



Estratégias para recuperação de xilooligossacarídeos do licor de resíduos de eucalipto para avaliação do seu efeito estimulante em *Staphylococcus xylosus*

Strategies for xylooligosaccharides recovery from eucalyptus waste liquor to evaluate their stimulatory effect on *Staphylococcus xylosus*

Mariana Gomes Moreira¹ , Jenniffer Andrea Tamayo Peña¹ , Telma Teixeira Franco^{1,2*} 

¹ Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil.

² Núcleo Interdisciplinar de Planejamento Energético, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil.

*Autor de correspondência/Corresponding author: tfranco@unicamp.br

Recebido/Received: 08.11.2022 – Aceito/Accepted: 11.04.2023

RESUMO

Xilooligossacarídeos (XOS) são reconhecidos pelo seu potencial prebiótico relevante para diversos setores industriais e foram obtidos após o pré-tratamento hidrotérmico da biomassa lignocelulósica residual de galhos de eucalipto. Subprodutos inibitórios são gerados durante o processo de solubilização dos oligossacarídeos e acabam comprometendo a utilização do licor em microrganismos. Neste trabalho, o processo de destoxificação, hidrólise enzimática e atividade estimulantes de crescimento da bactéria *Staphylococcus xylosus* foram estabelecidos. Os resultados mostraram que a adsorção com carvão ativado em pó removeu cerca de 55% do ácido acético e mais de 90% do ácido fórmico, compostos fenólicos, lignina solúvel, furfural e 5-hidroximetilfurfural, e que a soma dos oligossacarídeos xilobiose (X2) e xilotriose (X3) foram maximizadas de 0,57 g/L para 1,21 g/L com 110 U/g_{XOS} da enzima endoxilanase e 6,3% do licor destoxificado na hidrólise enzimática. O consumo de cerca de 63% de X2 e de 46% de X3 pela bactéria em meio basal deficiente em fontes de carbono, mas acrescido com os oligômeros, proporcionou maior crescimento celular em relação aos meios basais com alta composição de carbono, com e sem XOS, revelando seu potencial prebiótico pelo efeito estimulante de crescimento.

Palavras-chave. Xilooligossacarídeos, Carvão Ativado, Prebiótico, Eucalipto, Biomassa.

ABSTRACT

Xylooligosaccharides (XOS) are recognized for their prebiotic potential relevant to several industrial sectors and were obtained after hydrothermal pretreatment of residual lignocellulosic biomass from eucalyptus branches. Inhibitory by-products are generated during the solubilization process of oligosaccharides and end up compromising the utilization of the liquor in microorganisms. In this work, the detoxification process, enzymatic hydrolysis and growth stimulating activity of *Staphylococcus xylosus* bacteria were established. The results showed that adsorption with powdered activated carbon removed about 55% of acetic acid and more than 90% of formic acid, phenolic compounds, soluble lignin, furfural, and 5-hydroxymethyl furfural and the sum of the oligosaccharides xylobiose (X2) and xylotriose (X3) were maximized from 0.57 g/L to 1.21 g/L with 110 U/g_{XOS} of the enzyme endoxylanase and 6.3% of the detoxified liquor in the enzymatic hydrolysis. The consumption of X2 and X3 were about 63% and 46%, respectively, by the bacteria in basal medium deficient in carbon sources, but in medium added with the oligomers, provided higher cell growth compared to basal medium with high carbon composition, with and without XOS, revealing its prebiotic potential by its growth-stimulating effect.

Keywords. Xylooligosaccharides, Activated Charcoal, Prebiotic, Eucalyptus, Biomass.

INTRODUÇÃO

O Brasil é referência mundial no cultivo de árvores de eucalipto e está entre os principais produtores de papel, celulose e madeira serrada no mundo. Entre os milhões de toneladas de resíduos sólidos florestais gerados, 12,5% são mantidos em campo para proteção e adubação do solo e apenas 8,9% são reutilizados em outros setores industriais. O uso desses resíduos como matéria-prima para fabricação de novos produtos agrega valor, cria oportunidades por meio da inovação e reduz a pressão por novos recursos¹. A partir da hidrólise das xilanas presentes nas frações hemicelulósicas das biomassas lignocelulósicas de eucalipto, obtêm-se uma importante classe oligossacarídeos denominados xilooligossacarídeos (XOS).

Os XOS são definidos como oligômeros formados por 2 a 10 unidades de xilose conectados por ligações β -1,4-glicosídicas², sendo um ingrediente prestigiado pelas indústrias cosméticas, farmacêuticas e de alimentos, devido, principalmente, às suas propriedades prebióticas^{3,4}, sendo bons estimuladores de microbianos naturais, responsáveis por aumentar a atividade da microbiota saudável⁵ e contribuir de forma sustentável para a saúde do hospedeiro. Além disso, em formulações cosméticas podem ser utilizados como estabilizadores, agente de volume e antioxidantes³.

Durante o pré-tratamento para desconstruir a estrutura lignocelulósica e solubilizar a hemicelulose na forma de oligômeros e monômeros, as altas temperaturas e condições severas empregadas geram subprodutos considerados inibitórios que comprometem a utilização do licor em fermentações e etapas sucessoras. Destacam-se as formações de produtos de degradação, como o furfural e 5-hidroximetilfurfural (5-HMF), gerados a partir da desidratação de pentoses e hexoses da hemicelulose e celulose, respectivamente, ácido fórmico, os compostos fenólicos derivados da decomposição da lignina, e o ácido acético resultante da hidrólise dos grupos acetil hemicelulósicos^{6,7}.

Várias estratégias são utilizadas para remover ou reduzir esses compostos presentes no licor, como a filtração por membrana⁸, adsorção com carvão ativado⁹⁻¹¹, purificação por resinas de troca iônica¹² e floculação por polímeros vegetais¹³. Entre elas, a adsorção com carvão ativado se apresenta como uma técnica relevante para diminuir efetivamente as concentrações desses compostos sem alterar significativamente a concentração dos compostos valiosos. Como vantagens, destacam-se as propriedades como a área superficial, capaz de acomodar seletivamente as moléculas de interesse, alta porosidade, baixa reatividade, ser facilmente regenerado e por apresentar baixo custo quando comparado com os outros métodos¹⁴.

A composição elementar de um carvão ativado característico é formada por mais de 85% de carbono (C), seguido de elementos como oxigênio (O), enxofre (S), nitrogênio (N), hidrogênio (H) e cinzas orgânicas¹⁵. Esses átomos podem formar moléculas na superfície do material, impedindo o acesso aos poros. Para melhorar a acessibilidade do material, algumas técnicas podem ser aplicadas, como a carbonização, a qual é capaz de eliminar substâncias voláteis e gases leves, como metano, gás hidrogênio, dióxido e monóxido de carbono para contribuir na formação da estrutura porosa do adsorvente, e a ativação física e química, as quais são responsáveis por desobstruir os poros internos. Enquanto a ativação física envolve fluxos de gases oxidantes ou de vapor de água a altas temperaturas, a ativação química utiliza agentes ativadores para remover as impurezas do material, como ácido fosfórico (H_3PO_4), ácido sulfúrico (H_2SO_4), hidróxido de potássio (KOH), hidróxido de sódio (NaOH) e cloreto de zinco ($ZnCl_2$)¹⁶. Cada agente causa diferentes efeitos no produto final, como por exemplo, o $ZnCl_2$ leva à formação de uma elevada área superficial contendo mais estruturas de microporos, enquanto a utilização de H_3PO_4 gera uma distribuição de poros mais heterogênea^{14,17}.

