

Trabalho de Graduação

Curso de Graduação em Bacharelado em Engenharia Ambiental

**AVALIAÇÃO DA FONTE DE CARBONO NO PERFIL DE CRESCIMENTO DE  
MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS E METABÓLITOS PRODUZIDOS**

Mariana Damasceno Pazianoto

Orientador: Prof. Dr. Michel Brienzo

Coorientadora: Caroline Freitas

Rio Claro – SP  
2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
Instituto de Geociências e Ciências Exatas  
Câmpus de Rio Claro

MARIANA DAMASCENO PAZIANOTO

**AVALIAÇÃO DA FONTE DE CARBONO NO PERFIL DE  
CRESCIMENTO DE MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS E  
METABÓLITOS PRODUZIDOS**

Trabalho de formatura apresentado  
ao Instituto de Geociências e  
Ciências Exatas do Campus de Rio  
Claro, Universidade Estadual  
Paulista, como parte dos requisitos  
para obtenção do grau de Bacharel  
em Engenharia Ambiental.

Rio Claro – SP  
2023

P348a	<p>Pazianoto, Mariana Damasceno</p> <p>Avaliação da fonte de carbono no perfil de crescimento de microrganismos probióticos e metabólitos produzidos / Mariana Damasceno Pazianoto. -- Rio Claro, 2023</p> <p>52 p. : il., tabs.</p> <p>Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Engenharia Ambiental) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Geociências e Ciências Exatas, Rio Claro</p> <p>Orientador: Michel Brienzo</p> <p>Coorientadora: Caroline Freitas</p> <p>1. Xilana. 2. Xilo-oligossacarídeos. 3. Prebióticos. 4. Probióticos. 5. Fermentação. I. Título.</p>
-------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Geociências e Ciências Exatas, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

MARIANA DAMASCENO PAZIANOTO

**AVALIAÇÃO DA FONTE DE CARBONO NO PERFIL DE  
CRESCIMENTO DE MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS E  
METABÓLITOS PRODUZIDOS**

Trabalho de Graduação apresentado ao Instituto de Geociências e Ciências Exatas - Câmpus de Rio Claro, da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, para obtenção do grau de Bacharel em Engenharia Ambiental.

Comissão Examinadora

\_\_\_\_\_ (Michel Brienzo)

\_\_\_\_\_ (Danieli Canaver Marin)

\_\_\_\_\_ (Carolina Froes Forsan)

Rio Claro, 30 de novembro de 2023.

Assinatura do(a) aluno(a)

Assinatura do(a) orientador(a)

## **Dedicatória**

Dedico esse trabalho ao meu pai Heric Pazianoto (em memória) – seu orgulho pelas minhas conquistas foi o incentivo para a minha jornada. À minha família, Eliane, Dete, Eduardo e Pedro, por tornarem minha vida mais leve. Todos os obrigados do mundo não seriam suficientes.

## AGRADECIMENTOS

A conclusão desse curso é uma conquista que eu não realizei sozinha. De todas as pessoas que encontrei e esbarrei nessa trajetória, vocês, com certeza, são as que eu levarei pra toda a vida:

Prof. Dr. Michel Brienzo, pela paciência, orientação, atenção e auxílio em todas as etapas de desenvolvimento desse trabalho.

Dra. Caroline Freitas, pelo apoio e orientação desde a minha primeira iniciação científica. Sem a sua ajuda, esse trabalho não estaria concluído.

Prof. Dr. Marcus Cezar Avezum e Prof<sup>a</sup>. Dra. Vânia Rosolen, que carregam o curso de Engenharia Ambiental nos ombros, mas ainda assim dão tudo de si na orientação dos seus alunos.

Izabela Sabadin, que chegou bem no finalzinho, no olho do furacão dessa imensa jornada, mas que teve um papel fundamental nas risadas, nas conversas e nas fofocas! Eu sei que pode parecer meio clichê, mas a minha vontade de continuar estagiando, foi com certeza por conta de você. Obrigada!

Turma 019 da Engenharia Ambiental da UNESP de Rio Claro, sou muito grata por todos os momentos. Que nos encontremos em muitos outros!

Melissa Martins, que foi minha parceira apocalíptica de todas as horas. Uma mulher sábia de 87 anos em um corpo de 25! Obrigado por tantos ensinamentos e por me mostrar novas maneiras de viver o mundo.

Bruna Marques e Eduara Dias, quando disseram que passaria rápido, eu não dei ouvidos. Nunca imaginei que cinco anos das nossas vidas passariam tão depressa e que nos traria tantas mudanças. No entanto, foi graças a essas mudanças que nos adaptamos e pudemos encontrar a felicidade em cada nova chance. Amo vocês!

Gabriela Benedete, Victoria Miranda e Julia Torquato com vocês eu descobri o verdadeiro conceito de amizade. Vocês sempre foram o ombro pra chorar depois do fim do mundo. Obrigado por tudo e por tanto!

Raquel Vieira, Deus em forma de gente, psicóloga que transformou a minha vida e que ainda vai transformar por longos e longos anos. Obrigado por me mostrar que a vida é simples e linda!

Gabriel Chagas, meu lindo morango de Batatais. Se me dissessem, em 2019, que eu te conheceria, eu ia dar risada. Nunca imaginei que encontraria o amor da minha vida na universidade. De algum modo, minha alma conhecia a sua antes mesmo que tivéssemos tido a chance de nos encontrar (Foi como voltar para casa depois de um dia muito, muito longo). Te amo!

Minha mãe Eliane e minha vó Dete, dois grandes exemplos de mulheres fortes na minha vida; Tio Du, que foi meu pai em tantos momentos; Vitor, meu primo que cresceu comigo e eu considero irmão; Mazza, que esteve presente nas minhas grandes conquistas e Pedro, meu irmão que será sempre irmãozinho independentemente do tamanho: A gratidão e o amor que eu sinto por vocês é infinito. Vocês não entendem o privilégio que é poder existir no mesmo plano que vocês e ainda chamá-los de família. O esforço de vocês me fez ser o que sou hoje! Espero poder contribuir por todo carinho, cuidado e paciência.

Processo nº 2022/03960-4, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).



“(…) E assim seguem os dias à prova de planejamento e contrariando nossas vontades, pois, por mais que tenhamos ensaiado nossa fala e estejamos preparados para a melhor cena, nos bastidores do universo alguém troca nosso papel de última hora, tornando surpreendente a nossa vida. ”

(Martha Medeiros)

## RESUMO

A xilana é o polissacarídeo mais abundante dentre as hemiceluloses, com maior incidência em resíduos agrícolas e agroindustriais, e apresenta grande potencial econômico. Uma importante aplicação dessa macromolécula é a produção de xilo- oligossacarídeos (XOS), oligômeros de xilose reconhecidos por seu efeito prebiótico, além de diversas propriedades biológicas benéficas à saúde. O efeito prebiótico dos XOS se dá devido ao potencial de estimular o crescimento e multiplicação de microrganismos probióticos em detrimento dos patogênicos, devido a produção de metabólitos como ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). Nesse estudo, avaliou-se o potencial prebiótico de xilo- oligossacarídeos com o crescimento de microrganismos probióticos e também o perfil de metabólitos produzidos por cromatografia líquida. Os XOS foram produzidos por hidrólise enzimática de xilana solubilizada de pseudocaule de bananeira. A endoxilanase produzida por *Aspergillus versicolor* foi purificada e aplicada. Os XOS foram avaliados em diferentes concentrações para determinar o perfil de crescimento dos microrganismos *Lactiplantibacillus plantarum* e *Bifidobacterium longum*. Da mesma forma, os produtos metabólitos acetato, propionato e butirato foram avaliados em função do estímulo ao crescimento dos microrganismos. O crescimento dos microrganismos probióticos é reconhecido pela sua contribuição à saúde do hospedeiro. Entretanto, muitos dos benefícios à saúde são provenientes dos metabólitos produzidos pelos microrganismos. Este estudo elucidou o perfil de crescimento de microrganismos probióticos, relacionando-o com os metabólitos produzidos. Esta proposta está inserida no contexto do Projeto Temático de Fruto-refinaria (2017/22401-8), o qual visa o aproveitamento de polissacarídeos de resíduos de fruta.

**Palavras-chave: xilana, xilo-oligossacarídeos, prebióticos, probióticos, fermentação.**

## **ABSTRACT**

Xylan is the most abundant polysaccharide among hemicelluloses, with the highest incidence in agricultural and agro-industrial waste, and has great economic potential. An important application of this macromolecule is the production of xylo-oligosaccharides (XOS), xylose oligomers recognized for their prebiotic effect, as well as various biological properties beneficial to health. The prebiotic effect of XOS is due to their potential to stimulate the growth and multiplication of probiotic microorganisms to the detriment of pathogenic ones, due to the production of metabolites such as short-chain fatty acids (SCFA). The aim of this study was to evaluate the prebiotic potential of xylo-oligosaccharides with the growth of probiotic microorganisms and to assess the profile of metabolites produced by liquid chromatography. The XOS was produced by enzymatic hydrolysis of solubilized xylan from banana pseudostems. The endoxylanase produced by *Aspergillus versicolor* was purified and applied. The XOS was evaluated at different concentrations to determine the growth profile of the microorganisms *Lactiplantibacillus plantarum* and *Bifidobacterium longum*. Likewise, the metabolite products acetate, propionate and butyrate was evaluated according to their stimulation of microorganism growth. The growth of probiotic microorganisms is recognized for its contribution to the health of the host. However, many of the health benefits come from the metabolites produced by the microorganisms. This study will elucidate the growth profile of probiotic microorganisms, relating it to the metabolites produced. This proposal is part of the Fruit-refinery Thematic Project (2017/22401-8), which aims to use polysaccharides from fruit waste.

**Keywords: xylan, xylo-oligosaccharides, prebiotics, probiotics, fermentation.**

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Esquema simplificado da estrutura da parede celular vegetal.....	<b>15</b>
<b>Figura 2</b> - Diagrama representando a produção de xilo-oligossacarídeos a partir da hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos.....	<b>18</b>
<b>Figura 3</b> – Diagrama de estruturação do item 3: Materiais e métodos .....	<b>27</b>
<b>Figura 4</b> – Remoção de extrativos em sistema Soxhlet com etanol 96%.....	<b>29</b>
<b>Figura 5</b> – Remoção de extrativos em sistema Soxlet com água destilada .....	<b>30</b>
<b>Figura 6</b> – Fim da segunda remoção de extrativos realizada com água destilada .....	<b>31</b>
<b>Figura 7</b> – Plaqueamento em meio contendo xilana como fonte de carbono.....	<b>37</b>
<b>Figura 8</b> – Resultado da contagem de bactérias <i>Bifidobacterium longum</i> .....	<b>38</b>
<b>Figura 9</b> – Resultado da contagem de bactérias <i>Lactoplantibacillus plantarum</i> .....	<b>39</b>
<b>Figura 10</b> – Avaliação e quantificação dos metabólitos produzidos, utilizando glicose como fonte de carbono.....	<b>41</b>
<b>Figura 11</b> – Avaliação e quantificação dos metabólitos produzidos, utilizando xilose como fonte de carbono.....	<b>41</b>
<b>Figura 12</b> – Avaliação e quantificação dos metabólitos produzidos, utilizando FOS como fonte de carbono.....	<b>42</b>
<b>Figura 13</b> – Avaliação e quantificação dos metabólitos produzidos, utilizando XOS como fonte de carbono.....	<b>42</b>
<b>Figura 14</b> – Avaliação e quantificação dos metabólitos produzidos, utilizando xilana como fonte de carbono.....	<b>43</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Composição percentual do pseudocaule de bananeira.....	<b>16</b>
<b>Tabela 2</b> – Caracterização química do pseudocaule de bananeira.....	<b>32</b>
<b>Tabela 3</b> – Caracterização química da hemicelulose pseudocaule de bananeira.....	<b>33</b>
<b>Tabela 4</b> – Caracterização química da hemicelulose pseudocaule de bananeira com quantificação de XOS .....	<b>34</b>
<b>Tabela 5</b> – XOS produzidos com diferentes cargas de enzimáticas a partir da hemicelulose de pseudocaule de bananeira .....	<b>35</b>

## SUMÁRIO

<b>1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>15</b>
1.1 Biomassa Lignocelulósica.....	15
1.2 Hemiceluloses (Xilanas) .....	16
1.3 Hidrólise Enzimática.....	17
1.4 Xilo-oligossacarídeos.....	19
1.5 Metabólitos.....	21
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>21</b>
2.1 Objetivos específicos .....	22
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>22</b>
3.1 Remoção dos extrativos .....	22
3.2 Extração da hemicelulose.....	23
3.3 Caracterização química da biomassa e da hemicelulose.....	23
3.4. Quantificação dos açúcares provenientes da caracterização química.....	24
3.5. Cultivo do fungo <i>Aspergillus versicolor</i> e produção de xilanases .....	24
3.6. Remoção dos extrativos .....	24
3.7. Extração da hemicelulose.....	25
3.8. Caracterização química da biomassa e da hemicelulose.....	25
3.9. Quantificação dos açúcares provenientes da caracterização química.....	25
3.9.1. Quantificação dos açúcares provenientes da caracterização química .....	25
3.9.2. Quantificação dos açúcares provenientes da caracterização química .....	26
3.9.3. Quantificação dos açúcares provenientes da caracterização química .....	26
3.10. Cultivo do fungo <i>Aspergillus versicolor</i> e produção de xilanases .....	26
3.11. Quantificação dos açúcares provenientes da caracterização química.....	26
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>28</b>
4.1 Remoção dos extrativos .....	28
4.2 Caracterização química do pseudocaule de bananeira.....	32
4.3 Caracterização química da hemicelulose do pseudocaule de bananeira .....	33
4.4. Hidrólise enzimática .....	34
4.5. Fermentação <i>in vitro</i> de xilo-oligossacarídeos.....	36

