



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia Química

**MARIANA GOMES MOREIRA**

**RECUPERAÇÃO DE XILOOLIGOSSACARÍDEOS DO  
LICOR DE RESÍDUOS DE EUCALIPTO PARA  
AVALIAÇÃO DO SEU EFEITO ESTIMULANTE NO  
CRESCIMENTO DE *Staphylococcus xylosus***

CAMPINAS

2022

MARIANA GOMES MOREIRA

**RECUPERAÇÃO DE XILOOLIGOSSACARÍDEOS DO LICOR DE  
RESÍDUOS DE EUCALIPTO PARA AVALIAÇÃO DO SEU EFEITO  
ESTIMULANTE NO CRESCIMENTO DE *Staphylococcus xylosus***

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Engenharia Química da Universidade  
Estadual de Campinas como parte dos  
requisitos exigidos para a obtenção do título  
de MESTRA EM ENGENHARIA  
QUÍMICA

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> TELMA TEIXEIRA FRANCO

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À  
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DE  
MESTRADO DEFENDIDA PELA  
ALUNA MARIANA GOMES MOREIRA  
E ORIENTADA PELA PROFA. DRA.  
TELMA TEIXEIRA FRANCO.

Campinas  
2022

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

M813r Moreira, Mariana Gomes, 1996-  
Recuperação de xilooligossacarídeos do licor de resíduos de eucalipto para avaliação do seu efeito estimulante no crescimento de *Staphylococcus xylosus* / Mariana Gomes Moreira. – Campinas, SP : [s.n.], 2022.

Orientador: Telma Teixeira Franco.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Xilooligossacarídeos. 2. Eucalipto. 3. Prebióticos. 4. Carvão ativado. 5. Hidrólise enzimática. I. Franco, Telma Teixeira, 1957-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Informações Complementares

**Título em outro idioma:** Xylooligosaccharides recovery from eucalyptus waste liquor to evaluate its stimulating effect on *Staphylococcus xylosus* growth

**Palavras-chave em inglês:**

Xylooligosaccharides

Eucalyptus

Prebiotic

Activated carbon

Enzymatic hydrolysis

**Área de concentração:** Engenharia Química

**Titulação:** Mestra em Engenharia Química

**Banca examinadora:**

Telma Teixeira Franco [Orientador]

Rosana Goldbeck Coelho

Gustavo Paim Valença

**Data de defesa:** 16-12-2022

**Programa de Pós-Graduação:** Engenharia Química

**Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)**

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-1481-3171>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/1541570393380670>

Folha de Aprovação da Defesa de Dissertação de Mestrado defendida por **MARIANA GOMES MOREIRA** e aprovada em 16 de dezembro de 2022 pela Comissão Examinadora constituída pelos doutores:

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

Profa. Dra. Rosana Goldbeck Coelho  
FEA / UNICAMP

Prof. Dr. Gustavo Paim Valença  
FEQ / UNICAMP

A 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 este trabalho a todos aqueles que participaram efetivamente da minha jornada e torceram pelo meu sucesso. Em especial, à minha mãe, Geni Gomes, por sempre sonhar comigo e não medir esforços para que meus sonhos se realizassem.

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de começar agradecendo a Deus, por me auxiliar a superar todos os obstáculos durante meu percurso, pela proteção, condições, oportunidades e forças para concluir esta etapa da minha vida.

Á minha mãe, Geni, pelo amor, carinho e dedicação. Obrigada por sempre acreditar, apoiar e me incentivar em minhas escolhas, pois sem você, nada disso teria sido possível.

Ao Gabriel, pelo amor, companheirismo, apoio emocional e todo suporte.

Á minha Família por todo incentivo durante o caminho.

Ás minhas amigas de Barão Letícia, Mariana, Bruna, Cíntia, Beatriz, Gabriella, Mariana, Catharina e Andressa. Sem dúvidas, essa jornada ficou muito mais fácil com vocês. Á minha amiga Luana, por compartilhar a vida comigo mesmo longe. E também as minhas amigas Larissa, Carla, Aniely, Carolina e Juliana que me acompanham sempre.

Á minha orientadora, Profa. Dra. Telma Teixeira Franco, pela orientação e auxílio no desenvolvimento deste trabalho.

Ás minhas colegas de laboratório, Lívia, e principalmente, Jenniffer, por todo suporte, disposição, paciência, ensinamentos e conversas que compartilhamos ao longo desses meses no laboratório. Muito obrigada.

Ao Prof. Dr. Marcos Soares Forte, por ter cedido gentilmente o carvão ativado utilizado neste trabalho e ao técnico Fernando Frederico pelo auxílio e disposição com as análises do HPLC.

Por fim, a todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização dessa dissertação, muito obrigada.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) - Processo 15/50612-8 pelo financiamento do projeto de pesquisa, tornando possível a produção desta tese.

*“Temos que continuar aprendendo. Temos que estar abertos. E temos que estar prontos para espalhar nosso conhecimento a fim de chegar a uma compreensão mais elevada da realidade. ”*

*Thich Nhat Hanh*

## RESUMO

Milhões de toneladas de resíduos sólidos de eucalipto são gerados no Brasil atualmente. Esta matéria-prima lignocelulósica apresenta cerca de 18% de fração hemicelulósica, sendo composta majoritariamente por polissacarídeos de xilanas, os quais apresentam grande potencial econômico proporcionado por sua bioconversão em açúcares fermentáveis e oligossacarídeos com valor agregado na indústria, como os xilooligossacarídeos (XOS). Além do produto de interesse, subprodutos inibidores são formados durante o processo de pré-tratamento para descomplexar a estrutura da biomassa, fazendo-se necessária a adição de etapas para remoção efetiva desses compostos para não prejudicar a utilização do licor hemicelulósico rico em XOS. Neste estudo, a destoxificação do licor por adsorção de carvão ativado comercial em pó removeu mais de 90% dos compostos fenólicos, ácido fórmico, furfural, 5-hidroximetilfurfural e lignina solúvel, e cerca de 55% de ácido acético. Em seguida, a maximização XOS<sub>2-3</sub> de 0,57 g/L para 1,21 g/L foi alcançada por hidrólise enzimática empregando-se 110 U/g<sub>XOS</sub> de enzima xilanase comercial e 6,3% de licor destoxificado. A atividade prebiótica dos XOS<sub>2-3</sub> foi avaliada pelo crescimento da bactéria *Staphylococcus xylosus* ao longo de 6 horas de ensaio em meios de cultura enriquecidos com os oligossacarídeos. Esta é uma bactéria presente na microflora da pele e pode favorecer a proteção da barreira cutânea. Os ensaios mostraram que quando os XOS<sub>2-3</sub> estavam mais disponíveis no meio basal escasso de fontes de carbono, a bactéria cresceu e consumiu mais X2 (63,0%) e X3 (46,0%) em relação aos meios basais com altas composições de carbono, indicando boa estimulação para o crescimento da bactéria.

**Palavras-chave:** xilooligossacarídeos, eucalipto, prebióticos, carvão ativado, hidrólise enzimática.

## ABSTRACT

Millions of tons of solid eucalyptus wastes are currently generated in Brazil. This lignocellulosic raw material presents about 18% of hemicellulosic fraction, being composed mostly of xylan polysaccharides, which have great economic potential provided by its bioconversion into fermentable sugars and oligosaccharides with added value in the industry, such as xylooligosaccharides (XOS). In addition to the product of interest, inhibitory by-products are formed during the pretreatment process to decomplex the biomass structure, making it necessary to add steps for effective removal of these compounds to not impair the use of hemicellulosic liquor rich in XOS. In this study, the liquor detoxification by adsorption with commercial powdered activated carbon removed more than 90% of the phenolic compounds, formic acid, furfural, 5-hydroxymethylfurfural, and soluble lignin, and about 55% of acetic acid. Then, the XOS<sub>2-3</sub> maximization from 0.57 g/L to 1.21 g/L was achieved by enzymatic hydrolysis using 110 U/g of XOS of xylanase enzyme and 6.3% of detoxified liquor. The XOS<sub>2-3</sub> prebiotic activity was evaluated by *Staphylococcus xylosus* bacteria growth over 6 hours of assay in culture media enriched with the oligosaccharides. This is a bacterium present in the skin microflora and can contribute to the protection of the skin barrier. The assays showed when XOS<sub>2-3</sub> was more available in the basal medium scarce carbon sources, the bacteria grew and consumed more X2 (63.0%) and X3 (46.8%) compared to the medium with high carbon compositions from the basal medium, indicating good stimulation for the bacteria growth.

**Keywords:** xylooligosaccharides, eucalyptus, prebiotics, activated charcoal, enzymatic hydrolysis.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Principais vantagens do cultivo de Eucalipto .....	20
<b>Figura 2.</b> Estrutura da biomassa lignocelulósicas vegetal e seus componentes .....	22
<b>Figura 3.</b> Estrutura da cadeia de celulose .....	23
<b>Figura 4.</b> Estrutura da lignina e seus álcoois formadores .....	23
<b>Figura 5.</b> Monômeros constituintes da hemicelulose .....	24
<b>Figura 6.</b> Representação da aplicação do pré-tratamento em materiais lignocelulósico	26
<b>Figura 7.</b> Geração das frações lignocelulósicas e subprodutos formados, como 5-HMF, furfural, ácido fórmico, ácido acético e compostos fenólicos, a partir de pré-tratamento de biomassas lignocelulósicas .....	28
<b>Figura 8.</b> Representação da estrutura do carvão ativado e exemplos de grupos funcionais presentes em sua superfície .....	31
<b>Figura 9.</b> Perfis de isotermas de adsorção .....	33
<b>Figura 10.</b> Representação da produção de XOS a partir dos pré-tratamentos químico e enzimático aplicados na biomassa lignocelulósica.....	36
<b>Figura 11.</b> Principais aplicações da enzima xilanase nos setores industriais .....	37
<b>Figura 12.</b> Atuação da enzima endo-1,4- $\beta$ -xilanase nas cadeias de xilanas hemicelulósicas.....	38
<b>Figura 13.</b> Estrutura molecular da xilose e xilooligossacarídeos com diferentes GP ...	39
<b>Figura 14.</b> Principais aplicações dos XOS na indústria cosmética.....	41
<b>Figura 15.</b> Representação da alteração da microbiota cutânea.....	43
<b>Figura 16.</b> Resumo da metodologia desenvolvida neste trabalho para destoxificação, hidrólise enzimática e crescimento da <i>S. xylosus</i> .....	46

<b>Figura 17.</b> Carvões ativados utilizados na adsorção do licor bruto .....	48
<b>Figura 18.</b> Metodologia para filtração prévia do LB <sub>RE</sub> antes da adsorção com carvão ativado .....	48
<b>Figura 19.</b> Metodologia para determinação da concentração de compostos fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu.....	50
<b>Figura 20.</b> Metodologia para os ensaios de crescimento da bactéria <i>S. xylosus</i> .....	54
<b>Figura 21.</b> Remoção de compostos inibidores no LB <sub>RE</sub> a partir dos carvões: C <sub>G-ST</sub> (sem tratamento), carvão C <sub>G-CA</sub> (carbonizado) e carvão C <sub>G-QT</sub> (quimicamente tratado) após 2 horas de adsorção.....	58
<b>Figura 22.</b> Isoterma de adsorção para o ácido acético com carvão C <sub>G-CA</sub> .....	59
<b>Figura 23.</b> Amostra de licor bruto, à esquerda, licor destoxificado com C <sub>P6</sub> , à direita .	64
<b>Figura 24.</b> Limites inibitórios e concentrações de ácido acético, 5-HMF, furfural e compostos fenólicos presentes no LB <sub>RE</sub> , LD com C <sub>P6</sub> .....	65
<b>Figura 25.</b> Concentrações de XOS <sub>2-3</sub> resultantes dos ensaios de hidrólise enzimática.	67
<b>Figura 26.</b> Concentração celular da bactéria <i>S. xylosus</i> para os meios C, CX, D e DX durante 6 horas de ensaios de crescimento. ....	70
<b>Figura 27.</b> Perfil de consumo de xilobiose (X2) e xilotriose (X3) pela bactéria <i>S. xylosus</i> durante 6 horas de ensaio para A) Meio CX e B) Meio DX .....	71
<b>Figura 28.</b> Reação de desaminação do ácido glutâmico.....	74

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Massa e porcentagem de carvão ativado para experimentos de isoterma de adsorção do ácido acético.....	49
<b>Tabela 2.</b> Condições ótimas de cultivo e composição do meio caldo nutriente (C) para a bactéria <i>S. xylosus</i> (FAT, 2020).....	53
<b>Tabela 3.</b> Composição química dos meios de cultura para ensaios de crescimento da bactéria <i>S. xylosus</i> .....	55
<b>Tabela 4.</b> Composição química do licor bruto (LB <sub>RE</sub> ) obtido por pré-tratamento hidrotérmico dos galhos de eucalipto. ....	56
<b>Tabela 5.</b> Concentrações dos compostos inibidores do LB <sub>RE</sub> , LFD obtido após duas filtrações seguida da adsorção com o carvão C <sub>G-CA</sub> e LD obtido após adsorção direta com o carvão C <sub>G-CA</sub> ao final de duas horas.....	60
<b>Tabela 6.</b> Concentrações dos compostos inibidores nos licores destoxificados (LD) por adsorção com os carvões ativados C <sub>G-CA</sub> e C <sub>P6</sub> .....	62
<b>Tabela 7.</b> Concentrações dos açúcares, xilose e XOS <sub>T</sub> , nos licores destoxificados (LD) por adsorção com os carvões ativados C <sub>G-CA</sub> e C <sub>P6</sub> . ....	63
<b>Tabela 8.</b> Relação enzima/substrato e concentrações de XOS <sub>2-3</sub> e XOS <sub>4-5</sub> nos hidrolisados após hidrólise enzimática durante 24 e 48 horas. ....	66
<b>Tabela 9.</b> Valores de XOS <sub>2-3</sub> para os ensaios de validação da hidrólise enzimática com 6,3% de LD e 110 U/g <sub>XOS</sub> de enzima xilanase. ....	68
<b>Tabela 10.</b> Concentrações totais e concentrações de carbono (C <sub>carbono</sub> ) de cada componente para cada meio de cultura, sendo os meios ricos em nutrientes com XOS <sub>2-3</sub> (meio CX) e sem XOS <sub>2-3</sub> (meio C) e os deficientes em nutrientes com XOS <sub>2-3</sub> (meio DX) e sem (meio D) XOS <sub>2-3</sub> .....	69
<b>Tabela 11.</b> Valores de pH ao longo dos ensaios de crescimento da bactéria <i>S. xylosus</i> para os meios contendo XOS. ....	73

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABIHPEC: Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos

C: Meio caldo nutriente

C<sub>Carbono</sub>: Concentração de carbono

C<sub>G</sub>: Carvão ativado granulado

C<sub>G-CA</sub>: Carvão ativado granulado carbonizado

C<sub>G-QT</sub>: Carvão ativado granulado quimicamente tratado

C<sub>G-ST</sub>: Carvão ativado granulado sem tratamento prévio

C<sub>Pó</sub>: Carvão ativado em pó

CX: Meio caldo nutriente com XOS

D: Meio nutriente diluído

DX: Meio nutriente diluído com XOS

GH: Glicosil hidrolase

GOS: Galactooligossacarídeos

GP: Grau de polimerização

H: Hidrolisado

HPLC: Cromatografia líquida de alta eficiência

IUPAC: *International Union of Pure and Applied Chemistry*

LB<sub>RE</sub>: Licor bruto de resíduos de eucalipto

LD: Licor destoxificado

LF: Licor filtrado

LFD: Licor filtrado destoxificado

NREL: *National Renewable Energy Laboratory*

PIB: Produto Interno Bruto

SCN: Staphylococci coagulase-negativa

X2: Xilobiose

X3: Xilotriose

X4: Xilotetraose

X5: Xilopentaose

XOS: Xilooligossacarídeos

XOS<sub>T</sub>: Xilooligossacarídeos totais

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. OBJETIVOS.....	18
2.1. Objetivo geral.....	18
2.2. Objetivos específicos .....	18
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
3.1. Resíduos de Eucalipto.....	19
3.2. Composição da biomassa lignocelulósica.....	21
3.3. Pré-tratamento de biomassas vegetais.....	26
3.4. Compostos inibidores.....	27
3.5. Remoção de compostos inibidores do licor hemicelulósico .....	29
3.5.1. Isotermas de adsorção.....	32
3.6. Hidrólise enzimática.....	34
3.7. Xilooligossacarídeos e suas aplicações prebióticas .....	39
3.8. Microrganismos presentes na pele .....	42
3.8.1. Staphylococcus xylosus .....	44
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	46
4.1. Materiais.....	46
4.2. Adsorção com carvões ativados .....	47
4.2.1. Tratamento do Carvão ativado granulado .....	47
4.2.2. Filtração do Licor Bruto de resíduos de eucalipto .....	48
4.2.3. Experimentos de adsorção.....	49
4.3. Metodologia analítica.....	50
4.3.1. Determinação da concentração de compostos fenólicos.....	50
4.3.2. Determinação de lignina solúvel.....	50

4.3.3.	Determinação de furfural e 5-hidroximetilfurfural.....	51
4.3.4.	Determinação de ácido acético e ácido fórmico .....	51
4.3.5.	Determinação de açúcares monoméricos.....	51
4.3.6.	Determinação de XOS .....	52
4.4.	Ensaio de atividade enzimática.....	52
4.5.	Hidrólise enzimática.....	53
4.6.	Microrganismos e condições de cultivo .....	53
4.6.1.	Crescimento da bactéria <i>Staphylococcus xylosus</i> .....	54
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
5.1.	Composição do licor bruto de resíduo de eucalipto .....	56
5.2.	Destoxificação do licor bruto .....	57
5.2.1.	Efeitos dos tratamentos dos carvões ativados na adsorção .....	57
5.2.2.	Efeito da filtração do LB <sub>RE</sub> na adsorção .....	60
5.2.3.	Comparação entre C <sub>P6</sub> e C <sub>G-CA</sub> .....	62
5.3.	Hidrólise enzimática.....	65
5.4.	Efeito dos XOS <sub>2-3</sub> na bactéria <i>S. xylosus</i> .....	68
6.	CONCLUSÃO.....	76
7.	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	77
8.	REFERÊNCIAS .....	78

## 1. INTRODUÇÃO

Em razão dos avanços tecnológicos, aumento populacional e efeitos das alterações climáticas, a demanda pela substituição de recursos fósseis por métodos alternativos sustentáveis e renováveis vêm pressionando a busca por mais estudos sobre o potencial de biomassas vegetais para a conversão em biocombustíveis, bioenergia e bioprodutos (BRENELLI et al., 2020; MOSIER et al., 2005). Nesse contexto, as plantações florestais de eucalipto são destaque no país, pois além de terem um desenvolvimento acelerado, também possuem alta capacidade de adaptação em diversos ambientes. O uso diversificado de suas árvores proporciona alto potencial econômico do eucalipto, pois além de viabilizar a produção de madeira para atender outros mercados com base sustentável, também diminui a pressão sobre as florestas nativas (OLIVEIRA; JÚNIOR, 2021).

Entretanto, milhões de toneladas de resíduos sólidos florestais são gerados todos os anos em campo e não possuem reaproveitamento industrial (IBÁ, 2021). A obtenção de bioprodutos a partir da biomassa lignocelulósica, como os resíduos de eucalipto, envolvem etapas de pré-tratamento para descomplexar a estrutura recalcitrante composta por celulose, hemicelulose e lignina. A fração hemicelulósica pré-tratada contém uma diversidade de macromoléculas e açúcares fermentáveis, monoméricos ou oligoméricos, que podem ser utilizados em diversas aplicações no mercado, entre elas, os xilooligossacarídeos (XOS) (CHANDRA et al., 2007; POLETTO et al., 2020).

Por outro lado, o principal problema relacionado à aplicação do pré-tratamento é a geração de compostos inibidores na fase líquida, como os compostos fenólicos, furfural, 5-hidroxi metilfurfural (5-HMF) e ácidos orgânicos. Esses subprodutos são gerados a partir da degradação dos componentes estruturais da biomassa e impactam negativamente alguns bioprocessos, como a inibição do crescimento celular e redução dos rendimentos de fermentações industriais (JIA et al., 2016; MISRA; RAGHUWANSHI; SAXENA, 2013). A literatura cita diversos processos para destoxificação, os quais são baseados em métodos de separação e purificação, com o intuito de reduzir os efeitos nocivos no licor. Entre eles, a adsorção com carvão ativado se destaca pelas excelentes propriedades adsorptivas como área superficial, porosidade, grupos funcionais, baixa reatividade, estabilidade térmica e baixo custo (NASCIMENTO et al., 2014).

A hidrólise enzimática após a destoxificação do licor hemicelulósico é uma alternativa interessante para aumentar a concentração dos oligômeros de XOS com menor grau de polimerização (GP), como a xilobiose (X2) e xilotriose (X3), já que inúmeras referências (BRENELLI et al., 2022; DE FREITAS; CARMONA; BRIENZO, 2019; JAIN; KUMAR; SATYANARAYANA, 2015) apontam, principalmente, atividade prebiótica em XOS com GP 2 e 3 (XOS<sub>2-3</sub>). A catálise enzimática pelas enzimas xilanases hidrolisa as cadeias de xilanas extraídas da fração hemicelulósica da biomassa vegetal, formando um licor hidrolisado rico em açúcares fermentáveis.

Os XOS, oligômeros formados por unidades de xilose, são promissores candidatos para diversos setores industriais, principalmente para as indústrias farmacêuticas e de cosméticos, devido sua aplicação prebiótica benéfica à saúde humana (AHMAD; ZAKARIA, 2019; OTIENO; AHRING, 2012; VÁZQUEZ et al., 2000). Como prebióticos, podem estimular o crescimento e atividades de bactérias a favor do hospedeiro, por fornecer substratos seletivos, e assim, atuar na defesa da saúde dérmica e gástrica (GIBSON, 2017).

A aplicação de XOS oriundos de resíduos de eucalipto como prebióticos demanda que novos processos sejam elaborados para a sua conversão em ingredientes qualificados pela indústria, e assim, garantir seu reaproveitamento efetivo, ainda mais por serem considerados abundantes, acessíveis e renováveis. Neste estudo, a remoção dos compostos inibidores por adsorção em batelada com carvão ativado e a ação da hidrólise enzimática sobre os XOS de cadeias maiores presentes no licor bruto de resíduos de eucalipto (LB<sub>RE</sub>) foram avaliadas visando a máxima recuperação de XOS<sub>2-3</sub> para serem testados quanto à atividade estimulante de crescimento de uma bactéria presente na pele humana.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo remover compostos inibidores de crescimento microbiano por adsorção com carvão ativado e converter os XOS de maiores GP em XOS<sub>2-3</sub> por hidrólise enzimática, ambos presentes no LB<sub>RE</sub>, para avaliar a atividade estimulante dos oligossacarídeos no crescimento da bactéria *Staphylococcus xylosus*.

### 2.2. Objetivos específicos

- Adsorver furfural, 5-HMF, compostos fenólicos, lignina solúvel e ácidos orgânicos presentes no LB<sub>RE</sub> em duas granulometrias de carvões ativados;
- Avaliar a influência dos tratamentos prévios físicos e químicos do carvão ativado granulado;
- Avaliar o efeito da filtração prévia de componentes do LB<sub>RE</sub> antes da adsorção;
- Avaliar a melhor relação enzima/substrato para converter XOS de maiores GP em XOS<sub>2-3</sub> por hidrólise enzimática;
- Avaliar o crescimento celular da bactéria *S. xylosus* e o consumo de xilobiose e xilotriose do hidrolisado em quatro diferentes meios de cultura.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Resíduos de Eucalipto

O Brasil se destaca internacionalmente não só por suas vastas florestas nativas e tropicais, mas também por possuir grandes plantios de florestas homogêneas com espécies específicas capazes de assistir as necessidades do mercado mundial. Em 2020, o país atingiu 9,55 milhões de hectares de árvores plantadas, sendo as espécies de eucalipto responsáveis por 78% deste total (IBÁ, 2021). Os investimentos no setor florestal representaram cerca de 1,3% do PIB e 6,9% do PIB industrial do país em 2018, mostrando-se evidente a sua importância socioeconômica para o país, uma vez que também acaba contribuindo para a geração de empregos, redução do êxodo rural e estimulação de economias locais (IBÁ, 2019).

Além do cenário brasileiro se apresentar como privilegiado para o plantio, por possuir condições climáticas, topografia e recursos hídricos favoráveis, o investimento no setor de base florestal também inclui pesquisas voltadas para o melhoramento genético e aprimoramento de processos tecnológicos. Estes elevam a posição do país ao topo de *rankings* mundiais, uma vez que classificam as plantações de eucaliptos nacionais como uma das mais sustentáveis, inovadoras e produtivas do mundo. A produtividade média dessa espécie atingiu o valor de 36,8 m<sup>3</sup>/ha.ano em 2020, sendo destinadas principalmente para atividades econômicas no ramo da construção, 27%, fabricação de móveis, 25% e para compor produtos de madeira, 15% (IBÁ 2021).

No Brasil, o cultivo de eucalipto abrange predominantemente os estados de Minas Gerais, Mato Grosso do Sul e São Paulo, responsáveis por 60,8% do total, sendo as espécies mais cultivadas *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus saligna*, *Eucalyptus urophylla* e *Eucalyptos viminalis* (OLIVEIRA; JÚNIOR, 2021; IBÁ, 2021). As vantagens de se cultivar o eucalipto estão representadas na Figura 1 a seguir (OLIVEIRA; JÚNIOR, 2021).

