UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

Instituto de Química - Câmpus de Araraquara

HENRIQUE MAZIERO FOGARIN

PRODUÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS A PARTIR DA BORRA DE CAFÉ POR PRÉ-TRATAMENTO HIDROTÉRMICO E ÁCIDO: BIOATIVIDADES, IMPACTO NA MICROBIOTA E ANÁLISE DO CICLO DE VIDA

Araraquara

2025

HENRIQUE MAZIERO FOGARIN

PRODUÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS A PARTIR DA BORRA DE CAFÉ POR PRÉ-TRATAMENTO HIDROTÉRMICO E ÁCIDO: BIOATIVIDADES, IMPACTO NA MICROBIOTA E ANÁLISE DO CICLO DE VIDA

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Química, Araraquara, para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia Industrial e Ambiental

Orientadora: Profa. Dra. Kelly Johana Dussán Medina

Araraquara

2025

F655p

Fogarin, Henrique Maziero
Produção de oligossacarídeos a partir da borra de café por pré-tratamento hidrotérmico e ácido : bioatividades, impacto na microbiota e análise do ciclo de vida / Henrique Maziero Fogarin. -- Araraquara, 2025
219 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Química, Araraquara
Orientadora: Kelly Johana Dussán Medina

1. Café - Resíduos. 2. Economia circular. 3. Prebióticos. 4. Hemicelulose. 5. Metagenômica. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Dados fornecidos pelo autor(a).

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

A pesquisa inova ao otimizar o processo de extração de oligossacarídeos a partir da borra de café através do pré-tratamento hidrotérmico e com ácido sulfúrico diluído, determinar o impacto ambiental das condições avaliadas, avaliar as bioatividades dos oligossacarídeos extraídos, bem como o impacto na microbiota da formulação em hidrogel. Esta pesquisa está alinhada os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) 3 (Saúde e bem-estar), 9 (Indústria, inovação e infraestrutura) e 12 (Consumo e produção responsável) por produzir compostos que trazem benefícios à saúde humana através do aproveitamento de um resíduo agroindustrial na perspectiva de biorrefinarias.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

The research innovates by optimizing the process of extracting oligosaccharides from spent coffee grounds through hydrothermal and dilute sulfuric acid pretreatments, determining the environmental impact of the conditions evaluated, evaluating the bioactivities of the extracted oligosaccharides, as well as the impact on the microbiota of the hydrogel formulation. This research is in line with Sustainable Development Goals (SDGs) 3 (Health and well-being), 9 (Industry, innovation and infrastructure) and 12 (Responsible consumption and production) by producing compounds that benefit human health through the use of an agro-industrial residue from the perspective of biorefineries.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Produção de oligossacarídeos da borra de café por pré-tratamento hidrotérmico e ácido: bioatividades, impacto na microbiota e análise do ciclo de vida."

AUTOR: HENRIQUE MAZIERO FOGARIN
ORIENTADORA: KELLY JOHANA DUSSAN MEDINA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia, pela Comissão Examinadora:

Kelly J. Dussán

Profa. Dra. KELLY JOHANA DUSSAN MEDINA (Participaçao Presencial)
Departamento de Engenharia Química / Instituto de Quimica - UNESP - Araraquara

Profa. Dra. THAIS SUZANE MILESSI ESTEVES (Participaçao Virtual)
Departamento de Engenharia Química / Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia - UFSCAR - São Carlos

Profa. Dra. GISLANE LELIS VILELA DE OLIVEIRA (Participaçao Virtual)
Depto. de Ciências Químicas e Biológicas / Instituto de Biociências - UNESP - Botucatu

Araraquara, 01 de abril de 2025

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO	
	HENRIQUE MAZIERO FOGARIN 12/10/1993
Nacionalidade	brasileira
Nome em citações bibliográficas:	Fogarin, Henrique M. Fogarin, H. M. Fogarin, Henrique
Endereço profissional	Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Química, Campus de Araraquara Departamento de Engenharia Química Rua Francisco Degni, 55 Quitandinha, Araraquara – SP CEP 14800-900 Telefone: (19) 99402-3322
Currículo Lattes	http://lattes.cnpq.br/4950180005522074
ORCID	https://orcid.org/0000-0002-4842-3649
FORMAÇÃO ACADÊMICA	
2014/2020	Graduação em Engenharia Química Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Química, Araraquara.
02/2024 – 06/2024	Bolsa estágio de pesquisa no exterior (BEPE) – FAPESP Centro de Biotecnologia e Química Fina, Universidade Católica Portuguesa, Porto, Portugal.
PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA	
1) **Henrique Maziero Fogarin**, Sarha Lucia Murillo-Franco, Matheus Costa Monteiro dos Santos, Debora Danielle Virginio da Silva, Kelly Johana Dussán. Acid hydrolysis pretreatment for extraction of oligosaccharides derived from spent coffee grounds: valorization of a promising biomass. **Environmental Science and Pollution Research**, 2025. https://doi.org/10.1007/s11356-025-36417-0. 2) Matheus Costa Monteiro dos Santos, **Henrique Maziero Fogarin**, Sarha Lucia Murillo-Franco, Jonas Paulino de Souza, Erica Regina Filletti, Kelly Johana Dussán. Artificial Neural	

Networks (ANN's) to Predict the Behavior of Sugars Obtained by Acid Hydrolysis Process from Spent Coffee Grounds (SCG). **Waste and Biomass Valorization**. Submetido em 10/2024.

3) Naira Linhares Sabino, **Henrique Maziero Fogarin**, Sarha Lucia Murillo-Franco, Mariana Oliviera Bérgamo, Leticia Vicente Moreno, Debora Danielle Virginio da Silva, Cristiano Soleo Funari, Kelly Johana Dussán. Investigating the influence of solvents and extraction methods on the efficacy of phenolic compound recovery from spent coffee grounds. **Separation and Purification Technology**, 2025. https://doi.org/10.1016/j.seppur.2025.131793

4) Souza, J.P., **Fogarin, H.M.**, Almeida, S.G.C., Santos, B.C.S., Silva, D.D.V., Dussán, K.J. Fermentation of Sugarcane Biomass Hemicellulosic Hydrolysate by Yeast-Producer of Xylitol and Ethanol Isolated from the Atlantic Forest and the Brazilian Amazon Forest. **Waste & Biomass Valorization**, 2024. https://doi.org/10.1007/s12649-024-02535-y

5) De Almeida, S.G.C., Souza, J.P., **Fogarin, H.M.**, Franca, B.V., Dussán, K.J. Assessment of lipid synthesis from sugarcane biomass by adaptive strains of Rhodosporidium toruloides. **Biomass Conversion and Biorefinery**, 2024. https://doi.org/10.1007/s13399-024-05499-0

6) De Almeida, S.G.C.; **Fogarin, H.M.**; Costa, M.A.M.; Dussán, K.J. Study of sugarcane bagasse/straw combustion and its atmospheric emissions using a pilot-burner. **Environmental Science and Pollution Research**, 2023. https://doi.org/10.1007/s11356-023-28171-y

7) Dos Santos, M.G.; **Fogarin, H.M.**; da Silva, D.D.V.; Dussán, K.J. Bioprocess development for levulinic acid production using sugarcane biomass. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, 2023. https://doi.org/10.1016/j.scp.2023.101085

PARTICIPAÇÃO EM BANCAS E ORIENTAÇÕES

Bancas de trabalhos de conclusão

Não possui

Orientações

Não possui

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS

Congresso internacional de microbiologia em língua Portuguesa, 2024. (Vídeo Conferência). Potencial de biomassas de cogumelos na modulação da microbiota intestinal. 2024. (Apresentação Oral).

11th International Conference on Sustainable Solid Waste Management, 2024, (Rhodes). Neural Network-Enhanced Hydrolysis Process for Valorizing Spent Coffee Grounds. 2024. (Pôster)

11th International Conference on Sustainable Solid Waste Management, 2024, (Rhodes). Enhanced extraction of oligosaccharides from spent coffee grounds using dilute acid hydrolysis. 2024. (Apresentação Oral)

53rd Annual Meeting of the Brazilian Society of Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), 2024, (Águas de Lindóia). Artificial Neural Networks Coupled Genetic Algorithm as a Strategy for Optimizing Xylitol Production by Xylose Fermenting. 2024. (Pôster)

10th International Conference on Sustainable Solid Waste Management, 2023, (Chania). Obtaining high value-added bioproducts from a by-product of the coffee production chain. 2023. (Pôster)

10th International Conference on Sustainable Solid Waste Management, 2023, (Chania). Co-production of ethanol and xylitol from sugarcane hemicellulose hydrolysate by yeasts isolated from the Atlantic Forest and the Brazilian Amazon Forest. 2023. (Apresentação Oral)

10th International Conference on Sustainable Solid Waste Management, 2023, (Chania). Growth characterization of adapted *Rhodosporidium toruloides* in sugarcane biomass hemicellulosic hydrolysate. 2023. (Apresentação Oral)

Dedico este trabalho...

aos meus pais, Luzia Dulce Maziero Fogarin e Luiz Carlos Fogarin; à minha irmã, Letícia Maziero Fogarin; e a todos que estiveram presente e fizeram parte desta jornada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Luzia Dulce Maziero Fogarin e Luiz Carlos Fogarin, por todos os sacrifícios que fizeram para que pudesse ter a melhor educação possível, muitas vezes deixando de realizar sonhos próprios para que seus filhos pudessem ter seus sonhos realizados. Agradeço também por todo o carinho e pelos ensinamentos por eles transmitidos e por serem meu ponto de apoio ao qual sempre pude voltar nos momentos de incertezas e dificuldades.

Agradeço à minha irmã, por quem tenho admiração pela sua resiliência e força de vontade. Pelas trocas de experiências e conhecimentos que nos fazem crescer juntos e pelas conversas e conselhos pessoais e profissionais que tivemos nos últimos anos, que me fizeram ter foco e tranquilidade em momentos de decisão.

Agradeço aos meus colegas do grupo de pesquisa APIBIL pelos ensinamentos, trocas de experiências, pela ajuda no desenvolvimento e escrita de trabalhos científicos, pelas risadas e presentes das viagens (principalmente os doces), e pela oportunidade de poder trabalhar com um grupo de pessoas que contribuíram no desenvolvimento deste projeto.

Agradeço à Professora Doutora Kelly Johana Dussán Medina, minha orientadora, pela oportunidade de trabalhar em seu grupo de pesquisa, por todo o conhecimento transmitido e pelas oportunidades geradas por este trabalho. Pessoa a quem admiro pelo seu comprometimento, força de vontade, por toda a sua trajetória e sabedoria.

Agradeço aos meus colegas do grupo de pesquisa Bioactives and Bioproducts Research, do Centro de Biotecnologia e Química Fina, laboratório associado da Universidade Católica Portuguesa, Porto, por toda ajuda na condução do projeto de estágio no exterior, possibilitando o meu desenvolvimento pessoal e como pesquisador, pelos momentos de descontração durante os dias de longas jornadas de trabalho e também durantes os almoços.

Agradeço às Professoras Doutoras Manuela Pintado e Raquel Madureira, por terem aberto as portas para o meu estágio de pesquisa no exterior, por todo a disponibilidade e recursos disponibilizados durante a minha estadia no Centro de Biotecnologia e Química Fina, que foram de grande importância para o meu desenvolvimento crítico como pesquisador.

Ao Instituto de Química de Araraquara, à Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" e aos funcionários que possibilitaram e contribuíram para a realização e conclusão deste projeto.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho através da Chamada CNPq nº 07/2022 – processo # 131120/2022-0 e do processo # 316230/2023-5.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro, concedido por meio do Projeto FAPESP Processo # 2022/03000-0 e dos Processos # 2023/01752-8, 2023/15075-8.

"Sua META é ser o melhor do mundo naquilo que você faz.
Não existem alternativas"

(Campos, 2004, p. 11)*

1 CAMPOS, Vicente Falconi. **Gerenciamento da rotina do trabalho do dia-a-dia**. Nova Lima: INDG Tecnologia e Serviços Ltda., 2004. 266 p.

RESUMO

O café é uma das principais commodities globais. No entanto, seu processamento gera grandes volumes de resíduos, principalmente borra de café (BCF), que é descartada em aterros, causando impactos ambientais. Para mitigar esses impactos, é necessário implementar a valorização da BCF através da economia circular. A BCF possui aproximadamente 50% em massa seca de hemicelulose e celulose, a fração hemicelulósica é rica em galactomananas e arabinogalactanas, possibilitando a produção de manano-oligossacarídeos (MOS), que possuem potencial prebiótico. Entretanto, a BCF possui uma estrutura complexa. Assim, este trabalho teve como objetivo caracterizar BCF, otimizar a etapa de pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído para obtenção de OS utilizando um modelo Box-Behnken 3^4 com 29 ensaios, avaliando os fatores: temperatura (140-190 °C), relação sólido/líquido (S/L) (1:40-1:4 g/mL), tempo de reação (20-120 min) e concentração de ácido sulfúrico (0-2% v/v), realizar análise do ciclo de vida, avaliar o potencial prebiótico por ensaios *in vitro*, a bioacessibilidade e biodisponilidade através do protocolo INFOGEST, e o impacto na microbiota dos OS através de ensaios *in vitro* de fermentação colônica e análises de metagenômica. A BCF utilizada neste estudo apresentou como principais frações a hemicelulose, compostos extrativos, lignina e celulose, respectivamente. Tendo a manose (aproximadamente 25% em massa seca) como principal açúcar. Foi possível produzir oligossacarídeos (OS) através do pré-tratamento com ácido diluído, sendo as variáveis mais influentes: a relação sólido/líquido (S/L), a concentração de ácido e a temperatura. Concentrações de ácido abaixo de 1,5% v/v foram mais eficientes, favorecendo a despolimerização da hemicelulose. Sob a condição ótima (169 °C, S/L - 1/40, 20 min e 1,43% H_2SO_4) foi possível obter 21,40 g de OS por 100 g de BCF seca, com proporção de 1:1:1 (manose:galactose:arabinose), sendo a manobiose o principal OS. O ácido cítrico também se mostrou eficiente, abrindo caminho para estudos de otimização. A Avaliação do Ciclo de Vida (ACV) indicou que as etapas de precipitação dos OS e recuperação de solventes impactaram significativamente, sendo o ensaio 23 (165 °C, S/L - 1/4, 70 min e 0% H_2SO_4) a de menores impactos ambientais em relação aos ensaios de pré-tratamento hidrotérmico. O pré-tratamento hidrotérmico revelou-se eficaz na extração de oligossacarídeos e polissacarídeos proveniente de arabinogalactanas, com 76,25 ± 5,86 g de galactose por 100g de OS. Apesar da presença de ácido clorogênico, os oligossacarídeos do ensaio 23 (OS-23) apresentaram baixa capacidade antioxidante pelos métodos ABTS, DPPH e ORAC. O OS-23 (0,50% m/v) demonstrou potencial prebiótico ao promover o crescimento de *Bifidobacterium*, *Lacticaseibacillus* e *Lactobacillus*. No entanto, *L. acidophilus* LA-5 e *B. animalis* Bo apresentaram crescimento reduzido em concentrações superiores a 0,50% (m/v), sugerindo um possível estresse microbiano. A formulação de hidrogel com 1,5% m/v de pectina foi a que apresentou resultados mais adequados. Ensaios *in vitro* demonstraram que o Hydrogel OS-23 resiste à digestão e alcança o intestino onde será fermentado pela microbiota intestinal. A fermentação colônica *in vitro* demonstrou que o hidrogel contendo os OS-23 (Hydrogel OS-23) aumentou a diversidade microbiana e estimulou o crescimento de *Bifidobacterium* e *Bacteroides*, promovendo a produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), especialmente acetato. O Hydrogel OS-23 teve efeitos similares ao hidrogel contendo fruto-oligossacarídeos, indicando sinergia entre pectina e OS-23 na modulação da microbiota intestinal. Este estudo contribui para o entendimento da extração de OS da fração hemicelulósica da BCF, bem como suas bioatividades, potencial prebiótico e impacto sinérgico entre a matriz péctica e os OS da BCF na microbiota, representando um avanço significativo na valorização deste resíduo.

Palavras-chave: café-resíduos; economia circular; prebióticos; hemicelulose; metagenômica.

ABSTRACT

Coffee is one of the most tradable commodities. However, its processing generates large quantities of waste, primarily spent coffee grounds (SCG), which are often discarded in landfills, leading to environmental impacts. To mitigate these impacts, the valorization of SCG through circular economic approaches is essential. SCG consists of approximately 50% (dry weight) hemicellulose and cellulose, with the hemicellulosic fraction being rich in galactomannans and arabinogalactans, enabling the production of mannan-oligosaccharides (MOS) with potential prebiotic properties. However, the complex structure of SCG presents challenges for its valorization. The objectives of this study were to characterize SCG and optimize the dilute sulfuric acid pretreatment for oligosaccharide (OS) production using a Box-Behnken 3^4 model with 29 experiments. The evaluated factors include temperature (140–190 °C), solid/liquid ratio (S/L) (1:40–1:4 g/mL), reaction time (20–120 min), and sulfuric acid concentration (0–2% v/v). Additionally, a life cycle assessment (LCA) was conducted, along with *in vitro* evaluations of prebiotic potential, bioaccessibility and bioavailability through the INFOGEST protocol, and microbiota impact via *in vitro* colonic fermentation and metagenomic analyses. The SCG used in this study was primarily comprised hemicellulose, extractives, lignin, and cellulose, with mannose as the predominant sugar (approximately 25% dry weight). OS production was achieved through dilute acid pretreatment, with the most influential variables being the S/L ratio, acid concentration, and temperature. Acid concentrations below 1.5% v/v were more efficient, enhancing hemicellulose depolymerization. Under optimal conditions (169 °C, S/L – 1/40, 20 min, and 1.43% H2SO4), 21.40 g of OS per 100 g of dry SCG was obtained, with a monosaccharide ratio of 1:1:1 (mannose:galactose:arabinose), predominantly mannobiose. Citric acid also demonstrated efficiency, indicating potential for further optimization. LCA results indicated that OS precipitation and solvent recovery stages had the highest environmental impact, with assay 23 (165 °C, S/L – 1/4, 70 min, and 0% H_2SO_4) showing the lowest environmental burden among hydrothermal pretreatment assays. Hydrothermal pretreatment proved effective in extracting oligosaccharides and polysaccharides derived from arabinogalactans, yielding 76.25 ± 5.86 g of galactose per 100 g of OS. Despite the presence of chlorogenic acid, the oligosaccharides from assay 23 (OS-23) exhibited low antioxidant capacity in ABTS, DPPH, and ORAC assays. The OS-23 at 0.50% m/v demonstrated prebiotic potential by promoting the growth of *Bifidobacterium*, *Lacticaseibacillus*, and *Lactobacillus*. However, *L. acidophilus* LA-5 and B. *animalis* Bo exhibited reduced growth at concentrations exceeding 0.50% (m/v), suggesting microbial stress. The hydrogel formulation with 1.5% m/v pectin showed the most suitable properties. The *in vitro* assays confirmed that the hydrogel containing the OS-23 (Hydrogel OS-23) resists digestion and reaches the colon, where it undergoes fermentation by gut microbiota. *In vitro* colonic fermentation revealed that Hydrogel OS-23 enhanced microbial diversity and stimulated the growth of *Bifidobacterium* and *Bacteroides*, leading to increased production of short-chain fatty acids (SCFAs), particularly acetate. Hydrogel OS-23 exhibited effects similar to the hydrogel containing fructooligosaccharide, indicating synergy between pectin and OS-23 in gut microbiota modulation. This study contributes to the understanding of OS extraction from the hemicellulosic fraction of SCG, as well as its bioactivities, prebiotic potential, and the synergistic impact between pectic matrix and SCG-derived OS on gut microbiota, marking a significant advancement in SCG valorization.

Keywords: coffee-residues; circular economy; prebiotics; hemicellulose; metagenomics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura da fração lignocelulósica, composta pela hemicelulose, celulose e lignina. 32
Figura 2 - Cascata de valorização da biomassa de acordo com o valor agregado de cada setor. 36
Figura 3 – Principais classes de compostos prebióticos classificados de acordo com as evidências de benefícios a saúde humana.....49
Figura 4 - Diagrama do trato gastrointestinal humano.....56
Figura 5 – Principais modelos estáticos e dinâmicos de fermentação *in vitro* da MIH. 62
Figura 6 - Fronteiras do sistema para o cenário de valorização da BCF em OS de acordo com uma abordagem do berço ao portão.....74
Figura 7 - Fluxograma da simulação pelo *Aspen Plus* do processo de produção dos OS utilizando ácido sulfúrico diluído na etapa de pré-tratamento. 74
Figura 8 - Fluxograma da simulação pelo *Aspen Plus* do processo de produção dos OS utilizando água na etapa do pré-tratamento.....75
Figura 9 - Fluxograma das etapas de produção de OS a partir da BC baseados nos procedimentos experimentais. 75
Figura 10 - Disposição da microplaca para ensaio de eliminação do radical livre estável. 77
Figura 11 - Disposição da microplaca para ensaio de absorção de radicais de oxigênio. 80
Figura 12 - Viscosímetro rotacional (B-ONE PLUS, Lamy Rheology, França) para determinação da viscosidade das amostras desenvolvidas. 82
Figura 13 – Fluxograma das etapas do protocolo INFOGEST 2.0. 83
Figura 14 – Fermentadores em batelada contendo: (I-II) Hydrogel OS-23, (III-IV) Hydrogel FOS; (V-VI) Hydrogel Matriz, (VII-VIII) controle de inóculo (IC).....85
Figura 15 - Fermentador em batelada com controle de pH, temperatura e agitação, utilizado nos ensaios *in vitro* de fermentação colônica. 86
Figura 16 - Estimativa dos efeitos (com 95% de confiança) usando o gráfico de Pareto do planejamento Box-Behnken 3^4 para a otimização da extração de OS a partir do pré-tratamento da BCF. L = variável linear, Q = variável quadrática. 99
Figura 17 - Gráficos de contorno da função desejabilidade de acordo com o planejamento Box-Behnken 3^4, para a variável resposta EF-OS (g OS/100 g BCF seca) para (a) Relação S/L (g/mL) vs. Temperatura (°C); (b) Tempo (min) vs. Temperatura (°C); (c) Tempo (min) vs. Relação S/L

(g/mL); (d) %H_2SO_4 (v/v) vs. Temperatura (°C); (e) %H_2SO_4 (v/v) vs. Relação S/L (g/mL) e (f) %H_2SO_4 (v/v) vs. Tempo (min).....102
Figura 18 - Superfícies de resposta tridimensional de acordo com o planejamento Box-Behnken 3^4, para a variável resposta EF-OS (g OS/100 g BCF seca) para (a) Temperatura (°C) vs. %H_2SO_4; (b) Temperatura (°C) vs. Relação S/L (g/mL); (c) Temperatura (°C) vs. Tempo (min); (d) Relação S/L (g/mL) vs. %H_2SO_4; (e) Relação S/L (g/mL) vs. Tempo (min) e (f) Tempo (min) vs. %H_2SO_4 (v/v).....103
Figura 19 - Espectro da análise de MALDI-TOF-MS da matriz e dos OS obtidos com a condição ótima do modelo.....110
Figura 20 - Contribuição global para as categorias de impacto da produção de OS derivados da BCF.....113
Figura 21 - Espectro da análise de MALDI-TOF-MS da matriz e dos OS obtidos com o ensaio 23 do planejamento Box-Behnken 3^4.....120
Figura 22 - Curvas de crescimento das cepas (a) *L. acidophilus* LA-5, (b) *L. rhamnosus* Lcr35, (c) *L. casei* 01, (d) *B. animalis* Bo, e (e) *B. longum* BG3, em meio MRS-cys suplementado com OS-23 1,0%, OS-23 2,0%, OS-23 3,0%, FOS 2,0% e glicose 2,0% (m/v).....130
Figura 23 - Curvas de crescimento das cepas (a) *L. acidophilus* LA-5, (b) *L. rhamnosus* Lcr35, (c) *L. casei* 01, (d) *B. longum* BG3, em meio MRS-cys suplementado com OS-23 0,25%, OS-23 0,50%, OS-23 1,00% e FOS 0,50% (m/v).....132
Figura 24 - Curvas de crescimento das cepas (a) *L. acidophilus* LA-5, (b) *L. rhamnosus* Lcr35, (c) *L. casei* 01, (d) *B. animalis* Bo, (e) *B. longum* BG3 e (f) *B. lactis* Bb12, em meio MRS-cys suplementado com OS-23 0,50%, FOS 0,50%, Gli 0,50% e Gli 2,00% (m/v).....135
Figura 25 - Contagem da viabilidade celular para (a) *L. acidophilus* LA-5, (b) *L. rhamnosus* Lcr35, (c) *L. casei* 01, (d) *B. animalis* Bo, (e) *B. longum* BG3 e (f) *B. lactis* Bb12 em meio MRS-cys contendo OS-23 0,50%, FOS 0,50%, Glic 0,50% e Glic 2,00% (m/v).....136
Figura 26 - Viscosidade (mPa.s) das matrizes hidrogéis contendo 1,0%, 1,5% e 2,0% (m/v) de pectina, *Pear Organic Fruit Purée (Clearspring)* e *Tasty Turtle* – Maça e pera com iogurte *(Holle)*, aferida à temperatura ambiente.....140
Figura 27 - Concentração total de nitrogênio amoniacal ao longo das 48 h de fermentação colônica para as amostras Hydrogel OS-23, Hydrogel FOS, Hydrogel Matriz e o IC.....143
Figura 28 – (a) Diagrama de flor para todos os grupos de amostras nos diferentes tempos de fermentação (0, 24 e 48 h); (b) Análise de α-diversidade usando o índice de diversidade de Shannon e (c) Análise de α-diversidade usando o índice de diversidade de Chao1.....147

Figura 29 - Análise de coordenadas principais (PCoA) considerando as distâncias Unifrac não ponderadas. 150
Figura 30 - Análise de abundância relativa das diferentes amostras testadas (Hydrogel OS-23, Hydrogel FOS, Hydrogel Matriz) e IC, nos diferentes tempos de fermentação (0, 24 e 48 h) (a) para os 10 principais táxons de cada amostra a nível dos filos; (b) para os 30 principais táxons de cada amostra a nível dos gêneros e espécies; (c) para os 10 principais táxons de cada grupo de amostra a nível dos filos; (d) para os 30 principais táxons de cada grupo de amostra a nível dos gêneros e espécies. 153
Figura 31 - Comparação das abundâncias relativas de espécies bacterianas com diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, baseada no teste *t* para (a) Hydrogel OS-23 e IC às 24 h; (b) Hydrogel OS-23 e IC às 48 h; (c) Hydrogel OS-23 e Hydrogel Matriz às 24 h; (d) Hydrogel OS-23 e Hydrogel Matriz às 48 h. 158
Figura 32 - Concentrações dos AGCC majoritários (acetato, propionato e butirato) (μmol de AGCC por g de amostra fermentada) para as diferentes amostras avaliadas ao longo dos ensaios de fermentação colônica. 160
Figura 33 - Concentrações dos AGCC minoritários (isobutitato, isovalerato e valerato) (μmol de AGCC por g de amostra fermentada) para as diferentes amostras avaliadas ao longo dos ensaios de fermentação colônica. 164
Figura 34 - Resíduos versus valores preditos para os 29 ensaios do planejamento Box-Behnken 3^4. 185
Figura 35 – Gráfico de probabilidade normal para os 29 ensaios do planejamento Box-Behnken 3^4. 185
Figura 36 - Perfil dos compostos fenólicos extraídos do OS-23, determinados por CLAE acoplado com um detector UV/Vis – PDA. 218
Figura 37 – Composição dos monossacarídeos presentes nos OS-23 determinada por HPAEC-PAD. 218
Figura 38 - Composição dos OS presentes no Hydrogel OS-23 antes do ensaio *in vitro* da digestão do TGI determinada por HPAEC-PAD. 219
Figura 39 - Composição dos OS presentes no Hydrogel OS-23 após o ensaio *in vitro* da digestão do TGI determinada por HPAEC-PAD. 219

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Teor de manose de diferentes resíduos agrícolas. Os dados são expressos em porcentagem de peso, em uma base seca. 34
Tabela 2 - Vantagens e desvantagens dos principais métodos de pré-tratamento de biomassas lignocelulósicas. 39
Tabela 3 - Principais resultados obtidos através da ACV para diferentes aplicações da BCF. 46
Tabela 4 – Oligossacarídeos disponíveis comercialmente e suas aplicações. 49
Tabela 5 - Estudos da avaliação da propriedade prebiótica dos MOS obtidos de diferentes fontes através de ensaios fermentativos *in vitro*. 50
Tabela 6 - Estudos da suplementação de MOS na dieta de animais de corte e os principais resultados obtidos. 53
Tabela 7 - Comparação entre os fatores relevantes na escolha do tipo de método *in vitro*. 57
Tabela 8 - Principais bioatividades observadas para os AGCC. 63
Tabela 9 - Curva padrão de Trolox para ensaio de eliminação do radical livre estável. 77
Tabela 10 - Curva padrão de Trolox para ensaio de absorção de radicais de oxigênio. 79
Tabela 11 - Composição química (g/100 g de BCF seca) da BCF seca de acordo com o método NREL/TP-510-42618 (Sluiter *et al.*, 2008b). 91
Tabela 12 - Concentrações dos compostos fenólicos presentes na borra de café *in natura* a partir das análises de CLAE em triplicata. 93
Tabela 13 – Matriz do planejamento Box-Behnken 3^4 com 5 repetições no ponto central para o estudo da influência das variáveis: temperatura, razão S/L, tempo e concentração de H_2SO_4, no processo de obtenção dos OS a partir do pré-tratamento da BCF. 98
Tabela 14 - ANOVA para a variável dependente EF-OS (g OS/100g BCF seca) para o planejamento Box-Behnken 3^4 com 5 repetições no ponto central para a otimização da extração de OS a partir do pré-tratamento da BCF. 100
Tabela 15 - Modelo matemático, gerado de acordo com o panejamento Box-Behnken 3^4, e validação empregando a condição otimizada e uma condição aleatória. 104
Tabela 16 – Proporção em mols de manose, galactose e arabinose dos oligossacarídeos, após a hidrólise total com H_2SO_4 4% m/v, obtidos em cada ensaio do planejamento Box-Behnken 3^4. 108
Tabela 17 - Intensidades dos picos obtidos através da análise de MALDI-TOF-MS dos OS obtidos com a condição ótima do modelo. 110

Tabela 18 - Emissões de GEE (kg de CO2 eq. por kg de produto) para a produção de OS..115
Tabela 19 - Toxicidade humana por kg de produto, para a produção de OS a partir da BCF. 117
Tabela 20 - Acidificação do solo por kg de produto, para a produção de OS a partir da BCF. 119
Tabela 21 - Intensidades dos picos obtidos através da análise de MALDI-TOF-MS dos OS obtidos com a ensaio 23.....120
Tabela 22 - Composição química dos OS-23 em base seca. 122
Tabela 23 - Composição dos minerais presentes nos OS-23 extraídos da BCF. 123
Tabela 24 - Capacidade antioxidante dos OS-23 obtidos por pré-tratamento hidrotérmico da BCF.....126
Tabela 25 - Concentração dos OS presentes no Hydrogel OS-23 antes e após a digestão do TGI.....142
Tabela 26 - Inventário do ciclo de vida para o ensaio 1. 186
Tabela 27 - Inventário do ciclo de vida para o ensaio 2. 187
Tabela 28 - Inventário do ciclo de vida para o ensaio 3. 188
Tabela 29 - Inventário do ciclo de vida para o ensaio 4. 189
Tabela 30 - Inventário do ciclo de vida para o ensaio 5. 190
Tabela 31 - Inventário do ciclo de vida para o ensaio 6. 191
Tabela 32 - Inventário do ciclo de vida para o ensaio 7. 192
Tabela 33 - Inventário do ciclo de vida para o ensaio 8. 193
Tabela 34 - Inventário do ciclo de vida para o ensaio 9. 194
Tabela 35 - Inventário do ciclo de vida para o ensaio 10. 195
Tabela 36 - Inventário do ciclo de vida para o ensaio 11. 196
Tabela 37 - Inventário do ciclo de vida para o ensaio 12. 197
Tabela 38 - Inventário do ciclo de vida para o ensaio 13. 198
Tabela 39 - Inventário do ciclo de vida para o ensaio 14. 199
Tabela 40 - Inventário do ciclo de vida para o ensaio 15. 200
Tabela 41 - Inventário do ciclo de vida para o ensaio 16. 201
Tabela 42 - Inventário do ciclo de vida para o ensaio 17. 202
Tabela 43 - Inventário do ciclo de vida para o ensaio 18. 203
Tabela 44 - Inventário do ciclo de vida para o ensaio 19. 204
Tabela 45 - Inventário do ciclo de vida para o ensaio 20. 205
Tabela 46 - Inventário do ciclo de vida para o ensaio 21. 206

Tabela 47 - Inventário do ciclo de vida para o ensaio 22. 207
Tabela 48 - Inventário do ciclo de vida para o ensaio 23. 208
Tabela 49 - Inventário do ciclo de vida para o ensaio 24. 209
Tabela 50 - Inventário do ciclo de vida para o ensaio 25. 210
Tabela 51 - Inventário do ciclo de vida para o ensaio 26. 211
Tabela 52 - Inventário do ciclo de vida para o ensaio 27. 212
Tabela 53 - Inventário do ciclo de vida para o ensaio 28. 213
Tabela 54 - Inventário do ciclo de vida para o ensaio 29. 214
Tabela 55 - Inventário utilizado para os 29 ensaios, de acordo com o Ecoinvent 3. 215
Tabela 56 - Dados pessoais, alimentares e médicos dos doadores voluntários. 217
Tabela 57 - Hábitos e uso de medicamentos dos doadores voluntários. 217
Tabela 58 - Dados das fezes coletadas e preparo do inóculo. 217

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HMF	5-hidroximetilfurfural
AAPH	Dicloridrato de 2,2′-Azobis(2-metilpropionamidina)
ABTS	Ácido 2,2′-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
ACGs	Ácidos clorogênicos
ACV	Avaliação do ciclo de vida
AE	Extração assistida por enzima
AGCC	Ácidos graxos de cadeia curta
AICV	Avaliação do impacto do ciclo de vida
AU	Extração assistida por ultrassom
AUE	Extração assistida por ultrassom e enzima
BAL	Bactérias ácido-láticas
BCF	Borra de café
BCF-LE	Borra de café livre de extrativos
CAGR	Taxa de crescimento anual composta
CFU	Unidades formadoras de colônias
CG	Cromatografia gasosa
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DHB	2,5-dihidroxibenzóico
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
EC	Economia Circular
EF-OS	Eficiência de extração de oligossacarídeos
FDA	Administração Federal de Alimentos e Medicamentos
FOS	Fruto-oligossacarídeos
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GC-FID	Cromatografia gasosa equipado com detector de ionização de chama
GEE	Gases de efeito estufa
GOS	Galacto-oligossacarídeos
HM	Alto teor de metoxilação
HPAEC-PAD	Cromatografia de troca aniônica de alta eficiência acoplado com um detector de pulso amperométrico
Hydrogel FOS	Hidrogel contendo 0,5% (m/v) de FOS
Hydrogel Matriz	Hidrogel de pectina
Hydrogel OS-23	Hidrogel contendo 0,5% (m/v) dos OS-23
IC	Controle de inóculo
ICV	Inventário do ciclo de vida
ITU	Infecções do trato urinário
MALDI-TOF-MS	Espectrometria de massa de dessorção/ionização a laser assistida por matriz
MIH	Microbiota intestinal humana
MOS	Manano-oligossacarídeos
MRS	Caldo De Man, Rugosa e Sharpe
MRS-cys	Caldo De Man, Rugosa e Sharpe suplementado com 0,1% (m/v) de L-cisteína-HCl
NREL	Laboratório Nacional de Energia Renovável

OD	Densidade óptica
ODS	Objetivos de Desenvolvimento Sustentável
ONU	Organização das Nações Unidas
ORAC	Capacidade de absorção de radicais de oxigênio
OS	Oligossacarídeos
OS-23	Oligossacarídeos da condição 23 liofilizados
PBS	Solução salina de tampão fosfato
PCoA	Análise de Coordenadas Principais
PIB	Produto interno bruto
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
ROI	Retorno sobre o investimento
S/L	Sólido-líquido
TGI	Trato gastrointestinal
UP	Ultrapura
VSA	Variantes de sequência de amplicon

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 24
2. REVISÃO DA LITERATURA 29
2.1. PRODUÇÃO DE CAFÉ E SEUS RESÍDUOS 29
2.2. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA BORRA DE CAFÉ 31
2.3. APLICAÇÕES DA BORRA DE CAFÉ 34
2.4. PRÉ-TRATAMENTO DA BIOMASSA 36
2.5. ECONOMIA CIRCULAR (EC) E ANÁLISE DO CICLO DE VIDA (ACV) 43
2.6. OLIGOSSACARÍDEOS E SUAS BIOATIVIDADES 47
2.7. AVALIAÇÃO DA BIOACESSIBILIDADE E BIODISPONIBILIDADE 54
2.8. FERMETAÇÃO COLÔNICA 58
3. OBJETIVOS 65
3.1. OBJETIVO GERAL 65
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 65
4. MATERIAL E MÉTODOS 66
4.1. COLETA E ARMAGENAGEM DA MATÉRIA-PRIMA 66
4.2. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA BORRA DE CAFÉ 66
4.2.1. Remoção, quantificação e caracterização dos compostos extrativos 66
4.2.2. Quantificação dos carboidratos estruturais, lignina e cinzas 67
4.3. PRÉ-TRATAMENTO DA BORRA DE CAFÉ 68
4.3.1. Pré-tratamento da BCF-LE com ácido cítrico 68
4.4. PRECIPITAÇÃO DOS OLIGOSSACARÍDEOS 69
4.5. CARACTERIZAÇÃO DOS OLIGOSSACARÍDEOS 69
4.5.1. Determinação da proporção em mols dos carboidratos 70
4.5.2. Caracterização dos graus de polimerização 70
4.5.3. Determinação da umidade e cinzas 70
4.5.4. Determinação do teor de proteínas 71
4.5.5. Quantificação dos minerais 71

4.5.6. Determinação da composição dos açúcares monoméricos 72
4.5.7. Determinação dos compostos fenólicos 72
4.6. ANÁLISE DO CICLO DE VIDA 73
4.6.1. Objetivo e escopo 73
4.6.2. Unidade funcional 73
4.6.3. Fronteiras do sistema 73
4.6.4. Inventário do ciclo de vida (ICV) 74
4.6.5. Avaliação do impacto do ciclo de vida 76
4.7. AVALIAÇÃO DAS BIOATIVIDADES DOS OLIGOSSACARÍDEOS 76
4.7.1. Ensaio de eliminação do radical livre estável ABTS 76
4.7.2. Ensaio de eliminação do radical livre estável DPPH 78
4.7.3. Ensaio da capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC) 78
4.7.4. Ensaio *in vitro* em microplaca para atividade prebiótica 80
4.7.5. Avaliação da concentração celular 81
4.8. DESENVOLVIMENTO DE MATRIZ PÉCTICA 81
4.9. ENSAIO *IN VITRO* DA DIGESTÃO DO TRATO GASTROINTESTINAL 82
4.10. FERMENTAÇÃO COLÔNICA 84
4.10.1. Preparação do inóculo fecal 84
4.10.2. Ensaio *in vitro* de fermentação colônica 85
4.10.3. Determinação da concentração total de nitrogênio amoniacal 86
4.10.4. Quantificação dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) 87
4.10.5. Extração do DNA bacteriano e análise de metagenômica 88
4.11. ANÁLISES ESTATÍSTICAS 89
4.11.1. Otimização da etapa de pré-tratamento da BCF 89
4.11.2. Bioatividades, desenvolvimento da matriz péctica, digestão do TGI e fermentação colônica 89
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 90
5.1. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA BORRA DE CAFÉ (BCF) 90
5.2. OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS (OS) 96

5.2.1. Pré-tratamento com ácido cítrico empregando os parâmetros da condição ótima 105

5.3. AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO E ESTRUTURA DOS OLIGOSSACARÍDEOS (OS) EXTRAÍDOS DA BORRA DE CAFÉ (BCF) 107

5.4. ANÁLISE DO CICLO DE VIDA (ACV) DA PRODUÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS (OS) 111

5.4.1. Impactos globais médios 112
5.4.2. Mudanças climáticas 113
5.4.3. Toxicidade humana 116
5.4.4. Acidificação do solo 118

5.5. CARACTERIZAÇÃO DA MELHOR CONDIÇÃO DO PONTO DE VISTA AMBIENTAL 120

5.6. AVALIAÇÃO DAS BIOATIVIDADES DOS OS-23 125

5.6.1. Avaliação da capacidade antioxidante 125
5.6.2. Avaliação do potencial prebiótico 128

5.7. DESENVOLVIMENTO DA MATRIZ PÉCTICA 139

5.8. ENSAIO *IN VITRO* DA DIGESTÃO DO TRATO GASTROINTESTINAL 141

5.9. FERMENTAÇÃO COLÔNICA E METAGENÔMICA 142

5.9.1. Determinação da concentração total de nitrogênio amoniacal 143
5.9.2. Riqueza da diversidade da população bacteriana: avaliação da α-diversidade 144
5.9.3. Riqueza da diversidade da população bacteriana: avaliação da β-diversidade 149
5.9.4. Análise de abundância relativa bacteriana 150
5.9.5. Análise da concentração dos AGCC 159

6. CONCLUSÕES 166

REFERÊNCIAS 167

APÊNDICE A – TESTE DE NORMALIDADE PLANEJAMENTO BB 3^4 185

APÊNDICE B - INVENTÁRIO DO CICLO DE VIDA (ICV) 186

APÊNDICE C – INVENTÁRIO ECOINVENT 3 215

APÊNDICE D – INFORMAÇÕES SOBRE DOADORES E INÓCULO FECAL 217

APÊNDICE E – CROMATOGRAMAS COMPLEMENTARES 218

1. INTRODUÇÃO

O café é uma das principais commodities globais, com destaque para as espécies *Coffea arabica* e *Coffea canephora*, e os maiores exportadores de café são o Brasil, Vietnã e Colômbia, que juntos exportaram mais de 85 milhões de sacas na safra 2023/2024 (ICO, 2024). O processamento do café pode ser realizado por via seca, processo mais simples, ou por via úmida, que exige maior consumo de água, porém resulta em café de qualidade superior (Hoseini *et al.*, 2021). Além disso, países desenvolvidos, como Alemanha, Bélgica, Estados Unidos e Itália, transformam o café verde em produtos de maior valor agregado, como café torrado e solúvel, fomentando a reexportação e o comércio internacional (Vegro; de Almeida, 2020).

A produção e o consumo de café geram grandes volumes de resíduos, especialmente borra de café (BCF), estimada em 20 milhões de toneladas anuais (Kafková *et al.*, 2023). A maior parte dessa biomassa é descartada em aterros, gerando impactos econômicos e ambientais significativos, devido ao alto custo de manejo dos aterros (Werderits Silva; da Silva César; Conejero, 2021) e à presença de compostos tóxicos, como polifenóis e cafeína (Sanjay Gurav; Mudoi, 2022). Para mitigar esses impactos, é necessário explorar rotas alternativas de valorização da BCF, convertendo-a em produtos de maior valor agregado.

O ponto de partida para essa valorização está na caracterização química da BCF, permitindo identificar compostos de interesse comercial, estimar custos de extração e avaliar a viabilidade técnica e econômica das alternativas propostas (Sarghini *et al.*, 2021; Zhao *et al.*, 2024). Além disso, essa biomassa é promissora para o desenvolvimento de produtos de maior valor agregado devido ao seu baixo custo e composição química diversificada (Gonçalves *et al.*, 2023).

Sua composição é influenciada por fatores como processamento, torrefação e preparo da bebida, resultando em variações nas frações químicas. A BCF contém uma complexa mistura de polissacarídeos (hemicelulose e celulose), lignina, lipídios, proteínas, polifenóis e minerais. Entre esses componentes, os polissacarídeos predominam, correspondendo a cerca de 50% em base seca, sendo seguidos pela lignina (25–33%), lipídios (10–20%) e proteínas (6–14%) (Arya *et al.*, 2022; Bhaturiwala; Modi, 2020).

A fração lipídica da BCF contém ácidos graxos de interesse industrial, como linoleico (39–44%), palmítico (30–35%), oleico (7–11%) e esteárico (6–8%), que podem ser utilizados em setores como cosméticos, farmacêuticos e biocombustíveis (Veitía-de-Armas *et al.*, 2024). Já os compostos fenólicos, incluindo ácidos clorogênicos e ácido gálico, apresentam propriedades antioxidantes, antimicrobianas e anti-inflamatórias, tornando-se relevantes para

aplicações na indústria farmacêutica (Bouhzam *et al.*, 2023; Solomakou *et al.*, 2022). A diversidade química desses componentes reforça a versatilidade da BCF como matéria-prima.

A fração lignocelulósica, que inclui hemicelulose, celulose e lignina, possui características estruturais relevantes para usos industriais. A hemicelulose, predominante na BCF, é formada principalmente por galactomananas, que possuem ampla aplicabilidade em biopolímeros, alimentos e outras indústrias devido à sua estrutura rica em manose e galactose (Nguyen *et al.*, 2019). A alta concentração de mananas na BCF, em comparação com outros resíduos agroindustriais, destaca sua relevância como uma fonte valiosa de carboidratos estruturais (Awasthi *et al.*, 2022).

A BCF apresenta grande potencial como matéria-prima em biorrefinarias devido à presença de compostos bioativos, óleos, açúcares, taninos, antioxidantes e cafeína, entre outros. Sua valorização não apenas reduz os impactos ambientais gerados pelo descarte inadequado, mas também promove o desenvolvimento de produtos de maior valor agregado, como biocombustíveis Kamil *et al.* (2020), *biochar* Zhang, Shiqi *et al.* (2021) e compostos funcionais Franca; Oliveira (2022).

As biorrefinarias desempenham um papel crucial ao transformar subprodutos agroindustriais, como a BCF, em insumos para setores alimentícios, farmacêuticos e energéticos, contribuindo para uma economia mais sustentável (Forcina *et al.*, 2023) e gerando benefícios econômicos e sociais, como aumento na renda regional e criação de empregos (Murthy; Madhava Naidu, 2012).

A introdução da BCF como matéria-prima em biorrefinarias segue uma cascata de valorização, priorizando a obtenção de compostos de alto valor agregado para a indústria farmacêutica, alimentícia e de rações animais. A alta concentração de mananas na fração hemicelulósica da BCF tem atraído atenção para a produção de manano-oligossacarídeos (MOS), com potencial prebiótico e potencial para aplicação como aditivos nutricionais (Sarghini *et al.*, 2021; Tian *et al.*, 2017). Adicionalmente, a crescente demanda por ingredientes naturais e alimentos funcionais reforça a relevância da BCF como uma biomassa promissora.

O pré-tratamento adequado dessa biomassa é essencial para transformar a fração lignocelulósica em produtos de maior valor agregado, promovendo uma alternativa sustentável ao seu descarte e contribuindo para o desenvolvimento de novos produtos que serão introduzidos aos portfólios das empresas, construção de novas biorrefinarias e geração de oportunidades de trabalho, especialmente em países em desenvolvimento.

Entre os métodos disponíveis, destacam-se os físicos, químicos, físico-químicos e biológicos, cada qual com vantagens e limitações (Baruah *et al.*, 2018). Os métodos físicos,

como moagem e ultrassom, são utilizados para reduzir o tamanho das partículas e romper estruturas poliméricas, sendo geralmente etapas preparatórias para outros tipos de pré-tratamento (Li *et al.*, 2022). Já os biológicos, que empregam microrganismos e enzimas, apresentam baixo impacto ambiental, mas possuem limitações como tempos de reação mais longos e a necessidade de controle rigoroso das condições do processo (Awasthi *et al.*, 2022). Os métodos físico-químicos, como explosão a vapor e processos hidrotérmicos, combinam forças mecânicas e reações químicas, proporcionando uma abordagem eficiente, mas com custos energéticos elevados (Baksi *et al.*, 2023; Prasad; Padhi; Ghosh, 2023).

O pré-tratamento químico, em especial com ácidos diluídos, é amplamente utilizado devido à sua eficiência na extração da fração hemicelulósica (Li *et al.*, 2022). Este método baseia-se na quebra das ligações glicosídicas entre hemicelulose e celulose, utilizando ácidos inorgânicos e orgânicos. O uso de ácidos diluídos é particularmente vantajoso em escala industrial, pois reduz a formação de compostos inibidores e a corrosão de equipamentos, superando algumas limitações associadas ao pré-tratamento com ácidos concentrados (Lorenci Woiciechowski *et al.*, 2020).

Estudos demonstram resultados promissores na obtenção de oligossacarídeos (OS) com diferentes ácidos: Sarghini *et al.* (2021) obtiveram OS, como trissacarídeos e tetrassacarídeos, utilizando ácido clorídrico; enquanto Jin Cho *et al.* (2022) utilizaram ácido acético diluído para extrair galactomanana. Outros métodos, como a auto-hidrólise, destacam-se pela ausência de reagentes químicos, mas enfrentam desafios relacionados à eficiência.

Apesar de não haver um método único que atenda a todos os critérios ideais de pré-tratamento, o uso de ácidos diluídos sob condições controladas tem se mostrado eficaz na valorização da BCF. Esse processo, além de ser mais econômico e menos corrosivo, permite a extração de oligossacarídeos com propriedades funcionais, que podem ser aplicados nas indústrias alimentícia e farmacêutica.

Os prebióticos são classificados como compostos presentes na dieta que não são degradados pelas enzimas do trato digestório humano, além de promoverem benefícios à saúde do paciente através da estimulação do crescimento seletivo de certos microrganismos presentes na microbiota intestinal (Gibson *et al.*, 2004; Tian *et al.*, 2017).

Dentre os prebióticos, os oligossacarídeos (OS) têm recebido maior destaque na última década por conseguirem atingir o intestino grosso, promoverem o crescimento da microbiota intestinal e consequentemente liberam metabólitos que controlam diferentes processos fisiológicos (Catenza; Donkor, 2021).

Atualmente, os Fruto-oligossacarídeos (FOS) e os Galacto-oligossacarídeos (GOS) são os oligossacarídeos funcionais mais utilizados dentro da indústria de alimentos (Catenza; Donkor, 2021). Além destes dois oligossacarídeos citados, os MOS têm demonstrado ser capazes de atuar e mitigar diversas desordens metabólicas como: diabetes tipo 2, disbiose intestinal, inflamações autoimunes e câncer colorretal (Kango *et al.*, 2022).

Contudo, o processo de produção dos MOS através da hidrólise ácida da biomassa não garante que estes possuam características de oligossacarídeos prebióticos. Além disso, a grande maioria dos estudos tem como foco principal a produção dos oligossacarídeos, deixando de lado as avaliações de bioacessibilidade, a biodisponibilidade no trato digestório e quais os impactos na microbiota gastrointestinal (de Carvalho *et al.*, 2023).

Porém os testes de bioacessibilidade e de biodisponibilidade são de suma importância quando são avaliados compostos com potenciais prebióticos, isso devido às possíveis interações entre os compostos e a matriz alimentar em que será introduzido, que podem acarretar diferentes resultados quando os ingredientes funcionais interagem com a microbiota intestinal.

Assim, a valorização da BCF, por meio de sua caracterização química e da etapa de pré-tratamento eficiente, pode agregar valor a este subproduto e promover uma economia circular (EC) sustentável. A transição de um modelo linear de produção “extrair-produzir-descartar” para a EC é fundamental para mitigar os impactos ambientais e econômicos associados à geração de resíduos, especialmente no setor alimentício, responsável por um terço do desperdício global de alimentos (Schmidt Rivera *et al.*, 2020).

Nesse contexto, a valorização de subprodutos, como a BCF, surge como uma estratégia promissora dentro das biorrefinarias, que integram a produção de compostos de maior valor agregado, como fibras alimentares e oligossacarídeos prebióticos. Para otimizar esses processos, a Avaliação do Ciclo de Vida (ACV) desempenha um papel crucial ao quantificar os impactos ambientais e orientar decisões que promovam maior eficiência e sustentabilidade (de Oliveira Fernandes *et al.*, 2025). Dessa forma, a aplicação conjunta da EC, biorrefinarias e ACV fomenta a criação de processos produtivos mais sustentáveis, alinhados aos princípios de redução de resíduos, economia de recursos naturais e contribuição para os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável.

Assim este trabalho inova em otimizar o processo de extração de oligossacarídeos a partir da borra de café através do pré-tratamento hidrotérmico e com ácido diluído, identificando os principais parâmetros do processo. Além disso, a otimização dos parâmetros juntamente com as análises de impacto ambiental possibilita identificar condições que sejam ambientalmente mais amigáveis para a sua aplicação em biorrefinarias e consequentemente

gerando uma economia circular. Outro ponto de inovação deste trabalho é a introdução dos oligossacarídeos da borra de café em uma matriz hidrogel de pectina e avaliação do impacto sobre a microbiota humana, trazendo uma alternativa de aplicação dos oligossacarídeos obtidos em formulações direcionadas para as indústrias alimentícias e farmacêuticas. Por fim, este trabalho se enquadra dentro das ODS: 3 (Saúde e bem-estar), 9 (Indústria, inovação e infraestrutura) e 12 (Consumo e produção responsável); por produzir composto que promove e diversidade da microbiota, que traz benefícios à saúde humana, a partir de um resíduo agroindustrial, além de desenvolver uma nova forma de aplicação em uma matriz hidrogel.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Nesta seção serão apresentadas as revisões bibliográficas referentes aos temas: produção do café e seus resíduos, caracterização química da borra de café, aplicações da BCF, pré-tratamento da biomassa, Economia Circular (EC) e Avaliação do ciclo da vida (ACV), Oligossacarídeos (OS) e suas bioatividades, avaliação da bioacessibilidade, biodisponibilidade, e fermentação colônica.

2.1. PRODUÇÃO DE CAFÉ E SEUS RESÍDUOS

O café está entre as principais *commodities* negociadas ao redor do mundo, além de ser uma das bebidas mais apreciadas (Yeoh; Ng, 2022). As espécies *Coffea arabica* (Arábica) e *Coffea canephora* (Robusta) são as duas principais espécies cultivadas nos países produtores, sendo o cultivo da variedade Arábica correspondente à aproximadamente 62,4% do total de grãos produzidos e da variedade Robusta, os 37,6% restantes, durante a safra de 2023/2024 (ICO, 2024).

O cultivo desta *commodity* é impactado diretamente pelas condições regionais como: temperatura do ar, precipitação da chuva, déficit de água, fotoperíodo e incidência da radiação solar, sendo a temperatura do ar e o déficit de água os fatores mais impactantes por interferirem nos processos fisiológicos da planta (Lorençone *et al.*, 2023).

Por ser uma das principais *commodities* e ser dependente das condições regionais, a produção e exportação dos grãos de café possuem um grande impacto no Produto Interno Bruto (PIB) e na balança comercial dos países produtores (Al-Abdulkader *et al.*, 2018; Lorençone *et al.*, 2023).

As regiões da América do Sul e Ásia são as principais exportadoras de café, sendo o Brasil, o Vietnam e a Colômbia os principais países exportadores e sendo responsáveis por exportarem na safra de 2023/2024 respectivamente 49,03 milhões de sacas (1 saca = 60 kg), 24,96 milhões de sacas e 11,91 milhões de sacas (ICO, 2024). Ou seja, as principais regiões produtoras são caracterizadas pela presença de países em desenvolvimento, enquanto os principais mercados consumidores são caracterizados por economias desenvolvidas (Vegro; de Almeida, 2020).

O processamento dos grãos de café para a produção dos grãos verdes, que representaram 90,1% do total de sacas exportadas na safra de 2023/2024 (ICO, 2024), pode ser realizado através dos métodos por via seca ou por via úmida. O processamento pela via seca é um processo mais tradicional, de menor complexidade, haja visto que os grãos de café são secos ao sol e posteriormente são enviados para os descascadores para a remoção da casca e da polpa

(Hoseini *et al.*, 2021). Enquanto o processamento pela via úmida produz um café de maior qualidade e possui diversas etapas, incluindo uma etapa de fermentação microbiológica, que são responsáveis por remover a polpa, o pergaminho e mucilagem, e consequentemente utiliza grandes quantidade de água (Mussatto *et al.*, 2011b).

Ademais, em países como: Alemanha, Bélgica, Estados Unidos e Itália, os grãos de café verdes são transformados em produtos de maior valor agregado (café torrado, café solúvel e cápsulas), que representaram 9,9% do total de sacas exportadas na safra de 2023/2024 (ICO, 2024), e são novamente exportados (reexportação), gerando mais oportunidades de trocas comerciais (Vegro; de Almeida, 2020).

Entretanto, o processamento dos grãos de café e a produção do café solúvel são responsáveis pela geração de resíduos como: grãos defeituosos, pele de prata, polpa, casca e borra do café (Hoseini *et al.*, 2021). A BCF se caracteriza como sendo um dos principais resíduos da produção agroindustrial do café, sendo gerada pelo consumo do café como bebida em restaurantes, cafeterias especializadas e nas casas, e pela produção industrial do café solúvel (Jin Cho *et al.*, 2022; Murthy; Madhava Naidu, 2012; Sarghini *et al.*, 2021).

Estima-se que anualmente a quantidade gerada de BCF seja de aproximadamente 20 milhões de toneladas em base úmida ou 9 milhões de toneladas em base seca (Kafková *et al.*, 2023), sendo que aproximadamente 0,91 tonelada de BFC, em base seca, são produzidas para cada 1 tonelada de grãos torrados de café (Singh *et al.*, 2023) e para cada 1 tonelada de café instantâneo produzido, são geradas 2 toneladas de BFC em base úmida (Forcina *et al.*, 2023).

Toda essa quantidade gerada de BFC anualmente é em sua maioria enviada diretamente para os aterros sanitários, junto com os resíduos sólidos urbanos, devido ao baixo potencial de aproveitamento deste subproduto como fertilizante, ração para animais de criação ou compostagem (Jin Cho *et al.*, 2022). Levando em consideração que o custo de operação de um aterro sanitário seja entre US$ 20 – 40 por tonelada de resíduo sólido urbano (Werderits Silva; da Silva César; Conejero, 2021), o descarte deste subproduto agroindustrial, em base úmida, resultaria em um custo anual entre US$ 400 – 800 milhões.

Além do impacto financeiro, o descarte inadequado da BFC em aterros proporciona preocupações quanto aos impactos ambientais gerados por essa atividade, isso porque a borra contém compostos que podem contaminar o solo, como: os polifenóis, a cafeína, taninos (Mussatto *et al.*, 2011b; Sanjay Gurav; Mudoi, 2022; Sarghini *et al.*, 2021), além de possuir uma alta umidade e a presença de fenóis livres (Murthy; Madhava Naidu, 2012). E estes impactos causam ainda mais preocupações nos países em desenvolvimento (Tian *et al.*, 2017),

devido a gestão adequada dos resíduos e a construção de aterros sanitários não serem uma realidade para toda a população (Werderits Silva; da Silva César; Conejero, 2021).

Desta forma, há a necessidade de se buscar rotas alternativas para o aproveitamento e valorização desta biomassa, que hoje é considerada um resíduo agroindustrial, de forma a produzir produtos de maior valor agregado, diminuindo o descarte da borra em aterros sanitários e consequente os impactos econômicos e ambientais gerados (Murthy; Madhava Naidu, 2012; Sarghini *et al.*, 2021; Zhao *et al.*, 2024).

E o primeiro passo para esta valorização é a caracterização química da BFC, possibilitando entender quais compostos podem ser extraídos, os custos de obtenção de cada composto, suas aplicações, os parâmetros de escalabilidade do processo e a viabilidade econômica de cada rota.

2.2. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA BORRA DE CAFÉ

A grande quantidade de subprodutos agroindustriais gerados anualmente, entre eles a BFC, representa um potencial fonte de matéria-prima de baixo custo para a produção de compostos de maior valor agregado (Gonçalves *et al.*, 2023), e para isso a caracterização química destes materiais é de extrema importância para identificar possíveis aplicações.

Como foi citado anteriormente, a composição dos grãos de café sofre a interferência das condições regionais durante o seu cultivo. No caso da BFC, a sua composição química também pode variar de acordo com o processamento do grão, da torrefação e do preparo da bebida (Machado *et al.*, 2023). Fazendo com que diferentes estudos obtenham valores diferentes para cada uma das frações.

A BFC possui uma estrutura complexa e por isso contém uma variedade de componentes como: polissacarídeos (hemicelulose e celulose), lignina, polifenóis, proteínas, lipídios e minerais (Arya *et al.*, 2022; Bhaturiwala; Modi, 2020; Machado *et al.*, 2023; Nguyen *et al.*, 2019). Os polissacarídeos são os compostos majoritários da BFC correspondendo a aproximadamente 50% (m/m) em base seca, onde a hemicelulose representa 30 – 40% (m/m) e a celulose 8 – 13% (m/m), seguidos pela lignina (25 – 33 % m/m), lipídios (10 – 20 % m/m), proteínas (6 – 14 %), polifenóis (2 – 3% m/m) e menores quantidades de minerais (Arya *et al.*, 2022; Bhaturiwala; Modi, 2020; Sharma; Ray; Singhal, 2021).

Uma das frações mais relevantes da BFC são os lipídios, os estudos de Go *et al.* (2020), Sharma, Ray e Singhal, (2021) e Veitía-de-Armas *et al.* (2024), determinaram os principais ácidos graxos presentes na fração lipídica da BFC. Os pesquisadores identificaram que os ácidos linoleico (39 – 44% m/m) e palmítico (30 – 35,0% m/m) são os principais ácidos graxos

presentes, seguidos pelos ácidos oleico (7 – 11% m/m) e esteárico (6 – 8% m/m), e menores concentrações dos ácidos araquidônico, docosanoico e heptadecenóico. Por conter os ácidos oleico, linoleico e palmítico, a fração lipídica da BFC pode ser utilizada nas indústrias de cosmético, farmacêutica, nutricional e biocombustíveis (Veitía-de-Armas *et al.*, 2024).

Outra classe de compostos encontrados na BFC são os compostos fenólicos, estes compostos são metabólitos secundários encontrados em plantas e podem possuir apenas 1 anel fenólico (ácidos fenólicos) ou múltiplos anéis fenólicos (polifenóis) (Zhao *et al.*, 2024). Estes compostos são de grande interesse, principalmente para as indústrias farmacêuticas, por apresentarem naturalmente propriedades como: antioxidante, antialérgica, antimicrobiana, antidiabético, anti-inflamatória, entre outras (Bouhzam *et al.*, 2023; Caballero-Galván *et al.*, 2018; Gil-Martín *et al.*, 2022; Solomakou *et al.*, 2022).

Dentre os compostos fenólicos presentes na BFC, os ácidos clorogênicos (ACGs) e o ácido gálico são os que estão presentes em maiores concentrações, respectivamente (Abbasi-Parizad *et al.*, 2021; Rodrigues da Silva *et al.*, 2022). E os principais grupos dos ACGs presentes na BFC são: ácidos cafeoilquínicos, ácidos dicafeoilquínicos, ácidos feruloilquínicos, ácidos p-cumaroilquínicos e ácidos cafeoilferuloilquínicos (Bouhzam *et al.*, 2023).

A fração lignocelulósica, apresentada na Figura 1, é a porção mais abundante na BCF e é composta pela hemicelulose, celulose e lignina, e esta estrutura contendo esses três componentes está fortemente associada devido a ligações não covalentes e covalentes (Baruah *et al.*, 2018).

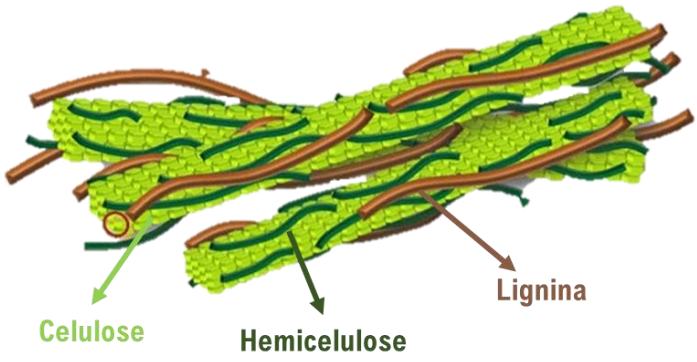


Figura 1 - Estrutura da fração lignocelulósica, composta pela hemicelulose, celulose e lignina.
Fonte: Adaptado de Jensen *et al.* (2017).

A celulose possui uma estrutura cristalina formada por camadas de glicose ordenadamente empilhadas, formando uma estrutura rígida com interações intra- e intermoleculares através das ligações de hidrogênio nas cadeias celulósicas e interações de Van der Waals entre as cadeias (Ávila *et al.*, 2021). Além disso, a celulose é constituída de cadeias

poliméricas com grau de polimerização entre 4000 e 6000 monômeros, que é um fator importante para a característica recalcitrante do material lignocelulósico (Chakraborty *et al.*, 2024).

A lignina possui uma estrutura fenólica altamente polimerizada e interpola a celulose e a hemicelulose (Baruah *et al.*, 2018). Esta estrutura possui um grau de polimerização entre 450 e 550 unidades, e é composta principalmente por três álcoois 4-hidroxicinamil que contêm compostos aromáticos como: p-hidroxifenil, siringil e guaiacil (Chakraborty *et al.*, 2024). Além disso, ela possui um papel importante na proteção das plantas com relação a proteção contra patógenos e insetos, bem como no fortalecimento das estruturas de crescimento das plantas (Li *et al.*, 2022).

A hemicelulose é a estrutura de maior relevância na borra de café por ser a que possui a maior proporção dentre todas as frações, como foi citado anteriormente. Esta possui uma estrutura hetero polimérica com grau de polimerização entre 100 e 200 unidades de monossacarídeos (Chakraborty *et al.*, 2024) e é composta por principalmente hexoses (manose e galactose) e pentoses (arabinose e xilose) (Jin Cho *et al.*, 2022), podendo ser ramificadas ou não.

Com relação a esta estrutura hetero polimérica, esta é formada pelas arabino-galactomananas de tipo II e as galactomananas (Nguyen *et al.*, 2019; Simões *et al.*, 2010; Tian *et al.*, 2017), esta última representa cerca de 20 – 30% da borra em base seca (Bhaturiwala; Modi, 2020). Tendo principalmente a manose e a galactose como os açúcares monoméricos principais das cadeias poliméricas (Tian *et al.*, 2017).

As galactomananas são mananas que possuem mais de 5% de galactoses em sua cadeia, além de serem compostas por uma cadeia linear de manoses ligadas entre si por ligações β(1-4) com ramificações formadas por galactoses no carbono C-6, o grau de polimerização e a relação manose:galactose varia de acordo com a fonte e por isso a proporção manose:galactose podem variar de 1:1 à 4:1 (Singh; Singh; Arya, 2018; Voiniciuc, 2022). Enquanto as arabino-galactomananas de tipo II são caracterizadas pela presença de resíduos de galactose ligados por interações (1→3)- e (1→3,6)-, assim como resíduos de arabinose ligados por interações (1 → 5), aproximadamente 3% (Simões *et al.*, 2010). Além disso, em estudo realizado com o café torrado, (Moreira; Filho, 2008) determinaram a composição dos grupos acetil, galactose e arabinose presentes nas cadeias de mananas, estimando as concentrações de galactose e arabinose em 3,2 mol% e 0,9 mol%, respectivamente.

Além da BCF, outros resíduos agroindústrias também possuem majoritariamente mananas em sua estrutura lignocelulósica, os principais são: o farelo de coco, a palha de milho,

a casca da batata e a torta de palma (Awasthi *et al.*, 2022). Quando comparada com outras fontes de mananas, a fração hemicelulósica da borra de café possui aproximadamente 39% em base seca de mananas, enquanto a torta de palma (dendê) e o farelo do coco que possuem 57% e 21%, respectivamente (Singh; Ghosh; Goyal, 2018), o que demonstra que a BCF está entre as principais fontes de mananas e consequentemente manose. A Tabela 1 apresenta a concentração de manose presente em diferentes resíduos agroindustriais. Desta forma, a borra de café apresenta um grande potencial para ser usada com matéria-prima no desenvolvimento de produtos de alto valor agregado.

Tabela 1 - Teor de manose de diferentes resíduos agrícolas. Os dados são expressos em porcentagem de peso, em uma base seca.

Matéria prima	Manose (g/100 g)	Referências
Sementes de açaí	47,09	Monteiro *et al.* (2019)
Farelo de coco	46,67	Antia *et al.* (2023)
Torta de palma	39,23	Antia *et al.* (2023)
Borra de café	19,07	Ballesteros; Teixeira; Mussatto (2014)
Madeira de *Pinus pinaster*	12,30	López *et al.* (2020)
Pinheiro radiata	11,30	Otieno, Daniel Obed e Ahring (2012)

Fonte: Elaborada pelo Autor (2025).

2.3. APLICAÇÕES DA BORRA DE CAFÉ

A borra de café, devido a presença de compostos bioativos, óleos, açúcares, taninos, corantes, antioxidantes, cafeína entre outros compostos que podem ser extraídos, tem grande potencial para ser introduzida como matéria-prima dentro de uma biorrefinaria, dando, ao que atualmente é considerado um resíduo, uma destinação mais adequada e reduzindo os impactos ambientais gerados pelo alto volume de material descartado e pelo descarte inadequado.

As biorrefinarias são responsáveis por transformar subprodutos dos setores alimentícios e agroindustriais, como a BCF, em produtos de maior valor agregado através de iniciativas que visam uma produção mais sustentável (Forcina *et al.*, 2023). Além disso, o desenvolvimento de biorrefinarias contribui para o desenvolvimento de uma economia mais sustentável, gerando empregos, aumentando a renda da região onde estas biorrefinarias forem instaladas e aumentando o ciclo de vida da borra de café (Murthy; Madhava Naidu, 2012).

Nos últimos anos a BCF vem sendo mais explorada por pesquisadores, e este interesse está relacionado com 4 fatores principais: a composição química da BCF, que pode gerar matérias-primas para as indústrias alimentícia, farmacêutica e de energia (Sanjay Gurav; Mudoi, 2022; Sharma; Ray; Singhal, 2021), também devido ao fato da quantidade que é gerada desta biomassa (aproximadamente 1,88 kg de BCF úmida por kg de grãos de café consumidos) (Schmidt Rivera *et al.*, 2020), por ser uma biomassa disponível em diversas localidades, e por

ser uma biomassa que não possui problemas quanto a sazonalidade (Rajabi Hamedani *et al.*, 2022).

A primeira abordagem é o aproveitamento da borra de café como matéria-prima na produção de biocombustíveis, passando por processos de extração, transesterificação, hidrólise, fermentação e pirólise, é possível obter biogás, biodiesel, *biochar*, bio-óleo, *pellets* e bioetanol (Franca; Oliveira, 2022; Kamil *et al.*, 2020; Nguyen *et al.*, 2019; Zhang, Shiqi *et al.*, 2021).

No entanto, de acordo com a "cascata de valorização da biomassa" apresentada na Figura 2, as rotas de valorização das correntes de resíduos devem priorizar a produção de compostos para as indústrias farmacêutica, alimentícia e de ração animal, respectivamente, devido ao seu maior valor agregado.