4.6. Determinação do crescimento através do plaqueamento .....	37
4.7. Avaliação e quantificação de metabólitos produzidos.....	40
<b>5. CONCLUSÃO.....</b>	<b>45</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>46</b>

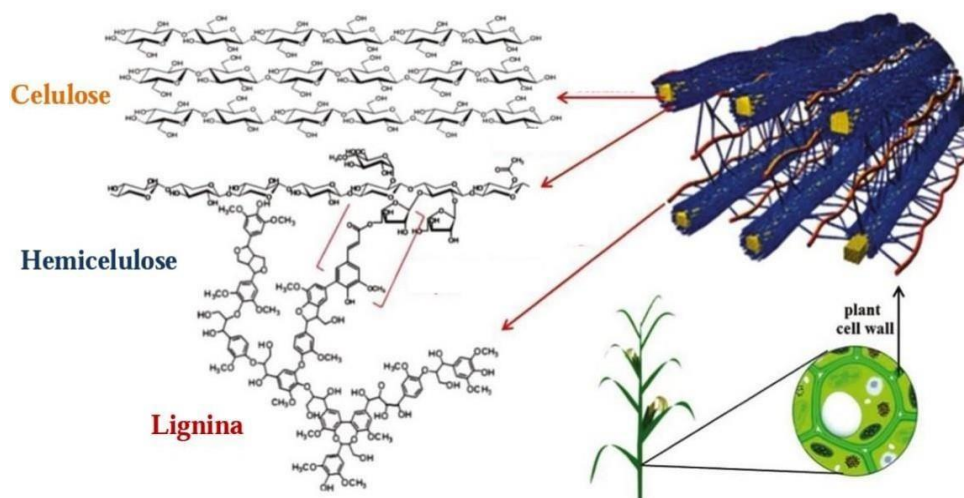
## 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1. Biomassa Lignocelulósica

A grande quantidade de plantas, cultivadas nos processos agroindustriais, geram um excesso de resíduos lignocelulósicos. Diversas agroindústrias têm realizado o aproveitamento de resíduos para a produção de subprodutos, se atentando à sua agregação de valor (COSTA FILHO et al., 2017). Entretanto, existem entraves que impedem a facilidade na utilização desse material, os quais necessitam ser resolvidos para sua exploração em potencial.

O termo “biomassa lignocelulósica” é utilizado para descrever um material formado da parede celular dos vegetais, que é composto, majoritariamente, por carboidratos (celulose e hemicelulose) e lignina. A composição química percentual de tais componentes nos diversos tipos de biomassa é bastante variável e dependente da espécie da planta, do tipo de tecido e até mesmo do estágio de desenvolvimento (GRACIOLI et al., 2018). Geralmente, na maioria das fibras vegetais, as porções de celulose e hemicelulose representam entre 40-50% e 15-30% da massa seca das plantas, respectivamente. Já a lignina pode corresponder a cerca de 10-30% da massa do resíduo vegetal (FREITAS, 2019). Um esquema estrutural da parede celular vegetal e a organização dos seus três principais componentes é mostrado na **Figura 1**.

**Figura 1.** Esquema simplificado da estrutura da parede celular vegetal.



**Fonte:** Gracioli, M. (2018).

Esse material pode ser utilizado no desenvolvimento de produtos com um alto valor agregado, como os prebióticos (FIGUEIREDO, 2016). Dentre os resíduos agroindustriais de frutas, o pseudocaule de bananeira é um dos maiores destaques no Brasil, devido a cultura da banana no território brasileiro e o reconhecimento do país como o quarto maior produtor mundial dessa fruta (EMBRAPA, 2023). Seu grau de umidade, assim como seu conteúdo de hemicelulose, celulose e lignina, podem variar de acordo com a espécie a ser estudada, como mostrado na **Tabela 1** (FREITAS, 2019).

**Tabela 1.** Composição percentual do pseudocaule de bananeira.

<b>Pseudocaule de bananeira</b>	<b>Celulose (%)</b>	<b>Hemicelulose (%)</b>	<b>Lignina (%)</b>	<b>Referência</b>
<i>Musa sapientum</i>	53,5	15,9	11,7	Roja & Neves (2002)
<i>Musa cavendishii</i>	37,1	12,6	13,3	Cordeiro et al. (2004)
<i>Musa acuminata</i>	34,5	25,6	12,0	Oliveira et al. (2007)

**Fonte:** FREITAS, C. (2019)

## 1.2. Hemiceluloses (xilanas)

O segundo componente mais abundante nos resíduos lignocelulósicos são as hemiceluloses, sendo o primeiro a celulose. A hemicelulose mais comumente encontrada na natureza é a xilana, polissacarídeo que apresenta grande potencial econômico e que tem apresentado cada vez mais aplicações (BRIENZO et al., 2016). As possibilidades do seu uso requerem sua prévia extração da biomassa e solubilização para poder convertê-la em bioprodutos, como prebióticos (xilo-oligosacarídeos), polímeros como xilofane, compostos de aplicação química e farmacêutica, e açúcares fermentáveis para a produção de etanol (FREITAS et al., 2019; FORSAN et al., 2021).

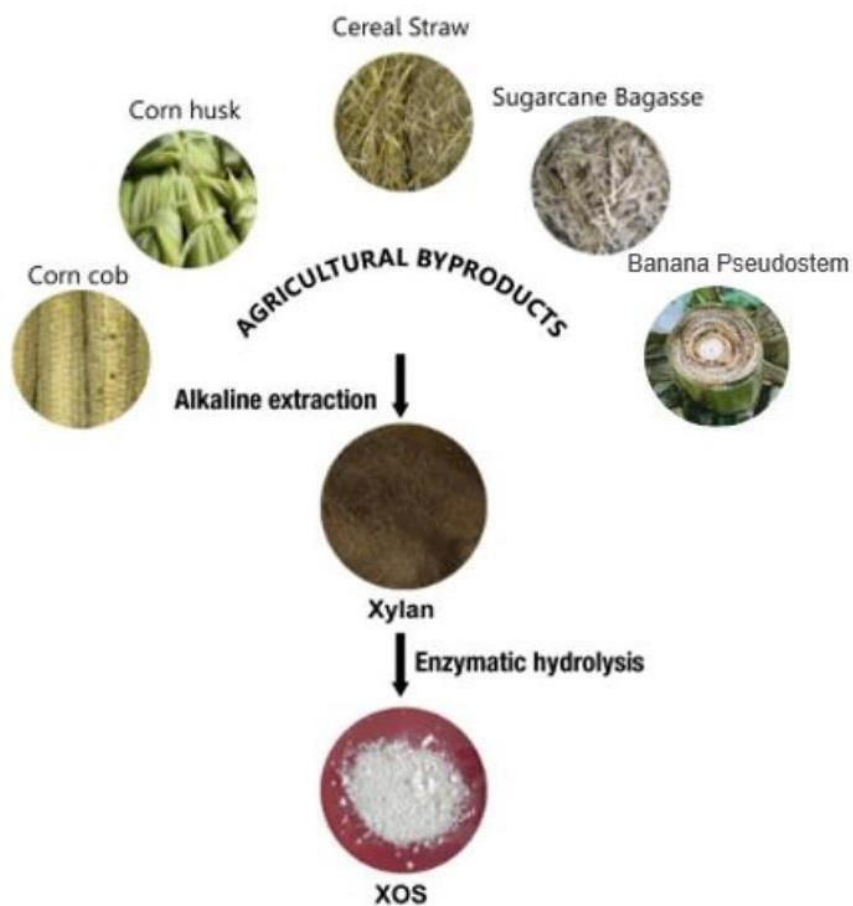
No pseudocaule de bananeira, o conteúdo de xilana pode chegar a 25% da massa seca (CORDEIRO et al., 2004). Por sua vez, a hidrólise das cadeias de xilana pode ocorrer através de métodos variados, utilizando agentes químicos e biológicos, temperatura ou uma combinação de técnicas para produzir xilo-oligossacarídeos (ÁLVAREZ et al., 2017; FREITAS et al., 2019; NAIDU et al., 2018).

### 1.3. Hidrólise Enzimática

A produção de xilo-oligossacarídeos ocorre através da quebra da ligação glicosídica da cadeia xilana. A hidrólise pode ocorrer usando reagentes químicos ou agentes biológicos, tais como enzimas. Diversos microrganismos produtores de xilanases têm sido reportados na literatura, tais como bactérias, fungos, leveduras e protozoários. Entretanto, os fungos filamentosos são os organismos mais utilizados, visto que são capazes de produzir elevados níveis dessas enzimas. Ademais, a vantagem na utilização dos fungos filamentosos também se dá devido a produção de diversas enzimas acessórias, juntamente as xilanases, necessárias para a quebra de demais grupos de xilanas, podendo promover a hidrólise completa molécula (GRACIOLI, 2018; KUMAR et al., 2017).

Para produção de XOS através da hidrólise enzimática, a xilana precisa ser previamente isolada dos outros componentes presentes no material lignocelulósico através de pré-tratamento, geralmente alcalino (FARHAT et al, 2017) ou oxidativo em meio alcalino (FREITAS, 2019; BRIENZO et al., 2009). Deste modo, a subsequente hidrólise enzimática gera XOS, e devido a especificidade enzimática, etapas de purificação não são necessárias porque produtos de degradação não são formados, conforme **Figura 2**.

**Figura 2.** Diagrama representando a produção de xilo-oligossacarídeos a partir da hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos.



**Fonte:** Adaptado de SAMANTA et al., 2015

A hidrólise enzimática da xilana é realizada pela enzima endo- $\beta$ -1,4-xilanase, preferencialmente sem atividade da enzima  $\beta$ -xilosidase, uma vez que o objetivo é a produção de oligômeros e não de monossacarídeos (xilose). No entanto, xilanases com diferentes especificidades de substrato geram diferentes produtos de hidrólise, havendo dificuldade em controlar o grau de polimerização dos XOS produzidos (AKPINAR et al, 2010). A enzima endo- $\beta$ -1,4-xilanase atua na cadeia da xilana e gera XOS com baixo grau de polimerização. Para a hidrólise completa da xilana, enzimas acessórias que atuam nas ramificações das cadeias são necessárias e a presença ou ausência dessas enzimas pode gerar XOS com ou sem ramificação (PUCHART; BIELY, 2008).

A bioconversão de resíduos agrícolas e agroindustriais através da hidrólise enzimática, ao contrário da hidrólise ácida e da auto-hidrólise, não requer alta pressão e/ou temperatura e, desse modo, não há formação de subprodutos das reações secundárias. A hidrólise enzimática de biomassa lignocelulósica é um processo amplamente estudado, uma vez que a bioconversão de resíduos agroindustriais, além de gerar moléculas de maior valor agregado, também pode auxiliar na redução do impacto ambiental causado por sua acumulação (BRIENZO et al, 2016).

#### **1.4. Xilo-oligossacarídeos**

Os xilo-oligossacarídeos (XOS) são oligômeros, derivados da xilana, formados por cadeias curtas de 10 unidades de xilose. São açúcares não digeríveis, o que significa que não são degradados no estômago humano e chegam intactos ao trato intestinal devido à falta de enzimas capazes de hidrolisar as ligações  $\beta$  no corpo humano. (FIGUEIREDO, 2016; GRACIOLI, 2018; DE FREITAS et al., 2019).

Esses oligossacarídeos possuem efeito prebiótico, o qual está relacionado com seu potencial seletivo de estimular a proliferação de microrganismos benéficos. Todavia, a propriedade prebiótica desses oligômeros é apenas uma das muitas propriedades biológicas que eles podem apresentar (CARVALHO et al., 2013).

Com o aumento na preocupação por uma alimentação saudável, e a popularização de alimentos funcionais, os XOS apresentam tendência para aumento de demanda, embora sua utilização seja uma realidade em poucos países (BRIENZO et al., 2016; GRACIOLI, 2018). Tais oligossacarídeos apresentam grande potencial de aplicações, especialmente na indústria farmacêutica, para controle da obesidade, prevenção de cáries, tratamento de infecções gastrointestinais, antioxidantes, imunoestimulantes, agentes ativos contra osteoporose, otite e disfunções da pele e cabelo; na indústria de alimentos, como alimentos funcionais, prebióticos e aditivos de ração animal; e na agricultura, como estimulantes e aceleradores de crescimento (GRACIOLI, 2018; DE FREITAS et al, 2021).

Os xilo-oligossacarídeos podem ser considerados prebióticos pois são capazes de aumentar o crescimento de micro-organismos probióticos (como *Lactopantibacillus* e *Bifidobacterium*), os quais produzem ácido graxos de cadeia curta e podem,

consequentemente, acabar reduzindo a atividade de bactérias nocivas e a concentração de produtos tóxicos da fermentação (SAMANTA et al., 2015). Estudos para avaliar os efeitos prebióticos têm sido feitos *in vitro* para humanos e animais, considerando os microrganismos comuns no intestino humano e animal e verificando o potencial de estimular o crescimento de microrganismos benéficos e inibir os patogênicos (BRIENZO et al., 2016).

