

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

CAIO CESAR DE MELLO CAPETTI

Produção de xilooligossacarídeos a partir de bagaço de cana-de-açúcar
empregando diferentes estratégias de pré-tratamentos

São Carlos

2020

CAIO CESAR DE MELLO CAPETTI

**Produção de xilooligossacarídeos a partir de bagaço de cana-de-açúcar
empregando diferentes estratégias de pré-tratamentos**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
Programa de Graduação em Física do Instituto de
Física de São Carlos da Universidade de São
Paulo, para obtenção do título de Bacharel em
Física Biomolecular.

São Carlos

2020

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca e Informação do IFSC, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Capetti, Caio Cesar de Mello

Produção de xilooligossacarídeos a partir de bagaço de cana-de-açúcar empregando diferentes estratégias de pré-tratamentos / Caio Cesar de Mello Capetti; orientador Igor Polikarpov – São Carlos, 2020.

29 p.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Física Biomolecular) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2020.

1. Xilooligossacarídeos. 2. Biomassa lignocelulósica. 3. Xilanases. I. Título. II. Polikarpov, Igor, orient.

Resumo

Xilooligossacarídeos (XOs) são oligômeros provenientes da hidrólise do xilano, o principal constituinte da hemicelulose. A hemicelulose, junto à celulose e à lignina, compõe fração significativa do material lignocelulósico (LCM) observado em resíduos agroindustriais, como bagaço de cana-de-açúcar. Ampla bibliografia descreve os impactos da administração de XOs sobre a saúde humana e animal. Eles possuem atividade pré-biótica, antioxidante e antitumoral, sendo sua produção, por essa razão, de interesse das indústrias alimentícia e farmacêutica. Em geral, a produção de XOs envolve uma etapa de pré-tratamento do LCM, que tem por objetivo desestruturar o complexo formado por celulose, hemicelulose e lignina, tornando a fração hemicelulósica sujeita a hidrólise, e uma etapa de hidrólise enzimática. Neste trabalho, propõe-se a comparação de dois pré-tratamentos, a saber, alcalino e hidrotérmico, bem como a avaliação da atividade de duas xilanases da família GH11 e uma xilanase da família GH10, em diferentes combinações, visando a produção de XOs. Em um primeiro momento, realizou-se a caracterização química da biomassa *in natura* e após cada um dos pré-tratamentos, onde observou-se que o tratamento alcalino diminuiu a proporção de lignina, enquanto o tratamento hidrotérmico reduziu a proporção de hemicelulose, solubilizando-a. Foram detectados XOs de diversos graus de polimerização (DP) apenas no líquor proveniente do pré-tratamento hidrotérmico. Por essa razão, a hidrólise enzimática foi realizada somente na fração sólida do bagaço sujeito a tratamento alcalino, enquanto no sujeito a tratamento hidrotérmico, a hidrólise foi realizada tanto na fração sólida como no líquor. A hidrólise enzimática na biomassa *in natura* não gerou quantidades significativas de XOs. Em contraste, na melhor condição, a hidrólise na biomassa pré-tratada com NaOH produziu (49.9 ± 0.4) mg de XOs por grama de biomassa *in natura*; a hidrólise na fração sólida de LCM sujeita a pré-tratamento hidrotérmico gerou (19.1 ± 0.2) mg/g de XOs. O líquor hidrolisado, por sua vez, rendeu (107 ± 3) mg/g de XOs. Assim, fica evidente que a aplicação do pré-tratamento hidrotérmico se mostrou mais eficiente no que diz respeito à produção de XOs. Fica demonstrada também a importância da aplicação de alguma estratégia de pré-tratamento a fim de expor a estrutura do LCM e possibilitar a ação das xilanases.

Palavras-chave: Xilooligossacarídeos. Biomassa lignocelulósica. Xilanases.

Sumário

1 INTRODUÇÃO	7
2 MATERIAIS E MÉTODOS	11
2.1 Produção de XOs exclusivamente a partir de pré-tratamentos em bagaço de cana de açúcar	11
2.2 Caracterização química da biomassa	13
2.3 Hidrólise enzimática	15
2.4 Detecção e quantificação cromatográfica de oligômeros após produção de XOs.....	16
3 RESULTADOS	19
3.1 Caracterização química da biomassa	19
3.2 Produção de XOs exclusivamente a partir de pré-tratamentos em bagaço de cana de açúcar	20
3.3 Hidrólise enzimática	21
4 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	25
REFERÊNCIAS	27

1 INTRODUÇÃO

Materiais lignocelulósicos (LCM) são constituídos principalmente por celulose, hemicelulose e lignina, sendo fundamentais na constituição da parede celular vegetal e uma fonte importante de polissacarídeos. A hemicelulose contribui com, a depender da espécie vegetal, entre 20% e 35% da composição dos LCM e é um polissacarídeo composto principalmente por xilano (1), possuindo grande variedade de aplicações biotecnológicas, como produção de biofilme (2), papel (3) e biocombustíveis. (4)

O xilano é um dos mais abundantes polissacarídeos naturais renováveis, sendo a celulose o mais abundante. Sua estrutura consiste em um esqueleto constituído de resíduos de D-xilopiranosil (Xylp) covalentemente ligados por meio de ligações β -1,4. A composição do xilano varia conforme sua origem, mas, em geral, apresentam substituintes como ácido glucurônico, estabelecendo ligações do tipo α -1,2, e resíduos de arabinofuranosil, com os quais estabelecem ligações do tipo α -1,3. (5)

A hidrólise do xilano produz xilose que é utilizada, por exemplo, na produção de xilitol, um adoçante comercial. Em reações controladas, tal hidrólise pode produzir também açúcares conhecidos como xilooligossacarídeos (XOs), que possuem tamanhos variados. Usualmente são considerados XOs oligômeros com entre 2 e 10 resíduos de xilose. (6)

Sabe-se que os XOs têm muitos impactos positivos na saúde humana e animal, como redução dos níveis de colesterol, melhoria na absorção de cálcio, regulação do metabolismo de lipídeos, diminuição das chances de desenvolvimento de câncer de cólon associado à atividade intestinal e até prevenção de cárries dentárias. (7-8) Seu impacto sobre o sistema digestivo é devido à sua propriedade pré-biótica, isto é, de promover o crescimento seletivo de bactérias benéficas constituintes da flora intestinal, como aquelas do gênero *Bifidobacterium*. (6) Adicionalmente, há evidências de que os XOs também possuem atividade antioxidante, devido à presença, em sua estrutura, de compostos como ácidos urônico e ferúlico. (9)

Na alimentação animal, por exemplo, XOs podem ser implementados na ração para animais domésticos, gado, suínos e galináceos. Estudos apontam que os xilooligossacarídeos possuem também efeito antibiótico, sendo que sua aplicação em conjunto com probióticos resultou na prevenção de doenças provocadas por bactérias como as do gênero *Salmonella*. (10-11)