**Figura 1.** Principais vantagens do cultivo de Eucalipto



Fonte: Autor, 2022.

Entretanto, enquanto 216,6 milhões de m<sup>3</sup> de eucalipto são produzidos e empregados em diversos setores no segmento industrial, milhões de toneladas de resíduos sólidos são gerados ao longo dos anos (IBÁ 2021). Segundo Crittenden e Kolaczowski (1995), resíduo, no setor madeireiro, é tudo que não é considerado matéria prima segundo as especificações, sendo constituídos, principalmente, por cascas, gravetos e folhas, com altas quantidades de matéria orgânica (apud BARBOSA; CONCEIÇÃO, 2016). Quando o eucalipto é colhido, os resíduos são majoritariamente deixados em campo para reciclar os nutrientes e proteger a superfície do solo (FOELKEL, 2008).

As espécies comerciais de eucalipto de reflorestamento são constituídas aproximadamente por 18% de galhos, os quais são formados majoritariamente por componentes estruturais como a celulose, hemicelulose e a lignina, assim como a maioria das biomassas vegetais lignocelulósicas, como o bagaço de cana de açúcar, espiga de milho, cascas de arroz e entre outros (FOELKEL, 2010).

A ampla disponibilidade deste resíduo, a grande quantidade de substâncias importantes que fazem parte de sua composição e as novas perspectivas de mercado com base em sustentabilidade sugerem o reaproveitamento dos resíduos lignocelulósicos de

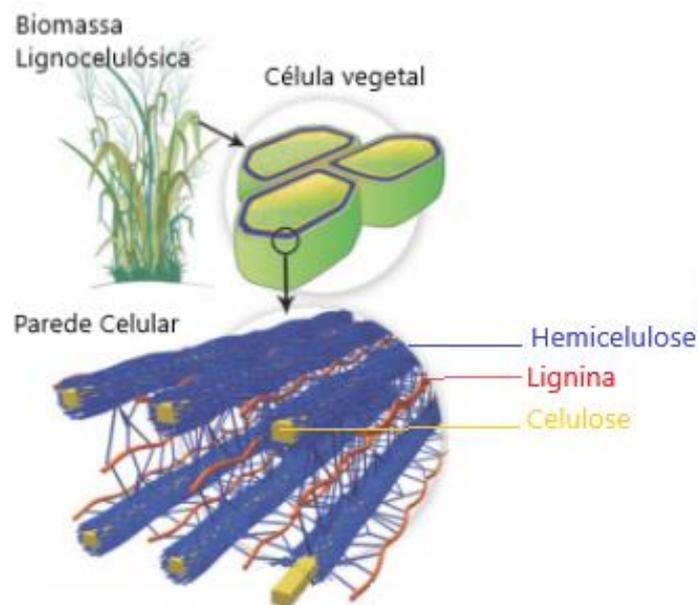
eucalipto como matéria-prima de baixo custo para fabricação de produtos alternativos e com valor agregado na indústria, saindo do âmbito que são designados, ganhando novas possibilidades de mercado e reduzindo pressões por novos recursos.

### **3.2. Composição da biomassa lignocelulósica**

O conceito de biomassa, segundo Omachi et al. (2004), compreende todo material orgânico e não fóssil que tenha conteúdo de energia química no seu interior. São caracterizados por serem materiais de baixo custo e com baixo impacto ambiental, já que não emitem gases do efeito estufa, sendo o recurso biológico renovável mais abundante da terra (SANTOS et al., 2012; VO, 2021). Desta forma, as biomassas vêm sendo amplamente estudadas para serem empregadas como alternativas para a produção de biocombustíveis, bioenergia e para extração de moléculas com valor agregado no mercado.

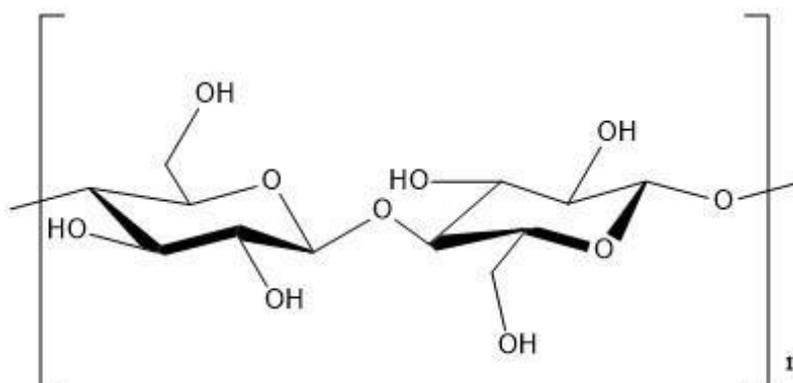
Entre os inúmeros exemplos de biomassa, como resíduos de origem animal e vegetal, a biomassa lignocelulósica oriunda de resíduos agroindustriais é composta, geralmente, por 40-50% de celulose, seguido de 20-35% de hemicelulose, 10-25% de lignina e uma pequena quantidade de cinzas e extrativos, dependendo da espécie vegetal (ANWAR; GULFRAZ; IRSHAD, 2014; SANTOS et al., 2012). Estes componentes são intimamente e fortemente conectados entre si, formando um complexo celular na parede da célula vegetal, conforme representado na Figura 2. Essas características morfológicas são responsáveis pela rigidez, impermeabilidade e conferência de resistência mecânica e microbiológica aos tecidos vegetais deste tipo de material.

**Figura 2.** Estrutura da biomassa lignocelulósicas vegetal e seus componentes



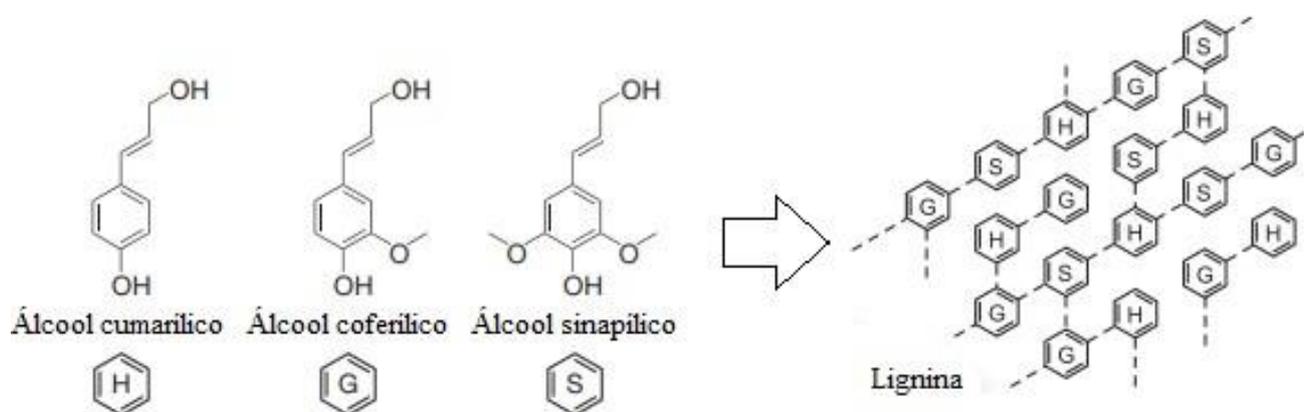
Fonte: Adaptado de Santos et al. (2012 apud KONDO, 1997).

A celulose, descoberta em 1837 pelo químico francês Anselme Payen (HON, 1994), é o biopolímero renovável mais encontrado na natureza, sendo comumente utilizada para a produção de papel, fibras e bioenergia nas indústrias químicas atualmente. É composta por monômeros de glicose organizados linearmente e conectados por ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas, possuindo fórmula molecular  $(C_6H_{10}O_5)_n$ , em que n representa o GP da molécula, podendo conter até dez mil unidades de glicose, conforme Figura 3 (BARRETO; ZANCAN; MENEZES, 2015). Sua estrutura forma as ligações de hidrogênio, as quais conferem propriedades de rigidez, integridade linear e organização cristalina ordenada (CHEN, 2014).

**Figura 3.** Estrutura da cadeia de celulose

Fonte: Autor, 2022.

A lignina, classificada como uma macromolécula heterogênea com estrutura amorfa, é composta por três diferentes principais blocos construtores: álcool cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico, derivado dos monômeros hidroxifenil (H), guaiacil (G) e siringil (S), respectivamente, como representado na Figura 4 (DUVAL; LAWOKO, 2014). Especialmente, a lignina envolve a celulose formando uma estrutura complexa e resistente, em que se faz necessária a utilização de métodos e tratamentos químicos para que haja o rompimento desta natureza para a conversão em produtos de interesses, fazendo surgir oportunidades de aproveitamento destes resíduos e recursos (OTIENO; AHRING, 2012).

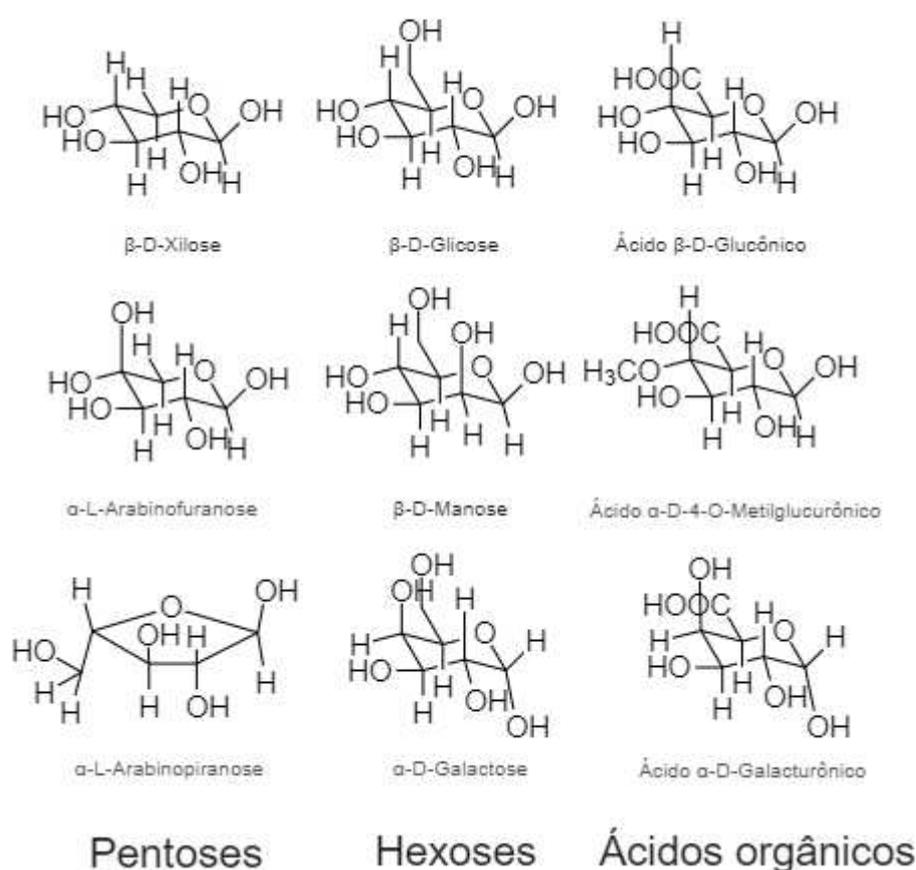
**Figura 4.** Estrutura da lignina e seus álcoois formadores

Fonte: Adaptado Duval; Lawoko (2014).

A hemicelulose consiste em uma classe de polímeros heterogêneos formados por hexoses, pentoses e ácidos orgânicos conectados por ligações  $\beta$ -1,4 (OTIENO; AHRING, 2012). Sua nomenclatura depende primordialmente da composição da cadeia linear,

composta por um monossacarídeo majoritário, como xilose nas xilanas, manose nas mananas e etc. (Figura 5), e das ramificações, as quais se associam com a celulose, conferindo uma maior estabilidade e flexibilidade a biomassa correspondente (SANTOS et al., 2012). Por possuir menor cristalinidade, são mais suscetíveis à despolimerização do que a celulose, e, conseqüentemente, à hidrólise sob condições térmicas e químicas, oferecendo maior acessibilidade a seus derivados (ANWAR; GULFRAZ; IRSHAD, 2014).

**Figura 5.** Monômeros constituintes da hemicelulose



Fonte: adaptado Ahmad; Zakaria (2019).

De modo geral, as xilanas são os componentes mais abundantes na fração hemicelulósica, sendo formadas por uma estrutura 1,4- $\beta$ -D-xilose com cadeias ramificadas de ácido 4-oximetilglicorônico (CHEN, 2014). De toda a hemicelulose presente em uma biomassa vegetal, cerca de 65 a 85% são formadas por xilanas, seguido da arabinose (9-11%) (OTIENO; AHRING, 2012). A partir deste componente, é possível sintetizar classes importantes de oligossacarídeos, como xilose, xilitol e XOS (ÁVILA et

al., 2020a).

Outros componentes também são encontrados em menores concentrações na biomassa vegetal lignocelulósica, os extrativos e cinzas. Os extrativos correspondem aos compostos orgânicos, os quais são responsáveis por um quinto da composição das madeiras vegetais e suas principais funções na biomassa lignocelulósica é proporcionar defesa contra microrganismos e insetos e servir como reserva de energia. São formados por proteínas, amidos, resinas, gorduras, fenólicos, pectinas, gomas e óleos essenciais, podendo ser extraídos através de métodos por extração por solventes (MOHAN, PITTMAN, STEELE, 2006). Já os conteúdos de cinzas correspondem aos resíduos inorgânicos que surgem após a queima da biomassa, e são formados por diversos elementos minerais na forma de óxido, como cobre, cálcio, magnésico, sódio, silício e entre outros. Esta composição das cinzas depende do tipo da biomassa e de seu ambiente de crescimento, uma vez que esses elementos são absorvidos do solo, responsáveis por diversas atuações durante o crescimento do vegetal (CHEN, 2014).

Apesar de todas as biomassas lignocelulósicas vegetais apresentarem esses constituintes, a sua composição química é diferenciada para cada tipo de material e fortemente dependente de sua origem, espécies e etapas de crescimento. Como exemplo, Xu et al. (2018) determinaram que a madeira de *Eucalyptus grandis* possui em sua composição 40,1% de celulose, 18,2% de hemicelulose, 29% de lignina totais e 12,7% de cinzas e extrativos, enquanto Silva Morais, Sansígolo e Neto (2016) encontraram valores de 40,8% para celulose, 39,9% para hemicelulose, 21,9% para lignina e o restante para cinzas e extrativos. Em comparação com outras biomassas do mesmo gênero, tem-se que a serragem de madeira de *Eucalyptus urograndis*, possui um pouco mais de celulose e hemicelulose, 42,8% e 43,4%, respectivamente, seguindo de 23,2% de lignina e apenas 1,81% de extrativos, de acordo com Morais, Sanígolo e Neto (2016).

O conhecimento da distribuição química das biomassas vegetais pode ser considerado um fator importante para a conversão destes materiais em biocombustíveis e bioprodutos, como ácidos orgânicos, açúcares fermentáveis, biopolímeros e entre outros, pois permitem prever métodos necessários para o rompimento e descomplexação da estrutura lignocelulósica. Desta forma, a utilização desse tipo de material é reconhecida como uma alternativa sustentável para o reaproveitamento desses compostos, minimização de desperdícios e criações de novas matérias-primas, por serem capazes de

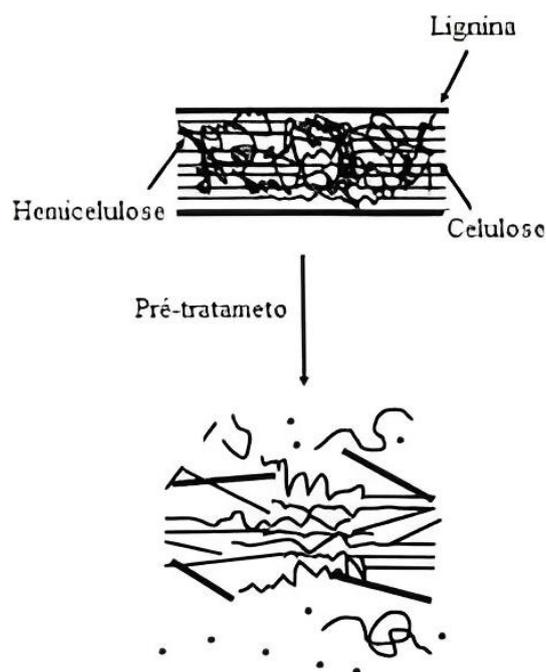
gerar produtos com em diversos segmentos industriais.

### 3.3. Pré-tratamento de biomassas vegetais

O aproveitamento dos resíduos lignocelulósicos para a produção de materiais com valor agregado no mercado é atraente devido ao menor custo em relação aos recursos fósseis, sua abundância e por serem renováveis. Em razão das fortes ligações, cristalinidade, GP e a complexidade entre os elementos que compõe a biomassa lignocelulósica, é imprescindível a utilização de metodologias que atuem sobre a separação de sua estrutura, para que a obtenção dos produtos de interesse seja realizada com facilidade e eficiência (ANWAR; GULFRAZ; IRSHAD, 2014).

O pré-tratamento é responsável por alterar a estrutura da biomassa lignocelulósica, através da diminuição da cristalinidade da celulose, separação da hemicelulose da celulose e rompimento e remoção da estrutura da lignina, como representado na Figura 6. Além disso, é capaz de reduzir os tamanhos das partículas e aumentar o tamanho dos poros dos substratos para facilitar o processos posteriores, reduzindo a recalcitrância da mesma (CHANDRA et al., 2007; MOSIER et al., 2005).

**Figura 6.** Representação da aplicação do pré-tratamento em materiais lignocelulósico



Fonte: Adaptado de Mosier et al. (2005).

Atualmente, há uma vasta gama de tecnologias que podem ser utilizadas em uma

alta variedade de matérias primas oriundas de biomassas. Os pré-tratamentos podem ser classificados em processos químicos, como a hidrólise ácida e alcalina, físicos, os quais utilizam martelos ou bolas de moagem, biológicos, em que enzimas ou microrganismos são aplicados no processo, físico-químicos, como o hidrotérmico ou ácido diluído, e também por combinações entre essas abordagens (CHANDRA et al., 2007; POLETTTO et al., 2020).

Entre todas as técnicas apresentadas, o pré-tratamento hidrotérmico, também denominado como água quente ou auto-hidrólise, é amplamente indicado para biomassas vegetais por apresentar condições mais brandas de operação e ser menos agressivo ao meio ambiente (HUANG et al., 2017). A técnica também se qualifica por melhorar a acessibilidade do material, tornando-o mais apto para ataques enzimáticos ou tratamentos posteriores (SANTOS et al., 2012). Estudos feitos por Cebreiros et al., (2020) apresentaram máxima recuperação de açúcares a partir da serragem de espécies de eucalipto em auto-hidrólise realizada a 180°C durante 45 minutos e carga de sólidos de 8%. Foram produzidos 7,5g/100g<sub>serragem</sub> de açúcares derivados da xilana, sendo 75% na forma oligomérica. Além disso, foi observado a formação de produtos inibitórios como o ácido acético (2,3g/100g<sub>serragem</sub>) e o furfural (1,3g/100g<sub>serragem</sub>), que poderiam vir a comprometer a utilização do licor em etapas futuras.

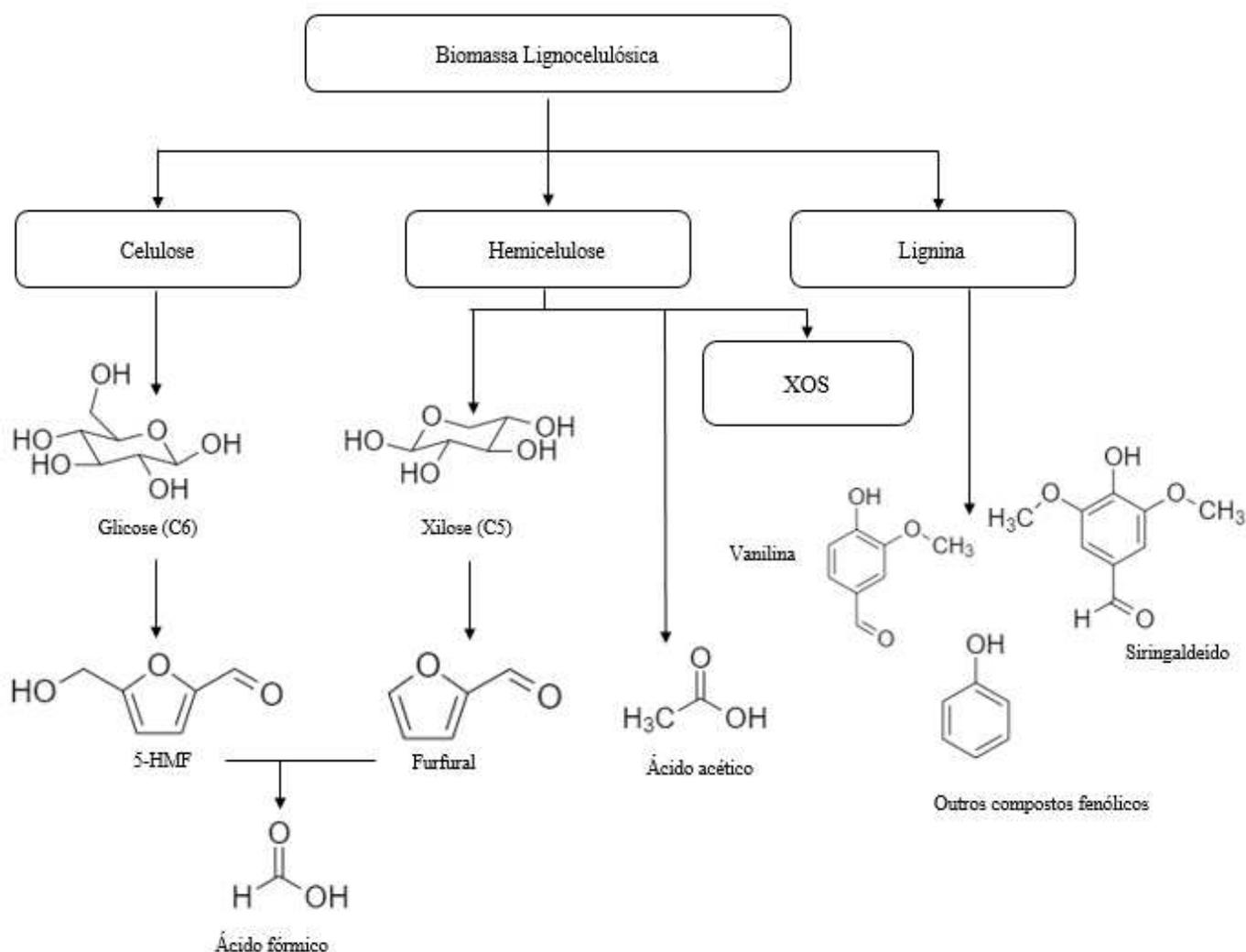
A principal desvantagem dos pré-tratamentos é atribuída a formação de subprodutos inibidores, sendo necessária a adição de etapas de purificação e separação, aumentando, conseqüentemente, o custo de produção. Visto que essas moléculas são constantemente produzidas ao decorrer do pré-tratamento, investigar metodologias de baixo custo para remoção destes compostos é uma alternativa atrativa para a conversão da biomassa no produto de interesse.

### **3.4. Compostos inibidores**

A aplicação do pré-tratamento para descomplexar a estrutura das biomassas lignocelulósicas leva à formação de compostos inibidores que prejudicam o uso do licor em etapas sucessoras. A severidade do processo determina a concentração formada dos compostos indesejáveis, já que condições extremas de altas temperaturas e pressões favorecem a formação desses produtos de degradação (ANTUNES et al., 2019; ARRUDA, 2008).

Destacam-se as formações de furfural, 5-HMF e ácido fórmico, gerados a partir da desidratação da hemicelulose (pentoses) e celulose (hexoses), os compostos fenólicos, resultantes da decomposição da lignina, e ácido acético, formado através da hidrólise dos grupos acetil presente no fragmento hemicelulósico (JIA et al., 2016; MISRA; RAGHUWANSHI; SAXENA, 2013), como representado na Figura 7. Essas moléculas inibem o crescimento microbiano, reduzindo a atividade celular e os rendimentos de fermentações industriais. Sua ação inibitória depende das concentrações no meio, bem como seus efeitos sinérgicos (ARRUDA, 2008; COSTA-TRIGO et al., 2020).

**Figura 7.** Geração das frações lignocelulósicas e subprodutos formados, como 5-HMF, furfural, ácido fórmico, ácido acético e compostos fenólicos, a partir de pré-tratamento de biomassa lignocelulósicas



Fonte: adaptado Basak et al., (2020).

