

**UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI E DAS MISSÕES**  
**URI - CAMPUS ERECHIM**  
**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**AMITO JOSÉ TEIXEIRA**

**APLICAÇÃO DE CELULASES E PECTINASES NA HIDRÓLISE**  
**DE RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS**

**ERECHIM, RS - BRASIL**  
**OUTUBRO, 2016**

**UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI E DAS MISSÕES**  
**URI - CAMPUS ERECHIM**  
**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**APLICAÇÃO DE CELULASES E PECTINASES NA HIDRÓLISE  
DE RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS**

**AMITO JOSÉ TEIXEIRA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Engenharia de Alimentos.

Orientadores: Dr<sup>a</sup> Geciane Toniazzo Backes

Dr. Rogério Luis Cansian

ERECHIM, RS - BRASIL

OUTUBRO, 2016

## **Aplicação de celulasas e pectinases na hidrólise de resíduos lignocelulósicos**

Amito José Teixeira

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI Erechim, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Engenharia de Alimentos.

Data da defesa: 31/10/2016.

Comissão Julgadora:

---

Prof. Rogério Luis Cansian, Dr. Sc  
Orientador

---

Prof<sup>a</sup>. Geciane Toniazco Backes, Dr<sup>a</sup>. Sc  
Orientadora

---

Prof. Jamile Zeni, Dr<sup>a</sup>. Sc  
URI – Erechim

---

Prof. Antonio Sergio do Amaral, Dr. Sc  
URI – Erechim

---

Prof<sup>a</sup>. Morgana Karin Pierozan, Dr<sup>a</sup>. Sc  
IDEAU - Getúlio Vargas

---

Prof<sup>a</sup>. Daniela dos Santos Oliveira, Dr<sup>a</sup>. Sc  
IDEAU - Getúlio Vargas

ERECHIM, RS, BRASIL

OUTUBRO, 2016.

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho especialmente aos meus falecidos pais, José (*in memorian*) e Ondina (*in memorian*), com todo meu amor e gratidão, por tudo que fizeram por mim ao longo da vida. Desejo poder ter sido merecedor do esforço dedicado por eles em todos os aspectos, especialmente quanto à minha formação.

Dedico também a minha mulher (Cleusa) e a minha filha (Camille), sem elas nenhum sonho seria possível ou valeria a pena.

*Só se pode alcançar um grande êxito quando  
nos mantemos fiéis a nós mesmos.*  
Friedrich Nietzsche

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pela proteção e a vida, por iluminar meus caminhos, tornando possível essa vitória.

À Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, URI - Erechim, pela oportunidade de realização do curso.

Ao professor Rogério Cansian e à professora Geciane pelas orientações, pelo incentivo e pelo apoio que me deram força na condução e construção deste trabalho.

À professora Jamile Zeni pela orientação no que diz respeito ao delineamento e tratamento estatístico aplicados neste trabalho.

À professora Eunice Valduga pela amizade, incentivo e apoio dispensados nas conversas e encaminhamentos iniciais para a realização deste curso.

À Dr<sup>a</sup> Viviane Astolfi pela amizade e disponibilidade de transmitir seus conhecimentos para a melhor condução deste trabalho.

Aos bolsistas Felipe Menegat, Junior André do Nascimento, Felipe Kominkiewicz e Leonardo Menoncin Weschenfelder pelo comprometimento e dedicação que muito contribuíram para o desenvolvimento dos trabalhos experimentais.

Ao bolsista Luis Henrique Culau (*in memoriam*) pelo brilhante trabalho que realizou frente aos trabalhos experimentais.

A todas as pessoas que colaboraram de alguma forma, na realização deste trabalho.

Resumo da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Engenharia de Alimentos.

## **Aplicação de celulases e pectinases na hidrólise de resíduos lignocelulósicos**

Amito José Teixeira  
Outubro/2016

Orientadores: Dr<sup>a</sup>. Geciane Toniazzi Backes e Dr. Rogério Luis Cansian

O Brasil dispõe de uma grande variedade de resíduos agrícolas e agroindustriais cujo bioprocessamento é de grande interesse econômico e social. Muitos desses resíduos têm potencial nutricional, principalmente na formulação de dietas para os ruminantes que são capazes de aproveitar volumosos de baixa qualidade de maneira eficiente, em virtude da síntese e secreção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas pelos micro-organismos do rúmen. Entretanto, o processo de digestão da forragem pode ser consideravelmente incompleto. Assim, os objetivos deste trabalho foram avaliar a ação de celulases e pectinases, comerciais e não comerciais na hidrólise de casca de soja, casca de arroz, sabugo/palha de milho e feno de Tifton 85 visando melhorar sua digestibilidade. Para tanto, determinou-se o tempo de hidrólise com celulase e pectinase comerciais, diferentes diluições de celulase comercial, maximizou-se a hidrólise em diferentes condições de temperaturas e agitação e avaliou-se o uso combinado das enzimas comerciais e não comerciais nas condições otimizadas. Em um segundo momento, avaliou-se o pré-tratamento dos resíduos por meio de moagem e diferentes concentrações de NaOH. Por fim, avaliou-se o efeito das enzimas na composição bromatológica dos resíduos tratados e não tratados enzimaticamente. Os melhores tempos de hidrólise com celulase comercial foram de 22, 10, 14, e 12 horas para casca de soja, casca de arroz, sabugo/palha de milho e feno de Tifton 85, respectivamente. Com a enzima pectinase comercial, os melhores tempos de hidrólise foram de 22, 10, 22 e 14 horas para casca de soja, casca de arroz, sabugo/palha de milho e feno de Tifton 85, respectivamente. A diluição da celulase comercial 1:50 (m/v) em água foi significativamente superior a soluções mais diluídas, sendo selecionada para os demais experimentos. O efeito da temperatura e agitação na hidrólise dos substratos foi avaliado por planejamento experimental  $2^2$ , e a agitação apresentou efeito significativo positivo ( $p < 0,05$ ) na hidrólise de todos os substratos. Foi avaliada a influência isolada da agitação na hidrólise dos substratos resultando nas maiores percentuais de hidrólise com 300 rpm (47,95 e 51,43%) para casca de soja, 350 rpm (26,05 e 9,23%) para sabugo/palha de milho, 200 rpm (2,4%) ou 300 rpm (11,61%) para casca de arroz e 150 rpm (20,5%) ou 350 rpm (12,6%) para feno de Tifton 85, usando celulase e pectinase, respectivamente. A celulase não comercial alcançou 17,16% (sabugo/palha de milho) a 23,65% (feno de Tifton 85) e a pectinase não comercial alcançou 7,26% (sabugo/palha de milho) a 30,07% (feno de Tifton 85) da hidrólise obtida com as respectivas enzimas comerciais, nos mesmos substratos. O pré-tratamento com 7,5% de NaOH e 0,5 mm de granulometria, aumentou significativamente a hidrólise de casca de soja (73,08% e 59,52%), sabugo/palha de milho (34,4% e 17,7%), casca de arroz (20,43% e 17,65%) e feno de Tifton 85 (35,63% e 22,93%), tanto com celulase como com pectinase comerciais. Comparando os resultados bromatológicos dos resíduos antes e depois do tratamento enzimático, foi

observada melhora nos parâmetros fibra em detergente neutro, fibra em detergente ácido, nutrientes digestíveis totais e extrativos não nitrogenados com celulase e pectinase tanto comerciais como não comerciais.

**Palavras chave:** Enzimas, resíduos agroindustriais, ruminantes, hidrólise, digestibilidade.



Abstract of Thesis presented to Food Engineering Program from Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões as a partial fulfillment of the requirements for obtaining the degree of Doctor in Food Engineering.

## **Cellulases and pectinases application in the hydrolysis of lignocellulosic residues**

Amito José Teixeira  
October/2016

Advisors: Dr<sup>a</sup>. Geciane Toniazzo Backes and Dr. Rogério Luis Cansian

Brazil has a wide range of agro-industrial residues and its bioprocessing has great economic and social interest. Many of these residues have nutritional potential, especially in the formulation of diets for ruminants, which are able to take advantage of lignocellulosic residues efficiently by virtue of the synthesis and secretion of cellulolytic enzymes and hemicelulolíticas by ruminal microorganisms. However, the residue digestion process can be significantly incomplete. Thus, the objectives of this study were to evaluate the action of commercial and non-commercial cellulases and pectinases hydrolysis, in soybean hulls, rice husks, corn stover and cobs and hay Tifton 85, to improve its digestibility. It was determined the time of hydrolysis with cellulase and commercial pectinase, different dilutions of commercial cellulase, hydrolysis was maximized at different conditions of temperature and agitation and evaluated the combined use of this enzymes and use of non-commercial enzymes in optimal conditions. In a second step, we evaluated the granulometry and different concentrations of NaOH at the residue pretreatment. Finally, we evaluated the effect of enzymes in the bromatological composition of the residues treated and untreated enzymatically. The best hydrolysis times with commercial cellulase were 22, 10, 14, and 12 hours for soybean hulls, rice husks, corn stover and cobs and hay Tifton 85, respectively. With commercial pectinase, best hydrolysis times were 22, 10, 22 and 14 hours for soybean hulls, rice husks, corn stover and cobs and hay Tifton 85, respectively. The dilution 1:50 (w/v) of the commercial cellulase in water was significantly higher than more dilute solutions being selected for other experiments. The effect of temperature and agitation in the hydrolysis of substrates was evaluated by factorial design 2<sup>2</sup>, and the agitation presented significant positive effect ( $p < 0.05$ ) for all substrates. We evaluated the influence of agitation in the hydrolysis of the substrates resulting in the highest percentage of hydrolysis from 300 rpm (47.95 and 51.43%) for soybean hulls, 350 rpm (26.05 and 9.23%) for corn stover and cobs, 200 rpm (2.4%) or 300 rpm (11.61%) for rice husks and 150 rpm (20.5%) or 350 rpm (12.6%) for hay Tifton 85, using cellulase and pectinase, respectively. The combined use of enzymes did not increase the hydrolytic activity. Not commercial cellulase, achieved 17.16% (corn stover and cobs) to 23.65% (hay Tifton 85) and non commercial pectinase achieved 7.26% (corn stover and cobs) a 30,07% (hay Tifton 85) of hydrolysis obtained with respectively commercial enzymes, on the same substrates. Pretreatment with 7.5% of NaOH and 0.5 mm granulometry, significantly increased hydrolysis of soybean hulls (73.08% and 59.52%), corn stover and cobs (34.4% and 17.7%), rice husks (20.43% and 17.65%) and hay Tifton 85 (35.63% and 22.93%) with both commercial cellulase and pectinase. Comparing the bromatological results of residues before and after the enzymatic treatment was observed improvement in

neutral detergent fiber, acid detergent fiber, total digestible nutrient and nitrogen-free extract parameters with both commercial and noncommercial cellulase and pectinase.

**Keywords:** enzyme, agro industrial residues, ruminants, hydrolysis, digestibility.

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Composição química parcial dos resíduos lignocelulósicos em estudo referenciados na literatura.....23
- Tabela 2 - Variáveis independentes e níveis utilizados no planejamento fatorial  $2^2$  para a hidrólise (%) dos resíduos lignocelulósicos empregando celulases e pectinases. .57
- Tabela 3 - Variáveis independentes e níveis utilizados no planejamento fatorial completo  $2^2$  para a hidrólise dos resíduos lignocelulósicos (%) empregando celulases e pectinases. ....58
- Tabela 4 - Percentual de hidrólise de casca de arroz (CA), casca de soja (CS), sabugo e palha de milho (SPM) e feno de Tifton 85 (FT), em diferentes tempos, empregando celulase comercial.....67
- Tabela 5 - Percentual de hidrólise de casca de arroz (CA), casca de soja (CS), sabugo/palha de milho (SPM) e feno de Tifton 85 (FT), em diferentes tempos, empregando-se pectinase comercial.....68
- Tabela 6 - Percentual de hidrólise de casca de soja (CS), casca de arroz (CA), sabugo/palha de milho (SPM) e feno de Tifton 85 (FT), empregando diferentes diluições de celulase comercial.....69
- Tabela 7 - Matriz do planejamento fatorial completo  $2^2$  completo (valores reais e codificados) para a hidrólise de casca de soja e sabugo/palha de milho com celulase comercial em diferentes temperaturas e agitações. ....70
- Tabela 8 - Matriz do planejamento fatorial  $2^2$  (valores reais e codificados) para a hidrólise de casca de arroz e feno de Tifton 85 com aplicação de celulase comercial em diferentes temperaturas e agitações. ....74
- Tabela 9 - Matriz do planejamento fatorial  $2^2$  completo (valores reais e codificados) para a hidrólise de casca de arroz e feno de Tifton 85 com celulase comercial em diferentes temperaturas e agitações. ....75
- Tabela 10 - Matriz do planejamento fatorial  $2^2$  (valores reais e codificados) para a hidrólise de casca de soja e sabugo/palha de milho com pectinase comercial. ....79
- Tabela 11 - Matriz do planejamento fatorial  $2^2$  (valores reais e codificados) para a hidrólise de casca de arroz (CA) e feno de Tifton 85 (FT) com pectinase comercial.82

Tabela 12 - Matriz do planejamento fatorial 2 <sup>2</sup> completo (valores reais e codificados) para a hidrólise de casca de arroz com pectinase comercial. ....	83
Tabela 13 - Efeito da interação entre celulase e pectinase comerciais na hidrólise dos substratos lignocelulósicos (casca de soja, casca de arroz, sabugo/palha de milho e feno de Tifton 85). ....	86
Tabela 14 - Hidrólise dos substratos lignocelulósicos (casca de soja, casca de arroz, sabugo/palha de milho e feno de Tifton 85) empregando-se celulase comercial e não comercial.....	88
Tabela 15 - Percentual de hidrólise de casca de soja (CS), casca de arroz (CA), sabugo e palha de milho (SPM) e feno de Tifton 85 (FT), em diferentes tempos, empregando celulase não comercial.....	89
Tabela 16 - Hidrólise dos substratos lignocelulósicos (casca de soja, casca de arroz, Sabugo/palha de milho e feno de Tifton 85) empregando-se pectinase comercial e não comercial.....	90
Tabela 17 - Percentual de hidrólise de casca de arroz (CA), casca de soja (CS), sabugo e palha de milho (SPM) e feno de Tifton 85 (FT), em diferentes tempos, empregando pectinase não comercial.....	91
Tabela 18 - Hidrólise dos resíduos lignocelulósicos (casca de arroz, casca de soja, sabugo/palha de milho e feno de Tifton 85), moídos em diferentes granulometrias, aplicando-se a enzima celulase comercial. ....	92
Tabela 19 - Matriz do planejamento fatorial 2 <sup>2</sup> (valores reais e codificados) para a hidrólise de casca de soja com celulase comercial sob efeito de pré tratamento com NaOH (1 a 5 %) em temperatura de 100 °C, por 30 a 90 minutos. ....	93
Tabela 20 - Hidrólise dos substratos lignocelulósicos (CS e SPM), sem pré-tratamento e moídos em granulometria de 0,5 mm, tratados com NaOH (3, 5, 7,5 e 10%) em temperatura de 100°C por 90 minutos, aplicando-se as enzimas celulase e pectinase comercial.....	95
Tabela 21 - Hidrólise dos resíduos lignocelulósicos (casca de arroz, feno de Tifton 85), sem pré-tratamento e moídos em granulometria de 0,5 mm tratados com NaOH (3, 5, 7,5 e 10%) em temperatura de 100°C por 90 minutos, aplicando-se as enzimas celulase e pectinase comercial.....	97