Diversas referências destoxificaram licores oriundos de biomassas vegetais com carvão ativado para reduzir a concentração das moléculas nocivas sem alterar a concentração de açúcares fermentáveis^{10,18}. Outras, combinaram a adsorção com carvão ativado com filtrações prévias do licor^{9,13}, já que a alteração do pH por um reagente alcalino seguida da sua redução com um reagente ácido precipitava compostos aromáticos^{6,19}. A aplicação do método de destoxificação, por separação ou purificação, depende do grau de toxicidade do licor, o qual varia de acordo com a matéria prima e condições de pré-tratamento empregadas. Assim, faz-se necessário investigar e avaliar o melhor método para cada trabalho.

Seguir com a hidrólise enzimática após a destoxificação é uma alternativa para garantir maior formação de XOS com menores graus de polimerização, como 2 e 3, (XOS₂₋₃), já que as reações catalisadas por enzimas específicas permitem que moléculas maiores deem origem a moléculas menores sem a formação de subprodutos indesejáveis^{19,20}. As enzimas xilanases são os catalisadores preferidos para a hidrólise das xilanas, as quais são capazes de formar seletivamente XOS₂₋₃ sem gerar significativamente monômeros de xilose^{21,22}.

Xilobiose (X2) e xilotriose (X3) são os principais candidatos para aplicações prebióticas, pois seus tamanhos são mais facilmente consumidos por bactérias seletivas e benéficas à saúde humana^{2,23}. Uma microbiota saudável exerce funções a favor da proteção da barreira cutânea, através de mecanismos por crescimento competitivo entre bactérias benéficas e patogênicas ou por excreção de moléculas antimicrobianas por parte dos microrganismos benignos, atuando diretamente na defesa natural da pele. Como por exemplo, doenças como dermatite atópica, acne, rosácea e distúrbios na pele estão associadas às perturbações na composição da microflora²⁴.

Staphylococcus xylosum é uma bactéria residente da pele, que se desenvolve geralmente em ambientes quentes e úmidos, como axilas, pés e virilha, e pode ser comumente encontrada em culturas iniciadoras para desenvolvimento de cor e sabor em alimentos de origem animal²⁵. Há poucos estudos sobre os mecanismos de ação de prebióticos nessa bactéria na literatura, entretanto, no geral, são consideradas produtoras de bactericidas peptídicas que impedem a ação de patógenos^{26,27}.

O presente estudo teve como objetivo remover compostos inibidores de crescimento microbiano por adsorção com carvão ativado em batelada e converter os XOS de maiores GP em XOS₂₋₃ por hidrólise enzimática, ambos presentes no LB_{RE}, para avaliar a atividade estimulante dos oligossacarídeos no crescimento da bactéria *S. xylosum*, e assim, contribuir com as pesquisas para a conversão de resíduos de eucalipto abundantes, acessíveis e renováveis, em ingredientes qualificados pela indústria, garantindo um reaproveitamento efetivo e novas aplicações.

MATERIAL E MÉTODOS

Matéria Prima

O licor bruto (LB_{RE}) de galhos residuais de eucalipto da espécie *Eucalyptus grandis* foi gentilmente fornecido pelo Laboratório de Engenharia Bioquímica, Biorrefinaria e Produtos de Origem Renovável (LEBBPOR) da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). A caracterização e a preparação do material foram feitas em trabalho anterior por Tamayo-Pena et al²⁸, sendo sua composição química: 1,44 ± 0,16 g/L de xilose, 8,70 ± 0,01 g/L de XOS totais, 0,98 ± 0,07 g/L de compostos fenólicos, 0,58 ± 0,05 de ácido fórmico, 0,44 ± 0,16 g/L de ácido acético, 0,13 ± 0,11 g/L de furfural,

0,04 ± 0,02 g/L de 5-HMF e (0,22 ± 0,01) ×10⁻¹ de lignina solúvel. O LB_{RE} foi obtido por pré-tratamento hidrotérmico com 10% (m/m) de carga de sólidos e 175 °C durante 20 minutos, e valor de pH 3,2.

Os carvões utilizados nos experimentos foram carvão ativado granulado (C_{Gran}), com 8x30 mesh, gentilmente cedido pelo Laboratório de Bioprocessos e Engenharia Metabólica (LEMeB) da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, e carvão ativado em pó P.A. (C_{Pó}) comercial (Synth – Lote 235611).

Destoxificação do licor bruto com carvão ativado

O LB_{RE} foi destoxificado por adsorção com os carvões ativados 4% (m/v) em agitador *orbital shaker* a 150 rpm e 30 °C durante 2 horas. As amostras foram centrifugadas (4200 rpm por 30 minutos a 4 °C) e então filtradas em papel filtro qualitativo para retenção do carvão. Em seguida, uma nova centrifugação foi aplicada sob as mesmas condições. O sobrenadante foi retirado cuidadosamente com o auxílio de pipetas Pasteur e armazenado para análises quantitativas pelos métodos analíticos.

A porcentagem de remoção dos compostos adsorvidos (i) foi calculada segundo a [Equação 1](#) a seguir:

$$\% \text{ Remoção} = \frac{C_{0,i} - C_i}{C_{0,i}} \times 100 \quad (1)$$

C_{0,i} é definido como a concentração inicial do composto *i* (g/L) e C_i como a concentração do composto *i* ao final da adsorção (g/L), em que *i* corresponde aos compostos fenólicos, furfural, 5-HMF, lignina solúvel, ácido acético ou ácido fórmico.

Tratamentos dos carvões ativados

Para avaliar a efetividade da remoção dos compostos fenólicos, inibidores, ácidos orgânicos e lignina solúvel no LB_{RE}, foram testados três diferentes tratamentos no C_{Gran}, de acordo com metodologias descritas por Heylmann et al²⁹ e Ramos et al¹⁶. O C_{Pó} não recebeu nenhum tipo de tratamento preliminar, já que seu grau analítico garante maior confiabilidade.

Os tratamentos empregados no C_{Gran} foram: carvão ativado granulado sem tratamento prévio (C_{G-ST}), carvão ativado granulado carbonizado em cadinhos de porcelana a 700 °C por 10 minutos em mufla (C_{G-CA}) e carvão ativado granulado quimicamente tratado com solução 33% (m/v) de ZnCl₂, na proporção 1:1, durante 24 horas e carbonizado (C_{G-QT}) sob as mesmas condições anteriores. Neste último, o material foi lavado primeiramente, com uma solução de ácido clorídrico (HCl) 2,5% (v/v) para remoção dos resíduos de ZnCl₂ e desobstrução dos poros formados, e com água destilada até obtenção do pH da água de lavagem. Em seguida, o material foi seco em estufa a 100 °C durante 1 hora.

Filtração do licor bruto

A remoção de impurezas e compostos sólidos do LB_{RE} foi feita de acordo com a metodologia adaptada estabelecida por Alves et al¹⁹, 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 (H₃PO₄) seguida de uma nova filtração. Ao final deste processo, o licor filtrado (LF) e o LB_{RE} foram submetidos à adsorção com o C_G de melhor desempenho para comparação.

Enzima comercial e ensaios de atividade enzimática

A enzima e o substrato empregados nos ensaios enzimáticos foram a endo-1,4- β -xilanase de *Neocallimastix patriciarum* (GH11) e o arabinoxilano de trigo, ambos obtidos comercialmente da Megazyme®.