A concentração dos compostos inibidores influencia diretamente a atividade celular, já que comprometem o desempenho dos microrganismos e reduzem a eficiência

da fermentação. Enquanto os compostos fenólicos danificam a barreira seletiva da membrana e a levam a morte celular pelas perdas de potássio, ácido glutâmico, RNA e outros compostos, os ácidos orgânicos, como o ácido acético e o fórmico, podem produzir acidificação intracelular e gerar acúmulo de compostos reativos que afetam diretamente o crescimento celular. Além disso, o furfural e o 5-HMF podem agir inibindo enzimas das vias metabólicas centrais, como as fermentativas, comprometendo a integridade da membrana e causar seu rompimento (ABDUL MANAF et al., 2022; GARCÍA-RUIZ et al., 2008). Desta forma, explorar etapas adicionais de purificação ou de separação para eliminar ou reduzir os efeitos inibitórios no licor hemicelulósico é uma estratégia fundamental para que garantir que a aplicação dos bioprodutos oriundos das biomassas lignocelulósicas não seja prejudicada.

### **3.5. Remoção de compostos inibidores do licor hemicelulósico**

Para superar os efeitos inibitórios dos produtos nocivos presentes no licor hemicelulósico, técnicas de destoxificação podem ser aplicadas. Esses processos são baseados em métodos de separação e purificação, sendo sua efetividade dependente da composição do licor hemicelulósico, da matéria prima utilizada e dos limites inibitórios do microrganismos empregados (DO NASCIMENTO et al., 2020; PANIAGUA-GARCÍA et al., 2018).

Diferentes processos químicos e físicos vêm sendo empregados para favorecer a aplicabilidade do licor pela remoção desses compostos considerados tóxicos. A evaporação a vácuo, que ao mesmo tempo que é capaz de remover compostos voláteis, acaba aumentando consideravelmente a concentração dos compostos não voláteis (MUSSATTO; ROBERTO, 2004b). Já a filtração por membrana, é capaz de separar as partículas e moléculas de interesse através de uma barreira física seletiva (CAO; XU, 2019). Outras técnicas como precipitações e filtrações (PANIAGUA-GARCÍA et al., 2018), combinação de filtração com adsorção com carvão ativado (ANTUNES et al., 2019; MUSSATTO; ROBERTO, 2004a), purificação por resinas de troca iônica (VAN ZYL; PRIOR; DU PREEZ, 1991) e floculação por polímeros vegetais (ARRUDA, 2008) também são comumente encontradas na literatura.

A adsorção como estratégia para remoção de compostos indesejáveis se destaca por sua facilidade de operação, alta eficiência, possibilidade de aumento de escala e pela

flexibilidade de uso de diversos adsorventes, como carvão ativado, resinas orgânicas, aluminas, argilas e adsorventes siliciosos (ARRUDA, 2008). Trata-se de um fenômeno físico-químico, em que os componentes de uma fase fluída migram para a superfície do adsorvente sólido através do gradiente de concentração que se manifesta como força motriz (NASCIMENTO et al., 2014). Esta técnica é amplamente utilizada para remoção de odor e de coloração no tratamento e purificação de águas, óleos, produtos farmacêuticos e efluentes de processos.

Materiais que possuem superfícies porosas acessíveis e capazes de acomodar seletivamente solutos de uma fase líquida ou gasosa são chamados de adsorventes. Entre eles, o carvão ativado se destaca por apresentar propriedades adsorptivas singulares, estabilidade térmica, ser pouco reativo e de baixo custo. Pode ser de origem sintética, produzidos a partir de polímeros artificiais, ou de origem natural, formados a partir lignite, resíduos de petróleo, materiais lignocelulósicos e resíduos agrícolas, gerando uma vasta gama de possibilidades de carvões ativados e custos (AHMEDNA; MARSHALL; RAO, 2000).

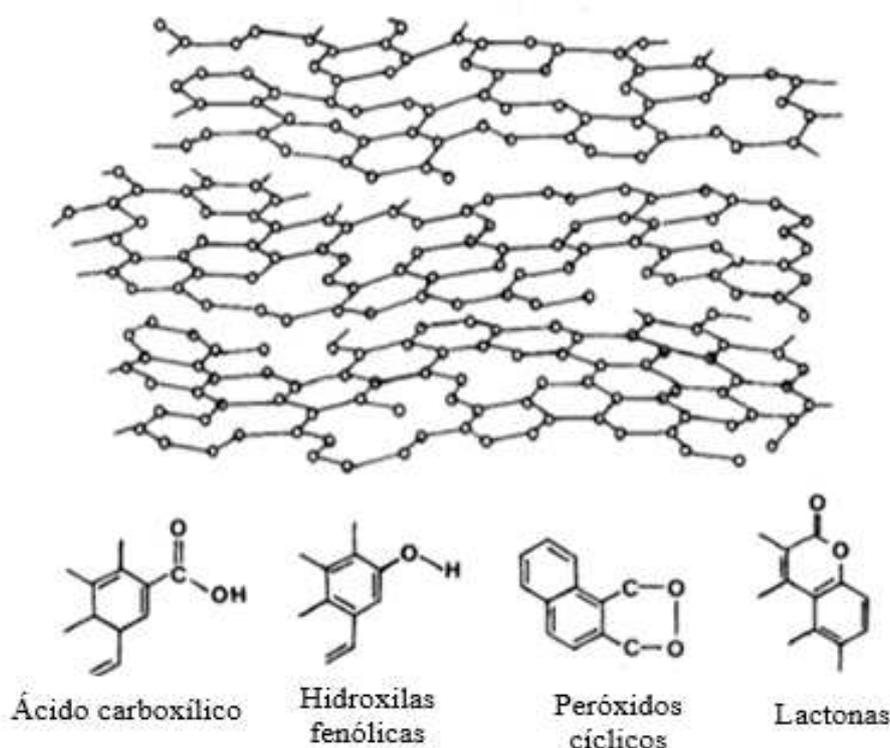
A composição elementar de um carvão ativado característico compreende mais de 85% de carbono (C), seguido de elementos como oxigênio (O), enxofre (S), nitrogênio (N), hidrogênio (H) e cinzas orgânicas (BANSAL; GOYAL, 2005). As características adsorptivas do material dependem principalmente da sua área superficial, porosidade e composição química de superfície, as quais são consequências dos materiais precursores e dos modos de processamento, os quais podem ser químicos ou físicos (NASCIMENTO et al., 2014).

A produção e preparação carvão ativado envolve dois processos principais: a carbonização e a ativação. Enquanto a primeira é responsável por eliminar gases leves e substâncias voláteis como metano, monóxido e dióxido de carbono e gás hidrogênio que são geradas durante a degradação da matéria, para auxiliar na formação da estrutura altamente porosa sob altas temperaturas, a ativação é capaz de desobstruir os poros internos, por métodos físicos e químicos. Na ativação física, um fluxo de vapor de água ou de gases oxidantes combinados com altas temperaturas, de 700 a 1000°C é utilizado. Já a ativação química utiliza agentes ativadores capazes de remover impurezas do material sendo os mais comumente utilizados, ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ ), ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ), hidróxido de potássio (KOH), hidróxido de sódio (NaOH) e cloreto de zinco

( $\text{ZnCl}_2$ ) (RAMOS et al., 2009). Cada agente apresenta diferentes efeitos no produto final, como por exemplo, o  $\text{ZnCl}_2$  leva à formação de elevada área superficial contendo mais estruturas de microporos, enquanto a utilização de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  gera uma distribuição de poros mais heterogênea (YAGMUR; OZMAK; AKTAS, 2008).

A estrutura do carvão ativado está representada na Figura 8. A presença de carbonos e outros átomos nas bordas de sua estrutura dão origem à compostos de superfície, como carbono-hidrogênio e carbono-oxigênio, permitindo que reações químicas gere como resultado a presença de grupos funcionais em sua superfície. Estes arranjos influenciam diretamente na polaridade, densidade, acidez e em outras propriedades do material. Embora as estruturas químicas exatas variem e não sejam sempre conhecidas com certeza, sugere-se que as estruturas mais frequentemente presentes em carvões ativados são ácido carboxílico, hidroxilas fenólicas, peróxidos cíclicos e entre outros (BANSAL; GOYAL, 2005; NITS, 2022).

**Figura 8.** Representação da estrutura do carvão ativado e exemplos de grupos funcionais presentes em sua superfície



Fonte: adaptado NITS (2022).

A adsorção com carvão ativado pode ser realizada em colunas de leito fixo ou através de processos em batelada (VÁZQUEZ et al., 2005). Enquanto o sistema em

batelada opera de maneira descontínua e em regime fechado, o sistema convencional de leito fixo apresenta comportamento dinâmico e é composto basicamente por uma bomba e uma coluna, sendo sua eficiência descrita a partir da concentração do efluente pelo tempo ou volume de líquido tratado (NASCIMENTO et al., 2014). Em ambos os casos, o processo de adsorção ocorre nos sítios ativos presentes na superfície do carvão ativado, em que o adsorvente e o soluto se ligam seletivamente através de mecanismos de fisissorção, em que há uma adsorção física sem alteração da natureza química dos envolvidos, através de forças de van der Waals, ou por quimissorção, causada por uma reação química entre as espécies envolvidas, podendo ocorrer a transformação do adsorvato (NASCIMENTO et al., 2014; WAR, 1995).

Métodos de destoxificação com carvão ativado podem ser encontrados na literatura com o intuito de reduzir a concentração de moléculas nocivas no licor oriundo das biomassas vegetais, sem alterar quantitativamente e qualitativamente a presença de compostos valiosos, como a adsorção em batelada ou a técnicas de filtração combinada à adsorção (ANTUNES et al., 2019; BASAK et al., 2020; COSTA-TRIGO et al., 2020; DO NASCIMENTO et al., 2020; PANIAGUA-GARCÍA et al., 2018). Segundo Alves et al. (1998), a elevação do pH do licor hemicelulósico por um reagente alcalino, como o óxido de cálcio ou hidróxido de sódio, seguida da sua redução com reagente ácido, como ácido fosfórico ou ácido clorídrico, precipita compostos na forma de óxidos, os quais podem ser removidos por filtrações simples, favorecendo a adsorção posterior.

Como a adsorção é resultado de forças físicas e químicas, e depende da natureza do adsorvente e do adsorvato, inúmeros fatores podem influenciar diretamente no processo de separação, como a área superficial, temperatura do sistema, pH do meio, propriedades do adsorvente e tamanho dos poros (NASCIMENTO et al., 2014). Desta forma, avaliações prévias à adsorção, como alteração de pH e filtrações de compostos sólidos da fase líquida, tratamentos adicionais aos carvões ativados adsorventes e a temperatura do sistema, podem ser testadas como forma de garantir que os compostos indesejáveis sejam eficientemente removidos.

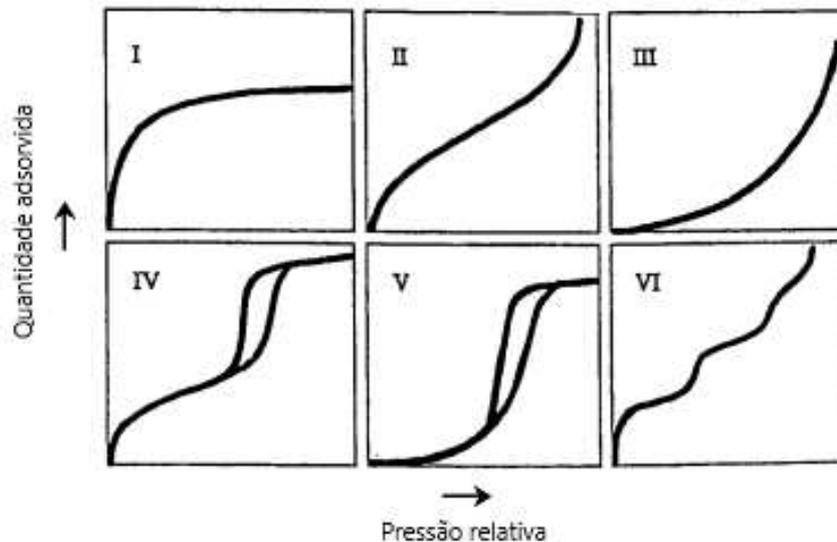
### **3.5.1. Isotermas de adsorção**

A adsorção de solutos em sólidos, em uma temperatura constante, pode ser descrita a partir de equações matemáticas definidas como isotermas de adsorção. Quando

a superfície do adsorvente entra em contato com o adsorvato líquido, considera-se que o equilíbrio de adsorção foi atingido quando não há mais variações da concentração do soluto na fase líquida. Este fenômeno pode ser avaliado através de testes experimentais, em que diferentes massas de adsorvente são adicionadas a uma determinada quantidade de soluto com concentração inicial conhecida, nos quais obtêm-se curvas que indicam como o soluto será adsorvido no material adsorvente (NASCIMENTO et al., 2014).

A Figura 9 apresenta a classificação IUPAC (*Internacional Union of Pure and Applied Chemistry*) para isotermas de adsorção. Esses gráficos relacionam a variação da concentração de equilíbrio do soluto em solução ( $C_e$ ) com a capacidade de adsorção na superfície do adsorvente ( $q_e$ ), expressa como massa de adsorvato por massa sólida de adsorvente, a uma dada temperatura constante. Além disso, fornecem uma estimativa da capacidade máxima do adsorvente e informações sobre favorecimento da adsorção, sendo dependentes do tipo de adsorvente, tipo do adsorvato e interações entre o soluto com a superfície.

**Figura 9.** Perfis de isotermas de adsorção



Fonte: adaptado de Donohue e Aranovich (1999).

Em resumo, enquanto as isotermas do tipo I são reconhecidas por sólidos microporosos que apresentam superfícies relativamente pequenas, isotermas dos tipos II e III descrevem a adsorção em superfícies macroporosas com fortes e fracas interações entre o adsorvente e o adsorvato, respectivamente. Já as isotermas dos tipos IV e V ocorrem em adsorções com histerese, e a tipo VI quando a adsorção acontece em etapas

(DONOHUE; ARANOVICH, 1999; THOMMES et al., 2015).

Modelos matemáticos foram propostos para descrever isotermas de adsorção, como Langmuir, Freundlich, Temkin, Dubinin-Radushkevich, Ridlich-Peterson e entre outros (NASCIMENTO et al., 2014), sendo os dois primeiros os mais utilizados para análises experimentais, pois permitem descrever o comportamento dos dados e prever a capacidade máxima de adsorção do material a partir de apenas dois parâmetros.

O modelo de Langmuir baseia-se na hipótese de distribuição uniforme da superfície do adsorvente, com monocamada das moléculas adsorvidas. Além disso, assume-se que não existe interação entre os adsorvatos, que há um número definido de sítios e que cada sítio pode comportar apenas uma molécula (LANGMUIR, 1916 apud NETHAJI; SIVASAMY; MANDAL, 2013). Já o modelo proposto por Freundlich compreende uma distribuição exponencial que justifica as considerações de adsorção em multicamadas e superfície sólida heterogênea com diferentes energias adsortivas para os sítios ativos. Desta forma, considerara-se que sítios energéticos possuem ligações mais forte com o soluto em relação aos sítios menos energéticos (FREUNDLICH 1906 apud NASCIMENTO et al., 2014).

As Equações 1 e 2 representam a isoterma de Langmuir e Freundlich, respectivamente. Seus parâmetros podem ser determinados a partir de dados experimentais juntamente com a linearização das equações.

$$q_e = \frac{q_{m\acute{a}x}K_L C_e}{1 + K_L C_e} \quad (1)$$

$$q_e = K_F C_e^{1/n} \quad (2)$$

Em que  $q_e$ : quantidade do soluto adsorvido por grama de adsorvente no equilíbrio (mg/g),  $q_{m\acute{a}x}$ : capacidade máxima de adsorção (mg/g),  $K_L$ : constante de interação adsorvato/adsorvente de Langmuir (L/mg),  $C_e$ : concentração do adsorvato no equilíbrio (mg/L),  $1/n$ : constante relacionada com a heterogeneidade da superfície e  $K_F$ : constante da capacidade de adsorção de Freundlich (mg/g).

### 3.6. Hidrólise enzimática

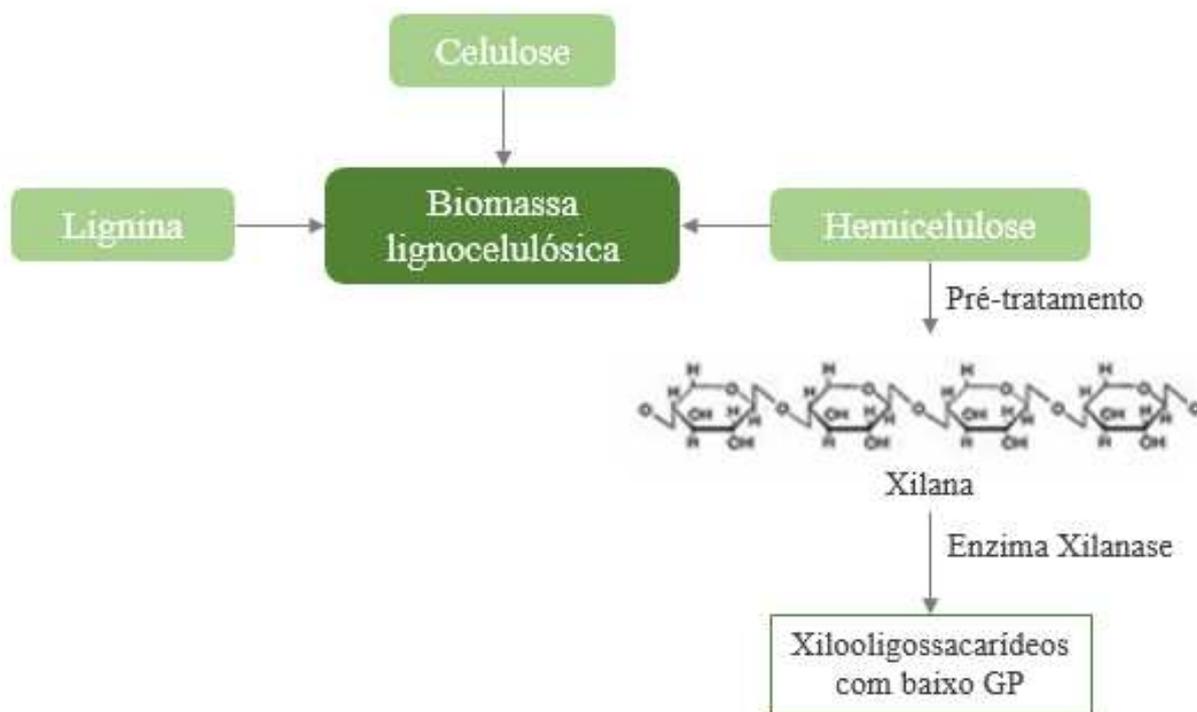
A hidrólise enzimática é uma reação química catalisada por enzimas, em que

moléculas maiores são quebradas dando origem a moléculas menores sob condições adequadas. Conduzida pelo fenômeno de transferência de massa, o substrato se conecta seletivamente aos sítios ativos das enzimas por difusão, formando complexos responsáveis pela catálise da reação (ZHANG; HAN; DONG, 2021). Pode ser utilizada para reduzir especificamente as cadeias dos polímeros lignocelulósicos ao invés de convertê-los quimicamente em outros produtos.

A hidrólise de polissacarídeos de xilana favorece a formação de produtos com menor GP, como os  $XOS_{2-3}$ , devido à alta especificidade da reação enzimática, evitando reações secundárias e subprodutos indesejáveis. As ligações químicas dos substratos a serem hidrolisadas, bem como as condições reacionais, como temperatura, concentração enzima/substrato e pH do meio, dependem da enzima, do tipo de substrato, seu comprimento da cadeia, grau de ramificação e da presença de substituintes (BRENELLI et al., 2020; CHANDRA et al., 2007; POLIZELI et al., 2005).

Aprimorar as condições reacionais é uma ação imprescindível, já que o escalonamento para processos industriais requer grandes volumes de enzimas e condições adequadas (ÁVILA et al., 2020a; TRAMONTINA et al., 2020; ZUBIETA et al., 2020). A otimização do método e a seleção de enzimas de alto desempenho em um processo eficiente são fundamentais para garantir a redução dos gastos gerados pela utilização e produção da enzima e para garantir um processo economicamente atraente para seu uso. A combinação entre um método de pré-tratamento químico seguida da hidrólise enzimática, pode beneficiar a formação dos  $XOS$  com menores GP, uma vez que o primeiro estágio aumentará a acessibilidade do material lignocelulósico ao ataque enzimático do segundo estágio. Esta estratégia viabiliza o uso comercial das matérias primas vegetais, devido a maior facilidade de conversão em produtos com valor agregado industrial (CHANDRA et al., 2007; O'DWYER et al., 2007; POLIZELI et al., 2005). A Figura 10 apresenta a produção de  $XOS$  a partir de métodos químico-enzimáticos.

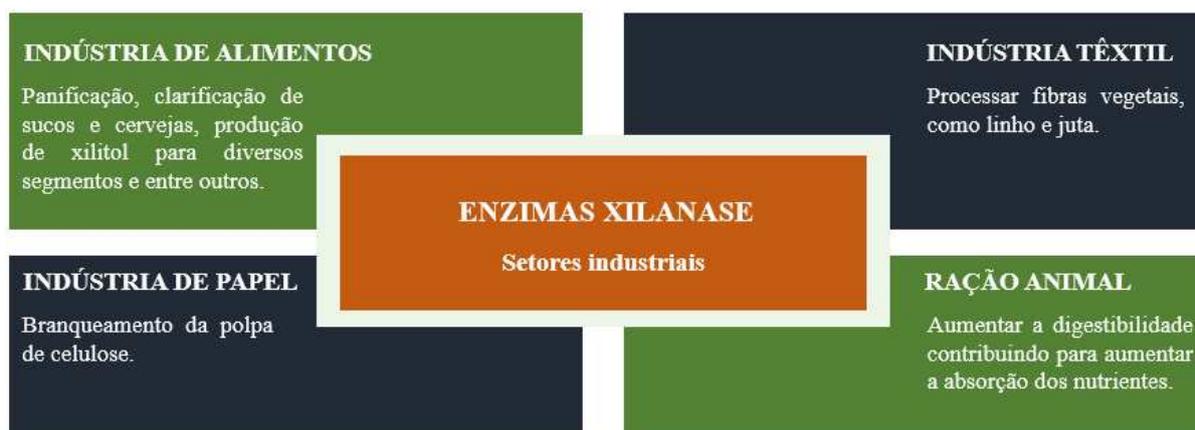
**Figura 10.** Representação da produção de XOS a partir dos pré-tratamentos químico e enzimático aplicados na biomassa lignocelulósica



Fonte: adaptado Poletto et al. (2020).

A classe de enzimas responsável por romper as ligações glicosídicas de cadeias de xilana são conhecidas como xilanases. Estas enzimas são agrupadas em famílias de glicosil hidrolase (GH) e dependem da sequência de aminoácidos que as formam. As xilanases têm sido amplamente utilizadas em vários âmbitos industriais, como apresentado na Figura 11 (CONESSA et al., 2021; KALIM et al., 2015; POLIZELI et al., 2005). Atualmente, existem cerca de 167 famílias GH, sendo as famílias GH10 e GH11 responsáveis pelas enzimas endoxilanase altamente ativas em XOS (COLLINS; GIBSON, 1999; CONESSA et al., 2021).

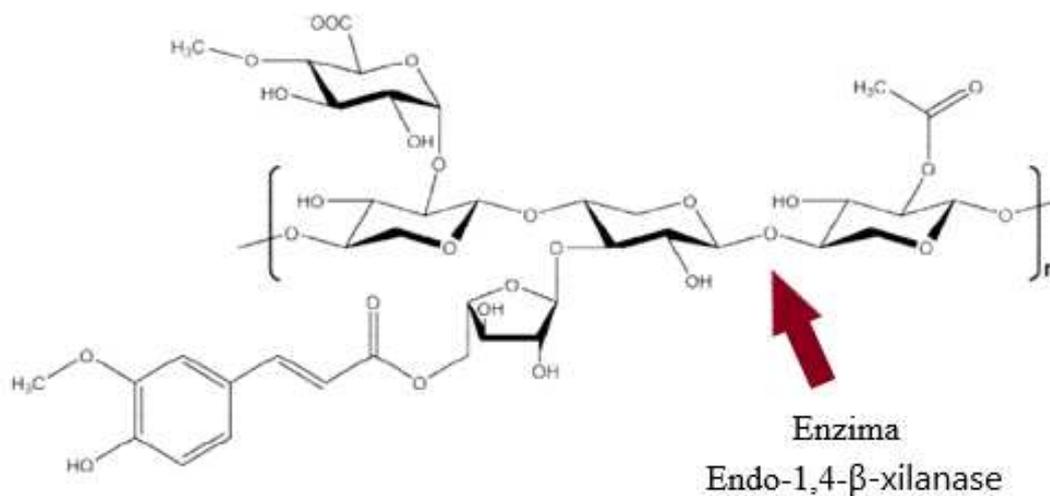
**Figura 11.** Principais aplicações da enzima xilanase nos setores industriais



Fonte: Autor, 2022.

As endoxilanases são os catalisadores preferidos para a hidrólise das xilanas devido à especificidade da reação, bem como às condições brandas que a acompanham e a perda insignificante de substrato. Endoxilanases pertencentes a família GH11 exibem maior afinidade pelo substrato, eficiência catalítica e adaptabilidade em amplas faixas de pH e temperatura em relação às enzimas GH10 (MALUNGA; BETA, 2015; PAËS; BERRIN; BEAUGRAND, 2012). Além disso, a enzima GH11 consegue atacar preferencialmente as cadeias mais longas de xilana, conseguindo reduzir consideravelmente o grau de polimerização das moléculas, sem produzir significativamente monômeros de xilose, em relação à enzima GH10, em que maiores quantidades de xilose podem ser formadas (SANTIBÁÑEZ et al., 2021). Especificamente, endo-1,4- $\beta$ -xilanases (GH11) são capazes de quebrar as ligações glicosídicas das cadeias de xilanas, reduzindo o GP do substrato, como representado na Figura 12, sendo que, no geral, esta enzima mostra atividade máxima em temperaturas entre 40 e 80°C e pH entre 4,0 e 6,5 (KULKARNI; SHENDYE; RAO, 1999; POLIZELI et al., 2005).

