproducts , and Degradation Products in Liquid Fraction Process Samples**. National Renewable Energy Laboratory (NREL), , 2008d.

SLUITER, A. et al. **Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass**. National Renewable Energy Laboratory (NREL), , 2012.

SMITH, P. K. et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, v. 150, n. 1, p. 76–85, 1985.

SOCCOL, C. R. et al. Recent developments and innovations in solid state fermentation. **Biotechnology Research and Innovation**, v. 1, n. 1, p. 52–71, 2017.

STEINBACH, D.; KRUSE, A.; SAUER, J. Pretreatment technologies of lignocellulosic biomass in water in view of furfural and 5-hydroxymethylfurfural production- A review. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 7, n. 2, p. 247–274, 2017.

SU, Y. et al. Efficient production of xylooligosaccharides rich in xylobiose and xylotriose from poplar by hydrothermal pretreatment coupled with post-enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 342, 2021.

SUN, D. et al. Effects of hydrothermal pretreatment on the dissolution and structural evolution of hemicelluloses and lignin: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 281, n. August 2021, p. 119050, 2022.

SUN, S. et al. The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 49–58, 2016.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, v. 83, p. 1–11, 2002.

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production : A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, p. 1621–1651, 2008.

TANEJA, K.; GUPTA, S.; CHANDER KUHAD, R. Properties and application of a partially purified alkaline xylanase from an alkalophilic fungus Aspergillus nidulans KK-99. **Bioresource Technology**, v. 85, n. 1, p. 39–42, 2002.

TAPIA V, E. et al. Optimization of lipid production by the oleaginous yeast Lipomyces starkeyi by random mutagenesis coupled to cerulenin screening. **AMB Express**, v. 2, n. 1, p. 1–8, 2012.

TESTOVA, L. et al. Autohydrolysis of birch wood. **Holzforschung**, v. 65, n. 4, p. 535–542, 2011.

THE MARKET REPORTS. **Global Xylo-oligosaccharide (XOS) Market by Manufacturers, Regions, Type and Application, Forecast to 2023**. Disponível em: <https://www.themarketreports.com/report/global-xylo-oligosaccharide-xos-market-by-manufacturers-regions-type-and-application-forecast-to-2023>. Acesso em: 20 maio. 2019.

TRAMONTINA, R. et al. Applying biorefinery concepts for sugarcane straw upcycling using alkaline and enzymatic treatments to produce value-added compounds and bioenergy. **Biomass and Bioenergy**, v. 178, n. July, p. 106972, 2023.

UÇKUN KIRAN, E.; AKPINAR, O.; BAKIR, U. Improvement of enzymatic xylooligosaccharides production by the co-utilization of xylans from different origins. **Food and Bioproducts Processing**, v. 91, n. 4, p. 565–574, 2013.

VAN DER POL, E. et al. Analysis of by-product formation and sugar monomerization in sugarcane bagasse pretreated at pilot plant scale: Differences between autohydrolysis, alkaline and acid pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 181, p. 114–123, 2015.

VAN DYK, J. S.; PLETSCHKE, B. I. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes-Factors affecting enzymes, conversion and synergy. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 6, p. 1458–1480, 2012.

VÁZQUEZ, M. J. et al. Xylooligosaccharides: Manufacture and applications. **Trends in Food Science and Technology**, v. 11, p. 387–393, 2000.

VÁZQUEZ, M. J. et al. Refining of autohydrolysis liquors for manufacturing xylooligosaccharides: Evaluation of operational strategies. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 8, p. 889–896, 2005.

VERGARA, P. et al. Effect of additives on the enzymatic hydrolysis of pre-treated wheat straw. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 38, n. 2, p. 241–249, 2021.

VITAL, M. H. F. Impacto Ambiental de Florestas de Eucalipto. **Revista do BNDES**, v. 14, n. 28, p. 235–276, 2007.

WALIA, A. et al. Microbial xylanases and their industrial application in pulp and paper biobleaching: a review. **3 Biotech**, v. 7, n. 1, p. 1–12, 2017.

WAN AZELEE, N. I. et al. High xylooligosaccharides (XOS) production from pretreated kenaf stem by enzyme mixture hydrolysis. **Industrial Crops and Products**, v. 81, p. 11–19, 2016.

WAN, C.; LI, Y. Effect of hot water extraction and liquid hot water pretreatment on the fungal degradation of biomass feedstocks. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 20, p. 9788–9793,

2011.

WU, H. et al. Heterologous Expression of a New Acetyl Xylan Esterase from Aspergillus niger BE-2 and its Synergistic Action with Xylan-Degrading Enzymes in the Hydrolysis of Bamboo Biomass. **BioResources**, v. 12, n. 1, p. 434–447, 2017.

XIA, W. et al. Industrial vitamin B12 production by Pseudomonas denitrificans using maltose syrup and corn steep liquor as the cost-effective fermentation substrates. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 38, n. 6, p. 1065–1073, 2015.

XIAO, X. et al. Enhanced enzymatic hydrolysis of bamboo (Dendrocalamus giganteus Munro) culm by hydrothermal pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 159, p. 41–47, 2014.

XU, J. et al. The integration of different pretreatments and ionic liquid processing of eucalyptus: Hemicellulosic products and regenerated cellulose fibers. **Industrial Crops and Products**, v. 101, p. 11–20, 2017.

YANG, B.; WYMAN, C. E. Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 2, p. 26–40, 2008.