De acordo com a International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP), o termo probiótico está relacionado a microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios a saúde do hospedeiro. Um prebiótico, por sua vez, é definido como um substrato que é seletivamente utilizado por microrganismos hospedeiros, conferindo-lhe benefícios a saúde. Entretanto, para ser um prebiótico, a substância deve afetar um grupo limitado de microrganismos no hospedeiro (SALMINEN et al., 2021). Os prebióticos são consumidos pelos probióticos, que os utilizam como fonte de energia. Desse modo, irão produzir e liberar pós-bióticos, ou metabólitos, produtos do metabolismo dos probióticos, que são definidos como a preparação de microrganismos inanimados e/ou os seus componentes que confere um benefício de saúde ao hospedeiro (SALMINEN, 2021).

Um dos critérios de seleção para probióticos é a produção de substâncias antimicrobianas. Entre essas substâncias estão não apenas metabólitos inibidores de crescimento, por exemplo, ácidos orgânicos e peróxido de hidrogênio, mas também bacteriocinas, inibidores de adesão e uma variedade de pequenas substâncias antimicrobianas (HILL et al., 2014). Alguns principais exemplos de microrganismos probióticos são *Bifidobacterium* (*Bifidobacterium bifidum*), *Lactobacteria* (*Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactoplatibacillus Plantarum*), *Enterococcus*, *Propionobacteria*, e *Peptostreptococci*, entre outros. Além disso, estes microrganismos restringem bactérias oportunistas tais como *Bacteroides*, *Clostridia*, *Bacilli*, *Fuzobacteria*, *Enterobacteriaceae*, *Eubacteria*, *Actinobacteria*, *Peptococci*, *Staphylococci*, *Streptococci*, leveduras e muitas outras, todas elas causando efeitos adversos sobre a saúde intestinal (PINALEZ-MÁRQUEZ et al., 2021).

Um indicativo do efeito prebiótico dos XOS é a produção de ácidos graxos de cadeia curta, como acetato, propionato e butirato, através da fermentação desses

compostos pelas bactérias que compõem a microbiota intestinal. O acetato é a fonte preferencial de energia metabolizável para os músculos, enquanto o propionato e butirato estão associados a distúrbios gastrointestinais de via inflamatória. Esses compostos representam cerca de 95% dos ácidos graxos de cadeia curta produzidos no trato gastrointestinal (LOUIS et al, 2007).

### **1.5. Metabólitos**

Um metabólito é o produto do metabolismo de organismos vivos, ou seja, o resíduo restante de um alimento após o aproveitamento da sua parte útil. Os metabólitos podem ser classificados em primários ou secundários. Os metabólitos primários são produtos do metabolismo que são essenciais para o crescimento bacteriano ou que são subprodutos do metabolismo energético, enquanto os metabólitos secundários não tem uma função óbvia no metabolismo celular (PEREDO-LOVILLO et al., 2020).

Os ácidos graxos de cadeia curta, particularmente o acetato, lactato, propionato e butirato são os principais metabólitos produzidos por fermentação anaeróbica pela microbiota intestinal. Os níveis mais elevados desses ácidos são encontrados no cólon proximal, onde são utilizados localmente por enterócitos ou transportados através do epitélio intestinal para a corrente sanguínea. O acetato e o lactato, os principais produtos metabólicos das bifidobactérias e lactobactérias, são utilizados por outros microrganismos para produzir, por exemplo, propionato e butirato. O butirato é considerado como um dos metabólitos mais importantes do cólon porque serve como fonte de energia para o colonócitos, tem propriedades anti-inflamatórias e expressão genética regulada (SANDERS et al.,2019; JIAN TAN et al., 2014).

## **2. OBJETIVOS**

Este estudo tem como objetivo determinar o efeito prebiótico de xilo-oligossacarídeos de pseudocaule de bananeira, no crescimento de microrganismos probióticos. O perfil de metabólitos produzidos por fermentação desses oligômeros será quantificado e relacionado à fonte de carbono.

## 2.1. Objetivos Específicos

- I. Extrair a hemicelulose do pseudocaule de bananeira;
- II. Produzir e purificar xilanases utilizando farelo de trigo como fonte de carbono, a partir do fungo filamentoso *A. versicolor*;
- III. Produzir xilo-oligossacarídeos por meio da hidrólise enzimática da hemicelulose extraída de pseudocaule de bananeira;
- IV. Realizar a fermentação *in vitro* de XOS através do cultivo de bactérias probióticas, utilizando os oligossacarídeos como fonte de carbono, assim como glicose, xilose, FOS, XOS e xilana de pseudocaule;
- V. Determinar o perfil de metabólitos resultantes da fermentação dos xilo-oligossacarídeos;
- VI. Correlacionar o crescimento dos microrganismos probióticos com os metabólitos produzidos em relação à fonte de carbono.

## 3. MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1. Remoção dos extrativos

O pseudocaule de bananeira foi moído e submetido a um processo de lavagem em sistema Soxhlet, que antecede a extração da hemicelulose. Este processo é utilizado para remoção de extrativos que podem estar presentes na biomassa e interferir na análise dos principais constituintes: hemicelulose, celulose e lignina. Cerca de 1g de amostra é colocada em saquinhos de papel filtro em sistema Soxhlet com etanol 96% por 8h e água destilada por mais 8h. (FREITAS, 2019).

### **3.2. Extração da hemicelulose**

Dez gramas da biomassa lignocelulósica (pseudocaule de bananeira) foram colocados em frascos de 1 L, seguido da adição de 200 mL de uma solução de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a 6 % (m/v). O pH foi ajustado em 11,6 com NaOH 5 mol/L, e o meio agitado a 150 rpm durante 24h sob temperatura de 25°C. Estas condições foram otimizadas para bagaço de cana-de-açúcar (BRIENZO et al., 2009).

Após o período de reação, as amostras foram filtradas. A fração sólida, rica em celulose, foi lavada com água destilada até se obter pH 7,0. A fração líquida, rica em hemicelulose, teve seu pH ajustado para 6,0 e foi colocada em estufa a 60°C para redução do volume a 1/3 do inicial. Com essa amostra de volume reduzido, foi feita uma diluição com etanol 96% (3 volumes), agitação e repouso para decantação do material em suspensão, as hemiceluloses. Posteriormente, o processo foi repetido três vezes com etanol 70%, até se obter uma fração líquida límpida. Em seguida, o material foi colocado para secagem em estufa a 45°C. O conteúdo seco foi triturado em almofariz para posterior utilização nos experimentos de caracterização química e hidrólise.

### **3.3. Caracterização química da biomassa e da hemicelulose**

Foi pesada, aproximadamente, 300 mg da biomassa lavada ou hemicelulose, em três frascos Scott de 100 mL (triplicata). À massa seca da amostra, foi adicionado 3,0 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 72 % (m/m), sendo a reação realizada a 45°C por 10 minutos em banho termostaticado. A reação foi interrompida pela adição de 84 mL de água destilada. Essa mistura/suspensão foi autoclavada a 121°C por 30 min. O conteúdo do frasco foi filtrado a vácuo. O material retido no filtro foi utilizado para quantificar a lignina insolúvel, por gravimetria. A lignina solúvel foi quantificada através da leitura da absorbância da fração líquida a 215 nm e 280 nm. A determinação do teor de glicose, xilose e arabinose foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (BRIENZO et al. adaptada, 2009). O mesmo procedimento foi realizado para a caracterização química da hemicelulose do pseudocaule de bananeira.

### 3.4. Quantificação de açúcares provenientes da caracterização química

As concentrações de glicose, xilose e arabinose foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência, em equipamento WATERS, nas seguintes condições: coluna BIO-RAD Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm); temperatura de 50°C; eluente: ácido sulfúrico 0,05 M com fluxo 0,6 mL/min; volume de amostra: 20 µL; detector: índice de refração (Waters 2414).

### 3.5. Cultivo do fungo *Aspergillus versicolor* e produção de xilanases

O meio de cultura sólido para produção de esporos foi preparado com a solução de sais de Vogel diluída 50 vezes em água destilada (v/v) suplementada com farelo de trigo na concentração de 3,0 % (m/v) e ágar 1,5 % (m/v). O meio foi distribuído em tubos de ensaio, autoclavados (20 min, 120°C, 1 atm) e inclinados. As culturas foram incubadas por 7 dias a 28°C para produção de conídios. Os conídios foram suspensos em água estéril destilada e a concentração da suspensão foi ajustada para 10 esporos/mL (CARMONA et al, 1997). Os meios líquidos para cultivo e produção enzimática foram preparados de acordo com Vogel (1956), contendo 1% (m/v) de xilana de farelo de trigo. Frascos erlenmeyers (125 mL), contendo 25 mL do meio, foram inoculados com 1,0 mL da suspensão de esporos e incubados de modo estático a 30°C por 5 dias (CARMONA et al, 1997). Após o crescimento em meio líquido, as culturas foram filtradas a vácuo em funil de Büchner. Desta forma, foi obtido o filtrado de cultura livre de células e micélio. O filtrado foi utilizado como preparação de proteínas e enzimas extracelulares.

### 3.6. Purificação da endoxilanase I produzida pelo *Aspergillus versicolor*

O filtrado da cultura obtido foi dialisado por cerca de 18 horas em tampão Tris-HCl 0,05 mol/L, pH 7,0. A amostra dialisada foi aplicada em uma coluna DEAE-Sephadex A-50, equilibrada com o mesmo tampão, para realização de cromatografia de troca iônica. As frações que apresentaram atividade xilanase foram reunidas (CARMONA et al, 1998).

A amostra obtida foi dialisada contra água, liofilizada, redissolvida em tampão fosfato de sódio 0,05 mol/L, pH 7,0 e aplicada em uma coluna Sephadex G-75,

equilibrada com o mesmo tampão, para realização de cromatografia de exclusão molecular. As frações que apresentaram atividade xilanase foram reunidas e, a amostra obtida novamente foi dialisada contra água e liofilizada (CARMONA et al, 1998).

### **3.7. Produção de XOS por hidrólise enzimática**

A reação foi conduzida com a endoxilanase I de *A. versicolor* produzida em meio contendo farelo de trigo e purificada (CARMONA et al, 1998), com tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 6) em banho-maria a 55°C com agitação de 120 rpm. A hidrólise enzimática ocorreu com os seguintes parâmetros: 50 UI/g de carga enzimática, 2% de substrato e 24 horas de reação, variando o volume de reação (5, 50, 100 e 200 mL). Após atingir o tempo reacional, os tubos foram aquecidos em banho-maria a 100°C durante 5 minutos. O hidrolisado foi filtrado com filtro de seringa 0,22 µm antes da injeção em CLAE para quantificação dos XOS.

### **3.8. Determinação da concentração de oligossacarídeos**

As concentrações de oligossacarídeos foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência, em equipamento WATERS, nas seguintes condições: coluna BIO-RAD Aminex HPX-87C (300 x 7,8 mm); temperatura de 80°C; eluente: água ultrapura com fluxo 0,6 mL/min; volume de amostra: 20 µL; detector: índice de refração (Waters 2414). Foram utilizados como padrões soluções de xilose (Sigma) e de xilobiose (X2), xilotriose (X3), xilotetraose (X4) e xilopentaose (X5).

### **3.9. Fermentação *in vitro* de XOS**

#### **3.9.1. Meios de inoculação**

O crescimento dos microrganismos *Lactoplantibacillus plantarum* 1462 e *Bifidobacterium longum* ocorreu utilizando meio formulado MRS (DE MAN, ROGOSA, SHARP, 1960), o qual é constituído por, em g/L: glicose 20g, peptose proteona 10g, extrato de carne 10g, extrato de levedura 5g, acetato de sódio 5g, fosfato dissódico 2g, citrato de amônio 2g, tween ® 80 1g, sulfato de magnésio 0,1g e sulfato de manganês 0,05 g. Posteriormente, o meio foi autoclavado a 121°C por 20 minutos.

Para culturas de Bifidobactérias, foi introduzida cisteína em uma concentração de 0,05% no meio.

### **3.9.2. Preparo do inóculo**

O crescimento foi mantido até que a suspensão atingisse o valor de absorvância de 1,0 no espectrofotômetro, isto é, valor equivalente a aproximadamente  $10^8$  células/mL para os *Lactiplantibacillus* e *Bifidobacterium*. Após obter essa suspensão e células, foi realizada sua respectiva diluição até se obter  $10^5$  células/mL. Para garantir que a quantidade inicial de células/mL dos experimentos fosse conhecida, foi realizado plaqueamento e contagem de colônias da suspensão de células após a diluição.

### **3.9.3. Crescimento em meio com diferentes fontes de carbono**

Diferentes fontes de carbono, a saber, glicose, xilose, xilana de pseudocaule de bananeira, fruto-oligossacarídeos (FOS) e xilo-oligossacarídeos (XOS), foram incorporadas ao meio na concentração de 20g/L. Como controle, utilizou-se o meio contendo glicose como fonte de carbono. Os microrganismos foram mantidos a 37°C, em triplicata, durante o período de 6 dias, onde foram coletadas duas amostras diárias. As alíquotas foram armazenadas em refrigerador para posterior análise e verificação de metabólitos produzidos em HPLC.