Seguindo essa perspectiva, a indústria de alimentos também pode se beneficiar da valorização da borra de café em biorrefinarias. Isso porque esta biomassa é uma fonte em potencial de compostos funcionais, compostos estes que possuem ações anti-oxidante, prebiótica e anti-inflamatória (Arya *et al.*, 2022; Sharma; Ray; Singhal, 2021).

Ademais, com a crescente demanda por alimentos mais saudáveis e que possuam em suas formulações ingredientes naturais, a indústria de alimentos vem se reinventando para atender as demandas do mercado e o aproveitamento da BCF para a obtenção de compostos funcionais sem competir com a produção de alimentos é a grande chave para o sucesso (Ávila *et al.*, 2021; Sarghini *et al.*, 2021).

Um exemplo prático do aproveitamento integral da borra de café através do processamento em biorrefinarias é a comercialização de fibras de café modificadas pela empresa AQIA, que possui aplicações nas indústrias farmacêuticas e de alimentos (Strieder *et al.*, 2023). Além disso, algumas *startups* têm desenvolvido projetos de aproveitamento da borra de café com o objetivo de atender as indústrias de alimentos e cosméticos como por exemplo: a *startup* Kaffe Bueno (óleo, farinha sem glúten e fibras), UpCicle (cosméticos) e GroCycle (substrato para crescimento de cogumelos) (Best Coffee, 2021).

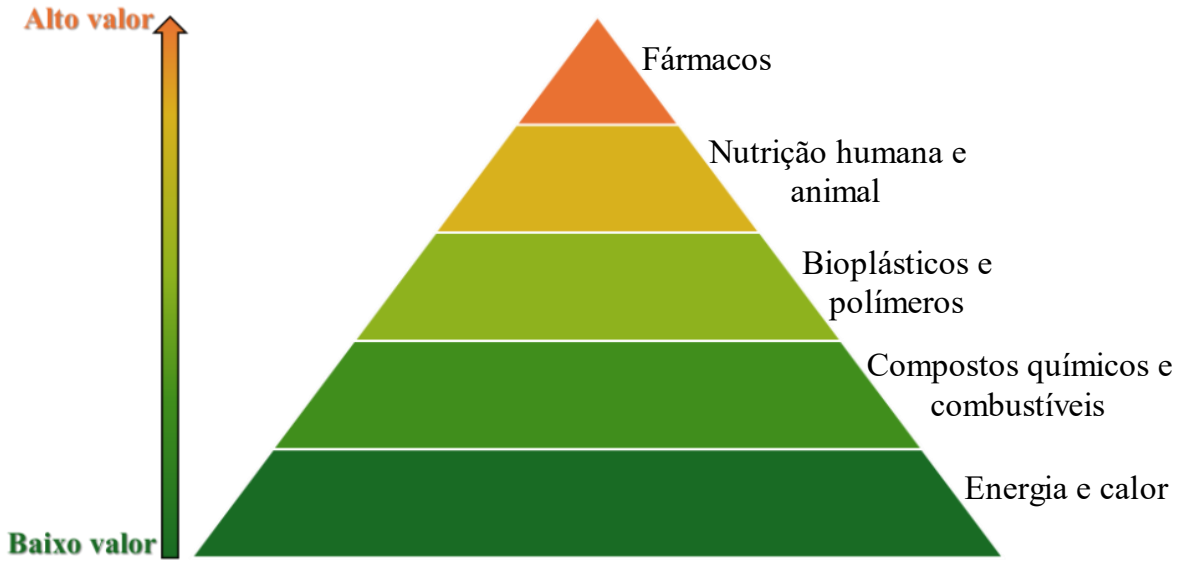


Figura 2 - Cascata de valorização da biomassa de acordo com o valor agregado de cada setor.
Fonte: Adaptado de Lange *et al.* (2012).

Devido ao alto teor de mananas presente na fração hemicelulósica, a BCF vem ganhando destaque para o seu aproveitamento na produção de oligossacarídeos, no caso da borra de café, os manano-oligossacarídeos (MOS) (Bhaturiwala; Modi, 2020; Nguyen *et al.*, 2019; Sarghini *et al.*, 2021; Tian *et al.*, 2017). Estes oligossacarídeos possuem propriedades prebióticas (Arya *et al.*, 2022), podendo ser utilizados na forma integral, pela indústria farmacêutica, ou como um aditivo nutricional em produtos alimentícios (Sarghini *et al.*, 2021). Assim, conhecer a estrutura geral da porção hemicelulósica é de extrema importância para se prever a composição de hexoses e pentoses dos mono- e oligossacarídeos presentes no hidrolisado.

Desta maneira, por conta da fração lignocelulósica possuir uma estrutura complexa e estarem presentes compostos que tenham potencial para serem utilizados como percursores de produtos de alto valor agregado, é necessário aplicar um método de pré-tratamento da borra de café que seja capaz de extrair a matiz hemicelulósica da fração lignocelulósica e transformar a cadeia polimérica da hemicelulose em compostos de maior valor agregado.

2.4. PRÉ-TRATAMENTO DA BIOMASSA

A primeira e essencial etapa para promover a valorização da BCF é realizar testes em escala de laboratório para avaliar diferentes rotas de valorização, alinhadas com avaliações técnicas, econômicas e ambientais para determinar as alternativas mais viáveis (Ingrao *et al.*, 2022). Pela visão de uma biorrefinaria, o processamento da biomassa deve tentar recuperar ao máximo todos os compostos disponíveis na biomassa para que possam ser transformados em

produtos de maior valor agregado, sem gerar novos resíduos provenientes do processo de aproveitamento.

As etapas de extração e recuperação dos compostos do material lignocelulósico irão depender da origem da matéria-prima e devem primeiramente recuperar compostos que serão destinados a produção de fármacos ou alimentos, para evitar possíveis contaminações, e posteriormente os compostos de maior valor agregado (Mata; Martins; Caetano, 2018). Desta forma, o pré-tratamento é um processo vital quando buscamos o aproveitamento integral da biomassa lignocelulósica. Principalmente quando o objetivo é poder introduzir a biomassa, neste caso a BCF, como matéria-prima para biorrefinarias.

Nesse âmbito o método de pré-tratamento ideal deve ser capaz de cumprir três objetivos principais: (1) produzir oligo- ou monossacarídeos com alta eficiência de extração da matriz hemicelulósica; (2) ser capaz de reduzir os custos de operação através da redução do tempo de reação e diminuir os processos de *downstream*; (3) remover a lignina, lipídios e outros compostos que não sejam açúcares (Nguyen *et al.*, 2019).

Entretanto, não há nenhum método de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica que consiga atender idealmente todos os 3 objetivos, sendo necessário escolher o pré-tratamento de acordo com as propriedades da biomassa que será utilizada, provenientes das análises de caracterização, para obter a máxima eficiência do pré-tratamento (Li *et al.*, 2022).

Atualmente os métodos de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica podem ser classificados, principalmente em: físico (moagem, micro-ondas, ultrassom, extrusão), químico (ácidos, bases, solventes e compostos oxidantes), físico-químico (explosão por vapor, CO_2 supercrítico, hidrotérmicos e explosão da fibra por amônia) e biológico (enzimático, microrganismos e enzimas imobilizadas) (Awasthi *et al.*, 2022; Baruah *et al.*, 2018).

Os métodos físicos de pré-tratamento são baseados no princípio da redução do tamanho das partículas, através da moagem mecânica ou da radiação, fazendo com que haja a quebra das ligações intramoleculares presentes nas estruturas poliméricas das frações celulósica, hemicelulósicas e da lignina (Li *et al.*, 2022). Entretanto, estes métodos são geralmente utilizados como uma etapa prévia ou de coprocessamento de pré-tratamentos químicos, físico-químicos ou biológicos (Chakraborty *et al.*, 2024).

Por conta da estrutura complexa e rígida da biomassa lignocelulósica, o fracionamento desta necessita além do remodelamento físico, de reações químicas. Nesse quesito, os métodos de pré-tratamento físico-químicos contemplam tanto as forças de cisalhamento, que remodelam a estrutura, quanto reação químicas (Prasad; Padhi; Ghosh, 2023) e estes métodos podem ser

realizados utilizando tanto por líquidos, quanto por vapor à altas temperaturas (Baksi *et al.*, 2023).

Os métodos que utilizam vapor para realizar o fracionamento da fração lignocelulósica, operam em faixas de temperatura entre 60 e 260 °C, e a altas pressões (6,9–48,3 bar), fazendo com que as moléculas dos reagentes vaporizados penetrem na estrutura da biomassa e a rápida liberação do vapor, faz com que haja o rompimento das fibras (Baruah *et al.*, 2018). No caso dos métodos hidrotérmicos, estes são realizados entre 150 e 230 °C, a pressões que variam entre 4,9 e 20 bar, e o princípio fundamental é a autoionização da água em H_3O^+ (Baksi *et al.*, 2023).

Os métodos biológicos de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica geralmente utilizam bactérias, fungos, uma combinação de microrganismos, ou as enzimas produzidas por estes microrganismos (Prasad; Padhi; Ghosh, 2023). Existem dois sistemas enzimáticos extracelulares envolvidos nos microrganismos, um sistema hidrolítico (responsável pela degradação da celulose e das hemiceluloses) e outro ligninolítico (responsável por despolimerizar a lignina) (Baruah *et al.*, 2018). Estes métodos são considerados os de menores impactos ao meio ambiente, por não usar reagentes químicos e por raramente produzir subprodutos (Basak *et al.*, 2023).

Entretanto, o pré-tratamento biológico é principalmente influenciado por fatores como: condições físicas (temperatura, tamanho das partículas), químicas (pH) e biológicas (bactérias ou fungos) (Prasad; Padhi; Ghosh, 2023), além de que os processos enzimáticos necessitam de um processo prévio de remoção de impurezas e controles da viscosidade e da densidade do hidrolisado, o que se caracteriza como uma desvantagem em relação à hidrólise química que não possui a necessidade deste processo adicional (Du *et al.*, 2011).

Os métodos de pré-tratamentos químicos geralmente são baseados na modificação da estrutura cristalina da celulose e na remoção das frações de hemicelulose e lignina da biomassa utilizando diferentes reagentes químicos, incluindo ácidos, bases, solventes e outros compostos oxidantes (Sai Bharadwaj *et al.*, 2023). O pré-tratamento químico é o método comumente utilizado em processos industriais devido a sua simplicidade de aplicação e operação, e por serem métodos que possuem alta eficiência (Li *et al.*, 2022). Entretanto, estes métodos possuem comumente duas desvantagens principais: a geração de inibidores e a necessidade da neutralização dos resíduos gerados (Basak *et al.*, 2023).

Com relação aos métodos de pré-tratamento alcalinos, estes são frequentemente utilizados quando o foco é a solubilização da lignina, e o hidróxido de sódio é o reagente que possui a maior eficiência (Chakraborty *et al.*, 2024). A solubilização da lignina e de fragmentos dá hemicelulose ocorre devido à reação de saponificação entre o reagente alcalino e as lições

intermoleculares de ésteres presentes entre a lignina e a hemicelulose, causando a quebra destas ligações (Baruah *et al.*, 2018).

Por outro lado, quando o foco do pré-tratamento é a extração da fração hemicelulósica, os métodos químicos utilizando ácidos diluídos são os mais utilizados, principalmente pela capacidade dos ácidos em quebrar as ligações glicosídicas entre as porções hemicelulósicas e celulósicas devido a presença dos íons hidrônios formados em solução, que rompem estas ligações (Baruah *et al.*, 2018). A Tabela 2 apresenta um resumo das vantagens e desvantagens dos principais métodos de pré-tratamento de biomassas lignocelulósicas.

Tabela 2 - Vantagens e desvantagens dos principais métodos de pré-tratamento de biomassas lignocelulósicas.

Métodos de pré-tratamento	**Vantagens**	**Desvantagens**	**Referências**
Físicos:			
Moagem	Aumenta a área superficial; Não há a produção de inibidores; Redução do grau de polimerização da celulose; Tempo operacional curto.	Alto consumo energético; Alto custo dos equipamentos.	Prasad, Padhi e Ghosh (2023)
Micro-ondas	Baixo consumo energético; Tempo operacional curto; Fácil operação; Mínima formação de inibidores.	Baixa penetração na estrutura lignocelulósica. Necessidade de processos de pré-tratamento adicional.	Baruah *et al.* (2018)
Ultrassom	Tempo operacional curto; Processo seguro; Baixo consumo de reagentes.	Alto consumo energético; Necessidade de processos de pré-tratamento adicional.	Li *et al.* (2022)
Extrusão	Mínima formação de inibidores e compostos de degradação; Processo de fácil escalabilidade; Não utiliza reagentes.	Controle da temperatura inadequado; Alto consumo energético; Alto custo de operação; Necessidade de processos de pré-tratamento adicional.	Chakraborty *et al.* (2024)
Químicos:			
Ácido	Alta solubilização da hemicelulose e parcial da lignina; Tempo de reação curto; Adequado para biomassas com baixo teor de lignina.	Processo é perigoso; Causa corrosão dos equipamentos; Formação de compostos inibidores.	Prasad, Padhi e Ghosh, (2023)

Ácido diluído	Alta solubilização da hemicelulose e parcial da lignina; Menor formação de compostos inibidores; Processo de fácil escalabilidade; Menor corrosão dos equipamentos.	Formação de compostos inibidores; Corrosão dos equipamentos; Alto custo de recuperação do ácido.	Lorenci Woiciechowski *et al.* (2020); Pasquier, du, Paës e Perré (2023)
Alcalino	Alta eficiência de remoção da lignina; Aumento da área superficial; Diminuição do grau de polimerização e cristalinidade.	Tempo de residência longos; Alto custo de recuperação dos reagentes.	Baruah *et al.* (2018)
Líquidos Iônicos	Baixa ou pouca formação de inibidores; Diminuição da cristalinidade da celulose recuperada; Recuperação da lignina.	Alto custo dos reagentes; Processos de *downstream* complexos.	Prasad, Padhi e Ghosh (2023)
Solventes orgânicos	Recuperação de lignina de alta qualidade; Fácil recuperação dos solventes.	Necessidade de secagem e recuperação dos solventes; Formação de furfural; Alto custo dos solventes; Necessidade de condições controlada de operação.	Baksi *et al.* (2023)
Ozônio	Não a formação de inibidores; Reação ocorre em condições ambiente; Separação efetiva da lignina.	Grande quantidade de ozônio requerida; Alto custo operacional.	Li *et al.* (2022); Prasad, Padhi e Ghosh, (2023)
Físico-químicos:			
Explosão por vapor	Não utiliza reagentes químicos; Baixo impacto ambiental; Alta eficiência energética; Não é preciso reciclar os reagentes.	Alto tempo de residência; Formação de inibidores; Baixa remoção da lignina; Depende da umidade da biomassa; Dependente do tamanho das partículas.	Baruah *et al.* (2018)
CO_2 supercrítico	Baixo impacto ambiental; Não há a formação de inibidores; Altas taxas de conversão.	Necessidade de altas pressões; Alto custo de operação.	Chakraborty *et al.* (2024)
Hidrotérmicos	Não utiliza catalizadores ou reagentes;	Baixa eficiência energética; Alto consumo de água;	Li *et al.* (2022)

	Processo de fácil operação; Processo de baixo custo.	Baixo rendimento dos produtos.	
Explosão da fibra por amônia	Tempo de reação curto; Baixa formação de inibidores.	Parcialmente quebra a lignina e a hemicelulose; Alto consumo de amônia; Não recomendado para biomassas com alto teor de lignina; Promove a corrosão dos equipamentos.	Li *et al.* (2022); Prasad, Padhi e Ghosh (2023)
Biológicos:			
Bactérias	Baixo consumo energético; Não utiliza catalisadores ou reagentes; Não há formação de inibidores; Ambientalmente amigável.	Longo tempo de reação; Necessidade da remoção da lignina; Hidrólise parcial de hemicelulose; Consumo dos açúcares do meio reacional; Influenciado por parâmetros físicos.	Baksi *et al.* (2023); Sai Bharadwaj *et al.* (2023)
Fungos	Baixo consumo energético; Não utiliza catalisadores ou reagentes; Capaz de degradar lignina, celulose e hemicelulose de acordo com as espécies; Não há formação de inibidores; Ambientalmente amigável.	É preciso diferentes espécies para diferentes biomassas; Longo tempo de reação; Aumento dos custos operacionais; Maior risco de contaminção	Baksi *et al.* (2023); Sai Bharadwaj *et al.* (2023)

Fonte: Elaborada pelo Autor (2025).

Além disso, o pré-tratamento realizado visando a extração da porção hemicelulósica por ácido é favorecido, principalmente em escala industrial, em relação aos métodos que utilizam solventes orgânicos, por conta do alto custo dos solventes, da necessidade de recuperar, formação de compostos tóxicos e reciclar os solventes após a hidrólise; em relação ao método de explosão a vapor devido a solubilização parcial da hemicelulose, e em relação a auto hidrólise devido ao alto consumo energético (Lorenci Woiciechowski *et al.*, 2020).

Em geral, podem ser utilizados diferentes ácidos orgânicos como: ácido acético, ácido cítrico, ácido oxálico e ácido málico; e inorgânicos: ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico e ácido clorídrico (Awasthi *et al.*, 2022). Os ácidos inorgânicos vêm sendo estudados extensivamente com o objetivo de extrair a hemicelulose de biomassas lignocelulósicas,

permitindo que estes ácidos possam ser aplicados em processos industriais em razão da maior compreensão do modo de ação e das suas vantagens e desvantagens.

Dentre os ácidos inorgânicos citados, o ácido sulfúrico é preferencialmente utilizado, isso porque ele é mais barato comparado aos ácidos nítrico e fosfórico, além de ser menos nocivo aos equipamentos industriais (Lorenci Woiciechowski *et al.*, 2020), aumentando sua eficiência econômica em relação aos outros ácidos inorgânicos.

Apesar do processo de pré-tratamento ácido ser demasiadamente eficiente na extração da fração hemicelulósica de biomassas lignocelulósicas, este processo possui uma desvantagem, que é a formação de compostos indesejados, inibidores e compostos corrosivos que acabam deteriorando os equipamentos (Yue *et al.*, 2022). Entre os compostos inibidores formados, pode-se citar os mais relevantes: furfural, 5-hidroximetilfurfural (5-HMF), ácido acético, ácidos fenólicos e aldeídos (Baruah *et al.*, 2018).

O ácido acético, o 5-HMF e o furfural são conhecidos por serem inibidores de micro-organismos, principalmente de leveduras que utilizam o hidrolisado como meio fermentativo, provocando a piora no rendimento da fermentação quando estes compostos estão acima de 2,0 g/L, 1,0 g/L e 1,0 g/L, respectivamente (Lorenci Woiciechowski *et al.*, 2020). Entretanto, esta desvantagem pode ser superada utilizando ácidos diluídos, ou seja, reações mais brandas, fazendo com que a corrosão dos equipamentos seja menor, além de diminuir a formação de compostos indesejados como o furfural, ácido acético e o 5-HMF.

Diversos estudos verificaram a eficiência da etapa de pré-tratamento da borra de café com o intuito de determinar quais as melhores condições de extração da hemicelulose e aproveitamento desta biomassa. Jin Cho *et al.* (2022) utilizou diversas etapas com o objetivo de fazer o aproveitamento integral da borra de café, a extração da hemicelulose foi realizada através da hidrólise com ácido acético diluído, os autores diminuíram a concentração total de açúcares de 49,22% para 42,93% em base seca devido a extração da galactomanana presente na hemicelulose. Sarghini *et al.* (2021) realizou a hidrólise ácida com ácido clorídrico, tendo resultados promissores quanto a produção de OS, principalmente trissacarídeos (71,60 – 79,23% m/m), tetrassacarídeos (15,75 – 20,14% m/m) e pentasacarídeos (4,59 – 7,41% m/m).

Em outro estudo, Ballesteros, Teixeira e Mussatto (2017) fizeram a auto hidrólise da borra de café e obtiveram um rendimento de 29,29% (g/g) de polissacarídeos quando aplicaram a condição otimizada, a 160°C, por 10 min e uma relação sólido/líquido de 1 g:15 ml. Entretanto, até o momento, não foram encontrados na literatura estudos que tenham avaliado o uso de ácido sulfúrico no pré-tratamento da borra de café com o objetivo de obter oligossacarídeos (OS).

2.5. ECONOMIA CIRCULAR (EC) E ANÁLISE DO CICLO DE VIDA (ACV)

Desde a revolução industrial, as empresas têm seguido um processo de produção linear tradicional, também conhecido pelo seu modelo de produção que consiste em "extrair-produzir-descartar", no qual as matérias-primas são extraídas de recursos naturais, transformadas em produtos consumíveis e descartadas ao final de sua vida útil (Neves; Marques, 2022). O processo de produção linear tem causado a degradação ambiental, em grande parte devido à geração de resíduos e às emissões de gases de efeito estufa (Neves; Marques, 2022; Talekar *et al.*, 2023; Tiwari; Si Mohammed, 2024).

A geração de resíduos do setor alimentício, que representa aproximadamente um terço do total de alimentos produzidos, tem recebido maior atenção nas últimas décadas devido às suas implicações financeiras (estimadas em aproximadamente US$ 990 bilhões) e ao seu impacto ambiental (equivalente a 3,3 bilhões de toneladas de CO_2) (Patel *et al.*, 2019). Além disso, à medida que a população global cresce, a demanda por recursos alimentares continuará a aumentar (Gusmerotti *et al.*, 2019). Consequentemente, os resíduos produzidos se tornaram uma preocupação econômica e ambiental significativa, com projeções indicando que poderão chegar a 3,40 bilhões de toneladas até 2030 (Talekar *et al.*, 2023).

Dessa forma, para mitigar esses possíveis danos, é necessário adotar uma metodologia sustentável que incorpore o gerenciamento e a valorização de resíduos. Isso pode ser feito transformando os subprodutos do setor alimentício, os resíduos agroindustriais e da pecuária em produtos de maior valor agregado (Forcina *et al.*, 2023; Rajabi Hamedani *et al.*, 2022; Schmidt Rivera *et al.*, 2020). Esta valorização está alinhada com o novo modelo econômico que foi denominado como EC, que tem um potencial significativo para abordar os problemas ambientais e econômicos associados ao paradigma tradicional de produção "extrair-produzir-descartar" (Neves; Marques, 2022; Tiwari; Si Mohammed, 2024).

O conceito de EC é abrangente e considera todos os setores da sociedade. A premissa fundamental desse modelo é estabelecer ciclos de retroalimentação nos quais os fluxos de resíduos são reintegrados ao processo de produção, com o objetivo de prolongar a retenção de materiais e recursos dentro do próprio processo de produção. Isso, por sua vez, serve para reduzir a geração de resíduos e os impactos ambientais associados (Grafström; Aasma, 2021; Ren; Albrecht, 2023; Schmidt Rivera *et al.*, 2020). A transição do conceito de produção linear para o circular é realizada seguindo os princípios dos 10 Rs (recuperar, reciclar, reutilizar, remanufaturar, reformar, consertar (*refurbish*), reutilizar, reduzir, repensar e recusar) de acordo com Kirchherr, Reike e Hekkert (2017).

A implementação da EC impacta a sociedade em diferentes níveis, de acordo com as atividades desenvolvidas. Essas atividades podem ser divididas em nível micro, meso e macro (Masi *et al.*, 2018). As atividades de nível micro são ações específicas e geralmente estão relacionadas às atividades cotidianas e ao conceito 3R (reduzir, reutilizar e reciclar), enquanto as atividades de nível meso são iniciativas colaborativas entre diferentes setores, como a construção de parques industriais com arquitetura e infraestrutura ecológicas, e as atividades de nível macro são as ações e políticas implementadas pelas instituições governamentais em relação à EC (Grafström; Aasma, 2021).

Conforme mencionado anteriormente, como a EC afeta todos os níveis da sociedade, há a necessidade da colaboração de todos os níveis da sociedade em direção ao modo de pensar e agir baseados nos conceitos da EC. Assim, os políticos e os governos desempenham um papel importante na transição do processo de produção tradicional para a abordagem de EC, criando leis bem definidas, desenvolvendo incentivos à inovação tecnológica e benefícios econômicos para as empresas e os consumidores que praticarem iniciativas de EC (Grafström; Aasma, 2021; Gusmerotti *et al.*, 2019; Ren; Albrecht, 2023). Portanto, a transição do processo de produção extrair-produzir-descartar para o modelo de EC precisará da colaboração dos diferentes setores e é uma ação essencial para a realização dos 17 Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) propostos pela Organização das Nações Unidas (ONU).

Nesse sentido, a valorização de resíduos e subprodutos dos setores alimentício e agroindustrial, como a biomassa gerada, é uma iniciativa essencial para a obtenção de uma EC devido à redução do descarte de resíduos, do uso de biomassa virgem e, consequentemente, dos impactos ambientais causados pelo descarte inadequado (Forcina *et al.*, 2023; Paleari, 2024; Schmidt Rivera *et al.*, 2020).

Nos últimos anos, a BCF tem atraído o interesse de pesquisadores e indústrias de biorrefinaria que estão criando alternativas de valorização de resíduos e reduzindo o descarte em aterros sanitários, devido aos 4 fatores citados no item 2.3. Assim, esse subproduto do consumo de café tem o potencial de ser uma matéria-prima de biorrefinaria para a extração de fibras alimentares das frações de hemicelulósica (Jana *et al.*, 2021; Strieder *et al.*, 2023; Wongsiridetchai *et al.*, 2021).

Nesse sentido, uma abordagem sistemática, como a ACV, é uma ferramenta crucial que analisa as entradas e saídas de cada etapa do ciclo de vida do produto e quantifica o impacto ambiental de cada etapa, o que promove uma melhor compreensão das vantagens e dos impactos dos processos avaliados e, consequentemente, melhora a tomada de decisões (Barbosa *et al.*, 2021; de Oliveira Fernandes *et al.*, 2025; Schmidt Rivera *et al.*, 2020).

O objetivo do estudo da ACV é quem define as fronteiras de estudo do sistema, a análise do berço ao túmulo (*cradle to grave*) mensura e quantifica os impactos ambientais de todo o ciclo de vida do produto, a análise do berço ao consumidor (*cradle to consumer*) envolve desde a extração da matéria-prima até o consumo do produto, a análise do berço ao portão (*cradle to gate*) avalia desde a obtenção das matérias-primas até a produção do produção do produto nas indústrias, e a análise do portão ao portão (*gate to gate*) refere-se aos impactos ambientais de um específico processo de produção (Ige *et al.*, 2021). Além disso o método de ACV pode ser dividido em 4 etapas: estabelecimento de metas e escopo, criação do inventário, avaliação dos impactos e interpretação dos resultados (Chohan *et al.*, 2023).

Na primeira etapa são determinados os objetivos do trabalho, bem como quais serão os limites ou volumes de controle avaliados e quais são as unidades funcionais utilizadas nas avaliações. Posteriormente, na segunda etapa é feito o levantamento de todos os dados das entradas e saídas ao longo de todo o ciclo de vida do produto como: composição das correntes do processo, emissões de cada etapa, emissões correlacionadas com o transporte de matérias-primas e produtos, geração de resíduos, entre outros. Na terceira etapa são feitos os cálculos dos impactos gerados por todo o processamento das matérias-primas no produto, além de ser feita a identificação de etapas de maior impacto para ser possível tomar decisões ou sugerir modificações. Finalmente, na quarta parte são feitas as análises dos impactos e são tomadas as decisões de acordo com os objetivos desejados.

Dentre os diferentes métodos de ACV, o método ReCiPe é um dos mais recentes e avançadas, com seu conjunto mais amplo de categorias de impacto de ponto médio (*mid-point*) e um mecanismo de cálculo de impacto com escopo global (Huijbregts *et al.*, 2017). Este método combina os pontos fortes da abordagem baseada no ponto médio do CML-IA e da abordagem orientada para o ponto final (*end-point*)/danos do *Eco-indicator* 99, que são métodos de LCA reconhecidos mundialmente (Rashedi; Khanam, 2020).

Atualmente, as análises técnico-econômicas e de impactos ambientais são pré-requisitos pedidos pelas agências de fomento para empresas desenvolvedoras de novas tecnologias que pretendem ter seus projetos financiados, sendo alguns dos parâmetros necessários as estimativas dos impactos dos gases de efeito estufa (GEE) e retorno sobre o investimento (ROI) (Mahmud *et al.*, 2021).

Além disso, as ACVs podem ser utilizadas como ferramenta em 5 tipos de abordagens diferentes: objetivando otimizar o processo com relação aos impactos ambientais, comparar diferentes rotas de produção para o mesmo produto, comparar rotas mais sustentáveis

tecnologias ou processos em estado inicial, avaliar novas alternativas para processos produtivos já existentes e para suportar decisões governamentais (Mahmud *et al.*, 2021).

Nesse contexto, diversos trabalhos foram realizados para avaliar a viabilidade e o impacto ambiental por meio da perspectiva da ACV de diferentes rotas de valorização da BCF, tais como: produção de *pellets* para aplicação como biocombustível sólido, produção de bio-óleo (Rajabi Hamedani *et al.*, 2022), produção de biocompósitos (Ingrao *et al.*, 2022), produção de biodiesel em comparação com incineração, aterro sanitário, digestão anaeróbica, compostagem, aplicação no solo (Schmidt Rivera *et al.*, 2020) e produção de tijolos (Forcina *et al.*, 2023). A Tabela 3 apresenta os principais resultados obtidos através da ACV para diferentes aplicações da BCF.

Assim, como o aproveitamento dos subprodutos agroindustriais, como a BCF, deve priorizar a produção de produtos de maior valor agregado (Figura 2) e com o aumento da procura por produtos alimentícios com propriedades funcionais, especialmente os OS prebióticos, faz-se necessário a otimização da produção dos OS quanto aos parâmetros de pré-tratamento (item 2.4), aos parâmetros ambientais (através da ACV) e aos parâmetros econômicos. Obtendo, desta forma, o processo de produção de menor impacto ambiental, com maior eficiência e rentabilidade, respeitando o conceito de EC.

Tabela 3 - Principais resultados obtidos através da ACV para diferentes aplicações da BCF.

Aplicação	Principais resultados	Referências
Biocombustível Sólido (*pellets*)	Alto impacto na escassez de recursos fósseis.	Rajabi Hamedani *et al.* (2022)
Biocompósitos (Polibutileno succinato/BCF)	O aumento do teor de BCF de 20 para 60 m/m% reduz os valores totais da demanda cumulativa de energia e da pegada de carbono em 7,4 a 8,4%, embora aumente o consumo de eletricidade para o processo de pré-tratamento; Para todos os três compósitos examinados, a fase de processamento é a que mais contribui para a demanda cumulativa de energia e da pegada de carbono.	Ingrao *et al.* (2022)
Biodiesel	Alto impacto em ecotoxicidade e toxicidade humana; Emissões de metais pesados; Alta emissão de GEE (CO_2 e CH_4); Alta depleção de recursos.	Forcina *et al.* (2023); Rajabi Hamedani *et al.* (2022)
Incineração	Menores impactos nas mudanças climáticas; Menores impactos de depleção de metais; Menores emissões de material particulado; Alta emissão de NO_x.	Rajabi Hamedani *et al.* (2022); Schmidt Rivera *et al.* (2020)

Aterro sanitário	Coprodução de biogás; Menores emissões de material particulado; Alta emissão de GEE (CO_2 e CH_4) - 612 kg CO_2 eq.	Forcina *et al.* (2023)
Digestão anaeróbica	Menores impactos nas mudanças climáticas; Menores impactos na depleção dos recursos; Alto impacto na camada de Ozônio.	Schmidt Rivera *et al.* (2020)
Compostagem	Alta emissão de CO_2; Alta depleção de recursos.	Schmidt Rivera *et al.* (2020)
Aplicação no solo	Menores impactos de depleção de metais; Alta emissões de NH_3.	Schmidt Rivera *et al.* (2020)
Bio-óleo	Menores impactos de ecotoxicidade humana; Menores impactos na produção de GEE.	Rajabi Hamedani *et al.* (2022)
Tijolos	Menores emissões de GEE - 145 kg CO_2 eq.	Forcina *et al.* (2023)

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

2.6. OLIGOSSACARÍDEOS E SUAS BIOATIVIDADES

Os compostos funcionais veem ganhando cada vez mais destaque dentro da comunidade científica devido ao seu grande potencial de impactar positivamente os padrões dietéticos adotados atualmente pela sociedade, assim o desenvolvimento e comercialização de alimentos que possuam compostos nutracêuticos incorporados é de suma importância.

Estes compostos funcionais podem ser divididos em 3 grupos diferentes de acordo com a forma com que são incorporados aos alimentos, estes grupos são: alimentos convencionais (alimentos não modificados), alimentos fortificados (alimentos com suplementação de compostos funcionais) e os ingredientes alimentares (componentes advindos de outras fontes que podem ser macronutriente, micronutrientes essenciais etc.) (de Carvalho *et al.*, 2023).

Os compostos prebióticos são exemplos de ingredientes alimentares que podem ser adicionados às formulações alimentares. Os prebióticos são classificados como substratos que são seletivamente metabolizados pela microbiota residente, conferindo um benefício à saúde (Gibson *et al.*, 2017). Além desta função biológica de estimular a microbiota intestinal, os prebióticos também poder ser utilizados para melhorar as características reológicas nos alimentos (Pimentel *et al.*, 2022).

Embora compostos prebióticos estejam naturalmente presentes em alimentos de origem vegetal, suas concentrações na natureza são geralmente baixas, tornando necessária sua adição a alimentos processados, de modo a aumentar sua disponibilidade aos consumidores e possibilitar o alcance da ingestão diária recomendada por meio da dieta (Ferreira *et al.*, 2023).

Atualmente, consumidores estão em busca de alimentos mais saudáveis e que promovam uma melhora na qualidade da sua alimentação, com isso aumentando a demanda comercial de produtos nutracêuticos, especialmente os alimentos contendo prebióticos (Ferreira *et al.*, 2023). O mercado global de prebióticos foi superior a US$ 2,9 bilhões em 2015 (Gonçalves *et al.*, 2023), em 2016 este mercado a marca de US$ 3,34 bilhões (Narisetty *et al.*, 2022a), o que representa um crescimento de aproximadamente 15%. Em 2019, durante a pandemia do vírus SARS-CoV-2, estimou-se que o mercado global de prebióticos poderia alcançar US$ 4,5 bilhões em 2020 e as projeções são que atinja a marca de US$ 8 bilhões até 2026 (Ferreira *et al.*, 2023), representando uma taxa de crescimento anual composta (CAGR) de 10%.

Dentre os compostos com características prebióticas, os oligossacarídeos têm recebido maior destaque na última década por possuírem funções altamente específicas. Os oligossacarídeos por possuírem uma estrutura complexa devido às conformações das ligações glicosídicas, conseguem atingir o intestino grosso e promover a diversificação da microbiota intestinal através do aumento da abundância relativa principalmente das espécies de *Bifidobacterias sp.*, *Lacticaseibacillus sp*, *Lactobacillus sp.*, e consequentemente promovem uma maior produção de metabólitos que controlam diferentes processos fisiológicos (Catenza; Donkor, 2021).

Numerosos compostos foram avaliados quanto às suas propriedades prebióticas (Figura 3), com destaque para os carboidratos. No entanto, atualmente, apenas quatro substâncias possuem um potencial prebiótico amplamente reconhecido: inulina, FOS, GOS e lactulose (Ferreira *et al.*, 2023).

Atualmente, os FOS e os GOS são os oligossacarídeos funcionais mais utilizados dentro da indústria de alimentos (Tabela 4) como: edulcorantes, substituintes de gordura, agentes fortificantes e agentes de volume (Catenza; Donkor, 2021). Além dessas duas classes de oligossacarídeos citadas, os MOS têm demonstrado ser capazes de atuar sobre diversas patologias como: diabetes tipo 2, disbiose intestinal, inflamações autoimunes e câncer colorretal (Kango *et al.*, 2022).

Os MOS possuem uma estrutura complexa, que faz com que estes compostos não sejam digeridos ou absorvidos no estômago ou no intestino delgado, possibilitando que cheguem ao intestino grosso e promovam a expansão da microbiota residente (Wongsiridetchai *et al.*, 2021). MOS podem ser classificados em α-MOS e β-MOS de acordo com as ligações glicosídicas presentes, os α-MOS podem ser obtidos da parede celular de leveduras, enquanto os β-MOS podem ser obtidos de plantas como: coco, café, aloe vera e goma guar; e seus resíduos (Jana *et al.*, 2021; Nguyen *et al.*, 2019).

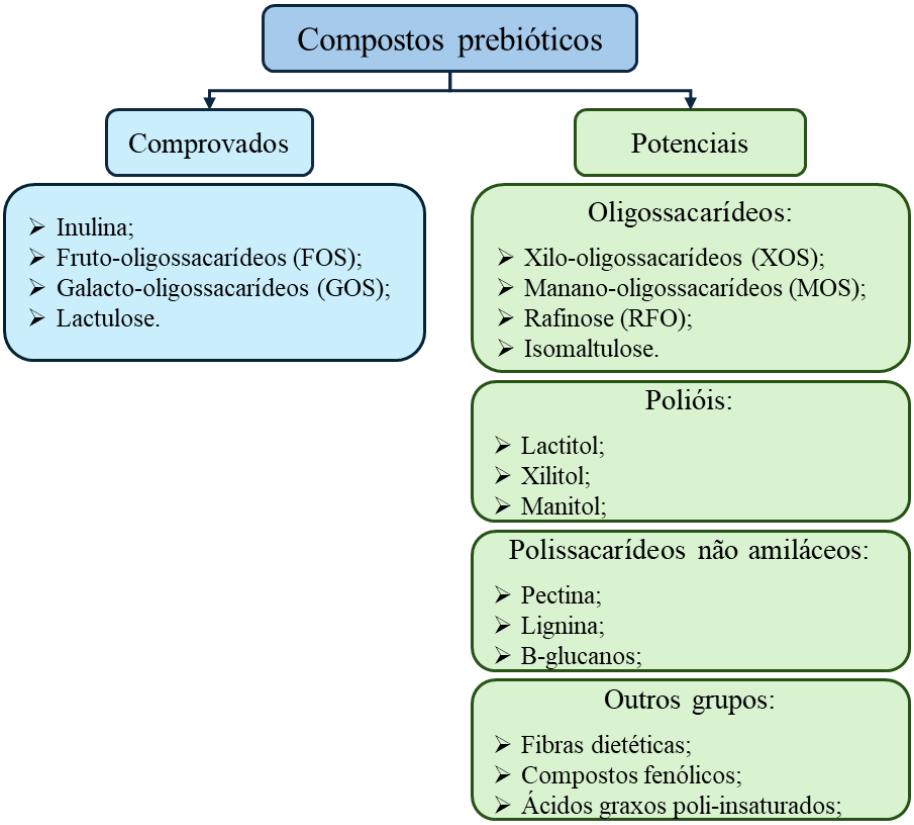


Figura 3 – Principais classes de compostos prebióticos classificados de acordo com as evidências de benefícios a saúde humana.

Fonte: Adaptado de Pimentel *et al.* (2022).

Tabela 4 – Oligossacarídeos disponíveis comercialmente e suas aplicações.

Nomes comerciais	Carboidratos	Aplicações
Frutalose®	Fructo-oligossacarídeos.	Enriquecimento de fibras em formulações; Substituição de açúcar.
Orafiti® P95	Fructo-oligossacarídeos.	Substituição de açúcar.
Nutraflora® P95	Fructo-oligossacarídeos.	Substituição de açúcar. Umectante e prolongamento da vida útil.
Frutafit®	Inulina, frutose e glicose.	Substituição de açúcar e gordura; Aprimoramento do sabor e da sensação na boca.
Oligomate 55	Galacto-oligossacarídeos, lactose, glicose.	Adoçante funcional.
Bioligo® GL 5700 IMF GOS	Galacto-oligossacarídeos, lactose, glicose, galactose.	Formulações infantis.
SureStar™ GOS	Galacto-oligossacarídeos	Formulações infantis, bebidas, sobremesas.
XOS Prebiotic	Xilo-oligossacarídeos.	Suplementação de formulações alimentares.
PreneXOS™	Xilo-oligossacarídeos.	Suplementação de formulações alimentares.

XOS95P	Xilo-oligossacarídeos.	Utilização como açúcar funcional.
Bio-MOS	Manano-oligossacarídeos.	Uso como ração animal.
ActiveMOS	Manano-oligossacarídeos.	Uso como ração animal.
AgriMOS	Manano-oligossacarídeos.	Uso como ração animal.

Fonte: Adaptado de Jana, Kango e Pletschke (2021)

Entretanto, o processo de produção dos MOS através do pré-tratamento com ácido diluído da biomassa não garante que estes possuam características de OS prebióticos. Desta forma, faz-se necessário testar os MOSs obtidos quanto a sua ação prebiótica em bactérias presentes na microbiota, principalmente das espécies de *Bifidobacterias sp.*, *Lacticaseibacillus sp*, *Lactobacillus sp*., *Faecalibacterium prausnitzii*, *Escherichia coli* e *Salmonella spp* (de Carvalho *et al.*, 2023).

A investigação da propriedade prebiótica dos MOS pode ser efetuada através da avaliação do crescimento de bactérias ácido-láticas (BAL) e os impactos sobre microrganismos patogênicos em testes *in vitro* (Wongsiridetchai *et al.*, 2021). Geralmente estes estudos podem avaliar o crescimento de monoculturas de BAL e de acordo com os resultados e objetivos do trabalho podem seguir para testes com co-culturas ou consórcios de microrganismos, o que possibilita entender as interações entre as culturas avaliadas quando estas são suplementadas com o composto de interesse (de Carvalho *et al.*, 2023).

Diferentes estudos avaliaram a propriedade prebiótica dos MOS, obtidos de diferentes fontes, através do crescimento de BAL (Tabela 5) indicando o potencial de reforçar o sistema imunológico, melhorar o equilíbrio da microbiota intestinal e a resistência aos microrganismos patogênicos.

Tabela 5 - Estudos da avaliação da propriedade prebiótica dos MOS obtidos de diferentes fontes através de ensaios fermentativos *in vitro*.

Fonte	Microrganismos avaliados	Resultados	Referências
Farelo de coco	*L. reuteri*, *L. crispatus*, *B. bifidum*, *B. animalis*, *E. coli*, *S. enteritidis*, *S. aureus*, *S. dysenteriae*.	Promoveu o crescimento das espécies de *Lactobacillus sp.* e *Bifidobacterium sp.* Inibiu o crescimento de *S. enteritidis*, *E. coli*, *S. aureus*, *S. dysenteriae*.	Rungruangsaphakun; Keawsompong (2018)
Goma de sementes de alfarroba	*L. delbrueckii, L. acidophilus, L. plantarum, L. fermentum, L. casei*	Aumentou significativamente o crescimento *Lactobacillus sp*.	Kumar Suryawanshi; Kango (2021) Srivastava *et al.* (2017)

	var.rhamnosus, L. brevis, L. casei e L. helveticus *E. coli, S. typhi, L. monocytogenes*.	Redução significativa no crescimento de *E. coli, S. typhi, L. monocytogenes*.	
Goma konjac	*L. delbrueckii* e *L. acidophilus*	Promoveu um baixo crescimento e formação de biofilme pelos microrganismos analisados.	Kumar Suryawanshi; Kango (2021)
Goma guar	*L. plantarum, L. johnsonii, L. paracasei, L. fermentun, B. animals* subsp. *lactis, B. breve, B. bifidum, B. longum* subsp. *Infantis.*	O crescimento de todas as culturas de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* foi significativamente superior ao do controle negativo.	Zhang *et al.* (2024)
Torta de palmiste	*L. plantarum*	Pode utilizar manose, manobiose e manotriose. Todos os hidrolisados testados foram capazes de promover o crescimento dos *L. plantarum.*	Zhang, Rui *et al.* (2021)
Borra de café	*L. acidophilus, L. casei, L. plantarum*, *B. cereus*, *E. coli* e *S. paratyphi*.	MOS promoveu melhora na taxa de crescimento e sobrevivência das BAL, principalmente *L. acidophilus*. Suplementar o meio de cultivo de *L. casei* com MOS inibiu o crescimento de *S. paratyphi*.	Wongsiridetchai *et al.* (2021)
Parede celular de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*	*L. plantarum* e *B. animalis* spp. *lactis* BB12®	Extrato proveniente da hidrólise enzimática foi responsável por promover o maior crescimento para os microrganismos avaliados, sendo maior que o controle positivo (suplementado com FOS)	Faustino *et al.* (2022)

Fonte: Elabora pelo autor (2025).

MOS obtidos do farelo de coco demonstraram possuir propriedades antitumorais, sendo capaz de reduzir para 50% a porcentagem das células de câncer de cólon HT29 em 24 horas e para 40% em 48 horas, quando ministrados a uma concentração de MOS de 500 μg/ml (Ghosh *et al.*, 2015). Em outro estudo realizado por Hernández-Arriaga, Dave Oomah e Campos-Vega (2017), onde os autores compararam o impacto da ingestão da fração não digerida da BCF na microbiota de pessoas com e sem sobrepeso, demonstrou-se que a ingestão da fração não

digerida da BCF tem um efeito inibidor sobre o câncer colorretal. Isso ocorre porque a fermentação desta fração pela microbiota da doadora que possuía um índice de massa corpórea considerada normal (23,3 kg/m²) regula efetivamente a apoptose, atenuando o estresse oxidativo nas células HT-29 do adenocarcinoma de cólon humano (Hernández-Arriaga; Dave Oomah; Campos-Vega, 2017).

Outra propriedade em potencial apresentada pelos MOS é a de agente antialérgico. Em estudos *in vitro* realizados com camundongos C3H/HeN, Ozaki, Fujii e Hayashi (2007) demonstraram que houve uma tendência do tratamento com MOS suprimir a imunoglobulina E (IgE), que quando presentes em altas concentrações indicam a ocorrência de uma inflamação, além de suprimir a produção interleucina-10 (IL-10).

Além disso, no estudo desenvolvido por Wang *et al.* (2018) os resultados mostraram que o MOS pode atenuar a síndrome metabólica induzida pela dieta rica em gordura, incluindo ganho de peso corporal mais lento, redução dos lipídios séricos e resistência à insulina, em ensaios de 11 semanas com ratos que foram alimentados por dieta rica em gordura com e sem a suplementação de MOS. O que indica o uso de MOS atenua distúrbios metabólicos.

Em outro estudo de Yan *et al.* (2019), os autores investigaram os efeitos dos MOS na obesidade induzida pela dieta ocidental e as funções mediadoras da microbiota intestinal e dos metabólitos microbianos. Os resultados indicaram que os MOS possuem potencial nutracêutico no controle do peso corporal e na melhoria da saúde intestinal, devido ao fato de que os MOS suprimiram o apetite, devido a modificação da microbiota intestinal e à produção elevada de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), o que resulta em menor deposição de lipídios.

Ademais, MOS obtidos da planta Konjac foi suplementado em ratos que eram alimentados com uma dieta com alto teor de gordura, e esta suplementação melhorou a tolerância à glicose e à insulina modulando a via de sinalização da insulina por meio da ativação do GLUT-2 e sua translocação para a membrana (Zhu *et al.*, 2019). A melhora com relação ao metabolismo da glicose também foi observada no estudo realizado por Wu *et al.* (2022), os autores incorporaram MOS obtidos da goma de sementes de Cássia durante 8 semanas na alimentação rica em gordura e açúcar de ratos e evidenciaram uma melhora significativa no nível de glicose no sangue em jejum em comparação com o do grupo modelo, além de reduzir a relação entre a área de glucagon e a de insulina.

Além das bioatividades potenciais citadas anteriormente, os MOS podem ser importantes no tratamento de infecções do trato urinário (ITU), um problema comum de saúde pública. Faustino *et al.* (2023) avaliou os possíveis benefícios do uso de extratos de MOS na profilaxia de ITU, sua capacidade de inibir a adesão de *Escherichia coli* uropatogênica às

células uroteliais. Os resultados preliminares indicaram que os extratos de MOS têm potencial para serem usados no tratamento de infecções do trato urinário e demonstraram que o mecanismo pelo qual eles inibem a adesão bacteriana é por meio da inibição competitiva das fímbrias do tipo 1 adesina específica de D-manose (FimH) pela ação da manose, validada pela avaliação do impacto do crescimento bacteriano.

Os MOS são amplamente utilizados como aditivos alimentares em rações animais devido aos seus efeitos na modulação da microbiota intestinal, e sua aplicação nos setores de alimentos nutracêuticos e funcionais também está aumentando (Faustino *et al.*, 2024). Diversos estudos foram realizados utilizando MOS em diferentes concentrações para diferentes tipos de ração animal e demonstram o potencial dos MOS como aditivo alimentar para rações animais para ganho de peso, redução no uso de antibióticos, diminuição do colesterol, entre outros parâmetros bioquímicos do sangue (Tabela 6)

Tabela 6 - Estudos da suplementação de MOS na dieta de animais de corte e os principais resultados obtidos.

Aplicação	**Resultados**	**Referência**
Ração para frangos de corte	Aumento do ganho de peso corporal, proteína total, albumina e aspartame amino transferase no grupo suplementado com MOS 0,2%; Melhora da resposta imunitária para os grupos suplementados com MOS 0,1% e 0,2%; Redução nas concentrações de alanina amino transferase, colesterol e ácido úrico.	Biswas *et al.* (2019)
Suplementação para peixes *Trachinotus ovatus*	Suplementação com 0,1-0,40% de MOS teve o melhor desempenho em termos de crescimento, aumento na área superficial do intestino, das bactérias aeróbias totais, na eficiência de conversão alimentar, na proteína e no valor produtivo das proteínas; Redução na razão de conversão alimentar e no teor de lipídios; Não houve efeito sobre a taxa de sobrevivência.	Hoang, Ky e Thi (2023)
Suplementação para peixes *Megalobrama amblycephala*	A taxa de ganho de peso não foi significativamente diferente após 8 semanas de alimentação; Redução na razão de conversão alimentar no grupo MOS de 400 mg/kg; Aumento nas capacidades bactericidas e antioxidantes do hospedeiro, no número de células caliciformes intestinais, na presença de bactérias benéficas na microbiota e consequentemente na taxa de sobrevivência.	Ding *et al.* (2022)

Suplementação para leitões pós-desmame	Suplementação de MOS 0,2%, aumentou a eficiência alimentar nas duas últimas semanas do ensaio e a altura das vilosidades duodenais; Redução no teor de clostrídios nas fezes ao 14º dia, nos níveis de mRNA dos fatores de necrose tumoral e de receptores do tipo Toll 4.	Agazzi *et al.* (2020)
Suplementação para leitões	Dieta com 800 $mg.kg^{-1}$ de MOS aumentou ou tendeu a aumentar a quantidade de *Lactobacillus;* Redução na presença de *E. coli*, nos níveis de mRNA do fato nuclear κB p65 nos vasos linfáticos intestinais, nas concentrações de citocinas pró-inflamatórias interleucina 4.	Duan *et al.* (2019)

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Levando em consideração todas as bioatividades apresentadas anteriormente além da capacidade prebiótica, os MOS se destacam como compostos nutracêuticos com potencial de serem utilizados na suplementação alimentar ou na profilaxia de infecções. Desta forma, com o objetivo de adequar-se às demandas dos consumidores, que buscam produtos que sejam produzidos de maneira mais sustentável, a indústria de alimentos vem desenvolvendo processos mais eficientes e sustentáveis (Narisetty *et al.*, 2022b).

Tendo isto em vista, a produção de oligossacarídeos prebióticos a partir de resíduos lignocelulósicos agroindustriais tem um papel relevante no desenvolvimento e implementação de processos produtivos mais sustentáveis, por reduzirem a quantidade gerada dos resíduos industriais, reutilizar os resíduos gerados através de biorrefinarias, dar uma destinação mais adequada aos resíduos, introduzir produtos de maior valor agregado ao portifólio das empresas e consequentemente viabilizar economicamente a operação das biorrefinarias.

2.7. AVALIAÇÃO DA BIOACESSIBILIDADE E BIODISPONIBILIDADE

O perfil nutricional e os efeitos à saúde de diferentes tipos de alimentos dependem dos tipos e das quantidades de macronutrientes (proteínas, lipídios e amidos), micronutrientes (minerais e vitaminas) e outros componentes (nutracêuticos, fibra alimentar, flavorizantes, conservantes) que eles contêm (Galanakis, 2021). Ao passarem pelo trato gastrointestinal humano, esses componentes são digeridos, gerando produtos de digestão que podem ser absorvidos pelas células do epitélio (Zhou; Tan; McClements, 2023).

Atualmente, a demanda por novos ingredientes funcionais com atividade biológica cientificamente comprovada *in vitro* e *in vivo* está em alta como resultado do crescimento do mercado global de alimentos funcionais, e os subprodutos da atividade agroindustrial são uma rica fonte de compostos naturais que podem ser potencialmente aplicados no setor de alimentos como fontes de aditivos alimentares (Rossi *et al.*, 2021).

Entretanto a grande maioria dos estudos tem como foco principal a produção dos oligossacarídeos, deixando de lado as avaliações de bioacessibilidade, a biodisponibilidade no trato digestório e quais os impactos na microbiota gastrointestinal (Faustino *et al.*, 2024). Entretanto os testes de bioacessibilidade e de biodisponibilidade são de suma importância quando estamos avaliando compostos com potenciais prebióticos, isso devido às possíveis interações entre os compostos e a matriz alimentar em que será introduzido, que podem acarretar diferentes resultados quando os ingredientes funcionais interagem com a microbiota intestinal (de Carvalho *et al.*, 2023).

A bioacessibilidade é uma medida importante para estimar a fração de compostos que podem ser metabolizados como a quantidade liberada da matriz sólida do alimento (Caicedo-Lopez *et al.*, 2019). Enquanto a biodisponibilidade mede o quanto essas substâncias atingem os tecidos e são usadas nos processos metabólicos, e depende da bioacessibilidade, da absorção, da transformação e do alcance dos tecidos-alvo para produzir modulação molecular ou resposta metabólica (Aguiar; Cazarin, 2021).

Nesse sentido, como MOS são produzidos com o intuito de serem introduzidos em matrizes alimentares como ingrediente funcional com ação prebiótica, é imprescindível realizar protocolos de testes *in vitro*, *in vivo* e ensaios clínicos para determinar o seu valor nutricional, processo de digestão e efeitos sobre a microbiota intestinal; antes que estes manano-oligossacarídeos possam estar disponíveis comercialmente (de Carvalho *et al.*, 2023; Zhou; Tan; McClements, 2023).

O trato gastrointestinal (TGI), apresentado na Figura 4, é composto pela boca (digestão mecânica dos alimentos e mistura com a saliva), a faringe, o esôfago (transporte do bolo alimentar por peristaltismo), o estômago (desintegração mecânica e química dos alimentos, mistura com o suco gástrico e transporte do bolo alimentar), o intestino delgado (transporte do quimo, mistura e absorção de nutrientes) e intestino grosso (transporte do quimo, mistura e absorção de água, minerais, vitaminas, gordura e moléculas orgânicas) (Sensoy, 2021).

Além disso, o TGI possui papel importante na liberação de compostos bioativos, tendo impactos positivos e negativos na bioacessibilidade desses compostos, o que demonstra a importância da avaliação das bioatividades de um determinado bioativo após a sua transformação pelo TGI, através de protocolos que simulam este processo (Salsinha *et al.*, 2023).

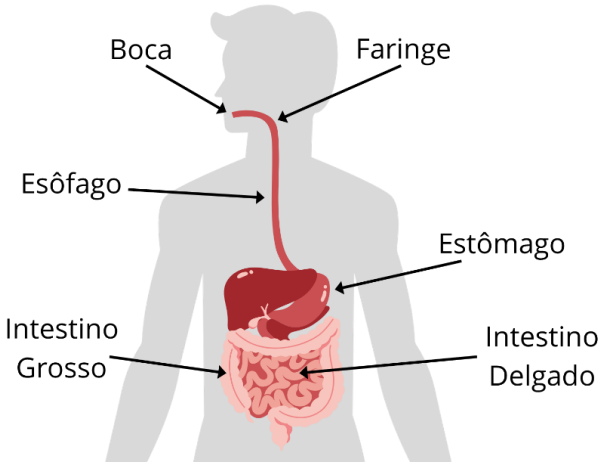


Figura 4 - Diagrama do trato gastrointestinal humano.

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Por esses motivos, os cientistas desenvolveram diferentes tipos de métodos (modelos de digestão *in vitro* e *in vivo*) para avaliar o comportamento dos alimentos no intestino humano (Aguiar; Cazarin, 2021; Sensoy, 2021). Em geral, os estudos *in vivo* (realizados com animais) e ensaios clínicos são a melhor maneira de avaliar a bioacessibilidade e a biodisponibilidade, pois expressam as condições reais e as biotransformações que ocorrem (Aguiar; Cazarin, 2021).

Entretanto, estes modelos possuem algumas desvantagens por serem mais caros, mais complexos de serem executados, possuem uma duração prolongada, o controle da dieta dos pacientes é restrito, e envolve questões éticas (Zhou; Tan; McClements, 2023). Dessa forma, alguns protocolos *in vitro* foram desenvolvidas com o intuito de substituir os métodos *in vivo*, diminuírem os custos dos procedimentos, apresentarem resultados confiáveis e rápidos para avaliar a bioacessibilidade de diferentes compostos (Aguiar; Cazarin, 2021).

Os modelos *in vitro* podem ser divididos em 2 tipos, os modelos estáticos e os modelos dinâmicos. A escolha do tipo de modelo *in vitro* deve levar em consideração os objetivos da pesquisa, espaço disponível para os testes, vantagens, desvantagens e qual o tipo de matriz (Tabela 7).

O maior desafio dos modelos *in vitro* é simular os movimentos peristálticos e o as misturas que ocorrem ao longo de todo o TGI. Enquanto os modelos estáticos simulam esses movimentos através da mistura utilizando vórtex ou banhos agitados, os modelos dinâmicos utilizam reatores que simulam o estômago, o duodeno, o jejuno e o íleo e que imitam os movimentos peristálticos, além de haver a possibilidade de serem acoplados a membranas de filtração para avaliar a absorção de moléculas com baixo peso molecular (Aguiar; Cazarin, 2021).

Tabela 7 - Comparação entre os fatores relevantes na escolha do tipo de método *in vitro*.

Fatores	Modelos estáticos	Modelos dinâmicos
Objetivo da Pesquisa	Avaliações preliminares quanto aos possíveis efeitos à saúde; Avaliações de melhorias nas propriedades de alimentos e medicamentos.	Avaliações da transferência de nutrientes, interações entre matriz e nutrientes, taxa de sobrevivência de probióticos e absorção de prebióticos; Prover dados para o desenvolvimento de novos produtos.
Vantagens	Rápidos, simples de realizar e operar e possuem um menor custo de operação.	Pode ser usado para comparar com testes *in vivo* e testes clínicos; São mais representativos quantos aos fenômenos fisiológicos.
Desvantagens	Dificuldade em simular forças mecânicas e mudanças bioquímicas que acorrem ao longo do trato; Acúmulo de metabólitos que podem influenciar nos processos subsequentes.	Operação mais complexa e com custos mais elevados; Dificuldade na verificação da replicabilidade das condições gastrointestinais.
Aplicações	Podem ser aplicados para avaliar etapas isoladas (gástrica, intestinal) ou a sequência delas; Estudar a liberação de compostos bioativos, solubilidade, biodisponibilidade e bioacessibilidade de compostos puros ou matrizes simples.	Estudos que pretendem avaliar o processo de digestão completo; Indicado para o estudo de matrizes complexas e medicamentos.

Fonte: Adaptado de Ji *et al.* (2022).

Outra dificuldade encontrada com relação aos modelos *in vitro* eram as variações quanto aos parâmetros experimentais, como por exemplo, o transporte do quimo e as concentrações das enzimas utilizadas em cada uma das etapas, e essa variações geram resultados discrepantes e impossibilitam uma comparação mais fidedigna entre os diferentes estudos (Salsinha *et al.*, 2023).

Desta maneira, em 2014 foi desenvolvido o protocolo INFOGEST por um comitê internacional com pesquisadores de 35 nacionalidades diferentes, este protocolo foi responsável por padronizar o conjunto de parâmetros de digestão dos alimentos para uma simulação estática *in vitro* da digestão em adultos (Minekus *et al.*, 2014) e em 2019 este método foi atualizado, incluindo a fase oral do processo de digestão e a utilização da lipase gástrica, e nomeado de INFOGEST 2.0 (Brodkorb *et al.*, 2019).

O protocolo INFOGEST 2.0 foi desenvolvido para simular os parâmetros e condições nas diferentes regiões do TGI (boca, estômago e intestino delgado), incluindo tempos de

retenção, temperaturas, forças mecânicas, pH, composições minerais, atividades enzimáticas, níveis de mucina e níveis de sais biliares (Brodkorb *et al.*, 2019).

Uma vantagem deste método é o fato de as atividades enzimáticas das diferentes soluções e as concentrações serem quantificadas antes de se iniciar o protocolo de digestão, o que possibilita uma melhor comparação entre os dados experimentais obtidos por diferentes pesquisadores (Grundy *et al.*, 2021). Além disso, este método tem sido usado em diferentes estudos relacionados a digestão de alimentos e bebidas e teve a sua robustez comprovada através de extensos estudos e comparações entre laboratórios para matrizes alimentares modelos (Zhou; Tan; McClements, 2023).

Desta forma a digestão dos alimentos ao longo do TGI possui papel importante na liberação de compostos bioativos, além de ser responsável pelos efeitos positivos e negativos decorrentes da liberação destes compostos, o que torna a avaliação de bioacessibilidade e biodisponibilidade através da simulação do TGI de suma importância para o completo entendimento dos potenciais bioativos dos compostos presentes na matriz alimentar (Salsinha *et al.*, 2023).

2.8. FERMETAÇÃO COLÔNICA

Após a digestão ao longo do TGI, as amostras digeridas são incubadas dentro de membranas de diálise imersas em água destilada em recipientes apropriados com o intuito de simular a passagem do material digerido pelas membranas do duodeno e jejuno, e ao final do processo a solução externa representa os compostos que seriam absorvidos, enquanto o material retido nas membranas representa os compostos que seguirão para o cólon (Salsinha *et al.*, 2023). Assim, este material retido pode ser utilizado para a avalição do impacto causado na microbiota.

A formação da microbiota intestinal humana (MIH) é um processo gradual, dinâmico e individualizado, que tem início logo nos primeiros dias de vida e é influenciada pela idade, hábitos alimentares, estilo de vida, hereditariedade e uso de medicamentos, principalmente os antibióticos (de Figueiredo; de Barros Ranke; de Oliva-Neto, 2020; Machado *et al.*, 2023).

Ao longo do TGI o número de células presente aumenta exponencialmente, iniciando com aproximadamente mil células por grama no tecido gástrico, 10 mil células por grama no duodeno, 1 milhão de células por grama no jejuno, chegando a 10 milhões de células por grama no íleo (Nissen; Casciano; Gianotti, 2020). Além disso, a MIH é um ecossistema complexo formado por mais de 500 espécies bacterianas diferentes, o que demonstra que o número total de células bacterianas presentes no cólon excede em muito o número total de células eucarióticas presentes no corpo (Singh; Ghosh; Goyal, 2018).

Das espécies de bactérias presentes na microbiota, estas fazem parte de 4 filos principais: *Bacillota*, *Bacteroidota*, *Actinomycetota* e *Pseudomonadota*; sendo o filo *Bacillota* o mais representativo compondo entre 46 e 58% do total de bactérias (Nissen; Casciano; Gianotti, 2020). Com relação aos gêneros de bactérias, *Bacteroides, Clostridium, Eubacterium, Fusobacterium, Peptococcus, Peptostreptococcus, Ruminococcus,* e *Bifidobacterium* são os mais comuns, enquanto *Escherichia* e *Lactobacillus* estão presentes em menores quantidades (Machado *et al.*, 2023).

Contudo, ainda não há um consenso sobre a composição exata das espécies de bactérias presentes no TGI, e esta continua a ser investigada pois os resultados de diferentes trabalhos demonstraram que os resultados da composição possuem dependência com o tipo de técnica analítica utilizada (culturômica, metagenômica) para a quantificação destas espécies (Sardelli *et al.*, 2021). Além disso, os parâmetros químicos e fisiológicos, como: pH, a pressão parcial de oxigênio, o potencial redox, o tempo de trânsito do conteúdo intestinal, os nutrientes e as secreções dos indivíduos, variam entre as diferentes seções intestinais e, consequentemente, moldam a composição e a atividade das comunidades de microrganismos de acordo com os gradientes axiais e verticais ao longo do TGI (Isenring *et al.*, 2023).

Devido a presença das diferentes espécies de bactérias, o seu processo de formação e processos de digestão e absorção de nutrientes, a MIH tem grande importância nos processos metabólicos, na bioquímica, imunologia, fisiologia e resistência do hospedeiro às infecções intestinais (Singh; Ghosh; Goyal, 2018). E um exemplo da importância da MIH na imunologia do hospedeiro é a presença do eixo intestino-cérebro, sistema de comunicação bidirecional que interrelaciona o intestino ao sistema nervoso central, integrando as vias de sinalização neural, hormonal e imunológica através de vários mecanismos, que incluem a modulação das respostas imunitárias, a produção de metabolitos e a síntese de neurotransmissores (Sharma *et al.*, 2023).

As alterações na microbiota quanto a capacidade metabólica, perda da diversidade de microrganismos e a pré-disposição ao aumento de patógenos, são processos definidos como a disbiose da MIH (Isenring *et al.*, 2023). A disbiose intestinal tem sido observada em várias doenças, incluindo doenças inflamatórias intestinais, obesidade, diabetes, doenças cardiovasculares e doenças neurodegenerativas (Alzheimer, Parkinson, Huntington e a esclerose múltipla) (Sharma *et al.*, 2023). Assim, o equilíbrio da microbiota faz com que o indivíduo também possua uma saúde balanceada.

Tendo em vista a importância da estabilidade da MIH para a saúde dos indivíduos, bem como o processo de formação desta e os impactos causados pelos hábitos alimentares, o estudo dos eventos biológicos que ocorrem no TGI, como ocorre a modulação da MIH de acordo com

o tipo de alimentação e quais são os gêneros de microrganismos favorecidos ou depletados de acordo com os parâmetros estudados, através de estudo *in vitro* e *in vivo* da fermentação colônica são de extrema importância. Tanto que o Conselho Europeu de Pesquisa fundou aproximadamente 60 projetos relacionados com a MIH nos últimos 10 anos (Sardelli *et al.*, 2021).

Os modelos *in vivo* são comumente utilizados para estudar os efeitos do microbiota intestinal em vários órgãos, entretanto eles possuem algumas desvantagens como: ter baixa reprodutibilidade, altos custos, questões éticas com relação ao uso de animais, possuir diferenças fisiológicas entre humanos e animais, e não permitem um estudo prolongado da interação microbiota-hospedeiro (Biagini *et al.*, 2023). Além disso, apesar dos modelos *in vivo* terem sido fundamentais para evidenciar a presença do eixo intestino-cérebro, estes não foram capazes de descrever os eventos biológicos subjacentes (Sardelli *et al.*, 2021).

Neste sentido, os modelos *in vitro* que mimetizam as condições intestinais vêm ganhando mais atenção nos últimos tempos devido ao desenvolvimento de técnicas de cultura, materiais, tecnologias e sistemas de triagem dos dados inovadores que permitiram aos investigadores recriarem, estudarem e compreenderem os efeitos da MIH no hospedeiro (Biagini *et al.*, 2023).

Além disso, quando bem planejados e executados os ensaios *in vitro* possibilitam eliminar os fatores relacionados com os hospedeiros, são altamente adequados para avaliar o impacto de fatores abióticos ou bióticos e os dados gerados podem ser utilizados para otimizar futuros ensaios *in vivo*, caso sejam necessários, o que tem despertado o interesse das indústrias farmacêuticas e de alimentos (Isenring *et al.*, 2023).

Entretanto, modular a relação microbiota-hospedeiro nos modelos *in vitro* não é uma tarefa trivial devido as caraterísticas físico-químicas e estruturais que devem incluir a estimulação dinâmica (peristaltismo intestinal e os fluxos de fluidos biológicos), fazendo com que os diferentes modelos enfrentem problemas semelhantes, como: a otimização da preparação da amostra, a modelação da complexidade do ambiente intestinal e o tipo de amostragem da microbiota (fezes, endoscopia, aspiração do fluido intestinal e endoscopia por cápsula) (Sardelli *et al.*, 2021).

Diferentes modelos *in vitro* para a avaliar o impacto das matrizes alimentares na MIH, desde modelos simples de incubação em condições anaeróbias, até modelos complexo com mais de 1 estágio, totalmente controlados e de operação contínua (Figura 5), e podem ser classificados como estáticos ou dinâmicos.

Os modelos estáticos geralmente são modelos de fermentação em batelada realizadas em ambientes controlados que simulam apenas um estágio do TGI, sendo caracterizados por serem modelos simples, com boa reprodutibilidade, porém com concentração de metabólitos e subprodutos da fermentação e falta de processos de absorção de nutrientes (Biagini *et al.*, 2023).

Enquanto os modelos dinâmicos, ainda podem ser divididos de acordo com a quantidade de estágios que possuem (único ou múltiplos), são sistemas mais complexos em que se é possível fazer controle de parâmetros como: pH, concentração de oxigênio, temperatura e tempo de trânsito; possibilitando uma melhor representatividade do ambiente intestinal (Dupont *et al.*, 2019).

As fermentações colônicas realizadas em biorreatores controlados são os mais indicados para a avaliação do crescimento microbiológico ou da capacidade de bioconversão sob condições e nutrientes específicos, além de serem utilizados para a obtenção de dados para fermentações colônicas mais complexas (Kleigrewe *et al.*, 2022).

Apesar de serem modelos estáticos mais complexos, estes fermentadores permitem controles mais precisos dos parâmetros operacionais como: mistura (agitação magnética), temperatura (banhos térmicos), pH (adição de base e ácido), anaerobiose (borbulhar N_2) e o monitoramento mais preciso da cinética e do potencial redox através de controles *feedback* (retroalimentação) durante o período de incubação (Isenring *et al.*, 2023).

Outro fator, citado anteriormente e que impacta diretamente nos resultados da fermentação colônica é a escolha do tipo de amostragem da microbiota. A prática mais comum é a utilização de suspenções líquidas da MIH, devido à disponibilidade e relativa facilidade em fazer a coleta das amostras fecais (Isenring *et al.*, 2023). Apesar de haver diferenças entre a composição da microbiota ao longo do TGI, como foi relatado anteriormente, a microbiota fecal é uma representação da comunidade de microrganismos presentes no TGI, porém algumas alterações e modificações composicionais são esperadas nos testes *in vitro* (Bircher *et al.*, 2020).

Além disso, a qualidade do inóculo da microbiota está diretamente relacionada com a confiabilidade dos resultados gerados, desta forma o uso de suspenções líquidas frescas da MIH é tido como o padrão ouro para se recriar a MIH, porém há limitações para manter os perfis microbianos, a densidade celular e a abundância reprodutível das populações bacterianas associadas ao lúmen intestinal e ao muco alimentar (Dixit *et al.*, 2024).