YU, Q. et al. Xylo-oligosaccharides and ethanol production from liquid hot water hydrolysate of sugarcane bagasse. **BioResources**, v. 10, n. 1, p. 30–40, 2015a.

YU, Q. et al. Xylo-oligosaccharides and Ethanol Production from Liquid Hot Water Hydrolysate of Sugarcane Bagasse. **BioResources**, v. 10, n. 1, p. 30–40, 2015b.

ZENG, M. et al. Microscopic examination of changes of plant cell structure in corn stover due to hot water pretreatment and enzymatic hydrolysis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 97, n. 2, p. 265–278, 2007.

ZHANG, F. et al. Green approach to produce xylo-oligosaccharides and glucose by mechanical-hydrothermal pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 344, 2022.

ZHANG, H.; XU, Y.; YU, S. Co-production of functional xylooligosaccharides and fermentable sugars from corncob with effective acetic acid prehydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 234, p. 343–349, 2017.

ZHANG, Y. et al. Effect of overliming and activated carbon detoxification on inhibitors removal and butanol fermentation of poplar prehydrolysates. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, n. 1, p. 1–14, 2018.

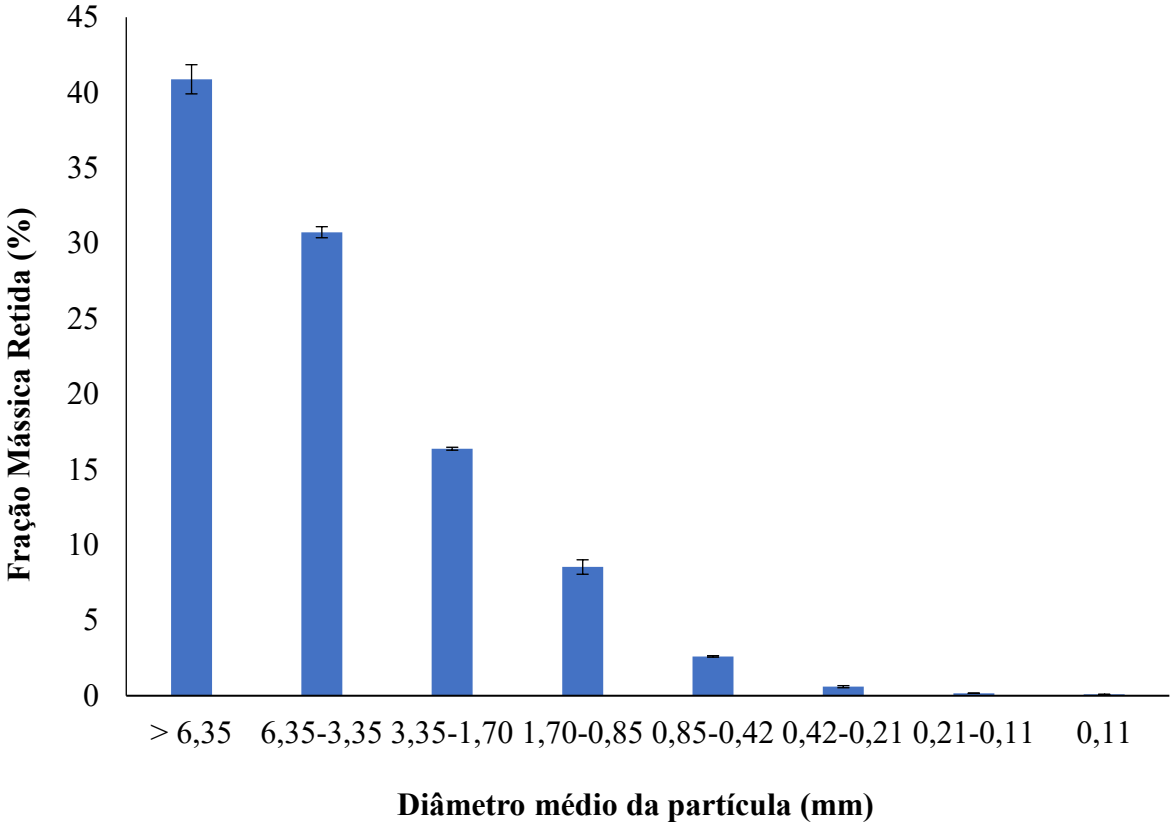
ZHAO, C. et al. Functional properties, structural studies and chemo-enzymatic synthesis of oligosaccharides. **Trends in Food Science and Technology**, v. 66, p. 135–145, 2017.

ZHAO, X.; ZHANG, L.; LIU, D. Biomass recalcitrance. Part II: Fundamentals of different pre-treatments to increase the enzymatic digestibility of lignocellulose. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 6, p. 561–579, 2012.

ZHENG, Y.; PAN, Z.; ZHANG, R. Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production. **International Journal of Agricultural and Biological Engineering**, v. 2, n. 3, p. 51–68, 2009.

ZHU, J. et al. Fractionation of poplar using hydrothermal and acid hydrotropic pretreatments for co-producing xylooligosaccharides, fermentable sugars, and lignin nanoparticles. **Industrial Crops & Products**, v. 181, 2022.

ZHUANG, X. et al. Kinetic study of hydrolysis of xylan and agricultural wastes with hot liquid water. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 5, p. 578–582, 2009.

ZHUANG, X. et al. Liquid hot water pretreatment of lignocellulosic biomass for bioethanol production accompanying with high valuable products. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 68–75, 2016.

ANEXO: Distribuição do tamanho das partículas dos galhos triturados.