Tabela 22 - Composição centesimal dos resíduos lignocelulósicos antes e após o emprego das enzimas celulase e pectinase, comerciais e não comerciais.....108

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura da parede celular de vegetais.....	29
Figura 2 - Hidrólise da molécula de celulose.....	29
Figura 3 - Estrutura primária de substâncias pécnicas.....	32
Figura 4 - Mecanismo de ação das enzimas pectinolíticas. ....	39
Figura 5 - Gráfico de Pareto com o efeito estimado (valor absoluto) das variáveis testadas no planejamento fatorial $2^2$ completo para a hidrólise de casca soja com celulase comercial.....	71
Figura 6 - Superfícies de resposta (a) e curvas de contorno (b) para a hidrólise (%) de sabugo/palha de milho com aplicação de celulase comercial, em função da temperatura e agitação. ....	72
Figura 7 - Influência da agitação na hidrólise de casca de soja (a) e sabugo/palha de milho (b) com celulase comercial. ....	72
Figura 8 - Gráfico de Pareto com o efeito estimado (valor absoluto) das variáveis testadas no planejamento fatorial $2^2$ completo para a hidrólise de casca de arroz (a) e feno de Tifton 85 (b) com celulase comercial.....	74
Figura 9 - Superfícies de resposta (a,b) e curvas de contorno (c,d) para a hidrólise da casca de arroz e feno de Tifton 85 com celulase comercial em função da temperatura e agitação.....	77
Figura 10 - Influência da agitação na hidrólise de casca de arroz com celulase comercial.....	78
Figura 11 - Gráfico de Pareto com o efeito estimado (valor absoluto) das variáveis testadas no planejamento fatorial $2^2$ para a hidrólise de casca soja (a) e sabugo/palha de milho (b) com pectinase comercial. ....	80
Figura 12 - Influência da agitação na hidrólise de casca de soja (a) e sabugo/palha de milho (b) com pectinase comercial e temperatura de 45 °C. ....	80

Figura 13 - Influência da agitação na hidrólise de casca de soja com pectinase comercial e temperatura de 37 °C.....	81
Figura 14 - Gráfico de Pareto com o efeito estimado (valor absoluto) das variáveis testadas no planejamento fatorial 2 <sup>2</sup> para a hidrólise de casca de arroz (a) e feno de Tifton 85 (b) com pectinase comercial.....	82
Figura 15 - Superfícies de resposta (a) e curvas de contorno (b) para a hidrólise da casca de arroz (a, b) com aplicação de pectinase comercial, em função da temperatura e agitação.....	84
Figura 16 - Influência da agitação na hidrólise de feno de Tifton 85 com pectinase comercial.....	85
Figura 17 - Gráfico de Pareto com o efeito estimado (valor absoluto) das variáveis testadas no planejamento fatorial 2 <sup>2</sup> para a hidrólise de casca de soja (a), casca de arroz (b), sabugo/palha de milho (c) e feno de Tifton 85 (d) com celulase comercial sob efeito de de pré tratamento com NaOH (1 a 5 %) em temperatura de 100 °C, por 30 a 90 minutos.....	94
Figura 18 – Hidrólise (%) de casca de soja empregando celulase (a) e pectinase (b) e sabugo/palha de milho com celulase (c) e pectinase (d), moídos em granulometria de 0,5 mm, sem pré-tratamento alcalino e tratados com NaOH (3, 5, 7,5 e 10%) em temperatura de 100°C por 90 minutos.....	96
Figura 19 - Hidrólise de casca de arroz com celulase (a) e pectinase (b) e feno de Tifton 85 com celulase (c) e pectinase (d), moídos em granulometria de 0,5 mm, sem pré-tratamento alcalino e tratados com NaOH (3, 5, 7,5 e 10%) em temperatura de 100°C por 90 minutos.....	98

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	21
2.1 RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS .....	21
2.1.1 Casca de Soja .....	23
2.1.2 Casca de arroz .....	24
2.1.3 Sabugo e palha de milho .....	24
2.1.4 Feno de Tifton 85 .....	25
2.2 PAREDE CELULAR .....	26
2.2.1 Componentes da parede celular .....	27
2.2.1.1 Celulose .....	27
2.2.1.2 Hemiceluloses .....	30
2.2.1.3 Pectinas .....	31
2.2.1.4 Lignina .....	33
2.3 ENZIMAS DEGRADADORAS DA PAREDE CELULAR .....	34
2.3.1 Enzimas fibrolíticas .....	35
2.3.1.1 Celulases .....	36
2.3.1.2 Hemicelulases .....	38
2.3.1.3 Pectinases .....	38
2.4 HIDRÓLISE DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS .....	40
2.4.1 Fatores que afetam a hidrólise enzimática dos resíduos lignocelulósicos .....	40
2.5 PRÉ-TRATAMENTOS DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS .....	44
2.5.1 Tipos de pré-tratamento .....	47
2.5.1.1 Pré-tratamento com hidróxido de sódio .....	49
2.6 FIBRA E ENERGIA DOS VOLUMOSOS .....	50
2.6.1 Fibra em Detergente Neutro e Ácido .....	51



2.6.2 Nutrientes Digestíveis Totais e Extrativos Não Nitrogenados .....	53
2.7 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	54
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	55
3.1 SUBSTRATOS E ENZIMAS UTILIZADOS NA HIDRÓLISE.....	55
3.2 AVALIAÇÃO DA HIDRÓLISE DE SUBSTRATOS LIGNOCELULÓSICOS COM ENZIMAS COMERCIAIS.....	56
3.2.1 Efeito do tempo .....	56
3.2.2 Efeito da diluição de enzima.....	57
3.2.3 Efeito da temperatura e agitação .....	57
3.2.4 Efeito da combinação das enzimas comerciais na hidrólise dos substratos lignocelulósicos .....	58
3.3 HIDRÓLISE DE SUBSTRATOS LIGNOCELULÓSICOS COM ENZIMAS NÃO COMERCIAIS.....	59
3.4 EFEITO DE PRÉ-TRATAMENTOS NA HIDRÓLISE DE RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS.....	59
3.4.1 Efeito da granulometria .....	59
3.4.2 Efeito do pré-tratamento alcalino.....	59
3.4.3 Combinação da granulometria e pré-tratamento alcalino .....	59
3.5 CARACTERIZAÇÃO CENTESIMAL .....	60
3.6 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS .....	60
3.6.1 Quantificações dos açúcares redutores totais (ART) .....	60
3.6.2 Determinação da atividade enzimática.....	62
3.6.2.1 Celulases.....	62
3.6.2.2 Pectinase.....	63
3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	65
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	66

4.1 HIDRÓLISE DE SUBSTRATOS LIGNOCELULÓSICOS COM ENZIMAS COMERCIAIS.....	66
4.1.1 Influência do tempo .....	66
4.1.2 Influência da Diluição de Enzima .....	68
4.1.3 Efeito da temperatura e agitação .....	69
4.1.3.1 Celulase com casca de soja e sabugo/palha de milho .....	70
4.1.3.2 Celulase com casca de arroz e feno de Tifton 85.....	73
4.1.3.3 Pectinase comercial com Casca de Soja e Sabugo/palha de milho.....	78
4.1.3.4 Pectinase com Casca de Arroz e Feno de Tifton 85.....	81
4.1.4 Efeito da combinação das enzimas comerciais na hidrólise dos substratos lignocelulósicos .....	85
4.2 HIDRÓLISE DE SUBSTRATOS LIGNOCELULÓSICOS UTILIZANDO ENZIMAS NÃO COMERCIAIS.....	87
4.2.1 Celulase não comercial .....	87
4.2.2 Pectinase não comercial .....	89
4.3 EFEITO DE PRÉ-TRATAMENTOS NA HIDRÓLISE DE RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS.....	91
4.3.1 Efeito da granulometria .....	91
4.3.3 Efeito combinado da granulometria e pré-tratamento alcalino na hidrólise de resíduos lignocelulósicos .....	95
4.4. CARACTERIZAÇÃO DOS RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS ANTES E APÓS A HIDRÓLISE ENZIMÁTICA .....	107
5. CONCLUSÕES .....	112
6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....	114
7. REFERÊNCIAS.....	115

## 1. INTRODUÇÃO

Os ruminantes têm a capacidade de aproveitar volumosos de baixa qualidade, devido a síntese e secreção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas realizadas pelos micro-organismos do rúmen. Entretanto, a conversão dos alimentos, principalmente os fibrosos, para produção de carne e leite tem sido pouco eficiente, indicando a necessidade de novos paradigmas biotecnológicos de alimentação animal com o objetivo de maximizar a utilização dos nutrientes (VARGA & KOLVER 1997).

Os ruminantes apresentam um ecossistema diverso e sofisticado de utilização dos carboidratos fibrosos dos vegetais, em função da relação simbiótica com a população microbiana diversificada do rúmen (MARTINS et al., 2006). Mesmo que os micro-organismos do rúmen consigam digerir celulose e outros carboidratos fibrosos, fatores relacionados à estrutura e composição da planta, como as interações físico-químicas entre a matriz de hemicelulose e lignina, e aspectos relacionados ao animal, como a mastigação, salivação e pH ruminal, podem limitar a digestão no rúmen, por se constituírem barreiras aos processos fibrolíticos (MARTINS et al., 2006).

Segundo Ojumu (2003) e Lima (2007), com a associação dos diferentes tipos de polímeros que compõem a matéria vegetal (celulose, hemicelulose e lignina), o grau de cristalinidade e o empacotamento provocado pela estrutura complexa da lignina, gera-se um material de estrutura rígida e muito resistente ao ataque enzimático, dessa forma a degradação da celulose na natureza ocorre lentamente a partir das extremidades susceptíveis. No entanto, complexos enzimáticos produzidos por vários micro-organismos têm se demonstrado capazes de catalisar a hidrólise da celulose, tanto cristalina quanto amorfa, em açúcares de baixa massa molecular como a glicose e celobiose (MARTINS, 2005).

A agricultura e a agroindústria brasileira, produzem uma grande variedade de resíduos cujo bioprocessamento seria de grande interesse econômico e social. Ramos (2000), menciona que há resíduos derivados de atividades como as indústrias de papel e celulose, serrarias, usinas de açúcar e álcool e unidades de produção agrícola geradoras de resíduos de culturas como a palha de cereais, de milho, de trigo, sabugo de milho, cascas de arroz e de aveia, dentre outros. Esses “alimentos”, de um modo geral, são muito pobres em nitrogênio, podem apresentar grande diferença em seu valor nutricional, possuem baixa digestibilidade e palatabilidade, razão pela qual seu consumo voluntário é limitado. Estas características limitam o atendimento das

necessidades dos animais, se os resíduos forem administrados como fonte única de nutrientes (SOUZA, 2008).

A utilização de enzimas em rações animais é um setor de relevante importância no agronegócio, sendo que as xilanases usadas juntamente com glucanases, pectinases, celulases, proteases, amilases, fitases, galactosidases e lipases degradam a porção de arabinoxilana presente na ração, reduzindo a viscosidade do material bruto e aumentando a digestibilidade da ração (POLIZELI et al., 2005).

Segundo Mussatto et al. (2008) as enzimas celulases são a mistura de várias enzimas que atuam sinergicamente, dentre as quais pelo menos três grandes grupos estão envolvidos nos mecanismos de hidrólise da cadeia de celulose: as endoglucanases, que agem nas regiões de baixa cristalinidade da fibra, gerando cadeias livres; as exoglucanases, que removem unidades de celobiose a partir das extremidades livres da cadeia e as glucosidases, que hidrolisam a celobiose à glicose.

As celulases têm uso extremamente difundido, como aplicações na produção de alimentos, ração animal, em processos de extração de óleos vegetais, maceração de frutas e na fabricação de cervejas e vinhos (ALMEIDA, 2012). As celulases são as enzimas que mais se destacam no processo hidrolítico, pois a celulose representa cerca de 40% da biomassa lignocelulósica (NISHIDA et al., 2013).

Ainda há as pectinases, aquelas enzimas que degradam as pectinas constituintes da parede celular (PEREIRA, 2012). As pectinases são um grupo de enzimas responsáveis pela degradação de moléculas longas e complexas chamadas pectinas, que ocorrem como polissacarídeos estruturais na lamela média e em paredes celulares primárias de plantas jovens (KASHYAP et al., 2001).

As celulases e pectinases são necessárias para a solubilização da biomassa lignocelulósica, sendo esta etapa identificada como o passo de mais alto custo no processo hidrolítico (CASTRO & PEREIRA JÚNIOR, 2010).

Com base no exposto, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar a ação de enzimas na hidrólise de substratos lignocelulósicos (casca de soja, casca de arroz, sabugo/palha de milho e feno de Tifton 85) e para tanto, se estabeleceu os objetivos específicos a seguir:

- Determinar o tempo necessário para a hidrólise dos substratos empregando celulases e pectinases;
- Avaliar diferentes diluições de celulase comercial na hidrólise dos substratos;

- Otimizar a hidrólise pelo estudo de diferentes condições de temperaturas e agitação;
- Estudar o efeito da combinação de celulases e pectinases comerciais na hidrólise dos substratos;
- Avaliar diferentes sistemas de pré-hidrólise seguidas de hidrólise enzimática nas condições maximizadas;
- Avaliar a hidrólise dos substratos com enzimas não comerciais;
- Caracterizar os substratos *in natura* e os substratos hidrolisados enzimaticamente.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo está apresentada uma revisão bibliográfica sobre os principais temas abordados no trabalho.

### 2.1 RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS

O agronegócio tem importante relevância para a economia brasileira, sendo as principais colheitas as de soja, milho, algodão, cana, café, trigo, citrus e a produção pecuária. A produção nacional de grãos da safra 2014/2015 foi de 204,5 milhões de toneladas, com um aumento de 5,6% ou 10,9 milhões de toneladas superior à obtida na safra 2013/14, quando alcançou 193,62 milhões de toneladas (CONAB, 2015).

Do processamento industrial desses produtos destinados para a nutrição humana e o consumo animal, origina-se altas quantidades de resíduos agroindustriais. Os resíduos da agroindústria, como palhas, bagaços, têm aproveitamento muito baixo, principalmente pelo alto teor de lignina na sua composição (ALBERTON et al., 2006). Este material é pouco aproveitado sendo que uma parte é usada para geração de energia elétrica em algumas indústrias como as sucroalcooleiras, enquanto outra grande parte é queimada ou simplesmente fica disponível na lavoura traduzindo-se, muitas vezes, num poluente ambiental. Se for se considerar o total da produção, uma pequena quantidade desses resíduos, é utilizada na alimentação de animais de produção (GRAMINHA et al., 2008).