A atividade da enzima foi determinada colorimetricamente através de um espectrofotômetro UV/Vis a 540 nm a partir da quantidade de açúcares redutores liberados³⁰. Uma curva de calibração foi previamente construída com padrões de concentrações conhecidas de xilose. As reações contendo 50 μ L de substrato (0,5% p/v) e 50 μ L da enzima, ambos diluídos em tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,0, foram incubadas a 50 °C durante 20 minutos em termociclador e interrompidas pela adição de 100 μ L do reagente ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), seguido do aquecimento imediato até a ebulição por 5 minutos. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de açúcares redutores do substrato por minuto. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Produção de XOS com baixo grau de polimerização

O licor destoxificado (LD) foi submetido à hidrólise enzimática para aumentar a proporção de XOS_{2,3} e formar o hidrolisado (H). Os ensaios foram executados em frascos Erlenmeyer contendo 6,3% do LD, enzima na dosagem 110 U/g_{XOS} e tampão citrato fosfato 50 mM e pH 6,0 para integrar o volume final 10 mL. As amostras foram incubadas sob agitação contínua a 160 rpm e 50 °C durante 48 horas. Em seguida, foram aquecidas a 90 °C por 10 minutos em banho maria, centrifugadas (4200 rpm por 15 minutos a 4 °C) e armazenadas para determinação da concentração XOS por HPLC.

ESTUDO DE CASO

Microrganismos e condições de cultivo

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

As bactérias criopreservadas foram ativadas pelo cultivo dos microrganismos em meio de cultura caldo nutriente (C), previamente esterilizado a 121 °C por 20 minutos, contendo: 1 g/L de extrato de carne, 2 g/L de extrato de levedura, 5 g/L de peptona A e 5 g/L de cloreto de sódio (NaCl), na proporção de 1,5 mL de criotubo para 50 mL de meio C. O pH do meio foi ajustado para $7,2 \pm 0,2$ e as amostras foram incubadas por 17 horas a 250 rpm em agitador *orbital shaker* a 37 °C.

Após a ativação, o cultivo foi escalonado para 150 mL, na proporção de ativação 30% (v/v), para a formação do pré-inóculo e incubadas por 24 horas sob as mesmas condições. Em seguida, mantendo-se a mesma proporção e condições, o pré-inóculo foi transferido para o inóculo, de volume final de 250 mL, e incubado novamente por 24 horas. Esse escalonamento garantiu a quantidade necessária de inóculo para os ensaios de crescimento da bactéria com o H.

Crescimento da bactéria *Staphylococcus xylosus*

A estimulação do crescimento da bactéria foi estudada a partir de quatro diferentes meios de culturas esterilizados: meio caldo nutriente (C) e caldo nutriente com 0,47 g/L de XOS_{2,3} (CX), caldo

nutriente diluído 4x com água (D) e caldo nutriente diluído com 0,64 g/L de XOS₂₋₃ (DX). Os ensaios foram conduzidos em fracos Erlenmeyer em duplicata, com volume final de 10 mL, sendo 30% (v/v) do inóculo.

As culturas foram incubadas a 37 °C e 250 rpm e amostras foram retiradas nos tempos 0, 1, 2, 3 e 6 horas para determinação da concentração celular e pH. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (4500 rpm por 10 minutos a 4 °C) para remoção das células e os sobrenadantes foram devidamente diluídos, filtrados com filtros PVDF 0,22 µm e utilizados para a quantificação do consumo dos XOS₂₋₃ por HPLC. O crescimento celular foi monitorado a partir da densidade óptica a 600 nm em espectrofotômetro, a qual foi correlacionada com seu peso seco correspondente. Uma curva de calibração foi previamente preparada a partir do inóculo da bactéria.

MÉTODOS ANALÍTICOS

Análises de açúcares monoméricos, ácidos orgânicos e inibidores

Açúcares monoméricos foram quantificados por *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) equipada com 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 (H₂SO₄) 5 mM foi utilizado como eluente a vazão de 0,6 mL/min.

Ácidos orgânicos foram analisados 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.

As concentrações dos inibidores, furfural e 5-HMF, foram determinadas por HPLC equipada com 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 µL/min.

Análises de compostos fenólicos e lignina solúvel

Compostos fenólicos totais foram determinados pelo método de Folin-Ciocalteu, conforme preconizado por Arruda et al¹³. O teor de lignina solúvel foi determinado por *UV-Spectroscopy* a 280 nm e calculada conforme descrito por Rocha et al³¹.

Análises de xilooligossacarídeos

Xilobiose (X2), Xilotriose (X3), Xilotetraose (X4) e Xilopentaose (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.

A concentração de XOS totais foi determinada utilizando o NREL/TP-510-42623 descrito por Sluiter et al³².

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Destoxificação do licor bruto

O LB_{RE} contém subprodutos inibitórios como os compostos fenólicos, furfural, 5-HMF, ácido acético, ácido fórmico e lignina solúvel, que afetam o crescimento e atividade celular de microrganismos^{18,33}.

Antunes et al³⁴ 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 al¹⁸ relataram que concentrações a partir 0,5 g/L de compostos fenólicos inibem a produção de ácido láctico por bactérias. Wikandari et al³⁵ também observaram que a mesma concentração de ácido acético de 1,5 g/L foi suficiente para causar diminuição no 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. Assim, a destoxificação por adsorção em carvão ativado garante que os ensaios de crescimento com a bactéria *S. xylosus* e com o LB_{RE} não sejam prejudicados.

Efeitos dos tratamentos dos carvões ativados na adsorção

Para aumentar a eficiência adsortiva do carvão ativado é necessário garantir que seus poros estejam desobstruídos e disponíveis para que as moléculas inibidoras de interesse possam ser acomodadas em sua superfície²⁹. Diferentemente dos carvões ativados em pó, os carvões ativados granulados podem necessitar de mais processos para sua formação, já que o tamanho de sua partícula influencia diretamente na capacidade de adsorção³⁶.

De um modo geral, observa-se na **Figura 1** que os carvões que receberam algum tipo de tratamento, C_{G-CA} e C_{G-QT}, promoveram uma maior remoção dos compostos propostos, exceto para os inibidores furfural e 5-HMF, os quais foram efetivamente removidos em todos os casos (> 99%). Além disso, nota-se que os tratamentos não influenciaram significativamente na remoção do ácido fórmico, sendo as porcentagens de remoção de 90,9%, 89,9%, e 89,1% C_{G-CA}, C_{G-ST} e C_{G-QT}, respectivamente.