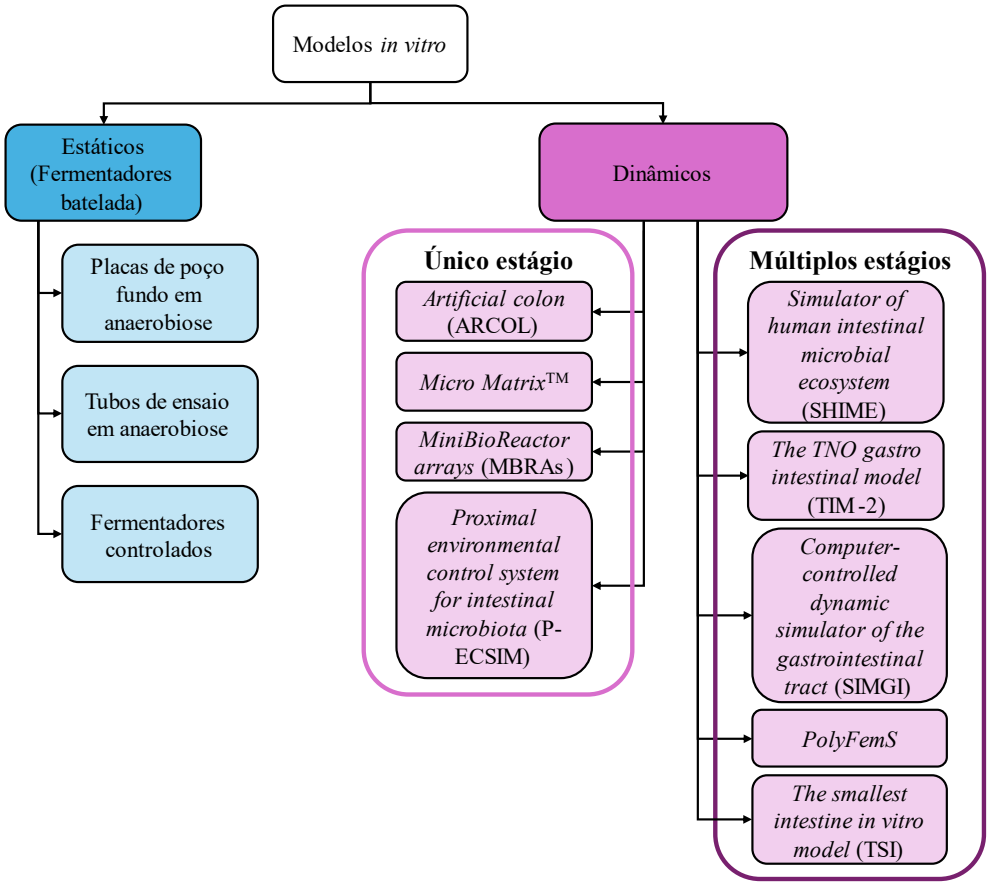


Figura 5 – Principais modelos estáticos e dinâmicos de fermentação *in vitro* da MIH.
Fonte: Elaborada pelo autor (2025)

Nesse sentido, o uso de amostras fecais criopreservadas tem sido uma alternativa utilizada em relação às amostras fecais frescas, com o objetivo de estender o tempo de utilização e o número de estudos que podem ser realizados com as mesmas amostras (Isenring *et al.*, 2023). No entanto, o tempo de armazenamento a temperatura inferiores à 0 °C pode impactar de maneira negativa a viabilidade do inóculo e a capacidade de fermentação da microbiota, assim, uma das estratégias para minimizar o impacto do congelamento do inóculo é o uso de crioprotetores, Dimetilsulfóxido (DMSO) e glicerol, o que permite a realização de experimentos de fermentação *in vitro* reprodutíveis, robustos e confiáveis (de Carvalho *et al.*, 2021).

Outro fator que pode afetar a qualidade das amostras fecais para o uso nos modelos de fermentação colônica é a utilização de amostras de diferentes doadores homogeneizadas em detrimento do uso de amostras individualizadas dos doadores, esta prática muitas vezes se faz necessária devido a quantidade de amostras fecais necessária para se iniciar as fermentações.

Entretanto o uso de inóculos fecais individualizados ou de um inóculo homogeneizado de diferentes doadores ainda é muito discutido entre os especialistas da área (de Carvalho *et al.*,

2021). De acordo com Aguirre *et al.* (2014), as amostras homogeneizadas possuem maior biodiversidade bacteriana, o que as torna mais representativas da microbiota intestinal humana e minimiza as variações entre doadores.

Por fim, uma prática comummente aplicada durante os testes de impacto de um composto específico ou uma matriz sobre a MIH através das fermentações colônicas em modelos *in vitro*, são as análises ômicas (culturômica, metagenômica, metabolômica) (de Carvalho *et al.*, 2023). Estas análises possibilitam avaliar a atividade metabólica microbiana durante a fermentação, as análises metabolômicas podem ser realizadas através de análises de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) ou cromatografia gasosa (CG) (De Sousa *et al.*, 2018), com o intuito de analisar os principais AGCC (acetato, propionato e butirato) (Salsinha *et al.*, 2024), metabólitos intermediários (succinato, lactato e formiato) e ácidos graxos de cadeia ramificada da fermentação proteolítica (Isenring *et al.*, 2023).

Além disso, os AGCC são os principais metabólitos provenientes da fermentação de compostos prebióticos pela MIH. A quantidade e o perfil dos AGCC produzidos são diretamente influenciados pela estrutura dos compostos prebióticos ingeridos, o que, por sua vez, impacta as atividades biológicas associadas a esses metabolitos (Ashaolu; Ashaolu; Adeyeye, 2021). A Tabela 8 apresenta as principais bioatividades atribuídas aos AGCC, destacando seus efeitos sobre a saúde e seu papel na regulação de processos fisiológicos essenciais.

Tabela 8 - Principais bioatividades observadas para os AGCC.

AGCC	**Principais bioatividades**
Acetato	Incorporado em diversas rotas metabólicas relacionadas com balanço energético; Demonstra regular os parâmetros de peso corporal e diabetes; Melhora a saúde intestinal; Participa da síntese de colesterol; Protege contra algumas cepas de *E. coli*.
Butirato	Utilizado como substrato pelas células epiteliais; Relacionado com a produção de hormônios intestinais; Demonstra regular os parâmetros de peso corporal e diabetes; Regula o sistema imunológico; Essencial para reverter as citocinas pró-inflamatórias; Ameniza os sintomas da inflamação intestinal através da diferenciação das células T regulatórias; Aumenta a produção de mucina por meio da regulação positiva da expressão do gene MUC2; Induz o mecanismo apoptótico e obstrui a formação de tumores; Tem efeitos terapêuticos sobre o câncer e a doença de Crohn; Impede a genotoxicidade dos peróxidos e nitrosamidas.
Propionato	Incorporado em diversas rotas metabólicas relacionadas com balanço energético; Demonstra regular os parâmetros de peso corporal e diabetes;

	Ameniza os sintomas da inflamação intestinal através da diferenciação das células T regulatórias; Essencial para reverter as citocinas pró-inflamatórias; Relacionado com a produção de hormônios intestinais; Aumenta o metabolismo de lipídios; Inibe a síntese de colesterol no fígado; Possui propriedades anticancerígenas.
Valerato	Estimula o crescimento do epitélio intestinal; Relacionado com a patogênese de doenças como câncer e doenças cardiometabólicas.
Formiato	Envolvido em inflamação e metanogênese.

Fonte: Adaptado de Ashaolu; Ashaolu; Adeyeye (2021).

O sequenciamento de amplicon do gene 16S rRNA ou reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR) em tempo real são técnicas culturômicas utilizadas para quantificar as bactérias viáveis cultiváveis presentes e identificar e quantificar a presença de um microrganismo específico em amostras biológicas (de Carvalho *et al.*, 2023).

Por outro lado, quando se deseja obter dados mais detalhados do que os dados dos métodos direcionados, qPCR, análises de metagenômica como o sequenciamento total do DNA da microbiota, onde são determinadas as sequências de DNA de todo o genoma nas amostras biológicas afim de caracterizar, identificar e quantificar as comunidades microbianas presentes na amostra (Liu, Yong-Xin *et al.*, 2021).

Assim, com a utilização de modelos *in vitro* da fermentação utilizando amostra fecais de diferentes doadores, associados com análises culturômica, metagenômica, metabolômica, é possível avaliar o impacto na MIH de compostos específicos ou matrizes mais complexas. Evitando assim o uso de testes *in vivo* e fornecendo dados importantes para a tomada de decisão das empresas farmacêuticas e alimentícias com relação ao desenvolvimento de novos produtos.

3. OBJETIVOS

Nesta seção serão apresentados os objetivos gerais e específicos do projeto.

3.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolver um processo sustentável para a produção de oligossacarídeos a partir da borra de café, por meio da otimização da hidrólise da biomassa lignocelulósica, caracterização dos compostos obtidos, avaliação da atividade prebiótica e análise do impacto ambiental do processo.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimizar a hidrólise da biomassa lignocelulósica de borra de café, empegando metodologia de planejamento de experimentos, obtendo hidrolisado com alto rendimento em oligossacarídeos.
- Caracterizar os diferentes oligossacarídeos obtidos da hidrólise da borra de café empregando técnicas de cromatografia.
- Estimar o impacto ambiental do processo de produção de oligossacarídeos, a partir da borra de café realizando análises da ACV.
- Avaliar a atividade prebiótica dos oligossacarídeos produzidos, através de testes *in vitro* do crescimento de bactérias das espécies *Lactobacillus*, *Lacticaseibacillus* e *Bifidobacterium*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Nesta seção serão apresentados os materiais e métodos utilizados em cada uma das etapas do projeto.

4.1. COLETA E ARMAGENAGEM DA MATÉRIA-PRIMA

A BCF foi gentilmente fornecida pela cafeteria "NoCafé" situada na cidade de Araraquara – São Paulo, Brasil. O café expresso, bebida, foi preparado utilizando uma máquina de café La Cimbali, modelo M27 RE (potência: 4250 – 5000 W, pressão de 9 bar), consumindo aproximadamente 16 a 20 g de café arábica torrado e moído para o preparo de 2 copos de café contendo 30 mL cada.

A coleta do material foi realizada 2 vezes por semana para evitar o crescimento de fungos no material, caso fosse verificada o crescimento de microrganismos no material coletado, o mesmo era descartado. Após a coleta a BCF era seca à 80 °C até atingir uma umidade de aproximadamente 5%. Posteriormente o material seco foi homogeneizado e armazenado à -18 °C em congelador (Consul, modelo: CHA31FB) em recipientes de plástico hermeticamente fechados.

4.2. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA BORRA DE CAFÉ

Nesta seção serão descritos os materiais e métodos utilizados nas etapas de caracterização da biomassa: remoção, quantificação e caracterização dos compostos extrativos; quantificação dos carboidratos estruturais, lignina e cinzas.

4.2.1. Remoção, quantificação e caracterização dos compostos extrativos

A remoção dos compostos extrativos presentes na BCF foi performado de acordo com o método padrão NREL/TP-510-42619, desenvolvido pelo Laboratório Nacional de Energia Renovável (NREL) (Sluiter *et al.*, 2008a) com algumas modificações. Brevemente, ao invés dos 3 ciclos de extração padrão para cada solvente em aparato Soxhlet, foram realizados 5 ciclos de extração por solvente. Além disso, a extração com etanol foi substituída pela extração com isopropanol 99,8% (Êxodo Científica, Brasil), após os ciclos de extração com água deionizada. Após a remoção dos compostos extrativos, a biomassa resultante foi denominada como borra de café livre de extrativos (BCF-LE).

A quantificação da fração correspondente aos compostos extrativos foi calculada através da diferença mássica em base entre as amostras antes e após o protocolo de remoção dos extrativos. A quantificação foi realizada em triplicata.

Em relação a caracterização e quantificação dos compostos extrativos removidos da BCF foi realizada utilizando um CLAE Shimadzu (LC-20AT, Quioto, Japão) equipado com uma pré-coluna e uma coluna Zorbax Eclipse Plus C18 (Agilent Technologies, CA, USA) à 30 °C, acoplado a um detector UV–Vis configurado no comprimento de onda de 280nm. Utilizou-se fase móvel constituída de acetonitrila (Merck, Brasil, ≥ 99.9%) e água deionizada em uma proporção 1:8 (v/v) com 1% de ácido acético (Merck, Brasil, 100%), e com uma vazão de 0,8 mL/min. O volume de injeção foi de 10 µL. Os compostos quantificados incluíam padrões de ácido gálico, ácido 3,5-dihidroxibenzóico, 5-HMF, furfural, ácido 2,4-dihidróxibenzóico, ácido cafeico, fenol, vanilina, siringaldeído e ácido p-cumárico.

4.2.2. Quantificação dos carboidratos estruturais, lignina e cinzas

A BCF-LE e a celulignina (resultante do pré-tratamento com ácido diluído), foram caracterizados quanto a proporção das frações de celulose, hemicelulose, lignina e cinzas, de acordo com o método padrão de determinação de carboidratos estruturais e lignina da biomassa (NREL/TP-510-42618), desenvolvido pelo NREL (Sluiter *et al.*, 2008b). A análise para a caracterização química da BCF-LE foi realizada em triplicata.

A fração líquida recuperada da caracterização química da celulignina foi analisada por CLAE para determinar a concentração dos carboidratos e ácidos orgânicos resultantes da hidrólise da celulose e da hemicelulose.

As concentrações de ácidos orgânicos (ácidos acético, fórmico e levulínico) foram quantificadas usando um CLAE Shimadzu (LC-20AT, Kyoto, Japão) equipado com uma pré-coluna e uma coluna Aminex (Bio-Rad) HPX-87H (300 × 7,8 mm) e acoplado a um detector de índice de refração (RID-10A, Shimadzu, Kyoto, Japão). A temperatura do forno foi ajustada para 60 °C e a temperatura do detector para 40 °C, e uma eluição isocrática de 0,6 mL/min. A fase móvel utilizada foi H_2SO_4 0,01 N. As amostras foram previamente filtradas por um filtro Sep Pak C18 e 20 µL foram injetados no sistema.

A concentração dos carboidratos (celobiose, glicose, xilose, galactose, arabinose, manose e frutose) de cada caracterização da celulignina foi quantificada com o mesmo sistema de CLAE citado anteriormente, equipado com uma pré-coluna e uma coluna Aminex (Bio-Rad) HPX-87P (300 × 7,8 mm), acoplada a um detector de índice de refração (RID-10A, Shimadzu, Kyoto, Japão). A temperatura do forno foi ajustada em 80 °C e a temperatura do detector em 40 °C, e água ultrapura foi usada como fase móvel em uma eluição isocrática a 0,6 mL/min. O volume de injeção foi de 20 µL. As amostras foram preparadas antes da análise por CLAE de acordo com o procedimento: primeiro foram neutralizadas com carbonato de cálcio (pH de 5-

6) sob constante agitação, depois foram centrifugadas (1157 *x*g, 10 min) e filtradas com filtros de nylon de 0,22 µm.

4.3. PRÉ-TRATAMENTO DA BORRA DE CAFÉ

A BCF-LE foi pré-tratada com ácido sulfúrico diluído (NEON, Brasil) em reatores de ampola de Teflon (volume nominal de 330 mL) com um módulo de aquecimento do tipo bloco seco (SL-16/4-E Solab), utilizando um volume de trabalho de 200 mL. A melhor condição para a extração de OS foi determinada usando um planejamento Box-Behnken 3^4 com 5 repetições no ponto central, consistindo em um total de 29 experimentos. Os fatores avaliados foram temperatura (140 - 190 °C), relação sólido-líquido (S/L) (1:40 - 1:4 g/mL), tempo de reação (20 - 120 min) e concentração de ácido sulfúrico (0 - 2% v/v). Após o pré-tratamento ácido, a mistura resultante foi filtrada usando um sistema de vácuo e papel de filtro (Whatman, Grau 1, 125 mm) para separar a fração sólida (celulignina) e o hidrolisado. A porção de celulignina foi lavada com água deionizada até atingir o pH neutro (6-7). Em seguida, a celulignina neutralizada foi seca em estufa a 105 °C até atingir um peso constante e armazenada em tubos Falcon de plástico de 50 mL para caracterização química. O hidrolisado foi quantificado e armazenado em tubos Falcon de plástico de 50 mL antes da precipitação de oligossacarídeos.

As concentrações de carboidratos (celobiose, glicose, xilose, galactose, arabinose, manose e frutose) de cada hidrolisado, obtidas em cada ensaio, foram quantificadas por CLAE seguindo o mesmo protocolo descrito para a quantificação de carboidratos (seção 4.2.2) usando uma pré-coluna e uma coluna Aminex (Bio-Rad) HPX-87P (300 × 7,8 mm).

4.3.1. Pré-tratamento da BCF-LE com ácido cítrico

A BCF-LE foi pré-tratada com solução de ácido cítrico em reatores descritos na seção 4.3. Primeiramente, a concentração de ácido cítrico (% m/v) foi calculada a partir da concentração volumétrica de ácido sulfúrico para a condição ótima de acordo com a Equação (1), onde 98% é a pureza do ácido sulfúrico concentrado utilizado para preparar a solução da condição ótima.

$$Conc.\text{Ác.}Cítrico\ \left(\frac{g}{mL}\right) = \%\ H_2SO_4 \left(\frac{v}{v}\right)_{cond.ótima}\ x\ \rho\ \left(\frac{g}{mL}\right) x\ 98\% \qquad (1)$$

Posteriormente, o ácido cítrico anidro (Qhemis, Brasil) foi pesado em balança analítica e diluído em água deionizada de forma que a solução final tivesse uma concentração de 2,58% (g/mL) de ácido cítrico, valor obtido através da Equação (1).

Após o preparo da solução de ácido cítrico, a BCF-LE foi submetido ao pré-tratamento com a solução de ácido cítrico de acordo com os parâmetros obtidos para a temperatura, relação

S/L, tempo de reação e concentração de ácido, da condição ótima do modelo obtido pelo planejamento Box-Behnken 3^4.

Após pré-tratamento com ácido cítrico, a separação do hidrolisado e da celulignina, quantificação do hidrolisado e a neutralização da celulignina, seguiram o procedimento descrito na seção 4.3.

4.4. PRECIPITAÇÃO DOS OLIGOSSACARÍDEOS

Primeiramente, o pH de cada amostra de hidrolisado foi ajustado para 5-6 com carbonato de cálcio PA 98% (Synth, Brasil), sob constante agitação. Em seguida, os hidrolisados foram centrifugados (1157 *xg*, por 10 min) para separar o precipitado. Posteriormente, 10 mL do sobrenadante foram transferidos para tubos de centrífuga (50 mL) previamente pesados e a precipitação dos oligossacarídeos foi realizada de acordo com Ballesteros; Teixeira; Mussatto (2017). Resumidamente, etanol absoluto 99,5% (Synth, Brasil) foi adicionado ao sobrenadante em uma proporção de 3:1 v/v (etanol:hidrolisado), as soluções finais foram deixadas a 4 °C por 16 horas, a adição de etanol causou a precipitação dos OS, a solução foi centrifugada (2500 *xg*, por 20 min a 4°C).

Em seguida, o sobrenadante foi descartado, e os tubos contendo os OS foram deixados em capela até atingirem peso constante, significando a completa evaporação do etanol. Por fim, a quantificação dos OS foi realizada calculando-se a diferença de peso dos tubos de centrífuga antes e depois da precipitação. E a variável de resposta foi calculada para cada ensaio de acordo com a Equação (2).

$$OS_{eficiência}\left(\frac{g\ OS}{100g\ BCF\ seca}\right) = \frac{m_{tubos\ após\ precpit.} - m_{tubos\ antes\ precipit.}}{m\ inicial_{BCF\ seca}} \times 100 \qquad (2)$$

4.5. CARACTERIZAÇÃO DOS OLIGOSSACARÍDEOS

Nesta seção serão descritos o material e métodos utilizados nas etapas de caracterização da biomassa: determinação em mols dos carboidratos e caracterização dos graus de polimerização.

Além disso, a melhor condição para a produção de OS com relação aos resultados obtida pela ACV foi repetida em triplicata, posteriormente os OS foram liofilizados utilizando um liofilizador ModulyoD (Thermo Electron Corporation, EUA), homogeneizados e armazenados em recipiente de plástico hermeticamente fechado. Os OS da condição 23 (Planejamento de Experimentos) liofilizados (OS-23) foi caracterizado quanto à umidade, quantidade de proteína, minerais, cinzas, composição dos açúcares monoméricos, e determinação dos compostos fenólicos presentes.

4.5.1. Determinação da proporção em mols dos carboidratos

Os OS extraídos foram submetidos à hidrólise ácida total descrita no protocolo Determinação de açúcares, subprodutos e produtos de degradação na fração líquida das amostras processadas (NREL/TP-510-42623) (Sluiter *et al.*, 2006). Os OS precipitados foram diluídos com água deionizada e, em seguida, ácido sulfúrico PA 98,0% (NEON, Brasil) foi adicionado às amostras de forma que a concentração final de ácido fosse de 4% (m/m). Em seguida, as amostras foram hidrolisadas a 120 °C por 60 minutos. Após a hidrólise ácida total, o pH de cada amostra foi ajustado para 5-6 com carbonato de cálcio PA 98% (Synth, Brasil). Em seguida, as amostras foram centrifugadas (1157 *xg*, por 10 min) para separar o precipitado. Os sobrenadantes foram filtrados com filtro de nylon de 0,22 µm e as concentrações de carboidratos hemicelulósicos (galactose, arabinose, manose) de cada amostra de OS foram quantificadas por CLAE, seguindo o mesmo protocolo descrito para a quantificação de carboidratos (seção 4.2.2), usando uma pré-coluna e uma coluna Aminex (Bio-Rad) HPX-87P (300 × 7,8 mm). Os resultados foram expressos em termos da razão molar entre os açúcares monoméricos da fração hemicelulósica.

4.5.2. Caracterização dos graus de polimerização

O grau de polimerização dos OS obtidos a partir da condição ótima do modelo do planejamento de experimentos Box-Behnken 3^4 e da melhor condição de acordo com a ACV, foram caracterizados por espectrometria de massa de dessorção/ionização a laser assistida por matriz (MALDI-TOF-MS). A preparação da amostra para análise MALDI foi realizada diluindo o OS precipitado com água deionizada em uma concentração de 1 mg/mL e, em seguida, a amostra foi misturada 1:1 (v/v) com ácido 2,5-dihidroxibenzóico (DHB), preparado a 10 mg/mL em 86% de acetonitrila. A mistura (1 µL) foi colocada em um alvo MALDI de aço retificado e seca em temperatura ambiente (25 °C). Os espectros de massa foram adquiridos no AutoFlex Max (TOF/TOF) MS (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha), da Central de Análises Químicas Instrumentais da USP de São Carlos, no modo refletor de íons positivos sobre os espectros de massa que variam de m/z 180-3000.

4.5.3. Determinação da umidade e cinzas

A quantificação da umidade e das cinzas dos OS-23, que posteriormente serão utilizados para os testes de capacidade anti-oxidante, atividade prebiótica e fermentação colônica, foram realizadas através de métodos gravimétricos. Tanto a quantificação da umidade, quanto a quantificação das cinzas foram realizados em triplicata.

A umidade foi determinada de acordo com o método de secagem em estufa. Em resumo, 500 mg do material liofilizado foram pesados em um cadinho de porcelana previamente tarado e colocados em estufa a 105 °C por 24 h. Após as 24 h, os cadinhos foram colocados em um dessecador por 1 h, e posteriormente foram pesados à temperatura ambiente em balança analítica. A diferença de massa entre os cadinhos antes e após a secagem em estufa foi considerada como a quantidade de água presente na amostra.

Após a determinação da umidade, o mesmo material foi analisado quanto ao teor de cinzas. Os cadinhos contendo os OS-23 secos, resultantes da quantificação do teor de umidade, foram levados à mufla a 575 °C por 3 h. Posteriormente, os cadinhos foram colocados em um dessecador por 1 h, e foram pesados. O teor de cinzas foi determinado pela diferença entre o peso dos cadinhos sem o material liofilizado e o peso do cadinho após a mufla.

4.5.4. Determinação do teor de proteínas

A quantificação do nitrogênio total foi realizada pelo método Kjeldahl utilizando uma unidade de destilação Kjeltec system 1002 (Tecator; Hoganas, Suécia) do Centro de Biotecnologia e Química Fina (Universidade Católica Portuguesa – Porto), e o teor de proteína foi calculado usando um fator de conversão de 6,25 de acordo com Ballesteros; Teixeira; Mussatto (2014). A análise do nitrogênio total foi realizada em triplicatas.

4.5.5. Quantificação dos minerais

A digestão dos OS-23 para análise mineral foi realizada pesando 500 mg da amostra em um recipiente de Telfon, posteriormente foram adicionados 10 mL de HNO_3. A mistura foi então homogeneizada suavemente e deixada parada por aproximadamente 15 minutos antes de fechar o recipiente e, em seguida, o recipiente foi aquecido em um sistema de digestão por micro-ondas (MARS One, CEM, EUA). Após a digestão por micro-ondas, as amostras foram resfriadas até atingirem a temperatura ambiente e diluídas até um volume final de 50 mL. As amostras digeridas e diluídas foram então analisadas por meio de Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Acoplado Indutivamente (Perkin Elmer, Massachusetts, EUA) do Centro de Biotecnologia e Química Fina (Universidade Católica Portuguesa – Porto), e quantificadas por meio de curvas de calibração externas com a adição de um padrão interno. A análise dos minerais foi realizada em quadruplicata.

4.5.6. Determinação da composição dos açúcares monoméricos

A composição dos monossacarídeos (celobiose, glicose, xilose, galactose, arabinose, manose e frutose) dos OS-23 foram analisados de acordo com o protocolo NREL/TP-510-42618 (Sluiter *et al.*, 2008b) descrito na seção 4.2.2.

Os monossacarídeos foram quantificados usando um cromatógrafo de troca de ânions de alta eficiência acoplado com um detector de pulso amperométrico (HPAEC-PAD) em um sistema Dionex ICS-5000 (Dionex Corp, Sunnyvale, Califórnia) do Centro de Biotecnologia e Química Fina (Universidade Católica Portuguesa – Porto). A separação foi realizada utilizando uma coluna analítica CarboPac PA-20 acoplada com uma coluna de proteção, com um vazão de 0,5 mL/min a 30 ºC. Água ultrapura (18,2 MΩ cm), NaOH 200 mmol/L e NaOH 2 mmol/L foram usados como fases móveis A, B e C, respectivamente. A eluição do gradiente foi realizada da seguinte forma: 62,5% A e 37,5% C de 0 a 20 minutos. Após cada execução, foi realizada uma etapa de regeneração usando 100% de B por 10 minutos, seguida de uma re-equilibração de 5 minutos para as condições iniciais (62,5% A e 37,5% C). Para minimizar a contaminação por carbonato, todos os eluentes foram purgados e mantidos sob uma manta de nitrogênio durante a cromatografia. A quantificação de monossacarídeos foi obtida usando padrões externos. A quantificação monossacarídeos presentes na estrutura dos OS foi realizada em triplicata.

4.5.7. Determinação dos compostos fenólicos

A extração dos compostos fenólicos do material liofilizado foi realizada de acordo com Okur *et al.* (2021), com algumas modificações. Resumidamente, 1 mL de uma solução de metanol:água (80:20 v/v) foi adicionado a 100 mg dos OS-L. Em seguida, a mistura foi colocada em um agitador (MaxQ 6000, Thermo Fisher Scientific) por 30 minutos, a 35°C e 125 rpm, para a solubilização dos compostos fenólicos. Depois disso, a mistura foi centrifugada por 10 minutos, a 4 °C e 2500 *x*g, o sobrenadante foi recuperado e filtrado com filtro de seringa Millipore Millex de 0,22 μm para análise de CLAE. O processo de extração foi realizado em duplicata.

A identificação dos principais compostos fenólicos foi realizada em um sistema de módulo de separação CLAE Waters Alliance e2695 acoplado com um detector UV/Vis de arranjo de fotodiodos 2998 (PDA 190-600 nm) (Waters, Milford, EUA) do Centro de Biotecnologia e Química Fina (Universidade Católica Portuguesa – Porto) e de acordo com Marçal *et al.* (2024). A separação ocorreu em uma coluna reversa ZORBAX Eclipse XDB-C18, 80 Å, 4,6 × 250 mm, 5 μm (Agilent, Santa Clara, EUA) a 25 °C. Foram usadas duas fases

móveis diferentes (A e B). A fase móvel A era composta por 94,9% de água ultrapura (UP), 5% de acetonitrila e 0,1% de ácido trifluoroacético (v:v:v), enquanto a fase móvel B continha 99,9% de acetonitrila e 0,1% de ácido trifluoroacético (v:v). O gradiente de eluição aplicado foi: 0-1 min 100 % A; 1-30 min 79 % A; 30-42 min 73 % A; 45-55 min 42 % A; 55-60 min 100 % A. A vazão e o volume de injeção foram de 1 $mL.min^{-1}$ e 20 μl, respectivamente.

4.6. ANÁLISE DO CICLO DE VIDA

A ACV para cada caso foi feita seguindo a norma ISO 14040 (2009) e as diretrizes do Sistema de Dados de Ciclo de Vida de Referências Internacionais (Joint Research Centre: Institute for Environment and Sustainability, 2010) com algumas modificações. A ACV considerou os quatro procedimentos do ciclo de vida (objetivo e escopo, inventário do ciclo de vida (ICV), avaliação do impacto do ciclo de vida (AICV) e interpretação do ciclo de vida) e um modelo de previsão final.

4.6.1. Objetivo e escopo

Este estudo teve como objetivo avaliar os impactos ambientais da produção de OS a partir da BCF usando uma abordagem de atribuição. O foco foi avaliar qual foi o processo unitário com maior impacto e como as variações nas condições de pré-tratamento - especificamente a relação S/L, a concentração de ácido sulfúrico, a temperatura de reação - influenciam esses impactos. O objetivo foi determinar as condições de hidrólise que minimizam os impactos ambientais e, ao mesmo tempo, compreender seus efeitos gerais sobre o meio ambiente.

4.6.2. Unidade funcional

De forma a manter a unidade funcional consistente em todos os cenários, determinou-se a unidade funcional como sendo 1 kg de OS para a análise.

4.6.3. Fronteiras do sistema

As fronteiras do sistema para os cenários (Figura 6) segue uma abordagem do berço ao portão (*cradle to gate*), começando com o transporte da BCF coletada na NoCafé, cafeteria parceira, até a instalação industrial, localizada no distrito industrial da cidade e a aproximadamente 7,5 km de distância da cafeteria, para a produção de OS.

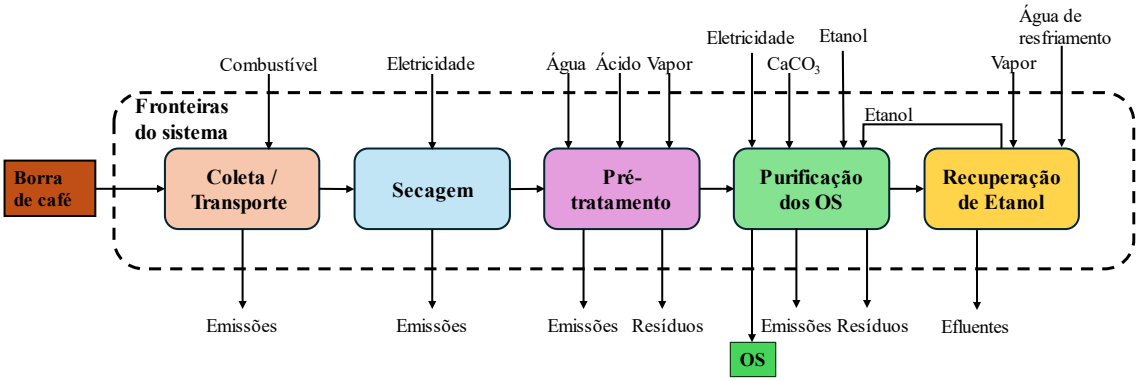


Figura 6 - Fronteiras do sistema para o cenário de valorização da BCF em OS de acordo com uma abordagem do berço ao portão.

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

4.6.4. Inventário do ciclo de vida (ICV)

O ICV foi construído usando dados obtidos das análises experimentais realizadas utilizando o planejamento de experimentos Box-Behnken 3^4 (seção 4.3). O balanço de massa foi obtido das simulações do processo de produção de OS, considerando todas as condições experimentais, no *Aspen Plus (Aspen Technology, Inc.) V12.1*, abrangendo todos os cenários potenciais (Figura 7 e Figura 8). Para obter os dados de rendimento da etapa de pré-tratamento no reator, foram determinados os rendimentos dos OS de acordo com a diferença de concentração dos açúcares monoméricos presentes no hidrolisado antes e após o processo de hidrólise total de carboidratos, de acordo com Sluiter *et al.* (2006). As concentrações foram determinadas através de análises de CLAE (seção 4.2.2).

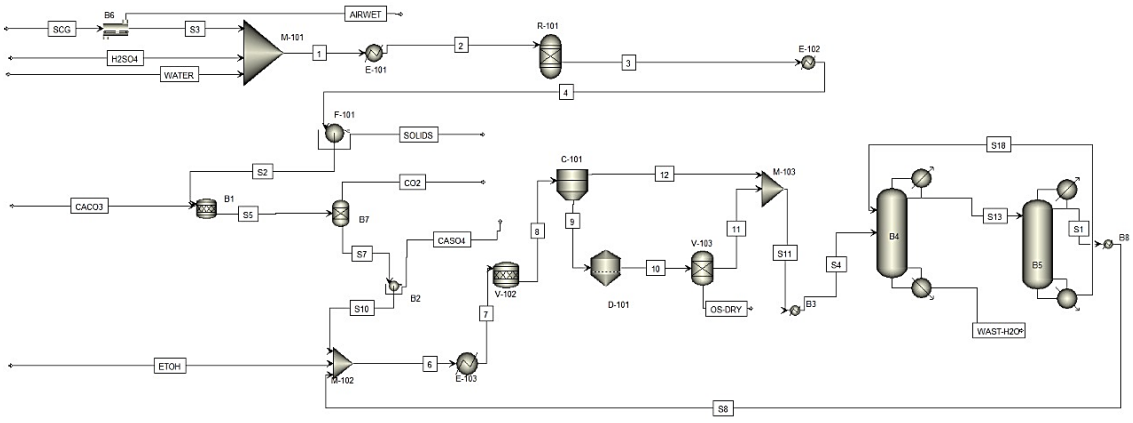


Figura 7 - Fluxograma da simulação pelo *Aspen Plus* do processo de produção dos OS utilizando ácido sulfúrico diluído na etapa de pré-tratamento.

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

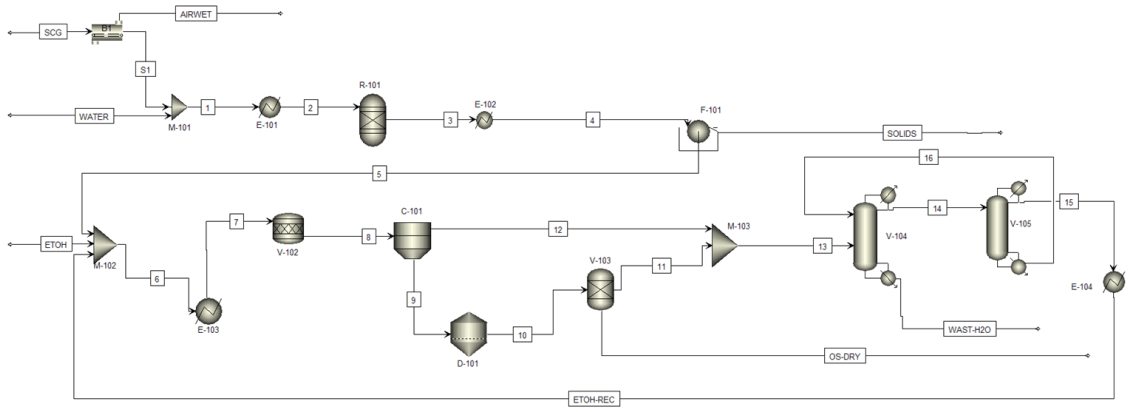


Figura 8 - Fluxograma da simulação pelo *Aspen Plus* do processo de produção dos OS utilizando água na etapa do pré-tratamento.

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Os balanços de massa e energia resultantes da simulação foram utilizados como dados de entrada para o ICV. As condições de transporte e *upstream* foram padronizadas em todos os cenários, enquanto as variações nas condições de hidrólise foram responsáveis pelas diferenças observadas na etapa *downstream*. Os inventários usados levaram em consideração uma vazão de processamento da BCF úmida de 1 tonelada por dia, utilizando como base de dados o Ecoinvent 3 (**Apêndice C**). Os inventários são apresentados no **Apêndice B**. A Figura 9 apresenta o fluxograma das etapas realizadas para a produção de OS, baseados nos procedimentos citados nas seções 4.3, 4.4 e 4.5. No total foram simuladas 29 condições referentes aos ensaios do Planejamento de Experimentos.

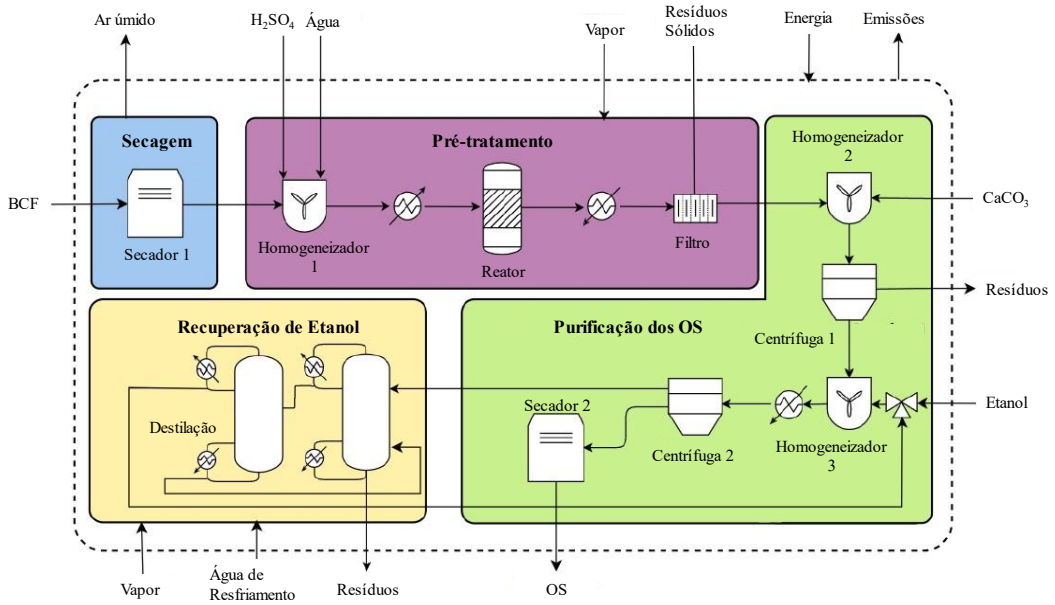


Figura 9 - Fluxograma das etapas de produção de OS a partir da BC baseados nos procedimentos experimentais.

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

4.6.5. Avaliação do impacto do ciclo de vida

O método de *ReCiPe Midpoint* 2016 com uma perspectiva hierárquica (*World ReCiPe H*) foi escolhido devido à sua abrangência compreensiva das 20 categorias de impactos, incluindo 3 principais áreas: danos à disponibilidade de recursos, à saúde humana e aos ecossistemas (Huijbregts *et al.*, 2017). A modelagem de ACV e os cálculos da pontuação dos impactos foram realizados utilizando o programa *SimaPro 9.5.0.0 Multiuser* (PRe-Consultants, Países Baixos).

4.7. AVALIAÇÃO DAS BIOATIVIDADES DOS OLIGOSSACARÍDEOS

Nesta seção serão apresentados os materiais e métodos utilizados para avaliar as bioatividades presentes nos OS-23 obtidos da melhor condição de acordo com a ACV, contemplando análises da capacidade antioxidante pelos métodos de ABTS (ácido 2,2′-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)), DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) e ORAC (capacidade de absorção de radicais de oxigênio); e potencial prebiótico através da avaliação do crescimento de microrganismos das espécies *Bifidobacterium sp.*, *Lacticaseibacillus sp.* e *Lactobacillus* sp. em microplacas e da viabilidade celular.

Foi escolhido um método de extração com água para obter o extrato antioxidante, a escolha foi feita com base em uma revisão da literatura (Ballesteros; Teixeira; Mussatto, 2017; Ray; Singhal, 2023). Os OS-23 foram resuspendidos com água ultrapura em uma proporção de 5 mg/mL, agitado em vórtex por 1 minuto e depois filtrado em filtros de 0,22 μm.

4.7.1. Ensaio de eliminação do radical livre estável ABTS

O ensaio ABTS estabelecido por Coscueta, Reis e Pintado (2020) foi usado para avaliar o potencial antioxidante do extrato. A solução estoque de ABTS•+ a partir da mistura de duas soluções denominadas respectivamente S1 e S2 por 16 h. A mistura foi armazenada a 4 °C em tubo de vidro com tampa, recobertos com folha de alumínio, por no máximo 1 mês. S1 foi preparada dissolvendo 0,0384 g do sal de ABTS em 10 mL de água UP. Enquanto, S2 foi preparada dissolvendo 0,0066 g de persulfato de potássio ($K_2O_8S_2$) em 10 mL de água UP.

Da solução estoque de ABTS foi prepara a solução de trabalho, no dia do ensaio. A solução estoque foi filtrada com filtros de seringa 0,45 μm e diluída com o solvente, no caso deste trabalho água UP, até obter uma absorbância de 0,70 ± 0,02 com um comprimento de onda de 734 nm para o controle (20 μL de água UP e 180 μL de solução de trabalho de ABTS•+).

A solução de trabalho de Trolox foi preparada dissolvendo 0,0125 g de Trolox em 1 mL de metanol e posteriormente, diluindo com água UP até completar o volume de 50 mL (1000 µM). Esta solução foi armazenada a -20 °C por 6 mês.

A reação foi realizada em uma microplaca de 96 poços com 180 µL de solução de trabalho de ABTS•+ e 20 µL de extrato. Uma curva padrão de Trolox, variando de 25 a 175 µM, também foi preparada na mesma proporção (Tabela 9).

Tabela 9 - Curva padrão de Trolox para ensaio de eliminação do radical livre estável.

Padrão	Trolox estoque (µL)	Solvente (µL)	Concentração no poço (µM)
1	25	975	25
2	50	950	50
3	75	925	75
4	100	900	100
5	125	875	125
6	150	850	150
7	175	825	175

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Aos 20 µL de extrato, Trolox ou água UP foram adicionados 180 µL de solução de trabalho de ABTS•+ (Figura 10). Após a mistura e a incubação no escuro por 5 minutos em temperatura ambiente, a absorbância foi medida a 734 nm com um leitor de placas de multidetecção (Synergy H1, Vermont, EUA) do Centro de Biotecnologia e Química Fina (Universidade Católica Portuguesa – Porto), controlado pelo programa *Gen5 Biotek versão 3.04*. Cada extrato foi analisado em triplicata.

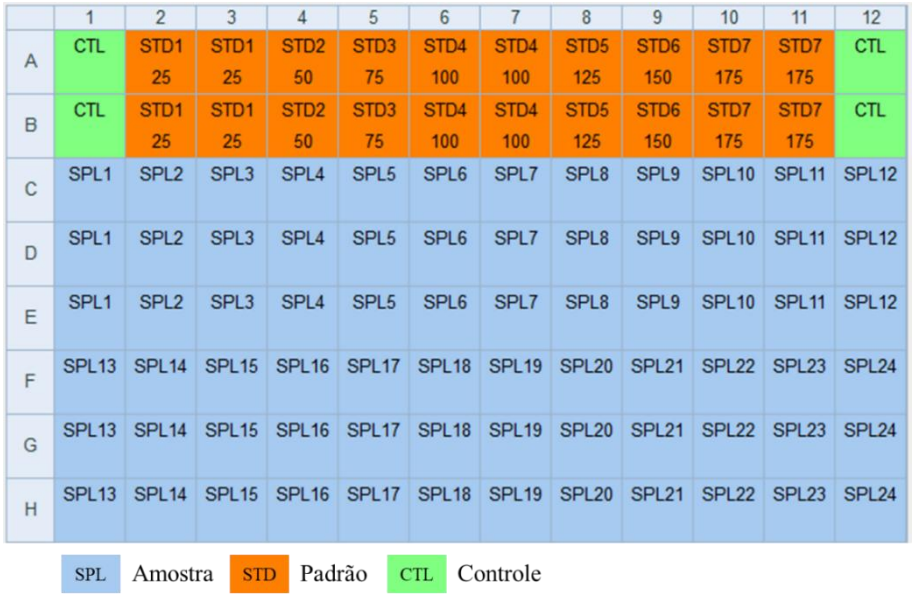


Figura 10 - Disposição da microplaca para ensaio de eliminação do radical livre estável.

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

4.7.2. Ensaio de eliminação do radical livre estável DPPH

Para o ensaio de DPPH, o método descrito por Schaich; Tian; Xie (2015) foi utilizado para avaliar os compostos antioxidantes hidrofílicos no extrato. A solução estoque de DPPH (600 μM) foi preparada dissolvendo 0,0240 g de DPPH em 100 mL de metanol, esta solução foi armazenada em recipiente de vidro âmbar e envolto com papel alumínio a -20 °C por no máximo 6 meses.

A solução de trabalho de DPPH (90 μM) foi prepara diluindo 15 mL da solução estoque com metanol até um volume final de 100 mL, para obter uma solução final com absorbância de 0,600 ± 0,100 em 515 nm, adicionando solução estoque de DPPH para ajustar a absorbância.

Enquanto a solução de trabalho de Trolox foi preparada dissolvendo 0,0125 g de Trolox em 1 mL de metanol e posteriormente, diluindo metanol até completar o volume de 50 mL (1000 μM). Esta solução foi armazenada a -20 °C por 6 mês. Uma curva padrão de Trolox (concentrações variando de 25 a 175 μM) (Tabela 9) foi preparada na mesma proporção.

A reação ocorreu em uma microplaca de 96 poços com a adição de 25 μL de extrato, Trolox ou solvente e 175 μL de solução de trabalho de DPPH (Figura 10). Após a mistura e a incubação no escuro por 30 minutos a 25 °C, a absorbância foi medida em um leitor de placas de multidetecção (Synergy H1, Vermont, EUA) do Centro de Biotecnologia e Química Fina (Universidade Católica Portuguesa – Porto), a 515 nm, controlado pelo programa *Gen5 Biotek versão 3.04*.

4.7.3. Ensaio da capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC)

O ensaio ORAC foi realizado em um leitor de placas de multidetecção (Synergy H1, Vermont, EUA) do Centro de Biotecnologia e Química Fina (Universidade Católica Portuguesa – Porto), controlado pelo programa *Gen5 Biotek versão 3.04*, de acordo com a metodologia descrita por Coscueta, Reis e Pintado (2020).

A solução tampão fosfato foi preparada dissolvendo 9,00 g de NaH_2PO_4 em aproximadamente 900 mL de água UP, o pH foi ajustado para 7,44 a 20 °C e o volume foi completado com água UP até 1000 mL. A solução final contém 75 mM e pH 7,4.

A solução estoque de fluoresceína (1166,1 μM) foi preparada dissolvendo 0,01097 g do sal de fluoresceína dissódico em 25 mL de tampão fosfato, posteriormente foi armazenada a 4 °C por no máximo 1 mês. No dia do ensaio, 100 μL da solução estoque foi diluída primeiramente em um volume final de 10 mL com tampão fosfato, posteriormente 250 μL desta solução diluída foi novamente diluída com tampão fosfato até o volume de 25 mL, esta solução final foi denominada solução de trabalho (116,66 nM).

A solução estoque de Trolox foi preparada dissolvendo 0,0125 g de Trolox em 1 mL de metanol e completando até 50 mL com tampão fosfato, posteriormente esta solução foi armazenada a -20 °C por até 6 mês. A solução de trabalho de Trolox foi preparada no dia de cada ensaio, diluindo 1 mL da solução estoque com 9 mL de solução tampão.

A solução de dicloridrato de 2,2′-Azobis(2-metilpropionamidina) – AAPH, foi prepara no dia do ensaio dissolvendo 0,13018 g de AAPH em 10 mL de tampão fosfato.

A reação ocorreu em microplacas de 96 poços de poliestireno preto (Nunc, Roskilde, Dinamarca), combinando 120 µL de fluoresceína (concentração final de 70 nM) com 20 µL de extrato antioxidante (Figura 11). Cada ensaio também possuía um branco (contendo 120 µL fluoresceína, 60 µL de AAPH e 20 µL de tampão fosfato) e uma curva padrão de Trolox (1-8 µM, concentração final na placa) (Tabela 10) também foram incluídos.

As soluções de trabalho de fluoresceína foram preparadas em tampão fosfato (75 mM; pH 7,4). A mistura foi então incubada por 10 minutos a 37 °C. Em seguida, foram adicionados rapidamente com o auxílio de uma pipeta multicanal 60 µL de APPH (concentração final na placa de 12 mM), e a microplaca foi levemente agitada. A mistura foi incubada por 90 minutos a 37 °C. As leituras de fluorescência foram feitas a cada minuto com agitação automática antes de cada leitura, com comprimentos de onda de excitação e emissão de 485 e 538 nm, respectivamente.

Tabela 10 - Curva padrão de Trolox para ensaio de absorção de radicais de oxigênio.

Padrão	Trolox estoque (µL)	Tampão fosfato (µL)	Concentração no poço (µM)
8	800	200	80
7	700	300	70
6	600	400	60
5	500	500	50
4	400	600	40
3	300	700	30
2	200	800	20
1	100	900	10

Fonte: Elaborada pelo autor (2025)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	POS	BLK	STD1 10	STD2 20	STD3 30	STD4 40	STD5 50	STD6 60	STD7 70	STD8 80	POS	BLK
B	POS	BLK	STD1 10	STD2 20	STD3 30	STD4 40	STD5 50	STD6 60	STD7 70	STD8 80	POS	BLK
C	SPL1	SPL2	SPL3	SPL4	SPL5	SPL6	SPL7	SPL8	SPL9	SPL10	SPL11	SPL12
D	SPL1	SPL2	SPL3	SPL4	SPL5	SPL6	SPL7	SPL8	SPL9	SPL10	SPL11	SPL12
E	SPL13	SPL14	SPL15	SPL16	SPL17	SPL18	SPL19	SPL20	SPL21	SPL22	SPL23	SPL24
F	SPL13	SPL14	SPL15	SPL16	SPL17	SPL18	SPL19	SPL20	SPL21	SPL22	SPL23	SPL24
G	SPL25	SPL26	SPL27	SPL28	SPL29	SPL30	SPL31	SPL32	SPL33	SPL34	SPL35	SPL36
H	SPL25	SPL26	SPL27	SPL28	SPL29	SPL30	SPL31	SPL32	SPL33	SPL34	SPL35	SPL36

SPL Amostra STD Padrão POS Controle BLK Branco

Figura 11 - Disposição da microplaca para ensaio de absorção de radicais de oxigênio.

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

4.7.4. Ensaio *in vitro* em microplaca para atividade prebiótica

Os OS-L foram testados quanto ao potencial de atividade prebiótica por meio de ensaio *in vitro* utilizando monoculturas puras de probióticos, por meio da avaliação de curvas de crescimento em microplaca de 96 poços. O potencial prebiótico dos OS-L foi determinado para as bactérias: *Bifidobacterium animalis* Bo (CSK, Ede, Holanda), *Bifidobacterium longum* BG3 (Cell Biotech, Hellerup, Dinamarca), *Bifidobacterium animalis* spp. *lactis* Bb12 (Chr. Hansen, Hørsholm, Dinamarca), *Lacticaseibacillus casei* 01 (Chr. Hansen, Hørsholm, Dinamarca), *Lactobacillus acidophilus* LA-5 (Chr. Hansen, Hørsholm, Dinamarca), *Lacticaseibacillus rhamnosus* Lcr35 (Grupo Azevedos, Alcabideche, Portugal).

Os inóculos de *L. casei* 01, *L. acidophilus* LA-5, *L. rhamnosus* Lcr35, *B. animalis* Bo, *B. longum* BG3 e *B. lactis* Bb12 foram preparados suspendendo cada uma das culturas bacterianas em caldo De Man, Rugosa e Sharpe (MRS) suplementado com 0,1% (m/v) de L-cisteína-HCl (MRS-cys), atingindo uma concentração celular final de $1x10^8$ CFU/mL, determinada pela densidade óptica entre 0,080 e 0,130 a 620 nm (espectrofotômetro UV-1900 UV-VIS, Shimadzu, Kyoto, Japão), e depois diluída para atingir a concentração final de bactérias probióticas 1×10^6 CFU/mL.

Cada inóculo (20 µL) foi transferido para os poços de uma microplaca e posteriormente cada poço foi preenchido com 180 µL (volume final de 200 µL) com as soluções contendo os OS-23 diluído em caldo MRS-cys basal sem glicose nas respectivas concentrações de 0,25, 0,50, 1,00, 2,00 e 3,00% (m/v). Os poços da microplaca contendo *Bifidobacterium sp*. foram

cobertos com 50 µL de parafina para manter a anaerobiose e a microplaca foi incubada a 37 °C por 48 h com agitação e com medições da absorbância a 620 nm registradas a cada hora. A melhor concentração dos OS-23 em MRS-cys sem glicose foi escolhida de acordo com a comparação das curvas de crescimento com o FOS comercial e a glicose.

O FOS comercial (NUTAFLORA® P-95, Ingredion, Brasil) foi solubilizado em caldo MRS-cys sem glicose nas concentrações de 0,50, 1,00 e 2,00% (m/v) e usado como referência por ser um composto prebiótico bem estabelecido.

Também foram realizados três controles: o primeiro contendo inóculo + caldo MRS-cys (controle positivo), o segundo contendo os OS-23 solubilizado nas diferentes concentrações em caldo MRS-cys sem glicose (controle negativo) e o terceiro contendo apenas caldo MRS-cys (controle de contaminação). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4.7.5. Avaliação da concentração celular

A contagem da viabilidade celular foi determinada para as amostras de OS-23 (0,5% m/v), FOS (0,5% m/v), glicose (0,5% m/v) e glicose (2,0% m/v), empregando a técnica de plaqueamento de gota em placa de ágar MRS-cys. As amostras foram coletadas de todos os poços da microplaca nos tempos 0 e 48 h, posteriormente foram diluídas de acordo com uma diluição decimal seriada em água peptonada e uma alíquota de 20 µL foi colocada na placa de ágar MRS-cys. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h, as placas contendo *Bifidobacterium* sp. foram incubadas em uma estação de trabalho anaeróbica (Whitley DG250, Don Whitley Scientific, Reino Unido), enquanto as contendo *Lacticaseibacillus* e *Lactobacillus* foram incubadas em estufas. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

4.8. DESENVOLVIMENTO DE MATRIZ PÉCTICA

Para o desenvolvimento do hidrogel, foi utilizada uma pectina comercial com alto teor de metoxilação (HM) da casca de frutas cítricas (P9135, Sigma-Aldrich). Primeiramente, 94 mL de água UP foram pré-aquecidos a 85 °C e, em seguida, a pectina HM em diferentes concentrações (1,0, 1,5 e 2,0 % m/v). A mistura foi deixada sob agitação magnética constante a 85 °C até a solubilização completa da pectina (aproximadamente 1h).

Após a solubilização completa da pectina, a solução foi resfriada até a temperatura ambiente sob agitação magnética constante. Em seguida, 1 mL de uma solução de 500 mg/mL dos OS-L e 5 mL de uma solução de 400 mg/mL de $CaCl_2$ foram adicionados, respectivamente nessa ordem, às soluções de pectina resfriadas e deixados sob agitação magnética constante por 30 minutos. Essa formulação foi denominada Hydrogel MOS.

A viscosidade das formulações de hidrogel foi medida à temperatura ambiente, usando um viscosímetro rotacional (B-ONE PLUS, Lamy Rheology, França) do Centro de Biotecnologia e Química Fina (Universidade Católica Portuguesa – Porto), usando um eixo R-2 a 200 rpm por 200 s (Figura 12). E a viscosidade das formulações de hidrogel também foi comparada com produtos comerciais: *Pear Organic Fruit Purée* (*Clearspring*) e *Tasty Turtle - Apple & pear with yogurt* (*Holle*); sob os mesmos parâmetros do viscosímetro. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.



Figura 12 - Viscosímetro rotacional (B-ONE PLUS, Lamy Rheology, França) para determinação da viscosidade das amostras desenvolvidas.

Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Dois controles também foram preparados utilizando a concentração de pectina mais adequada, seguindo as etapas descritas anteriormente de preparo do hidrogel: um contendo apenas pectina a 1,5% (m/v) - Hydrogel Matrix (controle de matriz), e outro (Hydrogel FOS) contendo 0,5% (m/v) de FOS e 1,5% (m/v) de pectina (controle positivo). Essas formulações foram armazenadas para uso posterior como controles para os ensaios *in vitro* de digestão do TGI e fermentação colônica *in vitro*.

4.9. ENSAIO *in vitro* DA DIGESTÃO DO TRATO GASTROINTESTINAL

A simulação da digestão do TGI foi realizada de acordo o protocolo *in vitro* estático INFOGEST 2.0 (Brodkorb *et al.*, 2019), com algumas modificações na fase gástrica, a lipase do extrato gástrico de coelho não foi adicionada (Figura 13). As amostras de formulação de hidrogel contendo 0,5% (m/v) dos OS-23 (Hydrogel OS-23), 0,5% (m/v) de FOS (Hydrogel FOS) e contendo apenas a pectina (Hydrogel Matriz) foram submetidas à digestão do TGI seguindo o protocolo INFOGEST padronizado mencionado.

Tempo de realização	Etapa	Passos
5 dias	 **Preparação** • Realizar os ensaio de atividade enzimática e biliares. • Preparar as soluções estoques dos fluidos salivares, gástricos e intestinais. • Realizar o experimento teste de ajuste de pH.	**1** **2** **3**
1 dia	 **Fase oral** • Misturar o alimento com o fluido salivar (1:1 m/m) • Adicionar $CaCl_2$ (1,5 mM no fluido salivar) • Adicionar a amilase salivar, se necessário (75 U/mL) • Incubar sob agitação (2 min, 37 °C, pH = 7,0)	**7-12** **13** **14** **15, 16**
	 **Fase gástrica** • Misturar o bolo alimentar com o fluido gástrico (1:1 m/m) • Adicionar $CaCl_2$ (0,15 mM no fluido gástrico) • Adicionar pepsina (2.000 U/mL) • Incubar sob agitação (2 h, 37 °C, pH = 3,0)	**17, 18** **19** **20, 21** **22-24**
	 **Fase intestinal** • Misturar o quimo gástrico com o fluido intestinal (1:1 m/m) • Adicionar bile (10 mM sais biliares) • Adicionar $CaCl_2$ (0,60 mM no fluido intstinal) • Adicionar pancreatina (atividade da tripsina 100 U/ mL) • Incubar sob agitação (2 h, 37 °C, pH = 7,0)	**25, 26** **27** **28** **29** **30-32**
	 **Amostragem** • Coleta e tratamento das amostras	

Figura 13 – Fluxograma das etapas do protocolo INFOGEST 2.0.

Fonte: Adaptado de Brodkorb *et al.* (2019)

Após a digestão do TGI, membranas de diálise (peso molecular de corte de 3,5 kDa) de 15 cm de comprimento foram utilizadas para simular a passagem das amostras digeridas pelo intestino delgado (ou seja, duodeno e jejuno, pelo menos). Cada uma das membranas contendo as amostras digeridas foi colocada em recipientes de vidro contendo 500 mL de água destilada separadamente. Posteriormente, os recipientes com as membranas foram incubados durante a noite a 37 °C e 50 rpm em um agitador (MaxQ 6000, Thermo Fisher Scientific) do Centro de Biotecnologia e Química Fina (Universidade Católica Portuguesa – Porto).

Ao final do processo de diálise, o retido (a solução que permanece dentro da membrana) representa a fração não absorvível (disponível para o cólon), que é acessível à microbiota intestinal (Ribeiro *et al.*, 2020; Salsinha *et al.*, 2024). O conteúdo retido foi liofilizado e usado como substratos no sistema *in vitro* de fermentação colônica em batelada.

As modificações na composição dos OS presentes no Hydrogel OS-23 ocasionadas pelo ensaio *in vitro* da digestão do TGI foi verificada comparando as concentrações dos OS presentes inicialmente no Hydrogel OS-23 e nos substratos retidos após a digestão através de análises de

HPAEC-PAD, utilizando um sistema Dionex ICS-5000 (Dionex Corp, Sunnyvale, California) do Centro de Biotecnologia e Química Fina (Universidade Católica Portuguesa – Porto), de acordo com Arnling Bååth *et al.* (2018) com modificações.

A separação foi realizada utilizando uma coluna analítica CarboPac PA-200 acoplada a uma pré-coluna, com uma vazão de 0,5 mL/min a 30ºC. Como fases móveis, foram empregados água ultrapura (18,2 MΩ cm), NaOH 200 mmol/L e NaOH 100 mmol/L, denominadas A, B e C, respectivamente. A eluição em gradiente foi conduzida da seguinte forma: 55% de A e 45% de C por 15 minutos. Após cada corrida, foi realizada uma etapa de regeneração com 100% de B por 10 minutos, seguida de um reequilíbrio de 5 minutos às condições iniciais (55% de A e 45% de C). Para minimizar a contaminação por carbonato, todos os eluentes foram purgados e mantidos sob uma atmosfera de nitrogênio durante a cromatografia. A quantificação dos manooligossacarídeos foi realizada por meio de padrões externos.

4.10. FERMENTAÇÃO COLÔNICA

Nesta seção serão apresentados o material e métodos, e as respectivas análises realizadas no Centro de Biotecnologia e Química Fina (Universidade Católica Portuguesa – Porto), para as etapas de preparação do inóculo fecal, ensaio *in vitro* de fermentação colônica, determinação da concentração total de nitrogênio amoniacal, quantificação dos AGCC, extração do DNA bacteriano e análise de metagenômica.

4.10.1. Preparação do inóculo fecal

Amostras fecais humanas frescas de cinco voluntários adultos saudáveis (**Apêndice D**) foram obtidas nas instalações da Universidade Católica Portuguesa, Escola Superior de Biotecnologia, Porto, Portugal, de acordo com o protocolo interno estabelecido, previamente validado pelo Comitê de Ética em Saúde da Universidade Católica Portuguesa.

As amostras fecais foram coletadas em um recipiente de 1 L limpo e hermeticamente fechados. Os recipientes com as fezes foram colocados no Oxoid™ AnaeroJar™ 2,5 L com um sachê Oxoid™ AnaeroGen™ 2,5 L, fechados até serem abertos dentro da cabine anaeróbica, uma estação de trabalho Whitley A35, e usados dentro de 2 horas após a coleta.

Sob a atmosfera da cabine anaeróbica (80% de nitrogênio, 10% de dióxido de carbono, 10% de hidrogênio), o conteúdo fecal de cada doador foi amostrado em quantidades iguais (~12 g), colocado em um recipiente vazio de 1 L à prova de adulteração de amostras pré-peso e pesado para obter um inóculo fecal homogeneizado para ter um inóculo uniforme e representativo.

O inóculo fecal foi diluído a 10% (m/m) em uma solução salina de tampão fosfato 0,1 M pH 7,3 (PBS) com 30% (v/v) de glicerol e homogeneizado, primeiro manualmente e depois mecanicamente, com um homogeneizador de laboratório Mixwel® por 2 minutos a 460 batidas de pás/min (de Carvalho *et al.*, 2021). Várias alíquotas do inóculo fecal homogeneizado foram armazenadas a -20 °C para evitar ciclos repetidos de congelamento e descongelamento.

4.10.2. Ensaio *in vitro* de fermentação colônica

Para a fermentação colônica, foram usados os inóculos fecais congelados preparados anteriormente e foram testadas quatro condições, em duplicata, em dois conjuntos de experimentos realizados em duas semanas diferentes: (I-II) Hydrogel OS-23, (III-IV) Hydrogel FOS; (V-VI) Hydrogel Matriz, (VII-VIII) controle de inóculo (IC), apenas com o inóculo fecal (Figura 14).

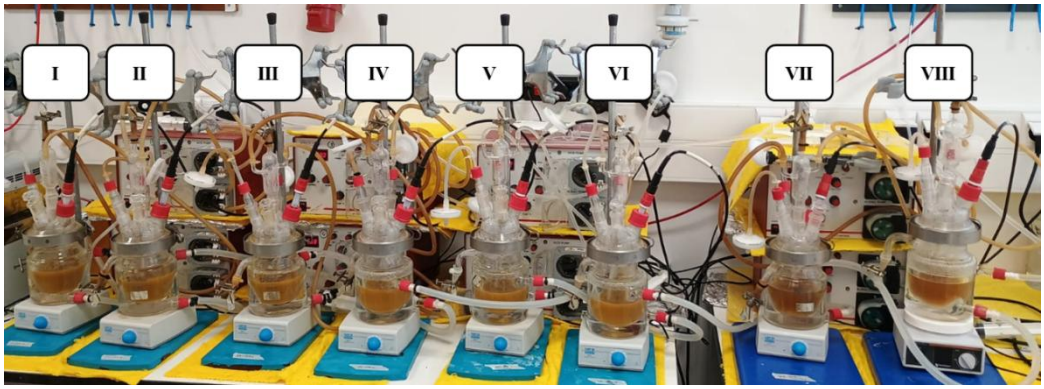


Figura 14 – Fermentadores em batelada contendo: (I-II) Hydrogel OS-23, (III-IV) Hydrogel FOS; (V-VI) Hydrogel Matriz, (VII-VIII) controle de inóculo (IC).

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Reatores estéreis de 300 mL de fermentação de cultura em batelada com agitação magnética foram montados e preenchidos assepticamente com 135 mL de meio nutriente basal estéril de acordo com Carvalho, de *et al.* (2019), gaseificados durante a noite com N_2 livre de O_2, com agitação contínua, um controlador de pH FerMac 260 foi utilizado para manter o pH em cada recipiente entre 6,7 e 6,9, pH do cólon distal humano (Sánchez-Patán *et al.*, 2012), através da adição de ácido clorídrico 0,5 mol/L e hidróxido de sódio 1,0 mol/L, o e a temperatura foi mantida a 37 °C com a ajuda de um banho-maria (Figura 15). Cada condição foi avaliada em duplicata, em dois conjuntos de experimentos realizados em duas semanas diferentes, e os substratos digeridos (seção 4.10) foram adicionados a 1% (m/v) assepticamente (flambando o orifício de entrada/amostragem).

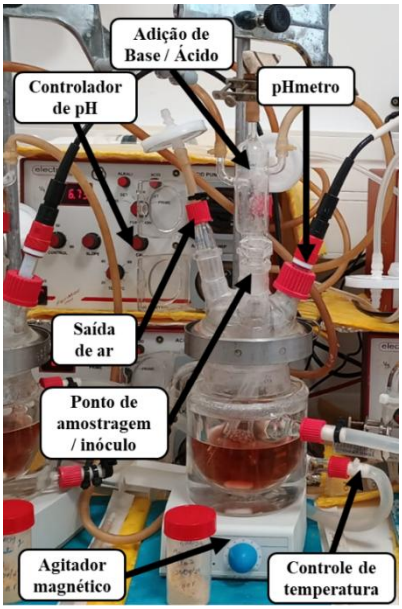


Figura 15 - Fermentador em batelada com controle de pH, temperatura e agitação, utilizado nos ensaios *in vitro* de fermentação colônica.

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Após a completa homogeneização dos substratos com o meio basal, cada recipiente foi inoculado com 15 mL de inóculo fecal (esses inóculos foram previamente submetidos a dois ciclos de lavagem com tampão fosfato, de acordo com Carvalho, de *et al.* (2021), para eliminar completamente o glicerol, que foi usado como criopreservante durante o armazenamento.

As fermentações em batelada foram realizadas por 48 h, e amostras (10 mL) foram coletadas assepticamente de cada recipiente às 0, 6, 24 e 48 h para análise de AGCC feita por cromatógrafo a gás equipado com detector de ionização de chama (GC-FID), determinação da concentração de amônio (NH_4^+), usando um eletrodo íon-seletivo 9663 de amônio e quantificação bacteriana por análise metagenômica.

Imediatamente após a coleta, as amostras foram colocadas em gelo para interromper a fermentação, centrifugadas a 4 °C, 4696 *xg* por 5 minutos, e o sobrenadante foi coletado para análise de GC-FID. O *pellet* foi ressuspendido em 10 mL de uma solução de PBS 0,1 M, agitado em vórtex e centrifugado (4 °C, 4696 *xg* por 5 minutos). O sobrenadante foi descartado e o ciclo de lavagem foi repetido mais uma vez. Os *pellets* de 0, 6, 24 e 48 h foram armazenados a -80 °C até a extração do DNA bacteriano.

4.10.3. Determinação da concentração total de nitrogênio amoniacal

A concentração total de nitrogênio amoniacal foi determinada de acordo com Carvalho, de *et al.* (2022). Resumidamente, a concentração de amônia foi medida usando um eletrodo seletivo de íons 9663 em temperatura ambiente (20 °C) e pH (6,7-6,9). Para modificar a força

iônica, 300 µL de $MgSO_4$ 1M foram adicionados a 3 mL do sobrenadante coletado após a centrifugação a 4 °C, 4696 *xg* por 5 minutos. As leituras foram feitas em duplicata de acordo com as instruções do fabricante. A quantificação foi baseada em uma curva de calibração de NH_4Cl (2 mM a 55 mM) e os cálculos da concentração total de nitrogênio amoniacal foram efetuados de acordo com a Equação (3).

$$\frac{[NH_4^+]}{[NH_3 + NH_4^+]} = 1 - \frac{1}{1 + 10^{(pKa - pH)}} \quad (3)$$

onde a concentração de íons amônio (NH_4^+), a concentração total de nitrogênio amoniacal (NH_3+ NH_4^+) e a constante de dissociação de ácido (pKa) são representadas como uma função da temperatura (T) usando a Equação (4).

$$pKa = 4 \times 10^{-8} T^3 + 9 \times 10^{-5} T^2 - 0.0356T + 10.072 \quad (4)$$

4.10.4. Quantificação dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC)

A quantificação dos AGCC foi realizada por GC-FID Agilent 8860 (Agilent, EUA) e uma coluna capilar BP21 (50 m × 0,32 mm × 0,25 µm; SGE Europe Ltd, Courtaboeuf, França). As condições do método foram as seguintes: as temperaturas do injetor (divisão 25:1; volume de injeção 1 µL), do injetor e do detector foram de 220 °C e 230 °C, respectivamente; o hidrogênio foi usado como gás de arraste a uma vazão de 2 mL/min. A temperatura do forno foi inicialmente de 60 °C e depois aumentada para uma temperatura final de 225 °C.

A extração dos AGCC dos sobrenadantes de fermentação foi realizada de acordo com o método descrito por Scortichini *et al.* (2020), com algumas modificações. Resumidamente, 250 mg de cada amostra foram acidificados com 200 µL de ácido sulfúrico (50% m/v) e misturados em vórtex por 1 min. 10 µL de solução de padrão interno (ácido caproico, C6) foram adicionados à solução ácida para atingir a concentração final da amostra de 450 µM. Os AGCC foram extraídos com a adição de 800 µL de éter dietílico e centrifugados por 5 minutos a 2800 *xg*.