Tendo em vista as propriedades dos XOs relacionadas à saúde, sua produção tem sido de interesse das indústrias alimentícia e farmacêutica. (12) Materiais lignocelulósico, de onde se pode obter XOs, são o principal constituinte de resíduos agroindustriais, fazendo com que seu custo seja atrativo. (13)

A primeira etapa para produção de XOs consiste na separação e parcial despolimerização da fração hemicelulósica, o que é feito por meio de um pré-tratamento. Existem diversas estratégias de pré-tratamento para biomassa lignocelulósica, como a auto-hidrólise, hidrólise ácida ou alcalina, pré-tratamento hidrotérmico, organosolv e explosão a vapor. Todos podem ser seguidos por uma etapa de hidrólise enzimática. (14)

Pré-tratamentos ácidos em geral removem a hemicelulose, mas, devido à sua agressividade, também degradam a fração celulósica, produzindo indesejados inibidores de fermentação como furfural e hidroximetilfurfural (HMF). Além disso, podem causar corrosão no equipamento a longo prazo. (15)

Por outro lado, pré-tratamentos alcalinos resultam na separação da lignina, com menos degradação de polissacarídeos. Soluções de hidróxido de sódio, hidróxido de potássio, hidróxido de amônio e hidróxido de cálcio são comumente empregadas para realizar esse pré-tratamento. (16) A solução alcalina rompe ligações éster que ligam as ramificações do xilano a seu esqueleto principal, causando solvatação da hemicelulose, modificação na estrutura da lignina, bem como inchaço e descristalização da fração celulósica, o que reduz sua interação com a lignina. (17)

O pré-tratamento hidrotérmico é uma alternativa barata e ecologicamente limpa, pois emprega apenas água como reagente. Fundamenta-se no fato de que o pH da água reduz quando sua temperatura aumenta, e também no fato de que ácido acético é liberado das ramificações do xilano, o que também contribui para redução do pH do microambiente. Tais condições propiciam a quebra das ligações covalentes dentro do biopolímero, especialmente na fração mais sensível, a hemicelulose. (18-19)

Uma vez que o xilano esteja isolado e parcialmente degradado, pode-se considerar realizar uma etapa de hidrólise enzimática, na qual hemicelulases catalisarão a clivagem do xilano em oligômeros. Um aspecto positivo dessa abordagem é o fato de que não há liberação de subprodutos indesejados, devido às condições brandas envolvidas nesse processo. (20-21)

Dada a variedade estrutural e química do xilano, é importante selecionar cuidadosamente enzimas adequadas para realizar a hidrólise. O banco de dados CAZy apresenta diversas famílias de glicosil hidrolases, de acordo com as similaridades de sequência e de enovelamento, que refletem relações evolutivas. (22) Até novembro de 2020,

120 famílias consolidadas de glicosil hidrolases podem ser encontradas no [website do CAZy](#). Cada grupo age de diferente maneira no esqueleto do polímero ou nas ramificações. Endo- β -1,4-xilanases (EC 3.2.1.8) clivam aleatoriamente o esqueleto do xilano, enquanto β -1,4-xilosidases (EC 3.2.1.37) removem unidades de xilose das extremidades de um polissacarídeo ou de oligossacarídeos. Além dessas, α -glucuronidases (EC 3.2.1.139), acetil xilano-esterases (EC 3.1.1.72) e α -arabinofurosidases (EC 3.2.1.55) promovem a remoção de grupos laterais. As famílias GH8, GH10, GH11 e GH43, por exemplo, contemplam endo- β -1,4-xilanases enquanto GH6, GH51 e GH62 incluem enzimas bifuncionais. (23)

Após a obtenção de XOs da biomassa lignocelulósica, é importante realizar sua caracterização em termos de grau de polimerização e pureza. XOs com diferentes propriedades são adequados para diferentes aplicações. Por exemplo, na indústria alimentícia, XOs com baixo grau de polimerização (2-4) são desejáveis devido ao seu sabor levemente adocicado, baixo valor calórico, odor neutro e estabilidade em amplas faixas de pH e temperaturas. (24-25) No que tange o efeito pré-biótico dos XOs, há evidência de que XOs de curto grau de polimerização assumem papel fundamental no estímulo do crescimento de bactérias do gênero *Bifidobacterium*. (6-26) De maneira geral, os métodos de produção de XOs produzem oligômeros com grau de polimerização entre 2 e 6. (27)

O presente estudo, que abrange métodos de produção de XOs, é relevante no contexto de seus bem-conhecidos benefícios para a saúde humana e animal, bem como sua ampla variedade de aplicações. O potencial de exploração é destacado em países como o Brasil, cuja agricultura é uma atividade econômica de expressão. O desenvolvimento de uma metodologia eficiente para isolamento de hemicelulose e produção de XOs a partir de materiais lignocelulósicos, como bagaço de cana-de-açúcar (SCB) pode ajudar a melhorar e consolidar o uso desses oligossacarídeos de maneira funcional.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Produção de XOs exclusivamente a partir de pré-tratamentos em bagaço de cana de açúcar

O pré-tratamento da biomassa é uma etapa fundamental para avaliação da produção de xiloooligossacarídeos. Estes, podem ser produzidos após o próprio pré-tratamento ou após a aplicação de soluções enzimáticas sobre a fração hemicelulósica da biomassa pré-tratada, que deve estar acessível à ação das xilanases que promoverão sua hidrólise. Trataremos agora do primeiro caso. O esquema da figura 1 resume as possíveis alternativas para produção de XOs.

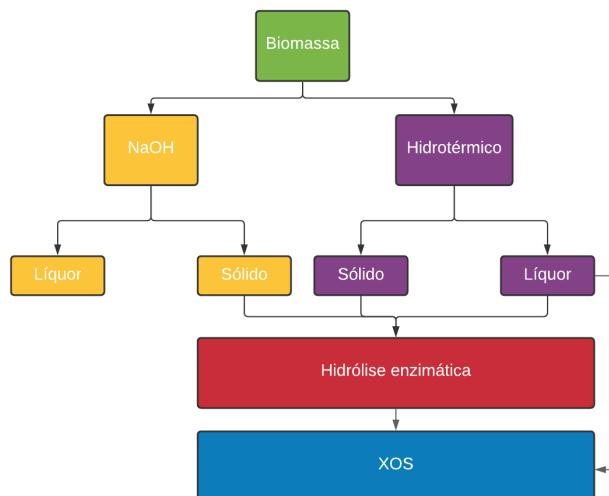


Figura 1 - Esquema representativo das rotas de produção de XOs que serão testadas neste trabalho.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A fim de analisar a produção de XOs a partir do pré-tratamento de biomassa, realizamos nosso estudo inicial com bagaço de cana, cedido pela empresa colaboradora Cosan Group-Raízen, sediada em Piracicaba-SP. Antes de qualquer procedimento a ser descrito a seguir, foi feita a lavagem da amostra, colocando-a em água a 50 °C por cerca de 5 minutos. Esse processo foi repetido por 4 vezes e tem por finalidade remover açúcares e impurezas da superfície da biomassa. Após a lavagem, o bagaço foi deixado em uma estufa de circulação a 40 °C até que a umidade atingisse um teor abaixo de 10%, o que correspondeu a cerca de 5 dias. Finalmente, a biomassa foi moída em um moinho de facas e armazenada em sacos plásticos a temperatura e umidade ambientes.