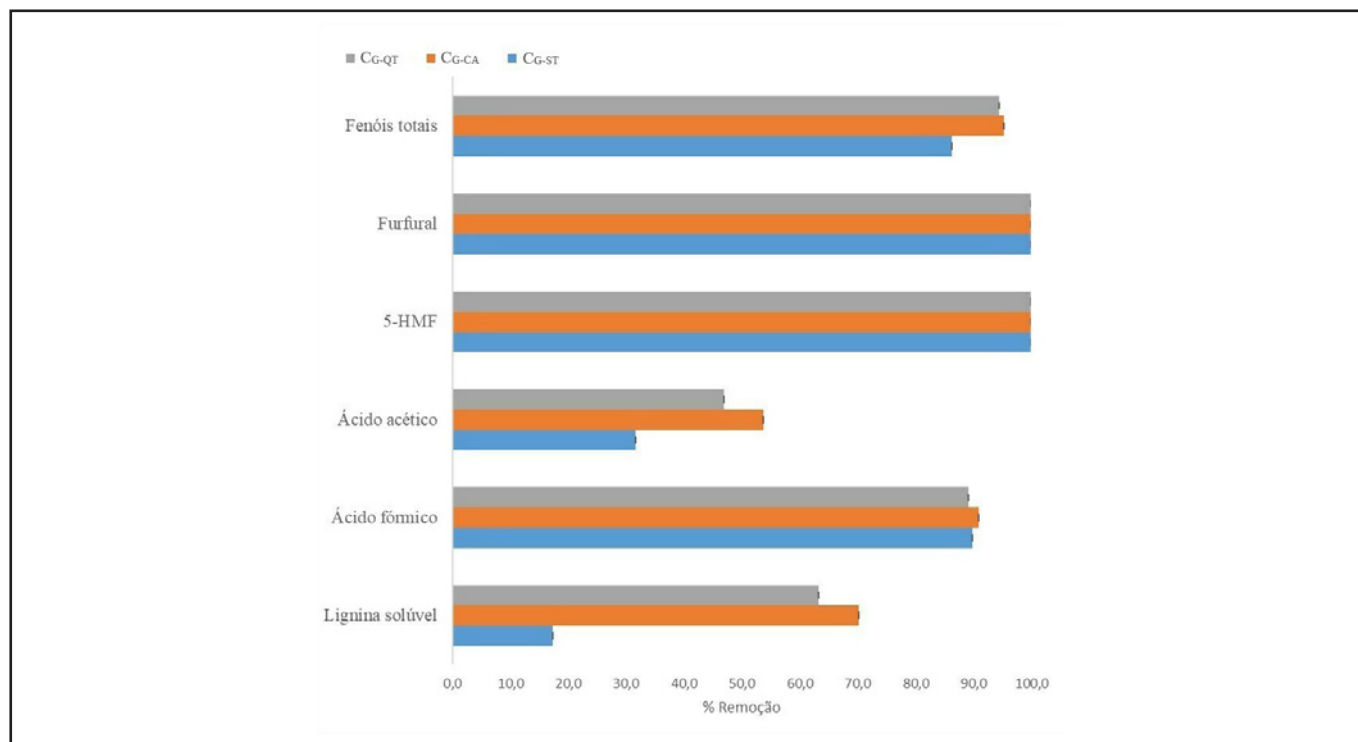


Figura 1. Remoção de compostos inibidores no LBRE a partir dos carvões: C_{G-ST} (sem tratamento), carvão C_{G-CA} (carbonizado) e carvão C_{G-QT} (quimicamente tratado) após 2 horas de adsorção

A ativação feita no C_{G-QT} não favoreceu a remoção de lignina solúvel, 63,2%, fenóis totais, 94,4%, e ácido acético, 46,9%, em relação ao carvão C_{G-CA} , 70,2%, 95,2% e 53,7%. A ativação química do material tem como objetivo básico aumentar a área superficial do adsorvente. O $ZnCl_2$ como ativador é capaz de remover impurezas e compostos orgânicos residuais do material, aumentando sua capacidade adsortiva³⁷. Entretanto, Vargas et al³⁸ afirmaram que pode haver o colapso da estrutura porosa do material adsorvente por excesso do agente ativador ao observar que a capacidade de adsorção do carvão ativado granulado de caroço de palmeira africana diminuiu com o aumento da concentração do $ZnCl_2$, ficando evidente que neste estudo, concentração de impregnação pode ter afetado as propriedades do C_{G-Gran} .

Sendo assim, o C_{G-CA} apresentou os melhores resultados para a remoção dos compostos inibitórios e foi utilizado para os experimentos de observação do efeito da filtração do licor bruto. Além disso, este tipo de tratamento favorece a redução de reagentes, água e energia em relação ao C_{G-QT} .

Efeito da filtração do licor bruto

A adição de um reagente básico no LB_{RE} , como o CaO, permite que alguns compostos sejam precipitados na forma de óxidos e removidos por filtração, segundo Alves et al¹⁹. Diversas referências na literatura^{13,34,39,40} aplicam esse processo prévio à adsorção com carvão ativado para garantir maior remoção dos compostos fenólicos presentes nos licores de diferentes biomassas lignocelulósicas.

As concentrações finais dos compostos inibidores para o LF, correspondente ao LB_{RE} filtrado previamente à adsorção, foram de: 0,243 g/L para o ácido acético, 0,059 g/L para o ácido fórmico, 0,008 g/L para a lignina solúvel, 0,027 g/L para os compostos fenólicos e concentrações inferiores a 0,001 g/L para furfural e 5-HMF. Já para o LB_{RE} que foi submetido direto à adsorção, o LD, os resultados foram 0,202 g/L de ácido acético, 0,053 g/L de ácido fórmico, 0,007 g/L de lignina solúvel, 0,047 g/L de compostos fenólicos e inferiores a 0,001 g/L de furfural e 5-HMF. Os valores foram calculados a partir de duplicadas e apresentaram erros inferiores a 5%.

A partir dos resultados, observa-se que as filtrações prévias não influenciaram nos resultados de adsorção do furfural, 5-HMF e ácido fórmico sendo que todos os resultados apresentaram porcentagem de remoção superior a 90,0%. Além disso, para o ácido acético a porcentagem de remoção no LD foi maior, 53,7%, do que para o LF, 44,4%.

Para a lignina solúvel, enquanto a filtração combinada a adsorção com C_{G-CA} removeu 62,6%, a aplicação direta do LB_{RE} à adsorção removeu 70,2%. De acordo com Evstigneyev et al⁴⁰ e Horvath⁴¹, a solubilidade da lignina aumenta com o aumento do pH da fase líquida. Desta forma, manter o pH ácido do LB_{RE} garantiu a maior afinidade das macromoléculas pelo adsorvente em relação à fase líquida, justificando sua menor concentração ao final da adsorção.

Em ambos os casos, nota-se que os compostos fenólicos foram altamente removidos, sendo de 97,3% e 95,2%, respectivamente, nos LF e LD. Como o esperado, a adição de CaO no LB_{RE} causa a precipitação de compostos aromáticos na forma de óxidos, permitindo que os mesmos sejam removidos por filtração¹⁹, justificando a ligeira maior remoção desses compostos, e relação ao LB_{RE} que foi diretamente adsorvido. Entretanto, esta etapa de filtração prévia como alternativa para aprimorar a adsorção não beneficiou significativamente a retirada dos fenólicos, assim como a remoção das impurezas sólidas do LB_{RE} , indicando que somente a adsorção com o carvão ativado foi suficiente para retirar efetivamente os compostos propostos.

Para este estudo com galhos de eucalipto residuais, filtrar o licor previamente à adsorção não promoveu reduções significantes nas concentrações dos compostos inibidores, e por essa razão, essa condição não foi empregada nos ensaios seguintes. Além disso, preservar o pH do LB_{RE} evita o consumo de reagentes e equipamentos e perdas de matéria prima que são geradas durante a filtração.

Comparação entre C_{pó} e C_{G-CA}

A **Tabela 1** apresenta os resultados da adsorção empregando-se os carvões em pó (C_{pó}) e o carvão ativado granulado de melhor desempenho, o carbonizado (C_{G-CA}). Além das menores partículas de carvão ativado conferirem menor taxa de difusão das moléculas do adsorvato no adsorvente, como consequência da menor resistência gerada no meio, o material em pó também proporciona uma maior área de contato com a fase líquida, aumentando os efeitos da adsorção^{11,42}.