A fase orgânica foi transferida para um novo tubo de coleta, e o processo de extração foi repetido três vezes, coletando um total de 2400 µL da fase orgânica. A identificação dos AGCC em cada amostra foi obtida pela comparação dos tempos de retenção relativos aos picos da amostra com os padrões adequados e a quantificação usando uma curva de calibração na faixa de concentrações de 0,86-7000 µM para os ácidos graxos essenciais mais prevalentes nas amostras - ácidos acético (C2), propiônico (C3) e butírico (C4), e concentrações de 0,12-1000 µM para os ácidos graxos essenciais menos prevalentes nas amostras - ácidos isobutírico (iC4), isovalérico (iC5) e valérico (C5).

4.10.5. Extração do DNA bacteriano e análise de metagenômica

Para realizar a análise metagenômica, os *pellets* provenientes da fermentação colônica *in vitro* coletados às 0, 6, 24 e 48 h (seção 4.11.2), foram dissolvidos em 10 mL de tampão fosfato e, em seguida, uma alíquota de 1 mL foi coletada em microtubos de 2 mL previamente esterilizados. Em seguida, 180 μL de uma solução de lisozima (10 mg/ml em tampão fosfato) foram adicionados ao microtubo. A solução foi incubada a 37 °C por 2 h e, em seguida, centrifugada a 4000 *xg* por 10 min a 4 °C. De acordo com as instruções do fabricante, o pellet resultante foi usado para extração de DNA usando o kit de isolamento de gDNA NZYTissue.

A análise de sequenciamento metagenômico do amplicon 16S foi realizada pela Novogene Europe (Cambridge, Reino Unido). Os genes 16S rRNA das regiões 16SV4-V5 foram amplificados com o uso de primers específicos conectados a códigos genéticos (5′-CCTAYGGRBGCASCAG-3′ e 5′-GGACTACNNGGGTATCTAAT-3′). As reações de PCR foram realizadas com 15 μL de Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix (New England Biolabs). Foram usados 0,2 μM de primers senso e antisenso e 10 ng de DNA modelo. As condições de PCR foram as seguintes: desnaturação inicial a 98 °C por 1 min, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 98 °C por 10 s, hibridização a 50 °C por 30 s e alongamento a 72 °C por 30 s e 72 °C por 5 min.

Os produtos de PCR resultantes foram detectados por eletroforese usando um hidrogel de agarose a 2%, e os produtos de PCR foram posteriormente purificados usando um kit Universal DNA Purification (DP214, TianGen, China). As bibliotecas de sequenciamento foram geradas usando o NEB Next® Ultra™ II FS DNA PCR-free library Prep Kit (E7430L, New England Biolabs, EUA), e os códigos de índice foram adicionados. A biblioteca foi então verificada com Qubit e PCR em tempo real para quantificação e bioanalisador para detecção de distribuição de tamanho.

As bibliotecas quantificadas foram agrupadas e sequenciadas em plataformas Illumina. Variantes de sequência de amplicon (VSA), anotação de espécies e construção de relações filogenéticas foram realizadas com o programa QIIME2 (versão QIIME2-202006). A α-Diversidade foi calculada para analisar a diversidade, a riqueza e a uniformidade das comunidades. Para isso, foram usados 7 índices no programa QIIME2: Observed_otus, Chao1, Shannon, Simpson, Dominância, Cobertura de Good e Pielou_e. Para avaliar a complexidade da composição da comunidade e comparar as diferenças entre grupos de amostras, a β-diversidade foi calculada com base em distâncias Unifracs não ponderadas no QIIME2.

4.11. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Nesta seção serão apresentados os métodos e análises estatísticas utilizados para a etapa de otimização do pré-tratamento da BCF e para as etapas de determinação das bioatividades, desenvolvimento da matriz péctica, digestão do TGI e fermentação colônica.

4.11.1. Otimização da etapa de pré-tratamento da BCF

As análises de variância, regressão múltipla, juntamente com a geração de gráficos de superfície e de contornos foram realizadas com o programa *STATISTICA* versão 12.0 StatSoft Inc., 2014 para definir as condições ideais de temperatura, relação S/L, tempo de reação e concentração de ácido sulfúrico, usando a eficiência da produção de oligossacarídeos (g de OS/100 g de BCF secos) como uma resposta variável. A função de perfil de desejabilidade de resposta do programa *STATISTICA* foi usada para otimizar os parâmetros a fim de obter a eficiência máxima da produção de oligossacarídeos.

4.11.2. Bioatividades, desenvolvimento da matriz péctica, digestão do TGI e fermentação colônica

Os resultados presentes nas Tabelas e Figuras são apresentados como média de três réplicas ± desvio padrão. A análise estatística foi realizada com o *STATISTICA* versão 12.0 StatSoft Inc., 2014. Primeiro, os dados foram analisados quanto à distribuição normal usando o teste de Shapiro-Wilk. Para comparar as médias de três ou mais grupos, foi usada a ANOVA de uma via. O teste post-hoc de Tukey foi usado para determinar as diferenças entre os grupos. Quando apenas duas amostras foram analisadas, foi aplicado o teste T-Student. O nível de significância (p) foi fixado em 0,05, sendo o p-valor menor do que 0,05 considerado estatisticamente significativo.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção serão apresentados os resultados e as discussões referentes as etapas de caracterização química da BCF, otimização da produção dos OS, ACV, composição dos açúcares monoméricos e determinação do grau de polimerização dos OS, avaliação das bioatividades dos OS, desenvolvimento da matriz péctica, ensaio *in vitro* do TGI, fermentação colônica e metagenômica.

5.1. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA BORRA DE CAFÉ (BCF)

A etapa de remoção dos compostos extrativos tem por objetivo a remoção de compostos que não pertençam à estrutura do material lignocelulósico e/ou que podem vir a interferir nos processos de pré-tratamento da biomassa e processos de *downstream* (Sluiter *et al.*, 2008a). Esta etapa consiste na remoção dos compostos não estruturais em 2 etapas, primeiramente há a remoção de compostos solúveis em água e posteriormente a remoção de compostos solúveis em álcoois. No caso deste trabalho foi escolhido trabalhar com o isopropanol. O estudo realizado por Sabino *et al.* (2025) demonstrou que o isopropanol foi o álcool que apresentou a maior eficiência na remoção dos compostos extrativos da borra de café.

Após a remoção dos compostos extrativos, a BCF foi caracterizada de acordo com NREL/TP-510-42618 (Sluiter *et al.*, 2008b) para determinar a proporção de celulose, hemicelulose (manose, galactose, arabinose, xilose), cinzas, lignina e grupos acetil. A Tabela 11 apresenta a composição química da BCF. Os resultados obtidos na caracterização química estão de acordo com os resultados de estudos anteriores sobre a caracterização química da BCF (Ballesteros; Teixeira; Mussatto, 2014; Nguyen *et al.*, 2019; Ribeiro *et al.*, 2023).

É possível observar que a biomassa analisada é composta majoritariamente de hemicelulose, extrativos, lignina e celulose. Além disso, os açúcares poliméricos derivados das estruturas da celulose e hemicelulose constituem 48,29 g/100 g de BCF seca, o que corresponde a aproximadamente metade do peso seco da biomassa, tendo a hemicelulose como a fração mais abundante (37,10 ± 1,63 g/100 g de BCF seca).

A lignina, fração formada por compostos aromáticos e que apresenta forte interações com a celulose e hemicelulose, foi a terceira fração mais abundante presente na BCF (24,31 ± 3,39 g/100 g de BCF seca), resultado que está de acordo com a proporção apresentada por Ballesteros; Teixeira; Mussatto (2014), Nguyen *et al.* (2019) apresentaram valores maiores para esta fração (38,6 ± 1,3 g/100 g de BCF seca), enquanto Ribeiro *et al.* (2023) reportaram valores inferiores (15,77 g/100 g de BCF seca) aos deste trabalho. Por outro lado, pode-se observar que para todos os trabalhos apresentados na Tabela 11, a lignina insolúvel em ácido (lignina de

Klason) foi a mais representativa variando entre 73,6% - 97,0% (m/m) da lignina total presente na BCF.

Este resultado demonstra a importância da caracterização da biomassa prévia à escolha do tipo de pré-tratamento, pois caso a maior proporção da lignina fosse solúvel em ácido, o pré-tratamento com ácido diluído extrairia além da hemicelulose, uma porção relevante da lignina presente na biomassa. O que não seria desejado devido à presença de compostos indesejados e consequentemente a necessidade de processos adicionais para remoção desses compostos.

Tabela 11 - Composição química (g/100 g de BCF seca) da BCF seca de acordo com o método NREL/TP-510-42618 (Sluiter *et al.*, 2008b).

Componentes da BCF	**Porcentagem mássica em base seca (g/100g)**			
	Presente trabalho	**A**	**B**	**C**
Celulose	11,19 ± 0,37	9,9 ± 0,4	12,40 ± 0,79	10,22
Hemicelulose	37,10 ± 1,63	33,4 ± 0,8	39,10 ± 1,94	39,84
Manose	25,46 ± 1,70	19,3 ± 0,5	19,07 ± 0,85	
Galactose	7,79 ± 2,22	10,8 ± 0,2	16,43 ± 1,66	37,44
Xilose	1,37 ± 1,01	-	-	
Arabinose	2,48 ± 1,61	2,2 ± 0,1	3,60 ± 0,52	2,40
Lignina Total	24,31 ± 3,39	38,6 ± 1,3	23,90 ± 1,70	15,77
Lignina solúvel	3,84 ± 0,16	8,8 ± 0,3	6,31 ± 0,37	0,47
Lignina insolúvel	20,47 ± 3,50	29,8 ± 1,3	17,59 ± 1,56	15,30
Grupos acetil	-	...	...	-
Cinzas	1,43 ± 0,01	...	1,30 ± 0,10	0,65
Lipídios	...	...	2,29 ± 0,30	...
Extrativos	25,96 ± 1,63	27,5 ± 0,4	...	19,70

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Nota: Todos os resultados são apresentados como média ± desvio padrão de triplicatas.

Sinais convencionais utilizados:
- \- Dado numérico igual a zero.
- ... Dado numérico não disponível
- A Nguyen *et al.* (2019).
- B Ballesteros, Teixeira e Mussatto (2014)
- C Ribeiro *et al.* (2023)

A fração de extrativos presentes na BCF utilizada neste trabalho corresponde em média 25,96 ± 1,63 g/100 g de BCF seca (Tabela 11) e este valor está de acordo com o resultado encontrado por Nguyen *et al.* (2019), que obteve uma porcentagem de extrativos presentes na borra de café de 27,5 ± 0,4 g/100 g de BCF seca. A pequena diferença na porcentagem de extrativos presente, pode estar relacionada com o fato da borra de café utilizada por Nguyen *et al.* (2019) ser uma mistura de diferentes tipos de preparo do café o que resulta em borras com diferentes porcentagens de extrativos, além da utilização de etanol na extração dos compostos extrativos.

A variação na composição química entre diferentes estudos está relacionada ao tipo de preparação da bebida do café. Alguns métodos extraem mais componentes e, consequentemente, os outros são concentrados. Além disso, o tipo de grão de café, o processo de cultivo e o processo de torrefação influenciam a composição química da bebida.

Dentre os compostos extrativos que podem ser extraídos da borra de café *in natura*, os compostos fenólicos são os compostos de maior interesse. Isso porque, estes compostos podem ser utilizados nas indústrias farmacêutica e alimentícia devido às suas características antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana e antialérgica (Rochín-Medina *et al.*, 2018; Solomakou *et al.*, 2022).

Dentre os compostos fenólicos que podem ser extraídos da borra de café, os compostos de maior interesse são: o ácido clorogênico, ácido cafeico, furfural e 5-HMF. Os dois primeiros compostos podem ser utilizados na indústria farmacêutica e são os compostos fenólicos de maiores concentrações presente na borra de café (Solomakou *et al.*, 2022).

Os outros dois compostos citados, furfural e 5-HMF são provenientes da degradação dos açúcares presentes na celulose e hemicelulose da biomassa, estes possuem o potencial de serem compostos precursores na produção de outros produtos dentro da indústria química (dos Santos *et al.*, 2023). Entretanto, o furfural e o 5-HMF, são considerados tóxicos para os micro-organismos, principalmente as leveduras, quando estes estão presentes no hidrolisado hemicelulósico em concentrações acima de 1,0 g/L (Lorenci Woiciechowski *et al.*, 2020).

Desta forma é importante determinar as concentrações presentes destes compostos fenólicos na biomassa lignocelulósica previamente, para que seja possível tomar decisões de qual tipo de pré-tratamento realizar, quais as condições e qual será o objetivo do pré-tratamento, obter um hidrolisado hemicelulósico para ser fermentado ou então partir direto para a produção de compostos fenólicos da degradação dos carboidratos presentes. Neste sentido, a Tabela 12 apresenta as concentrações dos compostos fenólicos presentes na BCF *in natura* a partir das análises de CLAE feitas em triplicata.

A presença de compostos fenólicos em extratos obtidos da borra de café é esperada, devido ao fato do café ser a semente processada do fruto do café, este apresenta maiores concentrações de compostos fenólicos mesmo após o seu processamento (Inácio *et al.*, 2023).

Os compostos que foram identificados pertencem às classes de ácidos fenólicos e de fenóis em sua maioria. A extração em triplicata utilizando o aparato Soxhlet com água obteve majoritariamente os compostos 2,4-DHBA e 5-HMF, com concentrações de 31,06 ± 3,18 mg/L e 11,14 ± 2,06 mg/L respectivamente. Também foram encontrados em menores concentrações os compostos: ácido gálico, furfural, ácido cafeico, fenol, vanilina, siringaldeído, p-cumárico

nas concentrações 2,28 ± 0,34 mg/L, 2,75 ± 0,28 mg/L, 1,79 ± 0,14 mg/L, 0,88 ± 0,24 mg/L, 0,98 ± 0,27 mg/L, 0,22 ± 0,09 mg/L, 0,10 ± 0,01 mg/L, respectivamente.

Tabela 12 - Concentrações dos compostos fenólicos presentes na borra de café *in natura* a partir das análises de CLAE em triplicata.

Compostos fenólicos	Extração com água (mg/L)	Extração com isopropanol (mg/L)
Ác. Gálico	2,28 ± 0,34	0,64 ± 0,29
5-HMF	11,14 ± 2,06	-
Furfural	2,75 ± 0,28	0,07 ± 0,04
2,4-DHBA (2,4-ácido dihidroxibenzóico)	31,06 ± 3,18	-
Ác. Cafeico	1,79 ± 0,14	0,01 ± 0,02
Fenol	0,88 ± 0,24	-
Vanilina	0,98 ± 0,27	-
Siringaldeído	0,22 ± 0,09	-
p-Cumárico	0,10 ± 0,01	-

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Nota: Sinal convencional utilizado:
- Dado numérico igual a zero.

No caso da extração posterior com isopropanol, apenas foram encontrados os compostos: ácido gálico e furfural, e estes compostos estavam presentes em baixas concentrações, 0,64 ± 0,29 mg/L e 0,07 ± 0,04 mg/L respectivamente, considerando as concentrações extraídas com água.

Estes compostos também foram encontrados por Inácio *et al.* (2023), os autores avaliaram 3 métodos diferentes de extração dos compostos fenólicos utilizando a água como solvente. O 2,4-ácido dihidroxibenzóico, assim como neste trabalho, também esteve presente majoritariamente nos extratos dos 3 diferentes tipos de extração utilizados pelos autores, sendo obtidas concentrações de 228,07 mg/kg, 268,74 mg/kg, 124,77 mg/kg respectivamente para os métodos de extração assistida por ultrassom (AU), extração assistida por enzima (AE) e extração assistida por ultrassom e enzima (AUE). Porém, os autores também foram capazes de extrair concentrações mais significativas de ácido cafeico para os 3 métodos em relação a este trabalho, obtendo concentrações de 135,01 mg/kg, 648,33 mg/kg e 984,72 mg/kg respectivamente para os métodos AU, AE e AUE.

O 2,4-ácido dihidroxibenzóico é isômero do ácido dihidroxibenzóico e estão correlacionados com as meloidinas presentes no café (Inácio *et al.*, 2023). Além disso, este composto está sendo estudado em testes *in vivo* e *in vitro* na prevenção de disfunções renais e é um aditivo de alimentos aprovado pelas principais agências regulatórias (Widmeier *et al.*, 2019).

Em outro estudo realizado por Castaldo *et al.* (2021) com o intuito de avaliar a bioacessibilidade e a ação antioxidante dos compostos fenólicos presentes em biscoitos enriquecidos com a borra de café, também determinou a concentração do ácido p-cumárico, do ácido cafeico, entrou outros ácidos clorogênicos. Nos estudos realizados pelos pesquisadores, as concentrações dos ácidos p-cumárico e cafeico em borra de café foi de 0,2 ± 0,0 mg/kg e 7,2 ± 0,3 mg/kg em extratos obtidos com uma mistura entre água e etanol 3:1 (v/v).

Estes valores estão abaixo dos valores encontrados neste trabalho mesmo a borra sendo obtida de uma cafeteira caseira, esta diferença está diretamente correlacionada com a diferença da borra obtida, tendo em vista que por se tratar de um subproduto das sementes da planta, a sua composição será afetada pelas condições de cultivo, plantio e processos submetidos.

Em relação ao furfural e ao 5-HMF, o extrato obtido da borra de café utilizada neste estudo apresentou valores abaixo dos valores considerados tóxicos para micro-organismos (1,0 g/L). Entretanto, como estes compostos são provenientes da degradação dos açúcares presentes na hemicelulose (dos Santos *et al.*, 2023), a presença destes compostos junto aos compostos extrativos corrobora com a necessidade de utilizar concentrações diluídas de ácido durante a etapa de pré-tratamento.

Outro fator importante que podemos observar a partir dos dados presentes na Tabela 12 é que a extração pelo aparato Soxhlet utilizando água como solvente por 5 ciclos foi suficiente para extrair a maior parte dos compostos extrativos, haja vista que no extrato da borra com isopropanol detectados somente 0,64 ± 0,29 mg/L e 0,07 ± 0,04 mg/L de ácido gálico e furfural, respectivamente. As extrações dos compostos fenólicos da BCF, em sua maioria, são executadas com misturas entre solventes orgânicos e água, entretanto com os resultados apresentados na Tabela 12 demonstram a eficiência da extração utilizando somente água.

Além disso, Bravo *et al.* (2013) analisaram a atividade antioxidante pelo método DPPH de diferentes extratos obtidos a partir da BCF com diferentes solventes, e os autores determinaram que o extrato obtido com extração somente por água obteve resultados mais significativos. Estes resultados abrem novas perspectivas para métodos de extração que sejam mais ecologicamente amigáveis, não utilizando solventes orgânicos, e que sejam capazes de extrair compostos de maior valor agregado que possam ser utilizados pelas indústrias farmacêutica e alimentícia.

A fração hemicelulósica é a mais abundante, compreendendo 37,10 ± 1,63 g/100 g de BCF seca. Quando comparado com outros estudos, Nguyen *et al.* (2019) apresentou uma fração hemicelulósica menos abundante (33,4 ± 0,8 g/100 g de BCF seca), enquanto Ballesteros; Teixeira; Mussatto (2014) e Ribeiro *et al.* (2023) obtiveram valores próximos para a fração

hemicelulósica, 39,10 ± 1,94 g/100 g de BCF seca e 39,84 g/100 g de BCF seca respectivamente.

A fração hemicelulósica analisada neste trabalho é composta principalmente de manose (25,46 ± 1,70 g/100 g de BCF seca), galactose (7,79 ± 2,22 g/100 g de BCF seca), arabinose (2,48 ± 1,61 g/100 g de BCF seca) e xilose (1,37 ± 1,01 g/100 g de BCF seca) em quantidades menores. Sabe-se que o componente hemicelulósico dos BCF é predominantemente constituído de galactomananas e arabinogalactanas do tipo II (Sharma; Ray; Singhal, 2021; Simões *et al.*, 2014; Tian *et al.*, 2017).

Nesse sentido, os resultados apresentados na Tabela 11 concordam com os estudos citados, demonstrando que a hemicelulose dos BCF é uma estrutura heteropolimérica. A presença de xilose na hemicelulose também foi identificada nos estudos realizados por Jin Cho *et al.* (2022), Nguyen *et al.* (2017) e Ribeiro *et al.* (2023). No entanto, ela não foi encontrada em outros estudos de caracterização (Ballesteros; Teixeira; Mussatto, 2014; Mussatto *et al.*, 2011a). A variação na presença de xilose pode ser atribuída à variedade dos grãos e aos procedimentos de cultivo empregados.

As maiores diferenças das concentrações da fração hemicelulósica foram em relação as concentrações de manose e principalmente da galactose presente, enquanto os estudos apresentados na Tabela 11 obtiveram concentrações de manose entre 19,07 g/100 g de BCF seca - 21,02 g/100 g de BCF seca, neste trabalho determinou-se 25,46 ± 1,70 g/100 g de BCF seca. A respeito da galactose, os trabalhos encontrados na literatura obtiveram concentrações entre 10,80 g/100 g de BCF seca - 16,43 g/100 g de BCF seca, enquanto neste trabalho obteve-se 7,79 ± 2,22 g/100 g de BCF seca.

Esta diferença entre as concentrações de manose e galactose presente entre os trabalhos encontrados na literatura e este trabalho para a BCF, pode ser explicada pela estrutura heteropolimérica da hemicelulose. As arabinogalactanas do tipo II encontradas na BCF são caracterizadas pela presença de resíduos de galactose com ligações nas posições (1 → 3) e (1 → 3,6), bem como resíduos de arabinose com ligações (1 → 5) (Simões *et al.*, 2010). As mananas são polímeros lineares constituídas quase que exclusivamente de manose, com a presença de galactose em menos de 5% da cadeia, já as galactomananas possuem a cadeia polimérica linear constituída por manoses e contém α-D-galactopiranose na posição O-6 dos resíduos de manose, que representam mais de 5% da estrutura, com isso a razão manose:galactose na estrutura pode variar desde 1,1:1 até 3,5:1 dependendo da sua fonte (Yang *et al.*, 2023). Isso faz com que os diferentes trabalhos apresentem diferentes concentrações de

manose, galactose e arabinose na estrutura hemicelulósica devido ao fator de estarem trabalhando com borras de café provenientes de diferentes regiões e formas de cultivo.

Esta diferença entre as concentrações de manose e galactose dos trabalhos presentes na Tabela 11 em conjunto as diferenças na estrutura heteropolimérica da hemicelulose da borra de café, podem indicar que o material lignocelulósico caracterizado neste trabalho apresenta maiores proporções de galactomananas com maiores razões entre manose:galactose em relação às outras borras de café *in natura* utilizadas pelos outros trabalhos encontrados na literatura (Ballesteros; Teixeira; Mussatto, 2014; Mussatto *et al.*, 2011a; Nguyen *et al.*, 2019).

A manose é o principal açúcar na porção lignocelulósica da BCF, o que corrobora a maior presença de galactomananos na estrutura complexa da hemicelulose. A BCF é uma das biomassas com maior teor de manose, tendo um teor de manose menor do que a torta de palmiste e o caroço de açaí (Tabela 1).

O teor de manose na BCF, de acordo com a Tabela 11, representa aproximadamente um quarto do peso seco do material. Além disso, Otieno, Daniel O. e Ahring (2012) propõem que um material é considerado adequado para a produção de oligossacarídeos quando contém pelo menos 20% do monossacarídeo desejado. Isso indica que a BCF é uma fonte potencial de manano-oligossacarídeos a partir da hemicelulose.

5.2. OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS (OS)

A otimização da extração de oligossacarídeos foi determinada pela realização de um planejamento Box-Behnken 3^4 com 5 repetições no ponto central e a variável de resposta da otimização foi a eficiência de extração de OS (EF-OS) (g de OS/ 100g de BCF seca). A Tabela 13 apresenta os 29 ensaios, os níveis dos fatores correspondentes e os resultados da EF-OS. Conforme mostrado na Tabela 13, o ensaio 15 (165 °C, 1/40 g/mL, 20 min e H_2SO_4 1% v/v) resultou na maior EF-OS. De acordo com as condições mencionadas acima, obteve-se 22,40 gramas de OS a partir de 100 gramas de BCF seca. Em contraste, o ensaio 2 (190 °C, 1/4 g/mL, 70 min e H_2SO_4 1% v/v) resultou na menor EF-OS, sendo capaz de produzir apenas 1,65 g de OS para cada 100 g de BCF seca, e esse resultado pode indicar que temperaturas mais altas podem causar a conversão completa dos açúcares poliméricos da porção hemicelulósica em açúcares monoméricos.

Esse padrão pode ser observado quando os resultados obtidos nos ensaios 1 e 2 são comparados. No ensaio 1, a temperatura é mantida no nível mais baixo (T = 140 °C, ensaio 1), enquanto no ensaio 2, ela é mantida no nível mais alto (T = 190 °C, ensaio 2), com os outros fatores mantidos constantes. Essa evidência indica que a eficiência da produção de OS apresenta

um aumento de quatro vezes com a redução da temperatura. A influência da temperatura também foi observada por Pérez-Burillo *et al.* (2019), os autores realizaram uma pré-tratamento hidrotérmico com uma relação S/L de 10% (m/m), altas temperaturas e com tempos de amostragem de 10, 30 e 60 min, e observaram que acima de 185 °C após os 60 min de reação a quantidade de total OS diminui em 6 vezes, de 41,35 ± 2,49 mg/g de BCF a 185 °C para 6,89 ± 0,14 mg/g de BCF a 220 °C, indicando a degradação térmica dos OS.

Além disso, uma análise dos resultados dos ensaios 14 e 15 revela que uma alteração na relação S/L teve um impacto significativo na produção de OS. Quando a proporção é alterada do nível mais baixo (S/L=1/4, ensaio 14) para o mais alto (S/L=1/40, ensaio 15), a produção de OS atinge sua maior eficiência (22,40 g OS/100g BCF seca), aumentando 3,7 vezes quando comparada com o ensaio 14. Esse padrão também é evidente quando se comparam os ensaios 23 e 24.

Por outro lado, os resultados apresentados na Tabela 13 indicam que a mudança do nível mais baixo (tempo = 20 min, ensaio 5) para o nível mais alto (tempo = 120 min, ensaio 6) da variável tempo, não foi significativa com relação a EF-OS. Essa tendência de o tempo não ser tão relevante quanto aos outros fatores, está de acordo com os resultados obtidos por Sarghini *et al.* (2021). Os autores realizaram o pré-tratamento ácido da BCF, e a quantidade de OS extraída do resíduo de café não diferiu significativamente com a modificação do tempo de reação. Essa baixa influência do tempo é um resultado importante, pois pode ser possível trabalhar com tempos de residência mais curtos, tornando o processo industrial mais rápido. Uma redução nos tempos de residência pode resultar em maior produtividade e economia de custos operacionais, contribuindo coletivamente para a eficiência geral do processo industrial.

Além disso, os ensaios 15, 24 e 26 indicam que a aplicação de concentrações diluídas de ácido aumenta a clivagem da estrutura hemicelulósica, melhorando assim a produção dos OS. Entretanto, quando a concentração de ácido excede 1,5% v/v, conforme observado no ensaio 26, a EF-OS diminui. A quebra das cadeias dos açúcares poliméricos da hemicelulose é aumentada pela adição de ácido diluído à reação. Isso ocorre porque a protonação dos grupos amino da BCF favorece a extração dos OS. À medida que a condição de reação se torna mais severa, o grau de polimerização do OS diminui (Sarghini *et al.*, 2021). Isso sugere que a concentração de ácido utilizado no ensaio 26 foi capaz de clivar a estrutura da hemicelulose a ponto de também clivar os OS produzidos em açúcares monoméricos.

Tabela 13 – Matriz do planejamento Box-Behnken 3^4 com 5 repetições no ponto central para o estudo da influência das variáveis: temperatura, razão S/L, tempo e concentração de H_2SO_4, no processo de obtenção dos OS a partir do pré-tratamento da BCF.

Ensaio	Temperatura (°C)	S/L (g/mL)	Tempo (min)	H_2SO_4 (%v/v)	EF-OS (g OS/100g BCF seca)
1	140 (-1)	1/4 (-1)	70 (0)	1 (0)	6,93
2	190 (1)	1/4 (-1)	70 (0)	1 (0)	1,65
3	140 (-1)	1/40 (1)	70 (0)	1 (0)	15,18
4	190 (1)	1/40 (1)	70 (0)	1 (0)	12,32
5	165 (0)	1/22 (0)	20 (-1)	0 (-1)	8,30
6	165 (0)	1/22 (0)	120 (1)	0 (-1)	8,68
7	165 (0)	1/22 (0)	20 (-1)	2 (1)	10,31
8	165 (0)	1/22 (0)	120 (1)	2 (1)	11,43
9 (CP)	165 (0)	1/22 (0)	70 (0)	1 (0)	11,17
10	140 (-1)	1/22 (0)	70 (0)	0 (-1)	6,90
11	190 (1)	1/22 (0)	70 (0)	0 (-1)	2,76
12	140 (-1)	1/22 (0)	70 (0)	2 (1)	12,63
13	190 (1)	1/22 (0)	70 (0)	2 (1)	8,97
14	165 (0)	1/4 (-1)	20 (-1)	1 (0)	6,13
15	165 (0)	1/40 (1)	20 (-1)	1 (0)	22,40
16	165 (0)	1/4 (-1)	120 (1)	1 (0)	6,63
17	165 (0)	1/40 (1)	120 (1)	1 (0)	18,19
18 (CP)	165 (0)	1/22 (0)	70 (0)	1 (0)	13,97
19	140 (-1)	1/22 (0)	20 (-1)	1 (0)	14,73
20	190 (1)	1/22 (0)	20 (-1)	1 (0)	13,91
21	140 (-1)	1/22 (0)	120 (1)	1 (0)	17,77
22	190 (1)	1/22 (0)	120 (1)	1 (0)	9,92
23	165 (0)	1/4 (-1)	70 (0)	0 (-1)	6,09
24	165 (0)	1/40 (1)	70 (0)	0 (-1)	12,06
25	165 (0)	1/4 (-1)	70 (0)	2 (1)	3,39
26	165 (0)	1/40 (1)	70 (0)	2 (1)	18,31
27 (CP)	165 (0)	1/22 (0)	70 (0)	1 (0)	14,49
28 (CP)	165 (0)	1/22 (0)	70 (0)	1 (0)	14,37
29(CP)	165 (0)	1/22 (0)	70 (0)	1 (0)	15,03

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Nota: Os níveis codificados são apresentados entre parênteses.
Sinal convencional utilizado:
CP Ponto central.

Analisando os ensaios 23 e 25 quando a relação S/L está no nível mais baixo (1/4 g/mL), um aumento na concentração de ácido desfavorece a produção de OS. Mas analisando os ensaios 24 e 26 e tendo a relação S/L no nível mais alto (1/40 g/mL), a produção de OS se vê favorecida pela maior concentração de ácido sulfúrico. Isto quer dizer que a interação entre a relação S/L e a concentração de ácido será essencial para otimizar a quantidade de OS.

O gráfico de Pareto (Figura 16) ilustra os resultados da análise realizada para identificar os efeitos estatisticamente significativos com relação à EF-OS. Os termos com um valor de p

inferior a 0,05 foram considerados significativos. Conforme apresentado na Figura 16, a relação S/L foi a variável de maior influência sobre a EF-OS, seguida pela temperatura, concentração de ácido sulfúrico e a interação entre a razão S/L e a concentração de ácido sulfúrico. Além disso, a variável tempo não foi considerado significativo (valor de $p \geq 0,05$), o que corrobora com os argumentos apresentados nos parágrafos anteriores. Estes resultados mostram a importância de analisar criticamente a influência de cada parâmetro operacional e como eles interagem entre si, dependendo do composto específico desejado como produto final.

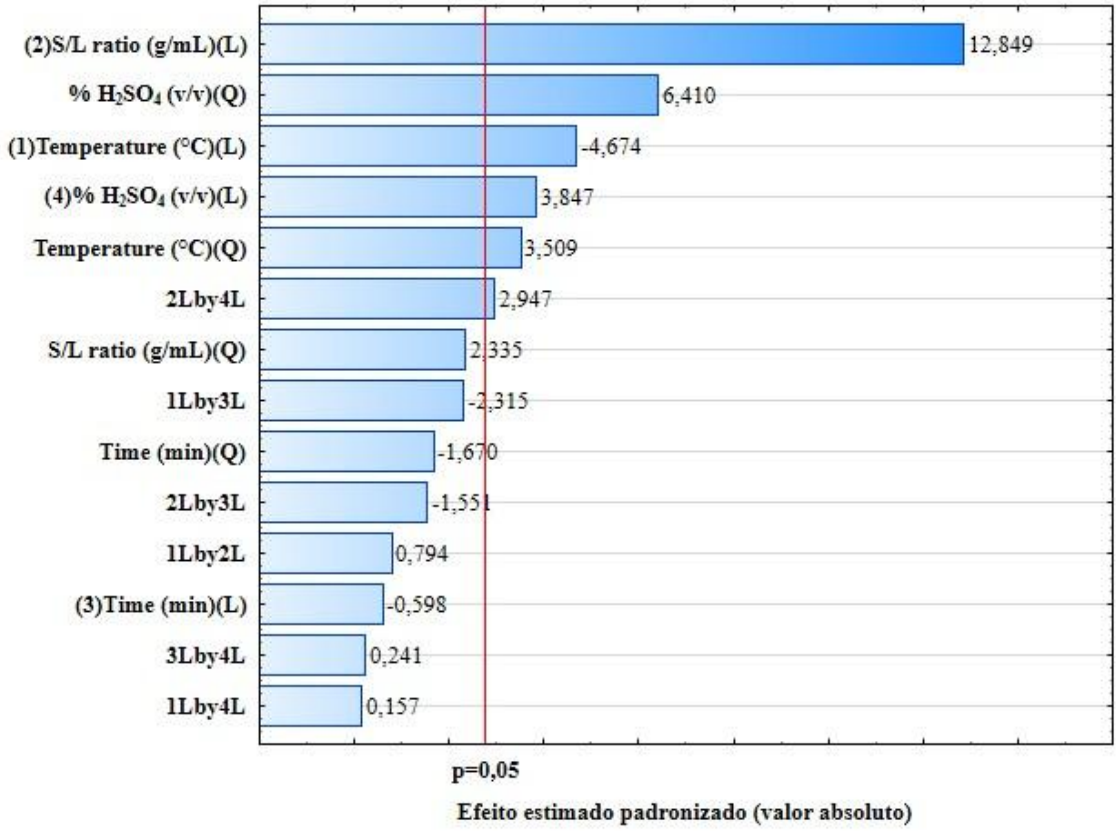


Figura 16 - Estimativa dos efeitos (com 95% de confiança) usando o gráfico de Pareto do planejamento Box-Behnken 3^4 para a otimização da extração de OS a partir do pré-tratamento da BCF. L = variável linear, Q = variável quadrática.

Fonte: Elaborada pelo autor (2025)

O modelo matemático desenvolvido para a produção de oligossacarídeos derivados do pré-tratamento ácido é apresentado na Equação (5). O modelo é apresentado considerando o valor real das variáveis, em que X_1 é a temperatura (°C), X_2 é a razão S/L (g/mL), X_3 é o tempo (min) e X_4 é a concentração de H_2SO_4 (%v/v).

$$EF - OS\left(\frac{g\ OS}{100g\ BCF\ seca}\right) = 9{,}596 - 2{,}050X_1 + 1{,}047X_1^2 + 5{,}637X_2 + 0{,}697X_2^2 - 0{,}262X_3 - 0{,}498X_3^2 + 1{,}688X_4 + 1{,}913X_4^2 + 0{,}603X_1X_2 - 1{,}759\,X_1X_3 + 0{,}119\,X_1X_4 - 1{,}178X_2X_3 + 2{,}240X_2X_4 + 0{,}183X_3X_4 \quad (5)$$

A partir da análise ANOVA (Tabela 14), o modelo de regressão foi considerado significativo (p-valor < 0,05) e foi capaz de explicar aproximadamente 91,13% dos dados. Além disso, o teste de falta de ajuste foi considerado não significativo (p-valor > 0,05). Esse resultado indica que o modelo proposto representa estatisticamente a relação entre a variável dependente e as variáveis independentes.

Tabela 14 - ANOVA para a variável dependente EF-OS (g OS/100g BCF seca) para o planejamento Box-Behnken 3^4 com 5 repetições no ponto central para a otimização da extração de OS a partir do pré-tratamento da BCF.

Fator	SQ	GL	MQ	F	p-valor
Regressão	643,541	14	45,967	10,2720	0,00005
Resíduos	62,650	14	4,475		
Falta de ajuste	53,411	9	5,935	3,2116	0,10594
Erro puro	9,239	5	1,848		
Total	706,191	28			

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Nota: $R^2 = 0,91128$; $R^2_{aju} = 0,82257$

A adequação do modelo foi verificada por meio da análise residual através dos gráficos de resíduos versus valores preditos e de probabilidade normal, dados apresentados na Figura 34 e Figura 35 do **Apêndice A**. A variável resposta apresentou linearidade para o gráfico de probabilidade normal dos resíduos, o que confirma a suposição de normalidade assumida para os modelos. Além disso, no respectivo gráfico de resíduos versus respostas previstas, foi observada uma dispersão aleatória, indicando a confiabilidade do modelo.

A função de desejabilidade é a relação entre as respostas previstas da variável dependente. O procedimento envolve a transformação dos resultados previstos em escores de desejabilidade que variam de 0 (indesejável) a 1,0 (muito desejável) e, em seguida, o cálculo da desejabilidade geral dos resultados em diferentes combinações das variáveis dependentes pela média geométrica da desejabilidade individual (Garcia; Pereira-Filho, 2015).

Desta forma, os gráficos de contorno de desejabilidade que mostram a influência de dois parâmetros operacionais diferentes são apresentados na Figura 17. Além disso, as curvas de superfície de resposta tridimensionais para a variável de resposta, EF-OS (g OS/100g BCF seca), são apresentadas na Figura 18.

Como pode ser observado nas Figura 17 b, Figura 17 c, Figura 17 f, Figura 18 c, Figura 18 e e Figura 18 f, o tempo não teve um efeito significativo na EF-OS. Estes resultados estão alinhados com as informações apresentadas no gráfico de Pareto (Figura 16). Além disso, pode-

se observar nas , Figura 18 c, Figura 18 e e Figura 18 f que, embora o tempo não tenha tido um efeito estatisticamente significativo, o ideal é que esteja no nível mais baixo (20 min) para obter os melhores resultados. Esse resultado é importante para o aumento da escala industrial do processo, uma vez que uma alta EF-OS pode ser obtida em 20 minutos de reação.

Nas Figura 17 a, Figura 17 b e Figura 17 d pode-se observar que a faixa de temperatura ideal ficou entre 160 e 175 °C, o que sugere que, em temperaturas mais baixas, o reator deve permanecer por períodos mais longos ou ter concentrações mais altas de ácido sulfúrico para poder romper as ligações químicas da fração hemicelulósica da BCF. Além disso, a faixa ideal da relação S/L é mostrada nas Figura 17 a, Figura 17 c e Figura 17 e, e foi encontrada entre 1/40 - 1/45 (g/mL).

A partir da Figura 18, pode-se observar que a variação na EF-OS (g OS/100g BCF seca) variou de 2 a 22, de acordo com as condições testadas das variáveis analisadas. Na Figura 18 d, pode-se observar que a concentração de ácido e a relação S/L são as duas variáveis que possuem maior influência na variável de resposta, onde a EF-OS máxima é alcançada.

Esses resultados corroboram os dados apresentados no gráfico de Pareto (Figura 16), e é esperado que essas duas variáveis estejam fortemente correlacionadas entre si porque, com um volume de líquido constante, a relação S/L afeta diretamente a concentração de ácido em contato com a biomassa, conforme mostrado na Figura 18 d. A partir das Figura 17 d, Figura 17 e e Figura 17 f, pode-se observar que a concentração ideal de ácido sulfúrico está entre 1,4 e 1,6% (v/v). Aumentar a concentração de ácido além da faixa ideal favorece a produção de açúcares monoméricos, enquanto diminuí-la abaixo da faixa ideal resulta em uma concentração ácido insuficiente para quebrar as cadeias de polímeros de hemicelulose, levando a uma proporção maior de polissacarídeos.

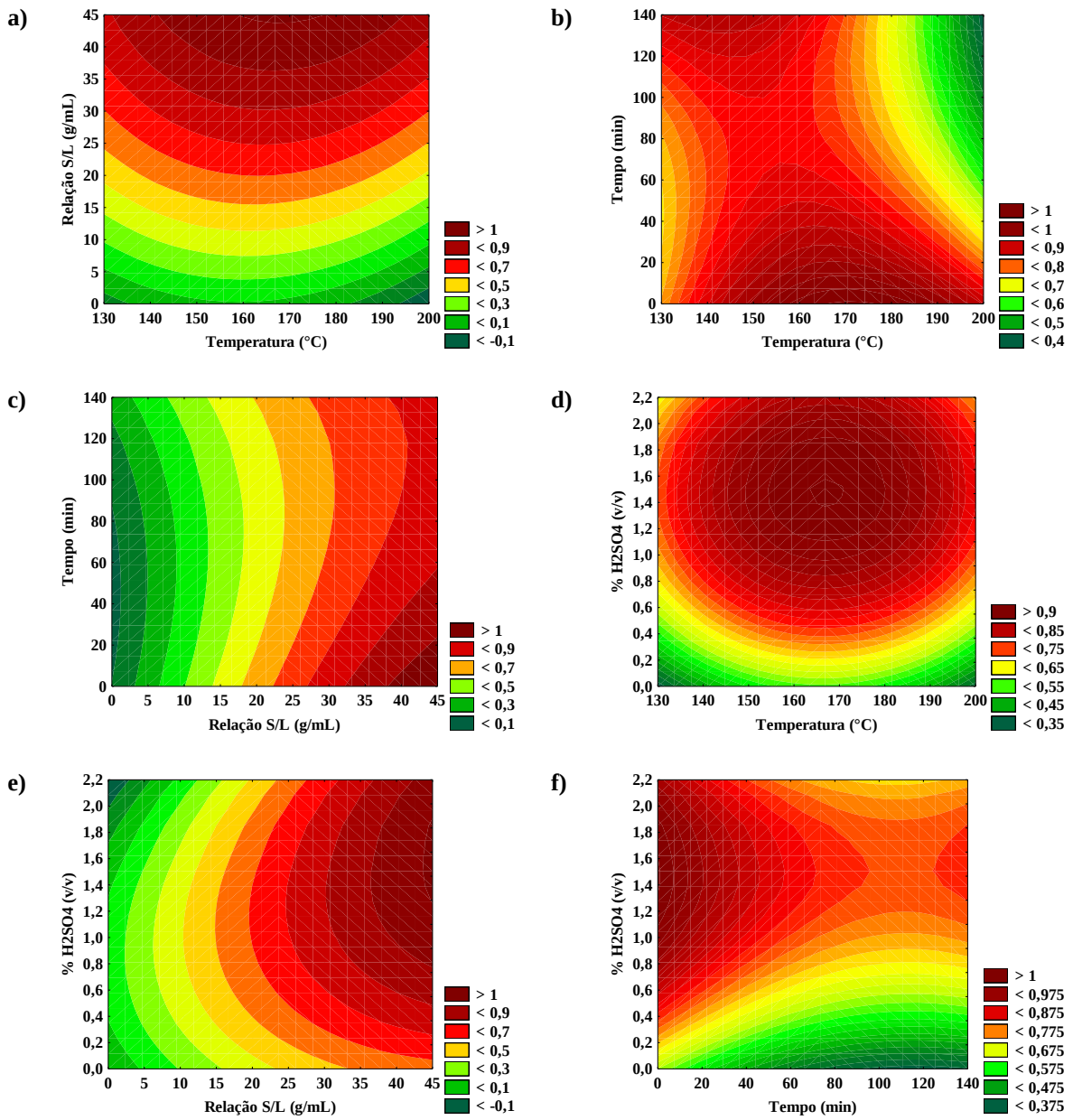


Figura 17 - Gráficos de contorno da função desejabilidade de acordo com o planejamento Box-Behnken 3^4, para a variável resposta EF-OS (g OS/100 g BCF seca) para (a) Relação S/L (g/mL) vs. Temperatura (°C); (b) Tempo (min) vs. Temperatura (°C); (c) Tempo (min) vs. Relação S/L (g/mL); (d) $\%H_2SO_4$ (v/v) vs. Temperatura (°C); (e) $\%H_2SO_4$ (v/v) vs. Relação S/L (g/mL) e (f) $\%H_2SO_4$ (v/v) vs. Tempo (min).

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

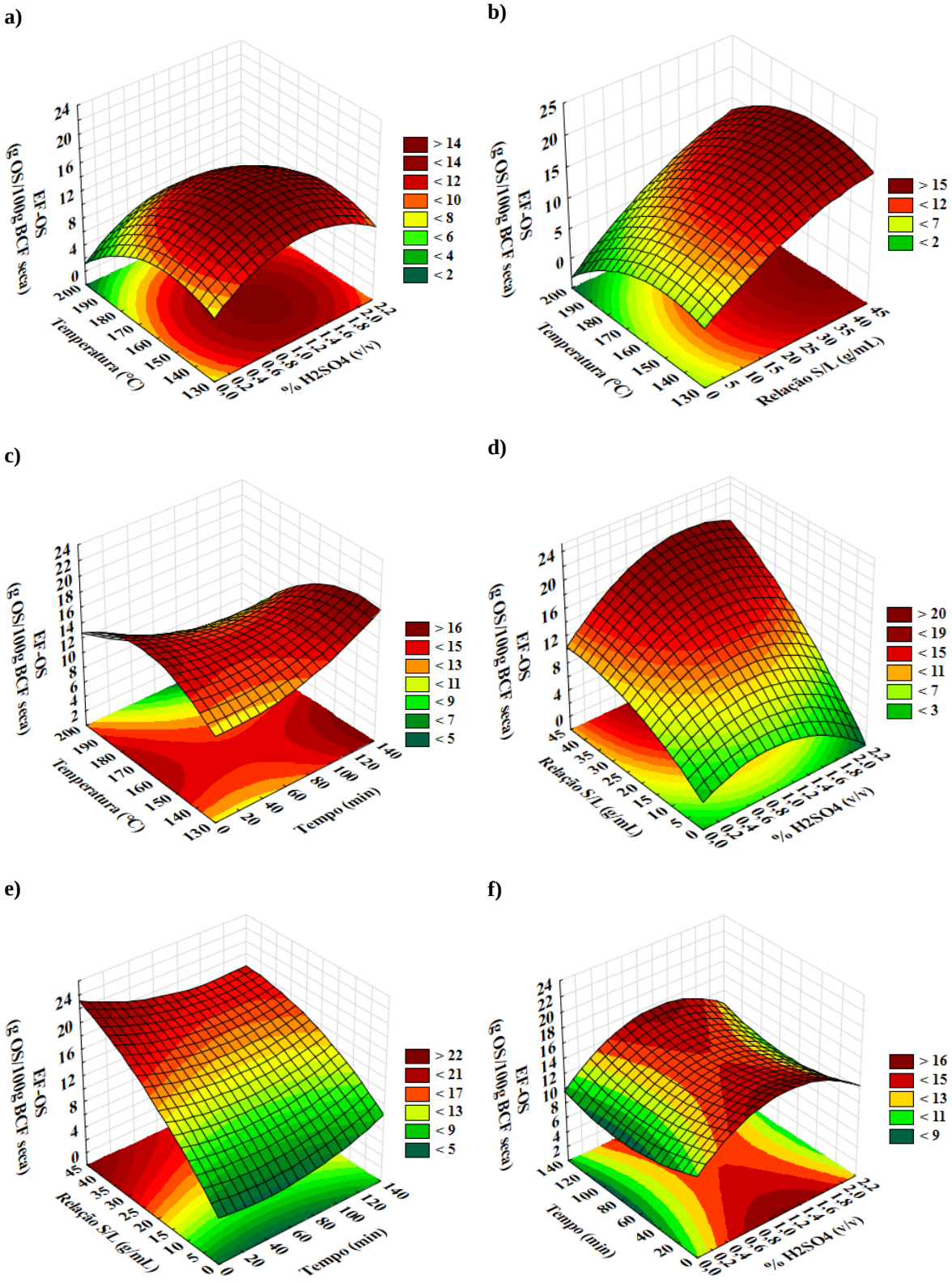


Figura 18 - Superfícies de resposta tridimensional de acordo com o planejamento Box-Behnken 3^4, para a variável resposta EF-OS (g OS/100 g BCF seca) para (a) Temperatura (°C) vs. $\%H_2SO_4$; (b) Temperatura (°C) vs. Relação S/L (g/mL); (c) Temperatura (°C) vs. Tempo (min); (d) Relação S/L (g/mL) vs. $\%H_2SO_4$; (e) Relação S/L (g/mL) vs. Tempo (min) e (f) Tempo (min) vs. $\%H_2SO_4$ (v/v).

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Neste estudo, o objetivo da otimização foi maximizar a EF-OS usando o programa *STATISTICA*, aplicando a função de desejabilidade para otimizar a Equação (5). Nesse sentido, o valor de 21,399 g OS/100g BCF seca foi previsto pelo modelo sob as condições: relação S/L de 1/40 (g/mL), tempo de reação de 20 min, concentração de H_2SO_4 de 1,43 v/v, a 169 °C.

O modelo matemático gerado de acordo com o planejamento Box-Behnken 3^4, com 5 pontos centrais no total, para a variável de resposta EF-OS (g OS/100g BCF seca) foi validado empregando a condição otimizada para a EF-OS, bem como uma condição aleatória dentro das faixas estudadas. As condições em questão, juntamente com os valores previstos, experimentais e de erro correspondentes, são apresentadas na Tabela 15. A porcentagem de erro entre os valores experimentais e previstos para as duas condições avaliadas foi inferior a 9%, o que indica a adequação do modelo matemático desenvolvido e, consequentemente, a validação do mesmo.

Tabela 15 - Modelo matemático, gerado de acordo com o panejamento Box-Behnken 3^4, e validação empregando a condição otimizada e uma condição aleatória.

Ensaios	Temper. (°C)	Relação S/L (g/mL)	Tempo (min)	H_2SO_4 (%v/v)	Predito (g OS/100g BCF seca)	Experimento (g OS/100g BCF seca)	Erro
Otimizada	169	1/40	20	1,43	21,40	19,49 ± 0,72	8,93%
Aleatória	155	1/6	55	1	8,04	7,73 ± 1,49	3,85%

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Nota: Os dados experimentais são apresentados como as médias ± desvio padrão de análises realizadas em triplicata.

À medida que a demanda por produtos alimentícios funcionais aumenta, o aprimoramento e a otimização do processo de pré-tratamento, uma etapa crucial, são vitais para o desenvolvimento de processos de produção mais eficientes, de OS novos e já estabelecidos, tornando-os mais acessíveis economicamente (Catenza; Donkor, 2021).

No trabalho desenvolvido por Nguyen *et al.* (2019), os autores empregaram uma sacarificação usando hidrólise enzimática (pectinase produzida internamente) e conseguiram produzir aproximadamente 9,38 g de MOS por 100 g de BCF. Esse resultado é quase a metade dos OS obtidos pela condição ideal neste trabalho, mostrando que o processo de pré-tratamento com ácido diluído é um processo eficiente. Além disso, a hidrólise enzimática precisou de 6 horas para produzir 9,38 g de MOS, enquanto neste estudo o tempo de reação foi de 20 minutos, o que representa um processo de economia de tempo.

Em outro estudo realizado por Ibrahim *et al.* (2022), uma β-mananase proveniente de *Aureobasidium pullulans* NRRL 58524 foi empregada para produzir MOS a partir da BCF por hidrólise enzimática. Sob as condições otimizadas, eles produziram 19,12 ± 1,04 g por 100 g

de BCF seca, o que é próximo ao resultado obtido experimentalmente pela condição ideal deste trabalho. No entanto, comparando esse resultado obtido pelos autores com os resultados obtidos neste estudo em termos de produtividade (OS por horas de produção), ao aplicar as condições ótimas mostradas neste estudo, a produtividade é de aproximadamente 58,47 g de OS por hora, enquanto usando as condições ótimas apresentadas por Ibrahim *et al.* (2022) a produtividade é de aproximadamente 0,46 g de MOS por hora. Considerando um processo escalonável, a produtividade é um parâmetro crucial, pois afeta diretamente o custo de produção e, por sua vez, a viabilidade do processo industrial.

Outros resíduos agroindustriais, como sementes de açaí e torta de palma, são conhecidos por sua composição rica em manose. Murillo-Franco; Galvis-Nieto; Orrego (2024) reportaram um rendimento de MOS variando entre 6,3 e 10,9 g/100 g de sementes de açaí secas usando processos enzimáticos, enquanto Li *et al.* (2018) obtiveram rendimentos de 10,5 e 19,7 g/100 g de biomassa seca por meio de pré-tratamento por explosão a vapor. Os rendimentos comparáveis obtidos de BCF por meio do pré-tratamento ácido destacam seu potencial como um material promissor para a produção de OS, oferecendo uma nova rota de valorização para este resíduo agroindustrial.

5.2.1. Pré-tratamento com ácido cítrico empregando os parâmetros da condição ótima

Com o intuito de se produzir OS para a sua aplicação na indústria de alimentos e a utilização de conceitos de química verde e sustentabilidade, decidiu-se realizar a etapa de pré-tratamento com solução de ácido cítrico, utilizando os parâmetros obtidos para a condição ótima do modelo (seção 5.2), em detrimento da solução de ácido sulfúrico diluído para compara a EF-OS (g OS/100g BCF seca) das duas condições.

A escolha do ácido cítrico se deve aos fatos de ser um ácido amplamente utilizado na indústria alimentícia por ser considerado um composto seguro pela Administração Federal de Alimentos e Medicamentos (FDA, sigla em inglês) (Mores *et al.*, 2021), ser utilizado como antioxidante e acidulante (Behera; Mishra; Mohapatra, 2021), além disso o ácido cítrico é produzido em escala industrial majoritariamente através de rotas fermentativas o que se caracteriza como sendo ambientalmente menos nocivo (Mores *et al.*, 2021) e também por ser um ácido orgânico que já foi utilizado por outros pesquisadores para o pré-tratamento de biomassa lignocelulósica (Liu *et al.*, 2022), inclusive para a produção de OS (Amaro Bittencourt *et al.*, 2024; Valladares-Diestra *et al.*, 2022).

Primeiramente, de forma a manter a concentração de ácido cítrico equivalente a concentração de ácido sulfúrico utilizado na condição ótima, a concentração do ácido sulfúrico

na condição ótima foi convertida de 1,43% (v/v) em 2,58% g de ácido por mL de solução de acordo com a Equação (1). Desta forma a BCF-LE foi submetida ao pré-tratamento com solução de ácido cítrico diluído sob as condições: relação S/L de 1/40 (g/mL), tempo de reação de 20 min, concentração de ácido cítrico de 2,58% (g/mL), a 169 °C.

O pré-tratamento com ácido cítrico resultou em uma EF-OS de 25,33 ± 2,08 g OS/100g BCF seca, este resultado foi maior do que os resultados apresentado na literatura para a produção de OS a partir de diferentes biomassas lignocelulósicas com o uso do pré-tratamento com ácido cítrico diluído.

Foram realizados testes estatísticos de teste de normalidade (Shapiro-Wilk), teste de homogeneidade de variâncias (teste de Levene) e teste t de Student para amostras independentes para comparar os resultados entre os dois ácidos utilizados. Comparando os resultados obtidos pelo pré-tratamento da BCF com ácido sulfúrico e ácido cítrico diluídos, ambos na condição ótima, houve diferença estatística ($p < 0,05$, teste t de Student). Assim, podemos concluir que o ácido cítrico apresentou uma melhor EF-OS em relação ao pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído.

O ácido cítrico foi utilizado para a produção de XOS a partir da casca do cacau através do pré-tratamento hidrotérmico com solução de ácido cítrico diluído (Valladares-Diestra *et al.*, 2022). Os autores obtiveram a máxima produção de XOS em condições com temperaturas acima de 170 °C, sendo possível extrair 6,47 g de XOS por 100 g de biomassa, o que corrobora com a temperatura utilizada neste trabalho por ser próxima a 170 °C. Sob a condição ótima (temperatura de 120 °C, tempo de reação de 10 min e concentração de ácido cítrico de 2% g/mL), os autores obtiveram 5,19 g de XOS por 100 g de biomassa.

O maior tempo de reação e a maior concentração de ácido utilizados neste trabalho em relação a condição ótima do trabalho citado anteriormente, pode indicar que o pré-tratamento com ácido cítrico sofra uma maior influência da temperatura e do tempo de reação, fazendo com que maiores concentrações de OS sejam obtidas no hidrolisado quando se aumenta a temperatura e o tempo de reação.

Em um trabalho mais recente, Amaro Bittencourt *et al.* (2024) utilizaram pré-tratamento hidrotérmico com solução de ácido cítrico para a obtenção de XOS a partir da casca da soja. Sob a condição ótima (concentração de ácido de 3,56% g/g de solução, 46,1 min e 135,7 °C), os autores obtiveram uma extração de XOS de 4,78 de XOS por 100 g de casca de soja.

MOS também foram produzidos a partir da goma guar, através de um pré-tratamento com ácido cítrico (300 mM, 130 °C e 1 h) e uma subsequente hidrólise enzimática com β-mannanase (Xin; Yin; Ran, 2024). Os autores obtiveram um rendimento de MOS de 61,8 %

após os dos tratamentos da goma guar, além disso os autores avaliaram a capacidade de degradação das estruturas de galactomananas pelo pré-tratamento com ácido cítrico e observaram que o ácido cítrico apresentou uma alta capacidade de degradação dessas estruturas e também constataram que houve a produção de MOS durante a etapa de pré-tratamento.

Estes resultados demostram a capacidade do ácido cítrico em ser um catalizador no pré-tratamento de biomassas lignocelulósicas (Gomes *et al.*, 2020) e ser possível obter diferentes OS a partir das diferentes biomassas. Entretanto, em todos os estudos utilizando o ácido cítrico, os autores submeteram a fração sólida resultante do pré-tratamento a hidrólises enzimáticas para obterem um maior aproveitamento da biomassa.

Assim estudos futuros sobre a utilização do ácido cítrico em substituição aos ácidos inorgânicos no pré-tratamento de biomassas lignocelulósicas são necessários para a otimização dos parâmetros operacionais e avaliação técnico-econômica e do impacto ambiental, além de contribuírem para desenvolvimento de biorefinarias com uma visão da economia circular.

5.3. AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO E ESTRUTURA DOS OLIGOSSACARÍDEOS (OS) EXTRAÍDOS DA BORRA DE CAFÉ (BCF)

A proporção de manose, galactose e arabinose presentes nas estruturas dos OS foi determinada após a hidrólise total com H_2SO_4 4% m/v dos OS extraídos da BCF, para cada um dos ensaios do planejamento Box-Behnken 3^4 (Tabela 16).

Dentre os ensaios de pré-tratamento hidrotérmicos (5, 6, 10, 11, 23, 24), que foram realizados apenas com água, o ensaio 24 (165 °C, 1/40 g/mL, 70 min e 0% v/v ácido) foi o que apresentou a maior EF-OS, sendo capaz de extrair 12,06 g de OS por 100 g de BCF seca, enquanto o ensaio 11 (190 °C, 1/22 g/mL, 70 min e 0% v/v ácido) foi o que apresentou menor EF-OS (2,76 g de OS por 100 g de BCF seca).

Considerando os ensaios hidrotérmicos, (5, 6, 10, 11, 23, 24), eles foram capazes de extrair estruturas de OS contendo galactose como o principal monossacarídeo. Esse padrão também foi observado por Ballesteros; Teixeira; Mussatto (2017), onde os autores realizaram auto hidrólise a partir da BCF, encontrando em seus polissacarídeos liofilizados maiores porcentagens de galactose em mol, seguido de manose e arabinose em porcentagens menores.

A maior proporção de monossacarídeos de galactose nessas amostras nos permite concluir que os OS extraídos sob condições pré-tratamento hidrotérmico possuem estruturas de arabinogalactanas e galactomananas (Ballesteros; Teixeira; Mussatto, 2017). Isso ocorre porque as arabinogalactanas são mais suscetíveis à degradação térmica e à despolimerização da cadeia linear das galactanas (Matulová *et al.*, 2011; Simões *et al.*, 2014), portanto, quando a BCF é

pré-tratada com condições brandas, como as condições de pré-tratamento hidrotérmico, esse processo favorece a extração de estruturas poliméricas mais vulneráveis, como as arabinogalactanas.

Tabela 16 – Proporção em mols de manose, galactose e arabinose dos oligossacarídeos, após a hidrólise total com H_2SO_4 4% m/v, obtidos em cada ensaio do planejamento Box-Behnken 3^4.

Ensaio	Temperatura (°C)	S/L (g/mL)	Tempo (min)	H_2SO_4 (%v/v)	Proporção de açúcares monoméricos (Man:Gal:Ara) (2)
1	140 (-1)	1/4 (-1)	70 (0)	1 (0)	6:2:1
2	190 (1)	1/4 (-1)	70 (0)	1 (0)	3:1:2
3	140 (-1)	1/40 (1)	70 (0)	1 (0)	3:3:1
4	190 (1)	1/40 (1)	70 (0)	1 (0)	1:2:4
5	165 (0)	1/22 (0)	20 (-1)	0 (-1)	1:7:1
6	165 (0)	1/22 (0)	120 (1)	0 (-1)	9:35:1
7	165 (0)	1/22 (0)	20 (-1)	2 (1)	4:3:1
8	165 (0)	1/22 (0)	120 (1)	2 (1)	6:7:1
9 (CP)	165 (0)	1/22 (0)	70 (0)	1 (0)	8:3:1
10	140 (-1)	1/22 (0)	70 (0)	0 (-1)	1:9:1
11	190 (1)	1/22 (0)	70 (0)	0 (-1)	2:4:1
12	140 (-1)	1/22 (0)	70 (0)	2 (1)	6:3:1
13	190 (1)	1/22 (0)	70 (0)	2 (1)	3:14:1
14	165 (0)	1/4 (-1)	20 (-1)	1 (0)	10:3:1
15	165 (0)	1/40 (1)	20 (-1)	1 (0)	8:5:1
16	165 (0)	1/4 (-1)	120 (1)	1 (0)	27:6:1
17	165 (0)	1/40 (1)	120 (1)	1 (0)	1:0:1
18 (CP)	165 (0)	1/22 (0)	70 (0)	1 (0)	2:3:1
19	140 (-1)	1/22 (0)	20 (-1)	1 (0)	4:2:1
20	190 (1)	1/22 (0)	20 (-1)	1 (0)	8:2:1
21	140 (-1)	1/22 (0)	120 (1)	1 (0)	5:4:1
22	190 (1)	1/22 (0)	120 (1)	1 (0)	3:2:1
23	165 (0)	1/4 (-1)	70 (0)	0 (-1)	1:21:4
24	165 (0)	1/40 (1)	70 (0)	0 (-1)	5:29:1
25	165 (0)	1/4 (-1)	70 (0)	2 (1)	36:7:1
26	165 (0)	1/40 (1)	70 (0)	2 (1)	1:1:1
27 (CP)	165 (0)	1/22 (0)	70 (0)	1 (0)	10:2:1
28 (CP)	165 (0)	1/22 (0)	70 (0)	1 (0)	3:2:1
29(CP)	165 (0)	1/22 (0)	70 (0)	1 (0)	4:2:1

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Nota: (1) Os níveis codificados são apresentados entre parênteses.
(2) A proporção dos açúcares monoméricos está apresentada como a proporção em mols de manose, galactose e arabinose presentes no hidrolisado após a hidrólise total dos OS obtidos.
Sinais convencionais utilizados:
CP Ponto central.
Man Manose.
Gal Galactose.
Ara Arabinose.

E à medida que se aumenta a temperatura, a proporção de manose:galactose aumenta, conforme observado nos ensaios 5, 10 e 11, corroborando a suscetibilidade da arabinogalactana à degradação térmica.

Por outro lado, os ensaios de pré-tratamento com ácido diluído se mostraram mais eficientes para extrair OS com estruturas de galactomananas, pois a análise da proporção em mols dos açúcares monoméricos presentes nos OS (Tabela 16) apresenta proporções em mols de manose, mais altas. As proporções mais altas de manose:galactose foram encontradas nos ensaios 16, 20, 25 e 27, com os mols de manose sendo 4 a 5 vezes mais altos do que os mols de galactose.

Esses resultados indicam que o pré-tratamento com ácido diluído é mais eficaz para extrair os OS derivados de galactomananas da fração hemicelulósica da BCF. As estruturas de galactomananas são estruturas mais resistentes à degradação térmica e à despolimerização (Simões *et al.*, 2013), portanto, há a necessidade de condições de pré-tratamento mais severas do que a pré-tratamento hidrotérmico, que pode ser obtida pela hidrólise ácida diluída.

A composição de açúcares monoméricos dos OS obtida da condição ótima do modelo também foi determinada. Na condição ótima, a proporção de açúcares monoméricos foi de 1:1:1 para manose, galactose e arabinose, respectivamente. Essa proporção de açúcares pode indicar que a condição ideal foi capaz de extrair estruturas de galactomanana e arabinogalactana.

Assim, para estudar o grau de polimerização do OS extraído da BCF após o pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído, na condição ótima determinada pelo modelo obtido pelo projeto 3^4 Box-Behnken, foi analisado por MALDI-TOF-MS. Os íons observados nos espectros de MALDI-TOF-MS foram identificados como íons $[M+H]^+$. A Figura 19 apresenta o grau de polimerização dos OS obtido na condição ótima analisada pelo MALDI-TOF-MS. As intensidades dos picos obtidos através da análise de MALDI-TOF-MS dos OS obtidos com a condição ótima estão apresentadas na Tabela 17.

A manose e a galactose não podem ser distinguidas devido às suas características isoméricas, elas foram apresentadas como “Hex”, enquanto a arabinose foi apresentada como “Pen” na Figura 19. O principal OS extraído, maior intensidade, na condição ideal foi a estrutura contendo 2 hexoses, $[Hex_2+H]^+$ e 343,19 m/z, o que pode indicar a presença de manobiose devido à estrutura de polissacarídeo de galactomananas presente na BCF.

Outra estrutura que foi obtida em maiores concentrações através da condição ótima, foi a estrutura contendo 1 hexose e 3 pentoses, $[Hex_1Pen_3+H]^+$ e 577,49 m/z, esta estrutura por conter mais resíduos de pentoses pode indicar que na condição ótima é possível extrair

estruturas de arabinogalactanas, que são estruturas mais sensíveis a condições mais severas de pré-tratamento.

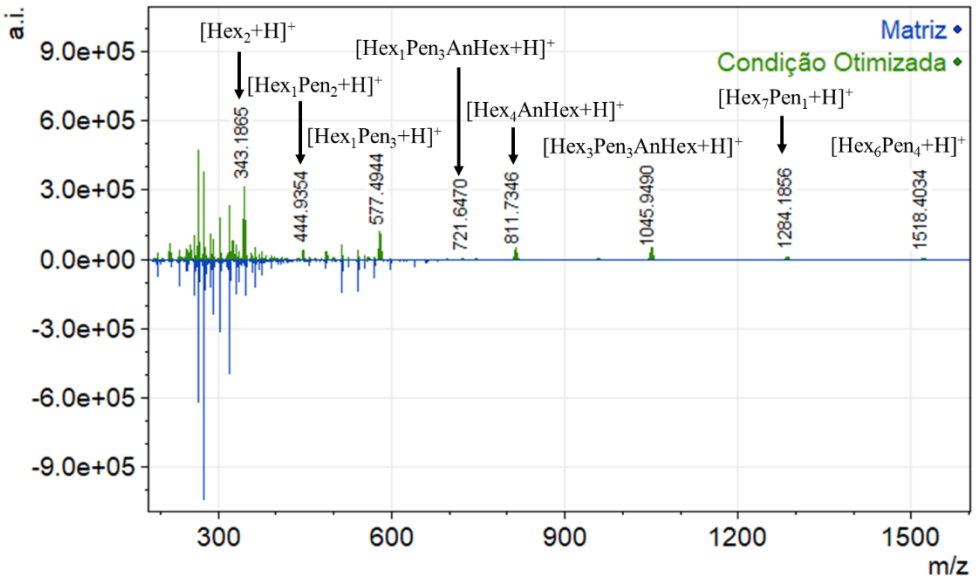


Figura 19 - Espectro da análise de MALDI-TOF-MS da matriz e dos OS obtidos com a condição ótima do modelo.

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Tabela 17 - Intensidades dos picos obtidos através da análise de MALDI-TOF-MS dos OS obtidos com a condição ótima do modelo.

Picos (m/z)	Intensidade
343,19	317.074
444,94	41.947
577,49	122.895
721,65	8.253
811,73	39.321
1045,95	27.913
1284,19	14.089
1518,40	8.028

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Além disso, a condição ótima foi capaz de produzir OS compostos por 1, 3, 4, 6 e 7 resíduos de hexose com pentose variando de 1 a 4, em concentrações menores de acordo com sua menor intensidade de sinal.

Estes resultados diferem dos resultados obtidos por Sarghini *et al.* (2021), em que os autores obtiveram porcentagem acima de 70% de trissacarídeos e 15 – 20% de tetrassacarídeos em seus extratados obtidos através do pré-tratamento da BCF com ácido clorídrico diluído. Isso pode estar relacionado com a diferença nos parâmetros operacionais utilizados pelos autores, que trabalharam com tempo de reação entre 30 e 60 s após os reatores atingirem os 200 °C. Por usarem a temperatura de reação mais alta do que as utilizadas neste trabalho era esperado que o grau de polimerização fosse menor, porém o tempo de reação foi significativamente menor

do que os adotados neste trabalho. Isso fez com que o efeito da temperatura fosse menor e consequentemente obtivessem OS com grau de polimerização maiores.

Entretanto, os resultados obtidos neste trabalho se assemelham aos resultados obtidos por Jin Cho *et al.* (2022), em que os autores fizeram inicialmente um pré-tratamento da BCF com ácido acético e posteriormente uma hidrólise enzimática. Após 4 ciclos de hidrólise enzimática na condição ótima, os principais OS extraídos pelos autores foram manotriose, manotetraose e manobiose respectivamente.

Além dos resíduos de hexoses e pentoses, os OS extraídos através do pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído, foram encontradas estruturas contendo anidro-hexoses [AnHex]. Estas estruturas também foram identificadas no trabalho de Simões *et al.* (2014), em que os autores estudaram a estabilidade das galactomananas e arabinogalactanas presentes na BCF. Segundo os autores, estas estruturas foram obtidas após o processo de torrefação de manotriose e manotetrose a 200 °C, sendo as de maiores concentrações correspondentes a estruturas de $[Hex_{1-4}AnHex+Na]^+$.

Esses resultados obtidos da análise de MALDI-TOF-MS (Figura 19), apresentando 28 resíduos de hexoses e anidro-hexoses, e 16 resíduos de pentoses, confirmando a presença de OS extraídos das estruturas de galactomananas e arabinogalactanas.

5.4. ANÁLISE DO CICLO DE VIDA (ACV) DA PRODUÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS (OS)

Para a construção das análises do ciclo de vida (ACV) da produção dos OS foram realizadas simulações do procedimento realizado em laboratório para a obtenção dos OS em escala industrial, considerando o processamento de 1 tonelada de borra úmida por dia, e fazendo o aumento de escala para as matérias-primas utilizadas e OS produzidos. As simulações foram realizadas utilizando o programa *Aspen Plus*, com o qual foram criados fluxogramas dos processos (Figura 7 e Figura 8) e a partir destes fluxogramas, das condições de operação, dos dados das matérias-primas (água, ácido sulfúrico, carbonato de cálcio e BCF) e dos dados de produção de OS, foi possível construir inventários contendo dados relevantes sobre consumo energético, emissões de CO_2, consumo das matérias-primas e geração de resíduos de cada etapa de produção.