Para fins comparativos realizamos dois tipos de pré tratamentos: pré-tratamento alcalino e pré tratamento hidrotérmico. O pré-tratamento alcalino é frequentemente usado

para fazer a extração da lignina da biomassa. Esse processo aumenta a acessibilidade à celulose e à hemicelulose, que pode ser útil quando se pretende empregar enzimas para promover a hidrólise dessas estruturas, por exemplo.

Esse pré-tratamento foi realizado da seguinte forma: em um erlenmeyer de 500 mL foram colocados 30 gramas de biomassa (massa seca). Em seguida, adicionou-se 300 mL de solução de NaOH (1% m/v), de maneira que a razão sólido/líquido fosse de 1 g : 10 mL. Com auxílio de um bastão de vidro, a biomassa foi misturada à solução alcalina. Então, o erlenmeyer foi selado com papel alumínio e levado à autoclave, onde permaneceu por 40 minutos a 120 °C, contados a partir do momento em que a temperatura foi atingida.

Após a despressurização da autoclave e resfriamento das amostras, coletou-se uma alíquota do líquor, que foi diluída duas vezes para análise da presença e quantificação de XOs. Procedeu-se a lavagem da biomassa, com água corrente até a neutralização do pH. Por fim, a biomassa pré-tratada foi colocada em uma estufa de circulação, a 40 °C, para secagem e posterior caracterização de sua composição química.

Já o pré-tratamento hidrotérmico tem por característica a extração da hemicelulose da biomassa, em contraste ao pré-tratamento alcalino, que remove lignina. O procedimento foi realizado em parceria com o professor Dr. Antonio Aprigio da Silva Curvelo (IQSC/USP), cujo laboratório, com estrutura e equipamentos adequados, foi gentilmente colocado à nossa disposição.

Para realizar o pré-tratamento hidrotérmico, foram pesados 70 gramas de bagaço de cana-de-açúcar lavado e moído (massa seca), que foram colocados em um reator Parr de alta pressão, de volume máximo 1 L, junto a 700 mL de água destilada (proporção sólido/líquido de 1 g : 10 mL). As condições empregadas foram estas: 160 °C, 1 hora e 73 psi, sob agitação de um motor, entre 240-250 RPM. Ao final do tempo estipulado, realizou-se um choque térmico, colocando o reator em um balde com gelo. O líquor foi separado da parte sólida por meio de filtração à vácuo. A parte sólida foi lavada até o volume de 1.160 L.

Então, o líquor foi diluído 2 vezes e analisado para presença e quantificação de XOs. A parte sólida, por sua vez, foi deixada na estufa de circulação a 40 °C para secagem e posterior caracterização de composição química.

2.2 Caracterização química da biomassa

As amostras de materiais lignocelulósicos, antes e após as diferentes estratégias de pré-tratamento, foram caracterizadas quanto à sua composição química de acordo com o método Klason, um dos mais utilizados em laboratórios e indústrias de celulose e papel (Horst et al., 2014; Ibáñez & Bauer, 2014). Com esse método, é possível obter a proporção de lignina insolúvel, lignina solúvel, celulose e hemicelulose da biomassa.

A metodologia já é bastante consolidada e aplicada em nosso grupo e consiste, em síntese, na realização de duas hidrólises consecutivas na biomassa, conforme descrito por Espírito Santo e colaboradores. A primeira é uma hidrólise com ácido concentrado (H_2SO_4 , 72%), a 45 °C, por 7 minutos sob agitação magnética, utilizando 2 gramas de biomassa (massa seca) para 15 mL de ácido. Essa hidrólise é interrompida com a adição de 275 mL de água Milli-Q, fazendo com que a concentração do ácido diminua para aproximadamente 4%. Essa mistura é levada à autoclave por 30 minutos a 120 °C, condições sob as quais ocorre a segunda hidrólise. Findado o processo na autoclave, realiza-se a separação das fases sólida e líquida por meio de filtração simples. A lavagem da parte sólida retida no filtro é feita até o volume de 500 mL. Essa solução resultante é diluída para análise em um sistema de cromatografia líquida de alta performance (HPLC), onde serão quantificados açúcares que compõem tanto a porção de celulose quanto a de hemicelulose. É a partir dessa solução, também, que é determinada a proporção de lignina solúvel. A lavagem prossegue para que não haja corrosão do papel filtro pelo ácido. Para isso, emprega-se cerca de 1.6 L de água Milli-Q. (18)

O sistema de cromatografia HPLC é equipado com um detector de índice de refração e uma coluna Aminex (HPX-87H, 300×7.8 mm, Bio-Rad, USA). O eluente utilizado foi ácido sulfúrico (H_2SO_4) 5 mM, com um fluxo de 0.6 mL/min, durante 60 minutos. Como padrões, foram utilizados arabinose, glicose, xilose e ácido acético, de maneira que a quantificação desses componentes foi possível com auxílio de uma curva de calibração adequada feita no equipamento. Com a concentração desses compostos, as concentrações de celulose e hemicelulose foram determinadas segundo estas relações:

$$C_{celulose} = 0.96 \cdot C_{glicose} \quad (1)$$

$$C_{hemicelulose} = 0.88 \cdot C_{xilose} + 0.7 \cdot C_{ácido\ acético} + 0.88 \cdot C_{arabinose} \quad (2)$$

Onde C representa a concentração do composto subscrito e os valores numéricos são fatores de correção estabelecidos na literatura, conforme apresentado por Kaar e colaboradores (1991).

Então, basta multiplicar as concentrações obtidas pelo fator de diluição da amostra, caso ela tenha sido diluída, dividir pela concentração de biomassa, em g/L e multiplicar por 100 para obter a proporção do componente. Matematicamente:

$$\%Componente = \frac{C_{componente} \cdot Fator\ de\ diluição}{C_{biomassa}} \cdot 100 \quad (3)$$

A quantificação de lignina insolúvel é feita pela pesagem do conteúdo retido no filtro após a separação da mistura previamente colocada em autoclave. O papel-filtro, junto com a parte sólida nele contida, são secos em mufla a 105 °C e a massa é aferida a cada hora, até que se observe uma massa mínima. Dessa massa deve ser subtraída a massa de cinzas de lignina, a ser determinada de maneira análoga ao método de determinação de cinzas totais, descrito em seguida.