Os materiais lignocelulósicos podem ser matéria-prima para produção de energia e alguns produtos químicos de valor agregado e a sua utilização poderia resolver os problemas de eliminação de resíduos modernas e também diminuir a dependência dos combustíveis fósseis, proporcionando uma conveniente e renovável fonte de energia, sob a forma de glicose (KAPDAN & KAEGI, 2006).

Muitos dos resíduos lignocelulósicos têm potencial nutricional, especialmente na formulação de dietas para bovinos, e estão recebendo melhor atenção em termos de controle de qualidade e assim estão sendo classificados como subprodutos ou co-produtos agroindustriais (GRAMINHA et al., 2008). Contudo, sua utilização na alimentação animal irá depender de uma série de fatores dentre eles, suas características nutricionais, o custo de transporte e o preparo dos resíduos.

O Brasil, como país tropical, possui excelentes condições para a exploração de ruminantes em pastagens, porém no período da seca em regiões áridas e semiáridas e no inverno gaúcho, a dificuldade de produzir alimentos volumosos, torna-se uma árdua e difícil tarefa para muitos produtores rurais (SOUZA, 2008). O autor menciona ainda, que os resíduos e os subprodutos agroindustriais, como as palhas, o sabugo de milho, fenos, cascas e outros, podem oferecer excelente opção como alimentação alternativa para os ruminantes, desde que tratados adequadamente.

O consumo voluntário dos ruminantes é influenciado por fatores que afetam o processo de digestão (maturidade da forragem, valor nutritivo e digestibilidade), fatores que afetam o processo de ingestão (facilidade de apreensão e colheita da forragem durante o pastejo) e fatores que afetam os requerimentos nutricionais (estágio fisiológico e o nível de desempenho dos animais) (MINSON, 1990).

Se forem administrados na alimentação animal, sem um balanceamento dos nutrientes, os materiais lignocelulósicos oferecem insuficientes quantidades de minerais, energia e proteínas para nutrir os animais (SOUZA, 2008).

Materiais lignocelulósicos são resíduos provenientes da agricultura, de agroindústrias, florestas, tratamento de resíduos sólidos municipais, gramas perenes, entre outros (ADEN et al., 2002). Conforme Kumar, Singh & Singh (2008) os maiores componentes da parede celular de plantas são a celulose, a hemicelulose e a lignina, além de vários extrativos e compostos inorgânicos. A proporção destes componentes varia na composição dependendo da espécie da planta, idade, época de colheita e condição ou estágio de desenvolvimento (JEFFRIES & JIN, 1999).

O material lignocelulósico para ser usado como substrato, precisa ser barato, bem processado e disponível em grandes quantidades (JUHÁSZ et al., 2005). A escolha de materiais agroindustriais deve-se ao fato de possuírem as seguintes características: são recursos renováveis, sua produção depende de outra atividade produtiva, muitas vezes é um subproduto ou produto secundário, sendo produzidos em grande quantidade e normalmente constituem um problema localizado, quando considerados rejeitos ou descarte industrial, que necessitam de algum tratamento ou alguma aplicação (SINGHANIA et al., 2008).

A composição química da biomassa lignocelulósica varia de acordo com o tipo de biomassa, mas, em geral, possui: 35-50% de celulose, 20-35% de hemicelulose e 10-25% de lignina e uma pequena quantidade de cinzas e extrativos (SANTOS et al., 2012). Assim, há muitas possibilidades de utilização dos mesmos. Contudo, a

composição e proporção dos constituintes dos resíduos lignocelulósicos variam não somente de acordo com o tipo do resíduo, mas também com fatores relacionados à origem, safra, condições e tempo de armazenamento.

Na Tabela 1, pode-se observar a composição de alguns tipos de biomassas.

Tabela 1 - Composição química parcial dos resíduos lignocelulósicos em estudo referenciados na literatura.

<b>Substrato lignocelulósico</b>	<b>Celulose (%)</b>	<b>Hemicelulose (%)</b>	<b>Lignina (%)</b>	<b>Referências</b>
Palha de milho	39,8	28,6	22,5	Oliveira, (2010)
Sabuho de milho	41,0	36,0	6,0	Goldestein, (1981)
Feno de Tifton 85	41,5	30,8	9,0	Reis et al. (1991)
Casca de Arroz	38,0	n.a.	22,0	Nakata et al. (1989)
	31,3	24,3	14,3	Zanzi (2001)
	35,0	25,0	20,0	Krishnani et al. (2008)
	30,9	n.a.	16,2	Adel et al. (2011)
	35,0	33,0	23,0	Johar et al. (2012)
Casca de soja	36,4	12,5	1,75	Corredor et al. (2008)
	38,4	10,2	2,8	Mielenz et al. (2009)
	33,4	17,1	9,8	Brijwani et al. (2010)
	39,7	25,5	9,1	Cassales et al. (2011)
	35,3	17,2	2,3	Yoo et al. (2011)

n.a.: não avaliado

### 2.1.1 Casca de Soja

A casca de soja é um subproduto resultante da industrialização da soja. É a película que reveste o grão, e se constitui numa fonte rica em fibra de baixa lignificação, com um teor de proteína bruta de aproximadamente 12% e de fibra bruta em torno de 36%. É um subproduto de grande destaque no agronegócio nacional, em virtude da alta produção brasileira de soja (RESTLE et al., 2004). De acordo com Zambom et al. (2001), a cada tonelada de soja processada, 2% é revertida no resíduo casca de soja. Assim, estima-se que foram gerados cerca de 1,64 milhão de toneladas desse resíduo no Brasil com a safra de 2013/2014 (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2015). Como a grande parte dos subprodutos e/ou resíduos do processamento agroindustrial, a casca de soja é usada na alimentação animal (OLIVEIRA, 2007).



### **2.1.2 Casca de arroz**

O arroz é uma cultura de enorme importância e é produzida no mundo todo. Anualmente cerca de 500 milhões toneladas de arroz são produzidas no mundo, e para cada quilograma de arroz produzidos por volta de 20% de casca de arroz são geradas (PORTUMARTHI et al., 2013). Este resíduo contém elevada concentração de celulose e está amplamente disponível a um custo baixo (SHI et al., 2013).

Resíduos lignocelulósicos agroindustriais, como a casca de arroz são fontes renováveis, abundantes e de baixo valor econômico, disponíveis para a biotransformação em produtos com valor agregado (MONTIPÓ et al., 2013).

A casca de arroz é um resíduo abundante em termos de Brasil, sendo ele o segundo maior produtor mundial de arroz. O estado do Rio Grande do Sul em especial é o maior produtor de arroz do Brasil, sendo responsável por cerca de 50% de toda a produção brasileira (HICKERT, 2010).

A industrialização do arroz gera grandes quantidades de resíduos, como a palha e a casca de arroz. Acima de 113 milhões de toneladas de casca de arroz são geradas a cada ano no mundo (YU et al., 2009).

A composição da casca de arroz apresenta teor de cinza na faixa de 13,2 a 21%. As cinzas por sua vez são constituídas basicamente de 80 a 90% de sílica ( $\text{SiO}_2$ ) e o restante da composição são compostos inorgânicos. No entanto, os componentes orgânicos principais presentes na casca de arroz são a celulose, a hemicelulose e a lignina. O material restante é composto por proteínas, carboidratos e gorduras. Dentre as características da casca de arroz, destacam-se a sua fibrosidade, a abrasividade e o baixo teor de nutrientes (PINTO, CALLONI & SILVA, 2013).

### **2.1.3 Sabugo e palha de milho**

Na atualidade há uma crescente preocupação com o descarte dos resíduos lignocelulósicos, que podem ocasionar problemas ambientais por conterem substâncias de alto valor orgânico, potenciais fontes de nutrientes para micro-organismos, assim como perdas de biomassa e energia (ABUD & NARAIN, 2009).

O milho é uma das principais culturas geradoras de resíduos no Brasil. Sendo destinado para alimentação, os grãos proporcionam a obtenção de uma série de produtos industrializados. Contudo, algumas partes da planta não possuem um uso

direto. O sabugo, que é a parte central da espiga na qual os grãos estão presos, é obtido após ser debulhado o grão. Para cada 100 kg de espigas de milho, estima-se que são produzidos 18 kg de sabugo (AGUIAR, 2010).

Assim como o sabugo a palha também é um resíduo excedente e sem utilização definida. O destino destes resíduos pode ser a alimentação animal (ZIGLIO et al., 2007).

O sabugo, é o resíduo gerado após o milho ser debulhado, geralmente é usado para ração animal, possui em sua composição: celulose (31,7%), hemicelulose (34,7%) e lignina (20,3%). Já, a palha de milho, que na maioria dos casos é deixada no campo após a colheita, apresenta em sua composição: celulose (25-41%), hemicelulose (34,5%) e lignina (14,1%) (AGUIAR, 2010).

#### **2.1.4 Feno de Tifton 85**

Visando a disponibilidade de alimentos volumosos nos período de escassez (seca ou inverno), técnicas de conservação de forragens vêm sendo utilizadas. A fenação é de grande importância como processo de conservação de forragem em função da facilidade e custo de operação. Para a produção de fenos, deve-se escolher forrageiras que reúnam ótimo valor nutritivo e alta produção de matéria seca (MS), obtendo-se assim, um maior rendimento no processo (GOMIDE, 1980).

O feno é um produto dos mais versáteis pois, sendo protegido adequadamente durante o armazenamento, apresenta muitas vantagens: pode ser armazenado por longos períodos, sofrendo poucas alterações no valor nutritivo; várias espécies forrageiras podem ser usadas no processo; pode ser utilizado em qualquer escala; pode ser colhido, armazenado e disponibilizado aos animais manualmente ou através de processo totalmente mecanizado; e pode atender as necessidades nutricionais de diferentes categorias de animais (REIS et al., 2001).

Os capins do gênero *Cynodon* se destacam na produção de feno, sendo o cultivar Tifton 85 amplamente utilizado (ÍTAVO et al., 2003). As plantas do gênero *Cynodon* são apropriadas para a produção de feno, devido possuírem uma morfologia adequada, com haste fina e folhas bem aderidas ao colmo (HADDAD & CASTRO, 1998). Os cultivares que apresentam maior relação folhas/hastes, como o Florarkik, Tifton 85, Coastcross e Florona, geram fenos de melhor qualidade (VILELA, 2005). O

Tifton 85 apresenta grande potencial para produção de matéria seca (MS) e altos coeficientes de digestibilidade (HILL et al., 1998).

## 2.2 PAREDE CELULAR

A parede celular constitui-se numa das mais importantes estruturas da célula vegetal, e é formada por agrupamentos de macromoléculas heterogêneas. Possui composição diversificada. Além dos polissacarídeos, também é composta de pequenas quantidades de proteínas e substâncias fenólicas. As proporções de tais componentes se alteram durante a vida da planta (DHUGGA, 2001).

A parede celular é uma estrutura complexa que exerce inúmeras funções. Proporciona rigidez mecânica, conserva a morfologia das células e controla a expansão celular e transporte intercelular. Também protege a célula de uma grande quantidade de organismos patogênicos e predadores, e participa na comunicação intercelular (CARPITA & GIBEAUT, 1993). Pelo fato de que muitas destas funções são exigidas ao mesmo tempo, em vários estádios de desenvolvimento do vegetal, a parede celular apresenta, ao mesmo tempo, grande flexibilidade e enorme resistência, devido a um sofisticado controle metabólico, com regiões de enorme complexidade, com grandes conteúdos de polissacarídeos, proteínas e compostos fenólicos (COSGROVE, 2000).

Em sua morfologia, a parede celular é dividida em três regiões distintas, a lamela média, parede primária e parede secundária. A lamela média é aquela região de intersecção entre duas células. Esta camada é rica em substâncias pécticas submersas em um meio aquoso (MAcNEIL et al., 1984). A parede primária da maioria dos vegetais tem três estruturas, em sua composição, as microfibrilas de celulose (Aproximadamente 30%), os polissacarídeos não-celulósicos, que incluem hemiceluloses (aproximadamente 30%) e pectinas (aproximadamente 30%) e as proteínas estruturais (aproximadamente 10%) (GIBEAUT & CARPITA, 1994). Esta parede é produzida por células em expansão podendo assim, se alongar com crescimento difuso ou orientado (HAYASHI, 1989). Tais estruturas estão localizadas em duas interfases, a microfibrilar e a matricial. A microfibrilar diferencia-se da matricial pelo alto grau de cristalinidade visível ao microscópio eletrônico e por sua composição química homogênea, sendo constituída basicamente de microfibrilas de

celulose, normalmente arrançadas em padrão helicoidal, organizadas em estruturas longas e finas, ligadas por pontes de hidrogênio (ROLAND et al., 1992). Unidos ao longo das microfibrilas de celulose estão os polissacarídeos não-celulósicos ou hemicelulósicos, localizados em zonas amorfas sem orientação regular. A fase matricial forma-se de polissacarídeos, compostos pécticos, glicoproteínas e substâncias fenólicas, de composição variada nas diferentes camadas da parede (GIBEAUT & CARPITA, 1993).

Ao finalizar o crescimento celular, começa o processo de diferenciação celular, com início da formação da parede secundária (tecido maduro) que confere forte resistência mecânica. A transição da finalização da parede celular primária para a formação da parede secundária é destacado pela redução da síntese de pectina e um grande aumento na síntese de celulose, hemiceluloses e lignina (RAVEN, EVERT & EICHHORN, 2001).

A lignificação que é a fase final da diferenciação celular, ocorre de modo que a lignina depositada estabelece ligações covalentes e não covalentes com a matriz de carboidratos, formando um complexo denominado lignina-carboidratos (SARKANEN, 1998). Do processo de diferenciação destas células origina-se uma intensa lignificação. A lignificação da parede celular começa na região da parede celular primária e se estende em dois sentidos, para o exterior em direção à lamela média, ou para o interior da célula, onde se propaga a parede secundária (LAWOKO, 2005).

As células da parede celular secundária são muito rígidas, como é o caso das fibras e elementos vasculares, e são muito importantes para a sustentação do vegetal, agindo no suporte e condução da água e outros fluídos na planta (BUXTON & REDFEARN, 1997).

A celulose e as hemiceluloses são os componentes da parede celular de maior importância econômica. Então, saber o mecanismo de regulação da biossíntese da celulose e hemiceluloses é uma condição indispensável para alterar-se as características das fibras (REITER, 2002).

## **2.2.1 Componentes da parede celular**

### **2.2.1.1 Celulose**

A celulose, que faz parte da parede celular das plantas, é a biomolécula mais

abundante da natureza (ENGLEHARDT, 1995). A mesma é gerada na forma de microfibrilas de celulose em cadeias lineares de  $\beta$  1,4 D Glicose ligadas por pontes de hidrogênio (DELMER, 1999).

Em cada microfibrila de celulose há aproximadamente 36 cadeias lineares de glicose. A função biológica da celulose parece ser unicamente de suporte proporcionando forma e resistência à parede celular (FRY, 1988).