Tabela 1. Concentrações finais dos compostos inibitórios, xilose e XOS totais após duas horas de adsorção com C_{G-CA} e C_{pó}

Inibidores	Concentração (g/L)		
	LB _{RE}	LD - C _{G-CA}	LD - C _{pó}
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 ⁻⁵
Ácido acético	0,436 ± 0,156	0,202*	0,197 ± 0,002
Xilose	1,436 ± 0,162	1,204 ± 0,074	1,297 ± 0,003
XOS totais	8,698 ± 0,005	5,879 ± 0,001	7,785 ± 0,001

* Valores de duplicatas com erros inferiores a 5%

Apesar do C_{pó} ter removido maiores quantidades de lignina solúvel (99,9%) em relação ao C_{G-CA} (70,2%) e ligeiramente mais ácido fórmico e ácido acético (93,0% e 55,0% contra 90,9% e 53,7%), observou-se que o carvão granulado adsorveu um pouco mais dos compostos fenólicos (95,2%) em relação ao em pó (93,6%) e que a granulometria não influenciou na adsorção do furfural e 5-HMF, sendo que estes foram eficientemente removidos em ambos os casos (> 99,0%).

Em comparação, Mussatto e Roberto¹¹ avaliaram a remoção de inibidores em licor de palha de arroz com diferentes granulometrias de carvões ativados a 2,5% por uma hora e mostraram que o carvão ativado em pó de maior área superficial removeu 26% de compostos fenólicos, 42% de furfural e 93% de 5-HMF, enquanto o carvão granulado de 8x30 mesh removeu 12%, 54% e 39%, respectivamente. Apesar da adsorção ser fortemente dependente da concentração dos adsorvatos na fase líquida, esses estudos se assemelham pelo fato de que o carvão ativado em pó obteve melhor êxito para a remoção dos três compostos e que o ácido acético foi o composto menos adsorvido. A razão para essa tendência do ácido acético 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 remoção⁴³.

Apesar dos resultados estarem de acordo com o esperado para o C_{P_0} , nota-se que a carbonização do C_{Gran} também gerou um material eficaz para a remoção dos compostos inibidores propostos. Entretanto, remoções de açúcares também foram observadas para ambos carvões, sendo que o C_{G-CA} retirou mais xilose e XOS totais (16,2% e 32,2%) em relação ao C_{P_0} (9,7% e 10,5%). Perdas de açúcares também foram relatadas em outros estudos^{13,18}. Desta forma, o carvão C_{P_0} foi escolhido para os experimentos de adsorção antes do estudo de caso por ser capaz de remover eficientemente os compostos inibitórios, não exigir tratamentos prévios e gerar menores perdas dos XOS.

Aplicação de endoxilanase para aumentar xilobiose e xilotriose no licor destoxificado

XOS com GP 2 e 3 são reconhecidos como açúcares fermentáveis qualificados para microrganismos benéficos e específicos no corpo humano, por possuírem tamanho adequado e por auxiliar no controle da microbiota^{2,33}. A principal vantagem de aplicar a hidrólise enzimática em polissacarídeos é atribuída à alta especificidade da reação, a qual garante a conversão em produtos com baixo GP, sem a formação de subprodutos^{44,45}. Para aumentar a concentração desses oligômeros no LD, a hidrólise enzimática com a enzima comercial endoxilanase GH11 foi aplicada.

A composição de oligômeros e monômeros no licor destoxificado era de 0,23 g/L de X2, 0,34 g/L de X3, 0,84 g/L de X4+X5 e 1,30 g/L de xilose. As enzimas endoxilanasas da família GH11 apresentam alta seletividade pelo substrato e eficiência catalítica, gerando menos monômeros e atuando preferencialmente nas cadeias mais longas⁴⁶. Após 48 horas, as concentrações aumentaram cerca de 134%, 97%, 51% e 7%, respectivamente, para X2, X3, X4+X5 e xilose, atingindo concentrações de 0,54 g/L, 0,67 g/L, 1,27 g/L e 1,39 g/L, ficando evidente que as cadeias mais longas dos XOS foram convertidas principalmente em X2 e X3 durante a hidrólise enzimática.

Efeito do X2 e X3 na *S. xylosus*

Nos microrganismos, os compostos inibidores prejudicam o crescimento e atividades celulares por atuarem diretamente na membrana. Enquanto os compostos fenólicos são responsáveis pelas perdas de potássio, ácido glutâmico, RNA e entre outros compostos da barreira seletiva, o furfural e 5-HMF são capazes de impedir a formação das enzimas das vias metabólicas centrais, como as fermentativas, e levar ao rompimento da membrana. Além desses, os ácidos orgânicos também afetam o crescimento da célula através de mecanismos de acidificação intracelular⁴⁷. Neste estudo, com exceção da lignina solúvel e seus derivados, compostos fenólicos, nota-se que as concentrações do furfural, 5-HMF dos ácidos orgânicos estão abaixo dos limites considerados inibitórios no LB_{RE} , conforme descrito anteriormente, para outros microrganismos. Considerando que os limites inibitórios desses compostos não tenham sido reportados pela literatura para a bactéria *S. xylosus* e que pode haver efeito sinérgico entre eles^{18,48}, a adsorção do LB_{RE} com o carvão ativado se fez necessária para garantir que o crescimento da bactéria e a avaliação do consumo de X2 e X3 não fossem prejudicadas.

Ensaio para avaliar o efeito dos XOS_{2,3} no crescimento da *S. xylosus* foram feitos em diferentes meios de culturas. Para avaliar efetivamente o crescimento da *S. xylosus* pelo consumo de XOS_{2,3} é importante analisar se as bactérias consomem, preferencialmente, os oligossacarídeos ou as fontes de carbono provenientes dos meios basais, já que estes são meios complexos e ricos em bons nutrientes. Com isso, a **Tabela 2** apresenta as composições dos 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 XOS₂₋₃ (DX) a partir das concentrações totais e das concentrações de carbono (C_{Carbono}), em g/L, de cada componente, sendo a última calculada pela fração mássica de carbono em cada um^{49,50}.

Tabela 2. Concentrações totais e concentrações de carbono (C_{carbono}) de cada componente para cada meio de cultura, sendo os meios ricos em nutrientes com XOS₂₋₃ (meio CX) e sem XOS₂₋₃ (meio C) e os deficientes em nutrientes com XOS₂₋₃ (meio DX) e sem (meio D) XOS₂₋₃

Componentes	Fração mássica de Carbono	Concentração (g/L)					
		Meios deficientes em nutrientes			Meio rico em nutrientes		
		Meio C	Meio CX	C _{Carbono}	Meio D	Meio DX	C _{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

No geral, após 6 horas de ensaio, observa-se que a alta disponibilidade de carbono do meio basal nos meios C e CX, calculada a partir da soma de C_{Carbono} de cada componente, sendo de 4,00 g/L e 4,20 g/L, respectivamente, fez com que a bactéria crescesse continuamente, diferentemente dos meios deficientes de nutrientes basais, D e DX, com concentrações de carbono de 1,00 g/L e 1,28 g/L, na devida ordem, 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 XOS₂₋₃ (meio DX). A incorporação de XOS₂₋₃ 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, 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, conforme **Figura 2**.