**Figura 12.** Atuação da enzima endo-1,4-β-xilanase nas cadeias de xilanas hemicelulósicas



Fonte: adaptado Kalim et al., (2015).

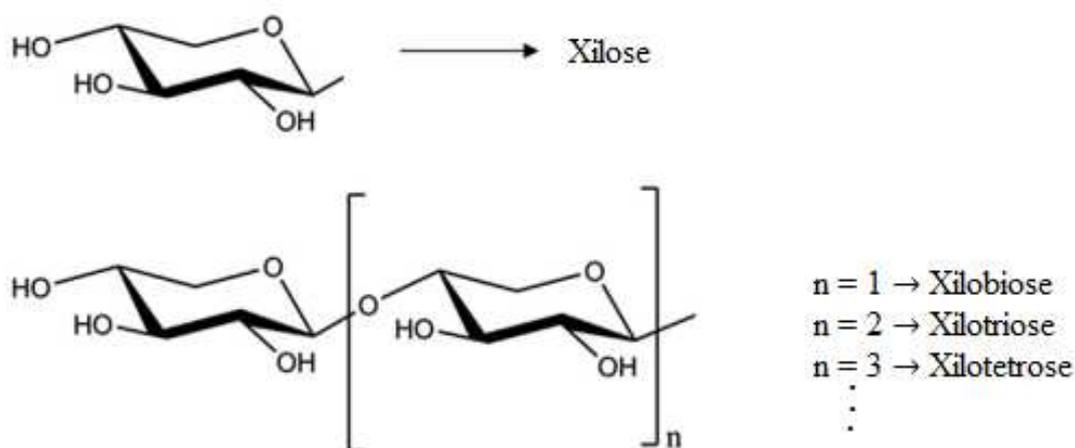
Uma vasta gama de organismos é capaz de produzir xilanases, entre eles, fungos dos gêneros *Trichoderma*, *Aspergillus* e *Fusarium*, bactérias como *Bacillus* e *Streptomyces*, alguns protozoários, algas marinhas, insetos, semente de plantas e entre outros. Fungos filamentosos vêm sendo amplamente estudados por serem capazes de secretar a enzima em níveis elevados para aplicações alimentícias e farmacêuticas de forma segura, com potencial de melhoramento de processos em variedades industriais (POLIZELI et al., 2005; SANTIBÁÑEZ et al., 2021). O custo da hidrólise enzimática pode limitar a viabilidade do processo, amplificando a necessidade pela melhoria e redução do custo da produção de xilanases por microrganismos qualificados.

O mecanismo das reações enzimáticas evidencia que, inicialmente, a enzima se conecta reversivelmente ao substrato, formando o complexo enzima-substrato (E-S). A inibição da enzima no sistema ocorre com excesso de substrato ou presença de moléculas inibidoras (que também se ligam à enzima) presentes no meio reacional. Enquanto altas concentrações de substrato irão prejudicar a difusão das moléculas durante a formação dos complexos, a falta de substrato faz com que a enzima não atinja sua atividade potencial formação do complexo E-S (SHULER; KARGI, 2002). Assim, aplicar relações ótimas de E-S e investigar previamente os fatores são ações fundamentais para minimizar materiais, redução de custos e bons rendimentos das moléculas de interesse.

### 3.7. Xilooligossacarídeos e suas aplicações prebióticas

Xilooligossacarídeos são definidos como oligômeros formados por 2 a 10 unidades de xilose conectados por ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas, obtidos a partir da hidrólise parcial das xilanas hemicelulósicas como representado na Figura 13 (AHMAD; ZAKARIA, 2019; ÁVILA; MARTINS; GOLDBECK, 2020).

**Figura 13.** Estrutura molecular da xilose e xilooligossacarídeos com diferentes GP



Fonte: Adaptado de Freitas; Carmona; Brienzo, (2019)

Por apresentarem características como a não digestibilidade em humanos, não cancerígeno, alta estabilidade em ampla faixa de pH e temperatura, solubilidade em água e ausência de coloração e odor (AMORIM et al., 2019; BARRETO; ZANCAN; MENEZES, 2015), os XOS são utilizados em diversos setores industriais como na agricultura, pecuária, alimentos, farmacêutico e cosméticos (AHMAD; ZAKARIA, 2019; POLETTO et al., 2020; VÁZQUEZ et al., 2000). Além disso, são facilmente encontrados em frutas, vegetais e brotos de bambu, além de resíduos agrícolas de materiais lenhosos, como sabugos de milhos, casca de arroz e amêndoas, grãos de cereais, galhos de eucalipto e entre outros (PETROVA; PETROV, 2017).

Em 1995, Gibbs e Roberfroid (apud GIBSON, 2017) introduziram o conceito de prebióticos como sendo “Ingrediente alimentar não digerível que afeta beneficemente o hospedeiro, estimulando seletivamente o crescimento e/ou atividade de um número limitado de bactérias no cólon humano, e assim, melhora a saúde do hospedeiro”. O termo prebiótico faz referência a carboidratos responsáveis por fornecer substratos fermentáveis

para bactérias benéficas presente no organismo do hospedeiro (BARRETO, ZANCAN, MENEZES, 2015; SINGH, BANERJEE, ARORA, 2015). Além disso, segundo Collins e Gibson (1999), para um composto químico ser considerado um prebiótico, ele deve se apresentar como um substrato seletivo para um número limitado de bactérias comensais presentes no organismo, estimulando o seu crescimento para torná-los metabolicamente ativos. Para isso, não devem ser absorvidos e nem hidrolisados no trato gastrointestinal, e devem auxiliar na alteração da microflora em direção a uma composição mais saudável.

O conceito de prebiótico foi originalmente formulado para aplicações voltadas às ações no intestino de um indivíduo, porém pode ser devidamente aplicado a composição de qualquer população microbiana, incluindo a microflora da pele. A utilização dos XOS como prebióticos em cosméticos vêm sendo amplamente explorada devido à linha tênue existente entre as indústrias farmacêuticas e cosméticas, as quais vêm procurando fornecer propósitos benéficos à saúde da pele pela incorporação de compostos naturais contendo substâncias bioativas, dando origem aos dermocosméticos (BARBOSA; CONCEIÇÃO, 2016).

Nesse setor, além de poderem atuar como antioxidantes, na presença de derivados fenólicos como ácido ferúlico, cumárico e entre outras ramificações, estabilizadores, como agentes de volume e ainda participar de formulações emolientes (AHMAD; ZAKARIA, 2019; SAMANTA et al., 2015), os XOS também podem atuar na defesa natural da pele, através da estimulação de antimicrobianos naturais na epiderme, ajudando a proteger e fortalecer a integridade da barreira cutânea e contribuindo também para a melhora na retenção de água (GIBSON, 2017). A Figura 14 a seguir descreve algumas aplicações dos XOS no setor cosmético.

**Figura 14.** Principais aplicações dos XOS na indústria cosmética



Fonte: Autor, 2022.

Segundo a Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos (ABIHPEC), o Brasil é o quarto maior mercado de beleza e cuidados pessoais do mundo. Apesar de companhias internacionais terem sido pioneiras na inclusão de prebióticos em produtos cosmecêuticos, atualmente, inúmeras indústrias brasileiras estudam e já utilizam os prebióticos em suas mercadorias para tratamento da pele (SEBRAE; ABIHPEC, 2018). O setor de dermocosméticos no Brasil expandiu 57,5% nos últimos anos, atingindo mais de R\$ 2,4 bilhões de reais em 2019. No mercado global, o valor atinge cerca de US\$ 14,4 bilhões durante o mesmo período.

A demanda incessante por produtos inovadores e com novas propriedades incentivou a utilização dos resíduos lignocelulósicos ricos em bioativos, já que podem impactar o desenvolvimento de novos produtos com valor agregado, por apresentar opções de tratamento à pele enquanto realiza sua função original voltada à vaidade. Além disso, a popularidade de cosméticos sustentáveis de origem vegetal promove a inserção dos oligossacarídeos neste setor com crescente potencial de desenvolvimento, o vegano.

A qualidade do prebiótico depende do GP do oligômero, sendo que os mais comumente utilizados são X2 e X3, pois se tratam de oligômeros com tamanho adequado para serem manipulados pelas bactérias benéficas (ÁVILA et al., 2020b; BRENELLI et al., 2020; OTIENO; AHRING, 2012). Entretanto, diversas referências (BRENELLI et al., 2022; DE FREITAS; CARMONA; BRIENZO, 2019; JAIN; KUMAR; SATYANARAYANA, 2015) descrevem atividade prebiótica em XOS com GP até 6.

As pesquisas possuem um papel essencial para garantir que as necessidades do mercado prebiótico sejam atingidas, já que auxiliam no desenvolvimento de processos e de produtos não convencionais com maior eficiência e rendimento. O uso da biomassa lignocelulósica como estratégia para conversão em produtos com alto valor agregado e prestigiados pelo setor industrial de cosméticos, pode ser atraente devido ao seu baixo valor econômico, fácil acessibilidade e pelas características naturais e sustentáveis. Apesar da alta disponibilidade de resíduos agroindustriais lignocelulósicos, esses materiais ainda são pouco explorados nesse setor, mas merecem atenção devido ao impacto positivo que pode ser gerado (BARBOSA; CONCEIÇÃO, 2016).

### **3.8. Microrganismos presentes na pele**

A pele é considerada o maior órgão do corpo humano, responsável pelo seu revestimento. Por estar em contato direto com o meio externo, e ser constituída por altas concentrações de sais, lipídios e proteínas, esse tecido abriga uma vasta gama de microrganismos, que integram a chamada microbiota da pele (ERIN CHEN; FISCHBACH; BELKAID, 2018). A composição da população microbiana em determinados locais cutâneos irá variar de acordo com fatores externos, como temperatura e contato com superfícies, e fatores intrínsecos do hospedeiro, como grau de umidade, idade e sexo (BYRD; BELKAID; SEGRE, 2018).

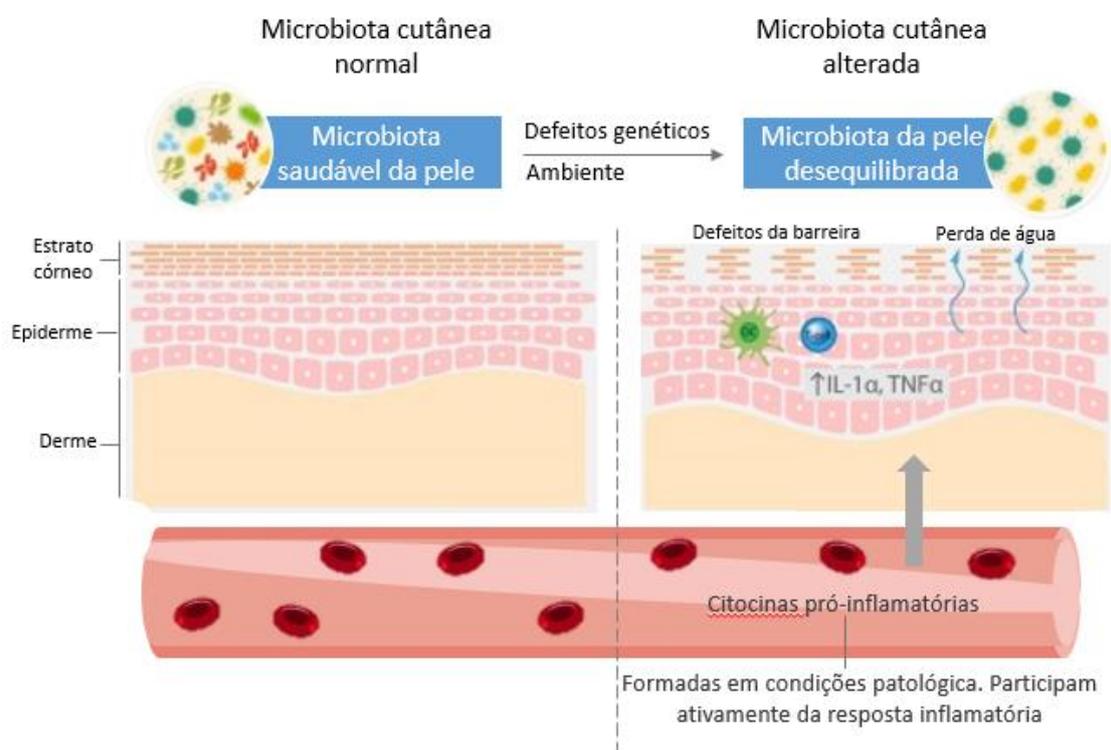
Usualmente, há quatro filos dominantes estáveis de bactérias resistentes na pele humana: Actinobacteria, Proteobacteria, Firmicutes e Bacteroidetes. Outros gêneros, como *Staphylococcus*, *Propionibacterium* e *Corynebacterium*, também são considerados dominantes, porém relativamente estáveis, sendo a composição geral, variável para cada indivíduo (GRICE, 2014). Por natureza, esses microrganismos são considerados benignos ao hospedeiro sob populações controladas, comportando-se como comensais ou mutualistas em condições de estado estacionário. Uma microbiota presente numa pele saudável é caracterizada pela diversidade destas bactérias (BYRD; BELKAID; SEGRE, 2018).

Muitos distúrbios que ocorrem na pele são associadas às perturbações na composição da microbiota, pois além de servirem como uma barreira física contra agentes patogênicos, desempenham outras funções essenciais a favor da proteção do indivíduo pela interação com o sistema imunológico, degradação de alguns componentes do suor,

produzindo peptídeos antimicrobianas patogênicas e entre outros (BYRD; BELKAID; SEGRE, 2018; FARIÁS; KOLBACH, 2011). As explosões de populações bacterianas patogênicas podem desencadear uma séria de doenças cutâneas, como no caso da acne vulgar causada pela principal bactéria associada à doença, a *Propionibacterium acnes*, dermatite atópica caracterizada pelo aumento da colonização bacteriana com *Staphylococcus aureus*, rosácea, psoríase e entre outras doenças. Além disso, outras adversidades da pele também são atribuídas ao desequilíbrio da microbiota, como a pele sensível, odor corporal e aparência visual (EGERT; SIMMERING; RIEDEL, 2017).

A Figura 15 abaixo apresenta a diferença entre a microbiota normal e a microbiota alterada quando há a perturbação da pele.

**Figura 15.** Representação da alteração da microbiota cutânea



Fonte: Adaptado de Lee, Verma e Thanabalu (2021).

Estudos feitos por Seité, Zelenkova e Martin (2017) sugeriram que a aplicação de um emoliente associado a uma fonte de carbono prebiótica, a manose, é uma abordagem terapêutica que permite alterar e equilibrar o sistema imunológico da microbiota cutânea, exibindo melhoras das doenças de pele como acne e rosácea, por promover o crescimento de bactérias benéficas sobre as patogênicas. As estratégias para

manipular a microbiota da pele compreendem basicamente o uso de antibióticos ou aplicações de prebióticos. Enquanto o primeiro atua diretamente na eliminação de microrganismos específicos patogênicos, o segundo tem a capacidade de potencializar, restaurar e conservar a microbiota da pele em diferentes formas, como por competição por crescimento entre bactérias patogênicas e benéficas ou através da excreção de moléculas antimicrobianas por parte dos microrganismos benignos (KRUTMANN, 2009; TORTORA, 2017).

Considerando a sensibilidade da microbiota cutânea perante as condições de mudanças e variações às perturbações geradas, pesquisas são necessárias para identificar cepas probióticas, ou seja, microrganismos que conferem benefícios à saúde, e também substratos prebióticos que possam vir a beneficiar a saúde da pele, já que a interação singular entre ambos pode levar à diferentes atividades responsivas.

### **3.8.1. *Staphylococcus xylosus***

A *Staphylococcus xylosus* é uma bactéria presente na microflora da pele e se desenvolve geralmente em ambientes quentes e úmidos, como axilas, pés, virilhas, dobras de cotovelos e joelhos e mucosas. Na indústria, é habitualmente empregada como cultura iniciadora para desenvolvimento de cor e sabor em alimentos de origem animal, e por esta razão, também é frequentemente encontrada em leite cru, queijos, carnes e salsichas (LEROY et al., 2020; STAVROPOULOU et al., 2018).

Assim como a maioria das bactérias Staphylococci coagulase-negativa (SCN), a *S. xylosus* é considerada um patógeno oportunista, pois ao mesmo tempo que pode promover diversos mecanismos favoráveis à proteção da barreira cutânea, em quantidades excessivas, pode desencadear infecções devido sua capacidade de formação de biofilmes, especialmente em pessoas com sistema imunológico comprometido, que utilizam cateteres permanente ou que passaram por procedimento hospitalar (BECKER; HEILMANN; PETERS, 2014; ERIN CHEN; FISCHBACH; BELKAID, 2018; MA et al., 2011).

No ecossistema da pele, as bactérias Staphylococci, no geral, são produtoras de bactericidas peptídicas para impedir a ação de patógenos (EGERT; SIMMERING; RIEDEL, 2017). Em estudos realizados por Leroy et al. (2020), cepas de *S. xylosus* foram

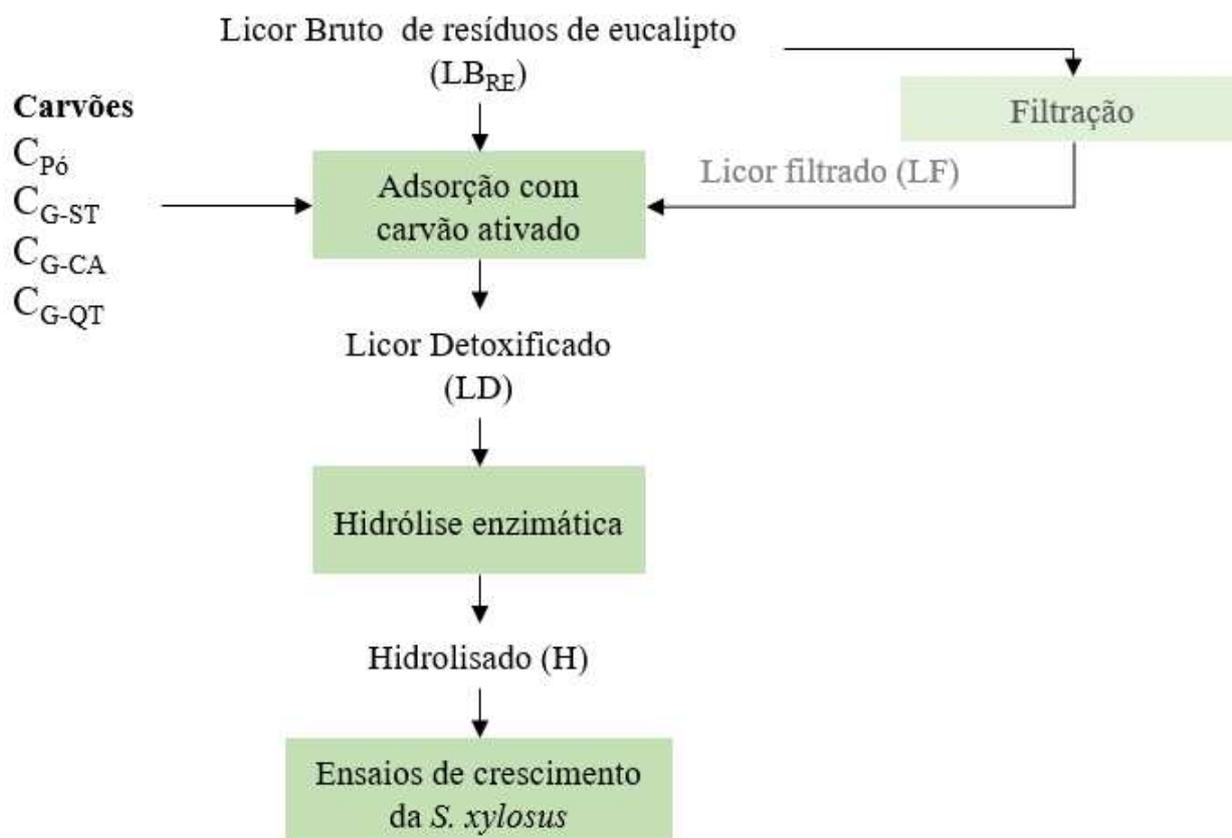
capazes de alterar a composição da pele e inibir ou retardar a formação de biofilmes de espécies *S. aureus*, a partir da excreção de peptídeos antimicrobianos, a qual é responsável por uma grande diversidade de infecções no setor médico hospitalar, ocasionando doenças como intoxicação alimentar, dermatite atópica, furúnculos e doenças mais sérias quando penetram em ossos e corrente sanguínea (BYRD; BELKAID; SEGRE, 2018; ERIN CHEN; FISCHBACH; BELKAID, 2018; LEROY et al., 2020).

Ainda há poucos estudos na literatura sobre os mecanismos de ação de prebióticos em bactérias *S. xylosum* para controle e manutenção da microbiota da pele. Assim, a investigação desse cenário se mostra promissora para o setor cosméticos provenientes de recursos naturais. Em formulações cosméticas, por exemplo, prebióticos podem ser aplicados como bioativos de tratamento diretamente na pele e aumentar seletivamente a atividade da microbiota cutânea saudável, contribuindo para a saúde do hospedeiro de forma sustentável.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

A Figura 16 apresenta um resumo das etapas experimentais deste trabalho para a destoxificação do licor bruto de resíduos de eucalipto ( $LB_{RE}$ ) e formação de  $XOS_{2-3}$  para os ensaios de crescimento da bactéria *S. xylosus*.

**Figura 16.** Resumo da metodologia desenvolvida neste trabalho para destoxificação, hidrólise enzimática e crescimento da *S. xylosus*



Fonte: Autor, 2022.

### 4.1. Materiais

O  $LB_{RE}$  foi gentilmente fornecido pela doutoranda Jenniffer Andrea Tamayo Pena do Laboratório de Engenharia Bioquímica, Biorrefinaria e Produtos de Origem Renovável (LEBBPOR) da FEQ/UNICAMP, sob o marco do projeto temático FAPESP/BBSRC “An integrated approach to explore a novel paradigm for biofuel production from lignocellulosic feedstocks” processo (15/50612-8), coordenado pela professora Telma Teixeira Franco. O material foi obtido por pré-tratamento hidrotérmico dos galhos de eucalipto pertencentes à espécie *Eucalyptus grandis*. As condições

operacionais ótimas foram descritas como 175°C, 20 minutos de tempo reacional e 10% (m/m) de carga de sólidos (TAMAYO-PENA; J.A. et al., 2020).

Os carvões utilizados na adsorção do LB<sub>RE</sub> foram carvão ativado granulado (C<sub>G</sub>), com 8×30 mesh, gentilmente cedido pelo Professor Marcus Soares Forte, do Laboratório de Bioprocessos e Engenharia Metabólica (LEMeB) da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, e carvão ativado em pó P.A. (C<sub>Pó</sub>) fornecido pela Synth (Lote: 235611).

A enzima empregada nos ensaios enzimáticos foi a endo-1,4-β-xilanase de *Neocallimastix patriciarum* (GH11) da Megazyme®.

## **4.2. Adsorção com carvões ativados**

### **4.2.1. Tratamento do Carvão ativado granulado**

Foram testados três diferentes tratamentos para o C<sub>G</sub> para avaliar a remoção dos compostos inibidores, como compostos fenólicos, furfural, 5-HMF, lignina solúvel, ácido acético e ácido fórmico, presentes no LB<sub>RE</sub>, de acordo com metodologias descritas por Heylmann et al., (2021) e Ramos et al., (2009). Já o C<sub>Pó</sub> não recebeu nenhum tipo de tratamento preliminar, já que seu grau analítico garantiu maior grau de pureza e confiabilidade, conforme Figura 17. Em seguida, os carvões foram empregados para a avaliação da adsorção dos compostos propostos do LB<sub>RE</sub>.

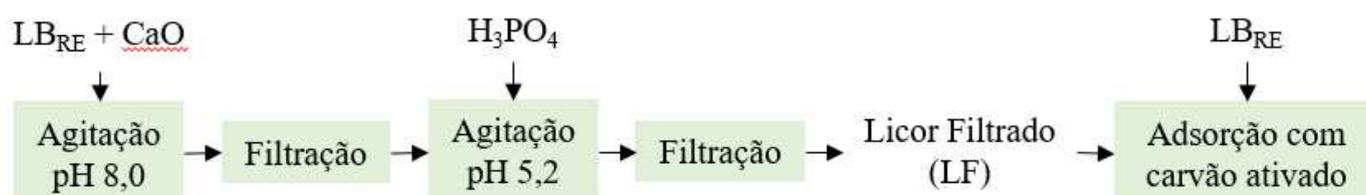
As diferentes estratégias utilizadas no C<sub>G</sub> foram: carvão sem tratamento prévio (C<sub>G-ST</sub>), carvão carbonizado em cadinhos de porcelana à 700°C por 10 minutos em mufla (C<sub>G-CA</sub>), e carvão quimicamente tratado e carbonizado (C<sub>G-QT</sub>), em que o material foi mantido em contato com uma solução de cloreto de zinco 33% (m/v), na proporção 1:1 (ZnCl<sub>2</sub>:carvão) por 24 horas. Neste tratamento, também foi feita uma lavagem com solução de ácido clorídrico (HCl) 2,5% (v/v) para eliminação dos íons zinco e desobstrução dos poros, lavagem com água destilada até obtenção do pH da água de lavagem, e então secagem em estufa a 100°C durante 1 hora.