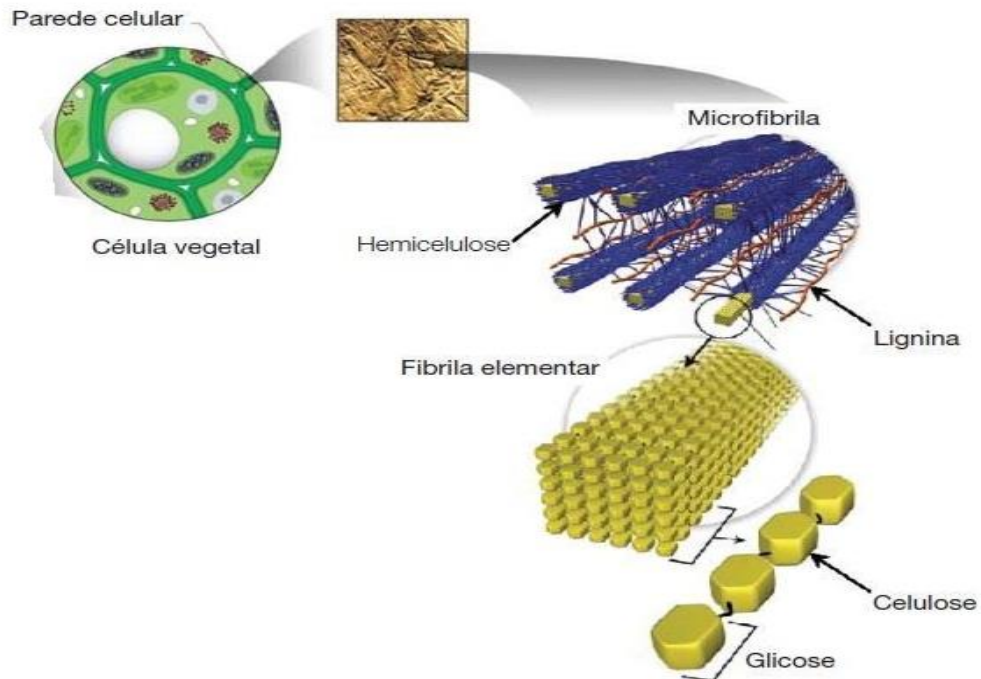
Em geral, a parede primária encerra de 10 a 40% de celulose e a secundária próximo de 40 a 60% (McNEIL et al., 1984).

Os modelos da organização microfibrilar da celulose, mostram que ela tem uma subestrutura predominantemente cristalino unido por ligações amorfas (DELMER, 1999).

Regiões cristalinas se formam em função do aumento da densidade de empacotamento. Há celuloses acessíveis e celuloses não acessíveis. Quanto mais acessíveis, mais interações podem ocorrer entre a celulose e fatores diversos como água e micro-organismos, por exemplo. As superfícies da celulose cristalina são muito acessíveis, mas o resto da estrutura não é. A maioria das celuloses não cristalinas são acessíveis, porém como a estrutura é coberta por hemicelulose e lignina, a acessibilidade fica diminuída (ROWELL, et al., 2005).

Nos materiais lignocelulósicos os açúcares estão na forma de polímeros (celulose e hemicelulose), ficando eles associados entre si e recobertos por uma molécula aromática complexa de lignina. Este conjunto é chamado de parede celular vegetal, difícil de ser desestruturada e convertida em monossacarídeos fermentescíveis (CANILHA et al., 2010), como pode ser observado na Figura 1.

Figura 1 - Estrutura da parede celular de vegetais.



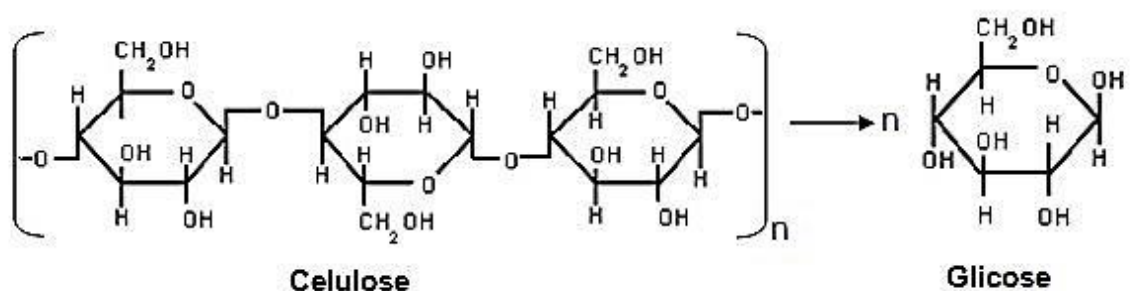
Fonte: Adaptado de Canilha et al. (2010).

Conforme a Figura 1, observa-se que as moléculas de glicose presentes na célula vegetal são de difícil acesso, uma vez que, pela estrutura da célula, essas moléculas apresentam-se em um emaranhado que dificulta o acesso à glicose.

Segundo Santos et al. (2012) a primeira fração de açúcar fermentescível presente na biomassa está na forma de celulose, polímero natural cristalino que possui como monômero a glicose. Desta forma, o processo de hidrólise age quebrando a celulose em várias moléculas de glicose.

A Figura 2 revela a reação de hidrólise da molécula de celulose, de modo que as ligações glicosídicas são quebradas pela reação com a água, pela ação de catalisadores químicos e enzimáticos.

Figura 2 - Hidrólise da molécula de celulose.



Fonte: Adaptado de Santos et al. (2012).

Os tipos de interações entre as moléculas de celulose originam duas regiões: uma região de forte interação e com grande número de ligações entre as moléculas de hidrogênio, ordenada e conseqüentemente cristalina, conferindo a fibra de celulose maior resistência a tração, insolubilidade em solventes orgânicos, água, ácidos e álcalis diluídos, à temperatura ambiente. A outra região é altamente ramificada e desordenada, sendo assim amorfa, concedendo a fibra uma maior flexibilidade. (FENGEL & WEGENER, 1989). Pequenas variações nesta conformação ou no empacotamento das cadeias celulósicas dentro dos cristais levam a um bom número de polimorfos cristalinos, muitos dos quais podem ser interconvertidos por vários processos de tratamento (O'SULLIVAN, 1997).

Na regiões amorfa, devido aos inúmeros capilares e orifícios presentes que possibilitam que, materiais gasosos, água e outros líquidos penetrem em suas fibrilas e micro fibrilas (BALÀZSY & EASTOP, 1999), ocorre o o intumescimento das fibras de celulose. Isso é mais difícil de ocorrer nas regiões cristalinas, pois a forte rede de ligações de hidrogênio impossibilita o inchamento.

A maioria dos polissacarídeos encontrados em paredes celulares vegetais pertence à celulose, hemicelulose ou classes de pectinas. Ainda que a celulose funcione como o componente rígido e sustentador de peso da parede celular, a rigidez da microfibrila celulósica é reforçada dentro de uma matriz de hemicelulose e pectinas. (OGEDA & PETRI, 2010).

#### 2.2.1.2 Hemiceluloses

As hemiceluloses são polissacarídeos complexos, com estrutura semelhante à celulose, de fácil interação com esta molécula, o que confere estabilidade e flexibilidade ao conjunto (SANTOS et al., 2012). Rowell et al. (2005), citam que as hemiceluloses ou polioses são heteropolissacarídeos complexos que apresentam cadeias menores que as das celulosas. São compostas por D-glucose, D-galactose, D-manose, D-xilose, L-arabinose, ácido D-glucurônico e ácido 4-O-metil-glucurônico, interligados às microfibrilas de celulose. Em relação à estrutura, são mais semelhantes às celulosas do que a lignina. As hemiceluloses são ramificadas e mais suscetíveis à hidrólise ácida, quando comparadas às celulosas, uma vez que oferecem maior acesso aos ácidos minerais normalmente usados para catalisar essas reações (CANILHA et al., 2010).

A parede primária das plantas, possui em torno de 20 % de xiloglucanas, que são as hemiceluloses mais abundantes (FRY, 1988).

Em geral, as hemiceluloses apresentam baixo grau de polimerização, sendo que a qualidade e quantidade de açúcares presentes, depende do tipo de parede celular e do material analisado (ROWELL et al., 2005).

As xiloglucanas são polissacarídeos nos quais a cadeia principal é formada por unidades de (1,4)- $\beta$ -D-Glicose. As xilanas são cadeias lineares de monossacarídeos com unidades de xilose. Estabelecem ligações cruzadas com as microfibrilas de celulose e lignina, perfazendo próximo de 5% dos componentes da parede primária e 20% da parede secundária (AWANO et al., 2001).

A estrutura da hemicelulose é mais parecida com a celulose do que com a lignina, sendo que o seu depósito na parede celular é feito num estágio anterior a lignificação. A estrutura de ramificações e as cadeias laterais da hemicelulose interage com a celulose promovendo estabilidade e flexibilidade ao agregado (RAMOS, 2003).

A fração hemicelulósica que compõe a biomassa é suscetível à quebra de forma a se obter açúcares fermentescíveis (SANTOS et al., 2012).

### 2.2.1.3 Pectinas

A pectina refere-se a uma família de oligossacarídeos e polissacarídeos, com características comuns, porém extremamente diversos em sua estrutura fina. O esqueleto péctico é primariamente um homopolímero de ácido galacturônico ligado em 1 $\rightarrow$ 4, com grau variável de grupos carboxilas metil esterificados (RIDLEY, O'NEILL & MOHNEM, 2001).

De acordo com a FAO e EU (União Européia) a pectina deve ser constituída de, pelo menos, 65% de ácido galacturônico (WILLATS, KNOX & MIKKELSEN, 2006).

As pectinas são os principais elementos da lamela média da célula vegetal. Sua principal característica é atuar como um agente cimentante, gerando a união entre as células. Esta propriedade está relacionada à uma importante característica da parede primária, sua porosidade (MOORE et al., 1986).

As pectinas da região da lamela média estão associadas por pontes de  $\text{Ca}^{2+}$  e podem ser solubilizadas por extração com agentes quelantes. Na parede primária, a matriz péctica age como um envoltório para as ligações cruzadas entre celulose e as cadeias de xiloglucanas (CARPITA & GIBEAUT, 1993).

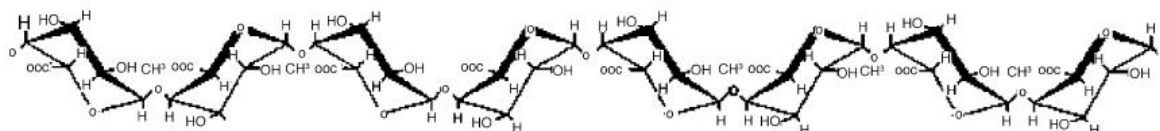


De maneira geral, substâncias pécticas, são polissacarídeos ricos em ácido galacturônico, e quando os polímeros de ácido galacturônico se encontram metil-esterificados, são chamados de polissacarídeos de pectinas. Já quando estão desesterificados, são denominados ácidos pécticos. Nas paredes celulares também pode-se encontrar polissacarídeos neutros (arabinanas, galactanas e arabinogalactanas) que mesmo não possuindo uma cadeia de ácido galacturônico estão, em geral, associados a pectinas (KASHYAP et al., 2001).

Em função da grande diversidade de pectinas nas plantas e sua complexidade, são necessárias diferentes pectinases com diversas formas de ação: poligalacturonase (PG), pectinesterase (PE), pectinaliase (PL) e pectatoliase (PAL). PG, PL e PAL são consideradas enzimas despolimerizantes, pois clivam a molécula de pectina entre os monômeros de ácido galacturônico, seja por hidrólise (PG) ou b-eliminação (PL, PAL). PE catalisa a desesterificação dos grupamentos metoxil da pectina (MARTOS et al., 2013).

As substâncias pécticas, apresentadas na Figura 3 são formadas por uma cadeia principal composta por unidades de ácido galacturônico ligadas entre si através de ligações  $\alpha$ -1,4 e contêm, basicamente, dois tipos de estruturas interligadas: as ramnogalacturonanas e as homogalacturonanas (CHEFTEL et al., 1999). As primeiras são formadas por unidades de ácido galacturônico entremeadas de unidades de ramnose, com cadeias laterais compostas de galactose e arabinose. Já, as homogalacturonanas são formadas por unidades de ácido galacturônico, podendo ser subdivididas em dois grupos: as pectinas, que se caracterizam por ter, pelo menos, 75% dos seus grupos carboxila esterificados com radicais metoxila, e o ácido poligalacturônico, em que as carboxilas das unidades de ácido galacturônico não estão esterificadas (WHITAKER, 1984).

Figura 3 - Estrutura primária de substâncias pécticas.



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

Conforme a American Chemical Society, as substâncias pécticas são

classificadas em protopectina, ácido pectínico, pectina e ácido péctico (SERRA et al., 1992).

A pectina é aquele material polimérico completamente solúvel em água que pode conter até mil resíduos de monossacarídeos por molécula e cuja estrutura pode variar de acordo com a espécie de planta de origem e o processo de extração (WASCHEK et al., 2008). No entanto, a solubilidade diminui com o aumento da cadeia do polissacarídeo péctico, sendo que soluções aquosas de pectina em concentrações de 1 a 2% (m/v) são altamente viscosas. Aspectos como massa molecular, grau de esterificação, força iônica, temperatura e concentração influenciam fortemente a viscosidade (FOGARTY & KELLY, 1983).

De modo geral as enzimas poligalacturonase (PG), pectina liase (PL) e pectato liase (PAL) atuam principalmente na diminuição da viscosidade dos líquidos (REXOVÁ-BENOVÁ & MARKOVIC, 1976).

#### 2.2.1.4 Lignina

A lignina é um dos constituintes da parede celular de todas as plantas vasculares. Possui composição heterogênea, de alto peso molecular e estrutura irregular (HOFRICHTER, 2002).

A lignina representa a maior dificuldade para o aproveitamento dos resíduos lignocelulósicos, pois forma uma barreira física na estrutura, dificultando o aproveitamento da celulose, uma vez que, as enzimas não conseguem penetrar com facilidade, devido a barreira formada, dificultando o acesso das mesmas de forma eficaz às fibras de celulose (RUEGGER & TAU-K-TORNISIELO, 2004).

A lignina, depois da celulose, é a macromolécula orgânica mais abundante dentre os materiais lignocelulósicos. Apresenta conformação tridimensional e amorfa, perfazendo de 20 a 30% do total dos lignocelulósicos. A função biológica da lignina é dar suporte estrutural à parede celular das plantas, pois a parede celular lignificada é vista como um complexo com microfibrilas de celulose e hemicelulose, além de conferir resistência ao material lignocelulósico impedindo os ataques microbianos (LEE, 2003).

A lignina é um complexo polimérico extremamente resistente à hidrólise. Sua rigidez e hidrofobia são cruciais para o suporte mecânico. A maior concentração da lignina está situada na região da lamela média, e sua concentração no interior da parede celular secundária é menor (FRY, 1988).

A lignina tem sua composição variada de acordo com a matriz lignocelulósica. A lignina atua como barreira física ao processo de hidrólise enzimática, podendo se ligar às enzimas deixando-as inativadas (SANTOS et al., 2012).

A lignina sendo um material hidrofóbico e amorfo atua como um cimento entre as fibrilas e como um agente enrijecedor no interior das fibras. A força de adesão entre as fibras de celulose e a lignina é aumentada pela existência de ligações covalentes entre as cadeias de lignina e os constituintes da celulose e da hemicelulose (SILVA et al., 2009).