Os inventários das simulações em escala industrial referentes aos 29 ensaios realizados de acordo com o planejamento Box-Behnken 3^4 (Tabela 13) são apresentados no **Apêndice B**. Estes inventários foram utilizados para realizar as ACV utilizando o programa *SimaPro 9.5.0.0 Multiuser*. As categorias de impacto foram avaliadas globalmente para cada etapa do processo,

levando em conta as condições operacionais dos 29 cenários (Tabela 13), utilizando como unidade funcional de 1 kg de OS produzida. Além disso, foram identificados os impactos potenciais mais relevantes, incluindo os mais significativos: Mudanças climáticas (por ser uma das categorias mais frequentemente avaliadas devido ao foco global na mitigação das emissões de gases de efeito estufa); Toxicidade humana (refletindo a crescente integração de preocupações sociais e ambientais nas análises de sustentabilidade), e Acidificação do solo (considerando o uso de pré-tratamento ácido no processo).

5.4.1. Impactos globais médios

Os impactos globais médios são avaliados com o intuito de identificar quais etapas do processo produtivo, como por exemplo o transporte, pré-tratamento, secagem, entre outros, possuem o maior impacto em cada uma das 18 categorias de impacto presentes no método de *ReCiPe Midpoint* 2016 com uma perspectiva hierárquica (*World ReCiPe H*). Desta forma, os impactos globais médios de cada uma das respectivas categorias de impacto são calculados fazendo-se a média dos valores de impacto dos 29 ensaios de acordo com a etapa do processo para a respectiva categoria de impacto. Posteriormente, as médias são normalizada de forma que a soma de cada etapa do processo represente uma fração do impacto total gerado em cada categoria de impacto, e esses resultados são utilizados para construir o gráfico da avaliação dos impactos globais médios.

Os resultados relativos aos impactos globais médios para cada etapa do processo estão resumidos na Figura 20. De forma geral, as etapas de *downstream* do processo foram as principais contribuintes para os impactos ambientais. De acordo com a Figura 20, o processo de produção é consideravelmente influenciado pela alocação dos impactos ambientais para as etapas de precipitação dos OS e recuperação de solventes. Esse fenômeno é consistente com os resultados apresentados para outros setores, como o de clarificação de sucos e recuperação de açúcar, em que as etapas de purificação e extração foram identificadas como os principais contribuintes para o impacto ambiental e o consumo de energia (Maravić *et al.*, 2015). Assim como para a purificação de proteínas derivadas do leite, os processos de purificação e limpeza baseados em membranas demonstraram ter o maior impacto ambiental devido ao seu alto consumo energético (Gésan-Guiziou *et al.*, 2019).

Além disso, o transporte apresentou impactos comparáveis aos das etapas de *downstream*, especialmente em categorias como eutrofização de água doce, ecotoxicidade em água doce e depleção de metais. E isto ocorre porque a combustão do diesel não apenas emite CO_2 e material particulado fino, mas também gera uma série de compostos tóxicos que podem diminuir a qualidade do ar e da água. As frações solúveis do diesel podem contaminar os corpos

d'água, causando danos significativos aos ecossistemas aquáticos, conforme relatado em vários estudos (Müller *et al.*, 2019).

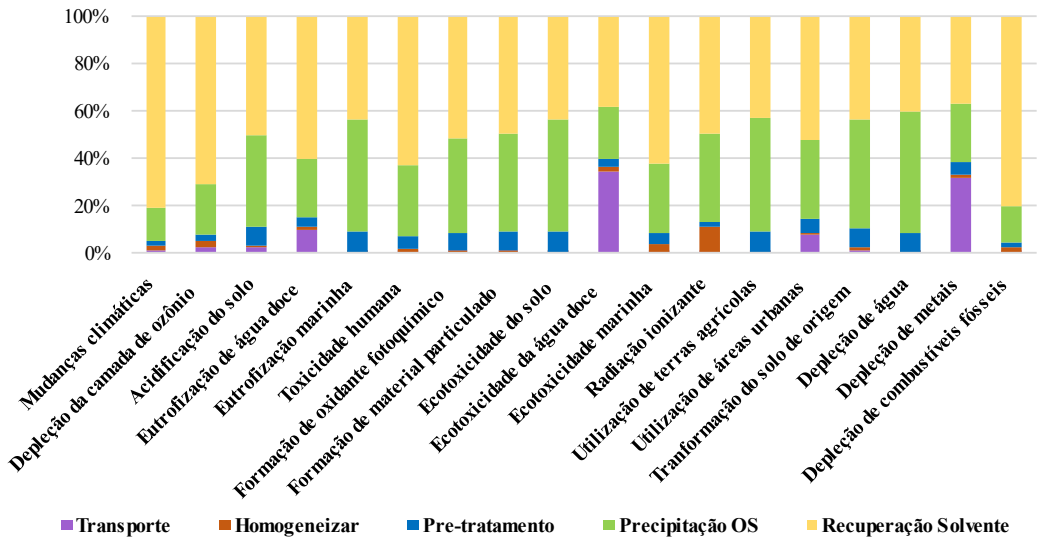


Figura 20 - Contribuição global para as categorias de impacto da produção de OS derivados da BCF.

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Os impactos associados ao transporte estão amplamente ligados ao uso de diesel para o transporte e coleta da BCF. Estudos anteriores destacaram os efeitos tóxicos das frações solúveis do diesel nos ecossistemas aquáticos (Müller *et al.*, 2019). Além disso, a contribuição para a depleção de metais pode ser atribuída à fase de produção do diesel, que envolve o uso de catalisadores metálicos essenciais para os processos de refino (Esmaeili, 2022).

5.4.2. Mudanças climáticas

As emissões de GEE, também conhecidas como gases do efeito estufa, têm sido um ponto focal de pesquisas (Reijnders, 2022), com diversos autores realizando análises de ACV para produtos derivados da BCF, frequentemente focando exclusivamente nesta categoria de impacto (Forcina *et al.*, 2023; Ingrao *et al.*, 2022).

A Tabela 18 ilustra o potencial de aquecimento global, expresso em kg de CO_2 equivalente por kg de OS, para as diferentes condições experimentais avaliadas. Em particular, os processos de *downstream*, especialmente a precipitação dos OS e a recuperação do solvente, apresentam o maior impacto ambiental. Esse resultado pode ser atribuído ao uso de solventes durante a precipitação. Quentier; Gerbino; Pénicaud (2020) demonstraram uma tendência semelhante, relatando que o uso de etanol na purificação dos OS aumenta significativamente os impactos ambientais devido aos grandes volumes necessários.

Além disso, a operação das colunas de destilação para recuperação do etanol é uma etapa com um consumo intensivo de energia e acaba consumindo mais energia do que outras etapas do processo, o que aumenta ainda mais o impacto. Resultados comparáveis foram relatados por Barbosa *et al.* (2021), que observaram que o potencial de aquecimento global de celu-oligossacarídeos extraídas de palha de cana-de-açúcar foi maior em etapas com alta demanda energética, particularmente durante a extração enzimática para hidrólise.

No entanto, os resultados desses autores diferem dos resultados apresentados neste trabalho, pois o método de purificação utilizado baseava-se em filtração direta, evitando o uso de solventes. É importante destacar que os ensaios 14, 16 e 25 apresentam os menores impactos sobre o aquecimento global, compartilhando características semelhantes de temperatura de hidrólise (165°C) e relação S/L (1:4).

Entre os ensaios hidrotérmicos (5, 6, 10, 11, 23 e 24), realizados somente utilizando a água como catalisador do pré-tratamento, o ensaio 23 se destaca por ser o que possui menor impacto sobre os GEE (31,12 kg de $CO_{2\ eq.}$ por kg de OS) devido principalmente aos menores volumes de etanol necessários na etapa de precipitação dos OS e consequentemente menores gastos energéticos na etapa de recuperação do solvente. Por outro lado, o ensaio 10, é o de maior impacto sobre os GEE (4306,01 kg de $CO_{2\ eq.}$ por kg de OS), apesar de apresentar uma EF-OS próxima da obtida no ensaio 23, entretanto a relação S/L é 10 vezes maior, fazendo com que o hidrolisado tenha uma concentração menor de OS e assim sendo necessário utilizar mais etanol para recuperar todo o OS extraído da BCF.

Porém, quando comparamos o resultado do impacto sobre os GEE do ensaio 23 com os resultados encontrados na literatura para a produção de XOS a partir do bagaço de cana-de-açúcar (Longati *et al.*, 2025), os autores obtiveram um potencial de aquecimento global de 6,31 kg de $CO_{2\ eq.}$ por kg de XOS. E isso ocorre devido a processo de purificação ser diferente, pois os autores obtiveram os OS através da destilação da corrente rica em XOS e desta forma não havendo a necessidade de utilizar e recuperar o etanol, que se demonstrou ser um processo com alta demanda energética.

Estudos anteriores investigaram a extração de OS utilizando diferentes matérias-primas e técnicas. Por exemplo, Gonzalez-Garcia; Gullón; Moreira (2018) relataram um impacto climático próximo a 50 kg de CO_2 eq por kg de OS a partir de resíduos da polpa de beterraba utilizando hidrólise enzimática. Por sua vez, Barbosa *et al.* (2021) relataram valores de impacto de aquecimento global variando de 20 a 30 kg de CO_2 eq por kg de OS, obtidos por meio de hidrólise enzimática aplicada à palha de cana-de-açúcar. Esses resultados estão dentro de uma faixa comparável aos determinados neste estudo, no qual o impacto de aquecimento global

variou de 17,48 a 189,65 kg de CO_2 eq por kg de OS, com exceção dos ensaios 3, 4, 7 e 10 que apresentaram o impacto de aquecimento global entre a faixa de 294,90 a 4304,48 kg de CO_2 eq por kg de OS.

Essa ampla variação destaca a influência significativa das condições do processo de pré-tratamento nos impactos relacionados às mudanças climáticas. Nesse sentido, embora a hidrólise enzimática seja frequentemente considerada mais ambientalmente amigável devido às suas condições operacionais mais brandas, este estudo sugere que o pré-tratamento com ácido diluído pode ser uma alternativa viável quando as mudanças climáticas são consideradas um fator relevante, principalmente para os ensaios 14 e 25 que apresentaram valores de impacto de aquecimento global abaixo dos 20 kg de CO_2 eq por kg de OS obtidos por ensaios enzimáticos.

Tabela 18 - Emissões de GEE (kg de CO2 eq. por kg de produto) para a produção de OS.

Ensaio	Emissões de GEE (kg de CO_2 eq.)					
	Transporte	Homogen.	Pré-tratamento	Precipit. OS	Recup. Solvente	Total
1	1,52	4,66	0,12	327,22	12,79	346,32
2	1,52	4,09	16,26	2,89	4,30	29,06
3	1,52	7,76	7,90	15,45	14,85	47,48
4	1,52	13,24	13,38	39,12	229,16	296,42
5	1,52	8,92	8,24	42,11	128,85	189,65
6	1,52	7,88	3,87	21,68	64,35	99,31
7	1,52	3,30	2,05	21,44	383,22	411,53
8	1,52	3,45	2,14	24,56	26,85	58,52
9	1,52	3,47	1,94	19,52	24,16	50,61
10	1,52	31,93	15,71	87,92	4168,92	4306,01
11	1,52	5,78	2,90	15,60	47,10	72,91
12	1,52	2,82	1,75	9,45	16,45	31,99
13	1,52	2,43	1,52	16,62	17,18	39,27
14	1,52	5,26	0,54	5,49	5,77	18,59
15	1,52	3,00	3,04	35,45	37,96	80,97
16	1,52	7,24	0,74	6,67	5,70	21,87
17	1,52	2,74	2,78	35,79	38,32	81,15
18	1,52	3,48	1,95	23,44	24,45	54,84
19	1,52	6,11	3,40	37,70	39,58	88,31
20	1,52	3,62	2,06	24,04	25,07	56,32
21	1,52	3,02	1,68	19,95	20,79	46,97
22	1,52	3,20	1,82	23,16	24,03	53,73
23	1,52	9,50	0,85	4,94	14,31	31,12
24	1,52	4,97	4,43	24,72	73,71	109,35
25	1,52	4,58	0,53	5,87	5,00	17,49
26	1,52	2,40	2,70	31,39	33,59	71,59
27	1,52	3,11	1,75	20,62	21,50	48,50
28	1,52	2,64	1,47	17,92	18,65	42,20
29	1,52	3,16	1,76	21,40	22,20	50,05

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Diferentes estudos avaliaram estratégias para a disposição e valorização da BCF e avaliaram suas emissões de GEE. Por exemplo, Forcina *et al.* (2023) analisaram diferentes abordagens e relataram emissões de 611,873 kg de CO_2 eq/tonelada (t) de BCF para disposição em aterros, 504,470 kg de CO_2 eq/t de BCF para compostagem, 604,489 kg de CO_2 eq/t de BCF para produção de biodiesel e 145,479 kg de CO_2 eq/t de BCF para produção de tijolos. Da mesma forma, Rajabi Hamedani *et al.* (2022) reportaram emissões de GEE de 30,7 kg de CO_2 eq/t de BCF para compostagem e 524,7 kg de CO_2 eq/t de BCF para disposição em aterros.

De modo a oferecer uma perspectiva comparativa, calculou-se as emissões de GEE associadas à unidade funcional de uma tonelada de BCF para a produção de OS obtidas neste estudo. As emissões variaram de 811,41 a 36.213,50 kg CO_2 eq/tonelada de BCF para os ensaios avaliados.

Esses resultados destacam o potencial da extração de OS como uma estratégia de valorização da BCF, alcançando emissões de GEE comparáveis a disposição em aterros, que a destinação mais comum atualmente. Além disso, essa abordagem contribui para a valorização de resíduos por meio do reaproveitamento da BCF e se enquadra dentro dos requisitos de um processo de EC.

5.4.3. Toxicidade humana

De acordo com os resultados obtidos para o impacto na toxicidade humana (Tabela 19), o impacto do transporte na toxicidade humana parece ser negligenciável em comparação com o impacto direto das etapas de processamento. Assim como as tendências observadas para os impactos relacionados às mudanças climáticas, as etapas de precipitação dos OS e recuperação do solvente apresentam valores de maiores impactos dentre os 29 ensaios avaliados em termos de toxicidade humana.

Nos cenários que envolvem processos de pré-tratamento com ácido diluído, o maior impacto ambiental ocorre durante a etapa de precipitação dos OS. Isso se deve à geração de material residual rico em sais, como sulfatos e carbonatos, resultante da neutralização do hidrolisado.

Por outro lado, os processos hidrotérmicos apresentam seu maior impacto durante a etapa de recuperação, principalmente devido ao aumento no consumo de energia, que contribui significativamente para a toxicidade humana. Essa tendência já foi relatada em estudos sobre OS extraídas de palha de cana-de-açúcar, nos quais o consumo de energia foi identificado como um dos principais fatores que amplificam os impactos de toxicidade humana não cancerígena (Barbosa *et al.*, 2021).

E assim como o que foi observado para o caso do impacto nas mudanças climáticas (seção 5.4.2) o ensaio 23 foi o de menor impacto sobre a toxicidade humana (11,72 kg 1,4-DB eq por kg de OS), dentre os ensaios hidrotérmicos, enquanto o ensaio 10 foi o de maior impacto sobre a toxicidade humana dentre todos os ensaios (644,88 kg 1,4-DB eq por kg de OS).

Tabela 19 - Toxicidade humana por kg de produto, para a produção de OS a partir da BCF.

Ensaio	Toxicidade humana (kg 1,4-DB eq.)					
	Transporte	Homogen.	Pré-tratamento	Precipit. OS	Recup. Solvente	Total
1	0,00	0,66	0,10	48,77	6,92	56,45
2	0,00	0,58	14,41	1,45	2,33	18,77
3	0,00	1,09	4,19	10,35	7,63	23,27
4	0,00	1,87	11,79	19,25	123,71	156,63
5	0,00	1,26	3,82	27,10	60,96	93,14
6	0,00	1,11	3,43	14,10	30,45	49,09
7	0,00	0,47	2,54	17,06	12,69	32,76
8	0,00	0,49	1,88	19,54	14,52	36,43
9	0,00	0,49	2,30	17,99	13,07	33,85
10	0,00	4,51	13,93	57,17	569,27	644,88
11	0,00	0,82	2,08	10,08	22,28	35,26
12	0,00	0,40	1,53	7,05	8,91	17,89
13	0,00	0,34	2,56	13,30	9,29	25,49
14	0,00	0,74	0,48	4,38	3,12	8,73
15	0,00	0,42	4,16	28,27	20,53	53,38
16	0,00	1,02	0,65	5,42	3,08	10,18
17	0,00	0,39	4,16	28,55	20,72	53,82
18	0,00	0,49	1,71	18,74	13,22	34,17
19	0,00	0,86	2,29	30,12	21,41	54,68
20	0,00	0,51	1,82	19,22	13,56	35,11
21	0,00	0,43	2,29	15,95	11,24	29,91
22	0,00	0,45	1,60	18,53	12,99	33,58
23	0,00	1,34	0,37	3,23	6,77	11,72
24	0,00	0,70	3,93	16,05	34,87	55,56
25	0,00	0,65	0,47	4,77	2,70	8,59
26	0,00	0,34	2,37	25,03	18,16	45,91
27	0,00	0,44	2,31	16,49	11,63	30,86
28	0,00	0,37	1,30	14,33	10,08	26,09
29	0,00	0,45	2,29	17,12	12,01	31,86

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Os valores de toxicidade humana neste trabalho ficaram entre 8 e 645 kg 1,4-DB eq por kg de OS, estando dentro da faixa esperada quando comparados à produção de fibras alimentares solúveis a partir de cascas de laranja, que apresenta valores entre 9 e 10 kg 1,4-DB eq por kg de fibra (Khanpit; Tajane; Mandavgane, 2023). Esses resultados são significativamente inferiores aos relatados para os OS da palha de cana-de-açúcar, que

atingiram um valor global de toxicidade humana ligeiramente superior a 300 kg 1,4-DB eq por kg de OS (Barbosa *et al.*, 2021).

5.4.4. Acidificação do solo

A produção de OS a partir da BCF por meio do pré-tratamento com ácido diluído, envolve processos em que há a geração de um resíduo com pH ácido após a etapa de pré-tratamento, que deve ser neutralizado antes de ser enviado para o tratamento dos efluentes industriais. Desta forma, torna-se o potencial de acidificação do solo um parâmetro a ser considerado. A acidificação pode levar à redução da diversidade de plantas ao interromper a regulação de nutrientes e os processos de nitrificação. Isso, por sua vez, resulta no amarelecimento dos tecidos das plantas e na redução do crescimento das raízes (Azevedo *et al.*, 2013).

A partir dos resultados obtidos referentes à acidificação do solo (Tabela 20), é possível destacar dois resultados principais. Nos ensaios em que foram realizados pré-tratamento hidrotérmicos (sem adição de ácido), o maior impacto está associado à recuperação de solventes e durante esta etapa, o consumo energético é o fator de maior influência. O ensaio 23 foi o que apresentou menores impactos sobre a acidificação do solo (0,79 kg de $SO_{2\ eq.}$ por kg de OS), dentre os ensaios hidrotérmicos, seguindo o padrão observado para os impactos sobre as mudanças climáticas e toxicidade humana.

No entanto, nos cenários em que foram realizados pré-tratamentos com ácido diluído, a etapa de precipitação – onde ocorre a neutralização do ácido – apresenta o maior impacto. Apesar da expectativa de que a ausência de ácido reduziria a acidificação terrestre, algumas das condições de pré-tratamento com ácido diluído apresentaram o menor impacto geral de acidificação. Esses resultados são consistentes com tendências semelhantes observadas para emissões que contribuem para o aquecimento global, em que a temperatura e a relação sólido-líquido parecem ser mais influentes do que a concentração de ácido.

Em relação aos resultados obtidos através da ACV para a produção de OS a partir da borra de café por pré-tratamento hidrotérmico e com ácido diluído, pode-se identificar que os ensaios 23 e 25 foram os ensaios de menores impactos para todas as 3 categorias avaliadas neste estudo, para pré-tratamento hidrotérmico e com ácido diluído, respectivamente. Assim, com o intuito de utilizar os OS extraídos da BCF para a suplementação de uma matriz hidrogel de pectina, decidiu-se utilizar o ensaio 23 para a sequência dos estudos.

Tabela 20 - Acidificação do solo por kg de produto, para a produção de OS a partir da BCF.

Ensaio	Acidificação do solo (kg de SO_2 eq.)					
	Transporte	**Homogen.**	**Pré-tratamento**	**Precipit. OS**	**Recup. Solvente**	**Total**
1	0,07	0,02	0,01	2,11	0,43	2,65
2	0,07	0,01	1,00	0,10	0,15	1,33
3	0,07	0,03	0,51	0,71	0,47	1,78
4	0,07	0,05	0,86	1,26	7,72	9,97
5	0,07	0,03	0,51	1,84	3,66	6,11
6	0,07	0,03	0,24	0,96	1,83	3,13
7	0,07	0,01	0,14	1,18	0,79	2,20
8	0,07	0,01	0,14	1,36	0,91	2,49
9	0,07	0,01	0,12	1,25	0,82	2,28
10	0,07	0,12	0,96	3,89	12,80	17,84
11	0,07	0,02	0,18	0,69	1,34	2,30
12	0,07	0,01	0,12	0,49	0,56	1,24
13	0,07	0,01	0,10	0,92	0,58	1,69
14	0,07	0,02	0,03	0,30	0,20	0,63
15	0,07	0,01	0,19	1,96	1,28	3,52
16	0,07	0,03	0,05	0,38	0,19	0,72
17	0,07	0,01	0,18	1,98	1,29	3,54
18	0,07	0,01	0,12	1,30	0,83	2,34
19	0,07	0,02	0,22	2,09	1,34	3,74
20	0,07	0,01	0,13	1,33	0,85	2,40
21	0,07	0,01	0,11	1,11	0,70	2,00
22	0,07	0,01	0,12	1,29	0,81	2,30
23	0,07	0,03	0,05	0,22	0,41	0,79
24	0,07	0,02	0,27	1,09	2,09	3,55
25	0,07	0,02	0,03	0,33	0,17	0,63
26	0,07	0,01	0,18	1,74	1,13	3,13
27	0,07	0,01	0,11	1,14	0,73	2,07
28	0,07	0,01	0,09	0,99	0,63	1,80
29	0,07	0,01	0,11	1,19	0,75	2,14

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Além disso, outro fator que pode ser observado é que o ensaio 23 apresentou menores impactos ambientais do que o ensaio 15, que apresenta parâmetros operacionais e EF-OS semelhantes ao ensaio da condição otimizada pelo modelo. Isso indica que o ensaio 23 apresenta menores impactos em relação ao ensaio da condição ótima para as três categorias de impacto avaliadas neste estudo (emissões de GEE, toxicidade humana e acidificação do solo). Desta forma, como um dos objetivos do estudo era utilizar os OS em aplicações alimentícias, os OS obtidos a partir do ensaio 23 (OS-23) foram os utilizados nos procedimentos seguintes.

5.5. CARACTERIZAÇÃO DA MELHOR CONDIÇÃO DO PONTO DE VISTA AMBIENTAL

Os OS-23, melhor condição da ACV dentre os ensaios hidrotérmicos, foram caracterizados em termos do grau de polimerização (Figura 21), da quantificação dos carboidratos estruturais, lignina, umidade, proteína e teor de cinzas. As intensidades dos picos obtidos através da análise de MALDI-TOF-MS dos OS obtidos com a ensaio 23 estão apresentadas na Tabela 21.

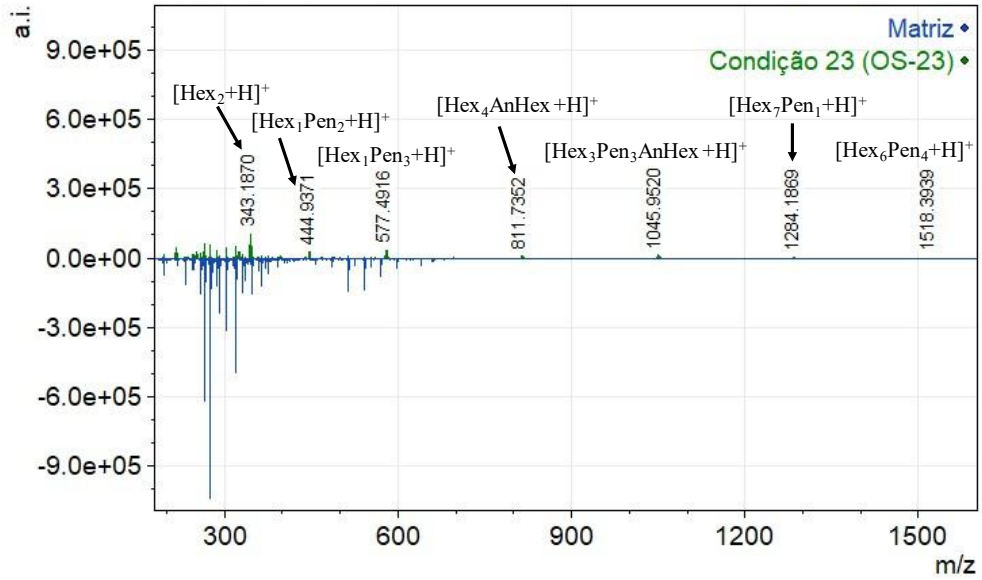


Figura 21 - Espectro da análise de MALDI-TOF-MS da matriz e dos OS obtidos com o ensaio 23 do planejamento Box-Behnken 3^4.

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Tabela 21 - Intensidades dos picos obtidos através da análise de MALDI-TOF-MS dos OS obtidos com a ensaio 23.

Picos (m/z)	Intensidade
343,19	108.010
444,94	28.971
577,49	36.262
811,73	9.283
1045,95	6.965
1284,19	4.035
1518,40	2.315

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Com relação a condição de extração dos OS feita somente com água que apresentou o menor impacto ambiental através da ACV, condição 23 do planejamento, as estruturas extraídas se assemelham as estruturas extraídas com a condição ótima do modelo, exceto a estrutura $[Hex_1Pen_3AnHex+H]^+$ (721,65 m/z) que não este presente na condição 23. Novamente o principal OS extraído, maior intensidade, nesta condição foi a estrutura contendo 2 hexoses,

$[Hex_2+H]^+$ e 343,19 m/z, o que indica a presença de manobiose proveniente da estrutura de galactomananas presente na BCF.

Entretanto, a condição 23 apresentou menores concentrações dos OS extraídos em relação a condição ótima, o que pode ser observado pela menor intensidade dos picos presentes no Espectro da análise de MALDI-TOF-MS (Figura 21, Tabela 17 e Tabela 21). Este resultado está de acordo com a EF-OS determinada no planejamento (Tabela 13), ou seja, o pré-tratamento com ácido diluído apresenta uma melhor EF-OS e assim, buscar ácidos que possam ser utilizados na indústria de alimentos, como o ácido cítrico, é de grande potencial para trabalhos futuros.

Além disso, as estruturas que apresentaram maiores reduções em relação a condição ótima foram $[Hex_4AnHex+H]^+$ (811,73 m/z) e $[Hex_3Pen_3AnHex+H]^+$ (1045,95 m/z), que apresentaram intensidades de picos 4,24 e 4,01 vezes menor, respectivamente. Enquanto a estrutura que apresentou a menor redução foi a $[Hex_1Pen_2+H]^+$ (444,94 m/z), que apresentou intensidade de picos 1,45 vezes menor.

No estudo desenvolvido por Ballesteros; Teixeira; Mussatto (2017), os autores obtiveram maiores rendimentos de polissacarídeos da BCF por auto-hidrólise sob os parâmetros operacionais: 180 °C, 15 ml / g de BCF e 30 minutos; sendo possível obter um rendimento de 8,95 g de polissacarídeos liofilizados por 100 g de BCF. Além disso, sob diferentes condições de extração, os OS obtidos apresentam diferentes proporções de manose, galactose e arabinose.

Em outro estudo, os autores extraíram MOS da BCF por pré-tratamento hidrotérmico com temperaturas variando entre 170 – 220 °C, tempo de reação entre 10 – 60 min e relação S/L de 1 g de BCF:7 mL de água destilada (Pérez-Burillo *et al.*, 2019). Sob a condição com parâmetros: 170 °C, 60 min e relação S/L de 1:7, condição que mais se assemelha a condição 23 deste trabalho, os autores obtiveram maiores concentrações de manopentose (2,60±0,03 mg/g de BCF), seguida de manobiose (2,43±0,03 mg/g de BCF). O que difere um pouco dos resultados obtidos neste trabalho que apresentaram maiores concentrações de manobiose.

Para ter uma maior compreensão do material obtido na condição 23 do planejamento, a composição química dos OS-23 também foi avaliada e os resultados são apresentados na Tabela 22 em termos de peso seco.

Pode-se observar na Tabela 22 que a OS-23 é composta principalmente de açúcares (86,63 ± 7,03 g/100g de OS-23 seco) polimerizados em oligossacarídeos. Quando comparado com o estudo desenvolvido por Ballesteros *et al.* (2015), o teor de açúcar total extraído da BCF é mais de duas vezes maior. Em outro estudo, Ballesteros; Teixeira; Mussatto (2017) extraíram polissacarídeos da BCF, e a maior quantidade de açúcares extraída foi de 34,92 g/100g de

material liofilizado, que também é mais de 2 vezes menor do que os valores obtidos neste estudo. No estudo de Simões *et al.* (2013), os autores extraíram as estruturas de polissacarídeos da BCF com água quente a 90 °C, e o material polimérico recuperado era composto de 44,3% de açúcares.

Tabela 22 - Composição química dos OS-23 em base seca.

Componentes	**Porcentagem mássica (g/100g OS-23 seco)**
Lignina total	3,51 ± 0,13
Linina solúvel	3,45 ± 0,12
Lignina insolúvel	0,06 ± 0,02
Monossacarídeos totais	86,63 ± 7,03
Manose	4,84 ± 0,45
Galactose	76,25 ± 5,86
Arabinose	2,93 ± 0,26
Xilose	1,03 ± 0,15
Glicose	1,58 ± 0,31
Umidade	9,42 ± 0,05
Proteína	3,72 ± 0,13
Cinzas	1,39 ± 0,01

Fonte: Elaborada pelo autor (2025)

Nota: Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão de triplicatas.

Os monossacarídeos presentes nos OS-23 são apresentados na Figura 37 (**Apêndice E**). Os OS-23 são compostos principalmente por galactose e manose, com menores concentrações de arabinose, glicose e xilose. A maior concentração de galactose presente nos OS-23, após o processo de hidrólise total (Sluiter *et al.*, 2008b), pode indicar que a maioria dos oligossacarídeos extraídos com a condição de pré-tratamento hidrotérmico é de polissacarídeos de arabinogalactanas e, em menores concentrações, OS das estruturas de polissacarídeos de galactomananas que está presente na BCF (Arya *et al.*, 2022; Ballesteros; Teixeira; Mussatto, 2017; Simões *et al.*, 2014).

A análise de minerais foi realizada usando um sistema de digestão por micro-ondas e as amostras digeridas por micro-ondas foram então analisadas por meio de espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado. A composição mineral dos OS-23 é apresentada na Tabela 23.

Os minerais mais abundantes presentes nos OS-23 são: cálcio, potássio e magnésio, com as respectivas concentrações de 2.904,43 ± 188,56 mg/kg de OS-23 secos, 2.330,72 ± 152,38 mg/kg de OS-23 secos e 2.092,85 ± 142,15 mg/kg de OS-23 secos. Esses resultados indicam que os minerais presentes no café torrado (Esquivel; Jiménez, 2012) são extraídos à medida que a bebida é preparada, mas ainda estão presentes na BCF e, consequentemente, nos OS extraídos da BCF.

Tabela 23 - Composição dos minerais presentes nos OS-23 extraídos da BCF.

Minerais	Concentração (mg/kg OS-23 seco)
Molibdênio	-
Zinco	12,43 ± 0,87
Cádmio	-
Chumbo	0,25 ± 0,11
Níquel	0,17 ± 0,04
Cobalto	0,30 ± 0,02
Boro	-
Manganês	43,13 ± 2,04
Ferro	44,81 ± 2,71
Cobre	0,31 ± 0,05
Alumínio	5,31 ± 0,53
Fósforo	75,88 ± 8,10
Magnésio	2092,85 ± 142,15
Sódio	50,88 ± 3,72
Potássio	2330,72 ± 152,38
Cálcio	2904,43 ± 188,56

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Nota: Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão de triplicatas.
Sinal convencional utilizado:
– Dado numérico igual a zero.

Nos estudos desenvolvidos por Ballesteros; Teixeira; Mussatto, (2014) e Mussatto *et al.* (2011a), em que os autores analisaram os minerais presentes na BCF. Os autores verificaram que os minerais predominantes foram o potássio, o magnésio e o fósforo. A presença de magnésio e potássio nos OS-23 está de acordo com os estudos de caracterização da BCF, e pode sugerir que esses minerais ainda disponíveis na BCF podem ser extraídos durante o pré-tratamento de pré-tratamento hidrotérmico. No entanto, a maior quantidade de fósforo nos estudos citados anteriormente em comparação com a concentração determinada neste estudo pode estar relacionada à diferença e à variabilidade das espécies de café, ao cultivo e ao preparo da bebida.

A presença desses minerais demonstra que os OS-23 poderiam ser utilizados na suplementação de produtos alimentícios, pois esses minerais são conhecidos como micronutrientes e fazem parte de uma variedade de processos vitais para a saúde humana (Ballesteros; Teixeira; Mussatto, 2014).

Os compostos fenólicos presentes nos OS-23 foram extraídos com uma solução de metanol:água (80:20 v/v), sob agitação (125 rpm) e temperatura controlada (35 °C) por 30 minutos. Os principais compostos fenólicos foram identificados por meio de um sistema de módulo de separação CLAE Waters Alliance e2695 com interface com um detector UV/Vis de matriz de fotodiodos 2998 (PDA 190-600 nm). E a identificação dos compostos fenólicos foi feita comparando o tempo de retenção dos picos e o espectro de absorção de UV com padrões

puros. O perfil dos compostos fenólicos extraídos do OS-23 está apresentado na Figura 36 (**Apêndice E**).

Com relação aos perfis dos compostos fenólicos, foram encontrados 4 picos com o respectivo tempo de retenção: 11,117 min, 13,678 min, 14,735 min e 15,565 min. Esses quatro picos apresentados no perfil do cromatograma (Figura 36 - **Apêndice E**) corresponderam ao tempo de retenção e ao espectro de absorção de UV do ácido clorogênico. De acordo com o estudo de Okur *et al.* (2021), o ácido clorogênico é o principal composto fenólico presente na BCF, o que corrobora a presença do ácido clorogênico nos OS-23.

No estudo de Solomakou *et al.* (2022), os pesquisadores avaliaram a recuperação de compostos fenólicos da BCF por meio de uma comparação de métodos bem estabelecidos com novos métodos de extração como técnicas mais ecológicas. Em seu estudo, eles obtiveram o melhor rendimento de extração usando a técnica de extração por micro-ondas, com uma proporção de líquido/sólido de 60 mL/g, um nível de potência de 600 W e uma concentração de solvente de 68% v/v de etanol, na qual conseguiram extrair os compostos fenólicos com um rendimento de 31,79 ± 0,25 mg GAE/g SCG.

O ácido clorogênico da BCF corresponde à classe de ésteres solúveis em água dos compostos fenólicos (Franca; Oliveira, 2022). A presença do ácido clorogênico nos OS-23 sugere que a pré-tratamento hidrotérmico da BCF também foi capaz de extrair esse composto fenólico da estrutura complexa da BCF.

Além disso, a presença de compostos fenólicos em produtos alimentícios e farmacêuticos está associada às atividades antioxidantes e nutracêuticas desses produtos (Franca; Oliveira, 2022). Embora as características de toxicidade dos compostos fenólicos para os microrganismos dependam de sua concentração, eles também são reconhecidos como compostos de alto valor agregado por apresentarem uma variedade de atividades, como antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana (Solomakou *et al.*, 2022).

Nesse contexto, a presença de compostos fenólicos nos OS-23 sugere que estes OS podem possuir capacidades antioxidantes. E poderiam ser incorporados ao portfólio de produção dos setores alimentício e farmacêutico (Singh *et al.*, 2023).

Além da caracterização dos OS obtidas da BCF, é necessário avaliar seu potencial prebiótico, analisando a bioacessibilidade, a biodisponibilidade no trato digestivo, o impacto na microbiota gastrointestinal e a possível aplicação na matriz alimentar.

Porque o interesse em compostos funcionais, especialmente prebióticos, levou ao desenvolvimento e à promoção de alimentos fortificados com compostos nutracêuticos (de Carvalho *et al.*, 2023). Essa demanda crescente criou um mercado lucrativo para produtos

suplementados com prebióticos, que deverá atingir um lucro de US$ 10,55 bilhões em 2025 (Gonçalves *et al.*, 2023).

5.6. AVALIAÇÃO DAS BIOATIVIDADES DOS OS-23

Nesta seção serão apresentados os resultados obtidos da avaliação das bioatividades presentes nos OS-23 obtidos da melhor condição de acordo com a ACV, contemplando análises da capacidade antioxidante (ABTS, DPPH e ORAC) e potencial prebiótico através da avaliação do crescimento de microrganismos das espécies *Bifidobacterium sp.*, *Lacticaseibacillus sp.* e *Lactobacillus* sp.

5.6.1. Avaliação da capacidade antioxidante

Diversos estudos demonstraram que os extratos obtidos da BCF, a partir de diferentes métodos e parâmetros, apresentam capacidade antioxidante e essa capacidade está relacionada à presença de compostos fenólicos, assim como o ácido clorogênico (Bhaturiwala; Modi, 2020; Moreira; Pintado; Saraiva, 2020; Okur *et al.*, 2021; Solomakou *et al.*, 2022). Existem diferentes métodos para avaliar a capacidade antioxidante de alimentos, extratos vegetais, frutas e subprodutos agroindustriais, apesar de cada método ser baseado em diferentes reações (Araújo-Rodrigues *et al.*, 2024).

Por isso, cada método reflete apenas a reatividade química relacionada às condições do ensaio escolhido, essencialmente o principal ensaio de capacidade antioxidante pode ser dividido em dois grandes grupos: ensaios de transferência de átomos de hidrogênio e ensaios de bases de reação de transferência de elétrons simples (Huang; Boxin; Prior, 2005). No primeiro grupo de ensaios, as medições de monitoramento estão relacionadas à cinética competitiva de uma reação redox, enquanto no segundo grupo de ensaios as medições de monitoramento estão relacionadas à capacidade de eliminação de radicais livres.

Nesse contexto, é importante avaliar a capacidade antioxidante dos OS-23 por meio de diferentes métodos, considerando que a BCF é rica em compostos fenólicos e nos OS-23 foi constatada a presença de ácido clorogênico. Neste estudo foi escolhido o método de extração com água conforme Ballesteros; Teixeira; Mussatto (2017) para obtenção do extrato antioxidante dos OS-23. Os valores de atividade antioxidante obtidos pelos ensaios ABTS, DPPH e ORAC são apresentados na Tabela 24.

Tabela 24 - Capacidade antioxidante dos OS-23 obtidos por pré-tratamento hidrotérmico da BCF.

Método	Resposta			
	Porcentagem de inibição (%)	µmol Trolox equivalente (TE)/ g de OS-23 seco	mg TE/mL	mg TE/g de OS-23 seco
ABTS	28,53 ± 0,69	47,49 ± 1,15	0,059 ± 0,001	11,89 ± 0,29
DPPH	7,92 ± 0,99	21,00 ± 2,44	0,026 ± 0,003	5,26 ± 0,61
ORAC	...	91,94 ± 2,86	0,115 ± 0,004	23,01 ± 0,72

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Sinal convencional utilizado:
... Dado numérico não disponível.

O ensaio ORAC sugere que o extrato dos OS-23 apresentou uma capacidade antioxidante de 91,94 ± 2,86 µmol TE/g de OS-23 seco. Os resultados do ensaio ABTS foram de aproximadamente 47,49 µmol TE/g de OS-23 seco. E os resultados do ensaio DPPH indicam uma atividade antioxidante de 21,00 ± 2,44 µmol TE/g de OS-23 seco. Enquanto os ensaios ORAC e ABTS quantificam a influência de compostos hidrofílicos e anfipáticos na atividade antioxidante, o ensaio DPPH mede o efeito do composto hidrofóbico na atividade antioxidante (Araújo-Rodrigues *et al.*, 2024).

Os resultados da capacidade antioxidante confirmam que a presença do ácido clorogênico nos OS-23 (Figura 36 - **Apêndice E**) influencia nas características e bioatividades dos OS, e consequentemente na sua futura aplicação. Além disso, Montemurro *et al.* (2024) estudaram diferentes metodologias de pré-tratamento físico e biológico com o objetivo de extrair os compostos presentes na complexa rede de fibras da BCF. Os autores conseguiram correlacionar o aumento da liberação dos compostos fenólicos, especialmente os ácidos clorogênicos incorporados às fibras solúveis, com o aumento da atividade antioxidante dos extratos.

Nos estudos realizados por Bravo *et al.* (2013), os pesquisadores avaliaram a influência de diferentes solventes na extração dos compostos fenólicos disponíveis nos SCGs. Os autores descobriram que a água e a solução de água:etanol (80:20) foram os melhores solventes de extração, pois seus extratos apresentaram os maiores valores para ABTS e DPPH, respectivamente. Além disso, eles também concluíram que a água é crucial para extrair os compostos antioxidantes, o que corrobora a decisão deste trabalho de extrair os compostos antioxidantes dos OS-23 com água para avaliar a capacidade antioxidante.

Em um estudo mais recente, Okur *et al.* (2021) avaliaram o aumento da recuperação dos compostos fenólicos e, consequentemente, da atividade antioxidante da BCF. Os pesquisadores

extraíram os compostos fenólicos utilizando uma solução de metanol:água (80:20 v/v) através de extração pelo método convencional com solvente, extração assistida por alta pressão hidrostática e extração assistida por ultrassom. Eles observaram que o método convencional apresentou a menor atividade de ensaio DPPH, enquanto a maior atividade antioxidante foi obtida pela extração assistida por ultrassom com 60% de amplitude por 15 minutos. Além disso, eles também conseguiram correlacionar o aumento da atividade antioxidante com o aumento dos compostos fenólicos totais.

Em outro estudo, os autores examinaram as diferenças entre a atividade antioxidante de extratos da BCF e dos grãos de café de diferentes intensidades de torrefação (de Cosío-Barrón; Hernández-Arriaga; Campos-Vega, 2020). Os pesquisadores observaram que as atividades antioxidantes (DPPH e ABTS) não apresentaram diferença estatística ao comparar os grãos de café com diferentes intensidades de torra, porém a BCF apresentou maior capacidade antioxidante quando comparados aos grãos de café.

Ballesteros; Teixeira; Mussatto (2017) avaliaram a capacidade antioxidante dos polissacarídeos extraídos da BCF por meio de pré-tratamento hidrotérmico com diferentes condições das variáveis operacionais. Eles também usaram um método de extração com água para obter o extrato de compostos fenólicos. O valor mais alto do ensaio ABTS (600,24 ± 12,20 µmol TE/g de material seco) foi obtido usando uma proporção líquido/sólido de 15 mL/g, a 160 °C por 10 min, enquanto o valor mais alto do ensaio DPPH (596,76 ± 3,24 µmol TE/g de material seco) foi obtido usando uma proporção líquido/sólido de 10 mL/g, a 180 °C por 10 min. As respostas de capacidade antioxidante obtidas pelos autores são aproximadamente 12,5 e 28,5 vezes maiores do que os valores obtidos neste trabalho para o ABTS e o DPPH, respectivamente.

Em outro estudo desenvolvido por Gu *et al.* (2020), os autores extraíram as galactomananas da BCF por pré-tratamento hidrotérmico e da BCF auto hidrolisada por hidrólise enzimática. Os autores obtiveram uma atividade de eliminação de radicais livres pelo método do DPPH de 58,8% e 76,4% a 1,2 g de material/L de extrato para a pré-tratamento hidrotérmico e a hidrólise enzimática, respectivamente. Os resultados também são mais altos quando comparados com os resultados obtidos para o DPPH neste trabalho, que observou apenas 7,92% ± 0,99 de atividade de eliminação de radicais livres a 50 g de material/L de extrato.

Os níveis mais baixos de capacidade antioxidante observados neste estudo, em comparação com os trabalhos previamente citados, podem ser atribuídos à extração convencional com solvente realizada antes da etapa de pré-tratamento. Esse processo envolveu

5 ciclos de água e 5 ciclos com isopropanol utilizando um aparelho Soxhlet, com o objetivo de remover compostos fenólicos da BCF. A remoção destes compostos foi necessária para evitar possíveis interferências no pré-tratamento e na reação subsequente. Estudos futuros deverão investigar a influência da extração dos compostos fenólicos antes da etapa de pré-tratamento, a fim de compreender melhor seu impacto na capacidade antioxidante dos OS.

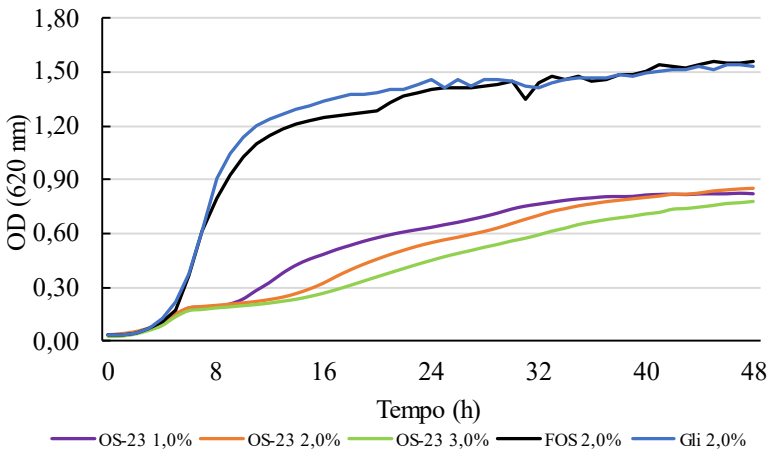
Além disso, a presença de compostos fenólicos na biomassa está diretamente relacionada a fatores como os procedimentos de cultivo, as características fitoquímicas, a localização geográfica e os métodos de preparação da bebida. Esses aspectos influenciam significativamente a extração e a análise dos diferentes antioxidantes, destacando a importância da caracterização detalhada da composição da biomassa e da fração resultante para o desenvolvimento do estudo.

5.6.2. Avaliação do potencial prebiótico

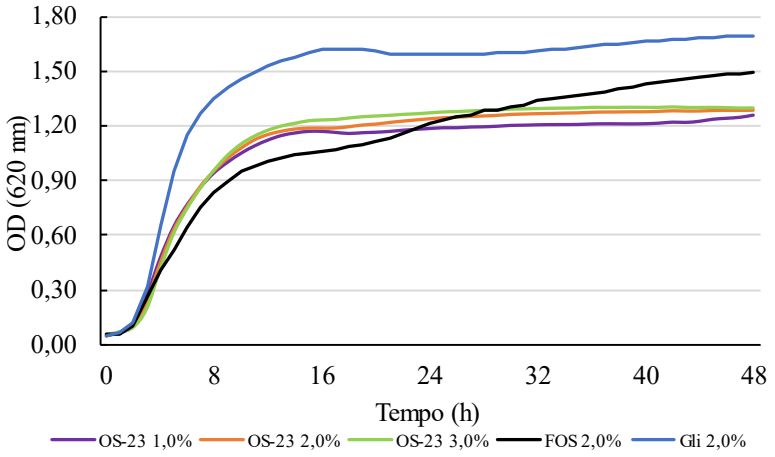
A atividade prebiótica dos OS-23 foi estudada em 6 cepas (*B. animalis* Bo, *B. longum* BG3, *B. lactis* Bb12, *L. casei* 01, *L. acidophilus* LA-5, *L. rhamnosus* Lcr35) em meio MRS basal sem glicose suplementado com 0,1% (m/v) de L-cisteína-HCl (MRS-cys), em concentrações de 0,25, 0,50, 1,00, 2,00 e 3,00% (m/v) dos OS-23.

Primeiramente, para determinar a melhor concentração dos OS-23 para o crescimento das bactérias probióticas, foram utilizadas 5 cepas: *L. casei* 01, *L. acidophilus* LA-5, *L. rhamnosus* Lcr35, *B. animalis* Bo e *B. longum* BG3. Os OS-23 nas concentrações de 1,00, 2,00 e 3,00% (m/v) foram dissolvidos no meio MRS-cys basal sem glicose, FOS e glicose a 2,00% (m/v) foram usados, respectivamente, como controle positivo e controle de crescimento de microrganismos. O crescimento dos microrganismos avaliados foi medido pela densidade óptica (OD) a 620 nm (Figura 22).

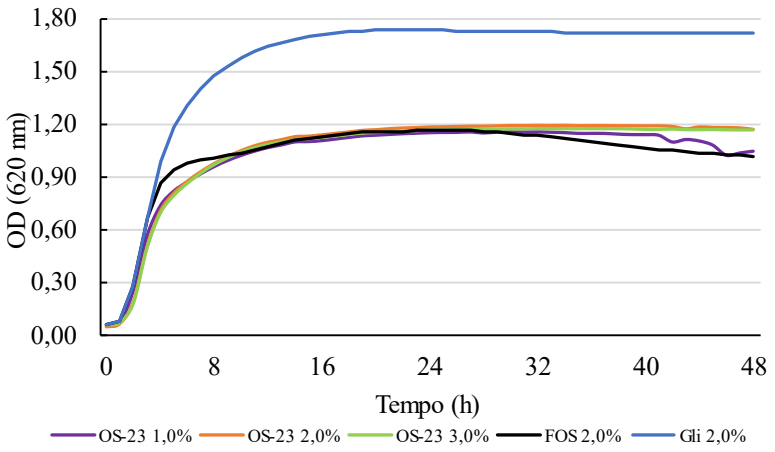
a)



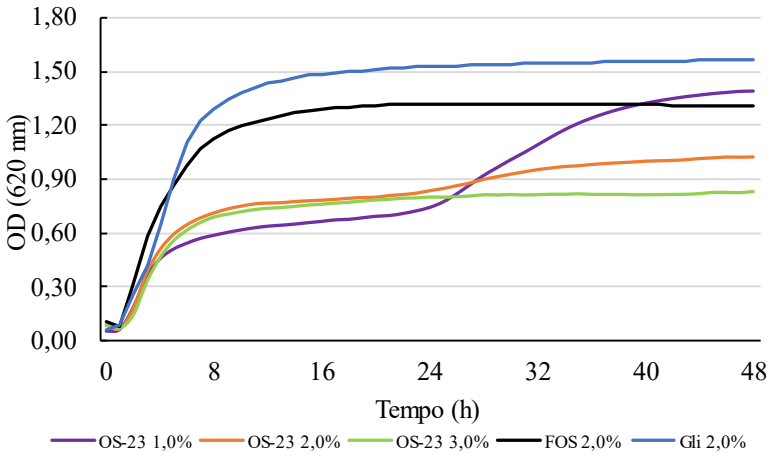
b)


1,80
1,50
1,20
0,90
0,60
0,30
0,00
OD (620 nm)
0
8
16
24
32
40
48
Tempo (h)
OS-23 1,0%
OS-23 2,0%
OS-23 3,0%
FOS 2,0%
Gli 2,0%

c)


1,80
1,50
1,20
0,90
0,60
0,30
0,00
OD (620 nm)
0
8
16
24
32
40
48
Tempo (h)
OS-23 1,0%
OS-23 2,0%
OS-23 3,0%
FOS 2,0%
Gli 2,0%

d)


1,80
1,50
1,20
0,90
0,60
0,30
0,00
OD (620 nm)
0
8
16
24
32
40
48
Tempo (h)
OS-23 1,0%
OS-23 2,0%
OS-23 3,0%
FOS 2,0%
Gli 2,0%

e)

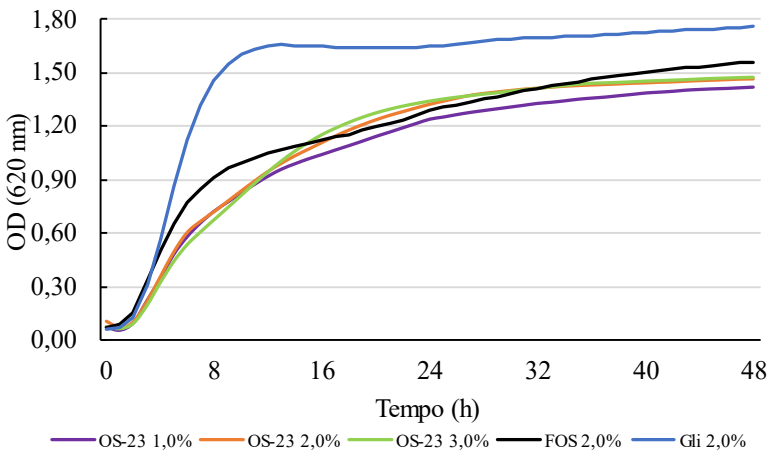


Figura 22 - Curvas de crescimento das cepas (a) *L. acidophilus* LA-5, (b) *L. rhamnosus* Lcr35, (c) *L. casei* 01, (d) *B. animalis* Bo, e (e) *B. longum* BG3, em meio MRS-cys suplementado com OS-23 1,0%, OS-23 2,0%, OS-23 3,0%, FOS 2,0% e glicose 2,0% (m/v).

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Os OS-23 promoveram o crescimento dos microrganismos probióticos, pois a DO (620 nm) aumentou exponencialmente durante 8 horas para os *L. rhamnosus* Lcr35 e *L. casei* 01, 40 horas para o *L. acidophilus* LA-5 e 24 horas para as *B. animalis* Bo e *B. longum* BG3. Além disso, em relação ao crescimento dos microrganismos de acordo com a fonte de carbono, glicose a 2% (m/v) foi a fonte de carbono que apresentou a maior densidade ótica para todos os microrganismos avaliados. Para o *L. acidophilus* LA-5 e o *L. rhamnosus* Lcr35, o FOS a 2% (m/v) promoveu uma taxa de crescimento maior quando comparado ao OS-23 independente da concentração. No entanto, para *L. casei* 01 e *B. longum* BG3, o OS-23 em todas as concentrações apresentou a máxima OD em valores comparáveis aos obtidos quando estas bactérias foram inoculadas em meio MRS com FOS a 2,0% (m/v), um suplemento prebiótico bem estabelecido.

Comparando a máxima OD obtida pelas diferentes concentrações do OS-23, não houve diferenças significativas entre os valores máximos de OD obtidos para o *L. acidophilus* LA-5, *L. rhamnosus* Lcr35, *L. casei* 01 e *B. longum* BG3. Padrão que não foi observado para a *B. animalis* Bo, cuja OD máxima foi obtida para o OS-23 a 1,0% (m/v).

A taxa de crescimento mais lenta observada pelos microrganismos *L. acidophilus* LA-5 e *B. animalis* Bo (respectivamente, Figura 22a e Figura 22d) pode sugerir que alguns compostos presentes no OS-23 estão afetando o crescimento dos microrganismos por exercerem estresse sobre esses microrganismos, afetando assim sua atividade metabólica. Como foi observado na Figura 36 (**Apêndice E**), o OS-23 apresenta ácido clorogênico na estrutura.

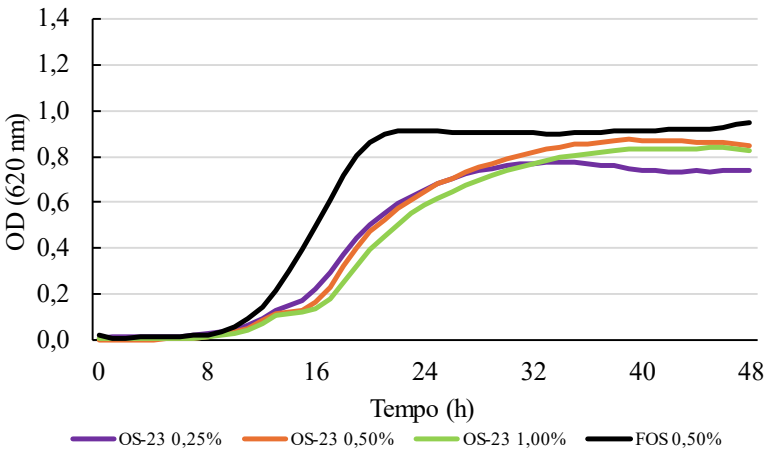
Mesmo apresentando uma baixa porcentagem de inibição (Tabela 24), o composto ainda poderia estar impactando a atividade metabólica dos microrganismos, resultando em uma

redução da taxa de crescimento. Diante disso, optou-se por investigar a taxa de crescimento desses microrganismos em uma concentração mais reduzida de OS-23.

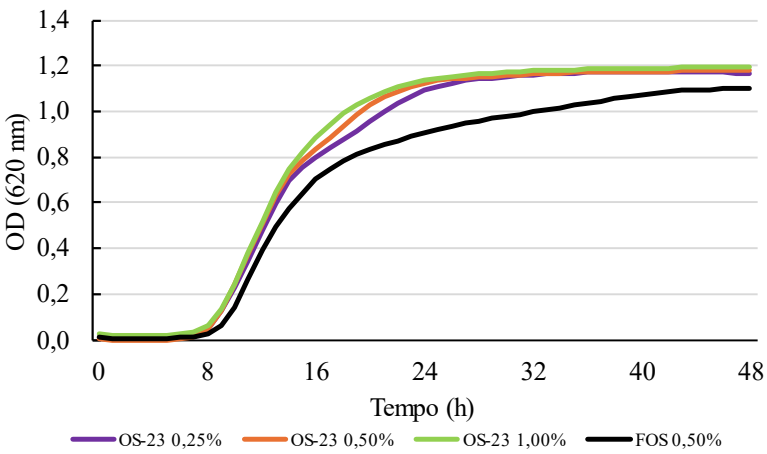
O efeito inibitório dos compostos fenólicos presentes no extrato líquido resultante do pré-tratamento hidrotérmico da BCF sobre determinados gêneros de bactérias presentes na MIH foi relatado por Pérez-Burillo *et al.* (2019). Segundo os autores, a presença de polifenóis nos extratos apresentou correlação negativa com os gêneros *Blautia*, *Faecalibacterium*, *Ruminococcus* e *Collinsella*. Alem disso, quanto mais prolongado o pré-tratamento, maior a concentração de polifenóis, devido à liberação contínua desses compostos em resposta ao aumento da desconstrução da estrutura hemicelulósica. No entanto, para os gêneros *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* e *Lacticaseibacillus*, não foram observadas correlações significativas.

Para avaliar o crescimento das cepas *B. longum* BG3, *L. rhamnosus* Lcr35, *L. casei* 01 e *L. acidophilus* LA-5 em concentrações mais baixas de OS-23, o composto foi testado nas concentrações de 0,25, 0,50 e 1,00% (m/v). O OS-23 foi dissolvido em meio basal MRS-cys sem glicose, e FOS a 0,50% (m/v) foi usado como controle positivo. O crescimento dos microrganismos foi monitorado por OD a 620 nm (Figura 23).

a)



b)



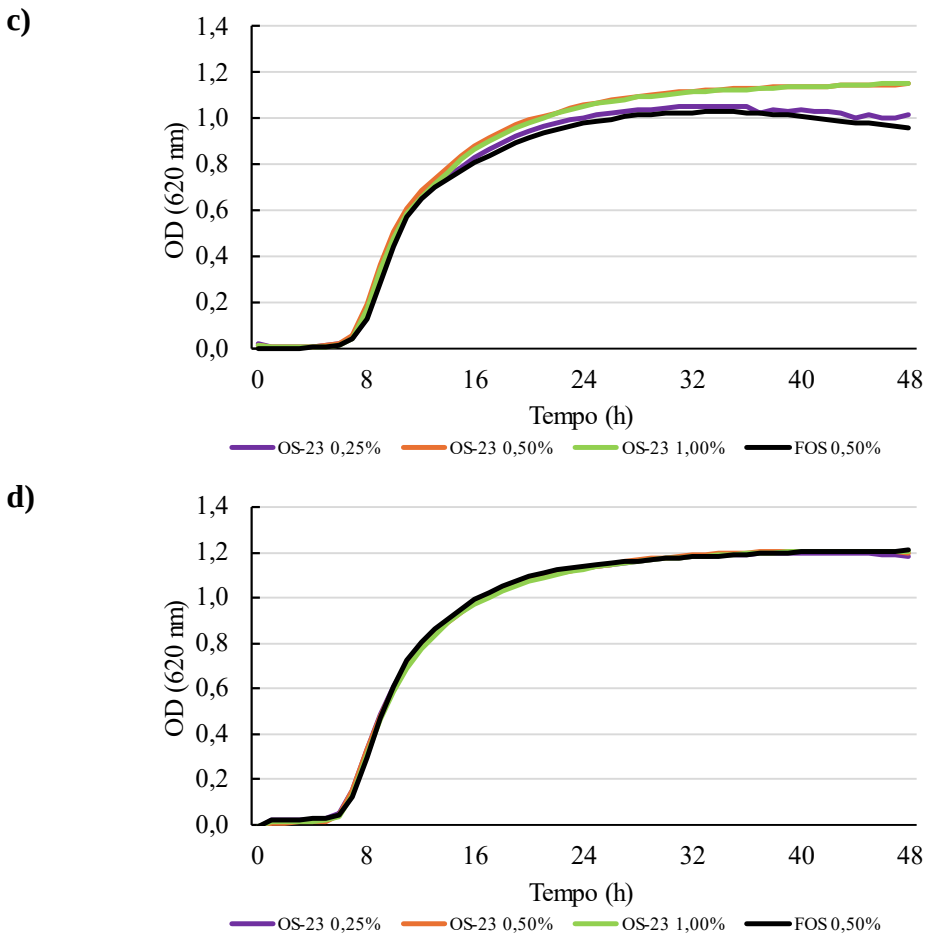


Figura 23 - Curvas de crescimento das cepas (a) *L. acidophilus* LA-5, (b) *L. rhamnosus* Lcr35, (c) *L. casei* 01, (d) *B. longum* BG3, em meio MRS-cys suplementado com OS-23 0,25%, OS-23 0,50%, OS-23 1,00% e FOS 0,50% (m/v).

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Para todos os microrganismos avaliados, os OS-23 em concentrações mais baixas promoveram o aumento da OD a 620 nm, o que pode indicar que todos os microrganismos foram capazes de crescer em concentrações mais baixas dos OS-23 (Figura 23). Além disso, todos os microrganismos atingiram a OD máxima antes das 24 horas, o que não foi observado quando os OS-23 foram dissolvidos em concentrações mais altas em meio MRS-cys.

Esses resultados reforçam a hipótese de que a presença de compostos fenólicos na estrutura dos OS-23 pode estar influenciando o metabolismo microbiano. Esse efeito foi particularmente evidente para *L. acidophilus* LA-5, que atingiu a OD máxima somente após aproximadamente 40 horas quando cultivado em meio MRS-cys suplementado com OS-23 nas concentrações de 1,00, 2,00 e 3,00% (m/v).

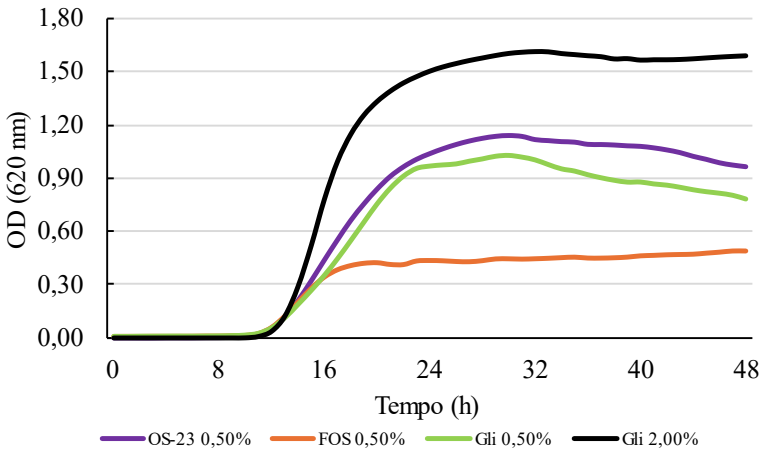
Ao comparar a fonte de carbono preferencial de cada microrganismo avaliado, observou-se que o FOS a 0,50% (m/v) proporcionou a maior taxa de crescimento (OD a 620 nm) para *L. acidophilus* LA-5, enquanto a menor taxa de crescimento desse probiótico foi registrada na

presença de OS-23 a 0,25% (m/v). Para *L. rhamnosus* Lcr35, as OD a 620 nm apresentaram valores próximos entre as diferentes concentrações de OS-23. No entanto, quando cultivado em meio MRS-cys suplementado com FOS a 0,50% (m/v), seu crescimento foi mais lento e menos expressivo. O OS-23 a 0,50 e 1,00% (m/v) promoveram o crescimento máximo do *L. casei* 01, enquanto o OS-23 a 0,25% (m/v) e o FOS a 0,50% (m/v) obtiveram valores de OD mais baixos. Para a *B. longum* BG3, as OD a 620 nm para as diferentes fontes de carbono apresentaram valores próximos.

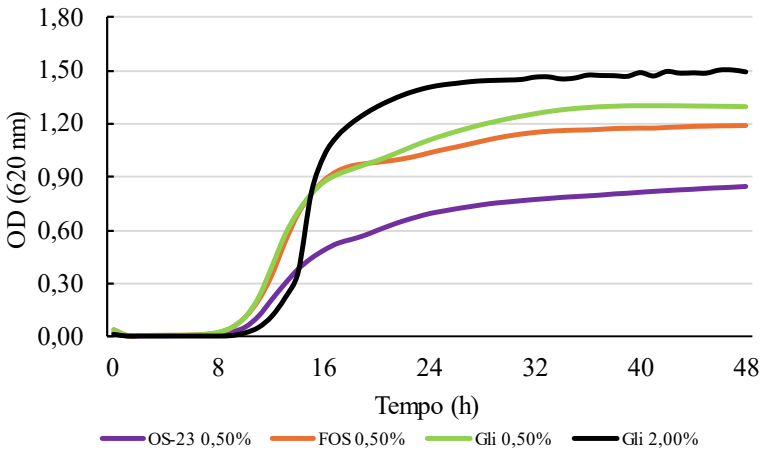
Em resumo, os resultados indicam que a concentração de 0,50% (m/v) de OS-23 foi a mais eficiente para promover o crescimento dos microrganismos probióticos avaliados neste estudo. Nessa concentração, todas as cepas probióticas testadas atingiram a OD máxima em um tempo reduzido. Além disso, o crescimento obtido foi comparável ao observado em concentrações mais elevadas de OS-23, demostrando que essa dosagem é suficiente para favorecer a fermentação sem a necessidade de maiores concentrações.

Para comparar a influência da concentração de OS-23 (0,50% m/v) com outras fontes de carbono, o experimento foi repetido, avaliando-se o crescimento de *B. animalis* Bo, *B. longum* BG3, *B. lactis* Bb12, *L. casei* 01, *L. acidophilus* LA-5 e *L. rhamnosus* Lcr35. Os microrganismos foram cultivados em meio MRS-cys suplementado com OS-23 0,50% (m/v) e comparados com meios contendo FOS e glicose na mesma concentração (0,50% m/v), além de glicose a 2,00% (m/v). O crescimento foi monitorado por OD a 620 nm (Figura 24).