Para quantificação de cinzas totais, colocou-se 1 grama de biomassa (massa seca) em um cadinho que, em uma mufla apropriada, foi submetido às temperaturas de 200 °C por 1 hora, 400 °C por 1 hora e 800 °C por 2 horas. Pesou-se então a quantidade de cinzas que restaram dentro do cadinho e foi calculada a proporção que tal massa representa da massa seca inicial.

Quanto à lignina solúvel, sua determinação foi feita desta forma: preparou-se uma solução composta por 2% (v/v) de NaOH 6.5 M e 5% da solução oriunda da filtração (500 mL iniciais). Tal solução tem sua absorbância medida por meio de espectrofotômetro em comprimento de onda de 280 nm. A conversão de absorbância em concentração é dada pela fórmula (Espírito Santo, 2015):

$$C = 4.187 \cdot 10^{-2} \cdot A - 3.279 \cdot 10^{-4} \quad (4)$$

Em que C é a concentração em g/L; $4.187 \cdot 10^{-2}$ Lg⁻¹cm⁻¹ corresponde à absorvidade da lignina; $3.279 \cdot 10^{-4}$ g/L é o coeficiente linear de tal absorvidade e A corresponde à absorbância medida a 280 nm. Vale ressaltar que a fórmula foi simplificada, desconsiderando concentrações de furfural e HMF.

Além de lignina insolúvel, lignina solúvel, celulose e hemicelulose, outro componente importante da biomassa são os extrativos, componentes orgânicos produtos do metabolismo vegetal, incluindo ácidos graxos, ésteres, álcoois, esteroides e hidrocarbonetos, por exemplo.

Sua extração frequentemente se faz com solventes orgânicos e água, ou por meio de pré-tratamentos (31).

2.3 Hidrólise enzimática

Após a aplicação de pré-tratamentos na biomassa, a ação de enzimas xilanases é facilitada, já que seu principal substrato (xilano) ficou mais exposto com a modificação na composição decorrente dos pré-tratamentos, conforme observamos nas caracterizações químicas. Para analisar esse aspecto e o poder das xilanases de produzir XOs com baixo grau de polimerização, que possuem propriedades pré-bióticas mais acentuadas, foram utilizadas 5 combinações de enzimas em 4 amostras diferentes, discriminadas na tabela 1.

As enzimas *PxXyn10A* (WP_053782506.1) e *PxXyn11B* (WP_053781844.1) são xilanases provenientes do organismo *Paenibacillus sp. A59*, uma bactéria xilanolítica do solo, cujas caracterizações bioquímica e biofísica foram apresentadas no trabalho de Ghio e colaboradores (32). A enzima MetXyn11 (ATY75129.1) é uma xilanase da família GH11 oriunda de metatranscriptoma de um consórcio de organismos degradadores de compostos derivados de cana de açúcar. Esta última foi caracterizada em nosso grupo (33).

Tabela 1 - Combinações de enzimas utilizadas e amostras de biomassa empregadas. Cada amostra foi submetida às 5 combinações enzimas.

Combinações de enzimas utilizadas	Amostras sujeitas à ação enzimática
<i>PxXyn10A</i> 125 µg/ml	Bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i> moído
<i>PxXyn11B</i> 125 µg/ml	Bagaço de cana-de-açúcar após pré-tratamento alcalino
MetXyn11 125 µg/ml	
<i>PxXyn10A</i> 62.5 µg/ml + <i>PxXyn11B</i> 125 µg/ml	Bagaço de cana-de-açúcar após pré-tratamento hidrotérmico
<i>PxXyn10A</i> 125 µg/ml + MetXyn11 62.5 µg/ml	Líquor obtido após pré-tratamento hidrotérmico

Fonte: Elaborada pelo autor.

A hidrólise enzimática foi feita sob pH 6.0, garantido por tampão fosfato 50 mM, e a 50 °C, que são condições ótimas determinadas para as enzimas, conforme dados obtidos nos testes de caracterização. A reação foi mantida sob agitação de 150 RPM, teve volume total de 5 mL e ocorreu por um período de 48 horas, com coleta de alíquotas também após 24 horas. Para amostras sólidas, foi respeitada a proporção entre sólido e líquido de 2% (0.1 g de biomassa, peso seco, para 5 mL de tampão fosfato com a enzima). No caso do líquor proveniente do pré-tratamento hidrotérmico, empregou-se 1.65 mL desse substrato, que, dada sua concentração de aproximadamente 0.06 g/mL, corresponderia a 0.1 g de biomassa. As mesmas cinco combinações enzimáticas foram realizadas e assim como no caso de substratos sólidos, o tampão fosfato 50 mM pH 6.0 completou o volume da reação para 5 mL. As reações foram realizadas em triplicata. Como controle, 5 mL do tampão fosfato foram adicionados a 0.1 g de biomassa, para o caso de substratos sólidos e, no caso do líquor proveniente do pré-tratamento hidrotérmico, 3.35 mL do tampão foram adicionados a 1.65 mL do líquor.

Ao final do tempo de reação, foram coletadas alíquotas do sobrenadante. Elas foram fervidas por 5 minutos, para cessar a reação com a desnaturação das enzimas, e centrifugadas para separação entre resíduos sólidos e a fração líquida. Esta última foi diluída 2 vezes e analisada para presença de XOs também pelo método cromatográfico de troca iônica de alta eficiência acoplada com detecção eletroquímica por amperometria pulsada (Dionex ICS-5000 HPAEC/PAD).

2.4 Detecção e quantificação cromatográfica de oligômeros após produção de XOs

A detecção dos oligômeros produzidos foi feita pelo método cromatográfico de troca iônica de alta eficiência acoplada com detecção eletroquímica por amperometria pulsada (Dionex ICS-3000 HPAEC/PAD). Tampão NaOH 100mM (tampão A) e tampão acetato de sódio 500 mM com NaOH 100 mM (tampão B) foram usados para a eluição das amostras, o fluxo foi de 0.3 mL/min a 30 °C, o volume de injeção foi de 1 µL e o tempo de corrida foi de 35 minutos.

Esse procedimento permite também uma quantificação dos xilooligossacarídeos produzidos, visto que além do cromatograma obtido para a mostra, também se obteve cromatogramas para padrões com oligômeros de X1 a X6 a 1 mg/mL, diluído 2x até a

concentração de aproximadamente 0.016 mg/mL (2^{-6} mg/mL). As áreas abaixo dos picos correspondentes a X1-X6 nas diversas concentrações foram determinadas pelo software Chromeleon™ 7.2.9 Chromatography Data System (Thermo Scientific Inc., Waltham, MA, EUA) e um gráfico (Figura 2) relacionando área e concentração foi obtido com auxílio do software OriginPro 2018 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, EUA). A esses dados, um *fitting* polinomial de terceiro grau foi feito e apresentou bom ajuste, com R^2 mínimo de 0.998 para a curva de X5. Quatro parâmetros foram determinados pelo software, o que permitiu conversão de valores de área em valores de concentração, segundo a equação geral abaixo.

$$[XOs] = B_3 \cdot A^3 + B_2 \cdot A^2 + B_1 \cdot A + C \quad (5)$$

Nessa equação, B_1 , B_2 e B_3 são coeficientes determinados pelo software, bem como C , que representa a interceptação das curvas no eixo Y. A é a área abaixo do pico no cromatograma. Os valores desses parâmetros estão na Tabela 2.