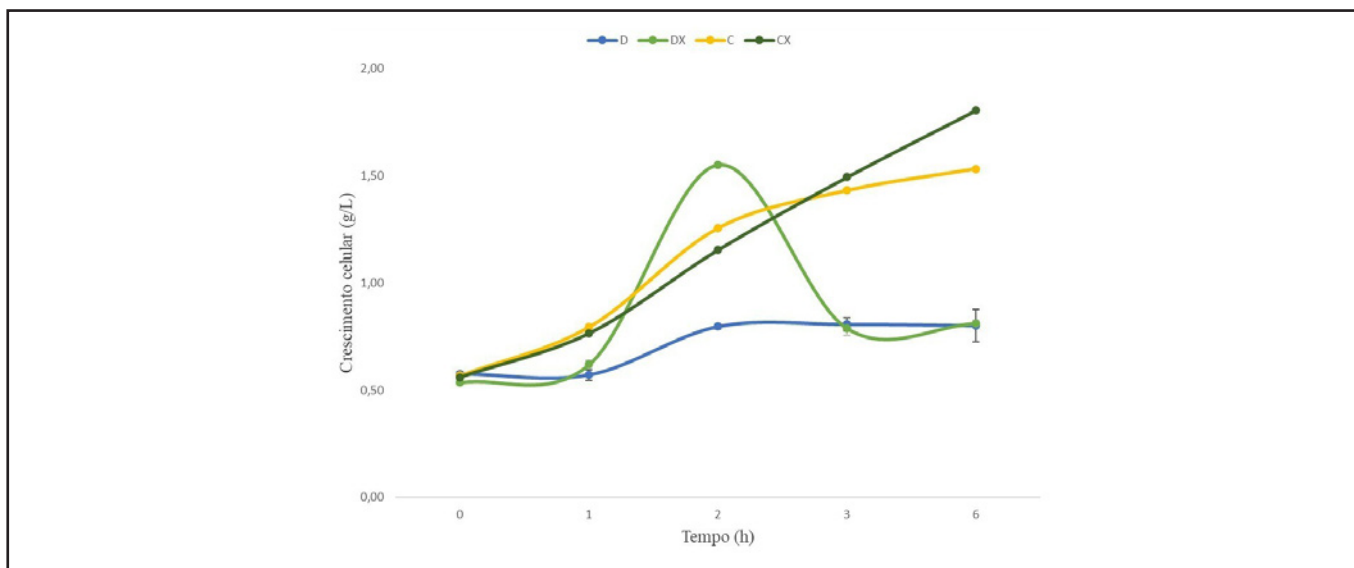


Figura 2. Concentração celular de *S. xylosus* durante 6 horas de fermentação nos meios C (caldo nutriente) e CX (caldo nutriente com 0,47 g/L de XOS₂₋₃), D (caldo nutriente diluído 4x) e DX (caldo nutriente diluído 4x com 0,64 g/L de XOS₂₋₃)

Em relação ao consumo dos oligossacarídeos para o tempo de 2 horas, quando os XOS_{2-3} 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_{2-3} são bons estimuladores de crescimento para esta bactéria *S. xylosus*, já que o consumo dos oligossacarídeos permitiu que a bactéria crescesse mais em relação aos meios basais com altas concentrações de carbono.

Já para as 6 horas de ensaio, a *S. xylosus* consumiu apenas 22,4% de X2 e de 9,7% de X3 no meio CX contra 64,4% e 46,8%, na devida ordem, para os mesmos oligossacarídeos do 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_{2-3} . Além disso, enquanto a bactéria consome gradualmente os oligômeros ao longo do tempo no meio CX, para o meio DX, o consumo é feito bruscamente durante a primeira hora, o qual se correlaciona com o máximo crescimento após 2 horas de ensaio, como apresentado na **Figura 3**.

Muitos trabalhos afirmam que a inibição de bactérias patogênicas por bactérias probióticas esteja relacionada com produção de ácidos metabólicos, como os ácidos graxos de cadeias curtas, que impedem o crescimento dos microrganismos nocivos por competição, provocando uma queda característica no pH do meio^{26,48}. Entretanto, neste estudo, foi observado o aumento do pH de 7,2 para 8,5 no meio CX, e de 7,2 para 7,9 para o meio DX, após as 6 horas de ensaio.

Além da glicose, os microrganismos também são capazes de catabolizar outros carboidratos, lipídeos e proteínas para a produção de energia. Entre eles, as proteínas são formadas por unidades de grupos carboxilas de um aminoácido que se conectam, através das ligações peptídicas, com o grupo amina de outro aminoácido subsequente, sendo ótimas fontes tanto de carbono quanto de nitrogênio⁵⁰. Em meios complexos compostos por extratos de carne, extrato de leveduras e peptonas, formados principalmente por proteínas, o pH tende a aumentar devido à formação de íons amônio (NH_4^+) em solução a partir da liberação do grupo amina dos aminoácidos. Para que a bactéria consiga catabolizar as proteínas, primeiramente, enzimas são excretadas para decompor as macromoléculas em aminoácidos. Em seguida, estas são convertidas em moléculas aceitas pelo ciclo de Krebs. Um dos mecanismos envolvidos nesta

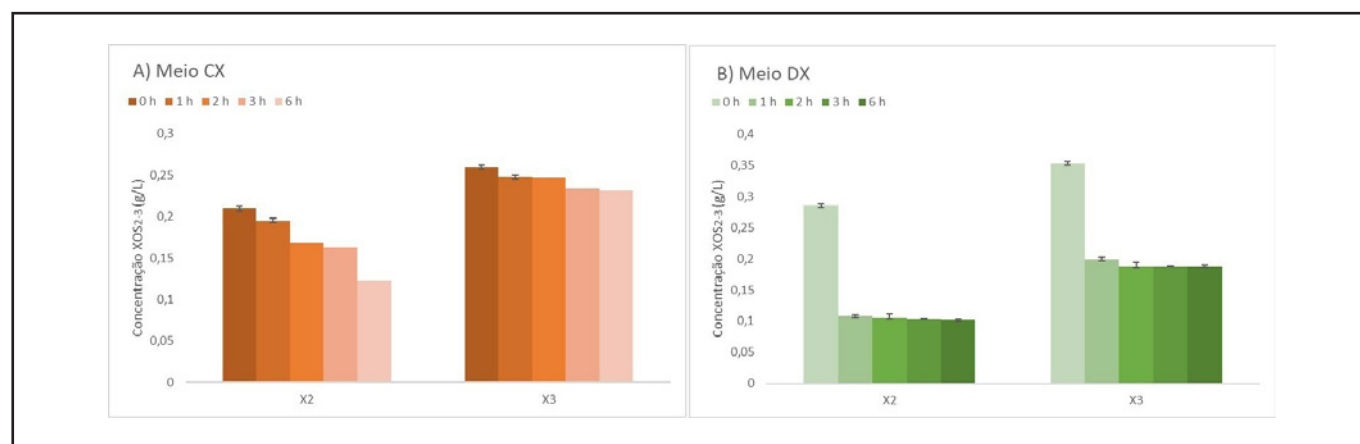


Figura 3. Perfil de consumo de xilobiose (X2) e xilotriose (X3) do hidrolisado durante 6 horas de fermentação da bactéria *Staphylococcus xylosus* para os meios A) CX (caldo nutriente com 0,47 g/L de X2+X3) e B) DX (caldo nutriente diluído 4x com 0,64 g/L de X2+X3)

segunda etapa é a desaminação, em que o grupo amina é removido do aminoácido para que somente o hidrocarboneto entre no ciclo. Por esta razão, também se nota que o pH do meio CX, o qual possui maiores concentrações dos nutrientes complexos, aumenta mais do que o do meio DX.

Para investigar o efeito probiótico da bactéria *S. xylosus* em pele através de mecanismos de excreção de moléculas antimicrobianas ácidas para combater espécies patogênicas, mais pesquisas seriam necessárias em meios menos complexos. Entretanto, Leroy et al²⁷ observaram que cepas dessa bactéria conseguiram inibir ou reduzir a formação de biofilmes pela espécie *Staphylococcus aureus*, bactéria patogênica da pele responsável por infecções hospitalares, a partir da excreção de peptídeos antimicrobianos. Neste presente estudo, os resultados de crescimento celular e consumo de X2 e X3 indicaram que os XOS do licor obtido dos resíduos de eucalipto apresentaram potencial prebiótico para a bactéria em questão, embora sua aplicação tópica ainda seja insuficientemente investigada.