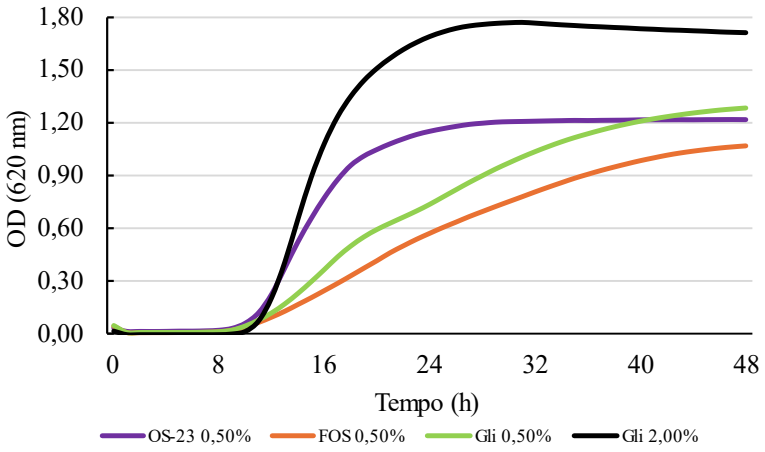
a)



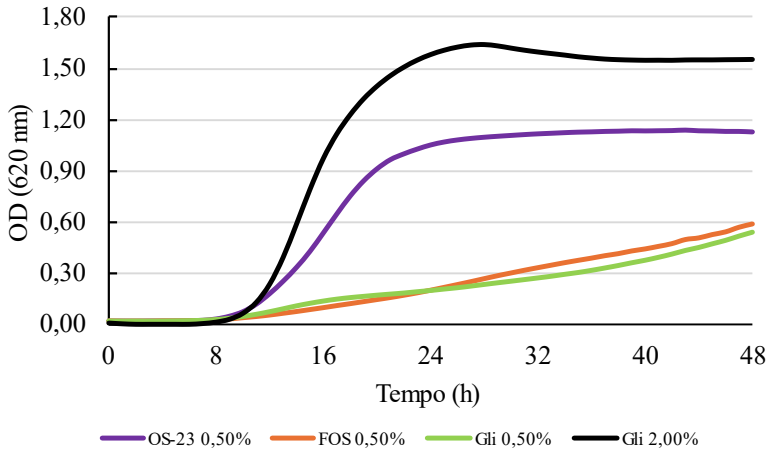
b)


1,80
1,50
1,20
0,90
0,60
0,30
0,00
OD (620 nm)
0
8
16
24
32
40
48
Tempo (h)
OS-23 0,50%
FOS 0,50%
Gli 0,50%
Gli 2,00%

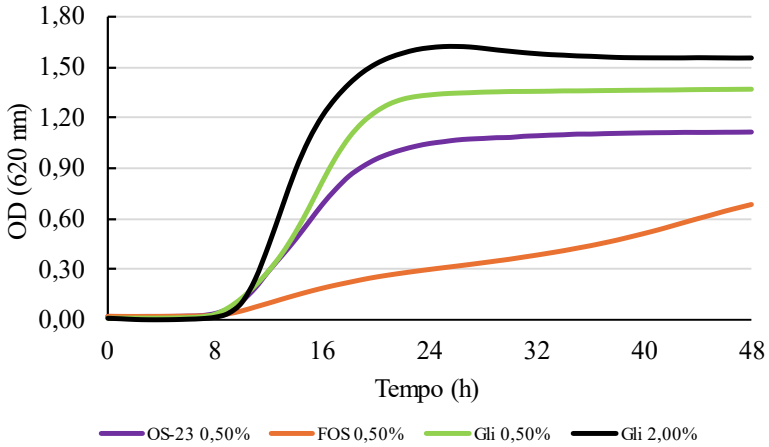
c)


1,80
1,50
1,20
0,90
0,60
0,30
0,00
OD (620 nm)
0
8
16
24
32
40
48
Tempo (h)
OS-23 0,50%
FOS 0,50%
Gli 0,50%
Gli 2,00%

d)


1,80
1,50
1,20
0,90
0,60
0,30
0,00
OD (620 nm)
0
8
16
24
32
40
48
Tempo (h)
OS-23 0,50%
FOS 0,50%
Gli 0,50%
Gli 2,00%

e)



f)

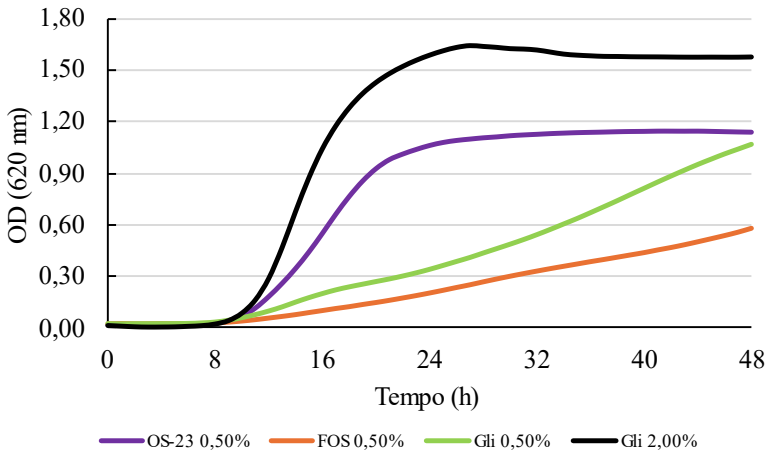
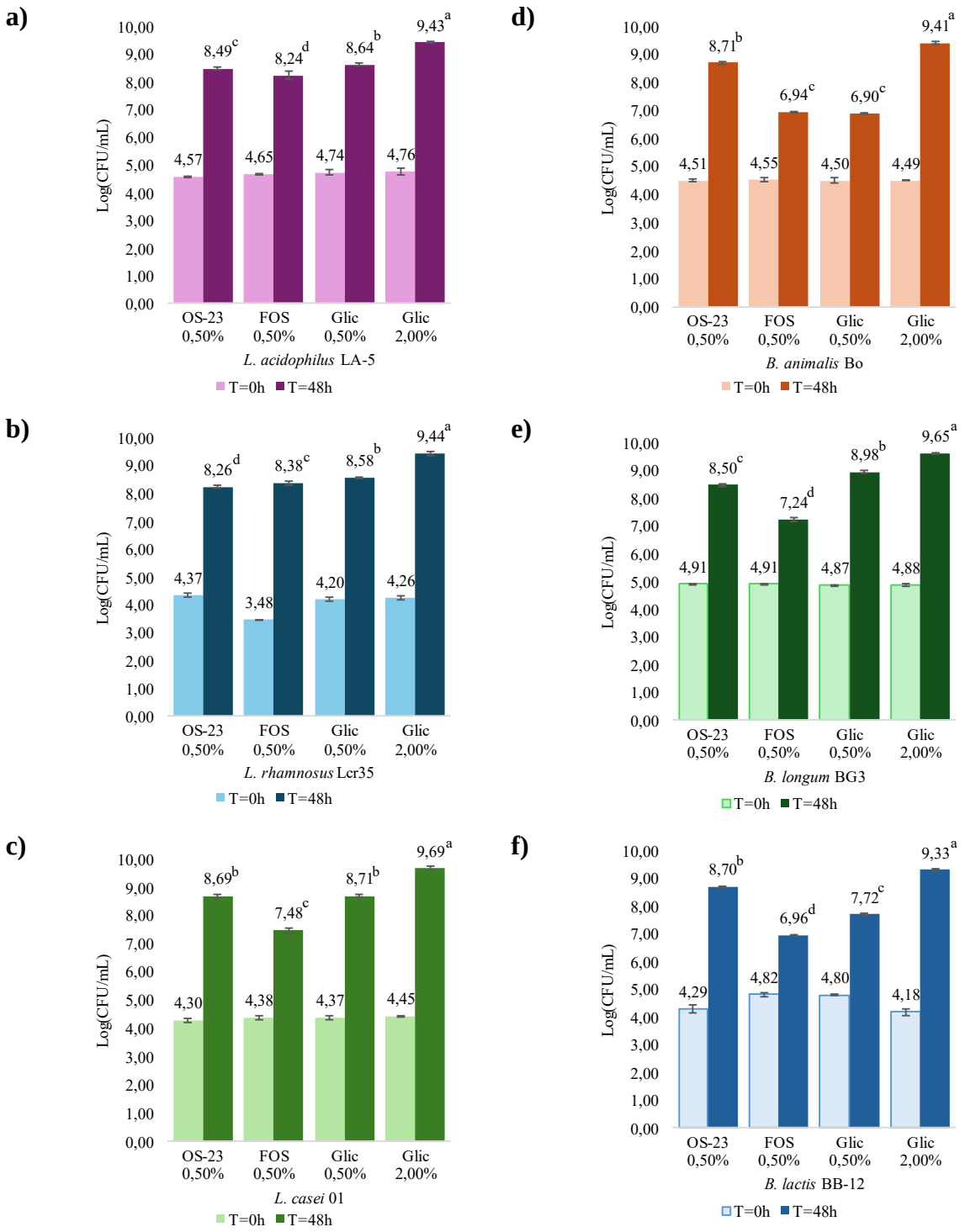


Figura 24 - Curvas de crescimento das cepas (a) *L. acidophilus* LA-5, (b) *L. rhamnosus* Lcr35, (c) *L. casei* 01, (d) *B. animalis* Bo, (e) *B. longum* BG3 e (f) *B. lactis* Bb12, em meio MRS-cys suplementado com OS-23 0,50%, FOS 0,50%, Gli 0,50% e Gli 2,00% (m/v).

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Além disso, a viabilidade celular foi determinada em amostras contendo OS-23 0,50% (m/v), FOS 0,50% (m/v), glicose 0,50% (m/v) e glicose 2,00% (m/v). Para isso, foi utilizada a técnica de plaqueamento em gota na placa de ágar MRS-cys, e a quantificação das unidades formadoras de colônias (CFU) foi realizada em 0 e 48 h para todos os microrganismos avaliados (Figura 25).



A diferentes letras (a, b, c e d) significam uma diferença estatística entre as fontes de carbono ($p < 0,05$). Os valores são apresentados como médias ± desvio padrão de triplicatas.

Figura 25 - Contagem da viabilidade celular para (a) *L. acidophilus* LA-5, (b) *L. rhamnosus* Lcr35, (c) *L. casei* 01, (d) *B. animalis* Bo, (e) *B. longum* BG3 e (f) *B. lactis* Bb12 em meio MRS-cys contendo OS-23 0,50%, FOS 0,50%, Glic 0,50% e Glic 2,00% (m/v).

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Todos os microrganismos avaliados apresentaram crescimento nos meios contendo diferentes fontes de carbono, uma vez que a contagem de células viáveis após as 48 h de

fermentação foi aproximadamente duas vezes maior em comparação ao tempo inicial (Figura 25). A glicose a 2,00% (m/v) destacou-se como a melhor fonte de carbono, promovendo a maior OD a 620 nm para todas as cepas avaliadas (Figura 24). Esses resultados estão de acordo com a contagem de células viáveis, em que a glicose a 2,00% (m/v) apresentou um aumento significativo na viabilidade celular (98 - 123 %) (Figura 25).

Ao comparar o crescimento dos microrganismos com base na OD a 620 nm em meios contendo OS-23, FOS e glicose a 0,50% (m/v), observou-se que o OS-23 foi a melhor fonte de carbono para *L. acidophilus* LA-5, *B. animalis* Bo, *B. lactis* Bb12. Esse padrão de crescimento também foi observado para a contagem de células viáveis das *B. animalis* Bo, *B. lactis* Bb12, onde o OS-23 a 0,50% (m/v) promoveu o maior número de células viáveis após 48 h de fermentação ($p < 0,05$), respectivamente, 8,71 e 8,70 log CFU/mL.

O maior crescimento de bactérias do gênero *Bifidobacterium* em comparação aos *Lactobacillus* também foi observado no estudo de Magengelele; Malgas; Pletschke (2023). Neste trabalho, os autores extraíram MOS da BCF através de um pré-tratamento alcalino seguido de hidrólise enzimática com mananase derivada de *Bacillus* sp., observando um crescimento superior de *Bifidobacterium* tanto na viabilidade celular quanto na OD a 600 nm. Este melhor desempenho está relacionado à maior capacidade das bactérias do gênero *Bifidobacterium* de metabolizar uma ampla variedade de carboidratos, fato também descrito por McLaughlin *et al.* (2015).

Além disso, nos estudos realizados por Sarghini *et al.* (2021), os autores estudaram o potencial prebiótico de OS extraídos da BCF por meio de um pré-tratamento com ácido clorídrico diluído, avaliando seu efeito sobre 4 espécies do gênero *Lactobacillus* (*L. gasseri* AL3 e AL5, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* e *L. reuteri* DSM 17938). Os resultados mostraram que as bactérias do gênero *Lactobacillus* possuem preferência pela fermentação de OS de menores graus de polimerização.

Essa característica pode explicar o menor desenvolvimento das espécies de *Lactobacillus* neste estudo. Isso porque o OS-23 contém OS de baixo grau de polimerização (abaixo de 5), porém ele também apresenta OS de maior grau de polimerização. Desta forma, quando os OS de menor grau de polimerização são completamente consumidos, o metabolismo dos microrganismos pode ser afetado, resultando em um crescimento reduzido.

No trabalho desenvolvido por Gu *et al.* (2020), os autores avaliaram o crescimento das bactérias *B. adolescentis* e *L. acidophilus* quando estas foram inoculadas em meio contendo galactomananas extraídas da BCF por pré-tratamento hidrotérmico e hidrólise enzimática. No caso do trabalho apresentado por estes autores, o *L. acidophilus* teve uma concentração celular

maior do que a *B. adolescentis* determinada pela medição da OD a 600 nm, porém os autores não avaliaram a viabilidade celular após os ensaios *in vitro*.

Wongsiridetchai *et al.* (2021) avaliaram o crescimento de bactérias do gênero *Lactobacillus* quando MOS obtido da BCF por hidrólise enzimática foram suplementados ao meio de cultivos dessas bactérias. Os autores observaram que o MOS foi capaz de promover o maior crescimento das bactérias *L. acidophilus* e *L. casei* em relação ao controle positivo, suplementado com FOS.

Dessa forma os resultados obtidos por Gu *et al.* (2020) e Wongsiridetchai *et al.* (2021) corroboram os resultados deste estudo para *L. acidophilus*, indicando que os polissacarídeos e oligossacarídeos de galactomananas são excelentes prebióticos para o metabolismo dessa espécie.

L. rhamnosus Lcr35 apresentou uma OD superior quando cultivado com FOS a 0,50% (m/v) em comparação ao OS-23 na mesma concentração após as 48 h de fermentação (Figura 24b). Esse melhor crescimento também foi confirmado pela viabilidade celular ($p < 0,05$), onde o *L. rhamnosus* Lcr35 apresentou contagens de 8,38 e 8,26 log CFU/mL para o FOS e o OS-23 respectivamente. Por outro lado, para os demais microrganismos avaliados, o OS-23 a 0,50% (m/v) promoveu um crescimento significativamente maior ($p < 0,05$).

Outro aspecto interessante de ser analisado é a comparação entre o crescimento de *B. lactis* Bb12 com base na OD a 620 nm e na viabilidade celular. Pela análise da OD, *B. lactis* Bb12 apresentou crescimento semelhante quando cultivado em meio suplementado com OS-23 e glicose a 0,50% (m/v). No entanto, ao avaliar a viabilidade celular, observou-se que *B. lactis* Bb12 teve uma viabilidade significativamente menor ($p < 0,05$) para meio suplementado com glicose a 0,50% (m/v) em comparação ao OS-23 na mesma concentração.

Essa divergência entre as análises pode ter ocorrido devido à morte de algumas células durante o ensaio *in vitro* no meio contendo glicose a 0,50% (m/v), resultando em uma OD elevada, enquanto a viabilidade celular foi reduzida. Este resultado reforça a importância de se avaliar a viabilidade celular em conjunto com as medições de OD nos estudos de crescimento microbiano, uma vez que não existe um método de viabilidade celular isento de limitações. Dessa forma, essas análises se complementam para fornecer uma avaliação mais precisa do desenvolvimento dos microrganismos (Wendel, 2022).

Esses resultados indicam que o OS-23 a 0,50% (m/v) promoveu o crescimento de todas as cepas microbianas investigadas neste estudo. Além disso, para alguns microrganismos específicos, como *B. animalis* Bo e *B. lactis* BB-12, o OS-23 proporcionou uma viabilidade celular significativamente maior ($p < 0,05$) ao longo das 48 h de fermentação em comparação

à glicose a 0,50% (m/v). Desta forma, nos casos de *L. casei* 01, *B. animalis* Bo e *B. lactis* BB-12, o OS-23 também demostrou um desempenho superior ao FOS, um prebiótico comercial, na mesma concentração (0,50% m/v).

Isso sugere que, nessa concentração, os OS-23 possuem potencial prebiótico e podem ser utilizados como suplemento em formulações alimentícias para estimular o crescimento de microrganismos benéficos na microbiota intestinal, contribuindo assim para a melhoria da saúde humana.

5.7. DESENVOLVIMENTO DA MATRIZ PÉCTICA

Atualmente, os produtos prebióticos disponíveis no mercado são, em sua maioria, comercializados na forma de cápsulas. O processo de envelhecimento, mesmo em indivíduos com hábitos saudáveis, pode impactar a alimentação e dificultar a deglutição de alimentos e medicamentos. Esse efeito ocorre devido à diminuição da massa muscular da face e à diminuição do fluxo salivar (Christmas; Rogus-Pulia, 2019). Tais alterações podem comprometer ainda mais a ingestão de suplementos e fármacos na população idosa. Diante este contexto, foi proposta a formulação de uma matriz hidrogel enriquecida com OS-23, um composto de potencial prebiótico, visando facilitar o consumo e melhorar a adesão a este tipo e suplementação.

A matriz hidrogel pode ser formulada usando diferentes tipos de agentes gelificantes, tais como: alginato, quitosana, goma xantana, amido, goma gelana, glucomanano e pectina (Manzoor *et al.*, 2022). Com base na revisão da literatura, optou-se pelo desenvolvimento da matriz à base de pectina, pois esse biopolímero já foi amplamente utilizado como agente gelificante em hidrogéis para administração de medicamentos (Han *et al.*, 2022), além de atuar como substituto de gordura e modificador de textura na indústria alimentícia (Manzoor *et al.*, 2022; Padma Ishwarya; Sandhya; Nisha, 2022). Além disso, a pectina tem sido apontada como um potencial material prebiótico (Chung *et al.*, 2017) e é extraída de fontes naturais como frutas e seus subprodutos (Padma Ishwarya; Sandhya; Nisha, 2022), tonando-se uma opção sustentável e funcional para a formulação da matriz hidrogel.

As matrizes hidrogéis formuladas com 1,0, 1,5 e 2,0% m/v de pectina foram denominadas respectivamente de Hydrogel 1,0% pectina, Hydrogel 1,5% pectina e Hydrogel 2,0% pectina. A viscosidade das matrizes hidrogéis foi determinada à temperatura ambiente, usando um viscosímetro rotacional, e foram comparadas com produtos disponíveis no mercado. As viscosidades para as matrizes e os produtos comerciais: Purê de frutas orgânicas de pera (Clearspring) e Tasty Turtle - Maçã e pera com iogurte (Holle), são apresentadas na Figura 26.

O *Pear Organic Fruit Purée (Clearspring)* apresentou a maior viscosidade (1307,00 ± 3,61 mPa.s) entre todas as formulações analisadas, enquanto o Hydrogel 1,0% pectina apresentou a menor viscosidade (99,30 ± 3,72 mPa.s). A viscosidade obtida pelo Hydrogel 2,0% pectina e pelo Holle - Tasty Turtle - Yogurt não apresentou diferença estatística significativa ($p > 0,05$).

Além disso, todos as três matrizes à base de pectina apresentaram diferenças estatisticamente significativas na viscosidade ($p < 0,05$). Além disso, o aumento nas concentrações de pectina está diretamente relacionado ao aumento da viscosidade da matriz hidrogel (Figura 26). Na Figura 26 os resultados são apresentados como média ± desvio padrão de triplicatas, diferentes letras minúsculas (a, b, c e d) representam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) entre as amostras.

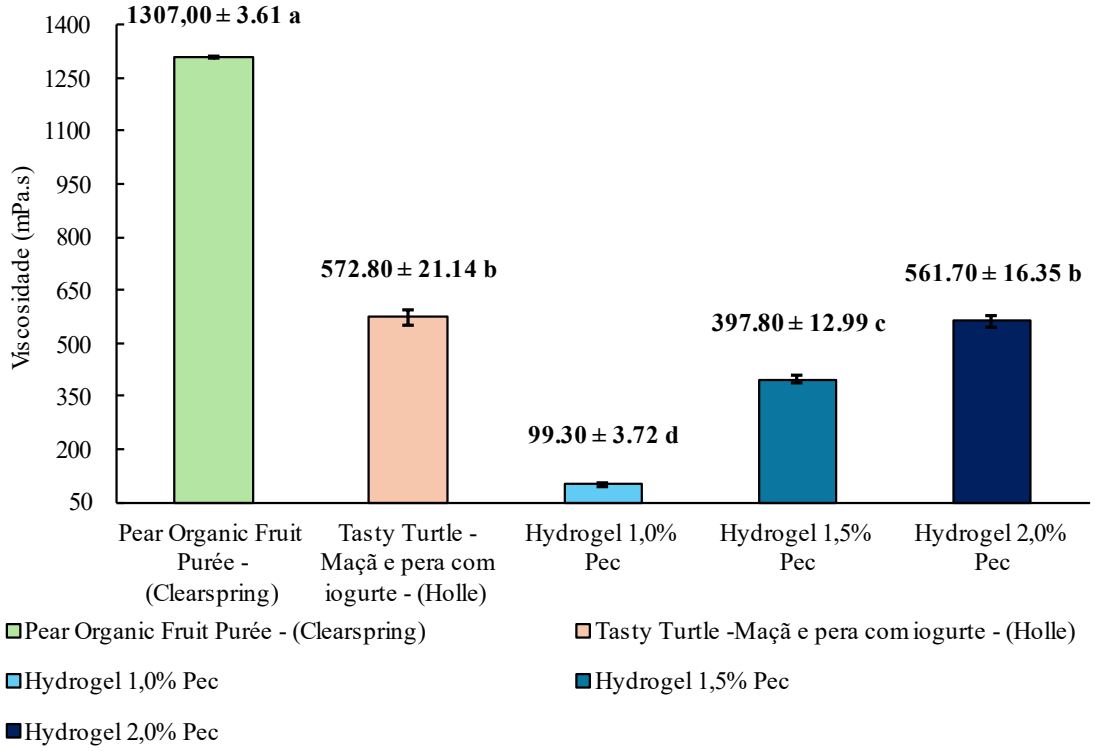


Figura 26 - Viscosidade (mPa.s) das matrizes hidrogéis contendo 1,0%, 1,5% e 2,0% (m/v) de pectina, *Pear Organic Fruit Purée (Clearspring)* e *Tasty Turtle* – Maça e pera com iogurte *(Holle)*, aferida à temperatura ambiente.

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

O Hydrogel 2,0% Pec apresentou a maior viscosidade entre os hidrogéis formulados ($p < 0,05$) e não apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparado ao *Holle - Tasty Turtle - Yogurt*, à temperatura ambiente. Entretanto, a viscosidade dos hidrogéis à base de pectina pode ser influenciada pela temperatura, conforme descrito por Kar; Arslan (1999), sendo esse efeito mais pronunciado em concentrações mais elevadas de pectina.

Dado que produtos dessa categoria são frequentemente consumidos em temperaturas mais baixas, a viscosidade tende a aumentar, o que pode dificultar seu consumo diretamente da embalagem. Considerando esse aspecto, o Hydrogel 1,5% Pec foi selecionado como a matriz hidrogel mais adequada para os ensaios de digestão *in vitro* do trato gastrointestinal (TGI) e de fermentação fecal. Esse hidrogel apresenta um valor intermediário de viscosidade, o que minimiza o impacto da variação da temperatura, garantindo maior viabilidade de consumo.

Além disso, como a pectina possui potencial prebiótico, pois é solúvel em água e pode ser metabolizada por bactérias intestinais, especialmente aquelas presentes no íleo e no cólon (Ashaolu; Ashaolu; Adeyeye, 2021). Desta forma, o desenvolvimento de um produto com concentrações mais baixas de pectina pode favorecer uma sinergia entre os compostos prebióticos presentes, promovendo um ambiente propício para o crescimento de microrganismos benéficos e contribuindo para uma microbiota intestinal mais saudável para os consumidores.

5.8. ENSAIO *in vitro* DA DIGESTÃO DO TRATO GASTROINTESTINAL

Para avaliar a biodisponibilidade e a bioacessibilidade dos OS-23 suplementados em uma matriz à base de pectina, foram realizados ensaios *in vitro* de digestão do TGI segundo Brodkorb *et al.* (2019). Inicialmente, foram desenvolvidas 3 formulações em hidrogel contendo 1,5% (m/v) de pectina: uma suplementada com 0,50% (m/v) de OS-23, outra suplementada com 0,50% (m/v) de FOS e uma terceira sem suplementação, A escolha dessas formulações foi baseada nos resultados obtidos e discutidos nas seções 5.6 e 5.7. A formulação suplementada com 0,50% (m/v) de FOS foi utilizada como controle positivo, enquanto a formulação sem suplementação serviu como controle para avaliar o efeito da matriz gel sobre a digestão.

O modo de preparo dos alimentos ou formulações desenvolvidas com diferentes nutrientes podem afetar a biodispinibilidade e a bioacessibilidade dos compostos de interesse. Por este motivo, estudos nessa área são fundamentais para identificar processos que possam impactar a biodispinibilidade ou a bioacessibilidade dos compostos de interesse (Aguiar; Cazarin, 2021)

A composição dos OS presentes no Hydrogel OS-23 foi analisada antes e após os ensaios *in vitro* de digestão do TGI por HPAEC-PAD (Tabela 25). As amostras foram comparadas para identificar possíveis modificações estruturais e avaliar a disponibilidade dos OS que serão fermentados pela microbiota.

Tabela 25 - Concentração dos OS presentes no Hydrogel OS-23 antes e após a digestão do TGI.

Oligossacarídeos	Concentração no Hydrogel OS-23 (µg/g material seco)	Concentração no Hydrogel OS-23 digerido (µg/g material seco)
Manobiose	301,14 ± 25,05	141,22 ± 19,33
Manotriose	58,30 ± 6,34	10539,30 ± 1284,41
Manotetraose	91,44 ± 71,84	13,72 ± 19,40
Manopentose	272,50 ± 24,60	-
Manohexose	-	331,57 ± 78,15

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Nota: Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão de duplicatas.
Sinal convencional utilizado:
- Dado numérico igual a zero.

De acordo com os resultados obtidos, após a digestão no TGI, o hidrogel ainda apresenta OS, sendo a manotriose o composto encontrado em maior concentração. Isso sugere que os OS extraídos da BCF são resistentes aos processos de digestão química e enzimática ao longo do TGI, garantindo que esses compostos alcancem o intestino e permaneçam disponíveis no material que será fermentado pela MIH.

Este resultado está em concordância com os resultados obtidos por Prayoonthien *et al.* (2019) e Miao *et al.* (2021), que demonstraram a resistência de OS obtidos, respectivamente, da polpa seca do coco e goma da semente de *Cassia*, reforçando o potencial prebiótico desses compostos.

5.9. FERMENTAÇÃO COLÔNICA E METAGENÔMICA

O desenvolvimento de diversas doenças, como doenças inflamatórias intestinais, obesidade, diabetes, doenças cardiovasculares e doenças neurodegenerativas, tem sido associada à disbiose (Sharma *et al.*, 2023). A disbiose resulta da redução da diversidade microbiana e do desequilíbrio da microbiota (Isenring *et al.*, 2023). Além disso, os hábitos alimentares adotados pela população têm um papel importante na modulação da MIH, modificando a sua composição, o índice de diversidade na microbiota, os níveis relativos aos microrganismos e as vias funcionais envolvidas (Salsinha *et al.*, 2024).

Os ensaios *in vitro* de fermentação colônica foram realizados ao longo de duas semanas, utilizando fermentadores em batelada com agitação magnética, controle de temperatura e pH (Figura 14 e Figura 15). Como inóculo, foram utilizadas amostras fecais homogeneizadas de 5 doadores saudáveis. Nesta etapa, foram avaliados os resultados referentes à determinação da concentração total de nitrogênio amoniacal, quantificação dos AGCC e análise metagenômica da microbiota intestinal.

5.9.1. Determinação da concentração total de nitrogênio amoniacal

A concentração total de nitrogênio amoniacal produzido durante as 48 horas de fermentação colônica foi determinada para as amostras Hydrogel OS-23, Hydrogel FOS, Hydrogel Matriz e o IC (Figura 27). Na Figura 27 os resultados são apresentados como médias ± desvio padrão de triplicatas. Diferentes letras minúsculas representam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) entre as amostras medidas no mesmo tempo.

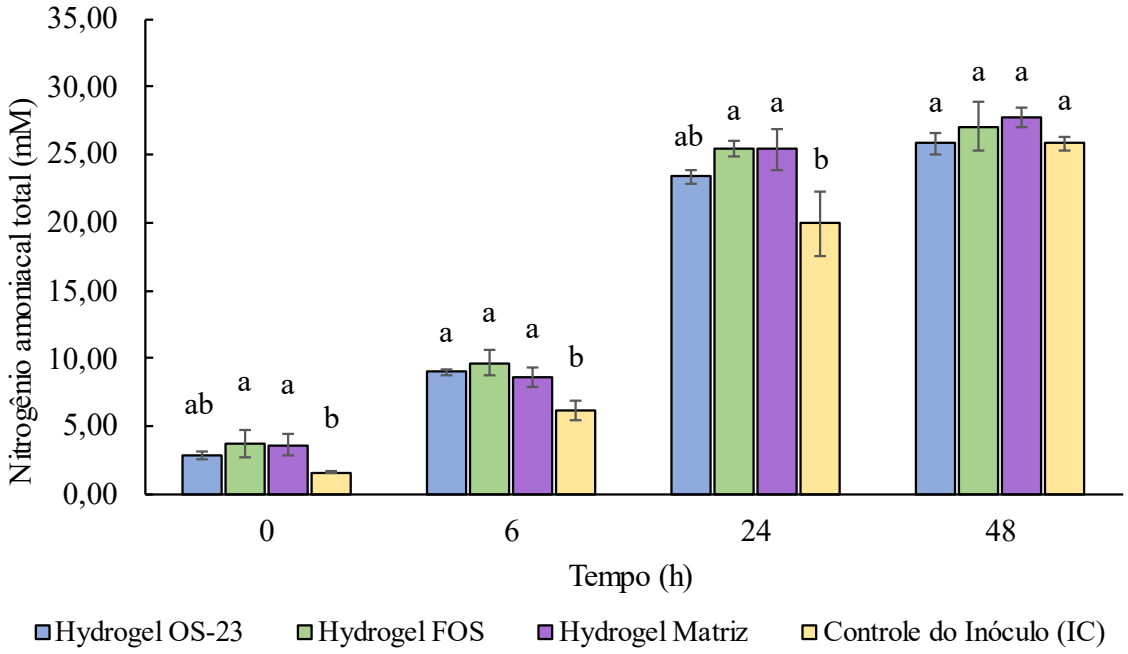


Figura 27 - Concentração total de nitrogênio amoniacal ao longo das 48 h de fermentação colônica para as amostras Hydrogel OS-23, Hydrogel FOS, Hydrogel Matriz e o IC.

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

No tempo inicial do experimento (0 h), as amostras Hydrogel OS-23, Hydrogel FOS e Hydrogel Matriz apresentaram concentrações semelhantes de nitrogênio amoniacal ($p > 0,05$), com valores de 2,82 ± 0,27 mM, 3,71 ± 0,99 mM e 3,63 ± 0,79 mM, respectivamente. Enquanto o IC apresentou uma concentração significativamente menor de nitrogênio amoniacal (1,62 ± 0,07 mM; $p < 0,05$) em comparação com as formulações Hydrogel FOS e Hydrogel Matriz.

Às 6 h de fermentação, o IC manteve a menor concentração de nitrogênio amoniacal (6,15 ± 0,69 mM; $p < 0,05$). Por outro lado, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) entre as formulações em hidrogel, indicando que todas produziram quantidades semelhantes de nitrogênio amoniacal ao longo do período avaliado.

Após 24 h de fermentação, as formulações em hidrogel não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) na concentração do nitrogênio amoniacal, com valores de 23,38 ± 0,50 mM, 25,43 ± 0,62 mM e 25,38 ± 1,54 mM para as amostras Hydrogel OS-23,

Hydrogel FOS e Hydrogel Matriz, respectivamente. Enquanto o IC apresentou uma concentração menor de nitrogênio amoniacal (19,94 ± 2,38 mM; $p < 0,05$) em comparação com Hydrogel FOS e Hydrogel Matriz.

Ao final das 48 h de ensaio da fermentação colônica, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) entre as concentrações de nitrogênio amoniacal total das formulações Hydrogel OS-23, Hydrogel FOS, Hydrogel Matriz e o IC, que apresentram valores de 25,82 ± 0,80 mM, 27,08 ± 1,76 mM, 27,77 ± 0,71 mM e 25,83 ± 0,50 mM, respectivamente.

Esses resultados eram esperados, uma vez que o OS-23 apresentou 3,72 ± 0,18 g de proteína por 100 g do material, enquanto o FOS comercial é um produto purificado que não apresenta proteína em sua composição. Além disso, os níveis normais de amônia presente em amostras fecais variam entre 12 e 30 mM (Scott *et al.*, 2013). A amônia é reconhecida com um metabólito residual com potenciais efeitos neurotóxicos (Wang *et al.*, 2023), e em concentrações elevadas pode ser prejudicial aos colonócitos (de Carvalho *et al.*, 2019).

Como os níveis de nitrogênio amoniacal total produzido ao longo das 48 horas de fermentação colônica permaneceram dentro da faixa considerada normal, pode-se inferir que a fermentação dos hidrogéis pela MIH não impactou significativamente a concentração de amônia. Isso se deve à baixa concentração de proteína nos hidrogéis, sugerindo que a principal fonte de amônia provém da proteína presente no inóculo fecal e no meio basal.

Concentrações mais elevadas de amônia, de aproximadamente 70 mM, foram observadas em ensaios *in vitro* de fermentação colônica utilizando farinha de inseto comestível (*Tenebrio molitor*) (de Carvalho *et al.*, 2019). Esse aumento foi diretamente associado à alta concentração de proteína presente na farinha de *Tenebrio molitor* (44,6 g/100 g de farinha). Essas conclusões reforçam os resultados deste estudo, em que as concentrações de amônia permaneceram dentro da faixa normal, o que pode ser atribuído à baixa concentração de proteína nos hidrogéis.

5.9.2. Riqueza da diversidade da população bacteriana: avaliação da α-diversidade

As métricas de α-diversidade são utilizadas para descrever a estrutura de uma comunidade microbiana com base em sua riqueza (número de grupos taxonômicos), uniformidade (distribuição das abundâncias dos grupos) ou ambas. Entre as métricas mais comumente aplicadas para esses cálculos estão a diversidade filogenética, o número observado de variantes de sequência de amplicon (ASVs), os índices Chao1, Simpson e Shannon (Kers; Saccenti, 2022).

Para visualizar as informações comuns e exclusivas de cada grupo de amostra ao longo da fermentação colônica, foi utilizado um diagrama de flor (Figura 28a). No centro do diagrama, são apresentados os microrganismos compartilhados por todos os grupos de amostras, enquanto cada pétala exibe os microrganismos específicos de cada grupo e tempo de amostragem. Essa abordagem permite uma análise comparativa da diversidade microbiana entre as diferentes condições experimentais e ao longo da fermentação (Salsinha *et al.*, 2024).

Desta forma, é possível observar, no tempo 0 h, o IC apresentou um total de 1037 ASVs, sendo 996 ASVs únicas e 41 ASVs compartilhadas entre outros grupos. Ao longo da fermentação, a diversidade no grupo de amostras do IC apresentou um declínio, em concordância com os resultados obtidos para a abundância relativa dos 30 principais táxons em cada grupo de amostras (Figura 30d).

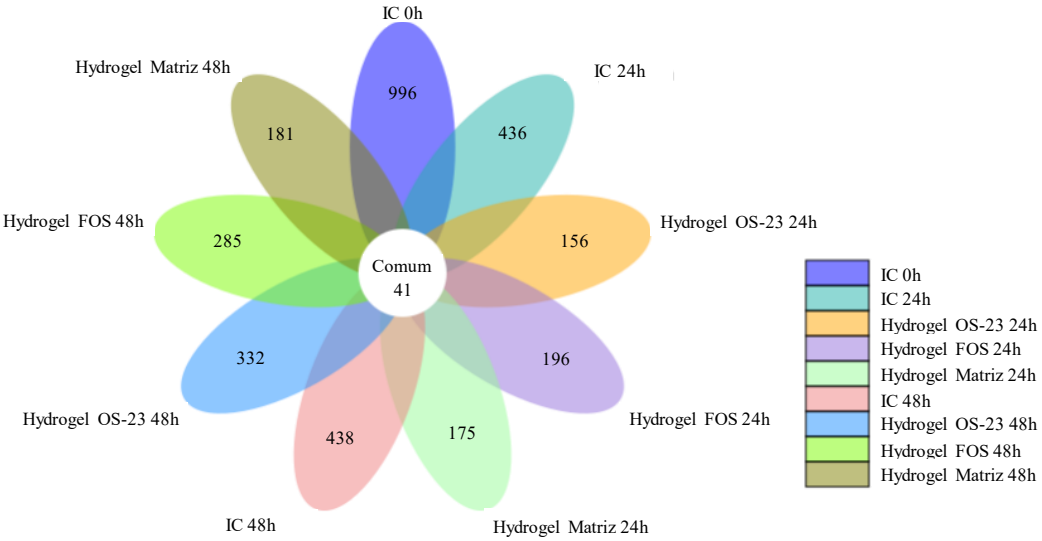
Entretanto, nos reatores suplementados com as amostras digeridas de Hydrogel OS-23, Hydrogel FOS e Hydrogel Matriz, observou-se inicialmente uma redução na diversidade microbiana, com um total de 197, 237 e 216 ASVs, respectivamente. Essa diminuição pode estar relacionada ao fato de que o inóculo fecal foi coletado de doadores saudáveis com uma dieta variada, enquanto a suplementação com os hidrogéis não replicava integralmente as condições necessárias para o desenvolvimento de todos os microrganismos presentes inicialmente. Esse efeito seletivo pode ter favorecido o crescimento de espécies de bactérias específicas, um fenômeno já descrito em ensaios de fermentação *in vitro* de OS de galactomananas (Miao *et al.*, 2021).

Por outro lado, ao longo do processo de fermentação, é possível verificar um aumento na biodiversidade nos reatores suplementados com os hidrogéis (Figura 30c, Figura 30d). Esse efeito é particularmente evidente ao final de 48 h, quando o grupo de amostras suplementado com Hydrogel OS-23 apresentou a maior diversidade entre os hidrogéis testados, com um total de 373 ASVs, das quais 332 eram únicas e 41 compartilhadas entre os grupos.

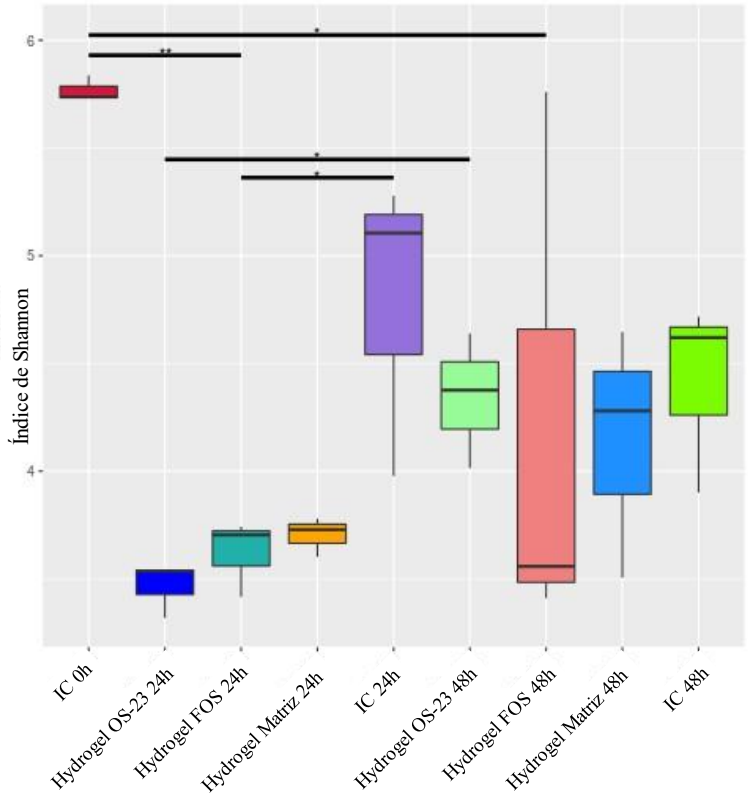
Em relação aos índices de α-diversidade, neste estudo foram calculados utilizando os índices de Chao1 e Shannon (Figura 28b e Figura 28c), o teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para determinar diferenças estatísticas entre as amostras, onde *$p < 0,05$, **$p < 0,01$ e ***$p < 0,001$. O índice de Chao1 calcula a diversidade das amostras com base no número total de espécies, atribuindo maior peso aos táxons de menor abundância. Já o índice de Shannon avalia a diversidade considerando tanto o número total de táxons quanto suas respectivas abundâncias relativas, ou seja, leva em conta a riqueza de taxonômica quanto a uniformidade na distribuição dos organismos entre os diferentes táxons (Kers; Saccenti, 2022). Desta forma, a aplicação conjunta dos índices de Chao1 e Shannon é importante para a análise de α-diversidade, pois

ambos fornecem informações complementares sobre a estrutura da microbiota por pertencerem a categorias de métricas diferentes (Cassol; Ibañez; Bustamante, 2025), permitindo uma avaliação mais abrangente da biodiversidade nas amostras analisadas.

a)



b)



c)

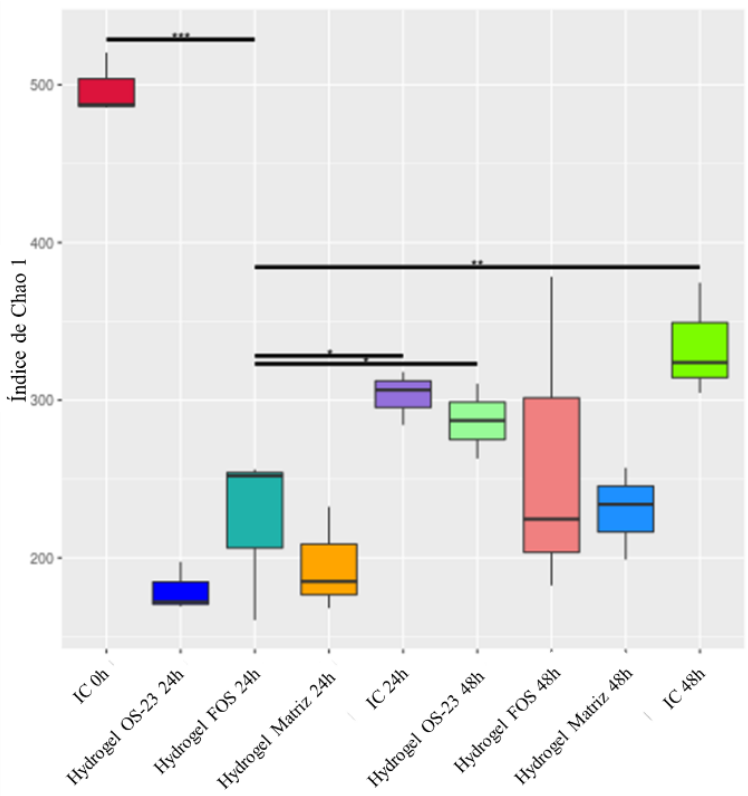


Figura 28 – (a) Diagrama de flor para todos os grupos de amostras nos diferentes tempos de fermentação (0, 24 e 48 h); (b) Análise de α-diversidade usando o índice de diversidade de Shannon e (c) Análise de α-diversidade usando o índice de diversidade de Chao1.

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

A partir das análises da α-diversidade através dos índices de Chao1 e Shannon, é possível verificar que o grupo de amostras do IC no tempo 0 h apresentou a maior diversidade microbiana, evidenciada pelos valores mais elevados desses índices. Essa diferença foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação aos outros grupos de amostras. No entanto, ao longo da fermentação, observou-se uma redução na diversidade para ambos os índices avaliados. Esse resultado está de acordo com os resultados apresentados pelo diagrama de flor (Figura 28a) e com os padrões descritos na literatura, incluindo os resultados de Miao *et al.* (2021).

Em relação ao impacto da suplementação dos hidrogéis nos meios fermentativos após a digestão no TGI, foi possível observar que Hydrogel OS-23 promoveu um aumento estatisticamente significativo nos valores de α-diversidade aos 48 h em comparação com as amostras de 24 h. Esse efeito foi detectado para o índice de Chao1 ($p = 0,0037$) quanto para o índice de Shannon ($p = 0,0136$), sugerindo que a formulação contendo OS-23 favoreceu a diversificação microbiana ao longo da fermentação colônica.

Esses resultados corroboram com o aumento observado no total de ASVs, que passou de 197 para 373 ao longo da fermentação, indicando que a suplementação com Hydrogel OS-

23 promoveu o aumento da diversidade da microbiota. Além disso, a formulação favoreceu o crescimento de bactérias dos gêneros *Bifidobacterium* e *Bacteroides*, microrganismos associados à promoção da saúde intestinal e à modulação da produção de AGCC (Salsinha *et al.*, 2024), e consequentemente reforçam o potencial prebiótico do Hydrogel OS-23.

Pérez-Burillo *et al.* (2019) relataram um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) nos índices de Simpson e Shannon em extratos com maior concentração de MOS obtidos da BCF por pré-tratamento hidrotérmico. Os autores concluíram que quanto maior a concentração de MOS nos extratos, maior a diversidade microbiana.

Ao comparar as amostras de Hydrogel OS-23 e IC após 48h de fermentação, observou-se que, embora a α-diversidade tenha aumentado ao longo da fermentação nos meios suplementados com Hydrogel OS-23, não houve diferenças estatisticamente significativas entre esses grupos nos índices de Chao1 ($p = 0,347$) e Shannon ($p = 0,945$). Esses resultados indicam que, inicialmente, ocorre uma redução na diversidade microbiana nas primeiras 24 h de fermentação, seguida por uma recuperação subsequente. Esse mesmo padrão foi observado em ensaios de fermentação *in vitro* que avaliaram a modulação da microbiota por OS de galactomananos (Miao *et al.*, 2021).

Entretanto, apesar de Hydrogel FOS e Hydrogel Matriz apresentarem maiores valores de α-diversidade para os índices de Chao1 e Shannon, não foram observadas diferença estatisticamente significativas ao longo da fermentação dentro desses grupos para os índices de Chao1 ($p = 0,666$) e Shannon ($p = 0,730$). Isto pode estar relacionada às flutuações na abundância relativa dos filos *Bacteroidota* e *Pseudomonadota* entre as diferentes amostras coletadas desses grupos (Figura 30a e Figura 30b). Essas diferenças na composição taxonômica podem ter influenciado a dinâmica da diversidade microbiana ao longo do experimento.

Outro ponto importante a ser observado é que a suplementação dos meios fermentativos com os hidrogéis Hydrogel OS-23 e Hydrogel FOS não apresentou diferenças estatisticamente significativas nos índices de α-diversidade de Chao1 ($p = 0,235$) e Shannon ($p = 0,277$) das amostras coletadas após 48 h de fermentação. Essa equivalência sugere que a matriz péctica com os OS-23 promove efeitos sinérgicos semelhantes ao da matriz péctica suplementada com FOS (prebiótico comercial).

Porém, estudos prévios relatam uma recuperação mais eficiente da diversidade da microbiota com a suplementação de MOS em comparação com outras fibras alimentares (Chen *et al.*, 2024). Além disso, Miao *et al.* (2021) observaram índices de α-diversidade de Shannon significativamente maiores quando ensaios *in vitro* foram realizados com a suplementação de OS de galactomananos, em relação ao controle positivo (FOS), após as 48 h de fermentação.

Desta forma, os resultados obtidos neste estudo são relevantes, pois corroboram a hipótese do efeito sinérgico da matriz péctica contendo OS-23 na promoção do aumento da diversidade da MIH.

5.9.3. Riqueza da diversidade da população bacteriana: avaliação da β-diversidade

A análise de β-diversidade avalia as diferenças na estrutura da comunidade microbiana entre grupos de amostras, permitindo a identificação de variações na composição microbiota entre diferentes condições experimentais. Essas diferenças podem ser quantificadas por meio da distância UniFrac, que considera a relação filogenética entre as espécies presentes nas amostras. A visualização dessas diferenças em duas dimensões pode ser realizada por meio da Análise de Coordenadas Principais (PCoA), um método estatístico multivariado utilizado para interpretar padrões de agrupamento entre as comunidades microbianas (Salsinha *et al.*, 2024).

As distâncias UniFrac não ponderadas entre duas amostras leva em consideração a árvore filogenética, calculando a fração do comprimento do ramo compartilhado entre as comunidades analisadas. Portanto, essa métrica reflete as distâncias filogenéticas entre os membros da comunidade microbiana, permitindo uma avaliação mais detalhada das similaridades e diferenças entre os grupos analisados (Kers; Saccenti, 2022).

A partir do processo de análise da sequenciação na região 16S, a matriz de valores composta pela abundância de ASVs em diferentes amostras foi utilizada para a análise PCoA (Figura 29). Na Figura 29, cada ponto representa uma amostra de um tempo distinto de fermentação, sendo codificado por cores de acordo com o grupo experimental. A distribuição das amostras no gráfico é determinada por dois componentes principais, representados nos eixos X e Y, onde o percentual indicado em cada eixo corresponde à contribuição relativa de cada componente para a variação observada entre as amostras. Além disso, o diagrama bidimensional de PCoA é apresentado com base nas primeira e segunda coordenadas principais.

Os resultados da análise PCoA demonstram que há clara diferenciação entre os grupos de amostras dos IC (0, 24 e 48 h) e os grupos de amostras dos meios suplementados com os hidrogéis, ao logo dos eixos PCoA 1 (19,93%) e PCoA 2 (10,04%). Essa diferenciação indica que a suplementação dos meios fermentativos com os hidrogéis influenciou significativamente a composição microbiana. Esse mesmo padrão foi observado no estudo realizado por Miao *et al.* (2021), onde foi identificada uma separação significativa entre as amostras suplementadas com OS (FOS e galactomananos) e o controle negativo.

Em relação aos hidrogéis Hydrogel OS-23 e Hydrogel Matriz, observa-se uma leve tendência de diferenciação entre os grupos de amostras referentes aos tempos 24 h e 48 h ao

longo do eixo PCoA 2 (10,04%). Esses resultados estão em concordância com os índices de α-diversidade de Chao1 e Shannon para essas mesmas amostras. Enquanto Hydrogel Matriz não apresentou diferenças estatisticamente significativas entre 24 h e 48 h para ambos os índices, Hydrogel OS-23 mostrou um aumento significativo nos valores de α-diversidade, com p = 0,0037 para o índice de Chao1 e p = 0,0136 índice de Shannon.

Entretanto, no caso do Hydrogel FOS não foi possível identificar uma diferenciação clara entre os grupos de amostras de 24 h e 48 h ao longo do eixo PCoA 2 (10,04%). Esse resultado pode estar correlacionado a elevada variação observada para esses grupos de amostras nos índices de Chao1 e Shannon (Figura 28b e Figura 28c), o que pode ter dificultado a distinção das amostras com base na análise de β-diversidade.

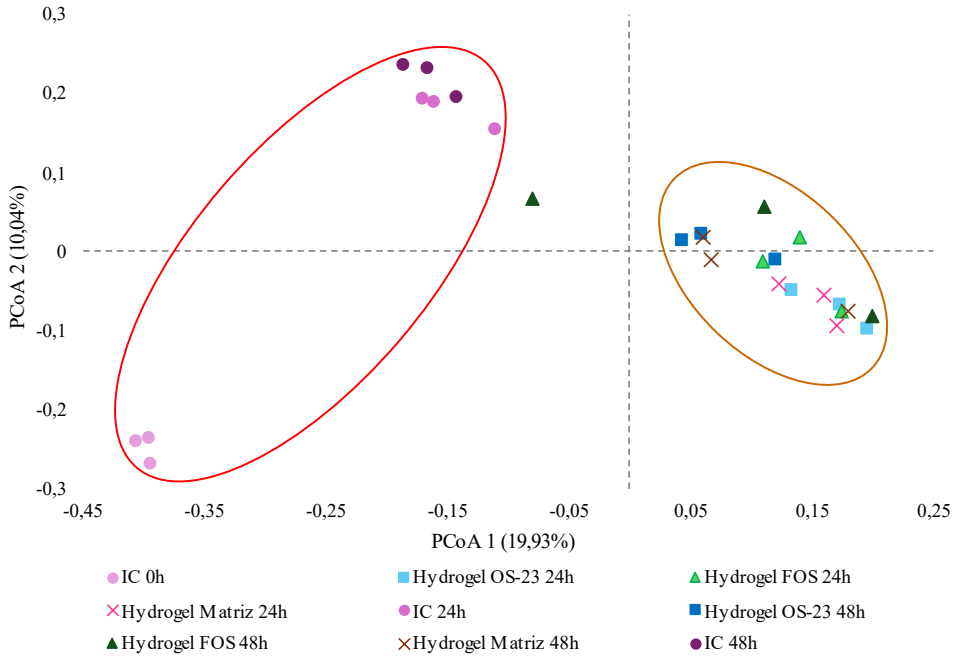


Figura 29 - Análise de coordenadas principais (PCoA) considerando as distâncias Unifrac não ponderadas.

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

5.9.4. Análise de abundância relativa bacteriana

Apesar dos efeitos promissores para a saúde e de potencial prebiótico demonstrados pelos OS-23 nas seções anteriores, é essencial avaliar o impacto na microbiota intestinal, considerando a fração do Hydrogel OS-23 que não foi absorvida após a digestão do TGI. Desta forma, foi realizada a análise de sequenciamento metagenômico do amplicon 16S, conduzida pela empresa Novogene e descrita na seção 4.10.5. Essa análise permitiu a determinação taxonômica dos 10 e 30 principais táxons de cada amostra, além da abundância por filos,

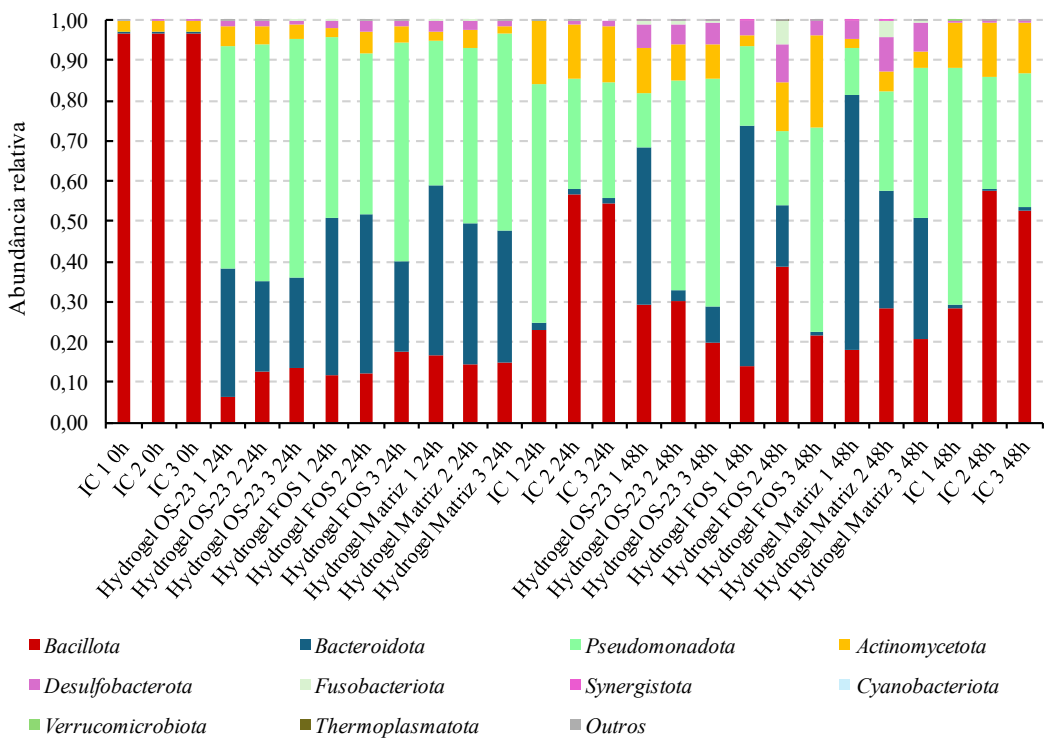
espécies e gênero, bem como da riqueza e diversidade bacteriana, por meio da análise de α-diversidade e β-diversidade.

A avaliação da abundância relativa bacteriana foi realizada por meio de histogramas, permitindo a visualização dos táxons predominantes e suas proporções nos diferentes níveis taxonômicos (filo, classe, ordem, família, gênero e espécie) (Salsinha *et al.*, 2024). Neste trabalho, foram apresentados histogramas de abundância relativa para cada amostra e para os grupos de amostra, abrangendo tanto os filos (Figura 30a e Figura 30c), quanto as espécies e gêneros (Figura 30b e Figura 30d).

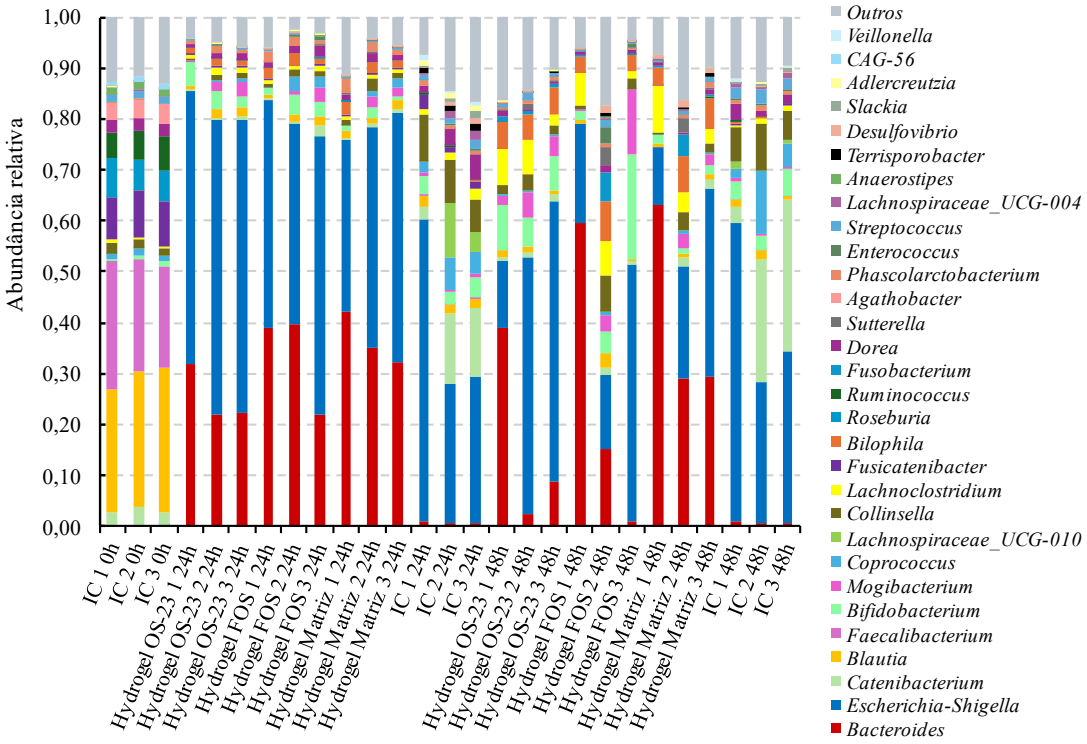
Em relação à abundância relativa nos dois níveis taxonômicos avaliados (filo, gênero e espécie), é possível observar que, no tempo 0h, a amostra do IC, que representa a microbiota basal antes da fermentação, apresenta uma alta proporção de bactérias do filo *Bacillota* (96,71%), equanto os filos *Bacteroidota* (0,44%) e *Actinomycetota* (2,77%) estão presentes em menores proporções.

Esse resultado era esperado, uma vez que os filos *Bacillota* e *Bacteroidota* são os mais representativos na microbiota intestinal. Além disso, o filo *Bacillota* inclui predominantemente bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, e *Ruminicoccus* (Stojanov; Berlec; Štrukelj, 2020), que desempenham funções importantes na homeostase intestinal e na fermentação de substratos disponíveis o ambiente intestinal.

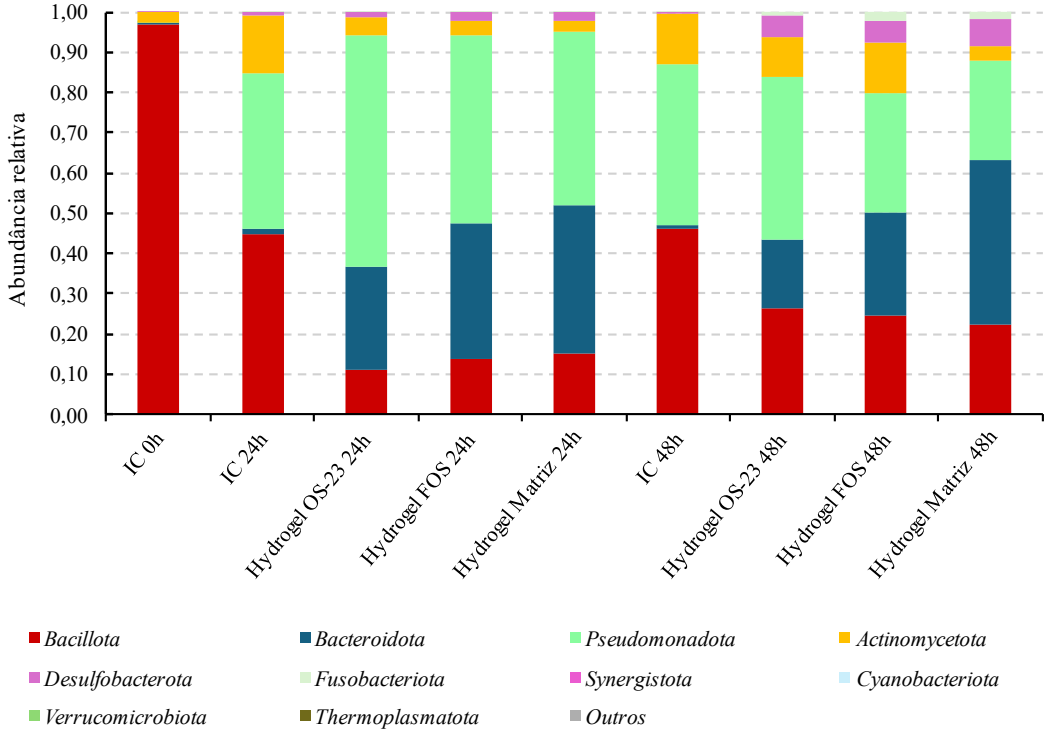
a)



b)


Abundância relativa
1,00
0,90
0,80
0,70
0,60
0,50
0,40
0,30
0,20
0,10
0,00
IC 1 0h
IC 2 0h
IC 3 0h
Hydrogel OS-23 1 24h
Hydrogel OS-23 2 24h
Hydrogel OS-23 3 24h
Hydrogel FOS 1 24h
Hydrogel FOS 2 24h
Hydrogel FOS 3 24h
Hydrogel Matriz 1 24h
Hydrogel Matriz 2 24h
Hydrogel Matriz 3 24h
IC 1 24h
IC 2 24h
IC 3 24h
Hydrogel OS-23 1 48h
Hydrogel OS-23 2 48h
Hydrogel OS-23 3 48h
Hydrogel FOS 1 48h
Hydrogel FOS 2 48h
Hydrogel FOS 3 48h
Hydrogel Matriz 1 48h
Hydrogel Matriz 2 48h
Hydrogel Matriz 3 48h
IC 1 48h
IC 2 48h
IC 3 48h
Outros
Veillonella
CAG-56
Adlercreutzia
Slackia
Desulfovibrio
Terrisporobacter
Anaerostipes
Lachnospiraceae_UCG-004
Streptococcus
Enterococcus
Phascolarctobacterium
Agathobacter
Sutterella
Dorea
Fusobacterium
Ruminococcus
Roseburia
Bilophila
Fusicatenibacter
Lachnoclostridium
Collinsella
Lachnospiraceae_UCG-010
Coprococcus
Mogibacterium
Bifidobacterium
Faecalibacterium
Blautia
Catenibacterium
Escherichia-Shigella
Bacteroides

c)


Abundância relativa
1,00
0,90
0,80
0,70
0,60
0,50
0,40
0,30
0,20
0,10
0,00
IC 0h
IC 24h
Hydrogel OS-23 24h
Hydrogel FOS 24h
Hydrogel Matriz 24h
IC 48h
Hydrogel OS-23 48h
Hydrogel FOS 48h
Hydrogel Matriz 48h
Bacillota
Bacteroidota
Pseudomonadota
Actinomycetota
Desulfobacterota
Fusobacteriota
Synergistota
Cyanobacteriota
Verrucomicrobiota
Thermoplasmatota
Outros

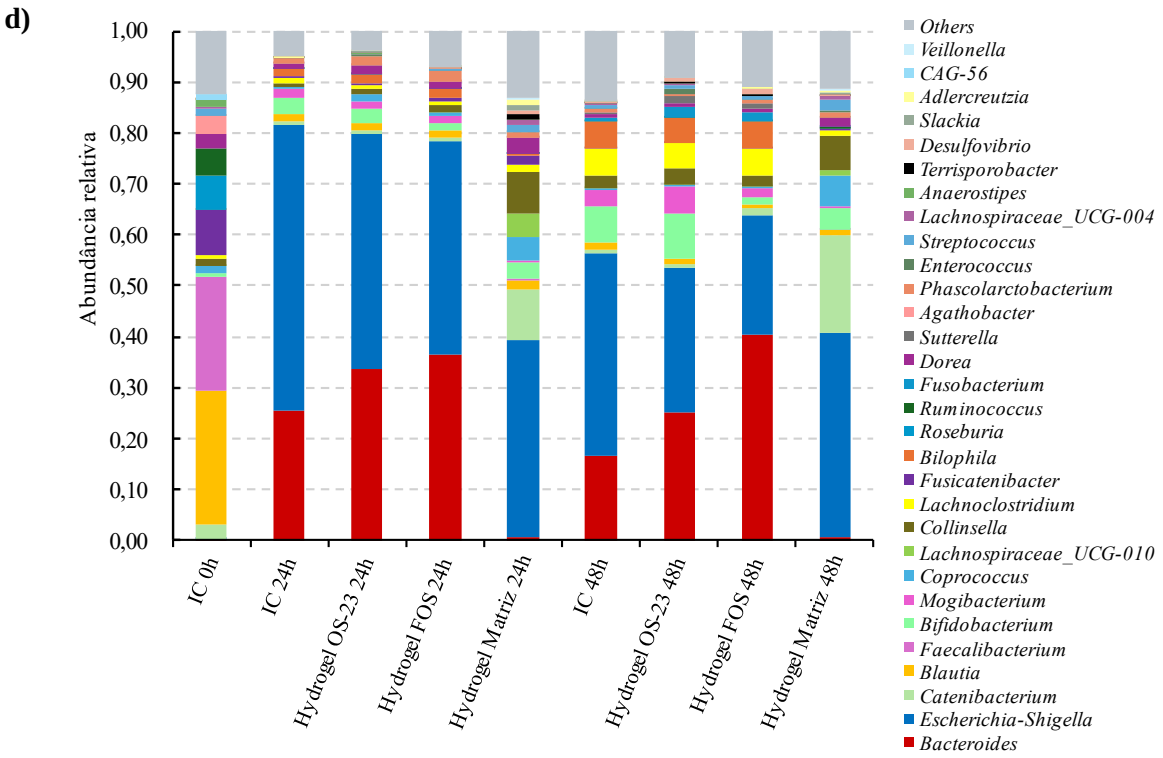


Figura 30 - Análise de abundância relativa das diferentes amostras testadas (Hydrogel OS-23, Hydrogel FOS, Hydrogel Matriz) e IC, nos diferentes tempos de fermentação (0, 24 e 48 h) (a) para os 10 principais táxons de cada amostra a nível dos filos; (b) para os 30 principais táxons de cada amostra a nível dos gêneros e espécies; (c) para os 10 principais táxons de cada grupo de amostra a nível dos filos; (d) para os 30 principais táxons de cada grupo de amostra a nível dos gêneros e espécies.

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Após as 48 h de fermentação, pode-se observar que, no grupo de amostras dos ICs, houve uma diminuição na abundância das bactérias do filo *Bacillota*, que passou de 96,71 % para 46,05%. Enquanto, as bactérias dos filos *Pseudomonadota* (de 0,01% para 40,09%) e *Actinomycetota* (de 2,77% para 12,50%) apresentaram um aumento da abundância relativa em relação ao IC no tempo 0 h. O padrão observado para os filos *Bacillota* e *Pseudomonadota* também foi observado por Miao *et al.* (2021), que relataram um comportamento semelhante ao utilizar OS de galactomananos extraídos da goma da semente de *Cassia*. Porém, os autores observaram um aumento na abundância de *Fusobacteriota*, o que não foi observado neste trabalho.

Além disso, ao longo das 48 h de fermentação, verificou-se um enriquecimento na diversidade das microbiota bacteriana, especialmente quando ao comparar as amostras dos hidrogéis com os ICs nos respectivos tempos de amostragem (Figura 30c e Figura 30d). Estes resultados são importantes, pois a redução da diversidade da MIH é um dos principais fatores associados à disbiose intestinal, fenômeno frequentemente observado em pacientes com doença de Crohn, síndrome do intestino irritável e câncer colorretal (Mosca; Leclerc; Hugot, 2016).

Em comparação com o grupo de amostras do IC às 24 h de fermentação, os hidrogéis promoveram um maior crescimento de bactérias do filo *Bacteroidota*, apresentando uma abundância relativa de 25,56%, 33,78% e 36,79% para o Hydrogel OS-23, Hydrogel FOS e Hydrogel Matriz, respectivamente, enquanto o IC apresentou apenas 1,36%. Entretanto, há uma diminuição da abundância relativa de bactérias do filo *Bacillota* nos hidrogéis, com valores de 10,90%, 13,66% e 15,19% para Hydrogel OS-23, Hydrogel FOS e Hydrogel Matriz, respectivamente, em comparação com os 44,70% observados no IC. Esse resultado pode ser explicado ao aumento da diversidade bacteriana na microbiota, indicando que a fermentação dos hidrogéis promoveu um ambiente mais equilibrado e diversificado, possivelmente favorecendo a proliferação de microrganismos benéficos.

O aumento na abundância de bactérias do filo *Bacteroidota* também foi observado por Miao *et al.* (2021). Entretanto, os autores observaram um aumento nas bactérias do filo *Bacillota*, enquanto neste estudo foi observado uma redução na abundância deste filo. Além disso, no estudo desenvolvido por Pérez-Burillo *et al.* (2019), os autores observaram que houve uma tendencia em que extratos com maiores concentrações de MOS, obtidos da BCF, favoreceram um aumento na abundância de bactérias do filo *Bacteroidota*.

Além disso, ao comparar os grupos de amostras dos hidrogéis Hydrogel OS-23, Hydrogel FOS e Hydrogel Matriz entre 24 h e 48 h de fermentação (Figura 30c e Figura 30d), os dados corroboram o enriquecimento da diversidade da microbiota. Esse efeito é evidenciado pelo aumento na abundância relativa de bactérias dos filos *Actinomycetota* e *Desulfobacterota* nas amostras de 48 h em comparação com as de 24 h.

Outro fator importante de se observar é que há uma semelhança no perfil dos filos de bactérias após as 48 h de fermentação entre os hidrogéis Hydrogel OS-23 e Hydrogel FOS. Essa modificação semelhante na estrutura da MIH entre as amostras suplementadas com Hydrogel OS-23 e Hydrogel FOS também foi reportada por Miao *et al.* (2021), que observaram um efetio similar entre os OS de galactomananas e o FOS. Assim, sugerindo que o Hydrogel OS-23 possui potencial para modular positivamente a microbiota intestinal, promovendo um ambiente mais equilibrado e diversificado.

Em relação à análise das principais espécies e gêneros presentes nos grupos de amostras analisados (Figura 30d), os resultados mostram, no tempo 0 h, o IC apresenta uma alta diversidade de gêneros e espécies em comparação com os grupos de amostras de 24 h, com predominância dos gêneros *Blautia* (26,40%) e *Faecalibacterium* (22,41%). Porém, conforme discutido anteriormente, a maioria dessas bactérias pertencem ao filo *Bacillota* (Figura 30c).

À medida que a fermentação progride, observa-se um aumento na abundância relativa de espécies que inicialmente estavam pouco representadas, o que indica um enriquecimento na diversidade da microbiota. Esse resultado reforça o papel da fermentação na modulação da comunidade microbiana e na diversificação dos microrganismos presentes.

Além disso, os hidrogéis foram capazes de promover um maior crescimento de bactérias do gênero *Bacteroides* em comparação com o IC, tanto após 24 h quanto após 48 h de fermetnação. Esse mesmo efeito foi observado em estudos anteriores, nos quais diferentes OS (galactomananos, MOS de farelo de coco e MOS de leveduras), foram utilizados em fermentações *in vitro* (Miao *et al.*, 2021; Prayoonthien *et al.*, 2019) e em experimentos com camundongos C57BL/6J (Chen *et al.*, 2024).

A suplementação do meio fermentativo com os hidrogéis digeridos estimulou o crescimento de bactérias do gênero *Bifidobacterium*, resultando em um aumento significativo na abundância relativa desse grupo ao longo da fermentação. Nos trabalhos de Miao *et al.* (2021)(OS de galactomananos), Panzella *et al.* (2017) (hidrolisado enzimático de BCF), Pérez-Burillo *et al.* (2019) (extrato hidrotérmico da BFC) e Prayoonthien *et al.* (2019) (hidrolisado enzimático da polpa seca do coco) também foi observado o aumento na abundância de bactérias benéficas do gênero *Bifidobacterium*, entretanto esses autores observaram também um aumento de bactérias benéficas do gênero *Lactobacillus*, o que não foi observado neste trabalho.

Essa diferença pode estar relacionada com o grau de polimerização tanto da matriz péctica quanto dos OS-23, uma vez que bactérias do gênero *Lactobacillus* apresentam preferência por OS de menor grau de polimerização (Sarghini *et al.*, 2021). Assim, a estrutura dos carboidratos presentes nos hidrogéis pode ter influenciado a seletividade microbiana durante a fermentação.