A lignina, bem como a hemicelulose, começa a dissolver em temperatura de 180°C em condições neutras (BOBLETER, 1994). Em função do seu caráter hidrofóbico é solúvel em solvente orgânico, à quente. A solubilidade da lignina em meios ácido, neutros ou alcalinos depende dos precursores da lignina (GRABBER, 2005).

### **2.3 ENZIMAS DEGRADADORAS DA PAREDE CELULAR**

As enzimas são moléculas protéicas, produzidas pelas células, que catalisam reações químicas específicas nos sistemas biológicos (KUNG Jr et al., 1997; McALLISTER et al., 2001).

As enzimas, denominadas de enzimas degradadoras da parede celular vegetal, compreendem pectinases, celulases, xilanases e proteases, podendo apresentar ação tanto sinérgica como sequencial na degradação dos substratos. A parede celular das plantas superiores é constituída por até 90% de carboidratos e 10% de proteínas. As paredes celulares apresentam celulose, hemiceluloses, substâncias pécticas, proteínas e lignina. Contudo, a proporção e a distribuição destes componentes são variáveis de acordo com células de diferentes tecidos, idades, condições fenológico-ambientais e mecanismos de defesa da planta hospedeira (WULFF, 2002).

A utilização de enzimas exógenas é uma tecnologia em desenvolvimento (NSEREKO et al., 2000). Iniciou no final da década de 1960 e durante os últimos tempos vem avançando, devido ao seu amplo campo de aplicação, maior estabilidade de celulase e hemicelulase à ação das proteases do rúmen (KUNG Jr., 2002), alto custo de produção nos confinamentos e disponibilidade de melhores produtos no mercado (BEAUCHEMIN et al., 2003). As celulases destacam-se como o mais

importante grupo de enzimas necessárias para a degradação de paredes celulares de plantas vasculares (SAHA et al., 2006).

### 2.3.1 Enzimas fibrolíticas

Segundo Beauchemin et al. (1997) visando potencializar a utilização dos alimentos fibrosos pelos ruminantes, pesquisas foram realizadas com o objetivo de aumentar a digestibilidade da matéria seca. Uma das estratégias desenvolvidas para esse fim foi aumentar a quantidade de enzimas fibrolíticas presentes no rúmen e no intestino, o que era alcançado através da suplementação com enzimas fibrolíticas exógenas. A maioria das preparações comerciais enzimáticas é produto da fermentação fúngica, predominantemente das espécies *Trichoderma* e *Aspergillus*, e bacteriana, principalmente *Bacillus*. A celulose e a hemicelulose são os principais alvos das enzimas fibrolíticas celulasas e hemicelulasas, respectivamente.

A aplicação de enzimas exógenas em rações concentradas para vacas leiteiras aumentou a eficiência alimentar em 6 a 12%, dependendo do nível de adição (BEAUCHEMIN et al., 1997), estando relacionado ao incremento na digestibilidade da dieta (IWAASA et al., 1997).

Em vacas leiteiras, verificou-se aumento médio no consumo de matéria seca de 1,0 a 1,3 kg dia<sup>-1</sup>, e na produção de leite de 1,1 a 1,5 kg dia<sup>-1</sup> (3,4 a 4,7%) (KRAUSE et al., 1998). Lewis et al. (1999), aplicaram na forragem uma mistura de xilanases e celulasas (1ml kg<sup>-1</sup> de MS total) e observaram aumento de 6,3 kg dia<sup>-1</sup> (16%) na produção de leite. No entanto, em níveis enzimáticos maiores e menores, o mesmo produto não foi efetivo. Rode et al. (1999) adicionaram enzimas à fração concentrada da dieta e observaram aumento na produção de 3,6 kg dia<sup>-1</sup> (10%).

Yang et al. (2000) acrescentaram enzimas ao concentrado e obtiveram maior produção de leite, 2,1 kg dia<sup>-1</sup> (5,9%).

Segundo Loures (2004), o uso de enzimas fibrolíticas na ensilagem do capim Tanzânia emurhecido ou não, apesar de ter reduzido o conteúdo de fibra em detergente neutro (FDA) e fibra em detergente ácido (FDA) da silagem, não provocou alterações significativas nos parâmetros ruminais (pH, amônia e ácidos graxos voláteis), nem aumentou o potencial de utilização da silagem pelos animais, através das variáveis; consumo de MS e degradabilidade da MS e da fibra. Os autores não observaram efeito do pré-emurhecimento ou não do capim Tanzânia na ação das

enzimas exógenas. No entanto, a literatura revela que as enzimas podem ser mais efetivas quando adicionadas em forragens secas do que úmidas (FENG et al., 1996). A autora mencionou ainda que a aplicação da preparação enzimática minutos antes do fornecimento da dieta constituída de silagem de capim não tratado, proporcionou os melhores resultados sobre a digestibilidade da fração fibrosa, indicando que talvez essa forma de aplicação seja o método mais viável para se obter maior efetividade das enzimas fibrolíticas.

Martins (2003) verificou que a resposta a suplementação da dieta de bovinos de corte a enzimas fibrolíticas foi dependente da fonte de volumoso, sendo que quando o volumoso foi composto por feno de Tifton 85 a ação das enzimas foi mais eficiente do que na silagem de milho. Mesmo com o consumo de matéria seca (MS) e de fibra em detergente neutro (FDN) não tendo aumentado, a digestibilidade da matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), energia bruta (EB), fibra em detergente neutro (FDN) e celulose aumentou em 6,1; 6,8; 6,7; 24,5; 16%, respectivamente, quando as enzimas foram adicionadas ao feno, enquanto a adição na silagem de milho não alterou os respectivos parâmetros.

### 2.3.1.1 Celulases

As celulases são um complexo enzimático que tem a capacidade de atuar sobre materiais lignocelulósicos promovendo sua hidrólise, assim são classificadas como hidrolases. Essas enzimas são biocatalizadores específicos que atuam conjuntamente para a liberação de açúcares, dos quais a glicose, é o mais importante (CASTRO e PEREIRA, 2010)

Na natureza, a celulose é degradada exclusivamente por micro-organismos, distribuídos entre o grupo das eubactérias e dos fungos. A degradação microbiana da celulose é feita pela atuação de um complexo enzimático, as celulases. Tais enzimas fazem parte da família das glicosil-hidrolases, que hidrolisam oligossacarídeos e polissacarídeos e reconhecem as ligações  $\alpha$ -1,4 entre as moléculas de glicose (HAICHAR et al., 2007). O complexo enzimático celulolítico é formado por três classes de enzimas que atuam sinergisticamente na hidrólise da celulose: endoglucanases (1,4- $\alpha$ -D-glucanglucanohidrolase), exoglucanases (exo1,4- $\alpha$ -D-glucan-celobiohidrolase) e  $\alpha$ -Dglucosidases ou celobiasas (JUHÁSZ et al., 2005).

As endoglucanases (EC 3.2.1.4) são as enzimas responsáveis por dar início a hidrólise da molécula de celulose. Essas enzimas atuam randomicamente na região amorfa da cadeia de celulose, clivando ligações  $\alpha$ -1,4 na região central da molécula e liberando oligossacarídeos de diversos graus de polimerização (DIENES et al., 2004). A carboximetilcelulose (CMC) é utilizada como substrato preferencial para a atividade dessas enzimas (CAO & TAN, 2002).

Durante o processo, as endoglucanases hidrolisam preferencialmente as ligações internas no polímero da celulose, produzindo oligossacarídeos de menor peso molecular, chamados de celodextrinas, além de celobiose. A região catalítica da enzima é dada pela forma que permite a ligação da enzima e a hidrólise na parte média da fibra da celulose. Assim, as endoglucanases atacam de forma mais ou menos aleatória as ligações  $\beta$ -(1-4)-glicosídicas em regiões amorfas da celulose ou na superfície das microfibrilas (RABELO, 2007). As exoglucanases ou celobiohidrolases (EC 3.2.1.91) agem nas extremidades da molécula de celulose microcristalina, liberando unidades de celobiose (CAO & TAN, 2002). As celobiohidrolases são de dois tipos: a tipo I, que hidrolisa terminais redutores, e as do tipo II, que hidrolisa terminais não redutores. As celobiohidrolases sofrem inibição pelo seu produto de hidrólise, a celobiose, por isso, é de grande importância a atuação de outras enzimas do complexo celulolítico – as  $\alpha$ -glucosidases (BON et al., 2008). As enzimas  $\alpha$ -glucosidases catalisam a hidrólise da celobiose a glicose, reduzindo, assim, a inibição das endoglucanases e exoglucanases pela presença deste dímero (PETROVA et al., 2002).

A hidrólise enzimática da celulose é realizada pelas enzimas celulases e este processo extrai do material celulósico açúcares redutores, incluindo a glicose (RABELO, 2007).

A produção de celulases em escala industrial iniciou em meados da década de 1980, visando sua aplicação como um aditivo para ração animal, de forma a aumentar a digestibilidade de rações por ruminantes e monogástricos. As celulases têm importante papel na nutrição animal, ao serem incorporadas à ração, essas enzimas, juntamente com as celulases produzidas pelos micro-organismos presentes no rúmen do animal, aumentam a digestibilidade das fibras da parede celular vegetal, melhorando a conversão do alimento consumido (pastagem) em carne e leite (CASTRO & PEREIRA, 2010).

### 2.3.1.2 Hemicelulases

Em função da sua complexa estrutura, a degradação completa da xilana exige a ação conjunta de diversas enzimas hidrolíticas. As endoxilanases  $\beta$ -1,4 (EC 3.2.1.8) clivam a estrutura principal da xilana, e as  $\beta$ -xilosidases (EC 3.2.1.37) clivam xilose das extremidades não redutoras de oligômeros de xilose. Já, a remoção dos grupos laterais é catalisada por  $\alpha$ -21 glicuronidases (EC 3.2.1.134),  $\alpha$ -L-arabinosidases (EC 3.2.1.155) e acetilesterases (EC 3.1.1.72). No caso da manana, a região central da molécula é hidrolisada por  $\beta$ -1,4-endomananases, produzindo manobiose e oligossacarídeos, os quais são clivados por  $\beta$ -manosidases para liberar manose (BRAITHWAITE et al., 1995).

### 2.3.1.3 Pectinases

As pectinases, ou enzimas pectinolíticas, pertencem a um grupo de enzimas que agem sobre as substâncias pécticas. No que diz respeito às substâncias pécticas, constituem um grupo heterogêneo de polissacarídeos complexos que se encontram, principalmente, na lamela média e na parede celular de plantas superiores, na forma de pectato de cálcio e de magnésio (CHEFTEL et al., 1999, JAYANI et al., 2005).

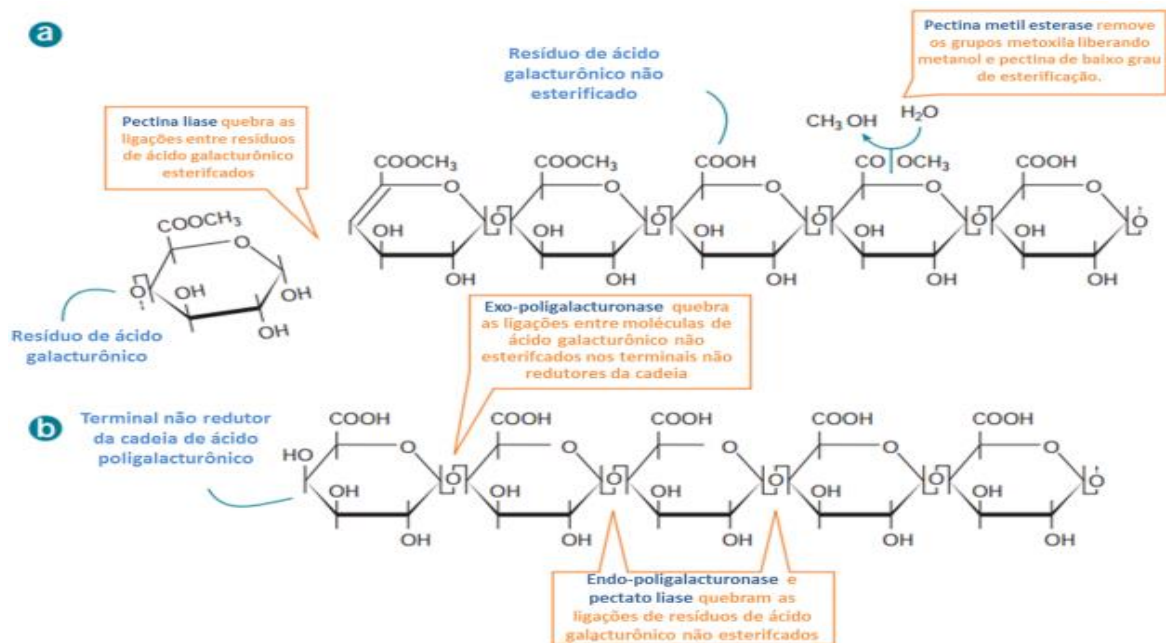
A ação das enzimas pectinolíticas acontece através de reações de hidrólise e de trans-eliminação, promovendo a despolimerização das moléculas, e através de reações de desesterificação, hidrolisando a ligação éster entre os grupos carboxila e metil das pectinas (KASHYAP et al., 2001). Dependendo do mecanismo de ação, as enzimas pécticas são divididas em despolimerizantes e desmetoxilantes. As enzimas despolimerizantes atuam catalisando a quebra das ligações  $\alpha$ -1,4 da cadeia principal do polissacarídeo péctico. Por sua parte a desmetoxilante desesterifica a pectina a ácido péctico por remoção dos resíduos metoxila (PILNIK & ROMBOUTS, 1981; KASHYAP et al., 2001).

Kashyap et al. (2001), classificam as pectinases despolimerizantes considerando os seguintes critérios:

- Forma pela qual a ligação é rompida (hidrólise ou trans-eliminação);
- Posição de ataque ao substrato (endopectinase ou exopectinase);
- Tipo de substrato hidrolisado (ácido péctico ou pectina).

A Figura 4 ilustra o mecanismo de ação de algumas das enzimas do complexo pectinolítico. A pectina metilesterase remove os grupos metoxila da cadeia principal altamente metoxilada, a qual esta representada pela letra 'a', diminuindo seu grau de esterificação. Isso oportuniza que as poligalacturonases façam a hidrólise da cadeia de forma aleatória (endo-PG) ou a partir de seus terminais (exo-PG). Essas enzimas agem somente em substratos de baixo grau de metoxilação representado pela letra 'b'. Já a pectina liase rompe as ligações glicosídicas entre os resíduos de ácido galacturônico por transeliminção, sem interferência no grupo éster, o qual é responsável por aromas específicos dos sucos de frutas e pela liberação de metanol (Yadav et al., 2009). Os autores mencionaram ainda que a pectina liase é a única pectinase capaz de atuar sem a ação das demais pectinases, independentemente do grau de esterificação da cadeia de pectina.

Figura 4 - Mecanismo de ação das enzimas pectinolíticas.



Fonte: Adaptado de NCBE, 2000.