Tabela 2 - Valores dos parâmetros de *fitting* para o polinômio de terceiro grau correspondente a cada oligômero.

	B_1	B_2	B_3	C
X1	0,00124	1,09E-06	2,66E-09	-0,00142
X2	0,00321	-2,34E-06	1,05E-08	-0,00117
X3	0,0038	-2,56E-05	1,44E-07	-0,01642
X4	0,0052	-4,95E-05	3,83E-07	-0,01512
X5	0,00627	-8,23E-05	6,74E-07	-0,02645
X6	0,00515	-7,15E-05	7,71E-07	-0,01756

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para estimar os erros, $\Delta[XOs]$, o desvio padrão das áreas das triplicatas foi calculada e o erro foi propagado de acordo com esta relação, em que ΔA é o desvio padrão das áreas:

$$\Delta[XOs] = 3 \cdot B_3 \cdot A^2 \cdot \Delta A + 2 \cdot B_2 \cdot A \cdot \Delta A + B_1 \quad (6)$$

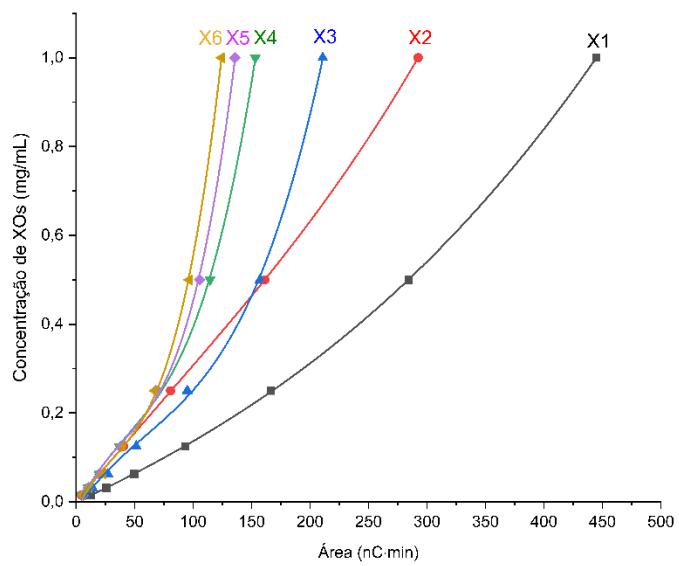


Figura 2 - Gráfico de dispersão que relaciona áreas obtidas nos cromatogramas e concentração de XOs. Cada cor representa um oligossacarídeo e a linha contínua representa o *fitting* polinomial de terceiro grau que melhor se ajustou aos dados.

Fonte: Elaborada pelo autor.

3 RESULTADOS

3.1 Caracterização química da biomassa

A caracterização química da composição da biomassa é fundamental para compreender a ação de cada tipo de pré-tratamento sobre a estrutura do bagaço de cana-de-açúcar e nos permitirá fazer previsões sobre as melhores condições para produção de xilooligossacarídeos.

Tabela 3 - Dados de composição química de bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e após submetida a pré-tratamentos. SCB-Alk e SCB-HT representam as frações sólidas resultante dos pré-tratamentos alcalino e hidrotérmico, respectivamente. A fração líquida também foi analisada (SCB-HT-Liq). Lignina total compreende lignina solúvel e lignina insolúvel.

	<i>In natura</i>	SCB-Alk	SCB-HT	SCB-HT (Liq)
Glucanos	(41.1 ± 0.1) %	(56.5 ± 0.5) %	(51.6 ± 0.5) %	0.6 mg/mL
Xilanos	(23.3 ± 0.3) %	(24.4 ± 0.3) %	(15.8 ± 0.1) %	5.2 mg/mL
Lignina total	(24.7 ± 0.5) %	(10.7 ± 0.7) %	(28.46 ± 0.05) %	4.3 mg/mL
Cinzas	(6.5 ± 0.2) %	(8.02 ± 0.09) %	(6.6 ± 0.4) %	
Extrativos	(7.0 ± 0.4) %	-	-	
Total	(103 ± 1) %	(100 ± 2) %	(103 ± 1) %	

Fonte: Elaborada pelo autor.

A constituição do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* determinada está em conformidade com aqueles estabelecidos na literatura (34,35). Isso valida os dados obtidos, bem como o método utilizado.

É possível notar que o pré-tratamento alcalino diminuiu significativamente a proporção de lignina, o que é esperado tendo em vista a forma como tal pré-tratamento modifica a estrutura do material lignocelulósico, desestruturando a lignina e tornando-a, assim, passível de ser solubilizada. Por outro lado, observou-se um incremento na proporção de cinzas, o que pode ser devido a resquícios de caráter salino decorrentes do pré-tratamento com NaOH.

Já o pré-tratamento hidrotérmico, que promove a hidrólise parcial do polímero de xilano, provocou uma redução da proporção de constituintes da hemicelulose, que pode ser

encontrada na fração solúvel. Em ambos pré-tratamentos, observou-se um aumento da proporção de celulose, que ocorreu como compensação da perda dos outros componentes e também ausência de extractivos, já que esses procedimentos removem metabólitos secundários.

3.2 Produção de XOs exclusivamente a partir de pré-tratamentos em bagaço de cana de açúcar

O gráfico da figura 3 revela que no líquor obtido após realizar pré-tratamento alcalino em bagaço de cana-de-açúcar é possível encontrar XOs como xilobiose e xilohexose. Os rendimentos obtidos por meio do pré-tratamento alcalino são baixos ao compararmos com aqueles obtidos com o pré-tratamento hidrotérmico, o que se deve ao fato de o pré-tratamento alcalino extraír principalmente a lignina. A hemicelulose, de onde se extraem os XOs, permanece na fração sólida, e não no líquor, que foi a fração analisada. Assim, o líquor proveniente do pré-tratamento alcalino não deve ser considerado como substrato para as xilanases e não foi submetido, portanto, à hidrólise enzimática.