Ademais, outro resultado importante observado ao final das 48 h de fermentação foi que as formulações contendo OS-23 e FOS apresentaram abundâncias relativas de *Bifidobacterium* de 7,00% e 8,86%, respectivamente, enquanto a matriz péctica sem suplementação resultou em uma abundância significativamente menor (Figura 30d).

Esses valores representam um aumento de aproximadamente 2,3 a 2,9 vezes na abundância de *Bifidobacterium* em comparação com os 3,03% obtidos na suplementação de MOS da polpa seca do coco (Miao *et al.*, 2021). Esse resultado sugere que as formulações desenvolvidas apresentam um efeito sinérgico entre a matriz péctica e os OS, potencializando a modulação benéfica da MIH.

A presença de *Escherichia–Shigella* foi observada em todas as amostras a partir das 24 h de fermentação. Apesar de serem bactérias patogênicas, a presença destas bactérias na

microbiota intestinal é esperada e já foi descrita em estudos anteriores (Miao *et al.*, 2021; Salsinha *et al.*, 2024). Entretanto, é possível observar que com o decorrer da fermentação houve uma redução na abundância relativa destas bactérias para os grupos de amostras, em que os hidrogéis foram utilizados como substrato, após a digestão do TGI. Para o Hydrogel OS-23, a abundância reduziu de 56,27% (24 h); para 39,64% (48 h); para o Hydrogel FOS, de 46,22% (24 h) para 28,08% (48 h); e para o Hydrogel Matriz, de 41,95% (24 h) para 23,43% (48 h). Enquanto, nas amostras do IC, a abundância permaneceu relativamente constante, passando de 0,01% (0 h) para 38,43% (24 h) e 39,98% (48 h).

Este resultado é relevante, pois sugere que utilizar os hidrogéis como substrato favorece o crescimento de bactérias do gênero *Bifidobacterium*, contribuindo para o equilíbrio da microbiota intestinal. Além disso, a presença de microrganismos patogênicos na MIH é um fenômeno esperado e, em determinados contextos, pode desempenhar um papel importante no ecossistema intestinal. A interação competitiva entre bactérias benéficas e patogênicas por nutrientes essenciais, como fontes de carbono e minerais, contribui para a manutenção do equilíbrio microbiano e a regulação da microbiota intestinal (Horrocks *et al.*, 2023).

A comparação das abundâncias relativas de espécies bacterianas entre os grupos foi realizada através do teste *t* (Figura 31) com intervalos de confiança de 95%, cada barra representa a média da abundância das espécies que apresentam diferenças significativas entre os grupos de amostras. O limite esquerdo de cada círculo indica o limite inferior do intervalo de confiança de 95%, enquanto o limite direito correponde ao limite superior. O centro do círculo representa a diferença da média entre os grupos, e sua cor indica o grupo com maior média. O valor apresentado à direita do painel corresponde ao p-valor do teste de significância da diferença entre os grupos.

O teste t foi realizado para identificar variações estatisticamente significativas ($p < 0,05$) na abundância de bactérias entre Hydrogel OS-23 e IC às 24h e 48 h (Figura 31a e Figura 31b), bem como entre Hydrogel OS-23 e Hydrogel Matriz nos mesmos períodos (Figura 31c e Figura 31d) ($p < 0,05$) considerando diferentes níveis taxonômicos.

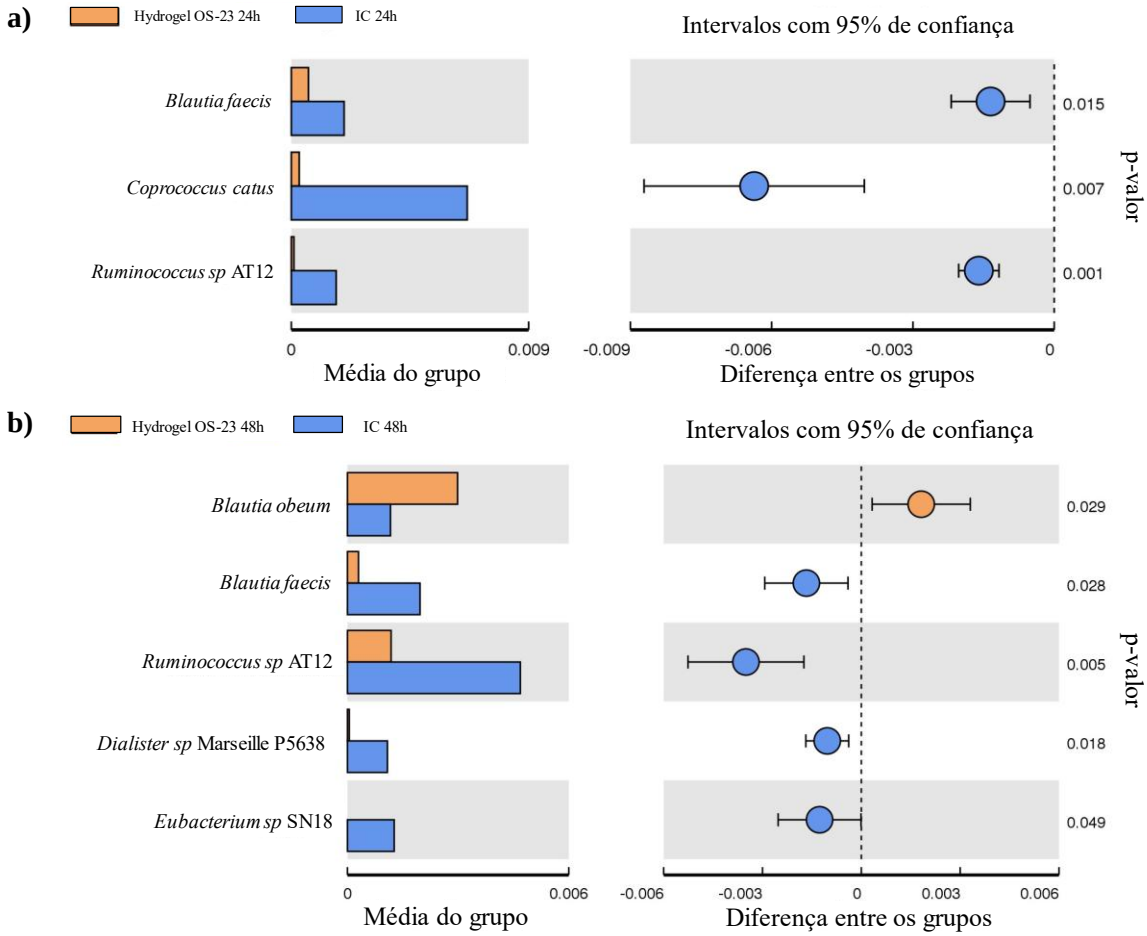
As 24 h, o IC apresentou níveis mais elevados das espécies *Blautia faecis*, *Coprococcus catus* e *Ruminococcus sp*. (Figura 31a). Após 48 h, observou-se que a suplementação do meio com o Hydrogel OS-23 favoreceu um crescimento maior da espécie *Blaudia obeum* ($p < 0,05$) em comparação ao IC.

A espécie *Coprococcus catus* tem sido associada a uma maior presença em amostras fecais de indivíduos obesos (IMC $\geq$25 kg/m^2) (Kasai *et al.*, 2015). Desta forma, a sua menor abundância nas amostras com Hydrogel OS-23 representa um resultado significativo, sugerindo

uma possível ação sinérgica benéfica dos oligossacarídeos extraídos da BCF e o hidrogel de pectina. Outro fator que pode ter influenciado para o menor crescimento de *Coprococcus* nas amostras da fermentação do Hydrogel OS-23 é sua reduzida capacidade de utilizar carboidratos como fonte de energia (Notting *et al.*, 2023). Esse aspecto metabólico pode ter limitado sua proliferação no ambiente fermentativo, favorecendo o crescimento de outras bactérias com maior aptidão para metabolizar os compostos presentes na formulação.

Em relação às bactérias do filo *Blautia*, essas são amplamente conhecidas por sua capacidade de produzir AGCC e por seu papel essencial no equilíbrio da microbiota intestinal. Entretanto, algumas espécies desse gênero podem estar associadas a condições especificas. Por exemplo, *Blautia faecis* foi encontrada em maior abundância no grupo de indivíduos com síndrome de Down (Hou *et al.*, 2023).

Por outro lado, estudos indicam que *B. obeum* pode desempenhar um papel benéfico na microbiota intestinal, uma vez que sua presença demostrou inibir a proliferação de *C. perfringens* e enterococos resistentes à vancomicina, sugerindo um potencial efeito probiótico (Liu, Xuemei *et al.*, 2021).



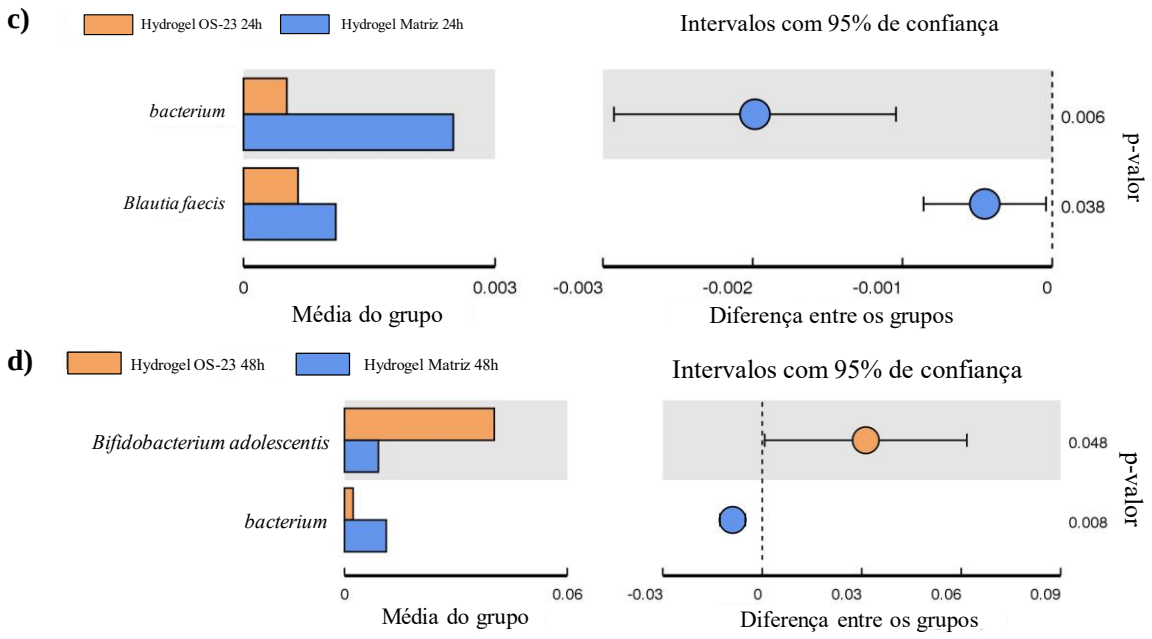


Figura 31 - Comparação das abundâncias relativas de espécies bacterianas com diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, baseada no teste *t* para (a) Hydrogel OS-23 e IC às 24 h; (b) Hydrogel OS-23 e IC às 48 h; (c) Hydrogel OS-23 e Hydrogel Matriz às 24 h; (d) Hydrogel OS-23 e Hydrogel Matriz às 48 h.

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Ao analisar os resultados dos testes t entre os grupos Hydrogel OS-23 e Hydrogel Matriz, observa-se que, após às 24h (Figura 31c e Figura 31d), é possível verificar a presença de bactérias da espécie *B. faecis* foi menor no grupo suplementado com Hydrogel OS-23 em comparação com Hydrogel Matriz. Além disso, é possível destacar o efeito sinérgico da matriz péctica contendo OS-23, que favoreceu um crescimento significativamente maior de *Bifidobacterium adolescentis* ($p = 0,048$) em relação ao meio suplementado apenas com o Hydrogel Matriz, reforçando o potencial prebiótico da formulação contendo OS-23.

Ademais, um estudo realizado com ratos Groningen suplementados com cepas de *B. adolescentis* confirmou a capacidade desses microrganismos de estimular a produção *in vivo* de ácido gama-aminobutírico (GABA, sigla em inglês), o principal neurotransmissor inibitório do sistema nervosa central. O GABA desempenha um papel fundamental na regulação dos transtornos de ansiedade e depressão em mamíferos, destacando a potencial influência de *B. adolescentis* nas interações do eixo intestino-cérebro (Duranti *et al.*, 2020).

Outro resultado relevante é que não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) na composição das espécies bacterianas no meio fermentativo entre as amostras de Hydrogel OS-23 e Hydrogel FOS, tanto após 24 h quanto após 48 h de fermentação. Esse resultado é relevante, pois o FOS é um prebiótico bem estabelecido e utilizado comercialmente. Desta forma, os dados indicam que o efeito sinérgico promovido por Hydrogel

OS-23 foi equivalente ao do Hydrogel FOS, reforçando o potencial prebiótico da formulação contendo OS-23.

Além disso, esses resultados estão em concordância com os obtidos nos testes *in vitro* com cepas das espécies *Lacticaseibacillus*, *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* avaliadas neste estudo (seção 5.6.2). Essa consistência entre os resultados sugere a capacidade do Hydrogel OS-23 de estimular seletivamente o crescimento de microrganismos benéficos na microbiota.

5.9.5. Análise da concentração dos AGCC

A microbiota intestinal desempenha um papel essencial na produção de diversos metabólitos e moléculas de sinalização que impactam diretamente a saúde humana (Horrocks *et al.*, 2023). Os AGCC vêm recebendo atenção recentemente devido à sua capacidade de modular uma ampla variedade de doenças. Esses compostos são produzidos pelas bactérias anaeróbicas do intestino a partir da fermentação de carboidratos complexos, incluindo polissacarídeos, oligossacarídeos e açúcares monoméricos (Salsinha *et al.*, 2024). Além do intestino, outros tecidos desempenham um papel importante na sinalização mediada pelos AGCC. Estruturas como o pâncreas, o fígado e o tecido adiposo expressam receptores específicos para esses metabólitos, o que sugere que a produção e a disponibilidade de AGCC podem exercer efeitos sistêmicos benéficos além do trato gastrointestinal (Anachad *et al.*, 2023).

Nesse contexto, este estudo avaliou a produção de AGCC majoritários (ácidos acético, propiônico e butírico) sintetizados por bactérias anaeróbicas intestinais (Salsinha *et al.*, 2024), bem como a produção de AGCC minoritários (ácidos isobutírico, isovalérico e valérico) durante os ensaios *in vitro* de fermentação colônica. As análises foram feitas para as diferentes amostras, incluindo Hydrogel OS-23, Hydrogel FOS, Hydrogel Matriz e IC.

As concentrações dos AGCC majoritários foram monitoradas ao longo das 48 h de fermentação colônica para cada uma faz formulações testadas. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 32, permitindo a comparação da produção desses metabólitos entre os diferentes grupos experimentais.

Na Figura 32, os valores representam as médias de triplicatas biológicas e duplicatas analíticas ± desvios padrão. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$). As letras maiúsculas (A, B, C) representam as diferenças entre as amostras (Hydrogel OS-23, Hydrogel FOS, Hydrogel Matriz e IC) no mesmo tempo de amostragem. Já as letras minúsculas (a, b, c) indicam as diferenças estatísticas para a mesma amostra ao longo do tempo.

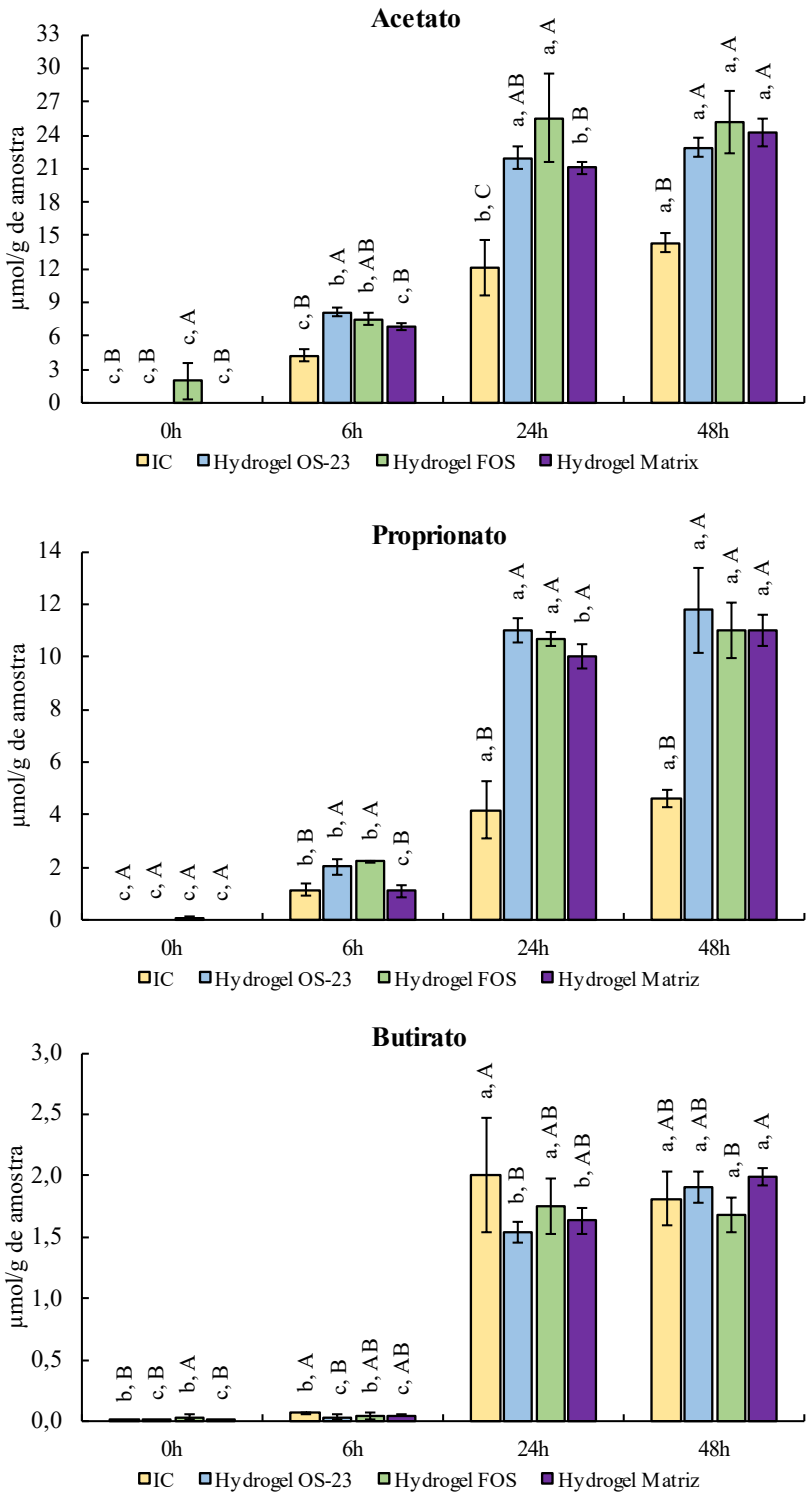


Figura 32 - Concentrações dos AGCC majoritários (acetato, propionato e butirato) (µmol de AGCC por g de amostra fermentada) para as diferentes amostras avaliadas ao longo dos ensaios de fermentação colônica.

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Após as 48 horas de fermentação colônica, foi observado que todas as amostras foram capazes de promover um aumento significativo ($p < 0,05$) na produção dos principais AGCC até as 24 horas de fermentação. Após esse período, as concentrações de acetato, propionato e

butirato permaneceram relativamente estáveis ou apresentaram aumentos pouco expressivos. O acetato foi o AGCC produzido em maiores concentrações pelas bactérias, um padrão também relatado em estudos anteriores que utilizaram hidrolisados ricos em MOS obtidos da BCF (Panzella *et al.*, 2017; Pérez-Burillo *et al.*, 2019) e para OS de galactomananos (Miao *et al.*, 2021).

Em relação ao acetato, às 24 h de fermentação, as maiores concentrações ($p < 0,05$) foram observadas nas amostras fermentadas de Hydrogel OS-23 e do Hydrogel FOS, atingindo valores de 21,96 ± 1,05 µmol/g e 25,53 ± 3,99 µmol/g, respectivamente. Enquanto a menor concentração foi registrada no IC, com 12,12 ± 2,52 µmol/g da amostra fermentada.

Após 48 h de fermentação, todas as formulações de hidrogel (Hydrogel OS-23, Hydrogel FOS, Hydrogel Matriz), apresentaram concentrações estatisticamente semelhantes ($p > 0,122$) de acetato, com valores de 22,92 ± 0,82 µmol/g, 25,15 ± 2,77 µmol/g e 24,26 ± 1,30 µmol/g das amostras fermentadas, respectivamente. Além disso, o IC apresentou uma produção significativamente menor ($p = 0,0002$) de acetato em comparação com as formulações hidrogel, atingindo apenas 14,37 ± 0,89 µmol/g da amostra fermentada. A presença do acetato tem sido associada a efeitos benéficos na proteção contra distúrbios metabólicos adiposos e hepáticos (Olaniyi *et al.*, 2022). Além disso, estudos sugerem que a redução dos níveis de acetato pode estar correlacionada com a deterioração cognitiva no longo prazo (Zheng *et al.*, 2021).

Esses resultados indicam que os hidrogéis foram capazes de aumentar significativamente a produção de acetato ($p < 0,05$) durante as fermentações colônicas, o que pode ser um resultado relevante devido aos benefícios desse metabolito no trato colorretal. O aumento da concentração de acetato tem sido associado a efeitos protetores sobre a mucosa intestinal, modulação da inflamação e melhoria da homeostase do tecido epitelial do cólon (Fusco *et al.*, 2023).

Entretanto, a presença de 0,50% de OS-23 ($p = 0,506$) e FOS ($p = 0,790$) nas respectivas amostras não influenciou significativamente a produção de acetato após 48 horas em comparação com a concentração produzida a partir da fermentação do Hydrogel Matriz. Esses dados sugerem que a matriz péctica, independentemente da suplementação com OS-23 ou FOS, foi suficiente para estimular a produção desse AGCC, possivelmente devido à sua fermentação pelas bactérias intestinais presentes nos ensaios.

Além disso, bactérias pertencentes aos gêneros *Bifidobacterium, Lactobacillus*, *Prevotella*, *Ruminococcus*., *Bacteroides*, *Clostridium* e *Streptococcus*,e espécies *Akkermansia muciniphila* e *Blautia hydrogenotrophica* são conhecidas por produzirem acetato através do metabolismo do piruvato, enquanto as bactérias acetogênicas utilizam a via de Wood–

Ljungdahl para a sínteses de acetato (Salsinha *et al.*, 2024). Desta forma, o aumento significativo na abundância relativa das bactérias dos gêneros *Bifidobacterium* e *Bacteroides* (Figura 30d) nas amostras suplementadas com os hidrogéis, em comparação com o IC após 48 h de fermentação, está em concordância com o aumento da produção de acetato.

Em relação ao propionato, foi observado um aumento na sua concentração até as 24 horas de fermentação para todas as amostras analisadas. Porém, após esse período, apenas o Hydrogel Matriz apresentou um aumento estatisticamente significativo ($p = 0,001$) na concentração de propionato, atingindo 11,04 ± 0,59 µmol/g da amostra fermentada.

Após 48 h de fermentação, o IC apresentou a menor concentração de propionato, com 4,60 ± 0,34 µmol/g da amostra fermentada. Enquanto, todas as formulações de hidrogel foram capazes de promover a produção de concentrações estatisticamente semelhantes de propionato ($p > 0,598$), sendo 11,78 ± 1,61 µmol/g para o Hydrogel OS-23, 11,04 ± 1,05 µmol/g para o Hydrogel FOS e 11,04 ± 0,59 µmol/g para o Hydrogel Matriz.

Esses resultados sugerem que a fermentação das formulações de hidrogéis favoreceu a produção de propionato em níveis superiores aos observados no IC, reforçando o potencial dos hidrogéis na modulação da microbiota intestinal. Isso porque o propionato é produzido pelas bactérias intestinais através das vias do acrilato, propanodiol e succinato, esta última via é a utilizada por bactérias do filo *Bacteroidota* e diversas bactérias *Bacillota* pertencentes à classe *Negativicutes* e espécies *Coprococcus catus*, *Salmonella enterica*, *Roseburia inulinivorans* e *Akkermansia muciniphila* (Salsinha *et al.*, 2024). Desta forma, o aumento na abundância de bactérias do gênero *Bacteroidota* e *Bacillota* em relação ao IC (Figura 30d), promovido pela fermentação dos hidrogéis, corroboram com as maiores concentrações de propionato observadas nas amostras.

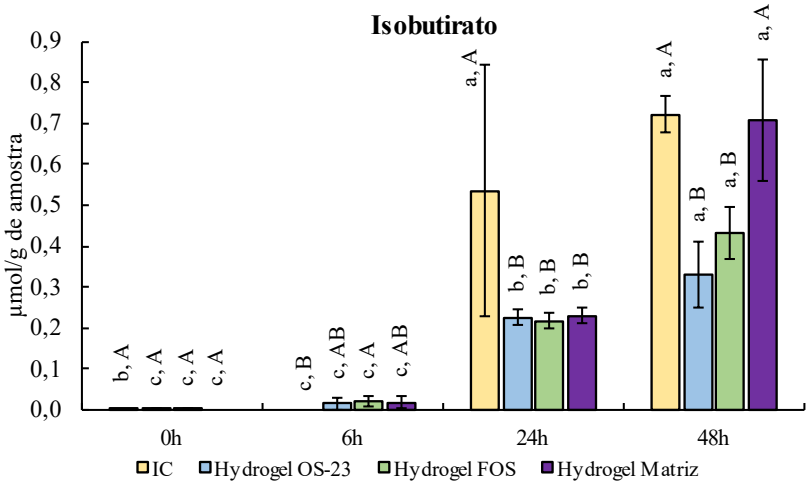
Em relação ao butirato, assim como para o acetato e o propionato, foi observado um aumento significativo ($p < 0,05$) na sua concentração entre 6 e 24 h de fermentação para todas as amostras analisadas. Porém, após 48 h, o Hydrogel OS-23 apresentou uma concentração de butirato de 1,91 ± 0,12 µmol/g da amostra fermentada, sem diferenças estatisticamente significativas quando comparado ao Hydrogel FOS (1,68 ± 0,14 µmol/g da amostra fermentada, $p = 0,071$), Hydrogel Matriz (1,99 ± 0,08 µmol/g da amostra fermentada, $p = 0,755$) e IC (1,82 ± 0,22 µmol/g da amostra fermentada, $p = 0,721$).

Estudos demonstraram que a suplementação com MOS (Panzella *et al.*, 2017; Prayoonthien *et al.*, 2019) e OS de galactomananos (Miao *et al.*, 2021) proporcionam maiores concentrações de propionato em relação ao butirato, um padrão que foi observado neste estudo. Entretanto, Pérez-Burillo *et al.* (2019) relataram concentrações de propionato e butirato, mas

equilibradas, sugerindo que diferentes fontes e estruturas de OS podem influenciar a produção desses metabólitos devido ao favorecimento do crescimento de bactérias específicas que metabolizam os diferentes OS. O butirato é produzido pelas vias butirato quinase e butiril-CoA, envolvendo principalmente bactérias dos gêneros *Ruminococcus*, *Anaerostipes* e *Roseburia*, e espécies *Coprococcus catus*, *Eubacterium rectale*, *Eubacterium hallii* e *Faecalibacterium prausnitzii* (Salsinha *et al.*, 2024). Em relação a via do butiril-CoA, esta via converte o acetato em butirato através da alimenta cruzada (*cross-feeding*) que pode ocorrer entre bactérias do gênero *Bifidobacterium* e *Faecalibacterium* (Rios-Covian *et al.*, 2015).

A baixa ou nula presença de bactérias produtoras de butirato está de acordo com as baixas concentrações desse AGCC detectadas neste estudo. Desta forma, esses resultados reforçam a relação entre a composição da microbiota intestinal e a produção seletiva de AGCC durante a fermentação colônica dos hidrogéis pela MIH.

Além dos AGCC majoritários, este estudo também avaliou produção de AGCC minoritários (ácidos isobutírico, isovalérico e valérico) sintetizados por bactérias anaeróbicas intestinais ao longo das 48 h de fermentação colônica. As concentrações desses metabolitos foram analisadas para as diferentes amostras (Hydrogel OS-23, Hydrogel FOS, Hydrogel Matriz e IC) e estão apresentadas na Figura 33. Na Figura 33, os valores representam as médias de triplicatas biológicas e duplicatas analíticas ± desvios padrão. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$). As letras maiúsculas (A, B, C) representam as diferenças entre as amostras (Hydrogel OS-23, Hydrogel FOS, Hydrogel Matriz e IC) no mesmo tempo de amostragem. Já as letras minúsculas (a, b, c) indicam as diferenças estatísticas para a mesma amostra ao longo do tempo.



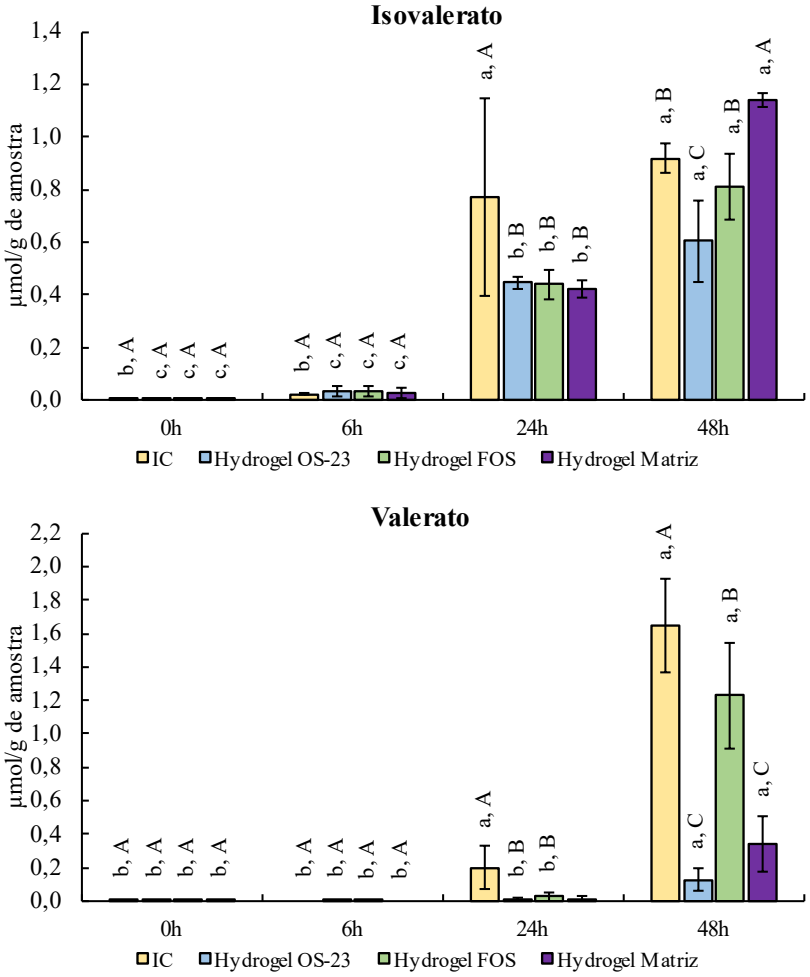


Figura 33 - Concentrações dos AGCC minoritários (isobutitato, isovalerato e valerato) (µmol de AGCC por g de amostra fermentada) para as diferentes amostras avaliadas ao longo dos ensaios de fermentação colônica.

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Em relação à produção de isobutirato, observou-se um aumento significativo na concentração desse AGCC entre 6 e 24 h ($p < 0,05$). As maiores concentrações foram alançadas ao final de 48 h de fermentação para todas as amostras ($p < 0,05$). Os valores obtidos foram de 0,33 ± 0,08 µmol/g para Hydrogel OS-23, 0,43 ± 0,06 µmol/g para o Hydrogel FOS, 0,71 ± 0,15 µmol/g para Hydrogel Matriz e 0,72 ± 0,04 µmol/g para o IC

Com relação ao isso-valerato, o Hydrogel Matriz apresentou a maior concentração ao final de 48 h de fermentação, atingindo 1,14 ± 0,03 µmol/g da amostra fermentada ($p < 0,05$). No entanto, os Hydrogéis OS-23 e FOS apresentaram concentrações significativamente menores, de 0,61 ± 0,16 µmol/g e 0,81 ± 0,12 µmol/g, respectivamente. Além disso, a capacidade do Hydrogel OS-23 de promover a produção de iso-valerato foi inferior à do IC, que atingiu uma concentração de 0,92 ± 0,06 µmol/g da amostra fermentada.

A produção significativa de valerato foi observada após 48 h para todas as amostras testadas, com exceção do IC, que apresentou uma concentração de 0,20 ± 0,13 µmol/g de amostra fermentada. Enquanto, a maior concentração de valerato, ($p < 0,05$) foi registrada no IC, atingindo 1,65 ± 0,28 µmol/g de amostra fermentada. Por outro lado, o Hydrogel OS-23 promoveu uma produçãoa menor produção de valerato, com uma concentração de 0,13 ± 0,07 µmol/g de amostra fermentada, sendo estatisticamente semelhante à concentração observada para o Hydrogel Matriz (0,34 ± 0,16 µmol/g da amostra fermentada).

6. CONCLUSÕES

A borra de café (BCF), resíduo gerado ao longo da cadeia produtiva do café, tem como principal destino o descarte em aterros sanitários, o que representa não apenas um passivo ambiental, mas também uma subutilização de um material com elevado potencial biotecnológico. Neste contexto, este trabalho demonstrou a valorização da BCF por meio da produção de oligossacarídeos, através do pré-tratamento com ácido diluído e do processo hidrotérmico.

A caracterização da BCF demonstrou que a hemicelulose foi a fração mais abundante, sendo composta majoritariamente por manose, o que confere à biomassa um perfil favorável à obtenção de oligossacarídeos (OS) com aplicação como nutracêuticos. Os resultados obtidos a partir do planejamento experimental indicaram que variáveis como temperatura, concentração ácida e relação sólido/líquido influenciam a extração eficiente dos OS. Na condição otimizada, foi possível obter um rendimento de 21,40 g de OS por 100 g de BCF seca, com predominância de manobiose e uma proporção manose:galactose:arabinose de 1:1:1.

A análise de Avaliação do Ciclo de Vida agregou uma dimensão ambiental ao estudo, evidenciando que as etapas de precipitação e recuperação de solventes são as mais relevantes em termos de impacto ambiental. O ensaio 23, pré-tratamento hidrotérmica, além de apresentar o menor impacto ambiental entre os ensaios hidrotérmicos, também permitiu a obtenção de OS com maior concentração de galactose e presença de minerais.

Ensaios funcionais *in vitro* demonstraram a capacidade dos OS extraídos em modular a microbiota intestinal, com destaque para o Hydrogel OS-23, que se mostrou resistente à digestão gástrica e colônica, sendo eficientemente fermentada por bactérias residentes. A suplementação com Hydrogel OS-23 resultou em aumento da diversidade bacteriana e da produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), com destaque para o acetato, corroborando seu potencial efeito prebiótico.

Portanto, este estudo reforça a viabilidade da BCF como matéria-prima alternativa para a geração de compostos bioativos de alto valor agregado, integrando perspectivas tecnológicas, funcionais e ambientais. A valorização da BCF, conforme demonstrado, está alinhada com os princípios da bioeconomia e da economia circular, além de contribuir com as Metas Globais 3 (Boa Saúde e Bem-Estar) e 12 (Consumo e Produção Responsáveis). Estudos futuros devem considerar a validação dos efeitos funcionais em modelos *in vivo*, bem como análises de viabilidade econômica e escalonamento do processo para aplicação industrial.

REFERÊNCIAS

ABBASI-PARIZAD, Parisa *et al.* Recovery of phenolic compounds from agro-industrial by-products: Evaluating antiradical activities and immunomodulatory properties. **Food and Bioproducts Processing**, [*s. l.*], v. 127, p. 338–348, 2021.

AGAZZI, Alessandro *et al.* Dietary Mannan Oligosaccharides Modulate Gut Inflammatory Response and Improve Duodenal Villi Height in Post-Weaning Piglets Improving Feed Efficiency. **Animals**, [*s. l.*], v. 10, n. 8, p. 1283, 2020.

AGUIAR, Laís Marinho; CAZARIN, Cínthia Baú Betim. In vitro and in vivo methods to predict carbohydrate bioaccessibility. **Current Opinion in Food Science**, [*s. l.*], v. 42, p. 69–75, 2021.

AGUIRRE, Marisol *et al.* To pool or not to pool? Impact of the use of individual and pooled fecal samples for in vitro fermentation studies. **Journal of Microbiological Methods**, [*s. l.*], v. 107, p. 1–7, 2014.

AL-ABDULKADER, Ahmed M. *et al.* Optimizing coffee cultivation and its impact on economic growth and export earnings of the producing countries: The case of Saudi Arabia. **Saudi Journal of Biological Sciences**, [*s. l.*], v. 25, n. 4, p. 776–782, 2018.

AMARO BITTENCOURT, Gustavo *et al.* Integrated Soybean Hull Biorefinery with Citric Acid-Catalyzed Hydrothermal Pretreatment for L-Lactic Acid and Xylooligosaccharide Production. **BioEnergy Research**, [*s. l.*], v. 17, n. 3, p. 1648–1661, 2024.

ANACHAD, Oumaima *et al.* The Implication of Short-Chain Fatty Acids in Obesity and Diabetes. **Microbiology Insights**, [*s. l.*], v. 16, p. 117863612311627, 2023.

ANTIA, Ukponobong E. *et al.* Bioconvertibility of mannan-containing polysaccharides to bioethanol: a comparative study of palm kernel cake and copra meal feedstocks. **Biomass Conversion and Biorefinery**, [*s. l.*], v. 13, n. 6, p. 5175–5186, 2023.

ARAÚJO-RODRIGUES, Helena *et al.* The Potential of Acorn Extract Treatment on PUFAs Oxidative Stability: A Case Study on Fish Cooking Wastewater. **Foods**, [*s. l.*], v. 13, n. 6, p. 935, 2024.

ARNLING BÅÅTH, Jenny *et al.* Mannanase hydrolysis of spruce galactoglucomannan focusing on the influence of acetylation on enzymatic mannan degradation. **Biotechnology for Biofuels**, [*s. l.*], v. 11, n. 1, p. 114, 2018.

ARYA, Shalini S. *et al.* **The wastes of coffee bean processing for utilization in food: a review**. [*S. l.*]: Springer, 2022.

ASHAOLU, T.J.; ASHAOLU, J.O.; ADEYEYE, S.A.O. Fermentation of prebiotics by human colonic microbiota *in vitro* and short-chain fatty acids production: a critical review. **Journal of Applied Microbiology**, [*s. l.*], v. 130, n. 3, p. 677–687, 2021.

ÁVILA, Patrícia F. *et al.* **Cello-oligosaccharides production from lignocellulosic biomass and their emerging prebiotic applications**. [*S. l.*]: Springer Science and Business Media B.V., 2021.

AWASTHI, Mukesh Kumar *et al.* Emerging trends of microbial technology for the production of oligosaccharides from biowaste and their potential application as prebiotic. **International Journal of Food Microbiology**, [*s. l.*], v. 368, 2022.

AZEVEDO, Ligia B. *et al.* Global assessment of the effects of terrestrial acidification on plant species richness. **Environmental Pollution**, [*s. l.*], v. 174, p. 10–15, 2013.

BAKSI, S. *et al.* Pre-treatment of lignocellulosic biomass: review of various physico-chemical and biological methods influencing the extent of biomass depolymerization. **International Journal of Environmental Science and Technology**, [*s. l.*], v. 20, n. 12, p. 13895–13922, 2023.

BALLESTEROS, Lina F. *et al.* Characterization of polysaccharides extracted from spent coffee grounds by alkali pretreatment. **Carbohydrate Polymers**, [*s. l.*], v. 127, p. 347–354, 2015.

BALLESTEROS, Lina F.; TEIXEIRA, José A.; MUSSATTO, Solange I. Chemical, Functional, and Structural Properties of Spent Coffee Grounds and Coffee Silverskin. **Food and Bioprocess Technology**, [*s. l.*], v. 7, n. 12, p. 3493–3503, 2014.

BALLESTEROS, Lina F.; TEIXEIRA, José A.; MUSSATTO, Solange I. Extraction of polysaccharides by autohydrolysis of spent coffee grounds and evaluation of their antioxidant activity. **Carbohydrate Polymers**, [*s. l.*], v. 157, p. 258–266, 2017.

BARBOSA, Fernando C. *et al.* Production of cello-oligosaccharides through the biorefinery concept: A technical-economic and life-cycle assessment. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, [*s. l.*], v. 15, n. 6, p. 1763–1774, 2021.

BARUAH, Julie *et al.* **Recent trends in the pretreatment of lignocellulosic biomass for value-added products**. [*S. l.*]: Frontiers Media S.A., 2018.

BASAK, Bikram *et al.* Advances in physicochemical pretreatment strategies for lignocellulose biomass and their effectiveness in bioconversion for biofuel production. **Bioresource Technology**, [*s. l.*], v. 369, p. 128413, 2023.

BEHERA, Bikash Chandra; MISHRA, Rashmiranjan; MOHAPATRA, Sonali. Microbial citric acid: Production, properties, application, and future perspectives. **Food Frontiers**, [*s. l.*], v. 2, n. 1, p. 62–76, 2021.

BEST COFFEE. **5 Companies reusing coffee waste to create luxury products.** [*S. l.*], 2021.

BHATURIWALA, Rizwan A.; MODI, Hasmukh A. Extraction of oligosaccharides and phenolic compounds by roasting pretreatment and enzymatic hydrolysis from spent coffee ground. **Journal of Applied Biology and Biotechnology**, [*s. l.*], v. 8, n. 4, p. 75–81, 2020.

BIAGINI, Francesco *et al.* Designs and methodologies to recreate in vitro human gut microbiota models. **Bio-Design and Manufacturing**, [*s. l.*], v. 6, n. 3, p. 298–318, 2023.

BIRCHER, Lea *et al.* Planktonic and Sessile Artificial Colonic Microbiota Harbor Distinct Composition and Reestablish Differently upon Frozen and Freeze-Dried Long-Term Storage. **mSystems**, [*s. l.*], v. 5, n. 1, 2020.

BISWAS, Avishek *et al.* Production performance, immune response and blood biochemical parameters in broiler chickens fed diet incorporated with prebiotics. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, [*s. l.*], v. 103, n. 2, p. 493–500, 2019.

BOUHZAM, Ibtissam *et al.* Extraction of Bioactive Compounds from Spent Coffee Grounds Using Ethanol and Acetone Aqueous Solutions. **Foods**, [*s. l.*], v. 12, n. 24, p. 4400, 2023.

BRAVO, Jimena *et al.* Influence of extraction process on antioxidant capacity of spent coffee. **Food Research International**, [*s. l.*], v. 50, n. 2, p. 610–616, 2013.

BRODKORB, André *et al.* INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. **Nature Protocols**, [*s. l.*], v. 14, n. 4, p. 991–1014, 2019.

CABALLERO-GALVÁN, Ashley Sthefanía *et al.* Analysis of Extraction Kinetics of Bioactive Compounds from Spent Coffee Grounds (Coffea arábica). **Waste and Biomass Valorization**, [*s. l.*], v. 9, n. 12, p. 2381–2389, 2018.

CAICEDO-LOPEZ, L.H. *et al.* Effect of the in vitro gastrointestinal digestion on free-phenolic compounds and mono/oligosaccharides from Moringa oleifera leaves: Bioaccessibility, intestinal permeability and antioxidant capacity. **Food Research International**, [*s. l.*], v. 120, p. 631–642, 2019.

CASSOL, Ignacio; IBAÑEZ, Mauro; BUSTAMANTE, Juan Pablo. Key features and guidelines for the application of microbial alpha diversity metrics. **Scientific Reports**, [*s. l.*], v. 15, n. 1, p. 622, 2025.

CASTALDO, Luigi *et al.* In vitro bioaccessibility and antioxidant activity of polyphenolic compounds from spent coffee grounds-enriched cookies. **Foods**, [*s. l.*], v. 10, n. 8, 2021.

CATENZA, K. F.; DONKOR, K. K. Recent approaches for the quantitative analysis of functional oligosaccharides used in the food industry: A review. **Food Chemistry**, [*s. l.*], v. 355, 2021.

CHAKRABORTY, Prasenjit *et al.* Technological advancements in the pretreatment of lignocellulosic biomass for effective valorization: A review of challenges and prospects. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, [*s. l.*], v. 137, p. 29–60, 2024.

CHEN, Jing *et al.* Mannan-oligosaccharides promote gut microecological recovery after antibiotic disturbance. **Food & Function**, [*s. l.*], v. 15, n. 7, p. 3810–3823, 2024.

CHOHAN, Imran Mir *et al.* A review on life cycle assessment of different pipeline materials. **Results in Engineering**, [*s. l.*], v. 19, p. 101325, 2023.

CHRISTMAS, Colleen; ROGUS-PULIA, Nicole. Swallowing Disorders in the Older Population. **Journal of the American Geriatrics Society**, [*s. l.*], v. 67, n. 12, p. 2643–2649, 2019.

CHUNG, Wing Sun Faith *et al.* Prebiotic potential of pectin and pectic oligosaccharides to promote anti-inflammatory commensal bacteria in the human colon. **FEMS Microbiology Ecology**, [*s. l.*], v. 93, n. 11, 2017.

COSCUETA, Ezequiel R.; REIS, Celso A.; PINTADO, Manuela. Phenylethyl Isothiocyanate Extracted from Watercress By-Products with Aqueous Micellar Systems: Development and Optimisation. **Antioxidants**, [*s. l.*], v. 9, n. 8, p. 698, 2020.

DE CARVALHO, Nelson Mota *et al.* Can Supplemented Skim Milk (SKM) Boost Your Gut Health?. **Fermentation**, [*s. l.*], v. 8, n. 3, 2022.

DE CARVALHO, Nelson Mota *et al.* Potential prebiotic activity of Tenebrio molitor insect flour using an optimized in vitro gut microbiota model. **Food and Function**, [*s. l.*], v. 10, n. 7, p. 3909–3922, 2019.

DE CARVALHO, Nelson Mota *et al.* Preservation of human gut microbiota inoculums for in vitro fermentations studies. **Fermentation**, [*s. l.*], v. 7, n. 1, 2021.

DE CARVALHO, Nelson Mota *et al.* **Strategies to Assess the Impact of Sustainable Functional Food Ingredients on Gut Microbiota**. [*S. l.*]: MDPI, 2023.

DE CARVALHO, N. Mota *et al.* Study of in vitro digestion of Tenebrio molitor flour for evaluation of its impact on the human gut microbiota. **Journal of Functional Foods**, [*s. l.*], v. 59, p. 101–109, 2019.

DE COSÍO-BARRÓN, Ana Cecilia González; HERNÁNDEZ-ARRIAGA, Angélica María; CAMPOS-VEGA, Rocio. Spent coffee (Coffea arabica L.) grounds positively modulate indicators of colonic microbial activity. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, [*s. l.*], v. 60, 2020.

DE FIGUEIREDO, Franciane Cristina; DE BARROS RANKE, Fabiane Fernanda; DE OLIVA-NETO, Pedro. Evaluation of xylooligosaccharides and fructooligosaccharides on digestive enzymes hydrolysis and as a nutrient for different probiotics and Salmonella typhimurium. **LWT**, [*s. l.*], v. 118, 2020.

DE OLIVEIRA FERNANDES, Matheus Augusto *et al.* LCA-based carbon footprint analysis of anaerobic digestion of coffee husk waste. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [*s. l.*], v. 207, p. 114993, 2025.

DE SOUSA, Cassiana S. *et al.* Microbial Omics. *In*: OMICS TECHNOLOGIES AND BIO-ENGINEERING. [*S. l.*]: Elsevier, 2018. p. 3–20.

DING, Zhujin *et al.* Dietary Mannan Oligosaccharides Enhance the Non-Specific Immunity, Intestinal Health, and Resistance Capacity of Juvenile Blunt Snout Bream (Megalobrama amblycephala) Against Aeromonas hydrophila. **Frontiers in Immunology**, [*s. l.*], v. 13, 2022.

DIXIT, Yogini *et al.* In Vitro Human Gastrointestinal Tract Simulation Systems: A Panoramic Review. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, [*s. l.*], v. 16, n. 2, p. 501–518, 2024.

DOS SANTOS, M.G. *et al.* Bioprocess development for levulinic acid production using sugarcane biomass. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, [*s. l.*], v. 33, 2023.

DU, Bingjian *et al.* Oligosaccharides prepared by acid hydrolysis of polysaccharides from pumpkin (Cucurbita moschata) pulp and their prebiotic activities. **International Journal of Food Science and Technology**, [*s. l.*], v. 46, n. 5, p. 982–987, 2011.

DU PASQUIER, Julien; PAËS, Gabriel; PERRÉ, Patrick. Principal factors affecting the yield of dilute acid pretreatment of lignocellulosic biomass: A critical review. **Bioresource Technology**, [*s. l.*], v. 369, p. 128439, 2023. Disponível em: Acesso em: 3 abr. 2024.

DUAN, Xudong *et al.* Mannan oligosaccharide supplementation in diets of sow and (or) their offspring improved immunity and regulated intestinal bacteria in piglet1. **Journal of Animal Science**, [*s. l.*], v. 97, n. 11, p. 4548–4556, 2019.

DUPONT, D. *et al.* Can dynamic *in vitro* digestion systems mimic the physiological reality? **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [*s. l.*], v. 59, n. 10, p. 1546–1562, 2019.

DURANTI, Sabrina *et al.* Bifidobacterium adolescentis as a key member of the human gut microbiota in the production of GABA. **Scientific Reports**, [*s. l.*], v. 10, n. 1, p. 14112, 2020.

ESMAEILI, Hossein. A critical review on the economic aspects and life cycle assessment of biodiesel production using heterogeneous nanocatalysts. **Fuel Processing Technology**, [*s. l.*], v. 230, p. 107224, 2022.

ESQUIVEL, Patricia; JIMÉNEZ, Víctor M. Functional properties of coffee and coffee by-products. **Food Research International**, [*s. l.*], v. 46, n. 2, p. 488–495, 2012.

FAUSTINO, Margarida *et al.* Comparative Analysis of Mannans Extraction Processes from Spent Yeast Saccharomyces cerevisiae. **Foods**, [*s. l.*], v. 11, n. 23, p. 3753, 2022.

FAUSTINO, Margarida *et al.* Effect of Mannan Oligosaccharides Extracts in Uropathogenic Escherichia coli Adhesion in Human Bladder Cells. **Pathogens**, [*s. l.*], v. 12, n. 7, p. 885, 2023.

FAUSTINO, Margarida *et al.* Up-scalable approaches for yeast mannan oligosaccharides (MOS) production: characterization and immunomodulatory properties. **Food and Bioproducts Processing**, [*s. l.*], v. 144, p. 32–42, 2024.

FERREIRA, Vanessa Cosme *et al.* An overview of prebiotics and their applications in the food industry. **European Food Research and Technology**, [*s. l.*], v. 249, n. 11, p. 2957–2976, 2023.

FORCINA, Antonio *et al.* A comparative life cycle assessment of different spent coffee ground reuse strategies and a sensitivity analysis for verifying the environmental convenience based on the location of sites. **Journal of Cleaner Production**, [*s. l.*], v. 385, p. 135727, 2023. Disponível em: Acesso em: 15 abr. 2024.

FRANCA, Adriana S.; OLIVEIRA, Leandro S. **Potential Uses of Spent Coffee Grounds in the Food Industry**. [*S. l.*]: MDPI, 2022.

FUSCO, William *et al.* Short-Chain Fatty-Acid-Producing Bacteria: Key Components of the Human Gut Microbiota. **Nutrients**, [*s. l.*], v. 15, n. 9, p. 2211, 2023.

GALANAKIS, Charis M. Functionality of Food Components and Emerging Technologies. **Foods**, [*s. l.*], v. 10, n. 1, p. 128, 2021.

GARCIA, José A.; PEREIRA-FILHO, Edenir R. Development of a sample preparation method for raw material evaluation of school supplies. **Química Nova**, [*s. l.*], 2015.

GÉSAN-GUIZIOU, G. *et al.* Life Cycle Assessment of a milk protein fractionation process: Contribution of the production and the cleaning stages at unit process level. **Separation and Purification Technology**, [*s. l.*], v. 224, p. 591–610, 2019.

GHOSH, Arabinda *et al.* Recovery and Purification of Oligosaccharides from Copra Meal by Recombinant Endo-β-mannanase and Deciphering Molecular Mechanism Involved and Its Role as Potent Therapeutic Agent. **Molecular Biotechnology**, [*s. l.*], v. 57, n. 2, p. 111–127, 2015.

GIBSON, Glenn R. *et al.* Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. **Nutrition Research Reviews**, [*s. l.*], v. 17, n. 2, p. 259–275, 2004.

GIBSON, Glenn R. *et al.* 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**, [*s. l.*], v. 14, n. 8, p. 491–502, 2017.

GIL-MARTÍN, Emilio *et al.* Influence of the extraction method on the recovery of bioactive phenolic compounds from food industry by-products. **Food Chemistry**, [*s. l.*], v. 378, p. 131918, 2022.

GO, Alchris Woo *et al.* Extraction of lipids from post-hydrolysis spent coffee grounds for biodiesel production with hexane as solvent: Kinetic and equilibrium data. **Biomass and Bioenergy**, [*s. l.*], v. 140, p. 105704, 2020.

GOMES, Michelle Garcia *et al.* Pretreatment of sugarcane bagasse using citric acid and its use in enzymatic hydrolysis. **Renewable Energy**, [*s. l.*], v. 157, p. 332–341, 2020.

GONÇALVES, Daniela A. *et al.* **How prebiotics have been produced from agro-industrial waste: An overview of the enzymatic technologies applied and the models used to validate their health claims**. [*S. l.*]: Elsevier Ltd, 2023.

GONZALEZ-GARCIA, Sara; GULLÓN, Beatriz; MOREIRA, Maria Teresa. Environmental assessment of biorefinery processes for the valorization of lignocellulosic wastes into oligosaccharides. **Journal of Cleaner Production**, [*s. l.*], v. 172, p. 4066–4073, 2018.

GRAFSTRÖM, Jonas; AASMA, Siri. Breaking circular economy barriers. **Journal of Cleaner Production**, [*s. l.*], v. 292, p. 126002, 2021.

GRUNDY, Myriam M.L. *et al.* INFOGEST inter-laboratory recommendations for assaying gastric and pancreatic lipases activities prior to in vitro digestion studies. **Journal of Functional Foods**, [*s. l.*], v. 82, p. 104497, 2021.

GU, Jie *et al.* Procuring biologically active galactomannans from spent coffee ground (SCG) by autohydrolysis and enzymatic hydrolysis. **International Journal of Biological Macromolecules**, [*s. l.*], v. 149, p. 572–580, 2020.

GUSMEROTTI, Natalia Marzia *et al.* Drivers and approaches to the circular economy in manufacturing firms. **Journal of Cleaner Production**, [*s. l.*], v. 230, p. 314–327, 2019.

HAN, Sung Soo *et al.* **Pectin Based Hydrogels for Drug Delivery Applications: A Mini Review**. [*S. l.*]: MDPI, 2022.

HERNÁNDEZ-ARRIAGA, Angélica María; DAVE OOMAH, B.; CAMPOS-VEGA, Rocio. Microbiota source impact in vitro metabolite colonic production and anti-proliferative effect of spent coffee grounds on human colon cancer cells (HT-29). **Food Research International**, [*s. l.*], v. 97, p. 191–198, 2017.

HOANG, Do-Huu; KY, Pham Xuan; THI, Vo Hai. Dietary mannan oligosaccharides elevated growth performance, gut morphology, microbiota, body composition, feed and nutrient utilisation of pompano, Trachinotus ovatus. **Aquaculture Reports**, [*s. l.*], v. 32, p. 101720, 2023.

HORROCKS, Victoria *et al.* Role of the gut microbiota in nutrient competition and protection against intestinal pathogen colonization. **Microbiology**, [*s. l.*], v. 169, n. 8, 2023.

HOSEINI, Marziyeh *et al.* Coffee by-products derived resources. A review. **Biomass and Bioenergy**, [*s. l.*], v. 148, p. 106009, 2021.

HOU, Xueyu *et al.* Profiling Blautia at high taxonomic resolution reveals correlations with cognitive dysfunction in Chinese children with Down syndrome. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [*s. l.*], v. 13, 2023.

HUANG, Dejian; BOXIN, O. U.; PRIOR, Ronald L. **The chemistry behind antioxidant capacity assays**. [*S. l.: s. n.*], 2005.

HUIJBREGTS, Mark A. J. *et al.* ReCiPe2016: a harmonised life cycle impact assessment method at midpoint and endpoint level. **The International Journal of Life Cycle Assessment**, [*s. l.*], v. 22, n. 2, p. 138–147, 2017.

IBRAHIM, Syahriar Nur Maulana Malik *et al.* Production and characterization of thermostable acidophilic β-mannanase from Aureobasidium pullulans NRRL 58524 and its potential in mannooligosaccharide production from spent coffee ground galactomannan. **3 Biotech**, [*s. l.*], v. 12, n. 9, p. 237, 2022.

ICO. **Coffee Market Report**. [*S. l.: s. n.*], 2024.

IGE, Oluwafemi E. *et al.* A review of the effectiveness of Life Cycle Assessment for gauging environmental impacts from cement production. **Journal of Cleaner Production**, [*s. l.*], v. 324, p. 129213, 2021.

INÁCIO, Heloisa Patrício *et al.* Effects of different extraction methods on the phenolic profile, antioxidant and antimicrobial activity of the coffee grounds and coffee silverskin (<scp> *Coffea arabica* </scp> L.). **JSFA reports**, [*s. l.*], v. 3, n. 8, p. 354–363, 2023.

INGRAO, Carlo *et al.* Spent-coffee grounds as a zero-burden material blended with bio-based poly(butylene succinate) for production of bio-composites: Findings from a Life Cycle Assessment application experience. **Environmental Impact Assessment Review**, [*s. l.*], v. 97, p. 106919, 2022.

ISENRING, Julia *et al.* In vitro human gut microbiota fermentation models: opportunities, challenges, and pitfalls. **Microbiome Research Reports**, [*s. l.*], v. 2, n. 1, p. 2, 2023.

ISO 14040. **ABNT NBR ISO 14040. Gestão ambiental - Avaliação do ciclo de vida - Princípios e estrutura.** [*S. l.: s. n.*], 2009. Disponível em: https://www.iso.org/standard/37456.html. Acesso em: 16 set. 2024.

JANA, Uttam Kumar *et al.* **Prebiotic mannooligosaccharides: Synthesis, characterization and bioactive properties**. [*S. l.*]: Elsevier Ltd, 2021.

JANA, Uttam Kumar; KANGO, Naveen; PLETSCHKE, Brett. Hemicellulose-Derived Oligosaccharides: Emerging Prebiotics in Disease Alleviation. **Frontiers in Nutrition**, [*s. l.*], v. 8, 2021.

JENSEN, Claus Uhrenholt *et al.* Fundamentals of Hydrofaction^{TM}: Renewable crude oil from woody biomass. **Biomass Conversion and Biorefinery**, [*s. l.*], v. 7, n. 4, p. 495–509, 2017.

JI, Haihua *et al. In vitro* gastrointestinal digestion and fermentation models and their applications in food carbohydrates. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [*s. l.*], v. 62, n. 19, p. 5349–5371, 2022.

JIN CHO, Eun *et al.* An integrated process for conversion of spent coffee grounds into value-added materials. **Bioresource Technology**, [*s. l.*], v. 346, 2022.

JOINT RESEARCH CENTRE: INSTITUTE FOR ENVIRONMENT AND SUSTAINABILITY. **International Reference Life Cycle Data System Handbook: General guide for Life Cycle Assessment - Provisions and Action Steps.** 1. ed. Luxembourg: Publications Office of the European Union, 2010-. ISSN 1018-5593.

KAFKOVÁ, Valentína *et al.* Integrated Approach to Spent Coffee Grounds Valorization in Biodiesel Biorefinery. **Sustainability**, [*s. l.*], v. 15, n. 7, p. 5612, 2023.

KAMIL, Mohammed *et al.* Economic, technical, and environmental viability of biodiesel blends derived from coffee waste. **Renewable Energy**, [*s. l.*], v. 147, p. 1880–1894, 2020.

KANGO, Naveen *et al.* **Advances in prebiotic mannooligosaccharides**. [*S. l.*]: Elsevier Ltd, 2022.

KAR, F.; ARSLAN, N. Effect of temperature and concentration on viscosity of orange peel pectin solutions and intrinsic viscosity–molecular weight relationship. **Carbohydrate Polymers**, [*s. l.*], v. 40, n. 4, p. 277–284, 1999.

KASAI, Chika *et al.* Comparison of the gut microbiota composition between obese and non-obese individuals in a Japanese population, as analyzed by terminal restriction fragment length polymorphism and next-generation sequencing. **BMC Gastroenterology**, [*s. l.*], v. 15, n. 1, p. 100, 2015.

KERS, Jannigje Gerdien; SACCENTI, Edoardo. The Power of Microbiome Studies: Some Considerations on Which Alpha and Beta Metrics to Use and How to Report Results. **Frontiers in Microbiology**, [*s. l.*], v. 12, 2022.

KHANPIT, Vishal V.; TAJANE, Sonali P.; MANDAVGANE, Sachin A. Technoeconomic and life cycle analysis of soluble dietary fiber concentrate production from waste orange peels. **Waste Management**, [*s. l.*], v. 155, p. 29–39, 2023.

KIRCHHERR, Julian; REIKE, Denise; HEKKERT, Marko. Conceptualizing the circular economy: An analysis of 114 definitions. **Resources, Conservation and Recycling**, [*s. l.*], v. 127, p. 221–232, 2017.

KLEIGREWE, Karin *et al.* Dietary Modulation of the Human Gut Microbiota and Metabolome with Flaxseed Preparations. **International Journal of Molecular Sciences**, [*s. l.*], v. 23, n. 18, p. 10473, 2022.

KUMAR SURYAWANSHI, Rahul; KANGO, Naveen. Production of mannooligosaccharides from various mannans and evaluation of their prebiotic potential. **Food Chemistry**, [*s. l.*], v. 334, p. 127428, 2021.

LANGE, Lene *et al.* The importance of fungi and of mycology for a global development of the bioeconomy. **IMA Fungus**, [*s. l.*], v. 3, n. 1, p. 87–92, 2012.

LI, Yan-xiao *et al.* High-level expression of an engineered β-mannanase (mRmMan5A) in Pichia pastoris for manno-oligosaccharide production using steam explosion pretreated palm kernel cake. **Bioresource Technology**, [*s. l.*], v. 256, p. 30–37, 2018.

LI, Xiaolin *et al.* Improving enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass by bio-coordinated physicochemical pretreatment—A review. **Energy Reports**, [*s. l.*], v. 8, p. 696–709, 2022.

LINHARES SABINO, Naira *et al.* Investigating the influence of solvents and extraction methods on the efficacy of phenolic compound recovery from spent coffee grounds. **Separation and Purification Technology**, [*s. l.*], v. 362, p. 131793, 2025.

LIU, Yong-Xin *et al.* A practical guide to amplicon and metagenomic analysis of microbiome data. **Protein & Cell**, [*s. l.*], v. 12, n. 5, p. 315–330, 2021.

LIU, Baojie *et al.* Application and prospect of organic acid pretreatment in lignocellulosic biomass separation: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, [*s. l.*], v. 222, p. 1400–1413, 2022.

LIU, Xuemei *et al. Blautia* —a new functional genus with potential probiotic properties? **Gut Microbes**, [*s. l.*], v. 13, n. 1, 2021.

LONGATI, Andreza A. *et al.* Xylooligosaccharides as a Tool for Sugarcane Bagasse Valorization: Integrated Biorefinery Modeling, Simulation and Life Cycle Assessment. **Waste and Biomass Valorization**, [*s. l.*], 2025.

LÓPEZ, Mar *et al.* Manufacture of platform chemicals from pine wood polysaccharides in media containing acidic ionic liquids. **Polymers**, [*s. l.*], v. 12, n. 6, 2020.

LORENCI WOICIECHOWSKI, Adenise *et al.* **Lignocellulosic biomass: Acid and alkaline pretreatments and their effects on biomass recalcitrance – Conventional processing and recent advances**. [*S. l.*]: Elsevier Ltd, 2020.

LORENÇONE, Pedro Antonio *et al.* Climate change and its consequences on the climatic zoning of Coffea canephora in Brazil. **Environment, Development and Sustainability**, [*s. l.*], v. 26, n. 4, p. 8377–8398, 2023.

MACHADO, Marlene *et al.* **Coffee by-products: An underexplored source of prebiotic ingredients**. [*S. l.*]: Taylor and Francis Ltd., 2023.

MAGENGELELE, Mihle; MALGAS, Samkelo; PLETSCHKE, Brett I. Bioconversion of spent coffee grounds to prebiotic mannooligosaccharides – an example of biocatalysis in biorefinery. **RSC Advances**, [*s. l.*], v. 13, n. 6, p. 3773–3780, 2023.

MAHMUD, Roksana *et al.* Integration of techno-economic analysis and life cycle assessment for sustainable process design – A review. **Journal of Cleaner Production**, [*s. l.*], v. 317, p. 128247, 2021.

MANZOOR, Arshied *et al.* **Recent insights into polysaccharide-based hydrogels and their potential applications in food sector: A review**. [*S. l.*]: Elsevier B.V., 2022.

MARAVIĆ, Nikola *et al.* Economic analysis and LCA of an advanced industrial-scale raw sugar juice purification procedure. **Food and Bioproducts Processing**, [*s. l.*], v. 95, p. 19–26, 2015.

MARÇAL, Sara *et al.* Impact of washing and freezing on nutritional composition, bioactive compounds, antioxidant activity and microstructure of mango peels. **Food Chemistry**, [*s. l.*], v. 442, p. 138368, 2024.

MASI, Donato *et al.* Towards a more circular economy: exploring the awareness, practices, and barriers from a focal firm perspective. **Production Planning & Control**, [*s. l.*], v. 29, n. 6, p. 539–550, 2018.

MATA, Teresa M.; MARTINS, António A.; CAETANO, Nídia S. **Bio-refinery approach for spent coffee grounds valorization**. [*S. l.*]: Elsevier Ltd, 2018.

MATULOVÁ, Mária *et al.* Structure of arabinogalactan oligosaccharides derived from arabinogalactan-protein of Coffea arabica instant coffee powder. **Carbohydrate Research**, [*s. l.*], v. 346, n. 8, p. 1029–1036, 2011.

MCLAUGHLIN, Heather P. *et al.* Carbohydrate catabolic diversity of bifidobacteria and lactobacilli of human origin. **International Journal of Food Microbiology**, [*s. l.*], v. 203, p. 109–121, 2015.

MIAO, Miao *et al.* Non-digestible galactomannan oligosaccharides from Cassia seed gum modulate microbiota composition and metabolites of human fecal inoculum. **Journal of Functional Foods**, [*s. l.*], v. 86, p. 104705, 2021.

MINEKUS, M. *et al.* A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food – an international consensus. **Food Funct.**, [*s. l.*], v. 5, n. 6, p. 1113–1124, 2014.

MONTEIRO, Alvaro Ferreira *et al.* High concentration and yield production of mannose from açaí (Euterpe oleracea Mart.) seeds via mannanase-catalyzed hydrolysis. **Scientific Reports**, [*s. l.*], v. 9, n. 1, p. 10939, 2019.

MONTEMURRO, Marco *et al.* Exploitation of spent coffee ground (SCG) as a source of functional compounds and growth substrate for probiotic lactic acid bacteria. **LWT**, [*s. l.*], v. 198, 2024.

MOREIRA, L. R.S.; FILHO, E. X.F. **An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems**. [*S. l.: s. n.*], 2008.

MOREIRA, Sílvia A.; PINTADO, Manuela; SARAIVA, Jorge A. High hydrostatic pressure-assisted extraction: A review on its effects on bioactive profile and biological activities of extracts. *In*: PRESENT AND FUTURE OF HIGH PRESSURE PROCESSING. [*S. l.*]: Elsevier, 2020. p. 317–328.

MORES, Sabrina *et al.* Citric acid bioproduction and downstream processing: Status, opportunities, and challenges. **Bioresource Technology**, [*s. l.*], v. 320, p. 124426, 2021.

MOSCA, Alexis; LECLERC, Marion; HUGOT, Jean P. Gut Microbiota Diversity and Human Diseases: Should We Reintroduce Key Predators in Our Ecosystem?. **Frontiers in Microbiology**, [*s. l.*], v. 7, 2016.

MÜLLER, Juliana Braun *et al.* Comparative assessment of acute and chronic ecotoxicity of water soluble fractions of diesel and biodiesel on Daphnia magna and Aliivibrio fischeri. **Chemosphere**, [*s. l.*], v. 221, p. 640–646, 2019.

MURILLO-FRANCO, Sarha Lucia; GALVIS-NIETO, Juan David; ORREGO, Carlos E. Mannooligosaccharide production from açaí seeds by enzymatic hydrolysis: optimization through response surface methodology. **Environmental Science and Pollution Research**, [*s. l.*], 2024.

MURTHY, Pushpa S.; MADHAVA NAIDU, M. **Sustainable management of coffee industry by-products and value addition - A review**. [*S. l.: s. n.*], 2012.

MUSSATTO, Solange I. *et al.* A study on chemical constituents and sugars extraction from spent coffee grounds. **Carbohydrate Polymers**, [*s. l.*], v. 83, n. 2, p. 368–374, 2011a.

MUSSATTO, Solange I. *et al.* **Production, Composition, and Application of Coffee and Its Industrial Residues**. [*S. l.: s. n.*], 2011b.

NARISETTY, Vivek *et al.* Valorisation of xylose to renewable fuels and chemicals, an essential step in augmenting the commercial viability of lignocellulosic biorefineries. **Sustainable Energy & Fuels**, [*s. l.*], v. 6, n. 1, p. 29–65, 2022a.

NARISETTY, Vivek *et al.* **Valorization of renewable resources to functional oligosaccharides: Recent trends and future prospective**. [*S. l.*]: Elsevier Ltd, 2022b.

NEVES, Sónia Almeida; MARQUES, António Cardoso. Drivers and barriers in the transition from a linear economy to a circular economy. **Journal of Cleaner Production**, [*s. l.*], v. 341, p. 130865, 2022.

NGUYEN, Quynh Anh *et al.* Development of an advanced integrative process to create valuable biosugars including manno-oligosaccharides and mannose from spent coffee grounds. **Bioresource Technology**, [*s. l.*], v. 272, p. 209–216, 2019.

NGUYEN, Quynh Anh *et al.* Development of an integrated process to produce d-mannose and bioethanol from coffee residue waste. **Bioresource Technology**, [*s. l.*], v. 244, p. 1039–1048, 2017. Disponível em: Acesso em: 9 abr. 2024.

NISSEN, Lorenzo; CASCIANO, Flavia; GIANOTTI, Andrea. Intestinal fermentation *in vitro* models to study food-induced gut microbiota shift: an updated review. **FEMS Microbiology Letters**, [*s. l.*], v. 367, n. 12, 2020.