As pectinases são usadas em conjunto com outras enzimas para reduzir a viscosidade da ração animal, a fim de aumentar a liberação e a absorção de nutrientes através da hidrólise das fibras não biodegradáveis e dos nutrientes bloqueados pelas fibras (JAYANI, 2005).



Muitas são as aplicações das pectinases. Nas indústrias de alimentos incluem amadurecimento de frutas, clarificação e redução de viscosidade em sucos de frutas, tratamento preliminar do suco de uva para indústrias vinícolas, extração de polpa de tomate, fermentação de chá e chocolate, tratamento de resíduos vegetais, degomagem de fibras nas indústrias têxtil e de papel, nutrição animal, enriquecimento protéico de alimentos infantis e extração de óleos (UENOJO & PASTORE, 2007).

## **2.4 HIDRÓLISE DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS**

Ja'afaru (2007) produziu enzimas celulases de *Aspergillus niger* e as utilizou na hidrólise enzimática de espiga de milho e serragem. Öhgren (2006) verificou o efeito da remoção da hemicelulose e lignina na hidrólise enzimática de resíduos de milho. Aguiar (2010) usou enzimas celulases para hidrolisar bagaço de cana-de-açúcar. Chen, Xia & Xue (2007) realizaram hidrólise enzimática e produção de etanol utilizando espiga de milho. Akhtar (2001) utilizou celulases produzidas por *Bacillus subtilis* na sacarificação de palha de trigo, de arroz e bagaço de cana-de-açúcar. Rabelo (2007) testou o desempenho do pré- tratamento alcalino na hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar.

### **2.4.1 Fatores que afetam a hidrólise enzimática dos resíduos lignocelulósicos**

A hidrólise enzimática de resíduos lignocelulósicos se processa inicialmente em um sistema heterogêneo (substrato insolúvel e enzimas solúveis), sendo que vários fatores têm sido apontados como limitantes à hidrólise e podem ser divididos em dois grandes grupos: os associados às mudanças na estrutura do substrato e os relativos ao comportamento das enzimas durante o processo hidrolítico (RAMOS, 2000).

Segundo RABELO, (2007) é fundamental a otimização das condições de hidrólise para obter-se o funcionamento satisfatório dos processos de sacarificação. Os fatores associados ao substrato se referem ao aumento gradativo da resistência da celulose à ação enzimática. Isso ocorre devido ao ataque preferencial das enzimas às regiões mais acessíveis da estrutura da celulose (RAMOS, 2000).

A hidrólise enzimática é impactada, além da concentração, pelo grau de polimerização, cristalinidade, área acessível e a presença de lignina, que depende do substrato utilizado (RABELO, 2007).

O grau de polimerização e a cristalinidade do substrato envolve à “reatividade” da celulose e se relaciona com suas características moleculares e organização estrutural. A área superficial disponível do substrato e a porosidade definem o conceito de “acessibilidade” das enzimas ao substrato e têm relação direta com fenômenos associados à difusibilidade das enzimas ao longo do processo hidrolítico (RAMOS, 2000).

O teor de lignina está negativamente correlacionado com a eficiência da hidrólise, pois a lignina age como uma barreira. A lignina não necessita ser completamente removida para aumentar a digestibilidade da celulose, já que apresenta maior efeito negativo quando está “blindando” as microfibrilas da mesma, então o tipo de pré-tratamento é um fator importante no rendimento da hidrólise (RABELO, 2007).

O grau de cristalinidade é considerado uma indicação da reatividade do substrato. A hidrólise enzimática da celulose é de 3 a 30 vezes mais rápida para celulose amorfa comparada com a hidrólise de celulose cristalina (ZHANG & LYND, 2004). Alguns pré-tratamentos que causam redução da cristalinidade dos substratos também produzem o aumento da área superficial que tem sido apontada como causa do aumento em taxas de hidrólise em muitas pesquisas (ZHANG & LYND, 2004). Fierobe et al. (2002), citados por ZHANG & LYND (2004), verificaram que a acessibilidade da celulose é mais importante do que o índice de cristalinidade na determinação de taxas de hidrólise.

Por outro lado Gomes (1985), afirma que a velocidade de hidrólise depende mais da cristalinidade do que da superfície de contato da celulose com a enzima. Considerando tanto a incerteza de metodologias para determinar o índice de cristalinidade, como resultados conflitantes sobre a alteração deste índice durante a hidrólise, não é possível concluir que o índice de cristalinidade é um fator determinante da taxa de hidrólise enzimática (ZHANG & LYND, 2004).

Conforme Zhang & Lynd, (2004), o grau de polimerização de substratos celulósicos está relacionado a quantidade de ligações  $\beta$ -glicosídicas terminais e interiores e a quantidade de substratos para a ação das enzimas exo e endoglucanases, respectivamente. A solubilidade da celulose diminui drasticamente com o aumento do grau de polimerização, por causa da presença de pontes de hidrogênio intermoleculares na estrutura de celulose. Os autores mencionam ainda que a mudança do grau de polimerização durante a hidrólise é determinada pela

relativa proporção das atividades de exo e endoglucanases e das propriedades da celulose. As exoglucanases atuam nas extremidades da cadeia, desencadeando apenas um incremento na redução do grau de polimerização. Já, as endoglucanases hidrolisam preferencialmente as ligações internas no polímero, causando uma redução drástica do mesmo.

As enzimas celulases podem ligar-se à superfície do substrato antes da hidrólise de partículas insolúveis de celulose. Se uma determinada amostra é desagregada em partículas, teoricamente, frações com partículas menores, teriam maior área superficial. Desta forma, enzimas hidrolíticas poderiam interagir mais com o substrato, o que conduziria a uma taxa de sacarificação maior. Todavia, resultados conflitantes têm sido relatados sobre a influência da granulometria sobre a eficiência da sacarificação (ZHANG & LYND, 2004).

Na avaliação de pré-tratamentos na hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para produção de etanol, Rabelo (2007), observou que não há grande influência do tamanho da partícula na liberação dos açúcares fermentescíveis.

De acordo com Ramos (2000) e Pitarelo (2007), quanto ao comportamento das enzimas durante o processo hidrolítico, pode-se destacar os seguintes fatores: 1. Inibição retroativa das celulases, por causa do acúmulo do produto final de hidrólise no meio de reação (glicose e celobiose); 2. Inativação das enzimas pelo efeito prolongado da temperatura e agitação; 3. Adsorção inespecífica e/ou não produtiva de um ou mais componentes enzimáticos sobre complexos lignina-carboidrato (hemicelulose e lignina); 4. Concentração de enzima; 5. Tempo de duração da hidrólise; 6. pH do meio. A celulose cristalina é altamente resistente ao ataque enzimático. A maioria das ligações glicosídicas na microfibrila são inacessíveis às enzimas, e todas as ligações clivadas pela ação das endoglucanases podem ser reformadas devido à orientação estável das ligações glicosídicas. Consequentemente, a degradação da celulose cristalina requer a ação sinérgica da endoglucanase e exoglucanase (RABELO, 2007). As exoglucanases removem as unidades de celobiose das extremidades, criadas pela ação das endoglucanases, impedindo assim a reformação das ligações glicosídicas. As duas enzimas podem agir consecutivamente ou em harmonia. As exo e endoglucanases são inibidas pela celobiose, e a ação da  $\beta$ -glucosidade é frequentemente a etapa limitante na degradação da celulose (RABELO, 2007). O autor cita também que o efeito do complexo da enzima celulase é expresso pela ação sinérgica destas três diferentes

enzimas sobre a celulose e este sistema de enzimas precisa ser mantido estável, para a atividade celulolítica elevada. Em consequência da ação das endo e exoglucanases na celulose, a celobiose e a glicose são obtidas, e enquanto sua concentração no meio reacional aumenta gradualmente, as atividades das celulasas respectivas são inibidas por estes produtos, tendo por resultado uma diminuição final na taxa e no rendimento do processo de sacarificação. A celobiose apresenta um poder de inibição maior no complexo celulolítico sendo mais expressivo que a inibição por glicose (RABELO, 2007).

A atividade catalítica das enzimas é altamente dependente da temperatura, porém, à medida que se eleva a temperatura dois efeitos ocorrem simultaneamente: (a) a taxa de reação aumenta, como se observa na maioria das reações químicas; e (b) a estabilidade da proteína decresce devido à desativação térmica (FURIGO Jr., 2001). A influência da temperatura sobre a atividade da enzima é geralmente, representada em termos de velocidade de reação em função da temperatura, ou seja, a maioria das reações químicas se processa a uma velocidade maior à medida que a temperatura aumenta. O efeito da temperatura sobre a atividade enzimática depende de um número de fatores que incluem o pH, a força iônica do meio e a presença ou ausência de ligantes. Os substratos freqüentemente protegem a enzima da desnaturação pelo calor. Toda enzima tem uma temperatura ótima para atingir sua atividade máxima (FURIGO Jr., 2001).

Sob determinadas condições, a velocidade de transferência do substrato em produto é proporcional à quantidade de enzima (FURIGO Jr., 2001).

Krishna & Chowdary (2000) e colaboradores, em estudos de sacarificação de *Antigonum leptopus* e folha de banana, verificaram que o índice de sacarificação se manteve constante, após certa concentração de enzimas, mesmo após o aumento da mesma.

Em baixas concentrações de enzima a velocidade da reação enzimática é diretamente proporcional à concentração, mas em altas concentrações, a velocidade é máxima e seu valor independe da concentração enzimática. Como o custo das enzimas celulasas contribui significativamente no custo total dos processos de conversão de biomassa, a dosagem de enzima deve ser minimizada (CHEN et al., 2007), desde que não interfira no rendimento.

O tempo de hidrólise enzimática tem efeito na temperatura de trabalho, então rápidas reações conduzem a uma maior temperatura de trabalho (AGUIAR, 2001).

Segundo Bailey & Ollis (1986) a desativação enzimática pode ocorrer devido à fatores como temperatura e ausência de substrato. Portanto, pode-se concluir que a hidrólise enzimática conduzida por tempos prolongados pode acarretar na diminuição da atividade enzimática devido à desnaturação da enzima pela temperatura e/ou devido à ausência de substrato.

De acordo com Zhang (2006), tempos muito curtos de reação não serão suficientes para a degradação tanto da fração amorfa como da fração cristalina da celulose. Desta forma, o tempo de hidrólise deve ser suficiente para garantir a degradação total da celulose sem que ocorra desativação enzimática.

As enzimas possuem grupos básicos, neutros e ácidos em sua estrutura, onsequentemente, as mesmas podem conter os grupos carregados negativamente ou positivamente em um determinado pH. Como os grupos ionizáveis fazem geralmente parte do sítio ativo, para que uma catálise ácida ou básica seja possível, os grupos ionizáveis no sítio ativo devem possuir uma carga em particular, isto é, a enzima cataliticamente ativa existe somente em um estado de ionização definido (BAILEY & OLLIS, 1986).

Variações no pH do meio resultam em mudanças na forma iônica do sitio ativo e mudanças na atividade das enzimas e, portanto, na taxa da reação hidrolítica. Mudanças no pH podem também alterar a forma tridimensional da enzima. Por essas razões, enzimas são somente ativas em certa faixa de pH. Em alguns casos o substrato pode conter grupos iônicos e o pH do meio pode afetar a afinidade da enzima pelo substrato. Determinações teóricas do pH ótimo de enzimas são extremamente difíceis. O pH ótimo para uma enzima é geralmente determinado experimentalmente (SHULER, 1992).

## **2.5 PRÉ-TRATAMENTOS DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS**

Com uma quantidade abundante de açúcares disponíveis na sua composição, os resíduos lignocelulósicos se apresentam como promissores fornecedores de energia para a produção de ruminantes. No entanto, necessitam de um pré-tratamento para que a estrutura da hemicelulose e da lignina, que dificulta o acesso de reagentes e catalisadores, possa ser rompida ou até mesmo removida, facilitando o acesso das enzimas à celulose (OLIVEIRA et al., 2011).

Conforme Lee (1997), a complexidade da parede celular é responsável pela enorme dificuldade ao ataque de enzimas hidrolíticas aos componentes da parede limitando o grau de fermentação ruminal. O autor menciona que os materiais lignocelulósicos devem ser tratados por processos físicos, químicos ou enzimáticos de forma a liberar os açúcares fermentescíveis ou aumentar sua susceptibilidade à hidrólise enzimática.

A celulose apresenta regiões cristalinas e amorfas, sendo que a forma cristalina é mais resistente à degradação química, microbiana e enzimática. Os graus de polimerização da celulose irão determinar a severidade do pré-tratamento a ser utilizado quando tem-se por objetivo liberar a glicose do composto (COHEN et al., 2005). Assim, a cristalização natural da lignocelulose e a sua resistência à hidrólise são os maiores obstáculos na produção de açúcares fermentescíveis de forma economicamente viável (KUMAR et al., 2008).

A combinação de lignina e hemicelulose cria um invólucro protetivo em torno da celulose. Esta proteção deve ser modificada ou removida para uma eficiente hidrólise da celulose (ALVIRA, 2009; EL-ZAWAWY, 2011).

A maior dificuldade para o aproveitamento dos resíduos lignocelulósicos é a barreira física criada pela lignina, a qual impede o aproveitamento da celulose na forma inativa (DURÁN et al., 1998). Em consequência, a hidrólise enzimática da biomassa depende inicialmente de um pré tratamento para romper a lignina e destruir a cristalinidade da celulose (SILVA et al., 2010).

Na biomassa lignocelulósica a associação entre os três constituintes majoritários faz com que esta seja resistente à bioconversão dificultando o aproveitamento dos resíduos lignocelulósicos como fonte de carboidrato. Um processo de hidrólise enzimática com prévia etapa de pré tratamento tem o seu rendimento aumentado de 20% para 90% (NOJIRI, 2009). Em vista disso, a etapa de pré-tratamento dos resíduos agrícolas, antes da hidrólise é imprescindível para aumentar a digestibilidade da biomassa e fazer com que a celulose torne-se mais acessível às enzimas que convertem os carboidratos em açúcares fermentescíveis (CHANG et al., 1998).

Para contornar a difícil estrutura da biomassa lignocelulósica, os pré-tratamentos têm sido alternativas plausíveis que vem sendo amplamente estudadas. A conversão dessa matéria-prima é melhorada quando se utiliza o pré-tratamento do material, que irá melhorar a digestibilidade química e enzimática dessa biomassa e

enfim obter uma eficiente liberação dos açúcares (SILVA, 2009).

Se o pré-tratamento for muito agressivo, os açúcares liberados podem ser degradados em compostos inibidores das enzimas diminuindo o rendimento. Entretanto, se condições muito brandas de pré-tratamento forem empregadas, resultará em pequena acessibilidade para a enzima (SENDELIUS et al., 2005).

Os pré-tratamentos se fazem necessários, pois promovem efeitos como a maior acessibilidade na área de superfície, diminuição na cristalização da celulose, despolimerização parcial da celulose, solubilização da hemicelulose e/ou lignina e a mudança da estrutura da lignina (MARGEOT et al., 2009).