### **3.10. Determinação do crescimento através do plaqueamento**

Em tubos com solução salina, as amostras foram diluídas de maneira que a contagem de colônias nas placas ficasse entre 30 e 300 UFC/mL. As placas contendo os *Lactoplantibacillus* foram incubadas a 37°C por 3 dias, assim como as placas contendo *Bifidobacterium*. Em seguida, foi realizada a contagem das colônias nas placas e os resultados foram expressos na unidade UFC/mL.

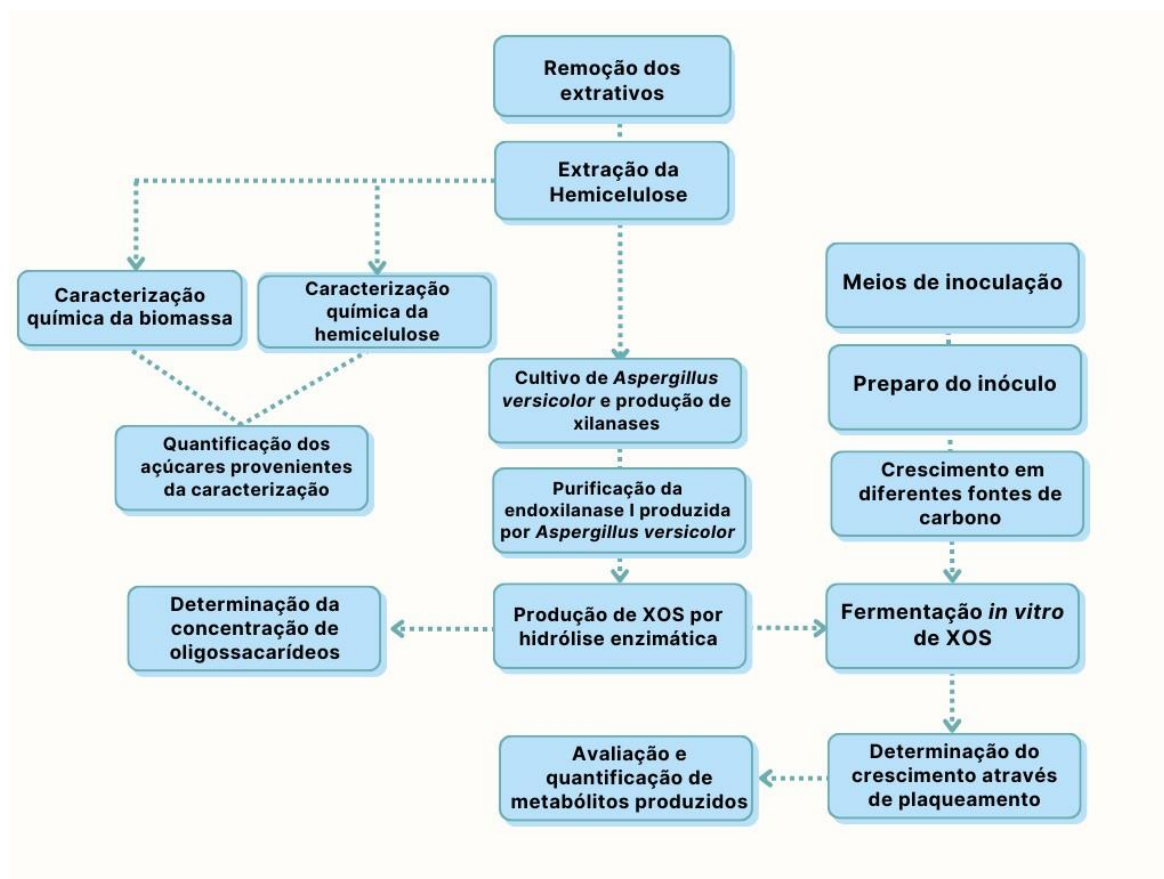
### **3.11. Avaliação e quantificação de metabólitos produzidos**

Após a fase de cultivo, as amostras foram submetidas a filtração usando um filtro de seringa de 0,22  $\mu\text{m}$ . Para avaliar a concentração de ácidos láctico, acético, butírico e propiônico no meio após o crescimento microbiano, foi realizada

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) utilizando uma coluna Shodex (SH-1011 Waters) em equipamento HPLC Waters. A análise foi realizada nas seguintes condições: temperatura de 50°C, taxa de fluxo de 0,6 mL/min usando uma solução de ácido sulfúrico de 0,005 mol/L como fase móvel e detecção por um detector de índice de refração.

Para melhor estruturação do item 3, materiais e métodos, a **Figura 3** exemplifica o diagrama de organização desse projeto.

**Figura 3.** Diagrama de estruturação do item 3: Materiais e Métodos



Fonte: Autora, 2023.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Remoção dos extrativos

O pseudocaule de bananeira apresenta grande quantidade de extrativos – compostos voláteis, solúveis, baixa massa molecular e que não fazem parte da composição da parede celular da planta – os quais podem ser facilmente removidos. Assim, para extrair a xilana com maior pureza, é importante que esses extrativos sejam previamente removidos. Por meio da lavagem, todo composto solúvel em meio aquoso pode ser extraído da biomassa. Os extrativos presentes na biomassa, se em grande quantidade, podem consumir reagentes nos processos de conversão (FREITAS, 2019).

Para essa etapa inicial, foi utilizado etanol como solvente para a lavagem da biomassa e água destilada. Ao utilizar etanol, primeiramente, observou-se que a coloração da água presente nos balões volumétricos do equipamento Soxhlet, ao final do procedimento, era mais límpida, como pode-se observar na **Figura 4**. Dessa maneira, realizou-se a segunda remoção com água destilada, o qual demonstrou uma mudança brusca de coloração já no início do processo (**Figura 5** e **Figura 6**) e, após sua finalização, foi perceptível o escurecimento dos balões volumétricos do equipamento.

Portanto, podemos inferir que os extrativos presentes no pseudocaule de bananeira são mais solúveis em água do que em etanol. No entanto, são necessários estudos dos componentes que podem estar presentes nos extrativos para concluir essa solubilidade. Estudos que descrevam e analisem a composição dos extrativos são escassos e, aqueles existentes, são voltados para biomassas da indústria canavieira (SZCZERBOWSKI, 2015).

**Figura 4.** Remoção de extrativos em sistema Soxhlet com etanol 96%



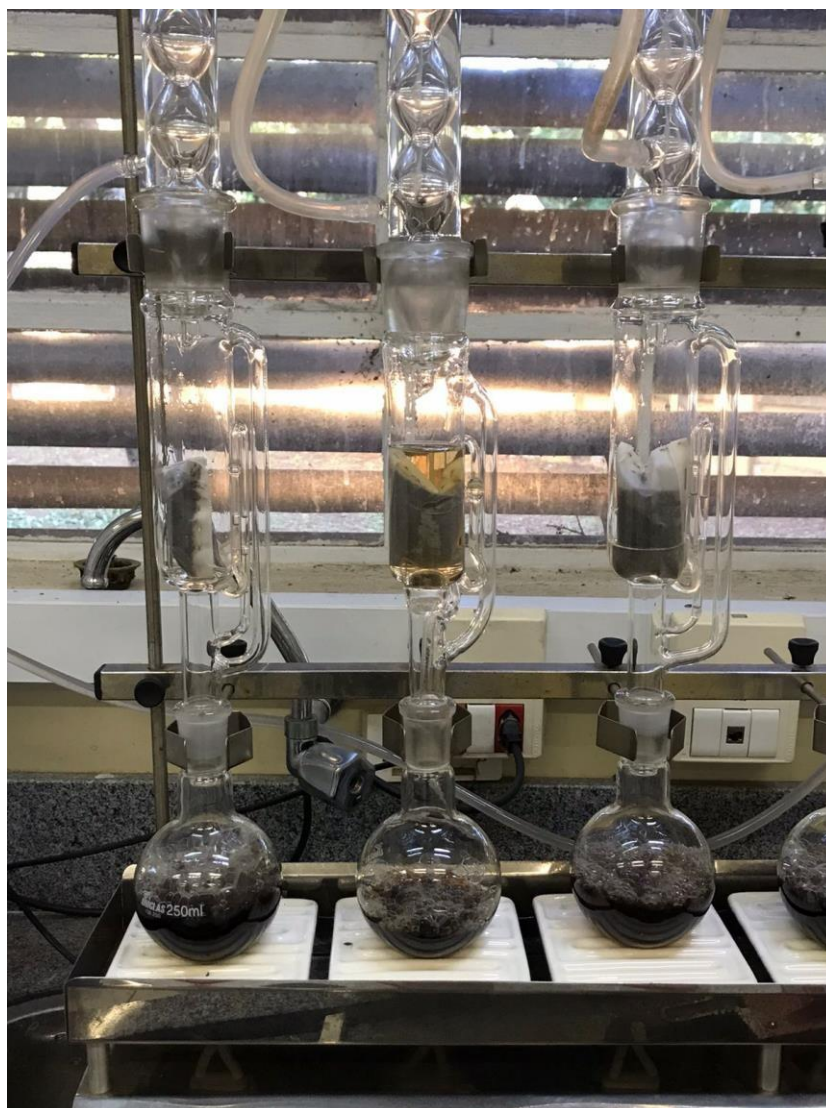
**Fonte:** Autora, 2023.

**Figura 5.** Remoção de extrativos em sistema Soxhlet com água destilada



**Fonte:** Autora, 2023.

**Figura 6.** Fim da segunda extração de extrativos realizada com água destilada.



**Fonte:** Autora, 2023.

#### **4.2. Caracterização química do pseudocaule de bananeira**

Previamente à caracterização, o material, obtido após remoção de extrativos utilizando água destilada a 80°C por uma hora, foi seco em estufa a 45°C a fim de remover o teor de umidade. A metodologia utilizada foi adaptada da metodologia para caracterização química

de biomassa para bagaço de cana-de-açúcar (IPBEN, 2017). Assim, foi caracterizada a biomassa quanto ao teor de carboidratos e lignina, de acordo com a **Tabela 2**. O procedimento foi realizado em triplicata e a média e o desvio padrão foram calculados.

**Tabela 2.** Caracterização química do pseudocaulo de bananeira

<i>Amostra</i>	<i>Lignina (%)</i>	<i>Celulose (%)</i>	<i>Hemicelulose (%)</i>	<i>Total (%)</i>
Pseudocaulo de bananeira	9,62	38,11	18,7	66,43
	±	±	±	±
	3,18	1,19	0,74	3,79

O conteúdo em lignina determinado foi de 9,62% para o material in natural e pode ser considerado inferior se comparados com valores observados nos trabalhos de Li et al (2010) e Preethi e Murthy (2013), os quais reportaram 10,8% e 17,9% de lignina, 71,8% e 53,4% de glicose e 11,2% e 14,1% de xilana, respectivamente. Em trabalhos de Díaz et al (2021) e Shimizu et al (2018), os valores encontrados para lignina de pseudocaulo de bananeira são de 7,92% e 16,4%, respectivamente. Ainda em Díaz et al (2021), foram encontrados valores entre 47,4% e 48,2% para celulose e 14,9% e 21,1% para hemicelulose.

Ademais, valores mais baixos em teor de lignina são comuns para esse tipo de biomassa, visto que sua estrutura não apresenta muita rigidez. O conteúdo de celulose apresentado nesse estudo também foi menor do que o reportado pelos autores. Por outro lado, a quantidade de hemicelulose foi semelhante. A partir do valor total, podemos perceber que o balanço de massa é inferior a 70%. A metodologia utilizada foi otimizada para caracterização de bagaço de cana-de-açúcar, e foi empregada neste estudo pois o pseudocaulo de bananeira é, ainda, uma biomassa pouco estudada e portanto, não há metodologias específicas para a mesma.

#### **4.3. Caracterização química da hemicelulose do pseudocaulo de bananeira**

Para essa etapa, utilizou-se a mesma metodologia da caracterização química da biomassa para determinar os teores de açúcares e lignina que compõe a hemicelulose do material estudado, conforme a **Tabela 3**.

**Tabela 3.** Caracterização química da hemicelulose do pseudocaule de bananeira, utilizando base massa seca.

<i>Amostra</i>	<i>Lignina (%)</i>	<i>Glicose/Glucana (%)</i>	<i>Hemicelulose (%)</i>	<i>Total (%)</i>
Hemicelulose do pseudocaule	1,924 ± 0,46	20,663 ± 2,92	17,604 ± 0,74	40,192 ± 3,72

A quantidade de hemicelulose é calculada pela soma da quantidade de xilose e arabinose – não houve formação de acetil.

É possível observar que o teor de lignina presente nessa amostra foi menor, uma diminuição de aproximadamente 80%. A redução da quantidade de lignina era esperada e é importante para posterior uso da xilana como substrato para hidrólise enzimática. Entretanto, a glicose se apresentou alta em relação a xilana e comparando-os com trabalhos anteriores, como Freitas (2019), o máximo valor obtido de hemicelulose, em uma amostra trabalhada com a mesma biomassa lignocelulósica é superior a 30%. No presente trabalho, a amostra tem porcentagem de xilana igual a 17,6%, resultado inferior. O balanço de massa total obtido foi em torno de apenas 40%, indicando que pode ter ocorrido algum erro na análise. Desse modo, foi necessário nova caracterização para confirmar os resultados.