CONCLUSÃO

A integração entre a destoxificação por adsorção de carvão ativado e a hidrólise enzimática aplicada no LB_{RE} de resíduos de eucalipto formou um licor rico em xilobiose e xilotriose com baixas concentrações de compostos inibidores. Apesar da carbonização do carvão ativado granulado (C_{G-CA}) gerar um material eficaz para a remoção dos compostos propostos, a adsorção com o C_{P6} foi empregada para obtenção do LD, pois além de evitar tratamentos prévios adicionais, adsorveu ligeiramente mais efetivamente os inibidores e gerou menores perdas de XOS na fase líquida. Os ensaios de crescimento da *S. xylosus* mostraram que, apesar da bactéria consumir, preferencialmente e primeiramente, as fontes de carbono do meio basal, na escassez dos mesmos, a bactéria se mostrou hábil em consumir XOS₂₋₃, pela maior acessibilidade dos oligossacarídeos no meio, e apresentou máximo crescimento evidenciando os XOS₂₋₃ como bons candidatos para estimulação da bactéria *S. xylosus*. Esse estudo também propõe uma abordagem sustentável que incentiva o uso de biomassas lignocelulósicas como fonte de potenciais ingredientes prebióticos com valor agregado e prestigiados pelas indústrias farmacêuticas e cosméticas.

CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram não existir conflitos de interesse.

FINANCIAMENTO

Este trabalho foi apoiado pelo Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo – Fapesp [subvenção n°. 2015/50612-8].

AGRADECIMENTO

Ao laboratório de Engenharia Bioquímica, Biorrefinaria e Produtos de Origem Renovável (LEBBPOR) da Faculdade de Engenharia Química (FEQ) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) pela infraestrutura para execução das análises. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento do projeto de pesquisa.

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

Concepção, planejamento, desenvolvimento de metodologias experimentais, análises experimentais, interpretação dos dados, e escrita (rascunho original, revisão e edição): Mariana Gomes Moreira; Planejamento, desenvolvimento de metodologias e análises experimentais: Jenniffer Andrea Tamayo Pena; Concepção, validação de recursos, supervisão e escrita (revisão e edição): Telma Teixeira Franco.

NOTA DE APRESENTAÇÃO

Os resultados deste artigo integram a dissertação de mestrado de Mariana Gomes Moreira, do Programa de Pós-Graduação de Engenharia Química (FEQ) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

REFERÊNCIAS

1. Indústria Brasileira de Árvores – IBÁ. Relatório anual IBÁ 2021. [acesso 2022 Jul 18]. Disponível em: https://iba.org/datafiles/publicacoes/relatorios/relatorioiba2021-compactado.pdf?utm_source=akna&utm_medium=email&utm_campaign=iba-lanca-relatorio-anual-2021
2. Ávila PF, Martins M, Costa FAA, Goldbeck R. Xylooligosaccharides production by commercial enzyme mixture from agricultural wastes and their prebiotic and antioxidant potential. *Bioact Carbohydr Diet Fibre*. 2020;24:100234. <https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2020.100234>
3. Ahmad N, Zakaria MR. Oligosaccharide from hemicellulose. Chapter 8. In: Ariffin H, Sapuan SM, Hassan MA, Editors. *Lignocellulose for Future Bioeconomy*, Elsevier; 2019.p.135-52. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816354-2.00008-6>
4. Otieno DO, Ahring BK. A thermochemical pretreatment process to produce xylooligosaccharides (XOS), arabinooligosaccharides (AOS) and mannoooligosaccharides (MOS) from lignocellulosic biomasses. *Bioresour Technol*. 2012;112:285-92. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.162>
5. Gibson GR, Hutkins R, Sanders ME, Prescott SL, Reimer RA, Salminen SJ et al. The International scientific association for probiotics and prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2017;14(8):491-502. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.75>
6. Jia H, Shao T, Zhong C, Li H, Jiang M, Zhou H et al. Evaluation of xylitol production using corncob hemicellulosic hydrolysate by combining tetrabutylammonium hydroxide extraction with dilute acid hydrolysis. *Carbohydr Polym*. 2016;151:676-83. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.06.013>
7. Misra S, Raghuwanshi S, Saxena RK. Evaluation of corncob hemicellulosic hydrolysate for xylitol production by adapted strain of *Candida tropicalis*. *Carbohydr Polym*. 2013;92(2):1596-601. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.11.033>

8. Cao R, Xu Y. Efficient preparation of xylonic acid from xylonate fermentation broth by bipolar membrane electrodialysis. Appl Biochem Biotechnol. 2019;187(1):396-406.
<https://doi.org/10.1007/s12010-018-2827-y>
9. Antunes FAF, Santos JC, Chandel AK, Carrier DJ, Peres GFD, Milessi TSS et al. Repeated batches as a feasible industrial process for hemicellulosic ethanol production from sugarcane bagasse by using immobilized yeast cells. Cellulose. 2019;26(6):3787-800.
<https://doi.org/10.1007/s10570-019-02341-z>
10. Nascimento BF, Araujo CMB, Nascimento AC, Silva FLH, Melo DJN, Jaguaribe EF et al. Detoxification of sisal bagasse hydrolysate using activated carbon produced from the gasification of açai waste. J Hazard Mater. 2021;409:124494.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124494>
11. Mussatto SI, Roberto IC. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review. Bioresour Technol. 2004;93(1):1-10.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2003.10.005>
12. van Zyl C, Prior BA, du Preez JC. Acetic acid inhibition of d-xylose fermentation by *Pichia stipitis*. Enzyme Microb Technol. 1991;13(1):82-6.
[https://doi.org/10.1016/0141-0229\(91\)90193-E](https://doi.org/10.1016/0141-0229(91)90193-E)
13. Arruda PV, Chaud LCS, Felipe MGA, Pivetta LR. 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. 2008;5(1):166-182.
<https://doi.org/10.3738/192-227869>
14. Nascimento RF, Lima ACA, Vidal CB, Melo DQ, Raulino GSC. Adsorção: aspectos teóricos e aplicações ambientais. E-book. 2. ed. Fortaleza (CE): Imprensa Universitária; 2020. [acesso em 2022 Jul 28]. Disponível em:
<http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/53271>
15. Bansal RC, Goyal M. Activated carbon adsorption. Roca Raton (NY): CRC Press; 2005.
<https://doi.org/10.1201/9781420028812>
16. Ramos PH, Guerreiro MC, Resende EC, Gonçalves M. Production and characterization of activated carbon prepared from PVA defect coffee. Quím Nova. 2009;32(5):1139-43.
<https://doi.org/10.1590/s0100-40422009000500011>
17. Yagmur E, Ozmak M, Aktas Z. A novel method for production of activated carbon from waste tea by chemical activation with microwave energy. Fuel. 2008;87(15-16):3278-85.
<https://doi.org/10.1016/j.fuel.2008.05.005>