**Figura 17.** Carvões ativados utilizados na adsorção do licor bruto

Fonte: Autor, 2022.

#### 4.2.2. Filtração do Licor Bruto de resíduos de eucalipto

A remoção de impurezas e compostos sólidos do  $LB_{RE}$  foi feita de acordo com a metodologia adaptada estabelecida por Alves et al., (1998), a qual envolve duas etapas: aumento do pH para 8,0 com óxido de cálcio ( $CaO$ ) seguida de filtração com papel filtro qualitativo; redução do pH para 5,2 com ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ ) seguida de uma nova filtração (Figura 18). Ao final deste processo, o licor filtrado (LF) e o  $LB_{RE}$  (pH 3,2) foram submetidos à adsorção com o  $C_G$  de melhor desempenho para comparação.

**Figura 18.** Metodologia para filtração prévia do  $LB_{RE}$  antes da adsorção com carvão ativado

Fonte: Autor, 2022.

### 4.2.3. Experimentos de adsorção

O LB<sub>RE</sub> foi destoxificado por adsorção com os carvões ativados 4% (m/v), o C<sub>P6</sub> e os C<sub>G</sub>. As amostras foram agitadas em shaker a 150 rpm e 30°C durante 2 horas, centrifugadas por 30 minutos a 4200 rpm e então filtradas em papel filtro qualitativo para retenção do carvão. Em seguida, outra centrifugação foi feita sob as mesmas condições anteriores. O sobrenadante foi retirado cuidadosamente com o auxílio de pipetas Pasteur e armazenado para análises.

O mesmo procedimento foi utilizado para a construção da isoterma de adsorção do ácido acético. Experimentos simultâneos foram executados variando-se as concentrações de C<sub>G-CA</sub>, para o volume fixo de 25 mL de LB<sub>RE</sub>, conforme Tabela 1.

**Tabela 1.** Massa e porcentagem de carvão ativado para experimentos de isoterma de adsorção do ácido acético

% C <sub>G-CA</sub>	Massa (g)
2%	0,5
4%	1,0
6%	1,5
8%	2,0
10%	2,5

A porcentagem de remoção dos compostos adsorvidos (*i*) foi calculada segundo a Equação 3 a seguir.

$$\%Remoção = \frac{C_{0,i} - C_{f,i}}{C_{0,i}} \times 100 \quad (3)$$

Em que:

C<sub>0,i</sub> = concentração inicial de composto *i* (g/L); C<sub>f,i</sub> = concentração do composto *i* ao final da adsorção (g/L). Sendo *i* = compostos fenólicos, furfural, 5-HMF, lignina solúvel, ácido acético ou ácido fórmico.

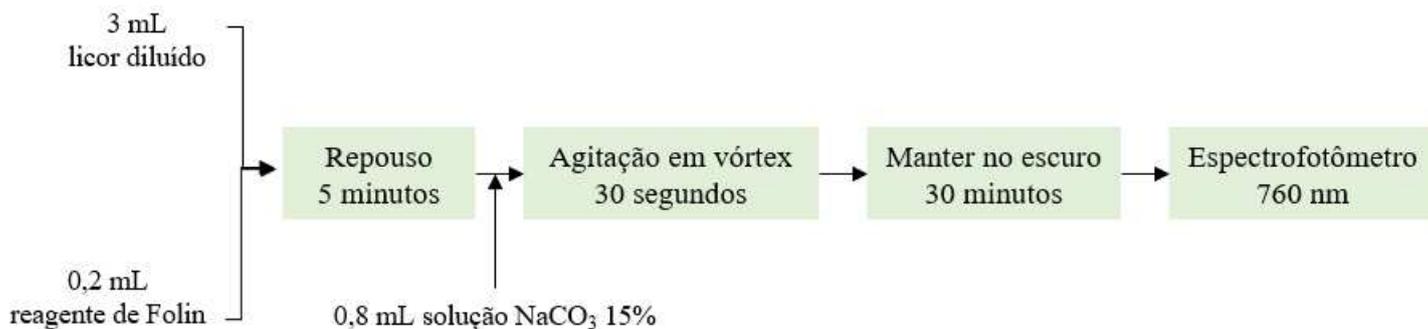
### 4.3. Metodologia analítica

#### 4.3.1. Determinação da concentração de compostos fenólicos

A concentração dos compostos fenólicos totais foi determinada pelo método de Folin-Ciocalteu, descrito por Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventós (1999 apud ARRUDA, 2008). Em tubos de ensaio, foram adicionados 3 mL de LB<sub>RE</sub> com diluição apropriada, 0,2 mL de reagente de Folin e, após 5 minutos, 0,8 mL de uma solução 15% (m/v) de carbonato de sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). As amostras foram agitadas em vórtex por 30 segundos e então mantidas no escuro por 30 minutos. Em seguida, as amostras foram lidas em espectrofotômetro a 760 nm. Um fluxograma resumido do processo pode ser observado na Figura 19.

A concentração dos fenóis totais foi determinada a partir de uma curva de calibração previamente construída, em concentrações de 1, 2,5, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 ppm, utilizando-se ácido gálico como padrão.

**Figura 19.** Metodologia para determinação da concentração de compostos fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu



Fonte: Autor, 2022.

#### 4.3.2. Determinação de lignina solúvel

A concentração de lignina solúvel foi quantificada utilizando-se balões volumétricos de 20 mL contendo a alíquota LB<sub>RE</sub> em diluição adequada (entre 20x e 30x). Em seguida, o pH do meio foi ajustado entre 12 e 13 com NaOH 6,5 N. As amostras foram analisadas em espectrofotômetro a 280 nm, com o auxílio de cubetas de quartzo. A concentração de lignina solúvel presente nas frações do LB<sub>RE</sub> foi determinada segundo as Equações 4 e 5 abaixo (ROCHA et al., 2012).

$$C_{LS} = 4,187.10^{-2}(A_{280} - A_{f,HMF}) - 3,279.10^{-4} \quad (4)$$

Em que,

$$A_{f,HMF} = (C_{furfural}\varepsilon_{furfural}) + (C_{HMF}\varepsilon_{HMF}) \quad (5)$$

Sendo  $C_{LS}$ : concentração de Lignina Solúvel (g/L);  $A_{280}$ : absorvância da solução de lignina em 280 nm;  $A_{f,HMF}$ : absorvância de furfural e HMF a 280 nm;  $C_{furfural}$ : concentração de furfural (g/L); determinada previamente por HPLC;  $C_{HMF}$ : concentração de HMF (g/L); determinada previamente por HPLC;  $\varepsilon_{furfural}$ : absorvância do furfural igual a  $146,85 \text{ (g.cm)}^{-1}$ ,  $\varepsilon_{HMF}$ : absorvância do HMF igual a  $114,00 \text{ (g.cm)}^{-1}$ .

#### 4.3.3. Determinação de furfural e 5-hidroximetilfurfural

Furfural e 5-HMF foram quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) utilizando-se coluna C18 Thermo (50 x 2,1 mm) a 30°C e detector de Arranjo de Diodo (PDA) com comprimento de onda de 280 nm. Ácido fosfórico 2 mM contendo acetonitrila 2,5% foi utilizado como eluente com vazão de 100  $\mu\text{L}/\text{min}$  e volume de injeção de 20  $\mu\text{L}$ . Os valores de concentração foram obtidos a partir de curva de calibração previamente construída.

#### 4.3.4. Determinação de ácido acético e ácido fórmico

As concentrações ácido acético e ácido fórmico foram determinadas por HPLC de troca iônica com detector por condutividade. A coluna Metrosep Organic Acids (300 x 7,8 mm) foi utilizada para as análises a 30°C. Ácido sulfúrico 0,5 mM e supressor de cloreto de lítio (LiCl) 50 mM foram utilizados como fase móvel com vazão a 0,5 mL/min e volume de injeção de 196  $\mu\text{L}$ . Curvas de calibração foram previamente preparadas com os seus respectivos padrões.

#### 4.3.5. Determinação de açúcares monoméricos

Açúcares monoméricos, glicose e xilose, foram quantificados por HPLC utilizando-se coluna Bio-Rad Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm) a 55°C e detector de índice de refração Waters 410 com temperatura de 40°C. Ácido sulfúrico 5 mM foi utilizado como eluente a vazão de 0,6 mL/min e volume de injeção de 20  $\mu\text{L}$ . Curvas de calibração foram previamente construídas com padrões para determinação dos valores de concentração das amostras.

#### 4.3.6. Determinação de XOS

Xilobiose (X2), Xilotriose (X3), Xilotetraose (X4) e Xilopentose (X5) foram quantificados por HPLC com detector amperométrico, coluna e pré-coluna CarboPac PA100 (4 x 50 mm). A composição da fase móvel consistiu em um sistema de gradiente de solvente composto por: A (água deionizada), B (NaOH 80 mM e acetato de sódio 500 mM) e C (NaOH 500 mM) com vazão de 1,0 mL/min e volume de injeção de 20 µL.

##### 4.3.6.1. Determinação de XOS totais

Para avaliar a variação da concentração de XOS totais ( $XOS_T$ ) no licor após a etapa de destoxificação, foi feita uma hidrólise ácida diluída do licor destoxificado com ácido sulfúrico numa concentração final no meio reacional de 4% (m/m), segundo o protocolo do *National Renewable Energy Laboratory* (NREL/TP-510-42623) (SLUITER et al., 2006). A reação foi mantida a 121°C por 60 minutos em autoclave, seguida de banho de gelo para cessar a reação. As amostras foram filtradas em papel filtro quantitativo e então armazenadas adequadamente para determinação dos mono e oligossacarídeos.

#### 4.4. Ensaio de atividade enzimática

A atividade da enzima foi determinada a partir de reações contendo 50 µL de arabinoxilano de trigo (Megazyme®) utilizado como substrato (0,5% p/v) e 50 µL da enzima, ambos diluídos em tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,0. As amostras foram incubadas a 50°C durante 20 minutos em termociclador. A reação foi interrompida pela adição de 100 µL do reagente ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) e imediatamente aquecida até ebulição durante 5 minutos.

A quantidade de açúcares redutores liberados foi determinada colorimetricamente através de um espectrofotômetro UV/Vis a 540 nm (MILLER, 1959), a partir de uma curva de calibração previamente construída com padrões de concentrações conhecidas de xilose. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de açúcares redutores do substrato por minuto. Os ensaios foram realizados em triplicata.

#### 4.5. Hidrólise enzimática

Os ensaios de hidrólise enzimática foram feitos em frascos Erlenmeyer contendo o licor destoxificado (LD), a enzima endo-1,4- $\beta$ -xilanase em quantidades apropriadas e tampão citrato-fosfato 50 mM e pH 6,0 para integrar o volume final necessário. As amostras foram incubadas a 50°C sob agitação constante de 160 rpm por 24 e 48 horas. Em seguida, foram aquecidas a 90°C por 10 minutos em banho maria, centrifugadas a 4200 rpm por 15 minutos a 4°C e armazenadas para determinação da concentração XOS por HPLC.

Para investigar os efeitos da relação enzima/substrato sobre o aumento da concentração de XOS<sub>2-3</sub>, os ensaios foram feitos variando-se a dosagem de enzima em 40,0, 75,0 e 110,0 U/g<sub>XOS</sub> em proporções fixas de LD de 6,3%, para obtenção de relações enzima/substrato (v/v) de 0,02, 0,04 e 0,06, respectivamente. Os intervalos foram escolhidos com base nos estudos feitos por Brenelli et al., (2020) e Carvalho et al., (2020).

#### 4.6. Microrganismos e condições de cultivo

A cultura criopreservada do microrganismo *S. xylosus* (ATCC 29971) foi adquirida da Coleção de Culturas Tropical (CCT) da Fundação André Tosello, Campinas (São Paulo, Brasil).

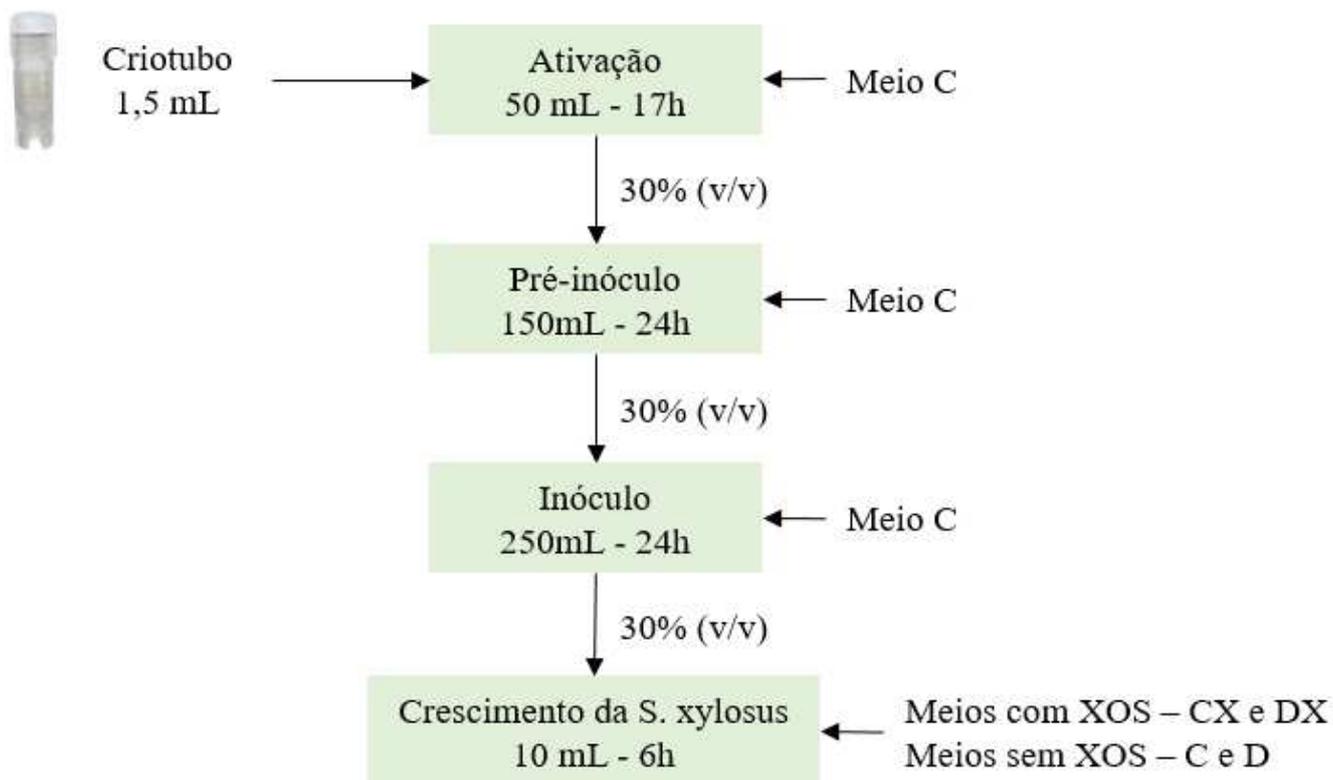
A cultura foi ativada em meio de cultura caldo nutriente (C), previamente esterilizado a 121°C por 20 minutos, na proporção 1,5 mL: 50 mL (criotubo: meio C) em Erlenmeyers de 250 mL e incubadas a 37°C por 17 horas. As condições adequadas para a ativação e preservação das culturas encontram-se descritas na Tabela 2.

**Tabela 2.** Condições ótimas de cultivo e composição do meio caldo nutriente (C) para a bactéria *S. xylosus* (FAT, 2020).

<i>Staphylococcus xylosus</i>	
Temperatura	37°C
Meio C	1 g/L de Extrato de carne 5 g/L de Peptona A 2 g/L de Extrato de levedura 5 g/L de NaCl
pH	7,2 $\pm$ 0,2

A Figura 20 apresenta um resumo das etapas para os ensaios de crescimento da bactéria *S. xylosus* mantidos em incubadora shaker.

**Figura 20.** Metodologia para os ensaios de crescimento da bactéria *S. xylosus*



Fonte: Autor, 2022.

Após a ativação, o cultivo foi escalonado para 150 mL, na proporção de ativação 30% (v/v), para a formação do pré-inóculo e incubado a 37°C por 24 horas a 250 rpm. Em seguida, mantendo-se a mesma proporção, o pré-inóculo foi transferido para o inóculo, de volume final de 250 mL, e incubado novamente por 24 horas a 250 rpm em temperatura ótima. Esse escalonamento garantiu a quantidade necessária de inóculo para os ensaios de crescimento da bactéria com o hidrolisado.

#### 4.6.1. Crescimento da bactéria *Staphylococcus xylosus*

As curvas de crescimento microbiano foram executadas em frascos Erlenmeyer de 100 mL em duplicata, com volume de trabalho de 10 mL, contendo 30% (v/v) do inóculo e diferentes meios de cultura, conforme Tabela 3, cultivadas sob condições ótimas por 6 horas e agitação de 250 rpm. O potencial prebiótico do hidrolisado (H) foi avaliado por comparação do meio caldo nutriente (C) e caldo nutriente com 0,47 g/L de XOS<sub>2-3</sub>

(CX), caldo nutriente diluído 4x com água (D) e caldo nutriente diluído com 0,64 g/L de XOS<sub>2-3</sub> (DX).

O crescimento bacteriano foi determinado por leituras de densidade óptica a 600 nm em espectrofotômetro, a qual foi correlacionada com a massa seca correspondente. Uma curva de calibração foi previamente preparada a partir do inóculo da bactéria. Amostras foram retiradas nos tempos 0, 1, 2, 3 e 6 horas, e analisadas para determinação da concentração celular e pH. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (4500 rpm por 10 minutos) para remoção das células. Os sobrenadantes foram devidamente diluídos, filtrados com filtros PVDF 0,22 µm e utilizados para a quantificação do consumo de X2 e X3 por HPLC, conforme descrito no item 4.4.6.

**Tabela 3.** Composição química dos meios de cultura para ensaios de crescimento da bactéria *S. xylosus*.

Componentes	Concentração (g/L)			
	Meio C	Meio CX	Meio D	Meio DX
Extrato de Levedura	2,00	2,00	0,50	0,50
Extrato de Carne	1,00	1,00	0,25	0,25
Peptona	5,00	5,00	1,25	1,25
NaCl	5,00	5,00	1,25	1,25
X2	-	0,21	-	0,29
X3	-	0,26	-	0,35
XOS totais	-	3,00	-	4,10

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Composição do licor bruto de resíduo de eucalipto

A composição do LB<sub>RE</sub> foi investigada pela doutoranda Jenniffer Andrea Tamayo Pena, em que o pré-tratamento hidrotérmico foi otimizado para maximizar a liberação de oligossacarídeos. A composição química original do LB<sub>RE</sub> é descrita na Tabela 4 e apresentava valor de pH 3,2 (TAMAYO-PENA; J.A. et al., 2020).

O pré-tratamento hidrotérmico empregado para descomplexar a estrutura das biomassas lignocelulósicas, além de solubilizar as frações hemicelulósicas na forma de oligômeros e monômeros, também gerou produtos inibidores, como os compostos fenólicos, ácido fórmico, ácido acético, furfural, 5-HMF e lignina solúvel.

**Tabela 4.** Composição química do licor bruto (LB<sub>RE</sub>) obtido por pré-tratamento hidrotérmico dos galhos de eucalipto.

Componentes	Concentração (g/L)
	LB <sub>RE</sub>
Xilose	1,436 ± 0,162
Arabinose	0,322 ± 0,057
Glicose	0,107 ± 0,005
XOS totais	8,698 ± 0,005
Fenóis totais	0,979 ± 0,070
Ácido fórmico	0,579 ± 0,050
Ácido acético	0,436 ± 0,156
Furfural	0,125 ± 0,114
5-HMF	0,040 ± 0,019
Lignina solúvel	0,022 ± 0,001

Fonte: (TAMAYO-PENA; J.A. et al., 2020).

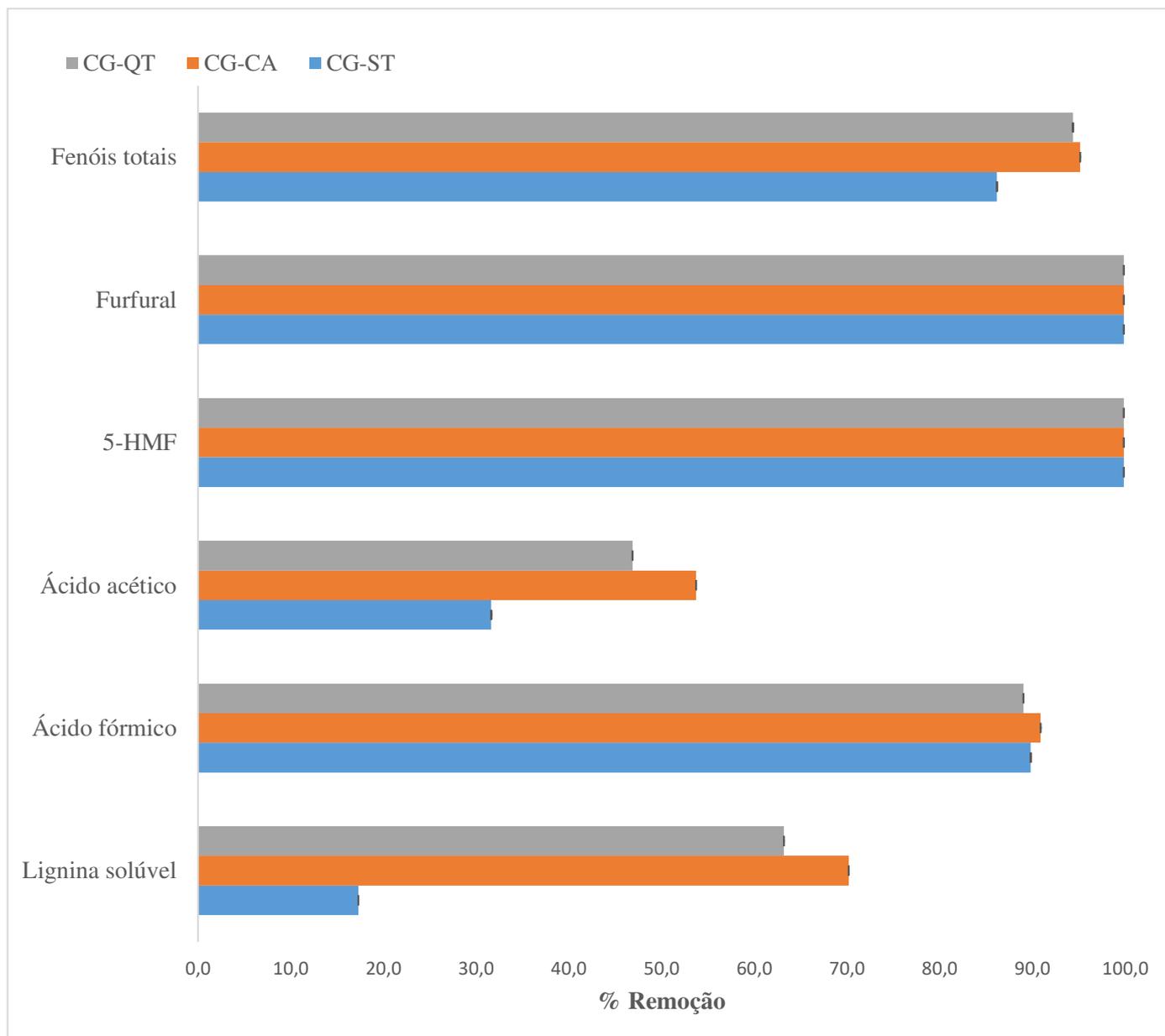
## 5.2. Destoxificação do licor bruto

### 5.2.1. Efeitos dos tratamentos dos carvões ativados na adsorção

A presença dos compostos inibidores no  $LB_{RE}$  pode comprometer o desenvolvimento de processos industriais, o crescimento e a atividade de bactérias (ARRUDA, 2008; COSTA-TRIGO et al., 2020). O processo de carbonização e ativação química do material garantem que os poros do material estejam desobstruídos e disponíveis para acomodar seletivamente as moléculas indesejáveis, proporcionando a separação das moléculas de interesse da fase líquida (NASCIMENTO et al., 2014). Diferentemente dos carvões ativados em pó, os carvões ativados granulados podem necessitar de mais processos para sua formação, já que o tamanho da sua partícula influencia diretamente na capacidade de adsorção (GE et al., 2022).

A Figura 21 apresenta os resultados da remoção dos compostos fenólicos, ácido fórmico, ácido acético, furfural, 5-HMF e lignina solúvel do  $LB_{RE}$  por adsorção com os carvões ativados granulados,  $C_{G-ST}$ ,  $C_{G-CA}$  e  $C_{G-QT}$ , ao final de duas horas de adsorção. No geral, observa-se que os carvões que receberam algum tipo de tratamento,  $C_{G-CA}$  e  $C_{G-QT}$ , promoveram uma maior remoção de todos os compostos, exceto para o furfural e o 5-HMF, em que todos os carvões os retiraram efetivamente (> 99%). Além disso, nota-se que os tratamentos não influenciaram significativamente na remoção do ácido fórmico, sendo as porcentagens de remoção de 90,9%, 89,8%, e 89,0%  $C_{G-CA}$ ,  $C_{G-ST}$  e  $C_{G-QT}$ , respectivamente.