Constatou-se que ainda haviam XOS nas amostras após a hidrólise enzimática do pseudocaule, o que indica que esse método não foi suficiente para quebrar a cadeia da xilana em vários oligômeros. Devido a isso, foi quantificado o residual de XOS, em HPLC, e essa quantidade foi acrescentada nos cálculos da caracterização química da hemicelulose do pseudocaule de bananeira, de acordo a **Tabela 4** abaixo.

**Tabela 4.** Caracterização química da hemicelulose do pseudocaule de bananeira, utilizando base massa seca, com quantificação de XOS.

<i>Amostra</i>	<i>Lignina</i> (%)	<i>Glicose</i> (%)	<i>Xilose</i> (%)	<i>Hemicelulose</i> <i>Total (%)</i>
Hemicelulose	1,92	20,66	41,48	64,07
do	±	±	±	±
pseudocaule	0,46	2,92	3,33	6,31

A quantidade de hemicelulose é calculada pela soma da quantidade de xilose e arabinose – não houve formação de acetil.

O balanço de massa total obtido foi superior do que o balanço da caracterização anterior, com uma diferença de, aproximadamente, 24%. Novamente, isso pode ser atribuído à circunstância em que a metodologia de caracterização química foi aprimorada especificamente para o bagaço de cana-de-açúcar, demonstrando resultados inferiores na avaliação quantitativa da hemicelulose presente no pseudocaule da bananeira.

#### **4.4. Hidrólise enzimática**

Este procedimento foi realizado utilizando 2% de substrato durante um período de 24 horas, entretanto variando os parâmetros de volume de reação: 5 mL, 50 mL, 100 mL e 200 mL. Na **Tabela 5**, é possível observar o grau de polimerização dos XOS produzidos na hidrólise enzimática e a concentração de cada um.

**Tabela 5.** XOS produzidos com diferentes cargas de enzimáticas a partir da hemicelulose de pseudocaule de bananeira

<i>Volume (mL)</i>	<i>XOS detectados</i>	<i>Concentração (g/L)</i>	<i>Conversão (%)</i>
<b>5</b>	X2	0,40	1,99
	X3	0,06	0,32
	X4	7,27	36,35
	X6 ou >X6	5,63	28,14
	<b>Total</b>	<b>13,36</b>	<b>66,8</b>
<b>50</b>	X2	0,81	4,03
	X3	0,24	1,20
	X5	9,89	49,45
	X6 ou >X6	5,17	28,63
	<b>Total</b>	<b>16,11</b>	<b>83,31</b>
<b>100</b>	X2	0,78	3,90
	X3	0,25	1,25
	X5	7,98	39,91
	X6 ou >X6	4,47	22,33
	<b>Total</b>	<b>13,48</b>	<b>67,39</b>
<b>200</b>	X2	0,83	4,13
	X3	0,33	1,67
	X5	9,25	46,76
	X6 ou >X6	5,13	25,64
	<b>Total</b>	<b>15,54</b>	<b>78,2</b>

X2: Xilobiose; X3: Xilotriose; X4: Xilotetraose; X5: Xilopentose; X6 ou >X6: Xilohexose ou maior

Ao compararmos as hidrólises enzimáticas, podemos observar que houve produção de xilo-oligossacarídeos com maior grau de polimerização: xilotetraose, xilopentose e xihexose/ou maior - diferentemente dos trabalhos anteriores de Akpınar, Erdoğan & Bostancı (2009), também utilizando xilanase de fungo do gênero *Aspergillus*, e Brienzo et al. (2010), com fungo *Thermoascus aurantiacus*, nos quais houve produção de XOS com menor grau de polimerização: xilobiose e xilotriose. No entanto, em trabalhos atuais, como Freitas et al. (2021), analisando produção de XOS por hidrólise enzimática utilizando como substrato xilana extraída do pseudocaule de bananeira e enzima purificada de *Aspergillus versicolor* sob diferentes parâmetros de carga enzimática (10 UI/g, 30 UI/g, 60 UI/g, 100 UI/g e 200 UI/g), também observou-se uma produção de xilo-oligossacarídeos com maior grau de polimerização: xilopentose e xilohexose – resultados, os quais, se aproximam com os deste projeto.

De acordo com Freitas et al. (2019), a enzima endo- $\beta$ -1,4-xilanase atua na estrutura da xilana e produz um baixo nível de polimerização de XOS. Algumas enzimas acessórias são necessárias para a hidrólise completa da hemicelulose, e, desse modo, sua presença ou ausência pode produzir XOS com ou sem ramificação. Os xilo- oligossacarídeos ramificados podem ser produzidos pela hidrólise de enzimas na ausência de enzimas acessórias, assim essa ramificação pode influir a taxa de hidrólise da xilana, que é altamente dependente da quantidade dessas enzimas.

Com os volumes de reação de 50 mL e 200 mL, observa-se as maiores concentrações de XOS, assim como elevada taxa de conversão, sendo, no total, 83,31 % e 78,20%, respectivamente. Com os volumes de 5 mL e 100 mL, verificamos concentrações menores de XOS, também com menor taxa de conversão, sendo 66,8% e 67,39%, respectivamente. Podemos considerar que, com volumes maiores, há maior produção de xilo- oligossacarídeos, já que houve maior concentração com 200 mL (15,54 g/L) do que com 5 mL e 100 mL (13,36 g/L e 13,48 g/L). No entanto, o volume de 50 mL foi uma exceção, com concentração de 16,11 g/L, os quais precisariam de mais análises para confirmar resultados.

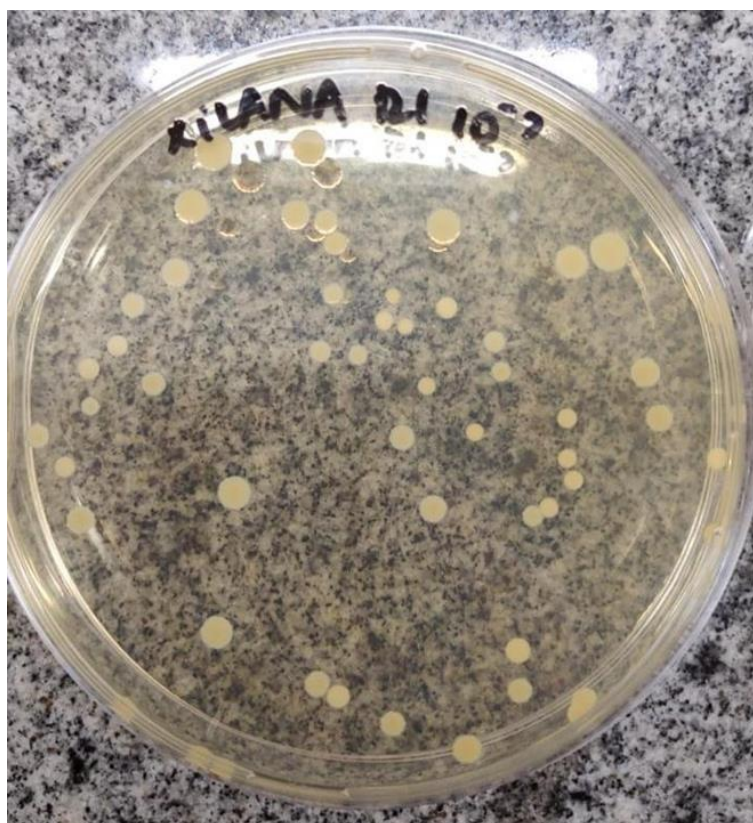
#### **4.5. Fermentação *in vitro* de xilo-oligossacarídeos**

Diversas espécies e linhagens de *Lactoplantibacillus* são reconhecidas como microrganismos probióticos (Aachary e Prapulla, 2010). A completa degradação de XOS (oligossacarídeos de xilose) de cadeia longa requer um efeito sinérgico entre diferentes enzimas, incluindo  $\beta$ -xilosidase,  $\alpha$ -glucuronidase,  $\beta$ -L-arabinofuranosidase e xilanase. Portanto, a capacidade dos microrganismos probióticos em utilizar XOS depende da eficácia de seu sistema enzimático xilanolítico. A presença de  $\beta$ -xilosidase e outras enzimas desse sistema já foi documentada em algumas cepas de *Lactoplantibacillus* (Chapla et al., 2012). Neste trabalho, foi avaliada a habilidade duas espécies de bactérias de utilizar XOS de cadeia longa como prebiótico.

#### **4.6. Determinação do crescimento através do plaqueamento**

A técnica de quantificação envolve a disseminação de bactérias e/ou leveduras em placas de cultura, seja por meio da técnica "Pour Plate" ou da técnica de superfície. Isso é feito com o propósito de estimar a quantidade de células que estão viáveis, ou seja, capazes de se reproduzir, em um meio de cultura apropriado. Cada colônia que se desenvolve em uma dessas placas representa uma unidade formadora de colônia (UFC) originada do material em questão. Devido à ampla flutuação na quantidade de microrganismos presente em uma amostra, frequentemente torna-se desafiante efetuar a contagem direta. Com o intuito de diminuir a densidade celular na amostra e facilitar a tarefa de contagem, empregam-se técnicas de diluição (VIEIRA et al., 2012). Neste trabalho, foram utilizadas técnicas de diluição em solução salina. A **Figura 7** exemplifica o plaqueamento em meio contendo glicose como fonte de carbono.

**Figura 7.** Plaqueamento em meio contendo xilana como fonte de carbono

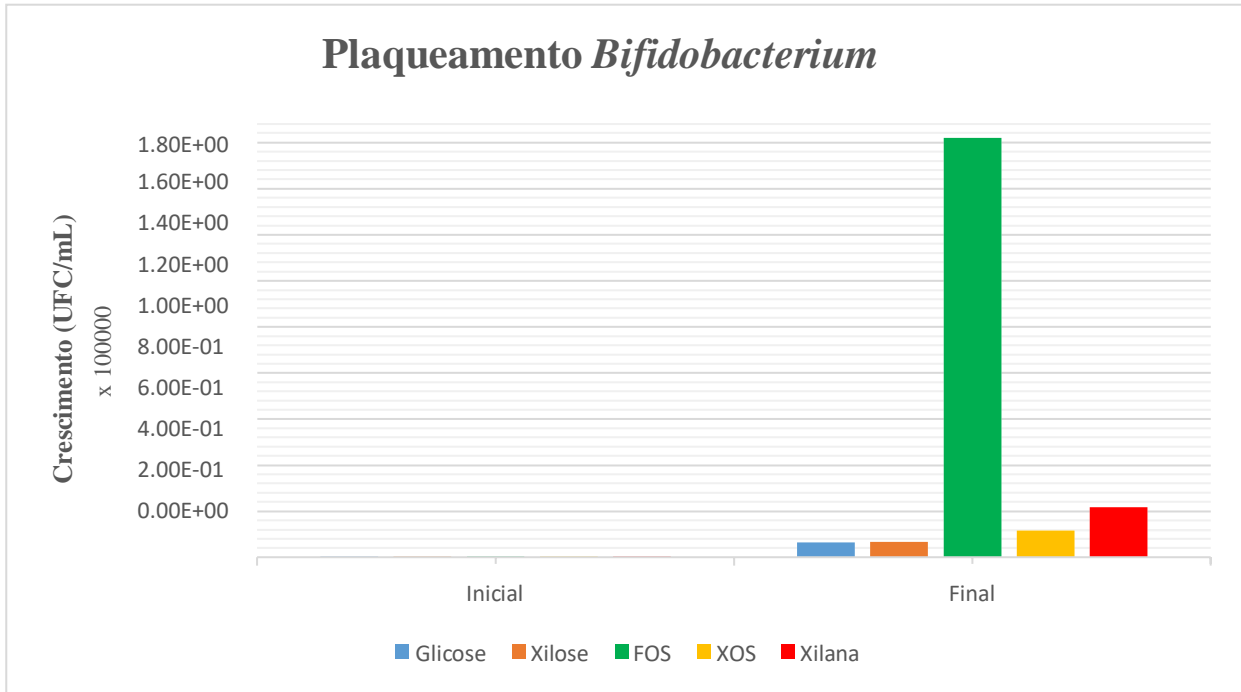


**Fonte:** Autora, 2023.

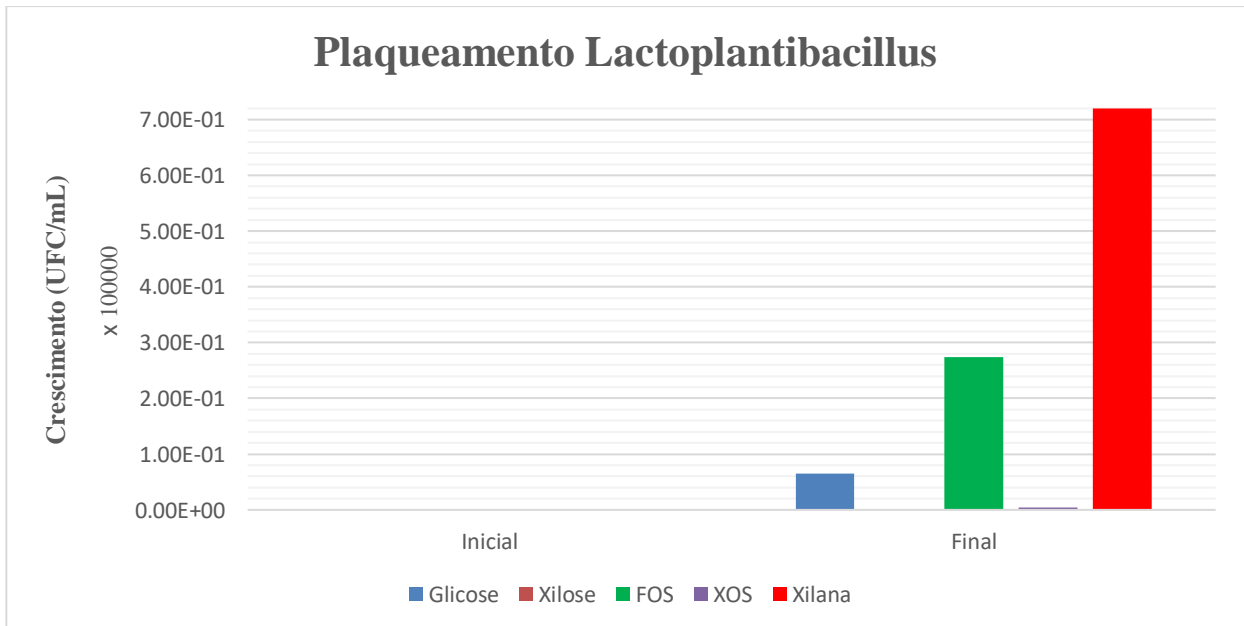
O meio contendo glicose foi considerado como controle, já que essa fonte de carbono é mais facilmente assimilada por microrganismos. A contagem das bactérias foi realizada