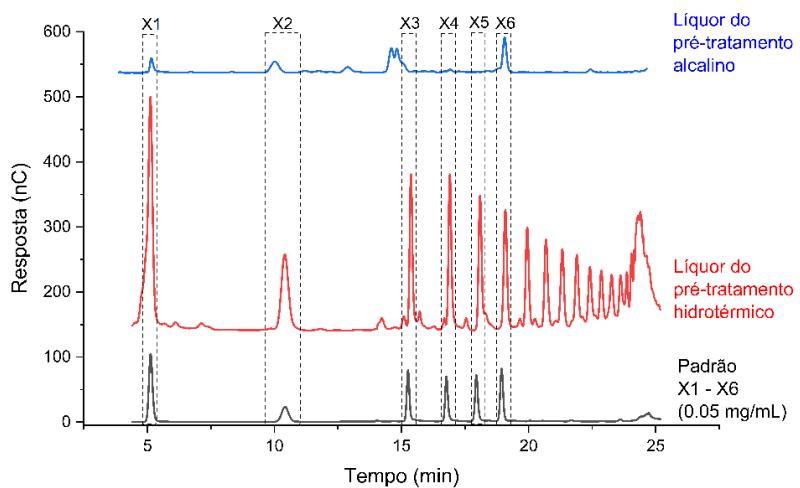


Figura 3 - Cromatograma onde são identificados e quantificados xiooligossacarídeos presentes no líquor provenientes dos pré-tratamentos realizados em bagaço de cana-de-açúcar.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os dados apresentados na forma de gráfico na Figura 3 evidenciam a presença de xiooligossacarídeos de múltiplos graus de polimerização no líquor extraído após realização

do pré-tratamento hidrotérmico em bagaço de cana-de-açúcar. As concentrações estimadas estão apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4 - Concentrações de XOs e xilose detectadas no líquor proveniente dos pré-tratamentos hidrotérmico (SCB-HT) e alcalino (SCB-Alk). Apenas o pré-tratamento hidrotérmico rendeu quantidades apreciáveis de XOs. N/D significa não detectado.

[XOs] (mg/mL)	SCB – HT (Liq)	SCB – Alk (Liq)
X1	0.25	0.03
X2	0.23	0.09
X3	0.13	N/D
X4	0.17	N/D
X5	0.16	N/D
X6	0.11	0.09

Fonte: Elaborada pelo autor.

Podemos observar que o líquor do pré-tratamento hidrotérmico rendeu 0.8 mg/mL de XOs, não contabilizando X1, enquanto o alcalino rendeu 0.18 mg/mL. A concentração mais elevada em comparação aquela obtida no pré-tratamento alcalino é consequência do fato de que o pré-tratamento hidrotérmico promove a extração de hemicelulose, que passa a compor o líquor, fração que foi analisada. A presença de oligossacarídeos com elevados graus de polimerização torna essa amostra (líquor do bagaço pré-tratado pelo método hidrotérmico) um alvo promissor para a aplicação das enzimas xilanases das famílias GH10 e GH11.

3.3 Hidrólise enzimática

A Tabela 5 registra as concentrações de XOs e xilose obtidas em cada hidrólise, separadas por substrato, por grau de polimerização e por combinação enzimática empregada.

Tabela 5 - Concentrações de XOs e xilose obtida em cada condição de hidrólise enzimática. As frações sólida e líquida oriundas do pré-tratamento hidrotérmico estão representados, respectivamente, por HT (sól) e HT (liq). Algumas condições empregam apenas uma enzima, enquanto outras empregam duas enzimas em conjunto. A condição *PxXyn10A + MetXyn11* foi a que rendeu maior quantidade de XOs em todos os substratos. N/D significa não detectado.

	Pré-tratamento	<i>PxXyn10A</i>	<i>PxXyn11B</i>	MetXyn11	<i>PxXyn10A</i> <i>PxXyn11B</i>	<i>PxXyn10A</i> MetXyn11
X1 (mg/mL)	Alcalino	0.07 ± 0.04	0.8 ± 0.2	N/D	0.4 ± 0.1	0.04 ± 0.05
	HT (sól.)	0.033 ± 0.004	0.016 ± 0.002	0.010 ± 0.006	0.08 ± 0.03	0.06 ± 0.01
	HT (liq)	0.45 ± 0.01	0.19 ± 0.01	0.10 ± 0.06	0.46 ± 0.01	0.4 ± 0.2
X2 (mg/mL)	Alcalino	1.06 ± 0.04	0.129 ± 0.007	N/D	0.5 ± 0.2	1.44 ± 0.05
	HT (sól.)	0.164 ± 0.002	0.182 ± 0.005	0.0156 ± 0.0006	0.36 ± 0.06	0.34 ± 0.02
	HT (liq)	1.49 ± 0.05	0.66 ± 0.02	0.65 ± 0.02	1.46 ± 0.04	1.7 ± 0.1
X3 (mg/mL)	Alcalino	0.25 ± 0.02	N/D	N/D	0.010 ± 0.005	0.21 ± 0.01
	HT (sól.)	0.111 ± 0.002	0.156 ± 0.009	0.0017 ± 0.0002	0.11 ± 0.02	0.122 ± 0.003
	HT (liq)	0.293 ± 0.006	0.45 ± 0.01	0.114 ± 0.002	0.305 ± 0.002	0.31 ± 0.01
X4 (mg/mL)	Alcalino	0.0192 ± 0.0007	N/D	N/D	N/D	0.017 ± 0.004
	HT (sól.)	0.053 ± 0.001	0.110 ± 0.003	0.0021 ± 0.0002	0.028 ± 0.005	0.038 ± 0.002
	HT (liq)	0.114 ± 0.003	0.329 ± 0.007	0.1281 ± 0.0005	0.116 ± 0.005	0.121 ± 0.009
X5 (mg/mL)	Alcalino	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
	HT (sól.)	N/D	0.021 ± 0.003	0.00065 ± 0.00008	N/D	N/D
	HT (liq)	0.012 ± 0.003	0.169 ± 0.007	0.102 ± 0.002	0.010 ± 0.005	0.01 ± 0.01
X6 (mg/mL)	Alcalino	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
	HT (sól.)	N/D	N/D	0.00012 ± 0.00006	N/D	N/D
	HT (liq)	N/D	0.0600 ± 0.0003	0.0805 ± 0.0004	N/D	N/D

Fonte: Elaborada pelo autor.

A hidrólise enzimática sobre bagaço de cana-de-açúcar *in natura* foi realizada e não produziu quantidades detectáveis de XOs, o que é esperado, dado que a estrutura da hemicelulose dessa amostra não está exposta à ação das xilanases, por estar associada à celulose e à lignina. Apenas materiais previamente sujeitos a algum tipo de pré-tratamento produziram XOs na presença de xilanases.

É possível observar que, de maneira geral, a hidrólise sobre o líquor proveniente do pré-tratamento hidrotérmico foi a que produziu as maiores concentrações de XOs. Nesse líquor os açúcares encontram-se livres e despolimerizados, o que explica a ação mais eficaz das enzimas sobre esse substrato. A melhor condição enzimática para os três substratos foi *PxXyn10A + MetXyn11*.

A amostra que passou por pré-tratamento alcalino gerou maiores concentrações de XOs que a fração sólida do pré-tratamento hidrotérmico, o que é razoável dadas as proporções de hemicelulose observadas na tabela 3.