**Figura 21.** Remoção de compostos inibidores no LB<sub>RE</sub> a partir dos carvões: C<sub>G-ST</sub> (sem tratamento), carvão C<sub>G-CA</sub> (carbonizado) e carvão C<sub>G-QT</sub> (quimicamente tratado) após 2 horas de adsorção

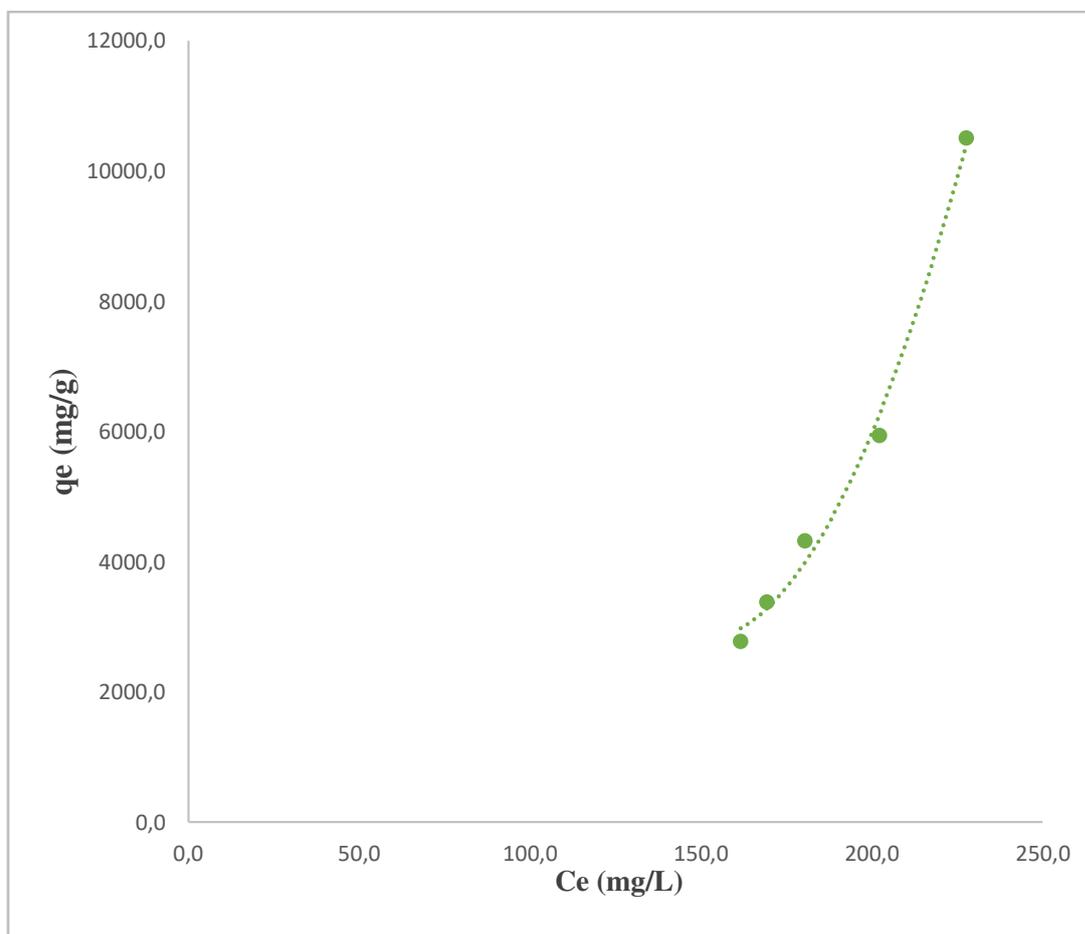


A ativação feita no C<sub>G-QT</sub> não favoreceu a remoção de lignina solúvel, 63,2% e compostos fenólicos, 94,4%, em relação ao carvão C<sub>G-CA</sub>, que removeu 70,2% e 95,2% dos mesmos compostos, respectivamente. Agentes ativadores, como ZnCl<sub>2</sub>, são responsáveis por inibir a formação e eliminar outros compostos orgânicos dos microporos, aumentando a área superficial no material adsorvente (SUJIONO et al., 2022). Entretanto, o tempo e taxa de impregnação podem afetar a qualidade do carvão ativado (MOZAMMEL; MASAHIRO; BHATTACHARYA, 2002). Vargas, Giraldo e Moreno-Piraján (2012) testaram a impregnação do carvão de caroço de palmeira africana

granular com  $ZnCl_2$  e observaram que o aumento de sua concentração no meio diminuiu a capacidade de adsorção do material devido ao colapso da estrutura porosa por excesso do agente ativador.

O ácido acético foi o composto menos adsorvido do  $LB_{RE}$ , sendo 53,7%, 46,9% e 31,6% para  $C_{G-CA}$ ,  $C_{G-QT}$  e  $C_{G-ST}$ , respectivamente, e, portanto, sua isoterma de adsorção foi estudada. Observa-se que a isoterma de adsorção do ácido acético (Figura 22) com o carvão  $C_{G-CA}$ , se assemelha com o formato da isoterma de adsorção do tipo III, conforme Figura 9, indicando fracas interações entre as moléculas do adsorvato com o adsorvente. Como resultado, tem-se uma baixa massa de ácido acético retida por unidade de massa de carvão ativado, e por esta razão, os parâmetros de adsorção não foram determinados. A razão para essa tendência também pode ser atribuída pela falta de sítios ativos necessários para uma alta concentração inicial de ácido acético, além de sua competição com os outros compostos, levando a uma menor remoção (ADEKOLA; OBA, 2016).

**Figura 22.** Isoterma de adsorção para o ácido acético com carvão  $C_{G-CA}$



O carvão C<sub>G-CA</sub> apresentou a melhor performance para a remoção dos compostos inibidores dentro do período de duas horas e foi utilizado no item 5.2.2. Além disso, este tipo de tratamento evita o consumo de reagentes, água e energia requerida para a remoção do HCl, o qual é necessário no tratamento químico, apresentando-se como mais econômico.

### 5.2.2. Efeito da filtração do LB<sub>RE</sub> na adsorção

A adsorção é uma consequência de combinações químicas e físicas entre moléculas do adsorvato e o adsorvente. Com isso, há vários fatores que influenciam diretamente no mecanismo de adsorção, como área superficial, tamanho dos poros, temperatura e pH do meio (MUSSATTO; ROBERTO, 2004a). Segundo Alves et al., 1998, compostos aromáticos ou impurezas podem ser precipitados na forma de óxidos pela alteração de pH do meio, a partir dos íons cálcio em solução provenientes do CaO, e então removidos do licor por filtração simples.

A Tabela 5 compara as composições dos sobrenadantes do licor filtrado destoxificado (LFD), referente ao LB<sub>RE</sub> filtrado duas vezes após ajustes de pH para 8,0 e 5,2 seguida da adsorção, e LD, referente ao LB<sub>RE</sub> submetido diretamente a adsorção, ambos adsorvidos com o carvão C<sub>G-CA</sub>.

**Tabela 5.** Concentrações dos compostos inibidores do LB<sub>RE</sub>, LFD obtido após duas filtrações seguida da adsorção com o carvão C<sub>G-CA</sub> e LD obtido após adsorção direta com o carvão C<sub>G-CA</sub> ao final de duas horas.

Inibidores	Concentração (g/L)		
	LB <sub>RE</sub>	LFD	LD
Furfural	0,125 ± 0,114	< 0,001	< 0,001
5-HMF	0,040 ± 0,019	< 0,001	< 0,001
Fenóis totais	0,979 ± 0,070	0,027 ± 0,002	0,047*
Ácido fórmico	0,579 ± 0,050	0,059*	0,053 ± 0,001
Lignina solúvel	0,022 ± 0,001	0,008*	0,007*
Ácido acético	0,436 ± 0,156	0,243 ± 0,002	0,202*

\* Valores de duplicatas com erros inferiores a 5%.

A precipitação seguida da filtração como etapa prévia à adsorção com carvão ativado não influenciou nos resultados de adsorção do furfural, 5-HMF e ácido fórmico sendo que todos os resultados apresentaram porcentagem de remoção superior a 90,0%. Entretanto, nota-se que ao final do processo, foram removidos 44,4% e 62,6% de ácido acético e lignina solúvel do LFD, enquanto o LD apresentou remoção de 53,7% e 70,2%, respectivamente, para os mesmos compostos.

De acordo com Evstigneyev et al., (2019) e Horvath (2006), a solubilidade da lignina aumenta com o aumento do pH da fase líquida. Desta forma, o meio que manteve o pH ácido do LB<sub>RE</sub>, pela não adição de CaO, garantiu que as macromoléculas adquirissem maior afinidade com o adsorvente em relação à fase líquida, justificando a maior porcentagem de remoção. Além disso, nota-se que seus derivados, os compostos fenólicos, foram altamente removidos em ambos os casos, sendo 97,3% e 95,2%, respectivamente, para os licores LFD e LD. Possivelmente, a adição de CaO no LB<sub>RE</sub> causou a precipitação de alguns compostos aromáticos na forma de óxidos, permitindo que os mesmos também fossem removidos pela filtração (ALVES et al., 1998). A etapa de filtração prévia como alternativa para aprimorar a adsorção não favoreceu a adsorção de outros inibidores, assim como a remoção das impurezas sólidas do LB<sub>RE</sub>, indicando que somente a adsorção com o carvão ativado foi suficiente para retirar efetivamente os compostos propostos.

Apesar de diversas referências utilizarem a estratégia de filtração prévia a adsorção em diferentes tipos de matérias primas, como em bagaço de cana (ANTUNES et al., 2021; ARRUDA, 2008), poupa de madeira (LU; DONG; YANG, 2013) e gramínea *Switchgrass* (PANIAGUA-GARCÍA et al., 2018), nota-se que neste estudo para o LB<sub>RE</sub>, a etapa de filtração não promoveu a remoção dos compostos inibidores propostos tão satisfatoriamente quanto ao emprego do LB<sub>RE</sub> direto à adsorção, sendo esta última a condição empregada para os experimentos posteriores de destoxificação, já que também evita o uso de reagentes, equipamentos, energia e perdas de licor que são geradas durante a filtração.

### 5.2.3. Comparação entre C<sub>P6</sub> e C<sub>G-CA</sub>

A Tabela 6 apresenta os resultados da adsorção do LB<sub>RE</sub> com os carvões C<sub>P6</sub> e C<sub>G-CA</sub>.

**Tabela 6.** Concentrações dos compostos inibidores nos licores destoxificados (LD) por adsorção com os carvões ativados C<sub>G-CA</sub> e C<sub>P6</sub>.

Inibidores	Concentração (g/L)		
	LB <sub>RE</sub>	LD - C <sub>G-CA</sub>	LD - C <sub>P6</sub>
Furfural	0,125 ± 0,114	< 0,001	< 0,001
5-HMF	0,040 ± 0,019	< 0,001	< 0,001
Fenóis totais	0,979 ± 0,070	0,048 ± 0,001	0,063 ± 0,001
Ácido fórmico	0,579 ± 0,050	0,053 ± 0,001	0,041 ± 0,002
Lignina solúvel	0,022 ± 0,001	0,007*	< 1,000×10 <sup>-5</sup>
Ácido acético	0,436 ± 0,156	0,202*	0,197 ± 0,002

\* Valores de duplicatas com erros inferiores a 5%.

Observa-se que a granulometria do carvão não é um parâmetro influente para a remoção de furfural e 5-HMF, sendo que em ambos os casos os compostos foram eficientemente removidos (> 99%). Apesar do C<sub>P6</sub> ter retirado, mais efetivamente, a lignina solúvel (99,9%) em relação ao C<sub>G-CA</sub> (70,2%) e ligeiramente mais ácido fórmico e ácido acético (93,0% e 55,0% contra 90,9% e 53,7%), o carvão granulado adsorveu um pouco mais dos compostos fenólicos (95,2%) em relação ao em pó (93,6%).

Estudos feitos por Mussatto e Roberto (2004), avaliaram a remoção de furfural e 5-HMF e produtos de degradação da lignina com 2,5% de carvão ativado com diferentes granulometrias no licor produzido a partir da palha de arroz. O carvão em pó foi capaz de remover cerca de 42%, 93% e 26%, respectivamente, para concentrações iniciais de 0,06 g/L de furfural e 0,50 g/L de 5-HMF, enquanto o carvão granulado de 8×30 mesh removeu 54%, 39% e 12% na devida ordem. Os autores concluíram que os parâmetros fermentativos do estudo foram fortemente influenciados pela porcentagem de remoção dos compostos propostos, sendo que eles foram reduzidos em até 34% quando o licor foi tratado com o carvão ativo granulado. Apesar da adsorção ser fortemente dependente da concentração dos adsorvatos na fase líquida, este estudo se assemelha com esta presente

pesquisa pelo fato de que o carvão ativado em pó apresentou melhor performance para remoção dos três componentes.

Apesar da efetividade de remoção dos compostos apresentados, é notório que há uma remoção moderada do ácido acético (cerca de 55,0%) em ambos carvões utilizados e que a granulometria não influenciou no processo de adsorção. Entretanto, esses resultados estão de acordo com os resultados da literatura, os quais relatam porcentagens inferiores a 55% de remoção de ácido acético para adsorção do licor com carvão ativado. Do Nascimento et al., (2020) reportaram que o carvão vegetal de endocarpo de açaí removeu 52,8% de furfural e 100% de 5-HMF, mas apenas 40,4% de ácido acético no licor de bagaço de sisal. Lu, Dong e Yang (2013), também destoxificaram licor de polpa de madeira com carvão ativado comercial e removeram 99,9% dos compostos fenólicos, 80,0% de furfural e 87,9% de 5-HMF, porém somente 26,4% de ácido acético. Apesar dos estudos apresentarem diferentes concentrações iniciais para esses compostos, nota-se que há mesma tendência para menor remoção do ácido acético.

Embora o  $C_{P6}$  tenha apresentado os melhores resultados, a carbonização do  $C_G$  ( $C_{G-CA}$ ) também gerou um material eficaz para a remoção dos compostos inibidores propostos. Entretanto, maiores perdas de xilose foram observadas para o carvão granulado (16,2%) em relação ao em pó (9,7%), conforme Tabela 7. Em estudos semelhantes feitos por Arruda (2008) e Costa-Trigo et al., (2020), perdas de xilose de 9% e 33% em licores de bagaço de cana e de rebarbas de cana em adsorção com carvão ativado também foram relatadas. Além disso, neste presente trabalho, os XOS totais foram removidos em 32,2% e 10,5% para o  $C_{G-CA}$  e  $C_{P6}$ , respectivamente. A perda pela adsorção com este último carvão não prejudicou o estudo, já que os compostos inibitórios foram removidos efetivamente nas etapas posteriores. Por fim, também foi observado que houve a clarificação do  $LB_{RE}$  após destoxificação, conforme Figura 23.

**Tabela 7.** Concentrações dos açúcares, xilose e  $XOS_T$ , nos licores destoxificados (LD) por adsorção com os carvões ativados  $C_{G-CA}$  e  $C_{P6}$ .

Componentes	Concentração (g/L)		
	$LB_{RE}$	LD - $C_{G-CA}$	LD- $C_{P6}$
Xilose	1,436 ± 0,162	1,204 ± 0,074	1,297 ± 0,003
XOS totais	8,698 ± 0,005	5,897 ± 0,001	7,785 ± 0,001

**Figura 23.** Amostra de licor bruto, à esquerda, licor destoxificado com  $C_{P6}$ , à direita

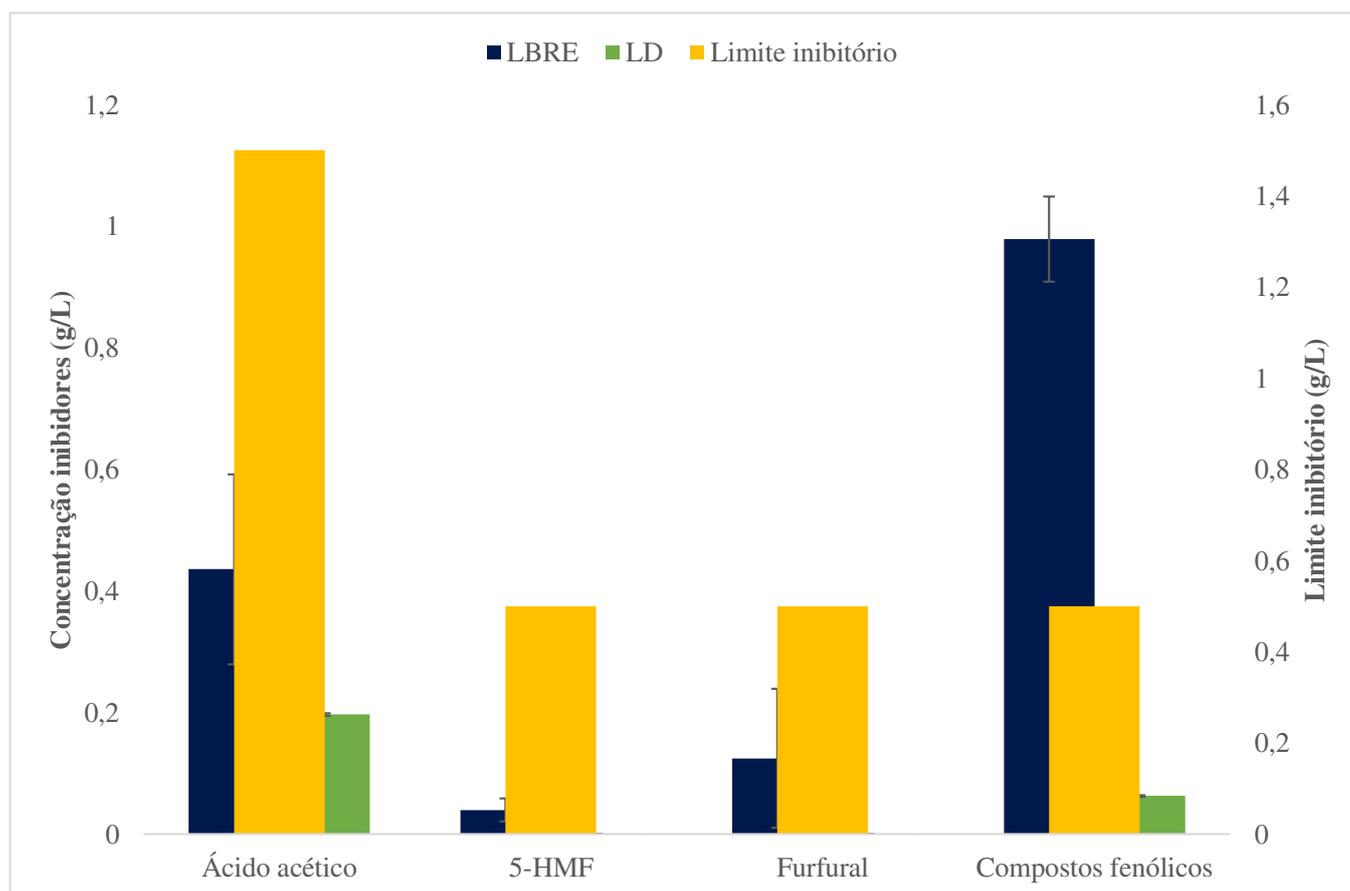


A ação inibitória dos compostos tóxicos à microrganismos é estabelecida pela sua capacidade de atravessar a membrana e causar danos celulares, como a alteração de pH, da sua estrutura e da sua permeabilidade, e pela modificação dos mecanismos de inibição de síntese e das enzimas fundamentais para manutenção e funcionamento das células (BASAK et al., 2020). Antunes et al., 2021 reportaram que concentrações abaixo de 1,5 g/L de ácido acético não inibem o metabolismo de cepas de *Scheffersomyces shehatae* e *Candida tropicalis* durante etapas de fermentação, enquanto Costa-Trigo et al., (2020) relataram que concentrações a partir 0,5 g/L de compostos fenólicos inibem a produção de ácido láctico por *Lactobacillus plantarum*. Wikandari et al., (2010) também observaram que a mesma concentração de ácido acético de 1,5 g/L foi suficiente para reduzir rendimento e produtividade de etanol, a partir da fermentação da levedura *Pichia stipitis*, além da concentração de 0,5 g/L para os inibidores furfural e 5-HMF.

Neste trabalho, com exceção dos compostos fenólicos, as concentrações do furfural, 5-HMF e ácidos orgânicos estão abaixo dos limites considerados inibitórios no LB<sub>RE</sub>, conforme Figura 24. Entretanto, considerando que os limites apresentados pela

literatura são para matérias-primas e microrganismos diferentes dos aqui utilizados, e que os efeitos sinérgicos entre eles podem se tornar significativos, a destoxificação como etapa prévia aos ensaios com a bactéria se faz necessária para garantir que a última não seja prejudicada. A adsorção com  $C_{P6}$  apresentou melhores resultados, por remover eficientemente os compostos propostos e minimizar a perda de  $XOS_T$ , além de evitar tratamentos adicionais ao adsorvente, tornando a técnica mais atrativa economicamente.

**Figura 24.** Limites inibitórios e concentrações de ácido acético, 5-HMF, furfural e compostos fenólicos presentes no  $LB_{RE}$ , LD com  $C_{P6}$



### 5.3. Hidrólise enzimática

A redução da massa molar, e conseqüentemente, do grau de polimerização do polissacarídeo em cadeias menores, pode ser atingida por catálise enzimática pelo emprego das enzimas xilanases. A variação da relação entre a dosagem enzimática pelo volume de LD foi avaliada após 24 e 48 horas de incubação visando maximizar a conversão dos  $XOS$  com alto GP em  $XOS_{2-3}$ . O LD apresentava 7,8 g/L de  $XOS_T$ , sendo 0,57 g/L de  $XOS_{2-3}$  e 0,85 g/L de  $XOS_{4-5}$ , e 1,30 g/L do monômero de xilose. A Tabela 8

apresenta os resultados obtidos após os ensaios enzimáticos empregando-se três razões de volumes de enzima comercial e volume de substrato. A resposta buscada neste estudo foi a concentração de XOS<sub>2-3</sub>, já que são açúcares reconhecidos como prebióticos qualificados pela facilidade de serem mais consumidos pelos microrganismos.

**Tabela 8.** Relação enzima/substrato e concentrações de XOS<sub>2-3</sub> e XOS<sub>4-5</sub> nos hidrolisados após hidrólise enzimática durante 24 e 48 horas.

Ensaio	Enzima/Substrato (v/v)	24 horas		48 horas	
		X2+X3 (g/L)	X4+X5 (g/L)	X2+X3 (g/L)	X4+X5 (g/L)
1	0,02	0,90 ± 0,01	1,23 ± 0,02	0,96 ± 0,01	1,30 ± 0,01
2	0,04	1,05 ± 0,01	1,25 ± 0,01	1,19 ± 0,01	1,29 ± 0,02
3	0,06	1,01 ± 0,01	1,19 ± 0,02	1,23 ± 0,01	1,32 ± 0,01

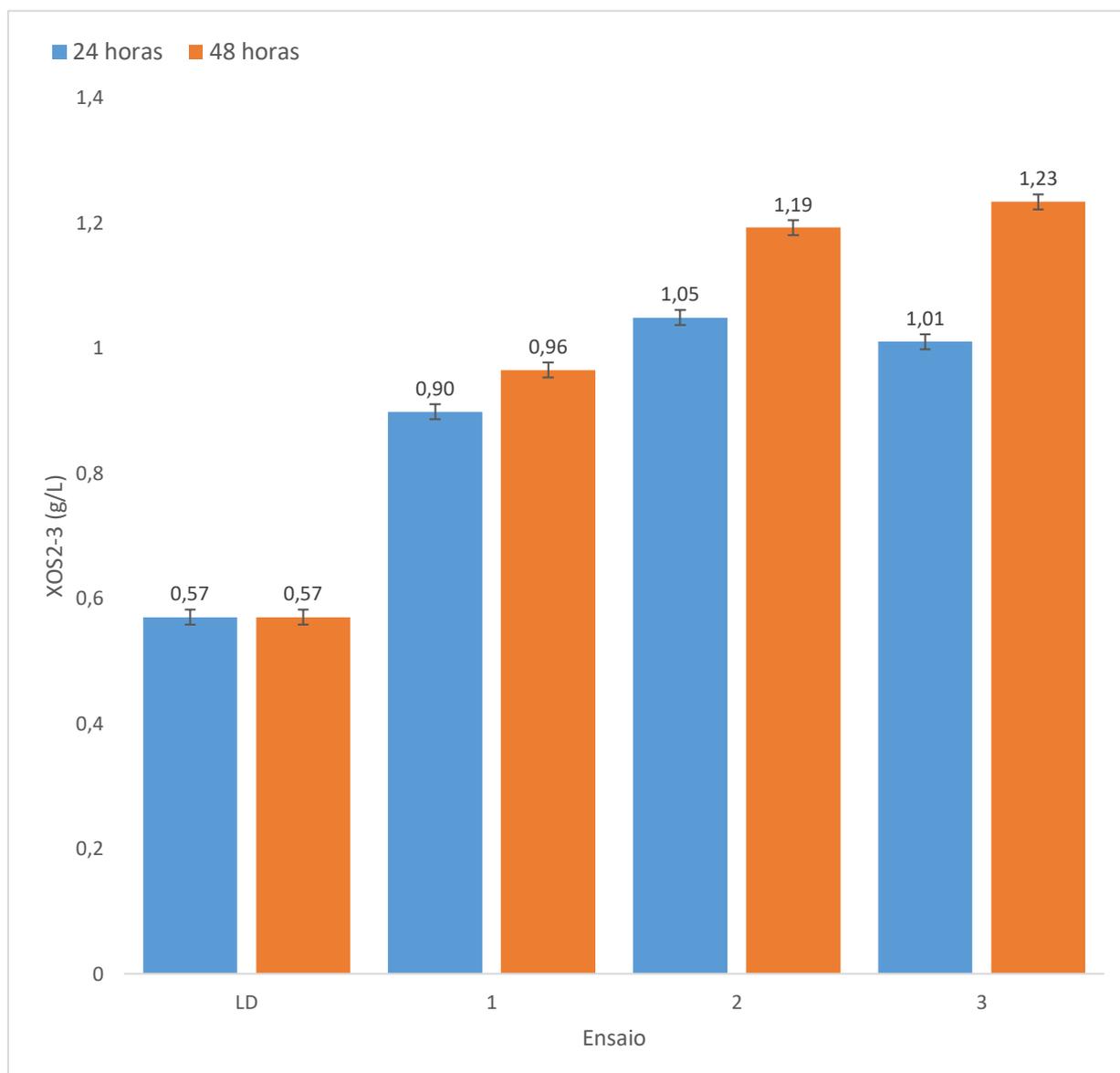
Observa-se que, tanto para 24 horas quanto para 48 horas, a menor razão enzima/substrato gerou baixas conversões de XOS<sub>2-3</sub>, sendo de apenas 56,9% e 68,6% após 24 e 48 horas, respectivamente, relação ao licor de entrada. Conforme os fundamentos de cinética da hidrólise enzimática, o aumento da dosagem da enzima no meio reacional, ou da quantidade de substrato, leva ao aumento da velocidade da reação para converter o substrato no produto de interesse (BAILEY; OLLIS, 1986; SHULER; KARGI, 2002).