18. Costa-Trigo I, Paz A, Otero-Penedo P, Outeirino D, Oliveira RPS, Domínguez JM. Detoxification of chestnut burrs hydrolyzates to produce biomolecules. *Biochem Eng J*. 2020;159:107599.
<https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107599>
19. Alves LA, Felipe MGA, Silva JBAE, Silva SS, Prata AMR. Pretreatment of sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. *Appl Biochem Biotechnol*. 1998;70:89-98.
<https://doi.org/10.1007/BF02920126>
20. Polizeli MLTM, Rizzatti ACS, Monti R, Terenzi HF, Jorge JA, Amorin DS. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2005;67(5):577-91.
<https://doi.org/10.1007/s00253-005-1904-7>
21. Zhang H, Han L, Dong H. An insight to pretreatment, enzyme adsorption and enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: experimental and modeling studies. *Renew Sustain Energy Rev*. 2021;140:110758.
<https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.110758>
22. Pesquisa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA. Xilanases microbianas e suas aplicações industriais. [acesso em 2022 Jul 28]. Disponível em:
<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1134008/1/Xilanases-microbianas-e-suas-aplicac807o771es-industriais-2021.pdf>
23. Brenelli LB, Figueiredo FL, Damasio A, Franco TT, Rabelo SC. An integrated approach to obtain xylo-oligosaccharides from sugarcane straw: from lab to pilot scale. *Bioresour Technol*. 2020;313:123637.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123637>
24. Krutmann J. Pre- and probiotics for human skin. *J Dermatol Sci*. 2009;54(1):1-5.
<https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2009.01.002>
25. Stavropoulou DA, Maere H, Berardo A, Janssens B, Filippou P, Vuyst L et al. Pervasiveness of *Staphylococcus carnosus* over *Staphylococcus xylosus* is affected by the level of acidification within a conventional meat starter culture set-up. *Int J Food Microbiol*. 2018;274:60-6.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.03.006>
26. Egert M, Simmering R, Riedel CU. The association of the skin microbiota with health, immunity, and disease. *Clin Pharmacol Ther*. 2017;102(1):62-9.
<https://doi.org/10.1002/cpt.698>
27. Leroy S, Lebert I, Andant C, Talon R. Interaction in dual species biofilms between *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus aureus*. *Int J Food Microbiol*. 2020;326:108653.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108653>

28. Tamayo-Pena JA, Felix TC, Pacheco LCA, Brenelli LB, Gonçalves AR, Franco TT. BBEST 2020-21/ Biofuture Summit II. Dezembro de 2020; São Paulo.
29. Heylmann KKA, Lopes BV, Afonso TF, Demarco CF, Cadaval Junior TR, Quadro MS et al. Produção, caracterização e aplicação de carvão ativado de caroço de pêssego no tratamento de efluente têxtil. Eng Sanit Ambient. 2021;26(3):485-94.
<https://doi.org/10.1590/S1413-415220190226>
30. Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal Chem. 1959;31(3):426-8.
<https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
31. Rocha GJM, Gonçalves AR, Oliveira BR, Olivares EG, Rossell CEV. Steam explosion pretreatment reproduction and alkaline delignification reactions performed on a pilot scale with sugarcane bagasse for bioethanol production. Ind Crop Prod. 2012;35(1):274-9.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.07.010>
32. Sluiter A, Hames B, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter J, Templeton D. Determination of sugars, byproducts, and degradation products in liquid fraction process samples: Laboratory Analytical Procedure (LAP). Technical Report NREL/TP-510-42623; 2006. Disponível em:
<https://www.nrel.gov/docs/gen/fy08/42623.pdf>
33. Lian Z, Wang Y, Luo J, Lai C, Yong Q, Yu S. An integrated process to produce prebiotic xylooligosaccharides by autohydrolysis, nanofiltration and endo-xylanase from alkali-extracted xylan. Bioresour Technol. 2020;314:123685.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123685>
34. Antunes FAF, Thomé LC, Santos JC, Ingle AP, Costa CB, Anjos V et al. Multi-scale study of the integrated use of the carbohydrate fractions of sugarcane bagasse for ethanol and xylitol production. Renew Energy. 2021;163:1343-55.
<https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.08.020>
35. Wikandari R, Millati R, Syamsiyah S, Muriana R, Ayuningsih Y. Effect of furfural, hydroxymethylfurfural and acetic acid on indigeneous microbial isolate for bioethanol production. Agric J. 2010;5(2):105-9.
<https://doi.org/10.3923/aj.2010.105.109>
36. Ge L, Zhao C, Chen S, Li Q, Zhou T, Jiang H et al. An analysis of the carbonization process and volatile-release characteristics of coal-based activated carbon. Energy. 2022;257:124779.
<https://doi.org/10.1016/j.energy.2022.124779>
37. Sujiono EH, Zabrian D, Zurnansyah, Mulyati, Zharvan V, Samnur et al. Fabrication and characterization of coconut shell activated carbon using variation chemical activation for wastewater treatment application. Results Chem. 2022;4:100291.
<https://doi.org/10.1016/j.rechem.2022.100291>

38. Vargas DP, Giraldo L, Moreno-Piraján JC. Co₂ adsorption on granular and monolith carbonaceous materials. J Anal App Pyrolysis. 2012;96:146-52.
<https://doi.org/10.1016/j.jaap.2012.03.016>
39. Paniagua-García AI, Hijosa-Valsero M, Díez-Antolínez R, Sánchez ME, Coca M. Enzymatic hydrolysis and detoxification of lignocellulosic biomass are not always necessary for ABE fermentation : The case of *Panicum virgatum*. Biomass Bioenergy. 2018;116:131-9.
<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2018.06.006>
40. Evstigneyev EI, Shevchenko SM. Structure, chemical reactivity and solubility of lignin: a fresh look. Wood Sci Technol. 2019;53:7-47.
<https://doi.org/10.1007/s00226-018-1059-1>
41. Horvath AL. Solubility of structurally complicated materials: I. Wood. J Phys Chem Ref Data. 2006;35:77-92.
<https://doi.org/10.1063/1.2035708>
42. Ahmedna M, Marshall WE, Rao RM. Granular activated carbons from agricultural by-products: preparation, properties, and application in cane sugar refining. Louisiana State University, LSU Digital Commons. Bulletin 869; 2000. p. 1-56. Disponível em:
https://digitalcommons.lsu.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1038&context=agcenter_bulletins
43. Adekola FA, Oba IA. Biosorption of formic and acetic acids from aqueous solution using activated carbon from shea butter seed shells. Appl Water Sci. 2016;7(6):2727-36.
<https://doi.org/10.1007/s13201-016-0491-3>
44. Pino MS, Rodríguez-Jasso RM, Michelin M, Flores-Gallegos A, Morales-Rodríguez R, Teixeira JA et al. Bioreactor design for enzymatic hydrolysis of biomass under the biorefinery concept. Chem Eng J. 2018;347:119-36.
<https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.04.057>
45. Santibáñez L, Henríquez C, Corro-Tejeda R, Bernal S, Armijo B, Salazar O. Xylooligosaccharides from lignocellulosic biomass: a comprehensive review. Carbohydr Polym. 2021;251:117118.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117118>
46. García-Ruiz A, Bartolomé B, Martínez-Rodríguez AJ, Pueyo E, Martín-Álvarez PJ, Moreno-Arribas MV. Potential of phenolic compounds for controlling lactic acid bacteria growth in wine. Food Control. 2008;19(9):835-41.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2007.08.018>
47. Basak B, Jeon BH, Kim TH, Lee JC, Chatterjee PK, Lim H. Dark fermentative hydrogen production from pretreated lignocellulosic biomass: effects of inhibitory byproducts and recent trends in mitigation strategies. Renew Sustain Energy Rev. 2020;133:110338.
<https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.110338>

48. Boonchuay P, Wongpoomchai R, Jaturasitha S, Mahatheeranont S, Watanabe M, Chaiyaso T. Prebiotic properties, antioxidant activity, and acute oral toxicity of xylooligosaccharides derived enzymatically from corncob. Food Biosci. 2021;40:100895.
<https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.100895>
49. Farfan JA. Química de proteínas: aplicada à ciência e tecnologia dos alimentos. 2. ed. Campinas (SP): Editora da UNICAMP; 1994.
50. Lehninger TM, Nelson DL, Cox MM. Princípios de bioquímica. 6. ed. Editora Artmed; 2014.