Para que as enzimas celulasas possam agir sobre a estrutura da celulose, deve existir um contato direto entre o complexo enzimático e as microfibras da celulose. Em vista disso, a taxa de hidrólise enzimática da celulose é profundamente afetada pela estrutura do material lignocelulósico (RABELO, 2007). O pré-tratamento desse material aponta para a desorganização do complexo lignocelulósico e, como consequência o aumento da acessibilidade das enzimas às moléculas de celulose (PEREIRA Jr., 2007).

Vários tipos de pré-tratamento podem ser utilizados para aumentar a susceptibilidade da associação celulose-lignina e melhorar a hidrólise enzimática. Os mesmos podem ser agrupados em quatro categorias: físico, químico, biológico ou uma combinação deles (RABELO, 2007).

Várias tecnologias têm sido propostas, geralmente combinando processos físicos e químicos. Para tratamentos físicos, tem-se disponível, diversos tipos de moagem. Já os tratamentos químicos e físicos compreendendo a explosão a vapor, extração por água líquida quente (LHW), explosão de fibra com amônia (AFEX), hidrólise alcalina, extração por solventes, hidrólise ácida diluída, entre outros (SUN & CHENG, 2002).

Segundo Baudel (2006), os tratamentos físicos convertem os materiais em pó fino, aumentando a superfície específica da celulose, de modo que a hidrólise da mesma ocorre com relativa facilidade. O autor cita ainda que a maior desvantagem associada a este método consiste no elevado consumo energético. Em adição a tais processos, existe o tratamento de deslignificação biológica e a própria hidrólise enzimática da celulose, que necessita de maior tempo de processo e possui alto custo de produção, respectivamente (SUN & CHENG, 2002). São comumente utilizados pré-tratamentos químicos para separar a lignina da celulose e hemicelulose, reduzir a

cristalinidade da celulose e aumentar a porosidade do material lignocelulósico, favorecendo a hidrólise enzimática (KUO & LEE, 2009).

A resistência da biomassa é explicada por vários fatores como a cristalinidade da celulose, a proteção da celulose pela lignina e pela hemicelulose e a área superficial (CHANG & HOLTZAPPLE, 2000), isto é o relacionamento entre os fatores estruturais e composicionais que refletem a complexidade dos materiais lignocelulósicos.

O propósito de um pré-tratamento é ser seletivo e funcional viabilizando a acessibilidade da celulose, ser eficiente em termos de rendimento, evitar a degradação de carboidratos e apresentar consumo reduzido de energia e insumos. O processo deve ter qualidade com higiene, simplicidade e segurança e que evite ou minimize a geração de compostos inibidores às enzimas (BAUDEL, 2006), além disso, deve contemplar fatores econômicos como o custo do reagente de pré-tratamento, a possibilidade de este ser reciclável e a possibilidade de aproveitamento de co-produtos da lignina de alto valor agregado (LADISCH et al., 1983; DELGENES et al., 1996).

O pré-tratamento é uma das etapas do processo mais custosas na conversão da biomassa em açúcares fermentescíveis e dentre as várias opções de pré-tratamentos relatados na literatura os fatores citados anteriormente são uma base de comparação para a escolha de um processo eficiente e de baixo custo (LEE et al., 1994; MOSIER et al., 2003).

O pré-tratamento do bagaço de cana é de extrema importância para o fracionamento dos três componentes. O mesmo é realizado através da solubilização e/ou pela degradação parcial da hemicelulose e da lignina, expondo as fibras de celulose e tornando esta mais acessível ao ataque das enzimas (HAHN-HÄGERDAL et al., 2006).

### **2.5.1 Tipos de pré-tratamento**

A degradação enzimática da celulose está diretamente relacionada ao teor de lignina e a sua disposição nas fibras da biomassa. Para a enzima celulase catalisar a hidrólise da celulose, é preciso acontecer um contato direto entre as microfibras da celulose e o complexo enzimático, de forma que a taxa de hidrólise enzimática da



celulose é profundamente afetada pela estrutura do material lignocelulósico. Diferentes métodos de pré-tratamento têm sido desenvolvidos para fragmentar a matriz que a hemicelulose e a lignina formam em torno da celulose aumentando assim a susceptibilidade da biomassa as celulasas (MCMILLAN, 1994).

O pré-tratamento da biomassa lignocelulósica pode ser feito com os pré-tratamentos físicos (ex. moagem), físico-químico (ex. autohidrólise), químicos (ex. ácidos, agentes oxidantes, bases), biológicos, elétricos ou uma combinação deles (KUMAR et al., 2009).

As operações físicas de pré-tratamento utilizam apenas energia mecânica e possibilitam a redução do tamanho da partícula através de moagem ou trituração, aumentando a superfície específica e causando a quebra de ligações de longas cadeias moleculares, diminuindo o grau de polimerização (SOUSA et al., 2009).

Pré-tratamentos que combinam princípios físicos e químicos geralmente representam a melhor opção para o fracionamento de lignocelulósicos. Métodos mecânicos, como a moagem, causam a redução do tamanho das partículas e da cristalinidade do material a fim de aumentar a área superficial e diminuir o grau de polimerização da celulose, aumentando assim a reatividade do material pré-tratado a enzimas hidrolíticas (ALVIRA et al., 2010).

Dentre os pré-tratamentos químicos têm-se os ácidos, alcalinos ou oxidativos, que diferem entre si nos tipos de química e mecanismos responsáveis pelas modificações estruturais e químicas da parede celular, para a melhoria de rendimentos e acesso da enzima a celulose.

A literatura relata a utilização de álcalis ou ácidos para extrações seletivas de componentes não-celulósicos (lignina e hemicelulose) sendo os mais promissores o vapor d'água, ácido sulfúrico diluído, amônia e hidróxido de sódio (BAUDEL, 2006).

Os pré-tratamentos químicos são os mais utilizados, pois são os mais eficientes no aumento da digestibilidade da biomassa (FAN et al., 1982).

O pré-tratamento alcalino promove intensa deslignificação da biomassa aumentando a reatividade da fibra, utiliza temperaturas e pressões moderadas em relação às utilizadas no pré-tratamento ácido e apresenta baixo custo dos reagentes. Geralmente os mais utilizados são soda ou cal (BAUDEL, 2006).

Tratamentos alcalinos também promovem a remoção de extrativos e de grupos pendentos da hemicelulose ligados na forma de éster, tais como as acetilas e no caso das gramíneas os ácidos ferúlico e cumárico, o que causa um aumento na

acessibilidade de enzimas à superfície da celulose e da hemicelulose (MENON &RAO 2012).

De acordo com Baudel (2006), os tratamentos alcalinos tendem a promover maior dissolução da lignina e menor solubilização/fragmentação das hemiceluloses. Tais processos geralmente utilizam condições moderadas de operação, em termos de temperaturas e pressões, quando comparados aos sistemas ácidos. Esse tipo de pré-tratamento tem como principal efeito a remoção da lignina da biomassa, promovendo maior reatividade da fibra. O álcali causa um “inchamento” da biomassa, de modo que a cristalinidade da celulose decresce, enquanto ocorre um incremento da superfície específica de contato e da porosidade da mesma. O autor cita também que desencadeia-se uma cisão das ligações lignina-carboidrato, além da fragmentação da estrutura da lignina (BAUDEL, 2006). Gupta (2008), cita que os principais reagentes utilizados para pré-tratamentos alcalinos são: hidróxido de sódio, hidróxido de amônia, etileno diamina e hidróxido de cálcio.

#### 2.5.1.1 Pré-tratamento com hidróxido de sódio

Detroy et al. (1981) citam que os principais reagentes utilizados para pré-tratamento alcalino são hidróxido de sódio, amônia e hidróxido de cálcio e a eficiência dessas bases depende da quantidade de lignina presente nos substratos.

O álcali age promovendo inchamento onde a base age indiretamente, sendo a água o agente de quebra (KOSARIC & VARDAR-SUKAN, 2001). Pelo inchaço da biomassa, a superfície é aumentada proporcionando maior abertura da estrutura e facilitando a migração da água para dentro do material. Uma vez dentro da biomassa, a água rompe a ligação de hidrogênio entre a hemicelulose e a lignina-carboidrato. O efeito é a diminuição da cristalinidade e a ruptura da lignina através da quebra das ligações aril-éter (BALAT & BALAT, 2008). Tais autores mencionam também que as vantagens de usar álcali sobre os métodos ácidos são as condições mais amenas e a remoção da lignina, sem a degradação dos outros componentes importantes. O tratamento alcalino requer temperaturas e pressões mais baixas que outros tipos de tecnologias de pré-tratamentos (MOSIER et al, 2005). Segundo Elshafei et al., (1991), comparado com o processo ácido, o processo alcalino provoca menor degradação de açúcares.

A hidrólise enzimática de uma biomassa tratada com base é afetada pelas características estruturais da biomassa resultante do pré-tratamento. O pré-tratamento remove substâncias amorfas (lignina e hemicelulose) (KIM & HOLTZAPPLE, 2006). Os autores complementam afirmando que um tratamento lignocelulósico efetivo deveria remover todos os grupos acetil e reduzir a quantidade de lignina para aproximadamente 10%. Quanto maior for a remoção da lignina, mais efetiva será a ação enzimática, pois estarão sendo eliminados sítios de adsorção que não são produtivos, aumentando o acesso para degradação da celulose e hemicelulose.

## **2.6 FIBRA E ENERGIA DOS VOLUMOSOS**

A produção animal está rigorosamente relacionada com a nutrição, que depende de quatro fatores: exigências nutricionais, composição e digestibilidade dos alimentos e quantidade de nutrientes exigidos pelo animal. Dentre esses fatores, a ingestão de matéria seca é apontada como sendo o mais importante e que determina o desempenho do animal, pois é o primeiro ponto que determina a ingestão de nutrientes necessários ao atendimento das exigências de manutenção e de produção (NOLLER et al., 1996).

A fibra vem sendo utilizada para caracterizar os alimentos (VAN SOEST, 1994) e para estabelecer limites de inclusão de ingredientes nas rações, entretanto, não existe consenso a respeito da definição de fibra, assim como a respeito da concentração de fibra na dieta que otimiza o consumo de energia. A fibra pode ser definida como sendo o componente estrutural das plantas (parede celular), a fração menos digestível dos alimentos ou fração do alimento que promove a ruminação e a saúde do rúmen (WEISS, 1993).

De acordo com Mertens (1987), o consumo e a digestibilidade são parâmetros decisivos em vários sistemas de formulação de dietas para ruminantes. A medição desses parâmetros faz-se necessária, pois, possuem alta correlação com a ingestão de matéria seca e eficiência na absorção e aproveitamento dos nutrientes. O autor menciona ainda que o consumo de alimentos é influenciado por vários fatores e, quando a densidade energética é mais baixa, como é o caso de dietas à base de volumosos, o consumo poderá ser limitado pelo efeito do enchimento.

A digestibilidade de um alimento pode variar em função do próprio alimento, do animal e das condições de alimentação (MERTENS, 1987). De acordo com SANTINI et al. (1992), os coeficientes de digestibilidade aparente usados na avaliação dos alimentos podem ser influenciados por uma série de fatores, sendo que dentre estes, a relação volumoso:concentrado está, com certeza, entre os fatores mais importantes. Para o preparo de dietas de animais de alta produção, o nível mínimo de forragem tem sido um fator levado em consideração, uma vez que os alimentos concentrados representam uma forma mais rapidamente disponível de energia. Existem também situações onde o estoque de forrageiras de alta qualidade está deficiente na propriedade e até mesmo seu custo de produção torna-se menos econômico do que o uso de subprodutos com alto teor de fibra (RODRIGUES, 1998). Conforme Mooney & Allen (1997), um nível mínimo de fibra na dieta é necessário para ótima produção e saúde de vacas leiteiras. Os autores mencionam ainda que a insuficiente quantidade de fibra ou a falta de uma determinada quantidade de fibra efetiva na dieta, pode resultar em um baixo pH ruminal, decréscimo da eficiência microbiana, diminuição da percentagem de gordura do leite, e pode ameaçar a saúde das vacas.

### **2.6.1 Fibra em Detergente Neutro e Ácido**

Conforme VAN SOEST, (1994) os carboidratos são os principais constituintes das plantas forrageiras, e correspondem de 50 a 80% da MS das forrageiras e cereais, sendo que as suas características nutritivas variam em função dos açúcares que os compõem, das ligações entre eles estabelecidas e de outros fatores de natureza físico-química. Assim, os carboidratos das plantas podem ser agrupados em duas grandes categorias conforme a sua maior ou menor degradabilidade, em não estruturais e estruturais, respectivamente (VAN SOEST, 1994).

Os carboidratos não estruturais são aqueles encontrados no conteúdo celular, como glicose e frutose, e os carboidratos de reserva das plantas, como o amido, a sacarose e as frutanas (VITTORI et al., 2000). Os carboidratos estruturais incluem aqueles constituintes da parede celular, representados principalmente pela pectina, hemicelulose e celulose (VAN SOEST et al., 1991). A natureza e concentração dos carboidratos estruturais da parede celular são os principais determinantes da qualidade dos alimentos volumosos (VAN SOEST, 1994).

Mertens et al. (1994) citam que o objetivo de se analisar qualquer alimento é o de detectar as diferenças nutricionais entre as diferentes fontes de alimentos visando fornecer informações aos nutricionistas, principalmente os que tratam com ruminantes e, ainda, separar as frações digestíveis, não digestíveis, rapidamente digestíveis, etc.

A fibra não é uma substância química específica. A mesma constitui uma denominação geral aplicada a diversos materiais compostos de H e C, especialmente a celulose, a hemicelulose e a lignina, organizadas para formar as paredes celulares dos vegetais (MERTENS, 2001).

A fibra bruta (FB) consiste principalmente de celulose adicionada de pequenas quantidades de lignina e hemicelulose. O método de determinação da FB tem como limitação, ou falha, a solubilização de lignina de forma imprecisa (variável) (VAN SOEST & WINE, 1968). Atualmente quase inexistem trabalhos de pesquisa utilizando a FB, pois os métodos da Fibra em Detergente Acido (FDA) e Fibra em Detergente Neutro (FDN) têm maior precisão e são utilizados em pesquisa na nutrição de ruminantes.

O método de determinação da qualidade de volumosos, proposto por Van Soest (1963) está baseado na obtenção dos componentes solúveis em reagentes específicos, conhecidos como detergente neutro e detergente ácido. Denomina-se como fibra em detergente neutro (FDN) a parede celular, a porção da forragem insolúvel em detergente neutro, que é basicamente constituída de celulose, hemicelulose, lignina, proteína lignificada e sílica (VAN SOEST, 1963)

A proposta de Van Soest (1963) veio ao encontro de uma necessidade existente na análise de alimentos voltados à nutrição animal, em que até então era usada somente a determinação de fibra bruta, extrato etéreo, proteína bruta e extrato não nitrogenado, por meio do método de Weende (SILVA, 1981). A fibra bruta é composta de celulose e parte da lignina insolúvel. Conforme Van Soest & Moore (1966) a fração de fibra em detergente neutro inclui celulose, hemicelulose e lignina como os componentes principais e a fração de fibra em detergente ácido (FDA) dos alimentos inclui celulose e lignina como componentes primários além de quantidades variáveis de cinza e compostos nitrogenados. Cada um deles tem o seu papel dentro do trato digestivo, mas de uma forma geral visam o fornecimento de combustíveis para a fermentação ruminal (alimento para os micro-organismos ruminais), estrutura física para promover a ruminação e passagem pelo trato digestivo como um todo e podem exercer função tampão de acordo com algumas características químicas e físicas.