através da técnica de plaqueamento “pour plate”. O resultado do plaqueamento das bactérias probióticas *Lactoplantibacillus plantarum* e *Bifidobacterium longum* na presença de diferentes fontes de carbono se encontram nas **Figuras 8 e 9.**

**Figura 8.** Resultado da contagem de bactérias *Bifidobacterium longum*



**Figura 9.** Resultado da contagem de bactérias *Lactoplantibacillus plantarum*



A bactéria *B. longum* conseguiu se adaptar e crescer em todos os meios, no entanto o crescimento foi maior nos meios contendo FOS e xilana como fonte de carbono. As contagens nos meios de cultura contendo glicose (controle), FOS e xilana foram de  $6,5 \times 10^7$  UFC/mL,  $1,82 \times 10^8$  UFC/mL e  $2,18 \times 10^8$  UFC/mL, respectivamente. Ainda, o meio de cultura que utilizou XOS como fonte de carbono obteve um crescimento igual a  $1,18 \times 10^8$  UFC/mL. Já a bactéria *L. plantarum* também conseguiu se adaptar e crescer em todos os meios de cultura, porém o crescimento foi maior nos meios contendo xilana e FOS como fonte de carbono. As contagens nos meio de cultura contendo glicose, xilana e FOS foram de  $6,5 \times 10^7$  UFC/mL,  $7,2 \times 10^8$  UFC/mL e  $2,74 \times 10^8$  UFC/mL, respectivamente. Ademais, o meio de cultura contendo XOS como fonte de carbono obteve um crescimento igual a  $1 \times 10^7$  UFC/mL. Isto é, em relação ao crescimento com XOS, a bactéria *B. Longum* obteve o melhor desempenho, se comparado com a *L. plantarum*.

Não é habitual os valores de crescimento com glicose serem menores do que com as demais fontes de carbono, visto que essa é usada como controle em diversos estudos: De acordo com Figueiredo (2016), *B. longum* apresentou um crescimento satisfatório em meios que continham XOS e FOS, embora esse crescimento tenha sido inferior ao observado em meios que continham glicose e xilose. Para Mäkeläinen et al. (2010), foi demonstrado que *B. longum* preferiu fermentar FOS em meios que continham XOS e FOS, embora seu crescimento tenha sido menos robusto em comparação com os meios contendo glicose.

Logo, isso pode se dar ao fato de que a bactéria consumiu mais rapidamente a glicose do meio e, atingindo a fase de decaimento, ou morte celular, como consequência.

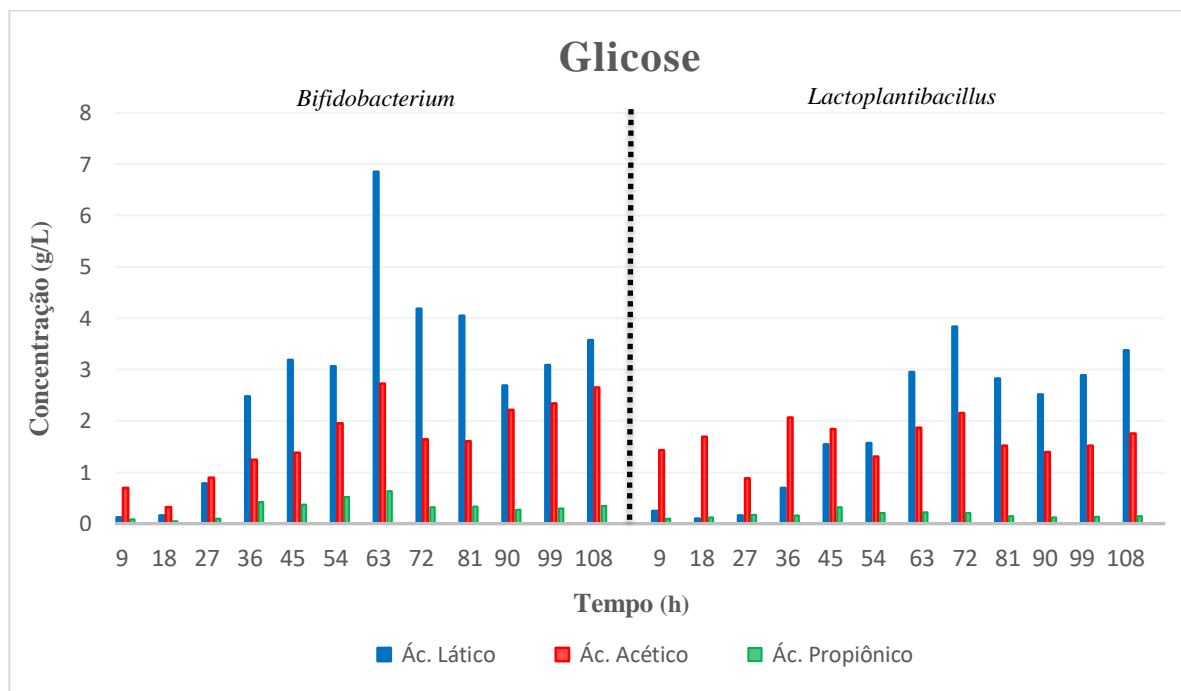
Para *L. plantarum*, os valores obtidos pelo crescimento com glicose e XOS também foram inferiores do que se comparados com demais estudos. Para Freitas (2019), a bactéria *L. plantarum* demonstrou sua capacidade de adaptação e crescimento em meios contendo tanto xilose quanto xilo-oligossacarídeos. Após um período de 72 horas, as contagens de unidades formadoras de colônias (UFC) nos meios de cultura que continham XOS e glicose atingiram  $5 \times 10^{11}$  UFC/mL e  $1 \times 10^{11}$  UFC/mL, respectivamente. Ainda, utilizando cepas de *L. fermentum* o crescimento na presença de XOS foi ligeiramente superior quando comparado com o controle (glicose), sendo  $3 \times 10^{10}$  e  $8 \times 10^{10}$  UFC/mL com glicose e XOS como fonte de carbono, respectivamente, após o período de 72 horas.

#### 4.7. Avaliação e quantificação de metabólitos produzidos

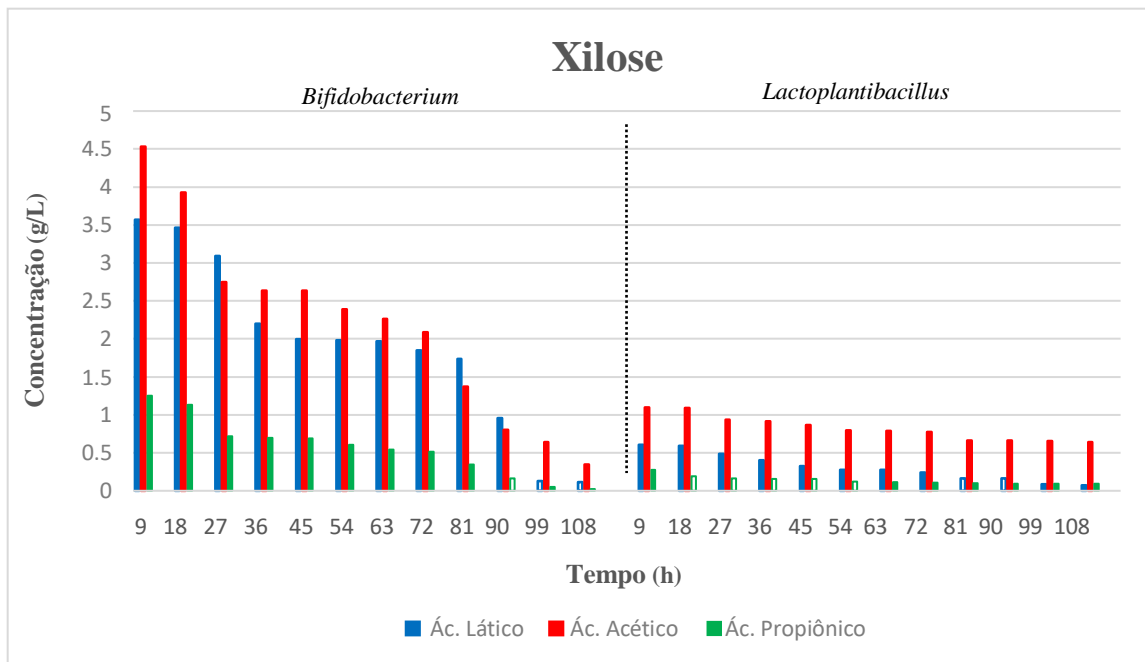
Os principais produtos metabólicos associados a *L. plantarum* e linhagens de *Bifidobacterium* são o ácido láctico e, no caso das bifidobactérias, também o ácido butírico. A produção de ácido láctico resulta do processo de fermentação realizado por bactérias lácticas, conferindo propriedades acidificantes, aromatizantes e conservantes aos alimentos (Altaf et al., 2005). Além disso, o ácido láctico desempenha um papel na redução da população de agentes patogênicos no intestino do hospedeiro (Saad, 2006). Por outro lado, é conhecido que as bifidobactérias liberam diversos ácidos graxos de cadeia curta, como o ácido acético e o ácido butírico, que diminuem o pH no intestino dos hospedeiros. Como resultado, um ambiente de pH reduzido inibe o crescimento de agentes patogênicos e promove a absorção de minerais, como o magnésio e o cálcio (Aachary e Prapulla, 2011).

O meio contendo glicose foi considerado como controle. O resultado da avaliação e quantificação dos metabólitos produzidos por *Lactoplantibacillus plantarum* e *Bifidobacterium longum* na presença de diferentes fontes de carbono se encontra nas Figuras 10, 11, 12, 13 e 14.