NOTTING, Fleur *et al.* The butyrate-producing and spore-forming bacterial genus *Coprococcus* as a potential biomarker for neurological disorders. **Gut Microbiome**, [*s. l.*], v. 4, p. e16, 2023.

OKUR, Ilhami *et al.* Improving the recovery of phenolic compounds from spent coffee grounds (Scg) by environmentally friendly extraction techniques. **Molecules**, [*s. l.*], v. 26, n. 3, 2021.

OLANIYI, Kehinde S. *et al.* Acetate-mediated-obestatin modulation attenuates adipose-hepatic dysmetabolism in high fat diet-induced obese rat model. **Endocrine**, [*s. l.*], v. 76, n. 3, p. 558–569, 2022.

OTIENO, Daniel O.; AHRING, Birgitte K. A thermochemical pretreatment process to produce xylooligosaccharides (XOS), arabinooligosaccharides (AOS) and mannooligosaccharides (MOS) from lignocellulosic biomasses. **Bioresource Technology**, [*s. l.*], v. 112, p. 285–292, 2012. Disponível em: Acesso em: 8 maio 2024.

OTIENO, Daniel Obed; AHRING, Birgitte Kiaer. **The potential for oligosaccharide production from the hemicellulose fraction of biomasses through pretreatment processes: Xylooligosaccharides (XOS), arabinooligosaccharides (AOS), and mannooligosaccharides (MOS)**. [*S. l.*]: Elsevier Ltd, 2012.

OZAKI, Kazuto; FUJII, Shigeyoshi; HAYASHI, Masahiko. Effect of Dietary Mannooligosaccharides on the Immune System of Ovalbumin-Sensitized Mice. **Journal of Health Science**, [*s. l.*], v. 53, n. 6, p. 766–770, 2007.

PADMA ISHWARYA, S.; SANDHYA, R.; NISHA, P. **Advances and prospects in the food applications of pectin hydrogels**. [*S. l.*]: Taylor and Francis Ltd., 2022.

PALEARI, Susanna. The EU policy on climate change, biodiversity and circular economy: Moving towards a Nexus approach. **Environmental Science & Policy**, [*s. l.*], v. 151, p. 103603, 2024.

PANZELLA, Lucia *et al.* High Antioxidant Action and Prebiotic Activity of Hydrolyzed Spent Coffee Grounds (HSCG) in a Simulated Digestion-Fermentation Model: Toward the Development of a Novel Food Supplement. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [*s. l.*], v. 65, n. 31, p. 6452–6459, 2017.

PATEL, Alok *et al.* Sustainable biorefinery concept for biofuel production through holistic volarization of food waste. **Bioresource Technology**, [*s. l.*], v. 294, p. 122247, 2019.

PÉREZ-BURILLO, Sergio *et al.* Spent Coffee Grounds Extract, Rich in Mannooligosaccharides, Promotes a Healthier Gut Microbial Community in a Dose-Dependent Manner. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [*s. l.*], v. 67, n. 9, p. 2500–2509, 2019.

PIMENTEL, Tatiana Colombo *et al.* Prebiotics in non-dairy products: Technological and physiological functionality, challenges, and perspectives. **Food Bioscience**, [*s. l.*], v. 46, p. 101585, 2022.

PRASAD, B. R.; PADHI, R. K.; GHOSH, G. A review on key pretreatment approaches for lignocellulosic biomass to produce biofuel and value-added products. **International Journal of Environmental Science and Technology**, [*s. l.*], v. 20, n. 6, p. 6929–6944, 2023.

PRAYOONTHIEN, Phatcharin *et al.* In vitro fermentation of copra meal hydrolysate by human fecal microbiota. **3 Biotech**, [*s. l.*], v. 9, n. 3, p. 93, 2019.

QUENTIER, Camille; GERBINO, Esteban; PÉNICAUD, Caroline. **Environmental performance of new processes for the production of fructo-and galacto-oligosaccharides (FOS and GOS)**. [*S. l.: s. n.*], 2020. Disponível em: https://hal.inrae.fr/hal-03086152v1. .

RAJABI HAMEDANI, Sara *et al.* Environmental life cycle assessment of spent coffee ground pellet. **Energy Reports**, [*s. l.*], v. 8, p. 6976–6986, 2022.

RASHEDI, A.; KHANAM, Taslima. Life cycle assessment of most widely adopted solar photovoltaic energy technologies by mid-point and end-point indicators of ReCiPe method. **Environmental Science and Pollution Research**, [*s. l.*], v. 27, n. 23, p. 29075–29090, 2020.

RAY, Aratrika; SINGHAL, Rekha S. Hydrogel formulation based on galactomannan from residual spent coffee ground confers bioactivities and viscosifying properties in milkshake. **Food Bioscience**, [*s. l.*], v. 55, 2023.

REIJNDERS, L. Life Cycle Assessment of Greenhouse Gas Emissions. *In*: HANDBOOK OF CLIMATE CHANGE MITIGATION AND ADAPTATION. Cham: Springer International Publishing, 2022. p. 313–347.

REN, Qiuzhen; ALBRECHT, Johan. Toward circular economy: The impact of policy instruments on circular economy innovation for European small medium enterprises. **Ecological Economics**, [*s. l.*], v. 207, p. 107761, 2023.

RIBEIRO, Tânia B. *et al.* Simulated digestion of an olive pomace water-soluble ingredient: relationship between the bioaccessibility of compounds and their potential health benefits. **Food & Function**, [*s. l.*], v. 11, n. 3, p. 2238–2254, 2020.

RIBEIRO, Gabriel Mota *et al.* The Role of Mild Alkaline Pretreatment in the Biorefinery Upgrade of Spent Coffee Grounds. **Energies**, [*s. l.*], v. 16, n. 9, p. 3907, 2023.

RIOS-COVIAN, David *et al.* Enhanced butyrate formation by cross-feeding between *Faecalibacterium prausnitzii* and *Bifidobacterium adolescentis*. **FEMS Microbiology Letters**, [*s. l.*], v. 362, n. 21, p. fnv176, 2015.

ROCHÍN-MEDINA, Jesús J. *et al.* Increase of content and bioactivity of total phenolic compounds from spent coffee grounds through solid state fermentation by Bacillus clausii. **Journal of Food Science and Technology**, [*s. l.*], v. 55, n. 3, p. 915–923, 2018.

RODRIGUES DA SILVA, Mariana *et al.* Metabolite characterization of fifteen by-products of the coffee production chain: From farm to factory. **Food Chemistry**, [*s. l.*], v. 369, p. 130753, 2022. Disponível em: Acesso em: 10 abr. 2024.

ROSSI, Yanina E. *et al.* Bioactive Ingredients Obtained from Agro-industrial Byproducts: Recent Advances and Innovation in Micro- and Nanoencapsulation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [*s. l.*], v. 69, n. 50, p. 15066–15075, 2021.

RUNGRUANGSAPHAKUN, Jurairat; KEAWSOMPONG, Suttipun. Optimization of hydrolysis conditions for the mannooligosaccharides copra meal hydrolysate production. **3 Biotech**, [*s. l.*], v. 8, n. 3, p. 169, 2018.

SAI BHARADWAJ, A.V.S.L *et al.* Review of chemical pretreatment of lignocellulosic biomass using low-liquid and low-chemical catalysts for effective bioconversion. **Bioresource Technology**, [*s. l.*], v. 368, p. 128339, 2023.

SALSINHA, Ana Sofia *et al.* Assessment of the bioaccessibility and bioavailability prediction of omega 3 and conjugated fatty acids by in vitro standardized digestion model (INFOGEST) and cell model. **Food Bioscience**, [*s. l.*], v. 53, p. 102635, 2023.

SALSINHA, Ana Sofia *et al.* The use of an *in vitro* fecal fermentation model to uncover the beneficial role of omega-3 and punicic acid in gut microbiota alterations induced by a Western diet. **Food & Function**, [*s. l.*], v. 15, n. 11, p. 6095–6117, 2024.

SÁNCHEZ-PATÁN, Fernando *et al.* In vitro fermentation of a red wine extract by human gut microbiota: Changes in microbial groups and formation of phenolic metabolites. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [*s. l.*], v. 60, n. 9, p. 2136–2147, 2012.

SANJAY GURAV, Amardeep; MUDOI, Tiluttama. Analytical evaluation of espresso spent coffee grounds as a source of bioactive compounds. **~ 4789 ~ The Pharma Innovation Journal**, [*s. l.*], v. 11, n. 7, p. 4789–4794, 2022. Disponível em: www.thepharmajournal.com.

SARDELLI, Lorenzo *et al.* Technological tools and strategies for culturing human gut microbiota in engineered in vitro models. **Biotechnology and Bioengineering**, [*s. l.*], v. 118, n. 8, p. 2886–2905, 2021.

SARGHINI, Fabrizio *et al.* Acid hydrolysis of spent coffee grounds: effects on possible prebiotic activity of oligosaccharides. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, [*s. l.*], v. 8, n. 1, 2021.

SCHAICH, K.M.; TIAN, X.; XIE, J. Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays. **Journal of Functional Foods**, [*s. l.*], v. 14, p. 111–125, 2015.

SCHMIDT RIVERA, Ximena C. *et al.* Life cycle environmental sustainability of valorisation routes for spent coffee grounds: From waste to resources. **Resources, Conservation and Recycling**, [*s. l.*], v. 157, p. 104751, 2020.

SCORTICHINI, Serena *et al.* Development and validation of a GC-FID method for the analysis of short chain fatty acids in rat and human faeces and in fermentation fluids. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, [*s. l.*], v. 1143, 2020.

SCOTT, Karen P. *et al.* The influence of diet on the gut microbiota. **Pharmacological Research**, [*s. l.*], v. 69, n. 1, p. 52–60, 2013.

SENSOY, Ilkay. A review on the food digestion in the digestive tract and the used in vitro models. **Current Research in Food Science**, [*s. l.*], v. 4, p. 308–319, 2021.

SHARMA, Garvita *et al.* Gut microbiota dysbiosis and Huntington's disease: Exploring the gut-brain axis and novel microbiota-based interventions. **Life Sciences**, [*s. l.*], v. 328, p. 121882, 2023.

SHARMA, Abhinav; RAY, Aratrika; SINGHAL, Rekha S. A biorefinery approach towards valorization of spent coffee ground: Extraction of the oil by supercritical carbon dioxide and utilizing the defatted spent in formulating functional cookies. **Future Foods**, [*s. l.*], v. 4, 2021.

SIMÕES, Joana *et al.* Extractability and structure of spent coffee ground polysaccharides by roasting pre-treatments. **Carbohydrate Polymers**, [*s. l.*], v. 97, n. 1, p. 81–89, 2013. Disponível em: Acesso em: 12 jul. 2024.

SIMÕES, Joana *et al.* Structural features of partially acetylated coffee galactomannans presenting immunostimulatory activity. **Carbohydrate Polymers**, [*s. l.*], v. 79, n. 2, p. 397–402, 2010.

SIMÕES, Joana *et al.* Thermal stability of spent coffee ground polysaccharides: Galactomannans and arabinogalactans. **Carbohydrate Polymers**, [*s. l.*], v. 101, n. 1, p. 256–264, 2014. Disponível em: Acesso em: 23 mar. 2024.

SINGH, Tanim Arpit *et al.* **Spent coffee ground: transformation from environmental burden into valuable bioactive metabolites**. [*S. l.*]: Springer Science and Business Media B.V., 2023.

SINGH, Shweta; GHOSH, Arabinda; GOYAL, Arun. Manno-oligosaccharides as Prebiotic-Valued Products from Agro-waste. *In*: ENERGY, ENVIRONMENT, AND SUSTAINABILITY. [*S. l.*]: Springer Nature, 2018. p. 205–221.

SINGH, Saumya; SINGH, Gursharan; ARYA, Shailendra Kumar. **Mannans: An overview of properties and application in food products**. [*S. l.*]: Elsevier B.V., 2018.

SLUITER, A *et al.* **Determination of Extractives in Biomass: Laboratory Analytical Procedure (LAP); Issue Date 7/17/2005**. [*S. l.: s. n.*], 2008a. Disponível em: http://www.nrel.gov/biomass/analytical_procedures.html. .

SLUITER, A *et al.* **Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass: Laboratory Analytical Procedure (LAP) (Revised July 2011)**. [*S. l.: s. n.*], 2008b. Disponível em: http://www.nrel.gov/biomass/analytical_procedures.html. .

SLUITER, A *et al.* **Determination of Sugars, Byproducts, and Degradation Products in Liquid Fraction Process Samples: Laboratory Analytical Procedure (LAP); Issue Date: 12/08/2006**. [*S. l.: s. n.*], 2006. Disponível em: www.nrel.gov. .

SOLOMAKOU, Nikoletta *et al.* Recovery of phenolic compounds from spent coffee grounds through optimized extraction processes. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, [*s. l.*], v. 25, 2022.

SRIVASTAVA, Praveen Kumar *et al.* Structural Characterization and *in Vitro* Fermentation of β-Mannooligosaccharides Produced from Locust Bean Gum by GH-26 *endo* -β-1,4-Mannanase (ManB-1601). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [*s. l.*], v. 65, n. 13, p. 2827–2838, 2017.

STOJANOV, Spase; BERLEC, Aleš; ŠTRUKELJ, Borut. The Influence of Probiotics on the Firmicutes/Bacteroidetes Ratio in the Treatment of Obesity and Inflammatory Bowel disease. **Microorganisms**, [*s. l.*], v. 8, n. 11, p. 1715, 2020.

STRIEDER, Monique Martins *et al.* **Coffee biorefinery: The main trends associated with recovering valuable compounds from solid coffee residues**. [*S. l.*]: Elsevier Ltd, 2023.

TALEKAR, Sachin *et al.* Food waste biorefinery towards circular economy in Australia. **Bioresource Technology**, [*s. l.*], v. 388, p. 129761, 2023.

TIAN, Tian *et al.* Chemical Characterization of Potentially Prebiotic Oligosaccharides in Brewed Coffee and Spent Coffee Grounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [*s. l.*], v. 65, n. 13, p. 2784–2792, 2017.

TIWARI, Sunil; SI MOHAMMED, Kamel. Unraveling the impacts of linear economy, circular economy, green energy and green patents on environmental sustainability: Empirical evidence from OECD countries. **Gondwana Research**, [*s. l.*], v. 135, p. 75–88, 2024.

VALLADARES-DIESTRA, Kim Kley *et al.* Citric acid assisted hydrothermal pretreatment for the extraction of pectin and xylooligosaccharides production from cocoa pod husks. **Bioresource Technology**, [*s. l.*], v. 343, p. 126074, 2022.

VEGRO, Celso Luis Rodrigues; DE ALMEIDA, Luciana Florêncio. Global coffee market: Socio-economic and cultural dynamics. *In*: COFFEE CONSUMPTION AND INDUSTRY STRATEGIES IN BRAZIL. [*S. l.*]: Elsevier, 2020. p. 3–19.

VEITÍA-DE-ARMAS, L. *et al.* Green solvent-based lipid extraction from guava seeds and spent coffee grounds to produce biodiesel: Biomass valorization and esterification/transesterification route. **Industrial Crops and Products**, [*s. l.*], v. 214, p. 118535, 2024.

VOINICIUC, Cătălin. Modern mannan: a hemicellulose's journey. **New Phytologist**, [*s. l.*], v. 234, n. 4, p. 1175–1184, 2022.

WANG, Pei *et al.* Gut microbiome-derived ammonia modulates stress vulnerability in the host. **Nature Metabolism**, [*s. l.*], v. 5, n. 11, p. 1986–2001, 2023.

WANG, Hongshan *et al.* Mannan-oligosaccharide modulates the obesity and gut microbiota in high-fat diet-fed mice. **Food & Function**, [*s. l.*], v. 9, n. 7, p. 3916–3929, 2018.

WENDEL, Ulrika. Assessing Viability and Stress Tolerance of Probiotics—A Review. **Frontiers in Microbiology**, [*s. l.*], v. 12, 2022.

WERDERITS SILVA, Dayana Elizabeth; DA SILVA CÉSAR, Aldara; CONEJERO, Marco Antonio. Prevention of food waste and alternative destinations for unused food in Brazil. **Journal of Cleaner Production**, [*s. l.*], v. 318, p. 128545, 2021.

WIDMEIER, Eugen *et al.* Treatment with 2,4-Dihydroxybenzoic Acid Prevents FSGS Progression and Renal Fibrosis in Podocyte-Specific Coq6 Knockout Mice. **Journal of the American Society of Nephrology**, [*s. l.*], v. 30, n. 3, p. 393–405, 2019.

WONGSIRIDETCHAI, Chayaporn *et al.* Evaluation of prebiotic mannooligosaccharides obtained from spent coffee grounds for nutraceutical application. **LWT**, [*s. l.*], v. 148, 2021.

WU, Chenxuan *et al.* Manno-oligosaccharides from cassia seed gum ameliorate inflammation and improve glucose metabolism in diabetic rats. **Food & Function**, [*s. l.*], v. 13, n. 12, p. 6674–6687, 2022.

XIN, Donglin; YIN, Hong; RAN, Ganqiao. Efficient production of High-Purity manno-oligosaccharides from guar gum by citric acid and enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, [*s. l.*], v. 401, p. 130719, 2024.

YAN, Shikai *et al.* Mannan Oligosaccharide Suppresses Lipid Accumulation and Appetite in Western-Diet-Induced Obese Mice Via Reshaping Gut Microbiome and Enhancing Short-

Chain Fatty Acids Production. **Molecular Nutrition & Food Research**, [*s. l.*], v. 63, n. 23, 2019.

YANG, Shaoqing *et al.* Nondigestible Functional Oligosaccharides: Enzymatic Production and Food Applications for Intestinal Health. [*s. l.*], 2023. Disponível em: https://doi.org/10.1146/annurev-food-052720-.

YEOH, Lyn; NG, Kok Siew. Future Prospects of Spent Coffee Ground Valorisation Using a Biorefinery Approach. **Resources, Conservation and Recycling**, [*s. l.*], v. 179, 2022.

YUE, Panpan *et al.* **Hydrothermal pretreatment for the production of oligosaccharides: A review**. [*S. l.*]: Elsevier Ltd, 2022.

ZHANG, Rui *et al.* Enzymatic preparation of manno-oligosaccharides from locust bean gum and palm kernel cake, and investigations into its prebiotic activity. **Electronic Journal of Biotechnology**, [*s. l.*], v. 49, p. 64–71, 2021.

ZHANG, Jing *et al.* Evaluation of *in vitro* prebiotic effects of galactomannan oligosaccharides derived from guar gum. **International Journal of Food Science & Technology**, [*s. l.*], v. 59, n. 3, p. 1885–1897, 2024.

ZHANG, Shiqi *et al.* Experimental exploration of processes for deriving multiple products from spent coffee grounds. **Food and Bioproducts Processing**, [*s. l.*], v. 128, p. 21–29, 2021.

ZHAO, Nan *et al.* Spent coffee grounds: Present and future of environmentally friendly applications on industries-A review. **Trends in Food Science & Technology**, [*s. l.*], v. 143, p. 104312, 2024.

ZHENG, Hong *et al.* Depletion of acetate-producing bacteria from the gut microbiota facilitates cognitive impairment through the gut-brain neural mechanism in diabetic mice. **Microbiome**, [*s. l.*], v. 9, n. 1, 2021.

ZHOU, Hualu; TAN, Yunbing; MCCLEMENTS, David Julian. Applications of the INFOGEST In Vitro Digestion Model to Foods: A Review. **Annual Review of Food Science and Technology**, [*s. l.*], v. 14, n. 1, p. 135–156, 2023.

ZHU, Di *et al.* Effect of Konjac Mannan Oligosaccharides on Glucose Homeostasis via the Improvement of Insulin and Leptin Resistance In Vitro and In Vivo. **Nutrients**, [*s. l.*], v. 11, n. 8, p. 1705, 2019.

APÊNDICE A – TESTE DE NORMALIDADE PLANEJAMENTO BB 3^4

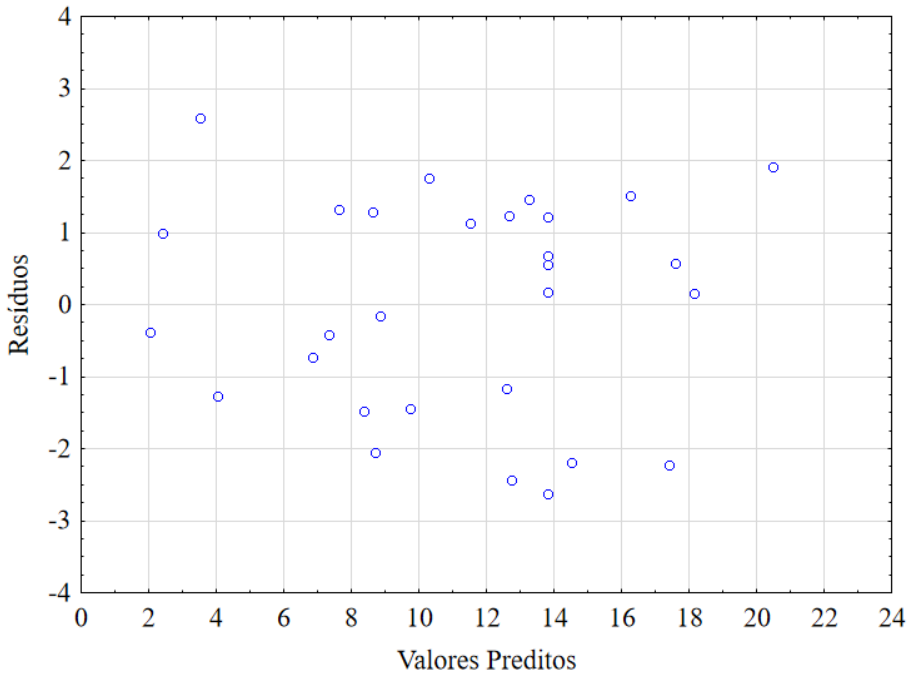


Figura 34 - Resíduos versus valores preditos para os 29 ensaios do planejamento Box-Behnken 3^4.

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

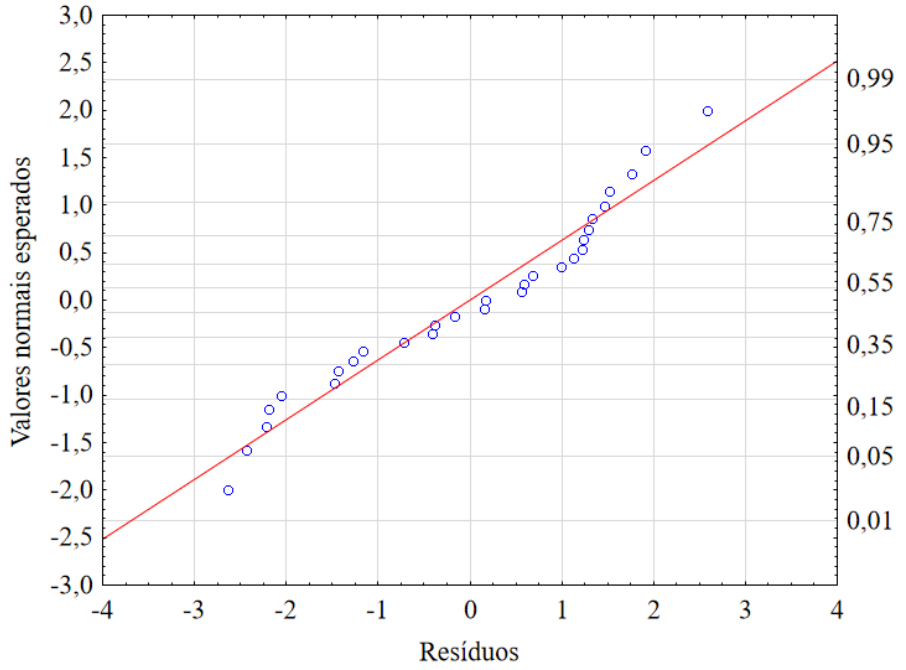


Figura 35 – Gráfico de probabilidade normal para os 29 ensaios do planejamento Box-Behnken 3^4.

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

APÊNDICE B - INVENTÁRIO DO CICLO DE VIDA (ICV)

Tabela 26 - Inventário do ciclo de vida para o ensaio 1.

Fronteiras do sistema	Quantidade na entrada	Quantidade na saída
Transporte		
Diesel (kg)	2,26	
BCF úmida (kg)	1000	
NO_x (g)		1,77
CO_2 (kg)		2,67
Material particulado (g)		0,015
Secagem		
Eletricidade (kw)	52,25	
Ar úmido (kg)		657,32
CO_2 (kg)		
Pré-tratamento		
Água (m^3)	1,85	
H_2SO_4 (kg)	72,01	
Resíduos sólidos (kg)		872,62
Vapor (kw)	6203,56	
Água de resfriamento (m^3)	252,47	
CO_2 (kg)		
Purificação dos OS		
$CaCO_3$ (kg)	65,41	
Etanol (kg)	3421,85	
Eletricidade (kw)	81637,21	
OS (kg)		57,60
Água residual (kg)		196,51
$CaSO_4$ (kg)		86,00
CO_2 (kg)		
Recuperação do solvente		
Vapor (kw)	20799,35	
Eletricidade (kw)	2759,55	
Água de resfriamento (m^3)	1722,87	
Água residual (kg)		6942,99
Vapor (kg)	40973,59	
CO_2 (kg)		

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Tabela 27 - Inventário do ciclo de vida para o ensaio 2.

Fronteiras do sistema	Quantidade na entrada	Quantidade na saída
Transporte		
Diesel (kg)	2,26	
BCF úmida (kg)	1000	
NO_x (g)		1,77
CO_2 (kg)		2,67
Material particulado (g)		0,015
Secagem		
Eletricidade (kw)	52,25	
Ar úmido (kg)		657,32
CO_2 (kg)		
Pré-tratamento		
Água (m^3)	1,85	
H_2SO_4 (kg)	33,88	
Resíduos sólidos (kg)		249,54
Vapor (kw)	1447,13	
Água de resfriamento (m^3)	125,08	
CO_2 (kg)		
Purificação dos OS		
$CaCO_3$ (kg)	30,77	
Etanol (kg)	577,95	
Eletricidade (kw)	131,26	
OS (kg)		65,71
Água residual (kg)		262,32
$CaSO_4$ (kg)		41,79
CO_2 (kg)		
Recuperação do solvente		
Vapor (kw)	8012,92	
Eletricidade (kw)	1055,01	
Água de resfriamento (m^3)	6930,38	
Água residual (kg)		2201,39
Vapor (kg)	15906,51	
CO_2 (kg)		

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Tabela 28 - Inventário do ciclo de vida para o ensaio 3.

Fronteiras do sistema	Quantidade na entrada	Quantidade na saída
Transporte		
Diesel (kg)	2,26	
BCF úmida (kg)	1000	
NO_x (g)		1,77
CO_2 (kg)		2,67
Material particulado (g)		0,015
Secagem		
Eletricidade (kw)	52,25	
Ar úmido (kg)		657,32
CO_2 (kg)		
Pré-tratamento		
Água (m^3)	18,34	
H_2SO_4 (kg)	338,73	
Resíduos sólidos (kg)		16366,80
Vapor (kw)	13862,99	
Água de resfriamento (m^3)	1188,68	
CO_2 (kg)		
Purificação dos OS		
$CaCO_3$ (kg)	343,94	
Etanol (kg)	2149,11	
Eletricidade (kw)	668,48	
OS (kg)		34,63
Água residual (kg)		383,74
$CaSO_4$ (kg)		41,79
CO_2 (kg)		
Recuperação do solvente		
Vapor (kw)	13346,90	
Eletricidade (kw)	1770,32	
Água de resfriamento (m^3)	11539,03	
Água residual (kg)		4371,75
Vapor (kg)	26291,90	
CO_2 (kg)		

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Tabela 29 - Inventário do ciclo de vida para o ensaio 4.

Fronteiras do sistema	Quantidade na entrada	Quantidade na saída
Transporte		
Diesel (kg)	2,26	
BCF úmida (kg)	1000	
NO_x (g)		1,77
CO_2 (kg)		2,67
Material particulado (g)		0,015
Secagem		
Eletricidade (kw)	52,25	
Ar úmido (kg)		657,32
CO_2 (kg)		
Pré-tratamento		
Água (m^3)	18,18	
H_2SO_4 (kg)	335,80	
Resíduos sólidos (kg)		461,58
Vapor (kw)	13753,80	
Água de resfriamento (m^3)	1269,78	
CO_2 (kg)		
Purificação dos OS		
$CaCO_3$ (kg)	518,87	
Etanol (kg)	6364,96	
Eletricidade (kw)	1826,89	
OS (kg)		20,29
Água residual (kg)		132,06
$CaSO_4$ (kg)		467,83
CO_2 (kg)		
Recuperação do solvente		
Vapor (kw)	130910,24	
Eletricidade (kw)	17469,48	
Água de resfriamento (m^3)	113863,71	
Água residual (kg)		24713,66
Vapor (kg)	260090,11	
CO_2 (kg)		

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Tabela 30 - Inventário do ciclo de vida para o ensaio 5.

Fronteiras do sistema	Quantidade na entrada	Quantidade na saída
Transporte		
Diesel (kg)	2,26	
BCF úmida (kg)	1000	
NO_x (g)		1,77
CO_2 (kg)		2,67
Material particulado (g)		0,015
Secagem		
Eletricidade (kw)	52,47	
Ar úmido (kg)		660,29
CO_2 (kg)		
Pré-tratamento		
Água (m^3)	18,18	
H_2SO_4 (kg)	0,00	
Resíduos sólidos (kg)		639,26
Vapor (kw)	14287,22	
Água de resfriamento (m^3)	1161,45	
CO_2 (kg)		
Purificação dos OS		
$CaCO_3$ (kg)	0,00	
Etanol (kg)	4848,51	
Eletricidade (kw)	1784,34	
OS (kg)		30,13
Água residual (kg)		0,00
$CaSO_4$ (kg)		0,00
CO_2 (kg)		
Recuperação do solvente		
Vapor (kw)	87303,61	
Eletricidade (kw)	17390,79	
Água de resfriamento (m^3)	73639,11	
Água residual (kg)		22704,14
Vapor (kg)	180711,36	
CO_2 (kg)		

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Tabela 31 - Inventário do ciclo de vida para o ensaio 6.

Fronteiras do sistema	Quantidade na entrada	Quantidade na saída
Transporte		
Diesel (kg)	2,26	
BCF úmida (kg)	1000	
NO_x (g)		1,77
CO_2 (kg)		2,67
Material particulado (g)		0,015
Secagem		
Eletricidade (kw)	52,47	
Ar úmido (kg)		660,29
CO_2 (kg)		
Pré-tratamento		
Água (m^3)	10,09	
H_2SO_4 (kg)	0,00	
Resíduos sólidos (kg)		330,35
Vapor (kw)	7593,43	
Água de resfriamento (m^3)	654,12	
CO_2 (kg)		
Purificação dos OS		
$CaCO_3$ (kg)	0,00	
Etanol (kg)	2863,12	
Eletricidade (kw)	1009,94	
OS (kg)		34,10
Água residual (kg)		0,00
$CaSO_4$ (kg)		0,00
CO_2 (kg)		
Recuperação do solvente		
Vapor (kw)	49354,70	
Eletricidade (kw)	9832,29	
Água de resfriamento (m^3)	41628,59	
Água residual (kg)		12928,49
Vapor (kg)	102163,92	
CO_2 (kg)		

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Tabela 32 - Inventário do ciclo de vida para o ensaio 7.

Fronteiras do sistema	Quantidade na entrada	Quantidade na saída
Transporte		
Diesel (kg)	2,26	
BCF úmida (kg)	1000	
NO_x (g)		1,77
CO_2 (kg)		2,67
Material particulado (g)		0,015
Secagem		
Eletricidade (kw)	52,25	
Ar úmido (kg)		657,32
CO_2 (kg)		
Pré-tratamento		
Água (m^3)	9,90	
H_2SO_4 (kg)	369,30	
Resíduos sólidos (kg)		335,35
Vapor (kw)	7539,19	
Água de resfriamento (m^3)	646,26	
CO_2 (kg)		
Purificação dos OS		
$CaCO_3$ (kg)	359,90	
Etanol (kg)	8619,20	
Eletricidade (kw)	884,17	
OS (kg)		81,35
Água residual (kg)		899,98
$CaSO_4$ (kg)		477,56
CO_2 (kg)		
Recuperação do solvente		
Vapor (kw)	53878,21	
Eletricidade (kw)	7145,75	
Água de resfriamento (m^3)	46580,99	
Água residual (kg)		17635,06
Vapor (kg)	107147,06	
CO_2 (kg)		

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Tabela 33 - Inventário do ciclo de vida para o ensaio 8.

Fronteiras do sistema	Quantidade na entrada	Quantidade na saída
Transporte		
Diesel (kg)	2,26	
BCF úmida (kg)	1000	
NO_x (g)		1,77
CO_2 (kg)		2,67
Material particulado (g)		0,015
Secagem		
Eletricidade (kw)	52,47	
Ar úmido (kg)		660,29
CO_2 (kg)		
Pré-tratamento		
Água (m^3)	9,91	
H_2SO_4 (kg)	369,33	
Resíduos sólidos (kg)		317,42
Vapor (kw)	7548,00	
Água de resfriamento (m^3)	646,32	
CO_2 (kg)		
Purificação dos OS		
$CaCO_3$ (kg)	464,90	
Etanol (kg)	9448,73	
Eletricidade (kw)	968,85	
OS (kg)		77,87
Água residual (kg)		32,78
$CaSO_4$ (kg)		501,89
CO_2 (kg)		
Recuperação do solvente		
Vapor (kw)	59035,63	
Eletricidade (kw)	7829,82	
Água de resfriamento (m^3)	51038,38	
Água residual (kg)		19340,53
Vapor (kg)	117403,20	
CO_2 (kg)		

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Tabela 34 - Inventário do ciclo de vida para o ensaio 9.

Fronteiras do sistema	Quantidade na entrada	Quantidade na saída
Transporte		
Diesel (kg)	2,26	
BCF úmida (kg)	1000	
NO_x (g)		1,77
CO_2 (kg)		2,67
Material particulado (g)		0,015
Secagem		
Eletricidade (kw)	52,47	
Ar úmido (kg)		660,29
CO_2 (kg)		
Pré-tratamento		
Água (m^3)	10,01	
H_2SO_4 (kg)	184,66	
Resíduos sólidos (kg)		333,75
Vapor (kw)	7614,15	
Água de resfriamento (m^3)	651,00	
CO_2 (kg)		
Purificação dos OS		
$CaCO_3$ (kg)	204,32	
Etanol (kg)	8659,34	
Eletricidade (kw)	867,65	
OS (kg)		77,48
Água residual (kg)		1215,22
$CaSO_4$ (kg)		250,91
CO_2 (kg)		
Recuperação do solvente		
Vapor (kw)	52845,09	
Eletricidade (kw)	7010,44	
Água de resfriamento (m^3)	45685,09	
Água residual (kg)		17415,54
Vapor (kg)	105095,99	
CO_2 (kg)		

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Tabela 35 - Inventário do ciclo de vida para o ensaio 10.

Fronteiras do sistema	Quantidade na entrada	Quantidade na saída
Transporte		
Diesel (kg)	2,26	
BCF úmida (kg)	1000	
NO_x (g)		1,77
CO_2 (kg)		2,67
Material particulado (g)		0,015
Secagem		
Eletricidade (kw)	52,47	
Ar úmido (kg)		660,29
CO_2 (kg)		
Pré-tratamento		
Água (m^3)	10,11	
H_2SO_4 (kg)	0,00	
Resíduos sólidos (kg)		368,62
Vapor (kw)	7605,39	
Água de resfriamento (m^3)	654,92	
CO_2 (kg)		
Purificação dos OS		
$CaCO_3$ (kg)	0,00	
Etanol (kg)	2862,81	
Eletricidade (kw)	1010,28	
OS (kg)		8,41
Água residual (kg)		0,00
$CaSO_4$ (kg)		0,00
CO_2 (kg)		
Recuperação do solvente		
Vapor (kw)	49417,78	
Eletricidade (kw)	9845,67	
Água de resfriamento (m^3)	41682,80	
Água residual (kg)		12931,60
Vapor (kg)	102292,11	
CO_2 (kg)		

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Tabela 36 - Inventário do ciclo de vida para o ensaio 11.

Fronteiras do sistema	Quantidade na entrada	Quantidade na saída
Transporte		
Diesel (kg)	2,26	
BCF úmida (kg)	1000	
NO_x (g)		1,77
CO_2 (kg)		2,67
Material particulado (g)		0,015
Secagem		
Eletricidade (kw)	52,47	
Ar úmido (kg)		660,29
CO_2 (kg)		
Pré-tratamento		
Água (m^3)	10,09	
H_2SO_4 (kg)	0,00	
Resíduos sólidos (kg)		328,72
Vapor (kw)	7767,42	
Água de resfriamento (m^3)	666,05	
CO_2 (kg)		
Purificação dos OS		
$CaCO_3$ (kg)	0,00	
Etanol (kg)	2786,08	
Eletricidade (kw)	1007,43	
OS (kg)		46,48
Água residual (kg)		0,00
$CaSO_4$ (kg)		0,00
CO_2 (kg)		
Recuperação do solvente		
Vapor (kw)	49237,24	
Eletricidade (kw)	9808,84	
Água de resfriamento (m^3)	41530,93	
Água residual (kg)		12841,13
Vapor (kg)	101918,35	
CO_2 (kg)		

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Tabela 37 - Inventário do ciclo de vida para o ensaio 12.

Fronteiras do sistema	Quantidade na entrada	Quantidade na saída
Transporte		
Diesel (kg)	2,26	
BCF úmida (kg)	1000	
NO_x (g)		1,77
CO_2 (kg)		2,67
Material particulado (g)		0,015
Secagem		
Eletricidade (kw)	52,47	
Ar úmido (kg)		660,29
CO_2 (kg)		
Pré-tratamento		
Água (m^3)	9,90	
H_2SO_4 (kg)	369,32	
Resíduos sólidos (kg)		323,90
Vapor (kw)	7518,26	
Água de resfriamento (m^3)	630,77	
CO_2 (kg)		
Purificação dos OS		
$CaCO_3$ (kg)	309,09	
Etanol (kg)	4123,62	
Eletricidade (kw)	722,33	
OS (kg)		95,40
Água residual (kg)		1391,43
$CaSO_4$ (kg)		420,44
CO_2 (kg)		
Recuperação do solvente		
Vapor (kw)	44441,56	
Eletricidade (kw)	5863,57	
Água de resfriamento (m^3)	38444,73	
Água residual (kg)		12680,63
Vapor (kg)	88305,37	
CO_2 (kg)		

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Tabela 38 - Inventário do ciclo de vida para o ensaio 13.

Fronteiras do sistema	Quantidade na entrada	Quantidade na saída
Transporte		
Diesel (kg)	2,26	
BCF úmida (kg)	1000	
NO_x (g)		1,77
CO_2 (kg)		2,67
Material particulado (g)		0,015
Secagem		
Eletricidade (kw)	52,47	
Ar úmido (kg)		660,29
CO_2 (kg)		
Pré-tratamento		
Água (m^3)	9,91	
H_2SO_4 (kg)	369,33	
Resíduos sólidos (kg)		223,76
Vapor (kw)	7607,58	
Água de resfriamento (m^3)	660,73	
CO_2 (kg)		
Purificação dos OS		
$CaCO_3$ (kg)	450,74	
Etanol (kg)	9147,49	
Eletricidade (kw)	883,21	
OS (kg)		110,66
Água residual (kg)		1199,56
$CaSO_4$ (kg)		503,81
CO_2 (kg)		
Recuperação do solvente		
Vapor (kw)	53658,85	
Eletricidade (kw)	7122,93	
Água de resfriamento (m^3)	46383,13	
Água residual (kg)		17931,48
Vapor (kg)	106724,86	
CO_2 (kg)		

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Tabela 39 - Inventário do ciclo de vida para o ensaio 14.

Fronteiras do sistema	Quantidade na entrada	Quantidade na saída
Transporte		
Diesel (kg)	2,26	
BCF úmida (kg)	1000	
NO_x (g)		1,77
CO_2 (kg)		2,67
Material particulado (g)		0,015
Secagem		
Eletricidade (kw)	52,47	
Ar úmido (kg)		660,29
CO_2 (kg)		
Pré-tratamento		
Água (m^3)	1,83	
H_2SO_4 (kg)	33,59	
Resíduos sólidos (kg)		533,55
Vapor (kw)	1408,36	
Água de resfriamento (m^3)	121,43	
CO_2 (kg)		
Purificação dos OS		
$CaCO_3$ (kg)	27,90	
Etanol (kg)	1391,35	
Eletricidade (kw)	137,90	
OS (kg)		51,07
Água residual (kg)		228,70
$CaSO_4$ (kg)		37,77
CO_2 (kg)		
Recuperação do solvente		
Vapor (kw)	8324,50	
Eletricidade (kw)	1104,73	
Água de resfriamento (m^3)	7196,20	
Água residual (kg)		2762,14
Vapor (kg)	16556,14	
CO_2 (kg)		

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Tabela 40 - Inventário do ciclo de vida para o ensaio 15.

Fronteiras do sistema	Quantidade na entrada	Quantidade na saída
Transporte		
Diesel (kg)	2,26	
BCF úmida (kg)	1000	
NO_x (g)		1,77
CO_2 (kg)		2,67
Material particulado (g)		0,015
Secagem		
Eletricidade (kw)	52,47	
Ar úmido (kg)		660,29
CO_2 (kg)		
Pré-tratamento		
Água (m^3)	18,18	
H_2SO_4 (kg)	335,81	
Resíduos sólidos (kg)		519,02
Vapor (kw)	13757,99	
Água de resfriamento (m^3)	1181,83	
CO_2 (kg)		
Purificação dos OS		
$CaCO_3$ (kg)	412,43	
Etanol (kg)	15715,74	
Eletricidade (kw)	1572,82	
OS (kg)		89,48
Água residual (kg)		2102,14
$CaSO_4$ (kg)		455,53
CO_2 (kg)		
Recuperação do solvente		
Vapor (kw)	95883,19	
Eletricidade (kw)	12721,03	
Água de resfriamento (m^3)	82891,92	
Água residual (kg)		31596,89
Vapor (kg)	189126,12	
CO_2 (kg)		

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Tabela 41 - Inventário do ciclo de vida para o ensaio 16.

Fronteiras do sistema	Quantidade na entrada	Quantidade na saída
Transporte		
Diesel (kg)	2,26	
BCF úmida (kg)	1000	
NO_x (g)		1,77
CO_2 (kg)		2,67
Material particulado (g)		0,015
Secagem		
Eletricidade (kw)	52,47	
Ar úmido (kg)		660,29
CO_2 (kg)		
Pré-tratamento		
Água (m^3)	1,83	
H_2SO_4 (kg)	33,58	
Resíduos sólidos (kg)		1114,47
Vapor (kw)	1396,12	
Água de resfriamento (m^3)	121,47	
CO_2 (kg)		
Purificação dos OS		
$CaCO_3$ (kg)	26,13	
Etanol (kg)	1254,64	
Eletricidade (kw)	99,40	
OS (kg)		37,11
Água residual (kg)		149,46
$CaSO_4$ (kg)		24,32
CO_2 (kg)		
Recuperação do solvente		
Vapor (kw)	5955,68	
Eletricidade (kw)	793,44	
Água de resfriamento (m^3)	5144,68	
Água residual (kg)		2145,55
Vapor (kg)	11852,03	
CO_2 (kg)		

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Tabela 42 - Inventário do ciclo de vida para o ensaio 17.

Fronteiras do sistema	Quantidade na entrada	Quantidade na saída
Transporte		
Diesel (kg)	2,26	
BCF úmida (kg)	1000	
NO_x (g)		1,77
CO_2 (kg)		2,67
Material particulado (g)		0,015
Secagem		
Eletricidade (kw)	52,47	
Ar úmido (kg)		660,29
CO_2 (kg)		
Pré-tratamento		
Água (m^3)	18,18	
H_2SO_4 (kg)	335,77	
Resíduos sólidos (kg)		395,37
Vapor (kw)	13768,51	
Água de resfriamento (m^3)	1181,57	
CO_2 (kg)		
Purificação dos OS		
$CaCO_3$ (kg)	551,91	
Etanol (kg)	17369,51	
Eletricidade (kw)	1737,85	
OS (kg)		97,94
Água residual (kg)		544,47
$CaSO_4$ (kg)		458,51
CO_2 (kg)		
Recuperação do solvente		
Vapor (kw)	105946,08	
Eletricidade (kw)	14056,11	
Água de resfriamento (m^3)	91591,18	
Água residual (kg)		34919,41
Vapor (kg)	210703,22	
CO_2 (kg)		

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Tabela 43 - Inventário do ciclo de vida para o ensaio 18.

Fronteiras do sistema	Quantidade na entrada	Quantidade na saída
Transporte		
Diesel (kg)	2,26	
BCF úmida (kg)	1000	
NO_x (g)		1,77
CO_2 (kg)		2,67
Material particulado (g)		0,015
Secagem		
Eletricidade (kw)	52,47	
Ar úmido (kg)		660,29
CO_2 (kg)		
Pré-tratamento		
Água (m^3)	10,01	
H_2SO_4 (kg)	184,67	
Resíduos sólidos (kg)		746,54
Vapor (kw)	7611,05	
Água de resfriamento (m^3)	651,08	
CO_2 (kg)		
Purificação dos OS		
$CaCO_3$ (kg)	198,33	
Etanol (kg)	8990,72	
Eletricidade (kw)	875,15	
OS (kg)		77,19
Água residual (kg)		839,79
$CaSO_4$ (kg)		240,79
CO_2 (kg)		
Recuperação do solvente		
Vapor (kw)	53264,58	
Eletricidade (kw)	7069,40	
Água de resfriamento (m^3)	46044,54	
Água residual (kg)		17715,66
Vapor (kg)	105937,64	
CO_2 (kg)		

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Tabela 44 - Inventário do ciclo de vida para o ensaio 19.

Fronteiras do sistema	Quantidade na entrada	Quantidade na saída
Transporte		
Diesel (kg)	2,26	
BCF úmida (kg)	1000	
NO_x (g)		1,77
CO_2 (kg)		2,67
Material particulado (g)		0,015
Secagem		
Eletricidade (kw)	52,47	
Ar úmido (kg)		660,29
CO_2 (kg)		
Pré-tratamento		
Água (m^3)	10,01	
H_2SO_4 (kg)	184,66	
Resíduos sólidos (kg)		1167,57
Vapor (kw)	7566,92	
Água de resfriamento (m^3)	637,25	
CO_2 (kg)		
Purificação dos OS		
$CaCO_3$ (kg)	179,34	
Etanol (kg)	8237,22	
Eletricidade (kw)	806,68	
OS (kg)		44,00
Água residual (kg)		1117,22
$CaSO_4$ (kg)		231,53
CO_2 (kg)		
Recuperação do solvente		
Vapor (kw)	49161,97	
Eletricidade (kw)	6524,47	
Água de resfriamento (m^3)	42499,23	
Água residual (kg)		16302,83
Vapor (kg)	97776,70	
CO_2 (kg)		

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Tabela 45 - Inventário do ciclo de vida para o ensaio 20.

Fronteiras do sistema	Quantidade na entrada	Quantidade na saída
Transporte		
Diesel (kg)	2,26	
BCF úmida (kg)	1000	
NO_x (g)		1,77
CO_2 (kg)		2,67
Material particulado (g)		0,015
Secagem		
Eletricidade (kw)	52,47	
Ar úmido (kg)		660,29
CO_2 (kg)		
Pré-tratamento		
Água (m^3)	10,01	
H_2SO_4 (kg)	184,67	
Resíduos sólidos (kg)		746,33
Vapor (kw)	7768,68	
Água de resfriamento (m^3)	663,79	
CO_2 (kg)		
Purificação dos OS		
$CaCO_3$ (kg)	205,43	
Etanol (kg)	8862,40	
Eletricidade (kw)	862,53	
OS (kg)		74,18
Água residual (kg)		966,54
$CaSO_4$ (kg)		240,80
CO_2 (kg)		
Recuperação do solvente		
Vapor (kw)	52498,07	
Eletricidade (kw)	6967,68	
Água de resfriamento (m^3)	45381,83	
Água residual (kg)		17463,96
Vapor (kg)	104413,20	
CO_2 (kg)		

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Tabela 46 - Inventário do ciclo de vida para o ensaio 21.

Fronteiras do sistema	Quantidade na entrada	Quantidade na saída
Transporte		
Diesel (kg)	2,26	
BCF úmida (kg)	1000	
NO_x (g)		1,77
CO_2 (kg)		2,67
Material particulado (g)		0,015
Secagem		
Eletricidade (kw)	52,47	
Ar úmido (kg)		660,29
CO_2 (kg)		
Pré-tratamento		
Água (m^3)	10,01	
H_2SO_4 (kg)	184,67	
Resíduos sólidos (kg)		1119,07
Vapor (kw)	7567,58	
Água de resfriamento (m^3)	637,17	
CO_2 (kg)		
Purificação dos OS		
$CaCO_3$ (kg)	178,41	
Etanol (kg)	8809,29	
Eletricidade (kw)	857,18	
OS (kg)		88,86
Água residual (kg)		654,73
$CaSO_4$ (kg)		231,55
CO_2 (kg)		
Recuperação do solvente		
Vapor (kw)	52154,21	
Eletricidade (kw)	6922,12	
Água de resfriamento (m^3)	45084,98	
Água residual (kg)		17340,67
Vapor (kg)	103729,20	
CO_2 (kg)		

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Tabela 47 - Inventário do ciclo de vida para o ensaio 22.

Fronteiras do sistema	Quantidade na entrada	Quantidade na saída
Transporte		
Diesel (kg)	2,26	
BCF úmida (kg)	1000	
NO_x (g)		1,77
CO_2 (kg)		2,67
Material particulado (g)		0,015
Secagem		
Eletricidade (kw)	52,47	
Ar úmido (kg)		660,29
CO_2 (kg)		
Pré-tratamento		
Água (m^3)	10,01	
H_2SO_4 (kg)	184,66	
Resíduos sólidos (kg)		711,17
Vapor (kw)	7749,93	
Água de resfriamento (m^3)	663,76	
CO_2 (kg)		
Purificação dos OS		
$CaCO_3$ (kg)	246,05	
Etanol (kg)	9655,20	
Eletricidade (kw)	934,64	
OS (kg)		83,84
Água residual (kg)		265,26
$CaSO_4$ (kg)		240,78
CO_2 (kg)		
Recuperação do solvente		
Vapor (kw)	56858,87	
Eletricidade (kw)	7546,98	
Água de resfriamento (m^3)	49149,51	
Água residual (kg)		18982,60
Vapor (kg)	113088,27	
CO_2 (kg)		

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Tabela 48 - Inventário do ciclo de vida para o ensaio 23.

Fronteiras do sistema	Quantidade na entrada	Quantidade na saída
Transporte		
Diesel (kg)	2,26	
BCF úmida (kg)	1000	
NO_x (g)		1,77
CO_2 (kg)		2,67
Material particulado (g)		0,015
Secagem		
Eletricidade (kw)	52,47	
Ar úmido (kg)		660,29
CO_2 (kg)		
Pré-tratamento		
Água (m^3)	1,84	
H_2SO_4 (kg)	0,00	
Resíduos sólidos (kg)		300,02
Vapor (kw)	1388,81	
Água de resfriamento (m^3)	121,32	
CO_2 (kg)		
Purificação dos OS		
$CaCO_3$ (kg)	0,00	
Etanol (kg)	545,46	
Eletricidade (kw)	186,90	
OS (kg)		28,28
Água residual (kg)		0,00
$CaSO_4$ (kg)		0,00
CO_2 (kg)		
Recuperação do solvente		
Vapor (kw)	9097,13	
Eletricidade (kw)	1812,78	
Água de resfriamento (m^3)	7673,38	
Água residual (kg)		2392,17
Vapor (kg)	18830,81	
CO_2 (kg)		

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Tabela 49 - Inventário do ciclo de vida para o ensaio 24.

Fronteiras do sistema	Quantidade na entrada	Quantidade na saída
Transporte		
Diesel (kg)	2,26	
BCF úmida (kg)	1000	
NO_x (g)		1,77
CO_2 (kg)		2,67
Material particulado (g)		0,015
Secagem		
Eletricidade (kw)	52,47	
Ar úmido (kg)		660,29
CO_2 (kg)		
Pré-tratamento		
Água (m^3)	18,35	
H_2SO_4 (kg)	0,00	
Resíduos sólidos (kg)		365,15
Vapor (kw)	13801,27	
Água de resfriamento (m^3)	1187,90	
CO_2 (kg)		
Purificação dos OS		
$CaCO_3$ (kg)	0,00	
Etanol (kg)	5167,21	
Eletricidade (kw)	1833,95	
OS (kg)		54,09
Água residual (kg)		0,00
$CaSO_4$ (kg)		0,00
CO_2 (kg)		
Recuperação do solvente		
Vapor (kw)	89657,35	
Eletricidade (kw)	17860,90	
Água de resfriamento (m^3)	75623,36	
Água residual (kg)		23436,96
Vapor (kg)	185589,69	
CO_2 (kg)		

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Tabela 50 - Inventário do ciclo de vida para o ensaio 25.

Fronteiras do sistema	Quantidade na entrada	Quantidade na saída
Transporte		
Diesel (kg)	2,26	
BCF úmida (kg)	1000	
NO_x (g)		1,77
CO_2 (kg)		2,67
Material particulado (g)		0,015
Secagem		
Eletricidade (kw)	52,47	
Ar úmido (kg)		660,29
CO_2 (kg)		
Pré-tratamento		
Água (m^3)	1,81	
H_2SO_4 (kg)	67,17	
Resíduos sólidos (kg)		708,45
Vapor (kw)	1406,09	
Água de resfriamento (m^3)	120,60	
CO_2 (kg)		
Purificação dos OS		
$CaCO_3$ (kg)	59,92	
Etanol (kg)	1746,41	
Eletricidade (kw)	138,01	
OS (kg)		58,70
Água residual (kg)		187,64
$CaSO_4$ (kg)		66,86
CO_2 (kg)		
Recuperação do solvente		
Vapor (kw)	8260,23	
Eletricidade (kw)	1100,51	
Água de resfriamento (m^3)	7135,55	
Água residual (kg)		2973,78
Vapor (kg)	16438,16	
CO_2 (kg)		

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Tabela 51 - Inventário do ciclo de vida para o ensaio 26.

Fronteiras do sistema	Quantidade na entrada	Quantidade na saída
Transporte		
Diesel (kg)	2,26	
BCF úmida (kg)	1000	
NO_x (g)		1,77
CO_2 (kg)		2,67
Material particulado (g)		0,015
Secagem		
Eletricidade (kw)	52,47	
Ar úmido (kg)		660,29
CO_2 (kg)		
Pré-tratamento		
Água (m^3)	18,00	
H_2SO_4 (kg)	671,55	
Resíduos sólidos (kg)		578,33
Vapor (kw)	13676,89	
Água de resfriamento (m^3)	1172,98	
CO_2 (kg)		
Purificação dos OS		
$CaCO_3$ (kg)	877,76	
Etanol (kg)	17439,61	
Eletricidade (kw)	1744,61	
OS (kg)		112,14
Água residual (kg)		180,86
$CaSO_4$ (kg)		907,83
CO_2 (kg)		
Recuperação do solvente		
Vapor (kw)	106333,84	
Eletricidade (kw)	14107,67	
Água de resfriamento (m^3)	91926,62	
Água residual (kg)		35044,52
Vapor (kg)	211474,44	
CO_2 (kg)		

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Tabela 52 - Inventário do ciclo de vida para o ensaio 27.

Fronteiras do sistema	Quantidade na entrada	Quantidade na saída
Transporte		
Diesel (kg)	2,26	
BCF úmida (kg)	1000	
NO_x (g)		1,77
CO_2 (kg)		2,67
Material particulado (g)		0,015
Secagem		
Eletricidade (kw)	52,47	
Ar úmido (kg)		660,29
CO_2 (kg)		
Pré-tratamento		
Água (m^3)	10,01	
H_2SO_4 (kg)	184,65	
Resíduos sólidos (kg)		1122,02
Vapor (kw)	7645,05	
Água de resfriamento (m^3)	650,92	
CO_2 (kg)		
Purificação dos OS		
$CaCO_3$ (kg)	217,55	
Etanol (kg)	8841,26	
Eletricidade (kw)	860,54	
OS (kg)		86,28
Água residual (kg)		617,03
$CaSO_4$ (kg)		231,52
CO_2 (kg)		
Recuperação do solvente		
Vapor (kw)	52363,95	
Eletricidade (kw)	6949,92	
Água de resfriamento (m^3)	45266,32	
Água residual (kg)		17408,94
Vapor (kg)	104146,28	
CO_2 (kg)		

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Tabela 53 - Inventário do ciclo de vida para o ensaio 28.

Fronteiras do sistema	Quantidade na entrada	Quantidade na saída
Transporte		
Diesel (kg)	2,26	
BCF úmida (kg)	1000	
NO_x (g)		1,77
CO_2 (kg)		2,67
Material particulado (g)		0,015
Secagem		
Eletricidade (kw)	52,47	
Ar úmido (kg)		660,29
CO_2 (kg)		
Pré-tratamento		
Água (m^3)	10,01	
H_2SO_4 (kg)	184,67	
Resíduos sólidos (kg)		1106,34
Vapor (kw)	7613,23	
Água de resfriamento (m^3)	650,94	
CO_2 (kg)		
Purificação dos OS		
$CaCO_3$ (kg)	242,80	
Etanol (kg)	9080,49	
Eletricidade (kw)	882,15	
OS (kg)		101,93
Água residual (kg)		414,95
$CaSO_4$ (kg)		231,54
CO_2 (kg)		
Recuperação do solvente		
Vapor (kw)	53648,46	
Eletricidade (kw)	7120,91	
Água de resfriamento (m^3)	46376,39	
Água residual (kg)		17852,46
Vapor (kg)	106701,99	
CO_2 (kg)		

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Tabela 54 - Inventário do ciclo de vida para o ensaio 29.

Fronteiras do sistema	Quantidade na entrada	Quantidade na saída
Transporte		
Diesel (kg)	2,26	
BCF úmida (kg)	1000	
NO_x (g)		1,77
CO_2 (kg)		2,67
Material particulado (g)		0,015
Secagem		
Eletricidade (kw)	52,47	
Ar úmido (kg)		660,29
CO_2 (kg)		
Pré-tratamento		
Água (m^3)	10,01	
H_2SO_4 (kg)	184,67	
Resíduos sólidos (kg)		1081,80
Vapor (kw)	7567,47	
Água de resfriamento (m^3)	651,22	
CO_2 (kg)		
Purificação dos OS		
$CaCO_3$ (kg)	195,62	
Etanol (kg)	9041,18	
Eletricidade (kw)	875,46	
OS (kg)		84,96
Água residual (kg)		499,53
$CaSO_4$ (kg)		231,54
CO_2 (kg)		
Recuperação do solvente		
Vapor (kw)	53241,14	
Eletricidade (kw)	7066,83	
Água de resfriamento (m^3)	46022,52	
Água residual (kg)		17768,78
Vapor (kg)	105892,82	
CO_2 (kg)		

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

APÊNDICE C – INVENTÁRIO ECOINVENT 3

Tabela 55 - Inventário utilizado para os 29 ensaios, de acordo com o Ecoinvent 3.

	Transp.	Homogen.	Pré-tratamento	Precipit. OS	Recup. Solvente
Entradas conhecidas da tecnosfera (materiais / combustíveis)	Diesel {BR}| diesel production , petroleum refinery operation | Conseq, U		Sulfuric Acid {Row}| production | APOS, U [Dummy] Cooling water	Ethanol, without water, in 95% solution state, from fermentation {BR}|sugarcane processing traditional annexed plant | APOS, U	[Dummy] Cooling water
Entradas conhecidas da tecnosfera (eletricidade / calor)		Electricity, low voltage {BR-South-eastern grid}| electricity voltage transformation from medium to low voltage | Cut-off, U	Heat, district or industrial, othe than natural gas {BR-South-eastern grid}| treatment of bagasse, from sugarcane, in heat and power co-generation unit, 6400kW thermal | APOS, U	Electricity, low voltage {BR-South-eastern grid}| electricity voltage transformation from medium to low voltage | APOS, U	Heat, district or industrial, othe than natural gas {BR-South-eastern grid}| treatment of bagasse, from sugarcane, in heat and power co-generation unit, 6400kW thermal | APOS, U Electricity, low voltage {BR-South-eastern grid}| electricity voltage transformation from medium to low voltage | APOS, U

Entradas conhecidas da natureza (recursos)		Water, unspecified natural origin, BR-SP	Calcium carbonate	
	Particulate, diesel soot			
Saída (Emissões ao ar)	Carbon dioxide			Carbon dioxide
	Nitrogen monoxide, BR			
Saída (Emissões à água)				Waste water

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

APÊNDICE D – INFORMAÇÕES SOBRE DOADORES E INÓCULO FECAL

Tabela 56 - Dados pessoais, alimentares e médicos dos doadores voluntários.

Doador	Gênero	Idade	IMC (kg/m²)	Dieta	Consumo de lácteos	Doenças intestinais	Probióticos / Prebióticos
1	Feminino	38	22,86	Onívora	Sim	Não	Não
2	Masculino	28	26,57	Onívora	Sim	Não	Não
3	Feminino	39	30,07	Onívora	Sim	Não	Não
4	Masculino	34	24,54	Onívora	Sim	Não	Não
7	Masculino	37	27,16	Onívora	Sim	Não	Não

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Tabela 57 - Hábitos e uso de medicamentos dos doadores voluntários.

Doador	Fumante	Exercícios Regulares	Antibióticos	Hospital
1	Não	Sim	Mais de 12 meses	Mais de 12 meses
2	Não	Sim	Mais de 12 meses	Mais de 12 meses
3	Não	Sim	Mais de 6 meses	Mais de 12 meses
4	Não	Sim	Nos últimos 6 meses	Nos últimos 12 meses
7	Não	Sim	Mais de 12 meses	Mais de 12 meses

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Tabela 58 - Dados das fezes coletadas e preparo do inóculo.

Doador	pH fecal	Escala de Bristol	Cor	pH fecal diluição 10%	Peso fecal (g)	Porcentagem (%)
1	6,67	4	Marrom claro	7,12	6,37	19,35
2	7,57	2	Marrom escuro	7,49	5,96	18,10
3	6,44	3	Marrom claro / amarelado	6,95	6,12	18,59
4	6,50	6	Marrom	6,92	7,87	23,91
7	6,36	4	Marrom escuro	6,94	6,60	20,05
Inóculo				6,74	32,92	

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

APÊNDICE E – CROMATOGRAMAS COMPLEMENTARES

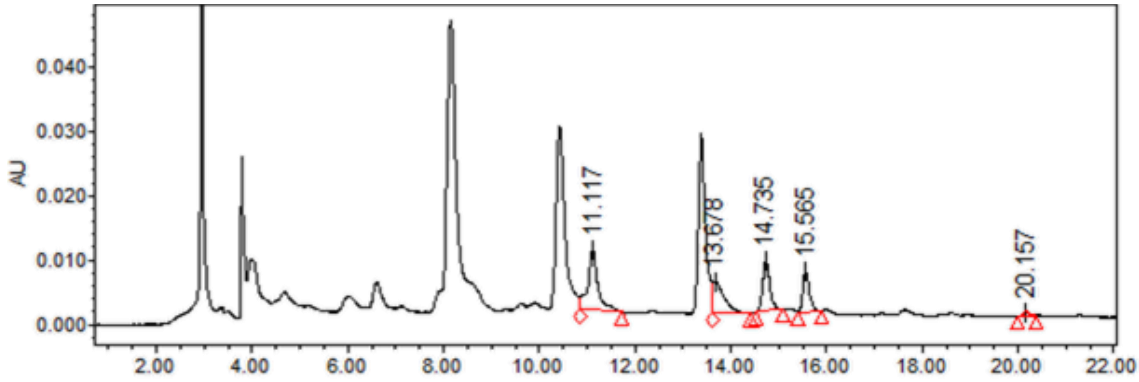


Figura 36 - Perfil dos compostos fenólicos extraídos do OS-23, determinados por CLAE acoplado com um detector UV/Vis – PDA.

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

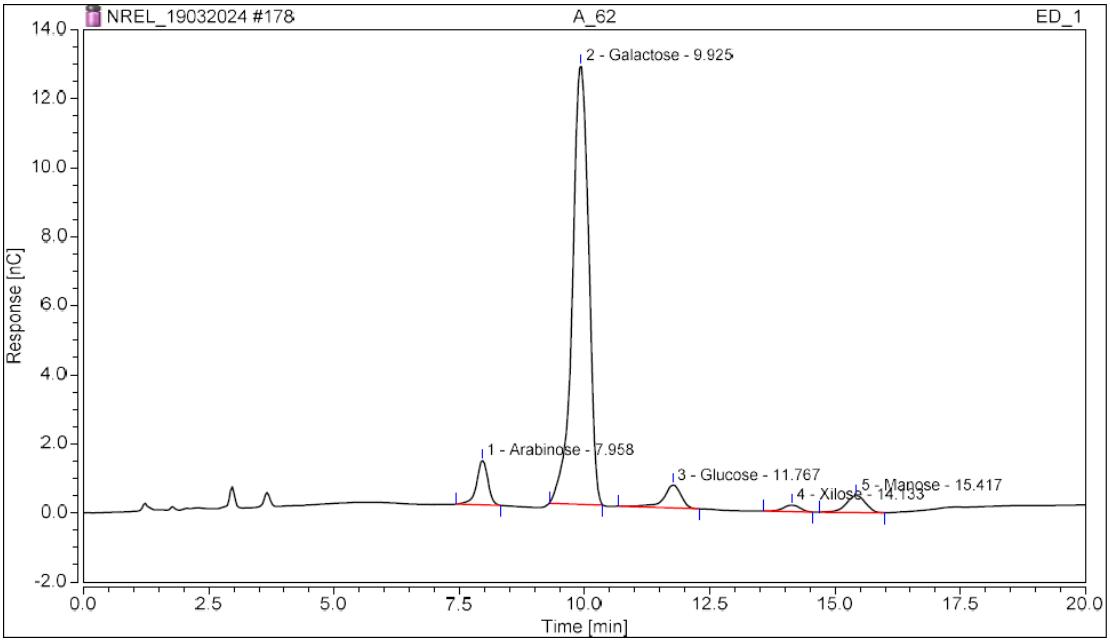


Figura 37 – Composição dos monossacarídeos presentes nos OS-23 determinada por HPAEC-PAD.

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

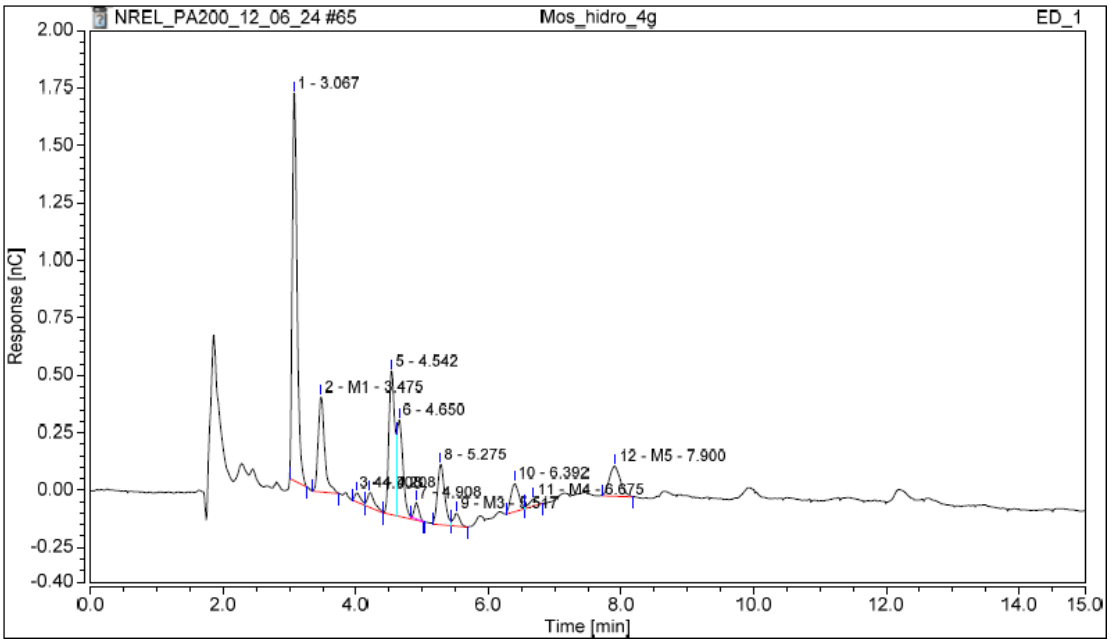


Figura 38 - Composição dos OS presentes no Hydrogel OS-23 antes do ensaio *in vitro* da digestão do TGI determinada por HPAEC-PAD.

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

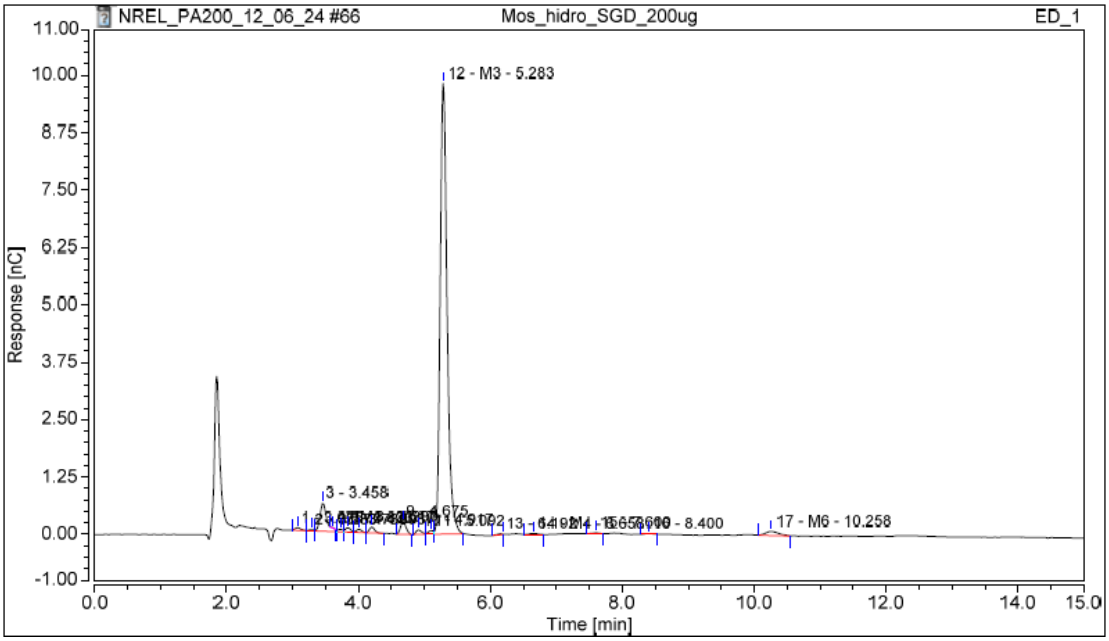


Figura 39 - Composição dos OS presentes no Hydrogel OS-23 após o ensaio *in vitro* da digestão do TGI determinada por HPAEC-PAD.

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).