Durante as primeiras 24 horas, nota-se que as condições empregadas no ensaio 2 apresentaram maiores concentrações de XOS<sub>2-3</sub> e XOS<sub>4-5</sub> em relação às do ensaio 3, indicando que a enzima atingiu seu limite efetivo, já que o aumento da quantidade de enzima no meio não influenciou nos resultados. Já após 48 horas, o maior tempo de contato da enzima com o substrato proporcionou maiores concentrações dos oligômeros no geral. Os XOS<sub>2-3</sub> e XOS<sub>4-5</sub> aumentaram 108,3% e 51,9%, respectivamente, para o ensaio 2, e em 115,5% e 55,8% para o ensaio 3, na devida ordem em relação ao LD, como o esperado (Figura 25).

Observa-se também, que a hidrólise enzimática converteu as maiores cadeias de XOS principalmente em XOS<sub>2-3</sub> em relação aos XOS<sub>4-5</sub>. Esses resultados estão de acordo com a literatura, pois a enzima  $\beta$ -1,4-xilanase (GH11) hidrolisa as ligações glicosídicas ao longo das cadeias em um mecanismo de clivagem aleatória, sendo que é esperado que sua atividade diminua conforme aumente o tamanho da cadeia, sem gerar menores

quantidades de monômeros (LI et al., 2021; SAKA; BAE, 2016).

**Figura 25.** Concentrações de XOS<sub>2-3</sub> resultantes dos ensaios de hidrólise enzimática.



O ensaio 3 após 48 horas apresentou o melhor resultado e foi selecionado para o preparo do hidrolisado utilizado para o crescimento da bactéria. Sua condição de maior relação enzima/substrato (v/v) correspondia a 6,3% de LD e 110 U/g<sub>XOS</sub> de enzima, e foi validada em triplicata, conforme Tabela 9. As concentrações de XOS<sub>4-5</sub> e xilose atingiram valores de 1,27 g/L e 1,39 g/L neste ponto, representando um aumento de 49,8% e 6,7% em relação as concentrações iniciais, ficando evidente que as cadeias longas de oligossacarídeos foram degradadas principalmente em XOS<sub>2-3</sub> durante a hidrólise enzimática.

**Tabela 9.** Valores de  $XOS_{2-3}$  para os ensaios de validação da hidrólise enzimática com 6,3% de LD e 110 U/g $_{XOS}$  de enzima xilanase.

Ensaio de validação	Concentração (g/L)
	X2+X3
1	1,25
2	1,22
3	1,17
Média	1,21 ± 0,04

#### 5.4. Efeito dos $XOS_{2-3}$ na bactéria *S. xylosus*

Xilooligossacarídeos com GP 2 e 3 são reconhecidos como carboidratos qualificados para fornecer substratos às culturas bacterianas benéficas do ser humano (ÁVILA et al., 2020b; LIAN et al., 2020). Por possuírem tamanho adequado, os  $XOS_{2-3}$  podem estimular o crescimento seletivo de bactérias favoráveis à saúde do hospedeiro, auxiliando na manutenção e restauração da microbiota humana (KRUTMANN, 2009). O consumo de X2 e X3 e o crescimento da bactéria verificaram a eficácia da hidrólise enzimática e da remoção dos compostos inibidores por adsorção com carvão ativado aplicadas ao LB<sub>RE</sub>.

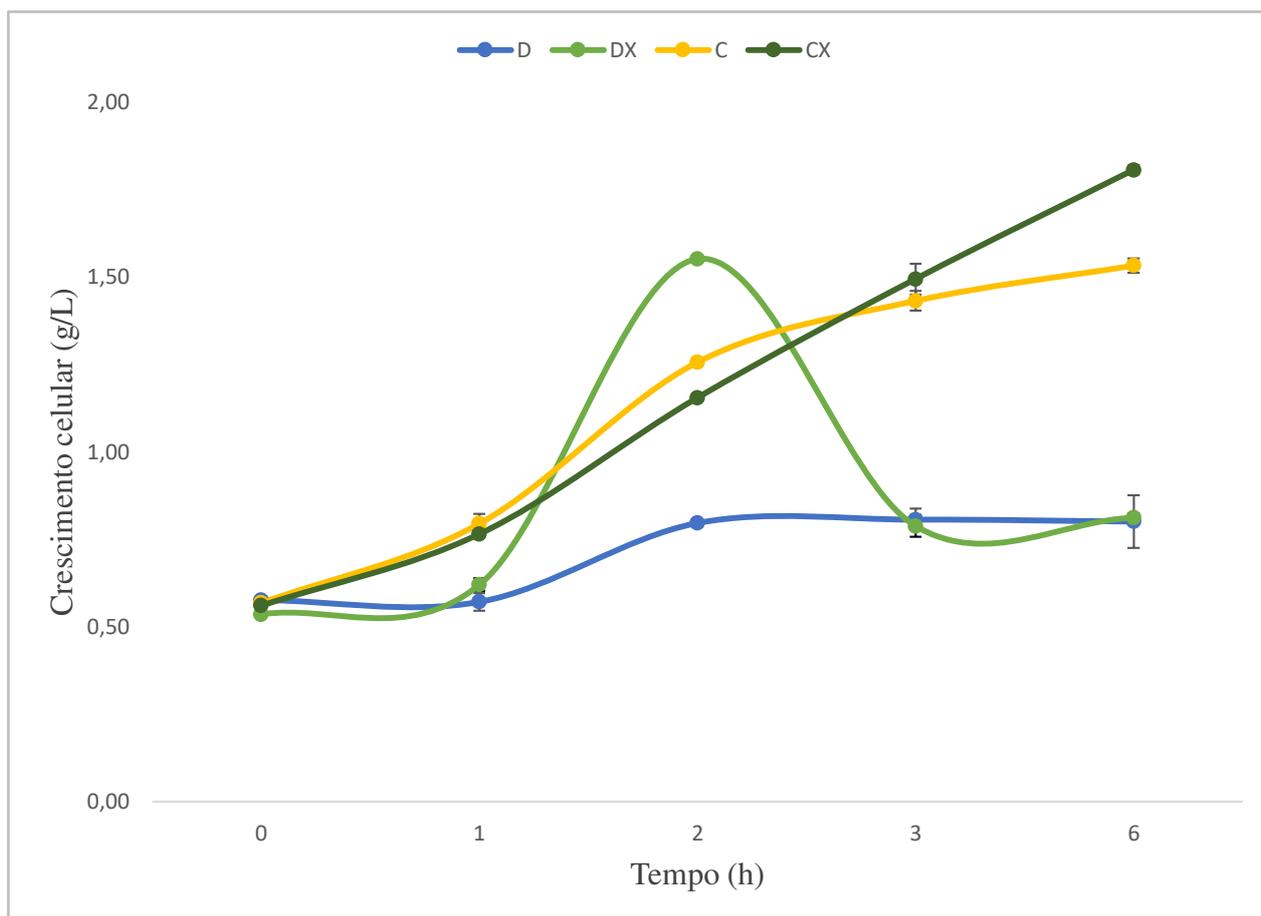
Ensaio para avaliar o efeito dos  $XOS_{2-3}$  no crescimento da *S. xylosus* foram feitos em diferentes meios de culturas. A Tabela 10 apresenta as composições dos meios de duas formas: a primeira considera as concentrações basais totais dos componentes em cada meio, e a segunda apenas a concentração de carbono ( $C_{\text{Carbono}}$ ), em g/L, de cada componente, calculado a partir da fração mássica de carbono em cada um (FARFAN, 1994). Para avaliar efetivamente o crescimento da *S. xylosus* pelo consumo de  $XOS_{2-3}$  é importante analisar quais são os nutrientes preferenciais da bactéria, os oligossacarídeos ou as fontes de carbono provenientes dos meios basais, já que estes são meios complexos e ricos em bons nutrientes. Para isso, foi calculado também a  $C_{\text{Carbono}}$  total em cada meio, a partir da soma de  $C_{\text{Carbono}}$  de cada componente, sendo, portanto, os meios basais ricos em nutrientes sem (meio C) e com  $XOS_{2-3}$  (meio CX), e os meios deficientes em nutrientes sem (meio D) e com  $XOS_{2-3}$  (DX).

**Tabela 10.** Concentrações totais e concentrações de carbono ( $C_{\text{carbono}}$ ) de cada componente para cada meio de cultura, sendo os meios ricos em nutrientes com  $XOS_{2-3}$  (meio CX) e sem  $XOS_{2-3}$  (meio C) e os deficientes em nutrientes com  $XOS_{2-3}$  (meio DX) e sem (meio D)  $XOS_{2-3}$ .

Componentes	Fração mássica de Carbono	Concentração (g/L)					
		Meios ricos em nutrientes			Meios deficientes em nutrientes		
		Meio C	Meio CX	$C_{\text{Carbono}}$	Meio D	Meio DX	$C_{\text{Carbono}}$
Extrato de Levedura	50%	2,00	2,00	1,00	0,50	0,50	0,25
Extrato de Carne	50%	1,00	1,00	0,50	0,25	0,25	0,13
Peptona	50%	5,00	5,00	2,50	1,25	1,25	0,62
$XOS_{2-3}$	43%	-	0,47	0,20	-	0,64	0,28
$C_{\text{Carbono}}$ total no meio (sem $XOS$ )				4,00			1,00
$C_{\text{Carbono}}$ total no meio (com $XOS$ )				4,20			1,28

A Figura 26 apresenta os perfis de crescimento durante 6 horas dos ensaios com a bactéria.

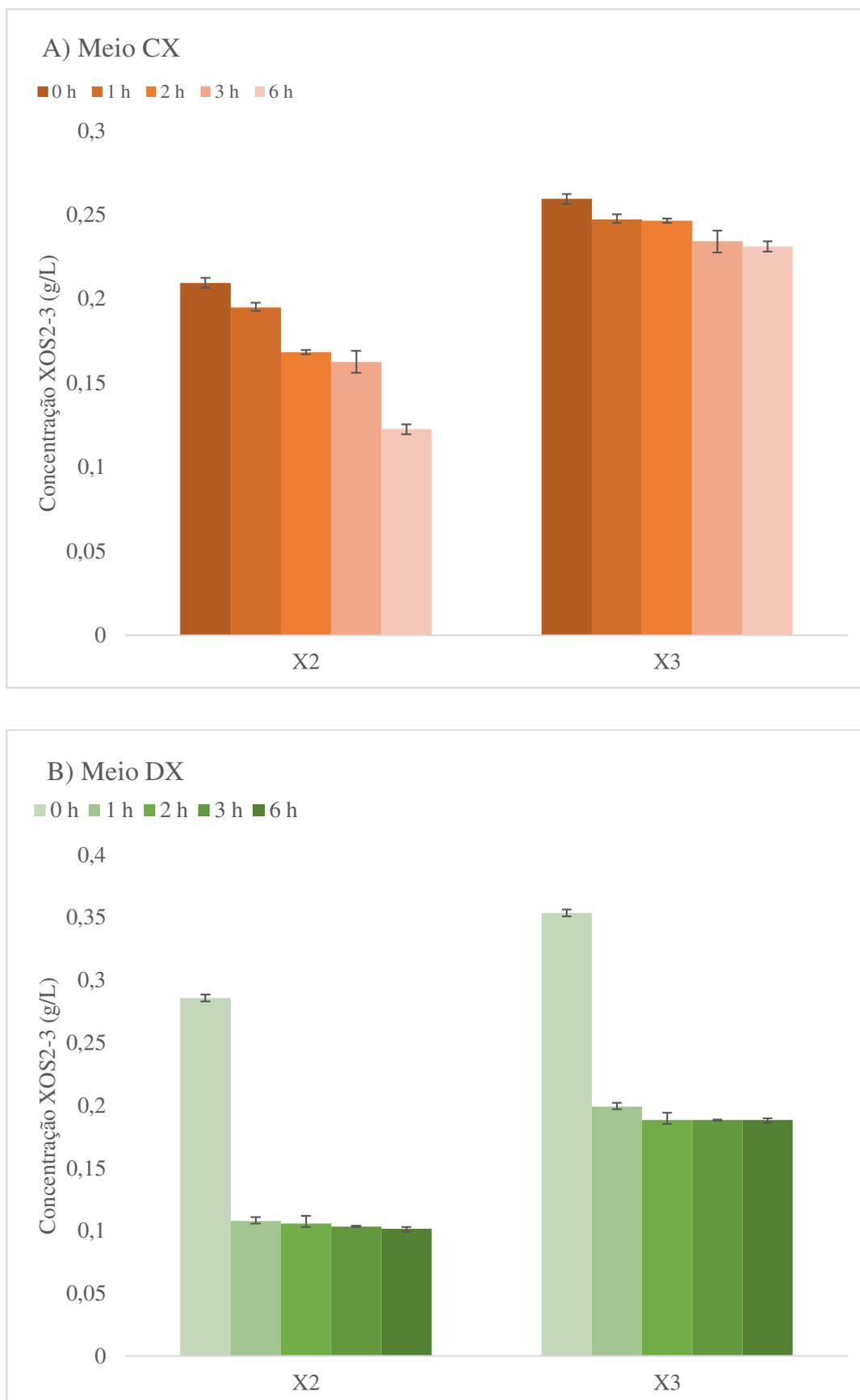
**Figura 26.** Concentração celular da bactéria *S. xylosus* para os meios C, CX, D e DX durante 6 horas de ensaios de crescimento.



No geral, após 6 horas de ensaio, observa-se que a alta disponibilidade de carbono do meio basal nos meios C e CX (4,00 g/L) levou ao crescimento contínuo bacteriano, diferentemente dos meios deficientes de nutrientes basais (1,00 g/L), em que a concentração celular diminuiu após duas horas de ensaio. Entretanto, para o tempo de 2 horas, destaca-se o máximo crescimento da bactéria no meio deficiente de nutrientes, porém acrescido de XOS<sub>2-3</sub> (meio DX). A incorporação de XOS<sub>2-3</sub> no meio basal escasso quase dobrou sua concentração celular em relação ao meio sem os oligossacarídeos, indo de 0,80 g/L (meio D) para 1,55 g/L (meio DX). Além disso, para o tempo de 2 horas, o crescimento do meio DX também superou os crescimentos da bactéria nos meios basais abundantes em nutrientes, os quais apresentaram 1,26 g/L (meio C) e 1,15 g/L (meio CX) de concentração celular, ficando notório, para esse intervalo, que a taxa de crescimento da *S. xylosus* foi maior o meio DX, seguido dos meios C, CX e D, na devida ordem.

A Figura 27 apresenta os perfis de consumos de X2 e X3 pela bactéria ao longo dos ensaios de crescimento.

**Figura 27.** Perfil de consumo de xilobiose (X2) e xilotriose (X3) pela bactéria *S. xylosus* durante 6 horas de ensaio para A) Meio CX e B) Meio DX



Ao longo das 6 horas de ensaio, a *S. xylosus* consumiu apenas 41,5% de X2 e de 10,9% de X3 no meio CX contra 64,4% e 46,8%, na devida ordem, para os mesmos oligossacarídeos no meio DX, ficando evidente que, para o meio basal rico em nutrientes, a bactéria consumiu primeiramente e preferencialmente, as fontes de carbono do meio basal em relação aos XOS<sub>2-3</sub>. Além disso, enquanto a bactéria consumiu gradualmente os oligômeros ao longo do tempo no meio CX, para o meio DX, o consumo foi feito bruscamente durante a primeira hora, o qual se correlaciona com o máximo crescimento após 2 horas de ensaio, como apresentado na Figura 26.

Em relação ao consumo dos oligossacarídeos para o tempo de 2 horas, quando os XOS<sub>2-3</sub> estavam mais acessíveis no meio, causado pela menor disponibilidade de nutrientes do meio basal escasso (meio DX), a bactéria consumiu cerca de 63,0% de X2 e de 46,0% de X3 e apenas 19,6% e 5,0%, respectivamente, para os meios oligômeros no meio CX, indicando que os XOS<sub>2-3</sub> estimulam o crescimento de *S. xylosus*, já que o consumo dos oligossacarídeos permitiu que a bactéria crescesse mais em relação aos meios basais com altas concentrações de carbono.

Além dos parâmetros avaliados, a variação do pH do meio também pode ser considerada um indicador da atividade probiótica da bactéria. Muitos trabalhos revelam que a inibição de bactérias nocivas esteja relacionada principalmente com a competição entre bactérias benéficas e patogênicas (BARRETO; ZANCAN; MENEZES, 2015; ERIN CHEN; FISCHBACH; BELKAID, 2018; LEROY et al., 2020). A queda do pH é uma característica marcante do comportamento probiótico de culturas bacterianas devida a produção de ácidos metabólicos, como os ácidos graxos de cadeias curtas produzidos durante a fermentação, responsáveis por inibir o crescimento das bactérias patogênicas (BOONCHUAY et al., 2021; RATHAMAT et al., 2021). Entretanto, nesse estudo, foi observado o aumento do pH em todos os meios propostos, apresentado na Tabela 11.

**Tabela 11.** Valores de pH ao longo dos ensaios de crescimento da bactéria *S. xylosus* para os meios contendo XOS.

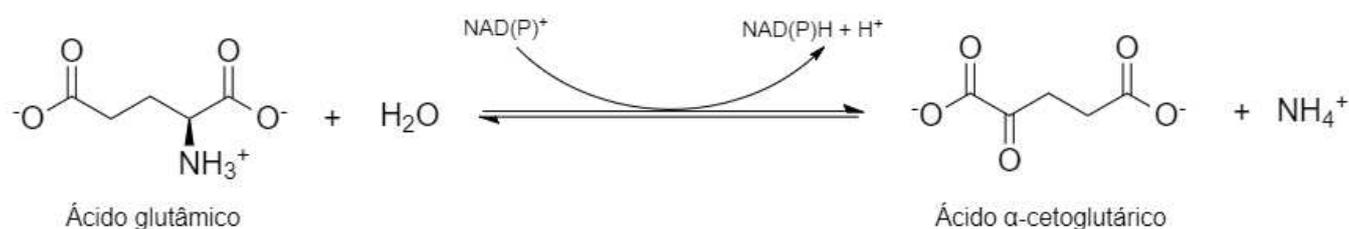
Tempo	Valores de pH	
	Meio CX	Meio DX
0 h	7,2	7,2
1 h	7,4	7,3
2 h	7,7	7,5
3 h	8,1	7,8
6 h	8,5	7,9

Em meios mais complexos compostos por extrato de carne, extrato de levedura e peptonas, formados principalmente por proteínas, o pH do meio tende a aumentar ao decorrer do tempo. As proteínas são formadas por unidades de aminoácidos, os quais se unem através de ligações peptídicas formadas por um grupo carboxila de um aminoácido e um grupo amina de outro aminoácido subsequente, sendo excelentes fontes tanto de carbono, quanto de nitrogênio (LEHNINGER et al., 2014).

A glicose é o carboidrato fornecedor de energia mais comum utilizado pelas células. Porém, os microrganismos também são capazes de catabolizar outros carboidratos, vários lipídeos e proteínas para produção de energia. Para que as bactérias consigam catabolizar proteínas, primeiramente, é necessária a ação de enzimas extracelulares para decompor as macromoléculas em aminoácidos. Em seguida, estes compostos devem ser convertidos em moléculas aceitas pelo ciclo de Krebs. Um dos mecanismos que ocorre durante a conversão dos aminoácidos na célula é a desaminação, em que o grupo amina do aminoácido é removido da molécula para que o hidrocarboneto entre no ciclo. Com a amônia liberada, ela é capaz de atrair um próton para formar íons amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) em solução, resultando no aumento do pH do meio (LEHNINGER et al., 2014; TORTORA, 2017). A partir disso, nota-se também que neste trabalho, o pH do meio CX apresentou maior valor final em relação ao meio diluído DX, por possuir maiores concentrações dos nutrientes complexos.

Para exemplificar, Figura 28 representa a reação de desaminação do ácido glutâmico, um aminoácido presente no extrato de levedura (SILVA et al., 2009).

**Figura 28.** Reação de desaminação do ácido glutâmico



Fonte: Adaptado de Marzzoco et al., (1999).

Pesquisas estabeleceram que os prebióticos melhoram efetivamente a resposta imune, resistências e comunidades da microbiota intestinal em humanos. Como exemplo, estudos feitos por Gupta et al., (2022) mostraram que as cepas probióticas *Lactiplantibacillus plantarum* foram capazes de consumir os XOS como única fonte de carbono e exibiram um alto potencial inibitório (30 a 80%) contra outras bactérias como *S. aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteu*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Jagtap et al., (2017) também mostraram que seis das dez culturas probióticas da microflora intestinal foram capazes de utilizar XOS produzido a partir de resíduos agrícolas e apresentou notável crescimento nos meios contendo XOS como única fonte de carbono.

Em relação a microflora da pele, pesquisas com propósitos semelhantes foram feitas por Hoseinifar et al., (2014) em peixes brancos do Cáspio, em que a suplementação da alimentação com 3% de XOS como prebiótico promoveu a atividade antimicrobiana contra espécies de *Streptococcus faecium*, *Serratia Marcescens* e *E. coli*, atuando na prevenção de infecções da mucosa cutânea, sendo uma alternativa ecológica para aumentar a resistência dos peixes do estudo. Além disso, outros oligossacarídeos similares não digeríveis possuem atividade prebiótica comprovada para bactérias do mesmo gênero da microbiota cutânea, como os galactooligosacarídeos (GOS). Petrov et al., (2022) mostraram o efeito prebiótico de GOS através da influência no crescimento da bactéria residente *Staphylococcus epidermidis* contra a patogênica *S. aureus* tanto em caldo nutritivo quanto em formulações cosméticas a 5%.

As referências citadas acima demonstram a atuação dos XOS como prebióticos. Sendo assim, considerando os resultados de crescimento celular e consumo dos XOS

obtidos nessa pesquisa, tem-se que os XOS oriundos dos resíduos de eucalipto apresentam grande potencial prebiótico para a microflora da pele, embora sua aplicação tópica seja ainda insuficientemente investigada, especialmente para a bactéria *S. xylosus*. Apesar deste estudo não ter testado a ação prebiótica dos XOS formados pela incorporação em formulações cosméticas devido às limitações causadas pela pandemia, esses resultados ampliam os conhecimentos sobre essa aplicação em potenciais bactérias probióticas da pele, abrindo portas para novos estudos.