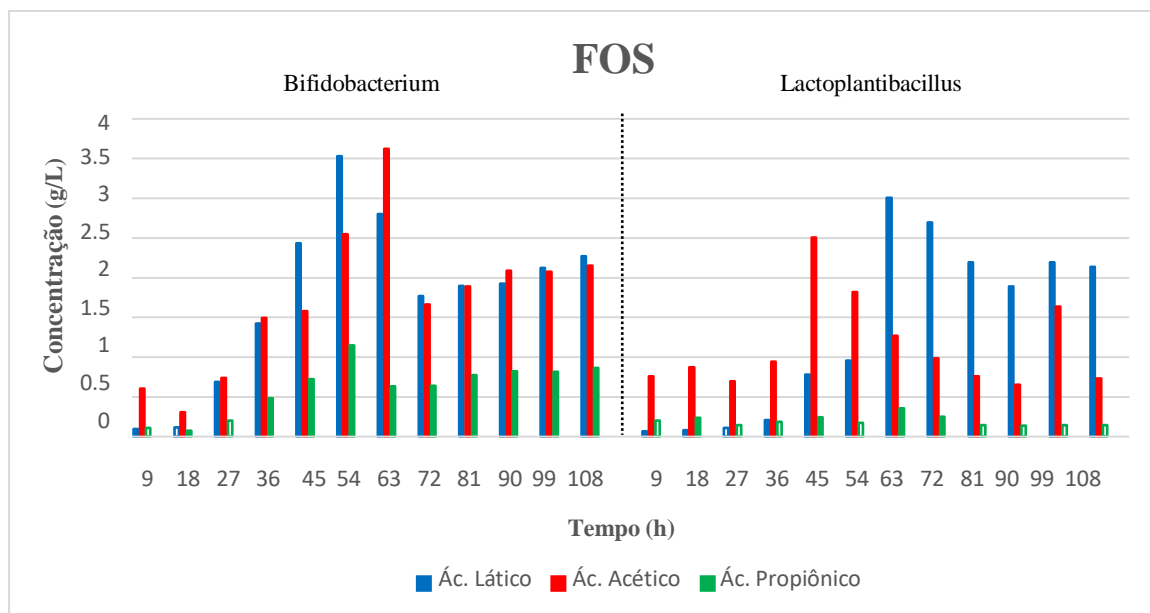
**Figura 10.** Avaliação e quantificação dos metabólitos produzidos, utilizando glicose como fonte de carbono



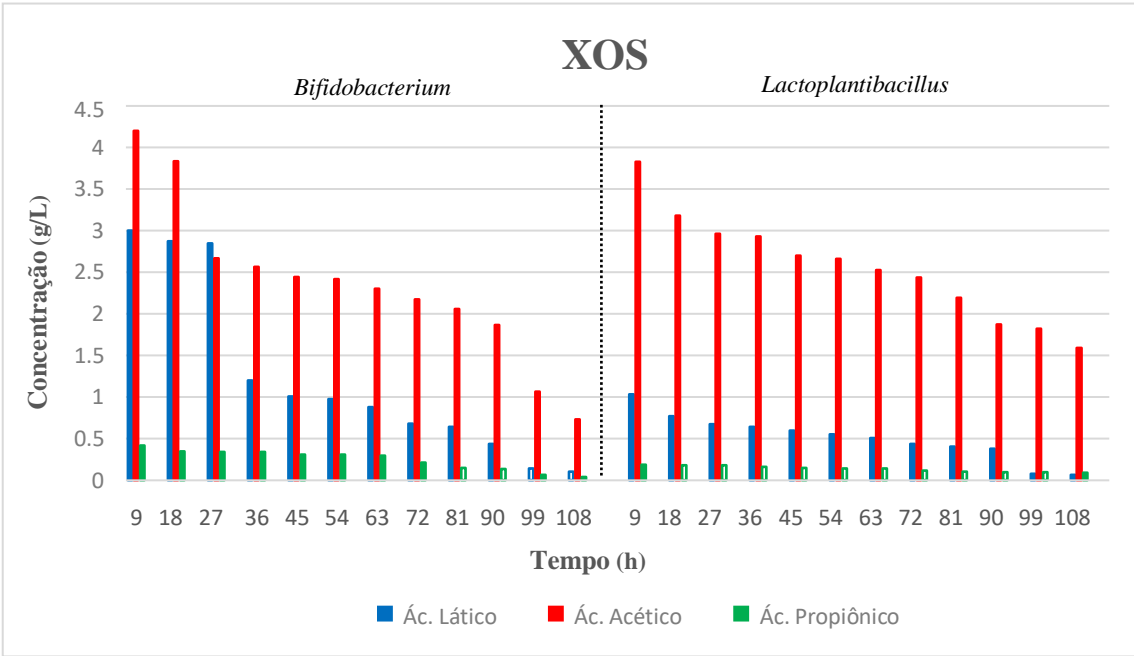
**Figura 11.** Avaliação e quantificação de metabólitos produzidos, utilizando xilose como fonte de carbono



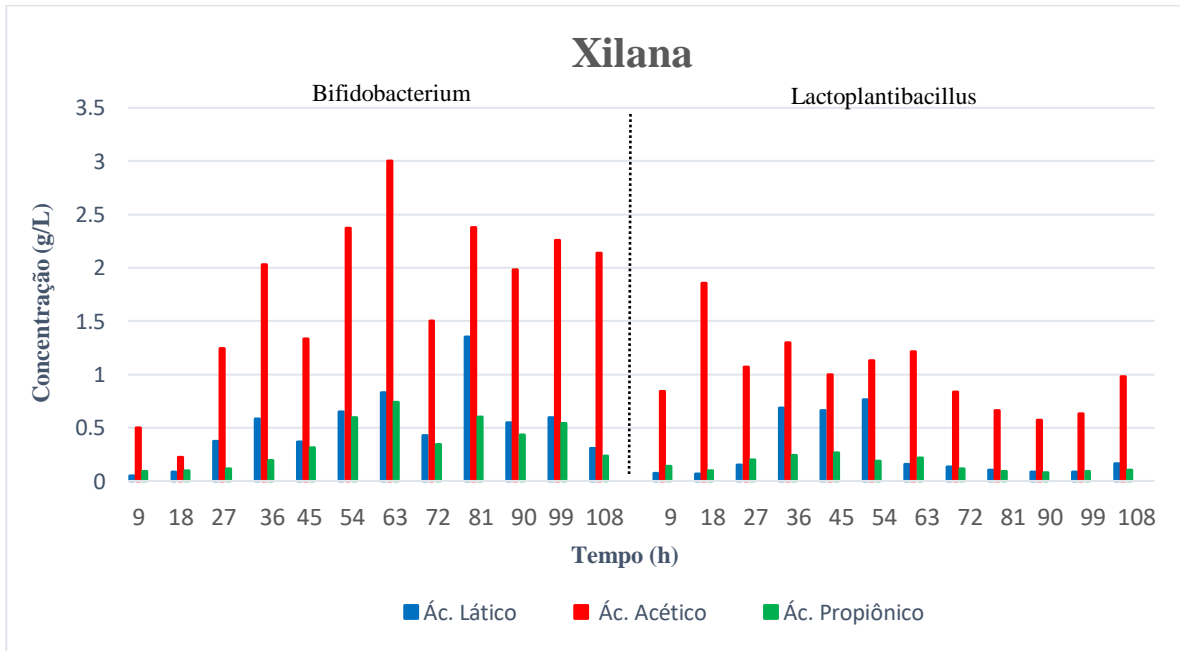
**Figura 12.** Avaliação e quantificação dos metabólitos produzidos, utilizando FOS como fonte de carbono



**Figura 13.** Avaliação e quantificação dos metabólitos produzidos, utilizando XOS como fonte de carbono



**Figura 14.** Avaliação e quantificação dos metabólitos produzidos, utilizando xilana como fonte de carbono



Inicialmente, foi cotada a avaliação e a quantificação do ácido butírico, concomitante aos demais ácidos orgânicos: ácido láctico, ácido acético e ácido propiônico. Entretanto, os valores observados de ácido butírico foram extremamente elevados, o que não é habitual. Cogita-se que o ácido possa interferir com alguns açúcares, como glicose e xilose, os quais estavam presentes em alguns meios de cultura. Esse fenômeno é observado, também, por Jiang (2010) na produção de ácido butírico a partir de glicose e xilose com células imobilizadas de *Clostridium tyrobutyricum* num bioreactor de leito fibroso.

A partir da **Figura 10**, pode-se observar que houve maior produção de ácido láctico pelas bifidobactérias, se comparadas com as lactobactérias, com pico de concentração igual a 6,85 g/L observado após 63h. Quanto a concentração de ácido acético, a variação entre os dois microrganismos é semelhante, com maior concentração encontrada entre 2,7 g/L para as bifidobactérias e 2,1 g/L para as lactobactérias. O ácido propiônico, por sua vez, aparece em menor escala, sendo sua maior concentração igual a 0,63 g/L.

Na **Figura 11**, a qual contém registros do meio contendo xilose como fonte de carbono, novamente *B. longum* é responsável pela maior concentração de ácido láctico, acético e propiônico, em comparação com *L. plantarum*, com valores aproximados de 3,57 g/L, 4,53 g/L e 1,25 g/L, respectivamente. É de importante registro que essa fonte de carbono consumida por *Bifidobacterium longum* permitiu a maior concentração de ácido propiônico, se comparada com todas as demais fontes de carbono.

Ademais, no meio contendo FOS, presente na **Figura 12**, pode-se observar o mesmo padrão, onde as bifidobactérias são responsáveis pelas maiores concentrações dos três ácidos orgânicos analisados. A concentração de ácido láctico encontrada foi de, aproximadamente, 3,5 g/L, enquanto de ácido acético e ácido propiônico são, respectivamente, 3,62 g/L e 1,15 g/L. Todavia, *L. plantarum* demonstrou mudança de comportamento a partir das 45h, evidenciando uma maior produção de ácidos láctico e acético, sendo suas concentrações aproximadas a 3 g/L e 2,51 g/L, respectivamente.

A maior quantificação de ácido acético, nesse estudo, é evidenciada na **Figura 13**, em que foi utilizado XOS como fonte de carbono, com valores que variam entre 4,20 g/L para as bifidobactérias e 3,83 g/L para as lactobactérias. No entanto, a produção de ácido láctico em maior quantidade somente foi observada por *Bifidobacterium longum*, principalmente a partir de 81h, com dados aproximados de 3,00 g/L. Os níveis de ácido propiônico foram similares em ambos os microrganismos, embora a concentração seja levemente superior nas bifidobactérias, sendo seu pico de concentração em 0,42 g/L.

Por fim, na **Figura 14**, em que foi avaliado a concentração de metabólitos em meios de cultura contendo xilana, os níveis de ácido acético foram superiores aos demais ácidos orgânicos analisados, sendo ainda maior nos meios de crescimento de *B. longum* (3,00 g/L). O ácido láctico foi produzido mais rapidamente por *L. plantarum*, visto que o pico de concentração é observado na 54ª hora, com 0,76 g/L, enquanto para *B. longum*, na 81ª hora, com 1,35 g/L. Além disso, as concentrações de ácido propiônico são superiores nos meios em que houve crescimento das bifidobactérias, sendo, aproximadamente 0,73 g/L, do que em relação ao meio de crescimento das lactobactérias (0,26 g/L).

Em resumo, o microrganismo *Bifidobacterium longum* obteve melhor desempenho na produção de metabólitos, quando comparado com *Lactoplantibacillus plantarum*, principalmente nos meios contendo FOS e XOS como fonte de carbono. Esse fenômeno pode ser explicado por Tang et al. (2022), o qual observou, avaliando xilooligossacarídeos na microbiota intestinal de suínos, que o tratamento com XOS, em baixas concentrações, aumentou a abundância de *Lactoplantibacillus* - que é considerada uma bactéria benéfica - mas não de *Bifidobacterium*. O mesmo foi analisado por Pan et al. (2019), Yin et al. (2019) e Zhou et al. (2021), em que o tratamento com XOS regula positivamente a abundância de lactobactérias, mas a baixa concentração desse não estimula a abundância de bifidobactérias. Desse modo, é provável que, nesse estudo, as concentrações mais elevadas de xilo-oligossacarídeos estimulou bifidobactérias, em detrimento de lactobactérias, o que por sua vez, favoreceu a produção de metabólitos como acetato, lactato e propionato.

Além disso, as maiores concentrações de ácidos orgânicos foram observadas nos ácidos acético e láctico, o que entra em concordância com os principais metabólitos produzidos pelo microrganismo que obteve melhor desempenho: *Bifidobacterium longum*. Ainda em Tang et al. (2022), a concentração mais elevada de butirato e propionato estava relacionada com o aumento abundante de lactobactérias. Todavia, para Menezes et al. (2018), na avaliação da produção de xilo-oligossacarídeos por fungos cultivados em casca de arroz e sua respectiva aplicação no crescimento de bactérias do ácido láctico, as maiores concentrações de ácido láctico e acético foram encontradas em cepas de *Bifidobacterium lactis*. Dessa maneira, nesse estudo, é provável que a formação dos metabólitos (acetato e lactato), em elevadas concentrações, estão relacionados diretamente ao *Bifidobacterium longum* e, por conseguinte, as baixas concentrações do metabólito (propionato) estão relacionados diretamente ao *Lactoplantibacillus plantarum*.

## 5. CONCLUSÃO

Por meio da análise dos resultados obtidos, verificou-se que os teores de açúcares e lignina reportados pela caracterização química do pseudocaule de bananeira não alcançaram o balanço de massa total. Além disso, os mesmos teores para a caracterização química da hemicelulose são bem menores do que o observados na literatura. Para a hidrólise enzimática, houve produção de xilo-oligossacarídeos com maior grau de polimerização: xilotetraose, xilopentose e xihexose/ou maior. Ainda, em todas as amostras, houve uma boa taxa de conversão e concentração de xilo-oligossacarídeos, excepcionalmente com os volumes de reação 50mL e 200 mL, o que permite concluir que os volumes dos hidrolisados possuem ótimos resultados para prosseguirmos para as próximas etapas do projeto, com probabilidade de aumentar a concentração nos volumes de 5 mL e 100 mL.

Após a fermentação *in vitro* através do cultivo de bactérias probióticas, foi realizada a técnica de plaqueamento “pour plate”, em que foi possível observar que os microrganismos demonstraram melhor crescimento nos meios contendo FOS e xilana. A fim de avaliar a ação prebiótica de XOS, as curvas de crescimento das bactérias probióticas foram determinadas pelo equipamento HPLC, em que foram construídos gráficos da concentração em g/L dos metabólitos produzidos pelo tempo em horas. Foi observado que *Bifidobacterium longum* obteve melhor desempenho de crescimento, principalmente nos meios contendo FOS e XOS como fonte de carbono, em comparação com a fonte controle (glicose). Além disso, os principais ácidos orgânicos produzidos foram ácido acético – sendo 4,20 g/ L a maior concentração encontrada no meio de cultura de XOS nas bifidobactérias – e ácido láctico, com 3,53 g/L, encontrada no meio de cultura de FOS nas bifidobactérias.