Na melhor condição, foi possível obter (49.9 ± 0.4) mg de XOs por grama de biomassa inicial no caso pré-tratado com álcali. Para a fração sólida obtida através do pré-tratamento hidrotérmico, foram (19.1 ± 0.2) mg/g de XOs. Para o líquor obtido nesse mesmo pré-tratamento, obteve-se (6.5 ± 0.2) mg de XOs para cada mL desse substrato. Sabendo que foram gerados 1.160 L de líquor a partir de 70 g de biomassa inicial, isso significa que cada grama de biomassa gera (107 ± 3) mg de XOs por meio do líquor. Combinando as frações sólida e líquida, a hidrólise enzimática realizada após pré-tratamento hidrotérmico rendeu (127 ± 3) mg de XOs por grama de biomassa *in natura*.

Tendo em vista o objetivo de produzir XOs, o pré-tratamento hidrotérmico apresentou-se como alternativa mais eficiente quando em comparação com o pré-tratamento alcalino, especialmente ao combinarmos os rendimentos das hidrólises das frações sólidas e líquidas.

4 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os experimentos mostraram que XOs podem ser produzidos a partir de material lignocelulósico segundo várias rotas e utilizando diversos pré-tratamentos. Cada alternativa rende diferentes quantidades e perfis de XOs.

Diferentes estratégias de pré-tratamentos geram diferentes impactos sobre a biomassa, afetando sua composição química. O pré-tratamento alcalino reduziu a proporção de lignina, enquanto o hidrotérmico reduziu a proporção de hemicelulose.

O material lignocelulósico necessita passar por, pelo menos, um processo de pré-tratamento para que sua fração hemicelulósica se torne acessível às xilanases. Uma vez realizado o pré-tratamento, a hemicelulose estará na fração sólida, líquida ou nas duas, como observado no pré-tratamento hidrotérmico. A hidrólise enzimática foi efetiva para reduzir o grau de polimerização dos XOs obtidos apenas por meio do pré-tratamento.

Foi observado que o pré-tratamento hidrotérmico seguido de hidrólise enzimática resultou maiores quantidades de XOs, sobretudo quando combinamos as frações sólida e líquida, em comparação ao pré-tratamento alcalino seguido de hidrólise enzimática. Esse resultado é particularmente conveniente pois o pré-tratamento hidrotérmico é um procedimento considerado verde, uma vez que emprega apenas água, não gerando resíduos químicos que exigem descarte cuidadoso.

No sentido de ampliar ainda mais este estudo, um próximo passo é estabelecer metodologias para purificação de XOs, visando viabilizar e controlar melhor sua aplicação na indústria. Alternativamente, estudos podem ser desenvolvidos para averiguar o efeito pré-biótico de misturas de XOs, em contraste com os já demonstrados efeitos dos oligossacarídeos purificados e devidamente separados por tamanho.

REFERÊNCIAS

- 1 SMITH, P.J.; WANG, H.T.; YORK, W.S.; PEÑA, M.J.; URBANOWICZ, B.R. Designer biomass for next-generation biorefineries: leveraging recent insights into xylan structure and biosynthesis. *Biotechnology Biofuels*, v.10, p.1-14, 2017. DOI /10.1186/s13068-017-0973-z.
- 2 ALEKHINA, M.; MIKKONEN, K.S.; ALÉN, R.; TENKANEN, M.; SIXTA, H. Carboxymethylation of alkali extracted xylan for preparation of bio-based packaging films. *Carbohydrate Polymer*, v.100, p.89–96, 2014. DOI 10.1016/j.carbpol.2013.03.048.
- 3 FARHAT, W.; VENDITTI, R.; QUICK, A.; TAHA, M.; MIGNARD, N.; BECQUART, F. Hemicellulose extraction and characterization for applications in paper coatings and adhesives. *Industrial Crops and Products*, v.107, p.370–7, 2017. DOI 10.1016/j.indcrop.2017.05.055.
- 4 DUTTA, S.K.; CHAKRABORTY, S. Mixing effects on the kinetics and the dynamics of two-phase enzymatic hydrolysis of hemicellulose for biofuel production. *Bioresource Technology*, v.259, p.276–85, 2018. DOI 10.1016/j.biortech.2018.03.042.
- 5 DEUTSCHMANN, R.; DEKKER, R.F.H. From plant biomass to bio-based chemicals: latest developments in xylan research. *Biotechnology Advances*, v.30, p.1627–40, 2012. DOI 10.1016/j.biotechadv.2012.07.001.
- 6 SINGH, R.D.; BANERJEE, J.; ARORA A. Prebiotic potential of oligosaccharides: a focus on xylan derived oligosaccharides. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, v.5, p.19–30, 2015. DOI 10.1016/j.bcdf.2014.11.003.
- 7 BIAN, J.; PENG, P.; PENG, F.; XIAO, X.; XU, F.; SUN, R.C. Microwave-assisted acid hydrolysis to produce xylooligosaccharides from sugarcane bagasse hemicelluloses. *Food Chemistry*, v.156, p.7–13, 2014. DOI 10.1016/j.foodchem.2014.01.112.
- 8 PINTO NETO, F.S.P.; ROLDÁN, I.U.M.; GALÁN, J.P.M.; MONTI, R.; DE OLIVEIRA, S.C.; MASARIN, F. Model-based optimization of xylooligosaccharides production by hydrothermal pretreatment of Eucalyptus by-product. *Industrial Crops and Products*, v.154, p.112707, 2020. DOI 10.1016/j.indcrop.2020.112707.
- 9 VIEIRA, T.F.; CORRÊA, R.C.G.; PERALTA, R..A.; PERALTA-MUNIZ-MOREIRA, R.F.; BRACHT, A.; PERALTA, R.M. An overview of structural aspects and health beneficial effects of antioxidant oligosaccharides. *Current Pharmaceutical Design*, v.26, p.1759–77, 2020. DOI 10.2174/1381612824666180517120642.
- 10 DE FREITAS, C.; CARMONA E.; BRIENZO, M. Xylooligosaccharides production process from lignocellulosic biomass and bioactive effects. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, v.18, p.100184, 2019. DOI 10.1016/j.bcdf.2019.100184.
- 11 ASAHIARA, T.; NOMOTO, K.; SHIMIZU, K.; WATANUKI, M.; TANAKA, R. Increased resistance of mice to salmonella enterica serovar typhimurium infection by symbiotic administration of bifidobacteria and transgalactosylated oligosaccharides. *Journal of Applied Microbiology*, v.91, p.985–96, 2001. DOI 10.1046/j.1365-2672.2001.01461.x.
- 12 QIAN, S.; ZHOU, J.; CHEN, X.; J.I. W.; ZHANG, L.; HU, W. Evaluation of an efficient fed-batch enzymatic hydrolysis strategy to improve production of functional