## 6. CONCLUSÃO

A integração entre a destoxificação por adsorção de carvão ativado e a hidrólise enzimática do LB<sub>RE</sub> resultou na formação de um licor com XOS<sub>2-3</sub> e com baixas concentrações de furfural, 5-HMF e lignina solúvel, sendo as três últimas concentrações inferiores a 0,001 g/L, ácido fórmico, 0,04 g/L, compostos fenólicos, 0,06 g/L, e ácido acético, 0,20 g/L. Apesar da carbonização do carvão ativado granulado, C<sub>G-CA</sub>, gerar um material eficaz para a remoção dos compostos nocivos, a melhor adsorção dos inibidores, neste trabalho, ocorreu com o carvão ativado em pó, pois além de evitar tratamentos prévios adicionais, gerou menores perdas de XOS na fase líquida e removeu efetivamente cerca de 99% dos compostos 5-HMF, furfural e lignina solúvel, aproximadamente 93% do ácido fórmico e compostos fenólicos e 55% do ácido acético. A hidrólise pela enzima endo-1,4-β-xilanase (GH11) permitiu o aumento de 112,2% na concentração de XOS<sub>2-3</sub>, atingindo o valor de 1,21 g/L no hidrolisado final, a partir das condições ótimas de 6,3% de LD e 110 U/g<sub>XOS</sub> de enzima com baixa produção de xilose. O consumo de 63,0% de X2 e de 46,0% de X3 pela bactéria em meio basal deficiente em fontes de carbono, mas enriquecido com os oligômeros, proporcionou maior crescimento celular em relação aos meios basais com alta composição de carbono, com e sem XOS<sub>2-3</sub>, após duas horas, revelando seu potencial prebiótico pelo efeito estimulante de crescimento. Com isso, este trabalho oferece uma abordagem que incentiva o uso das biomassas lignocelulósicas de eucalipto como fonte de prebióticos para a formulação de produtos com valores agregados para aplicações industriais.

## 7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para expandir e dar continuidade aos estudos que envolvem a aplicação prebiótica dos XOS provenientes de licor bruto de galhos de eucalipto residuais, algumas ideias são sugeridas:

- Avaliar o efeito da temperatura, massa de carvão ativado e o tempo de adsorção sob a remoção do ácido acético no licor bruto.

- Determinar os limites inibitórios dos compostos 5-HMF, furfural, ácidos orgânicos, compostos fenólicos e lignina solúvel para a bactéria *S. xylosus*, bem como os efeitos sinérgicos entre si;

- Avaliar o consumo dos XOS<sub>2-3</sub> e o crescimento da bactéria *S. xylosus* em meios de crescimento menos complexos contendo uma bactéria patogênica, como a *S. aureus*, para observar e estudar os mecanismos pro bióticos.

- Variar as concentrações iniciais de XOS em meio de crescimento apropriado para determinar uma faixa de concentração adequada para incorporação e aplicações em cosméticos;

- Efetuar testes prebióticos em cosméticos.

## 8. REFERÊNCIAS

ABDUL MANAF, S. F. et al. Sequential detoxification of oil palm fronds hydrolysate with coconut shell activated charcoal and pH controlled in bioreactor for xylitol production. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 179, p. 90–106, 1 mar. 2022.

ADEKOLA, F. A.; OBA, I. A. Biosorption of formic and acetic acids from aqueous solution using activated carbon from shea butter seed shells. **Applied Water Science**, v. 7, n. 6, p. 2727–2736, 28 out. 2016.

AHMAD, N.; ZAKARIA, M. R. Oligosaccharide from hemicellulose. **Lignocellulose for Future Bioeconomy**, p. 135–152, 2019.

AHMEDNA, M.; MARSHALL, W. E.; RAO, R. M. Granular Activated Carbons From Agricultural By-Products : Preparation , Properties , and Application in Cane Sugar Refining. **Methods**, v. 71, n. 869, p. 15–17, 2000.

ALVES, L. A. et al. Pretreatment of sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology**, v. 70–72, p. 89–98, 1998.

AMORIM, C. et al. From lignocellulosic residues to market: Production and commercial potential of xylooligosaccharides. **Biotechnology Advances**, v. 37, n. 7, p. 107397, 2019.

ANTUNES, F. A. F. et al. Repeated batches as a feasible industrial process for hemicellulosic ethanol production from sugarcane bagasse by using immobilized yeast cells. **Cellulose**, v. 26, n. 6, p. 3787–3800, 2019.

ANTUNES, F. A. F. et al. Multi-scale study of the integrated use of the carbohydrate fractions of sugarcane bagasse for ethanol and xylitol production. **Renewable Energy**, v. 163, p. 1343–1355, 2021.

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.

ARRUDA, P. V. Efeito da destoxificação do hidrolisado de bagaço de cana sobre a remoção de fenóis, a perda de açúcares e a bioconversão de xilose em xilitol. **Nucleus**, v. 5, n. 1, p. 166–182, 2008.

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, n. October 2019, 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, n. May, p. 1–9, 2020b.

ÁVILA, P. F.; MARTINS, M.; GOLDBECK, R. Enzymatic Production of Xylooligosaccharides from Alkali-Solubilized Arabinoxylan from Sugarcane Straw and Coffee Husk. **Bioenergy Research**, 2020.

BANSAL, R. C.; GOYAL, M. Activated Carbon Adsorption. **Boca Raton, CRC Press**, 2005.

BARBOSA, N. P.; CONCEIÇÃO, E. C. DA. Aproveitamento de Resíduos Industriais de Alimentos com Potencial Aplicação em Cosméticos Naturais. **Revista Processos Químicos**, v. 10, n. 20, p. 127–131, 2016.

BARRETO, A. R.; ZANCAN, L. R.; MENEZES, C. R. DE. Obtenção De Xilooligossacarídeos Por Resíduos Lignocelulósicos: Alternativa Para Produção De Compostos Funcionais Para Alimentos. **Obtenção de xilooligossacarídeos por resíduos lignocelulósicos: alternativa para produção de compostos funcionais para alimentos**, v. 19, n. 3, p. 821–836, 2015.

BASAK, B. et al. Dark fermentative hydrogen production from pretreated lignocellulosic biomass: Effects of inhibitory byproducts and recent trends in mitigation strategies. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 133, n. September, p. 110338, 2020.

BAILEY, J.; OLLIS, D. Biochemical Engineering Fundamentals. 2nd Edition, **McGraw-Hill**, New Delhi, 1986.

BECKER, K.; HEILMANN, C.; PETERS, G. Coagulase-negative staphylococci. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 4, p. 870–926, 2014.

BOONCHUAY, P. et al. Prebiotic properties, antioxidant activity, and acute oral toxicity of xylooligosaccharides derived enzymatically from corncob. **Food Bioscience**, v. 40, n. December 2020, p. 100895, 2021.

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. March, p. 123637, 2020.

BRENELLI, L. B. et al. Xylo-oligosaccharides, fermentable sugars, and bioenergy production from sugarcane straw using steam explosion pretreatment at pilot-scale. **Bioresource Technology**, p. 127093, 2022.

BYRD, A. L.; BELKAID, Y.; SEGRE, J. A. The human skin microbiome. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 3, p. 143–155, 2018.

Caderno de Tendências 2019-2020. **ABIHPEC e SEBRAE**, 2018. Disponível em: <<https://www.sebrae.com.br/Sebrae/Portal%20Sebrae/Anexos/CADERNO%20DE%20TENDENCIAS%202019-2020%20Sebrae%20Abihpec%20vs%20final.pdf>>. Acesso em 18/06/2022.

CAO, R.; XU, Y. Efficient Preparation of Xylonic Acid from Xylonate Fermentation Broth by Bipolar Membrane Electrodialysis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 187, n. 1, p. 396–406, 15 jan. 2019.

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.

CEBREIROS, F. et al. Integrated valorization of eucalyptus sawdust within a biorefinery approach by autohydrolysis and organosolv pretreatments. **Renewable Energy**, v. 149, p. 115–127, 1 abr. 2020.

CHANDRA, R. P. et al. Substrate pretreatment: The key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics? **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 108, n. May, p. 67–93, 2007.

CHEN, H. *Biotechnology of lignocellulose: Theory and practice*. Springer Netherlands, 2014.

CHEN, M. et al. Novel process for the coproduction of xylo-oligosaccharide and glucose from reed scraps of reed pulp mill. **Carbohydrate Polymers**, v. 215, n. December 2018, p. 82–89, 2019.

COLLINS, M. D.; GIBSON, G. R. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: Approaches for modulating the microbial ecology of the gut. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 69, n. 5, p. 1052–1057, 1999.

CONESSA, S. et al. Xilanases microbianas e suas aplicações industriais. 2021.

COSTA-TRIGO, I. et al. Detoxification of chestnut burrs hydrolyzates to produce biomolecules. **Biochemical Engineering Journal**, v. 159, n. January, p. 107599, 2020.

DA SILVA MORAIS, A. P.; SANSÍGOLO, C. A.; DE OLIVEIRA NETO, M. Effects of autohydrolysis of *Eucalyptus urograndis* and *Eucalyptus grandis* on influence of chemical components and crystallinity index. **Bioresource Technology**, v. 214, p. 623–628, 2016.

DE FREITAS, C.; CARMONA, E.; BRIENZO, M. Xylooligosaccharides production process from lignocellulosic biomass and bioactive effects. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 18, n. March 2018, p. 100184, 2019.

DO NASCIMENTO, B. F. et al. Detoxification of sisal bagasse hydrolysate using activated carbon produced from the gasification of açai waste. **Journal of Hazardous Materials**, v. 409, n. August 2020, 2020.

DONOHUE, M. D.; ARANOVICH, G. L. A New Classification of Isotherms for Gibbs Adsorption of Gases on Solids. **Fluid Phase Equilibria**, v. 160, n. 557, 1999.

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.

EGERT, M.; SIMMERING, R.; RIEDEL, C. U. The Association of the Skin Microbiota With Health, Immunity, and Disease. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 102, n. 1, p. 62–69, 1 jul. 2017.

ERIN CHEN, Y.; FISCHBACH, M. A.; BELKAID, Y. Skin microbiota-host interactions. **Nature**, v. 553, n. 7689, p. 427–436, 2018.

EVSTIGNEYEV, E. I.; SHEVCHENKO, S. M. **Structure, chemical reactivity and solubility of lignin: a fresh look**. [s.l.] Springer Berlin Heidelberg, 2019. v. 53

FARFAN, J. A. Química de proteínas: aplicada à ciência e tecnologia dos alimentos. 2º Ed. Campinas, SP. **Editora da Unicamp**, 1994.

FARÍAS, M. M.; KOLBACH, M. Prebiotics and probiotics: Is there a real benefit in dermatology? **Piel**, v. 26, n. 5, p. 227–230, 2011.

FOELKEL, C. Resíduos industriais do processo de fabricação de celulose e papel de Eucalipto. Parte 02: Fatores de sucesso para seu gerenciamento. **Eucalyptus Online Book e Newsletter**, 2008.

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**, 2010.

FUNDAÇÃO ANDRÉ TOSELLO (FAT) - Catálogo de culturas online. Disponível em: <<https://fat.org.br/catalogo-de-culturas-online/>>. Acesso em: 18/12/2020.

GARCÍA-RUIZ, A. et al. Potential of phenolic compounds for controlling lactic acid bacteria growth in wine. **Food Control**, v. 19, n. 9, p. 835–841, 2008.

GE, L. et al. An analysis of the carbonization process and volatile-release characteristics of coal-based activated carbon. **Energy**, v. 257, p. 124779, 15 out. 2022.

GIBSON, G. R. et al. The international Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. **Nature reviews, Gastroenterology and Hepatology**, v. 14, p. 491- 501, 2017.

GRICE, E. A.; PROFESSOR, A.; CUTAN MED SURG AUTHOR MANUSCRIPT, S. The skin microbiome: potential for novel diagnostic and therapeutic approaches to cutaneous disease HHS Public Access Author manuscript. **Biomedical Research Building**, v. 33, n. 2, p. 98–103, 2014.

GUPTA, M. et al. Bioprocess development for production of xylooligosaccharides prebiotics from sugarcane bagasse with high bioactivity potential. **Industrial Crops and Products**, v. 178, n. October 2021, p. 114591, 2022.

HEYLMANN, K. K. A. et al. Produção, caracterização e aplicação de carvão ativado de caroço de pêssego no tratamento de efluente têxtil. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 26, n. 3, p. 485–494, 14 jun. 2021.

HORVATH, A. L. Solubility of structurally complicated materials: I. Wood. **Journal of Physical and Chemical Reference Data**, v. 35, n. 1, p. 77–92, 2006.

HOSEINIFAR, S. H. et al. The effects of dietary xylooligosaccharide on mucosal parameters, intestinal microbiota and morphology and growth performance of Caspian white fish (*Rutilus frisii kutum*) fry. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 39, n. 2, p. 231–236, 1 ago. 2014.

HON, D. N. S. Cellulose: a random walk along its historical path. **Cellulose**, v.1, p. 1-25,

1994.

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.

INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES (IBÁ) - Relatório anual, 2019. Disponível em: <<https://iba.org/datafiles/publicacoes/relatorios/iba-relatorioanual2019.pdf>>. Acesso em: <21/10/2020>.

INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES (IBÁ) - Relatório anual, 2021. Disponível em: <[https://iba.org/datafiles/publicacoes/relatorios/relatorioiba2021-compactado.pdf?utm\\_source=akna&utm\\_medium=email&utm\\_campaign=Iba-lanca-Relatorio-Anual-2021](https://iba.org/datafiles/publicacoes/relatorios/relatorioiba2021-compactado.pdf?utm_source=akna&utm_medium=email&utm_campaign=Iba-lanca-Relatorio-Anual-2021)>. Acesso em: <18/07/2022>.

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. July, p. 283–288, 2017.

JAIN, I.; KUMAR, V.; SATYANARAYANA, T. Xylooligosaccharides: An economical prebiotic from agroresidues and their health benefits. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 53, n. 3, p. 131–142, 2015.

JIA, H. et al. Evaluation of xylitol production using corncob hemicellulosic hydrolysate by combining tetrabutylammonium hydroxide extraction with dilute acid hydrolysis. **Carbohydrate Polymers**, v. 151, p. 676–683, 2016.

KALIM, B. et al. Xylanases—from Microbial Origin to Industrial Application. **British Biotechnology Journal**, v. 7, n. 1, p. 1–20, 2015.

KRUTMANN, J. Pre- and probiotics for human skin. **Journal of Dermatological Science**, v. 54, n. 1, p. 1–5, 2009.

KULKARNI, N., SHENDYE, A., RAO, M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **FEMS Microbiol. Rev.** 23, 411–456, 1999.

LEE, Y. H.; VERMA, N. K.; THANABALU, T. Prebiotics in atopic dermatitis prevention and management. **Journal of Functional Foods**, v. 78, p. 104352, 1 mar. 2021.

LEHNINGER, T. M., NELSON, D. L. & COX, M. M. Princípios de Bioquímica. 6ª Edição, Ed. Artmed, 2014.

LEROY, S. et al. Interaction in dual species biofilms between *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 326, n. May, p. 108653, 2020.

LI, Q. et al. Co-production of Xylooligosaccharides and Xylose From Poplar Sawdust by Recombinant Endo-1,4- $\beta$ -Xylanase and  $\beta$ -Xylosidase Mixture Hydrolysis. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, n. February, 2021.

LIAN, Z. et al. An integrated process to produce prebiotic xylooligosaccharides by

autohydrolysis, nanofiltration and endo-xylanase from alkali-extracted xylan. **Bioresource Technology**, v. 314, n. 159, p. 123685, 2020.

LU, C.; DONG, J.; YANG, S. T. Butanol production from wood pulping hydrolysate in an integrated fermentation-gas stripping process. **Bioresource Technology**, v. 143, p. 467–475, 2013.

MA, X. X. et al. Antibiotic susceptibility of coagulase-negative staphylococci (CoNS): Emergence of teicoplanin non-susceptible CoNS strains with inducible resistance to vancomycin. **Journal of Medical Microbiology**, v. 60, n. 11, p. 1661–1668, 2011.

MALUNGA, L. N.; BETA, T. Antioxidant capacity of arabinoxylan oligosaccharide fractions prepared from wheat aleurone using *Trichoderma viride* or *Neocallimastix patriciarum* xylanase. **Food Chemistry**, v. 167, p. 311–319, 15 jan. 2015.

MARTINEZ, A. et al. Detoxification of dilute acid hydrolysates of lignocellulose with lime. **Biotechnology Progress**, v. 17, p. 287–293, 2001.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analyt. Chem.** 31 (3), p. 426–428, 1959.

MISRA, S.; RAGHUWANSHI, S.; SAXENA, R. K. Evaluation of corncob hemicellulosic hydrolysate for xylitol production by adapted strain of *Candida tropicalis*. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 2, p. 1596–1601, 2013.

MOHAN, D., PITTMAN Jr., C.U., STEELE, P. H. Pyrolysis of Wood/Biomass for Bio-Oil: A Critical Review. **Energy Fuels**, v. 20, p. 848–889, 2006.

MORENO-CASTILLA, C. Adsorption of organic molecules from aqueous solutions on carbon materials. **Carbon**, v. 42, n. 1, p. 83–94, 2004.

MOSIER, N. et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 6, p. 673–686, 2005.

MOZAMMEL, H. M.; MASAHIRO, O.; BHATTACHARYA, S. C. Activated charcoal from coconut shell using ZnCl<sub>2</sub> activation. **Biomass and Bioenergy**, v. 22, n. 5, p. 397–400, 2002.

MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Avaliação de diferentes tipos de carvão ativo na destoxificação de hidrolisado de palha de arroz para produção de xilitol. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 1, p. 94–100, 2004a.

MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review. **Bioresource Technology**, v. 93, n. 1, p. 1–10, 1 maio 2004b.

NASCIMENTO, R. F. et al. Adsorção: Aspectos teóricos e aplicações ambientais. **Imprensa Universitária da Universidade Federal do Ceará (UFC)**, 2014.

NETHAJI, S.; SIVASAMY, A.; MANDAL, A. B. Adsorption isotherms, kinetics and mechanism for the adsorption of cationic and anionic dyes onto carbonaceous particles prepared from *Juglans regia* shell biomass. **International Journal of Environmental**

**Science and Technology**, v. 10, n. 2, p. 231–242, 2013.

National Institute Of Technology Srinagar (NITS). Activated Carbon. 2020.

O'DWYER, J. P. et al. Enzymatic hydrolysis of lime-pretreated corn stover and investigation of the HCH-1 Model: Inhibition pattern, degree of inhibition, validity of simplified HCH-1 Model. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 16, p. 2969–2977, 2007.

OLIVEIRA, E. B.; JÚNIOR, J. E. P. O Eucalipto e a Embrapa. **EMBRAPA**. Brasília - DF, 2021.

OMACHI, I. et al. Produção de biomassa florestal para exportação: O caso da Amcel. **Revista Biomassa & Energia**, v 1, n.1, jan/mar, Viçosa - MG, p. 29 - 36, 2004.

OTIENO, D. O.; AHRING, B. K. A thermochemical pretreatment process to produce xylooligosaccharides (XOS), arabinooligosaccharides (AOS) and mannoooligosaccharides (MOS) from lignocellulosic biomasses. **Bioresource Technology**, v. 112, p. 285–292, 2012.

PAËS, G.; BERRIN, J. G.; BEAUGRAND, J. GH11 xylanases: Structure/function/properties relationships and applications. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 3, p. 564–592, 1 maio 2012.

PANIAGUA-GARCÍA, A. I. et al. Biomass and Bioenergy Enzymatic hydrolysis and detoxification of lignocellulosic biomass are not always necessary for ABE fermentation: The case of Panicum virgatum. **Biomass and Bioenergy**, v. 116, n. January, p. 131–139, 2018.

PETROV, A. et al. Prebiotic effect of galacto-oligosaccharides on the skin microbiota and determination of their diffusion properties. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 00, p. 1–11, 13 maio 2022.

PETROVA, P.; PETROV, K. Prebiotic–Probiotic Relationship: The Genetic Fundamentals of Polysaccharides Conversion by Bifidobacterium and Lactobacillus Genera. **Food Bioconversion**, v. 2, p. 237–278, 1 jan. 2017.

PINO, M. S. et al. Bioreactor design for enzymatic hydrolysis of biomass under the biorefinery concept. **Chemical Engineering Journal**, v. 347, p. 119–136, 1 set. 2018.

POLETTI, P. et al. Xylooligosaccharides: Transforming the lignocellulosic biomasses into valuable 5-carbon sugar prebiotics. **Process Biochemistry**, v. 91, n. December 2019, p. 352–363, 2020.

POLIZELI, M. L. T. M. et al. Xylanases from fungi: Properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, n. 5, p. 577–591, 2005.

QIAN, S. et al. Evaluation of an efficient fed-batch enzymatic hydrolysis strategy to improve production of functional xylooligosaccharides from maize straws. **Industrial Crops and Products**, v. 157, n. September, p. 112920, 2020.

RAMOS, P. H. et al. Production and characterization of activated carbon prepared from pva defect coffee. **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1139–1143, 2009.

RATHAMAT, Z. et al. Two-step isolation of hemicellulose from oil palm empty fruit bunch fibers and its use in production of xylooligosaccharide prebiotic. **Industrial Crops and Products**, v. 160, n. November, p. 113124, 2021.

ROCHA, G.J.M.; GONÇALVES, A.R.; OLIVEIRA, B.R.; OLIVARES, E.G.; ROSSELL, C.E.V. Steam explosion pretreatment reproduction and alkaline delignification reactions performed on a pilot scale with sugarcane bagasse for bioethanol production. **Ind. Crops Prod.** 35, 274–279, 2012.

SAKA, S.; BAE, H. J. Secondary Xylem for Bioconversion. **Elsevier Inc.**, chapter 11, p. 213-231, 2016.

SANTIBÁÑEZ, L. et al. Xylooligosaccharides from lignocellulosic biomass: A comprehensive review. **Carbohydrate Polymers**, v. 251, n. July 2020, 2021.

SANTOS, F. A. et al. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, v. 35, n. 5, p. 1004–1010, 2012.

SARAWAN, C. et al. Optimized activated charcoal detoxification of acid-pretreated lignocellulosic substrate and assessment for bioethanol production. **Bioresource Technology**, v. 286, n. March, p. 121403, 2019.

SEITÉ, S.; ZELENKOVA, H.; MARTIN, R. Clinical efficacy of emollients in atopic dermatitis patients - relationship with the skin microbiota modification. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, v. 10, p. 25–33, 2017.

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.

SHULER, L. M.; KARGI, F. Bioprocess engineering: Basic concepts. **Prentice Hall PTR**, 2<sup>o</sup>Ed, 2002.

SILVA, V. K. et al. Digestibilidade do extrato de leveduras em frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. 10, p. 1969–1973, out. 2009.

SLUITER, A. et al. Determination of Sugars, Byproducts, and Degradation Products in Liquid Fraction Process Samples: Laboratory Analytical Procedure (LAP); Issue Date: 12/08/2006. 2006.

STAVROPOULOU, D. A. et al. Pervasiveness of *Staphylococcus carnosus* over *Staphylococcus xylosus* is affected by the level of acidification within a conventional meat starter culture set-up. **International Journal of Food Microbiology**, v. 274, n. December 2017, p. 60–66, 2018.

SUJIONO, E. H. et al. Fabrication and characterization of coconut shell activated carbon using variation chemical activation for wastewater treatment application. **Results in Chemistry**, v. 4, p. 100291, 2022.

TAMAYO-PENA, J.A; FELIX, T.C; PACHECO, L.C.A; BRENELLI, L.B; GONÇALVES, A.R; FRANCO, T.T. BBEST 2020-21 / BIOFUTURE SUMMIT II. São

Paulo, Dezembro, 2020.

THOMMES, M.; KANEKO, K.; NEIMARK, A.; OLIVIER, J.; RODRIGUEZ-REINOSO, F.; ROUQUEROL, J.; SING, K. Physisorption of gases, with special reference to the evaluation of surface area and pore size distribution (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 87, n. 9-10, p. 1051-1069, 2015.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C. L. Microbiologia. 12<sup>a</sup> Edição, Ed. Artmed, 2017.

TRAMONTINA, R. et al. Designing a cocktail containing redox enzymes to improve hemicellulosic hydrolysate fermentability by microorganisms. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 135, n. August 2019, p. 109490, 2020.

VAN ZYL, C.; PRIOR, B. A.; DU PREEZ, J. C. Acetic acid inhibition of d-xylose fermentation by *Pichia stipitis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 13, n. 1, p. 82–86, 1 jan. 1991.

VARGAS, D. P.; GIRALDO, L.; MORENO-PIRAJÁN, J. C. CO<sub>2</sub> adsorption on granular and monolith carbonaceous materials. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 96, p. 146–152, 2012.

VÁZQUEZ, M. J. et al. Xylooligosaccharides: Manufacture and applications. **Trends in Food Science and Technology**, v. 11, n. 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.

VO, D.-V. Recent advances and sustainable development of biofuels production from lignocellulosic biomass. **Bioresource technology**, p. 126203, 2021.

WAR, W. Activated carbon adsorption. **Environmental Science and Technology**, v. 29, n. 3, 1995.

WIKANDARI, R. et al. **Effect of Furfural, Hydroxymethylfurfural and Acetic Acid on Indigenous Microbial Isolate for Bioethanol Production** *Agricultural Journal*, 2010.

XU, J. Y. et al. Effect of ultrasonic time on the structural and physico-chemical properties of hemicelluloses from *Eucalyptus grandis*. **Carbohydrate Polymers**, v. 195, n. December 2017, p. 114–119, 2018.

YAGMUR, E.; OZMAK, M.; AKTAS, Z. A novel method for production of activated carbon from waste tea by chemical activation with microwave energy. **Fuel**, v. 87, n. 15–16, p. 3278–3285, 2008.

ZHANG, H.; HAN, L.; DONG, H. An insight to pretreatment, enzyme adsorption and enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: Experimental and modeling studies. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 140, p. 110758, 1 abr. 2021.

ZUBIETA, M. P. et al. Improvement of homologous GH10 xylanase production by

deletion of genes with predicted function in the *Aspergillus nidulans* secretion pathway.  
**Microbial Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 1245–1253, 2020.