Portanto, é possível concluir que os XOS apresentaram perfil com potencial prebiótico, pois promoveram crescimento de microrganismos probióticos como o *Lactoplantibacillus plantarum* e *Bifidobacterium longum*. Além disso, pode-se inferir que a pesquisa alcançou com sucesso os seus objetivos planejados, demonstrando relevância no contexto biotecnológico. Ela abordou desde aspectos ambientais, ao empregar um subproduto agroindustrial, até a criação de um produto com maior valor agregado.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AACHARY, A. A; PRAPULLA, S. G. Xylooligosaccharides (XOS) as an Emerging Prebiotic: Microbial Synthesis, Utilization, Structural Characterization, Bioactive Properties, and Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 10, n. 1, p.2-16, 2010.

AKPINAR, O. et al. Comparison of acid and enzymatic hydrolysis of tobacco stalk xylan for preparation of xylooligosaccharides. *Lwt - Food Science and Technology*, v. 43, n. 1, p.119-125, 2010.

AKPINAR, O.; ERDOGAN, K.; BOSTANCI, S. Production of xylooligosaccharides by controlled acid hydrolysis of lignocellulosic materials. *Carbohydrate Research*, v. 344, n. 5, p.660-666, 2009.

ÁLVAREZ, C. et al. Optimized use of hemicellulose within a biorefinery for processing high value-added xylooligosaccharides. *Industrial Crops and Products*, v. 99, p.41-48, 2017.

AQUINO, J. S. et al. Models to Evaluate the Prebiotic Potential of Foods. *Functional Food - Improve Health through Adequate Food*, p.235-256, 2017.

BIELY, P., S. Singh, V. Puchart. Towards enzymatic breakdown of complex plant xylan structures: state of the art. *Biotechnol. Adv.*, 34 (2016), pp. 1260-1274

BRIENZO, M. Extração da hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar para produção de xilo-oligossacarídeo. 2010. 137 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada). Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo- SP.

BRIENZO, M.; SIQUEIRA, A. F.; MILAGRES, A. M. F. Search for optimum conditions of sugarcane bagasse hemicellulose extraction. *Biochemical Engineering Journal*, v. 46, n. 2, p.199-204, 2009.

BRIENZO M, Carvalho AFA, de Figueiredo FC, de Oliva-Neto P (2016) Sugarcane bagasse hemicellulose properties, extraction technologies and xylooligosaccharides production. In: Riley GL (ed) *Food Waste*. pp 155–188, 2016.

CARMONA et al. Purification and biochemical characterization of an endoxylanase from *Aspergillus versicolor*. *FEMS Microbiology Letters*, p. 311-315, 1998.

CARVALHO, A. F. A. et al. Xylo-oligosaccharides from lignocellulosic materials: Chemical structure, health benefits and production by chemical and enzymatic hydrolysis. *Food Research International*, v. 51, n. 1, p.75-85, abr. 2013. Elsevier BV.

CORDEIRO, N et al. Chemical composition and pulping of banana pseudo-stems. *Industrial Crops and Products*, v. 19, n. 2, p.147-154, 2004.

COSTA FILHO, D.V. et al. (2017): Aproveitamento de resíduos agroindustriais na elaboração de subprodutos. Congresso Internacional das Ciências Agrárias.

DÍAZ, S. et al., Oligosaccharides production by enzymatic hydrolysis of banana pseudostem pulp. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 2021.

DÍAZ, S. et al., Assesment of the effect of autohydrolysis treatment in banana's pseudostem pulp. *Waste Management*, v.119, p. 306-314, 2021.

DO NASCIMENTO FILHO, W. (2015): Avaliação do potencial dos resíduos produzidos do processamento agroindustrial no Brasil. *Rev. Virtual Quim.*, 2015, 7 (6), p. 1968-1987.

DEUTSCHMANN, R. et al. From plant biomass to bio-based chemicals: Latest developments in xylan research. *Biotechnology Advances*, 2012, 30, 1627-1640.

EBRINGEROVÁ, A.; HEINZE, T. Xylan and xylan derivatives-biopolymers with valuable properties. Naturally occurring xylan structures, isolation procedures and properties. *Macromolecular Rapid Communications*, 2000, 21, 542–556.

FARHAT, W. et al. Hemicellulose extraction and characterization for applications in paper coatings and adhesives. *Industrial Crops and Products*, v. 107, p.370-377, 2017.

FIGUEIREDO, F C. Efeito prebiótico de xilo-oligosacarídeos produzidos a partir da hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar utilizando extração alcalina e hidrólise de xilanases fúngicas. 2016. 66 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada), Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2016.

FOOKS, L. J.; GIBSON, G. R. In vitro investigations of the effect of probiotics and prebiotics on selected human intestinal pathogens. *Fems Microbiology Ecology*, v. 39, n. 1, p.67-75, 2002.

FORSAN CF, de Freitas C, Masarin F, Brienzo M (2021) Xylooligosaccharide production from sugarcane bagasse and leaf using *Aspergillus versicolor* endoxylanase and diluted acid. *Biomass Convers.*

FREITAS C, Carmona E, Brienzo M (2019) Xylooligosaccharides production process from lignocellulosic biomass and bioactive effects. *Bioact Carbohyd Diet Fibre* 18:100184.

FREITAS C, Terrone CC, Masarin F et al (2021) In vitro study of the effect of xylooligosaccharides obtained from banana pseudostem xylan by enzymatic hydrolysis on probiotic bacteria. *Biocatal Agric Biotechnol* 33:101973.

FREITAS, Caroline (2019): Hidrólise enzimática de hemicelulose do pseudocaule de bananeira com Endoxilânase I de *Aspergillus versicolor* para produção de xilo-oligossacarídeos e avaliação do seu efeito prebiótico. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada), Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2019.

GIBSON, G.R., Hutkins, R., Sanders, M.E., Prescott, S.L., Reimer, R.A., Salminen, S.J., Reid, G., 2017. Expert consensus document: the International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 14 (8), 491–502.

GÓMEZ, B. et al. Purification, Characterization, and Prebiotic Properties of Pectic Oligosaccharides from Orange Peel Wastes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 62, n. 40, p.9769-9782, 2014.

GRACIOLI, M.R. Purificação e caracterização de uma xilanase halotolerante de *Aspergillus hortai* CRM 1919 e aplicação na hidrólise de subprodutos agroindustriais. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada), Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2018.

GUIDO, E. S.; SILVEIRA, J. T. D.; FIGUEIRA, F. D. S. ; KALIL, S. J. . EXTRAÇÃO DE XILANAS DE BIOMASSAS LIGNOCELULÓSICAS PARA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE XILO-OLIGOSSACARÍDEOS. *Revista Multidisciplinar de Educação e Meio Ambiente*, [S. l.], v. 2, n. 3, p. 2, 2021.

HERIGSTAD, B.; HAMILTON, M.; HEERSINK, J. How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, v. 44, n. 2, p.121-129, 2001.

HILL, C. et al. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. . *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. V. 11, p. 506-514, 2014.

JIAN TAN, Craig McKenzie, Maria Potamitis, Alison N. Thorburn, Charles R. Mackay, Laurence Macia. The Role of Short-Chain Fatty Acids in Health and Disease. *Advances in Immunology*, v. 121, n.3. (2014)

KABEL, M. A., et al. Hydrothermally treated xylan rich by-products yield different classes of xylo-oligosaccharides. *Carbohydrate Polymers*. v. 50, p. 47-56, 2002.

KUMAR, D. et al. Xylanases and their industrial applications: A review. *Biochemical and Cellular Archives*, v. 17, n. 1, p.353-360, 2017.

LI, K. et al. Analysis of the chemical composition and morphological structure of banana pseudo- stem. *Bioresources*, v. 5, n. 2, p.576-585, 2010.

LI, Z et al. In vitro study of the prebiotic xylooligosaccharide (XOS) on the growth of *Bifidobacterium* spp and *Lactobacillus* spp. *International Journal Of Food Sciences And Nutrition*, v. 66, n. 8, p.919-922, 2015.

LOUIS, P. et al. Understanding the effects of diet on bacterial metabolism in the large intestine. *Journal of Applied Microbiology*, v. 102, n. 5, p.1197-1208, 2007.

MACFARLANE, G.; GIBSON, G.; CUMMINGS, J. Comparison of fermentation reactions in different regions of the human colon. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 72, n. 1, p.57-64, 1992.

MAKELAINEN, H., Forssten, S., Saarinen, M., Stowell, J., Rautonen, N., Ouwehand, A.C., 2010. Xylooligosaccharides enhance the growth of bifidobacteria and *Bifidobacterium lactis* in a simulated colon model. *Benef. Microbes*. 1, 81–91.

MARTINS, M. et al. Recent advances in xylo-oligosaccharides production and applications: A comprehensive review and bibliometric analysis. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2023, 47.

MELATI, RB; Brienzo, M. et al.: Key factors affecting the recalcitrance and conversion process of biomass. *Bioenergy Res*, 12 (2019), pp. 1-20.

MENEZES, BS, et al. Xylooligosaccharides production by fungi cultivations in rice husk and their application as substrate for lactic acid bacteria growth. *Bioresource Technology Reports*, 2018.

NAGHILI, H. et al. Validation of drop plate technique for bacterial enumeration by parametric and nonparametric tests. *Veterinary research forum: an international quarterly journal*, v. 4, n. 3, p. 179-183, 2013.

NAIDU, D.S., S.P. Hlangothi, M.J. John. Bio-based products from xylan: a review. *Carbohydr. Polym.* (2018).

NARISSETY, V. et al. Valorization of renewable resources to functional oligosaccharides: Recent trends and future prospective. *Bioresource Technology*, 2022, 346.

PALANIAPPAN, A. et al. Current status of xylooligosaccharides: Production, characterization, health benefits and food application. *Trends in Food Science & Technology*, 2021, 111, 506-519.

PAN et al. Dietary xylo-oligosaccharide supplementation alters gut microbial composition and activity in pigs according to age and dose. *AMB Express*, v. 9, p. 134. (2019)

PENG, F. et al. Fractional purification and bioconversion of hemicelluloses. *Biotechnology Advances*, 2012, 30, 879-903.

PEREDO-LOVILLO, A., Romero-Luna, H.E., Jiménez-Fernández, M., Health promoting microbial metabolites produced by gut microbiota after prebiotics metabolism, *Food Research International* (2020). <https://doi.org/10.1007/s12155-021-10373-2>

PINALEZ-MÁRQUEZ, C.D. et al. Circular bioeconomy and integrated biorefinery in the production of xylooligosaccharides from lignocellulosic biomass: A review. *Industrial Crops & Products*, 2021.

PREETHI, C.; MURTHY B. G. Physical and Chemical Properties of Banana Fibre Extracted from Commercial Banana Cultivars Grown in Tamilnadu State. *Agrotechnology*, v. 01, n. 11, p.1-3, 2013.

PUCHART, V.; BIELY, P. Simultaneous production of endo- $\beta$ -1, 4-xylanase and branched xylooligosaccharides by *Thermomyces lanuginosus*. *Journal of Biotechnology*, v. 137, n. 1-4, p.34- 43, 2008.

RASTALL, R. A.; GIBSON, G. R. Recent developments in prebiotics to selectively impact beneficial microbes and promote intestinal health. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 32, p.42-46, 2015.

ROSA et al. Valorização de resíduos da agroindústria. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE GERENCIAMENTO DE RESÍDUOS AGROPECUÁRIOS E AGROINDUSTRIAIS, 2., 2011, Foz do Iguaçu. Palestra. 2011. p. 98 – 105.

SALMINEN, S. et al. The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, v. 18, p. 649-667, 2021.

SAMANTA, A. K. et al. Xylooligosaccharides as prebiotics from agricultural by-products: Production and applications. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fiber*, v. 5, n. 1, p.62-71, 2015.

SANDERS, M.E., Merenstein, D.J., Reid, G., Gibson, G.R., & Rastall, R.A. (2019). Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 16, 1.

SHIMIZU, F. L. et al, Acid, alkali and peroxide pretreatments increase the cellulose accessibility and glucose yield of banana pseudostem. *Industrial Crops and Products*, v.115, p. 62-68, 2018.

- SINGH, R. D.; BANERJEE, J.; ARORA, A. Prebiotic potential of oligosaccharides: A focus on xylan-derived oligosaccharides. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fiber*, v. 5, n. 1, p.19-30, 2015.
- TEIXEIRA, L. S. et al. Efficiency of Amazonian tubers flours in modulating gut microbiota of male rats. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, v. 38, p.1-6, 2016.
- TANG, S. et al., Xylooligosaccharide-mediated gut microbiota enhances gut barrier and modulates gut immunity associated with alterations of biological processes in a pig model. *Carbohydrate Polymers*, v. 294, 2022.
- VIEIRA, D. ANA DE PAULA. *Microbiologia Aplicada / Darlene Ana de Paula Vieira, Nayara Cláudia de Assunção Queiroz Fernandes. – Inhumas: IFG; Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2012.*
- YIN et al., Dietary xylo-oligosaccharide improves intestinal functions in weaned piglets. *Nature Methods*, 11 (2014), pp. 106-112, 2019.
- ZHOU et al. Dietary supplemental xylooligosaccharide modulates nutrient digestibility, intestinal morphology, and gut microbiota in laying hens. *Animal Nutrition*, 7 (2021), pp.