- xylooligosaccharides from maize straws. *Industrial Crops and Products*, v.157, p.112920, 2020. DOI 10.1016/j.indcrop.2020.112920.
- 13 PINALES-MÁRQUES, C.D.; RODRÍGUEZ-JASSO, R.M.; ARAÚJO, R.G.; LOREDO-TREVINO, A.; NABARLATZ, D.; GULLÓN, B. Circular bioeconomy and integrated biorefinery in the production of xylooligosaccharides from lignocellulosic biomass: a review. *Industrial Crops and Products*, v.162, p.113274, 2021. DOI 10.1016/j.indcrop.2021.113274.
- 14 NAIDU, D.S.; HLANGOTHI, S.P.; JOHN, M.J. Bio-based products from xylan: a review. *Carbohydrate Polymer*, v.179, p.28–41, 2018. DOI 10.1016/j.carbpol.2017.09.064.
- 15 CHEN, J.; YUAN, Z.; ZANUSO, E.; TRAJANO, H.L. Response of biomass species to hydrothermal pretreatment. hydrothermal process. biorefineries, In: RUIZ, H.P.; THOMSON, M. H.; TRAJANO, H. L. *Hidrothermal processing in biorefineries*. New York: Springer International Publishing AG, 2017. p. 95–140. DOI 10.1007/978-3-319-56457-9.
- 16 BEHERA, S.; ARORA, R.; NANDHAGOPAL, N.; KUMAR, S. Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v.36, p.91–106, 2014. DOI 10.1016/j.rser.2014.04.047.
- 17 BRODEUR, G.; YAU, E.; BADAL,K.; COLLIER, J.; RAMACHANDRAN, K.B.; RAMAKRISHNAN, S. Chemical and physicochemical pretreatment of lignocellulosic biomass: a review. *Enzyme Research*, 787532, 2011. DOI 10.4061/2011/787532.
- 18 ESPIRITO SANTO, M.C. do. *Otimização de estratégias de pré-tratamento de bagaço de cana-de- açúcar para produção de etanol de segunda geração via hidrólise enzimática*. 2015.112p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2015.
- 19 ROY, R.; RAHMAN, M.S.; RAYNIE, D.E. Recent advances of greener pretreatment technologies of lignocellulose. *Current Research in Green and Sustainable Chemistry*, v.3, p.100035, 2020. DOI 10.1016/j.crgsc.2020.100035.
- 20 SANTIBÁÑEZ, L.; HENRÍQUEZ, C.; CORRO-TEJADA, R.; BERNAL, S.; ARMijo, B.; SALAZAR, O. Xylooligosaccharides from lignocellulosic biomass: a comprehensive review. *Carbohydrate Polymer*, v.251, 2021. DOI 10.1016/j.carbpol.2020.117118.
- 21 POLETTO, P.; PEREIRA, G.N.; MONTEIRO, C.R.M.; PEREIRA, M.A.F.; BORDIGNON, S.E.; DE OLIVEIRA, D. Xylooligosaccharides: transforming the lignocellulosic biomasses into valuable 5-carbon sugar prebiotics. *Process Biochemistry*, v.91, p.352–63, 2020. DOI 10.1016/j.procbio.2020.01.005.
- 22 GARRON, M.L.; HENRISSAT, B. The continuing expansion of CAZymes and their families. *Current Opinion in Chemical Biology*, v.53, p.82–7, 2019. DOI 10.1016/j.cbpa.2019.08.004.
- 23 WALIA, A.; GULERIA, S.; MEHTA, P.; CHAUHAN, A.; PARKASH, J. Microbial xylanases and their industrial application in pulp and paper biobleaching: a review. *3 Biotech*, v.7, p.1–12, 2017. DOI 10.1007/s13205-016-0584-6.
- 24 MEYER, T.S.M.; MIGUEL, Â.S.M.; FERNÁNDEZ, D.E.R.G.M.D.O. Biotechnological production of oligosaccharides — applications in the food industry. In: EISSA, A. A. (ed.) *Food production ans industry*. [S.I.]:IntechOpen, 2015.chap.2, p.3236.
- 25 VÁZQUEZ, M.J.; ALONSO, J.L.; DOMÍNGUEZ, H., PARAJÓ, J.C. Xylooligosaccharides: Manufacture and applications. *Trends in Food Science and*

- Technology*, v.11, p.387–93, 2000. DOI 10.1016/S0924-2244(01)00031-0.
- 26 SUWA, Y.; KOGA, K.; FUJIKAWA, S.; OKASAKI, M.; IRIE, T.; NAKADA, T. *Bifidobacterium bifidum proliferation promoting composition containing xylooligosaccharide*. Suntory Limited. US 5.939.309A. Deposit date: Aug.17,1999.
- 27 SAMANTA, A.K.; JAYAPAL, N.; JAYARAM, C.; ROY, S.; KOLTE, A.P.; SENANI, S. Xylooligosaccharides as prebiotics from agricultural by-products: Production and applications. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, v.5, p.62–71, 2015. DOI 10.1016/j.bcdf.2014.12.003.
- 28 ESPIRITO SANTO, M.; REZENDE, C.A.; BERNARDINELLI, O.D.; PEREIRA, N.; CURVELO, A.A.S.; DE AZEVEDO, E.R. Structural and compositional changes in sugarcane bagasse subjected to hydrothermal and organosolv pretreatments and their impacts on enzymatic hydrolysis. *Industrial Crops and Products*, v.113, p.64–74, 2018. DOI 10.1016/j.indcrop.2018.01.014.
- 29 KAAR, W.E.; COOL, L.G.; MERRIMAN, M.M.; BRINK, D.L. The complete analysis of wood polysaccharides using HPLC. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, v. 11, p.447–63, 1991. DOI 10.1080/02773819108051086.
- 30 BARBOSA, P.S. *Procedimentos para caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar: estudos para otimização e padronização*. 2018.71p. Dissertação (Mestrado em Ciências - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa 2018).
- 31 GHIO, S.; ONTAÑON, O.; PICCINNI, F.E.; MARRERO DÍAZ DE VILLEGAS, R.; TALIA, P.; GRASSO, D.H. *Paenibacillus sp. A59 GH10 and GH11 extracellular endoxylanases: application in biomass bioconversion*. *Bioenergy Research*, v.11, p.174–90, 2018. DOI 10.1007/s12155-017-9887-7.
- 32 EVANGELISTA, D.E. *Estudos funcionais e estruturais de pectinases e xilanases com potencial para aplicações biotecnológicas*. 2017.157p. Dissertação (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.
- 33 MARCONDES, W.F. *Integração da produção de xilo-oligossacarídeos como co-produto de alto valor agregado ao processo de produção de celulose nanofibrilada a partir do bagaço de cana-de-açúcar*. 2018.71p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2018.
- 34 YANG, R.; XU, S.; WANG, Z.; YANG, W. Aqueous extraction of corncob xylan and production of xylooligosaccharides. *LWT - Food Science and Technology*, v.38, p.677–82, 2005. DOI 10.1016/j.lwt.2004.07.023.