Destes, sabe-se que a hemicelulose tem alta digestibilidade, a celulose tem digestibilidade variável (afetada principalmente pela maturidade das plantas) e a lignina é praticamente indigestível (VIEIRA et al., 2000)

A fibra em detergente neutro (FDN) é uma medida do conteúdo total de fibra insolúvel do alimento e constitui o parâmetro mais usado para o balanceamento de dietas uma vez que interfere na qualidade da mesma e não são poucos os estudos que relacionam a quantidade de FDN nos alimentos e o respectivo consumo deste em ruminantes (MERTENS, 1997). O autor cita também que pela diferença entre fibra em detergente ácido e fibra em detergente neutro calcula-se a quantidade de hemicelulose. Normalmente o conteúdo de FDA de um mesmo alimento nos dá um indicativo muito fiel de como é a sua digestibilidade como um todo. Quanto maior o seu conteúdo, maior a chance de ter teores elevados de lignina e maior a chance de ter a digestibilidade reduzida (VIEIRA et al., 2000).

### **2.6.2 Nutrientes Digestíveis Totais e Extrativos Não Nitrogenados**

O NDT (Nutrientes digestíveis totais) é um dos modos mais empregados de expressão de energia para avaliação de alimentos na nutrição de ruminantes. Muitos componentes químicos são relacionados à concentração de energia disponível, sendo que os constituintes comumente avaliados são: proteína bruta digestível, extrato etéreo digestível, fibra em detergente neutro digestível (corrigida para cinzas e proteína) e carboidratos não fibrosos digestíveis (ROCHA JUNIOR et al., 2003).

Segundo o NRC (2001), o NDT não tem vantagens particulares ou desvantagens sobre a ED, podendo ser utilizado para descrever valores de necessidades energéticas do animal. O NDT pode ser convertido para ED pela equação: 1 kg NDT = 4,4 Mcal ED. Segundo Valadares Filho (2000), grande parte da avaliação energética dos alimentos se baseia no NDT e os cálculos de energia líquida (EL) são estimados a partir do NDT ou energia metabolizável (EM), oriunda também do NDT, o que faz com que o NDT possa ser considerado, no momento, como unidade possível de ser utilizada para formulação de rações.

Segundo Teixeira (2003), cerca de 75% da energia provém dos carboidratos, sendo que, para os herbívoros, 25% são extrativos não nitrogenados e o restante fibra bruta. O autor menciona que os extrativos não nitrogenados da dieta são constituídos

pelos açúcares e amido dos alimentos. Os ENN são obtidos por meio de cálculos e são constituídos pelos açúcares, amidos, dextrinas, hemiceluloses, e variavelmente lignina. Essa fração do esquema de Weende corresponde predominantemente aos carboidratos mais digestíveis, ou como se diz comumente, “carboidratos solúveis” (PEIXOTO & MAIER, 1993). Na maioria dos vegetais, com exceção das sementes oleaginosas, o carboidrato é em geral o principal componente. Na análise proximal dos alimentos, a fração carboidrato é representada por açúcares solúveis (extrativo não nitrogenado) e fibra bruta que representa os carboidratos estruturais (BERTECHINI, 2006). O autor cita também que os ENN são a porção da planta altamente digestível, consistindo principalmente de carboidratos, que permanecem após a extração de proteína, cinza, fibra bruta, gordura, e conteúdo de umidade.

Para obtenção dos valores dos ENN é realizado o seguinte cálculo:  $ENN = 100 - (\% \text{ umidade} + \% \text{ PB} + \% \text{ FB} + \% \text{ EE} + \% \text{ MM})$ . A determinação do ENN, por seu cálculo, se ressentem de todas as imprecisões pessoais e imperfeições inerentes às outras determinações laboratoriais, ou seja, acumula todos os erros que por ventura foram cometidos (SILVA & QUEIROZ, 2009).

## **2.7 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Na revisão bibliográfica apresentada fez-se uma contextualização da importância do agronegócio brasileiro, em consequência disto as altas quantidades de resíduos agroindustriais geradas. Resíduos estes, que após tratamento podem fazer parte de dietas para os animais ruminantes. Abordou-se também as características dos quatro materiais lignocelulósicos utilizados no presente trabalho. Fez-se uma revisão sobre as principais enzimas degradadoras da parede celular, as celulases, hemicelulases e pectinases. Evidenciou-se os principais fatores que afetam a hidrólise enzimática dos resíduos lignocelulósicos. Abordou-se alguns tipos de pré-tratamentos de materiais lignocelulósicos e por fim apresentou-se uma revisão sobre a fibra (FDA E FDN) e a energia (NDT E ENN) dos volumosos.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

Este capítulo apresenta as metodologias utilizadas na hidrólise de casca de arroz, casca de soja, sabugo/palha de milho e feno de Tifton 85, avaliando-se a influência do tempo, enzimas e diluições de enzimas, agitação e temperaturas empregadas no processo reacional com o emprego de enzimas comerciais e não comerciais. Na sequência, estão apresentadas as metodologias empregadas nas demais etapas do trabalho, a constar, a aplicação de enzimas não comerciais, a avaliação de diferentes sistemas de pré-hidrólise (moagem e pré tratamento alcalino) seguidas de hidrólise enzimática nas condições maximizadas e a caracterização físico-química dos substratos *in natura* e hidrolisados pelas enzimas comerciais e não comerciais.

#### 3.1 SUBSTRATOS E ENZIMAS UTILIZADOS NA HIDRÓLISE

Os substratos utilizados na hidrólise enzimática foram: casca de soja (CS), que consiste no resíduo da extração do óleo de soja, obtido após a prensagem de grãos e extração com solventes, doado por uma indústria de óleo de soja local (Olfar, Erechim, RS); casca de arroz (CA), que é um subproduto do processo de beneficiamento do arroz, obtido em uma indústria de parboilização de arroz (Josapar Pelotas, RS); sabugo/palha de milho (SPM) e feno de Tifton 85 (FT), adquiridos de produtores rurais da região do Alto Uruguai Gaúcho. Todos os substratos foram estocados à temperatura ambiente e utilizados sem tratamento prévio.

As enzimas comerciais utilizadas neste estudo foram: celulase produzida por *Aspergillus niger* (Sigma–Aldrich®) e pectinase de *Aspergillus niger* obtido da Rohapect DA6L®, do fornecedor AB Enzymes.

A produção de celulase não comercial foi realizada segundo metodologia descrita por Astolfi (2014) usando *Trichoderma reesei* NRRL 3652, obtido da ARS Culture Collection (NRRL). O cultivo em estado sólido foi realizado empregando como substrato casca de soja, em pH 4,6, temperatura 30°C, teor de umidade de 70%,  $1,0 \times 10^7$  esporos/g. O processo de extração foi realizado adicionando-se tampão citrato de sódio (0,5 M, pH 5,5) na razão 1:15 (substrato:tampão, m:m) e incubados por 30 minutos a 50°C e 100 rpm.



A pectinase não comercial foi obtida conforme metodologia descrita por Borszcz (2015) por cultivo em estado sólido (CES) com *Aspergillus niger* ATCC 9642, realizado em béquer de polipropileno de 500 mL, contendo uma mistura composta por casca de laranja triturada, farelo de trigo e água de maceração de milho (8:1:1, m:m:m), 30°C, teor de umidade de 65%,  $5 \times 10^6$  esporos/g em base úmida (bu). A extração foi feita com NaCl (0,1 mol/L), relação solvente:substrato 5:1 (v:m), 30 min, 20 °C, 175 rpm.

### **3.2 AVALIAÇÃO DA HIDRÓLISE DE SUBSTRATOS LIGNOCELULÓSICOS COM ENZIMAS COMERCIAIS**

A sacarificação enzimática de cada substrato sem nenhum tratamento prévio foi realizada como descrita por Liu et al. (2011). Os ensaios foram realizados em frascos erlenmeyers nos quais foram adicionadas 2 g do resíduo lignocelulósico (CS, CA, SPM e FT) e autoclavado por 15 min a 121°C. Posteriormente, adicionou-se a cada um dos substratos, separadamente, 100 mL da mistura reacional, contendo: 95 mL de tampão citrato de sódio 0,05 M em pH 5,0 e 5 mL do extrato enzimático comercial (celulase com atividade de  $6,35 \text{ U g}^{-1}$  ou pectinase com atividade de  $290 \text{ U mL}^{-1}$ ) ou 5 mL do extrato enzimático bruto de celulase ou pectinase não comercial.

As reações, com as enzimas comerciais, foram realizadas em agitador orbital, inicialmente com agitação de 150 rpm e temperatura de 37°C. Para a celulase, fez-se uma diluição de 1:100 (1 g da enzima para 100 mL de tampão citrato em pH 5,0) por um período de até 24 horas. A liberação de açúcares redutores totais (ART) na hidrólise foram estimados usando o método do DNS (ácido dinitrosalicílico) (MILLER, 1959).

#### **3.2.1 Efeito do tempo**

O comportamento cinético do processo de hidrólise dos substratos lignocelulósicos (CS, CA, SPM e FT) empregando celulases e pectinases comerciais foi acompanhado pela retirada de amostras da mistura reacional em vários intervalos de tempo. As reações de hidrólise foram realizadas em agitador orbital a 150 rpm e 37°C. As reações com pectinases foram realizadas pela adição de 5 mL de extrato

enzimático bruto, já quando empregou-se a celulase, adicionou-se 5 mL de uma diluição de 1 g de enzima para 100 mL de tampão citrato em pH 5,0.

### 3.2.2 Efeito da diluição de enzima

Para avaliar a influência da diluição de enzima na hidrólise dos substratos lignocelulósicos (CS, CA, SPM e FT), foram realizados estudos com diferentes concentrações de enzima (m:v) (diluída em tampão citrato pH 5,0) celulase comercial (1:50; 1:75; 1:100; 1:125; 1:150; 1:175 e 1:200). Para a pectinase comercial, não foi realizado este estudo pelo fato da mesma apresentar menor atividade de hidrólise dos resíduos lignocelulósicos. As reações foram realizadas de acordo com a metodologia descrita no item 3.2.1.

### 3.2.3 Efeito da temperatura e agitação

A fim de avaliar o efeito da temperatura e agitação na hidrólise dos substratos lignocelulósicos (CS, CA, SPM e FT) foi realizado um planejamento fatorial  $2^2$  (Delineamento Central Composto Rotacional - DCCR), incluindo 4 ensaios fatoriais e 3 repetições no ponto central, totalizando 7 ensaios. As variáveis independentes foram: temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ,  $X_1$ ) e agitação (rpm,  $X_2$ ). As variáveis tempo reacional e diluição da enzima foi mantida fixa, conforme definido nos itens 3.2.1 e 3.2.2, respectivamente. A Tabela 2 apresenta as variáveis independentes e seus respectivos níveis. A variável dependente (resposta) foi o percentual de hidrólise dos resíduos lignocelulósicos (%) empregando celulase e pectinase comercial e não comercial.

Tabela 2 - Variáveis independentes e níveis utilizados no planejamento fatorial  $2^2$  para a hidrólise (%) dos resíduos lignocelulósicos empregando celulasas e pectinases.

Variáveis Independentes	Códigos	Níveis		
		-1	0*	+1
Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	$X_1$	29	37	45
Agitação (rpm)	$X_2$	100	150	200

\* Triplicata do ponto central

Baseando-se nos resultados obtidos no planejamento fatorial  $2^2$ , um novo planejamento fatorial completo  $2^2$  foi realizado, deslocando-se os níveis das variáveis independentes, temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ,  $X_1$ ) e agitação (rpm,  $X_2$ ). As variáveis tempo reacional e diluição das enzimas foram mantidas fixas conforme definido nos itens 3.2.1 e 3.2.2, respectivamente. A Tabela 3 apresenta os níveis das variáveis independentes estudados no planejamento fatorial completo  $2^2$ .

Tabela 3 - Variáveis independentes e níveis utilizados no planejamento fatorial completo  $2^2$  para a hidrólise dos resíduos lignocelulósicos (%) empregando celulases e pectinases.

Variáveis Independentes	Códigos	Níveis				
		-1,41	-1	0*	+1	+1,41
<b>Celulases (CS e SPM)</b>						
Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	$X_1$	25,7	29	37	45	48,3
Agitação (rpm)	$X_2$	79,5	100	150	200	220,5
<b>Celulases (CA)</b>						
Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	$X_1$	33,7	37	45	53	56,3
Agitação (rpm)	$X_2$	129,5	150	200	250	270,5
<b>Celulases (FT)</b>						
Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	$X_1$	33,7	37	45	53	56,3
Agitação (rpm)	$X_2$	79,5	100	150	200	220,5
<b>Pectinases (CA)</b>						
Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	$X_1$	33,7	37	45	53	56,3
Agitação (rpm)	$X_2$	129,5	150	200	250	270,5

\* Triplicata do ponto central.

### 3.2.4 Efeito da combinação das enzimas comerciais na hidrólise dos substratos lignocelulósicos

Para avaliar o efeito da interação entre celulases e pectinases na hidrólise dos resíduos lignocelulósicos (CS, CA, SPM e FT) foram combinadas diferentes proporções das enzimas utilizadas na reação de hidrólise. As misturas (%) de celulase/pectinase foram de 100/0, 75/25, 50/50, 25/75 e 0/100.

As variáveis tempo reacional e agitação foram mantidas em 22, 10, 14, e 12 horas e 300, 350, 300 e 150 rpm para casca de soja, casca de arroz, sabugo/palha de milho e feno de Tifton 85, respectivamente. A temperatura foi mantida em  $45^{\circ}\text{C}$  para todos os substratos. A quantidade das enzimas foi de 5 mL (diluição: 1/50) da enzima celulase e 5 mL (sem diluição) da enzima pectinase.

### **3.3 HIDRÓLISE DE SUBSTRATOS LIGNOCELULÓSICOS COM ENZIMAS NÃO COMERCIAIS**

Para as enzimas celulasas e pectinases não comerciais, acompanhou-se o comportamento cinético do processo de hidrólise dos resíduos lignocelulósicos (CS, CA, SPM e FT) pela retirada de amostras da mistura reacional em vários intervalos de tempo. As reações de hidrólise foram realizadas em agitador orbital nas melhores condições obtidas com as enzimas comerciais pela adição de 5 mL de extrato enzimático bruto produzido por *Aspergillus niger* ATCC 9642 e *Trichoderma reesei* NRRL 3652, respectivamente, para 95 mL de tampão citrato em pH 5,0. A reação de hidrólise foi realizada conforme apresentado no item 3.2.

### **3.4 EFEITO DE PRÉ-TRATAMENTOS NA HIDRÓLISE DE RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS**

#### **3.4.1 Efeito da granulometria**

Com a finalidade de aumentar a área de superfície dos resíduos visando melhorar a ação das enzimas, os resíduos lignocelulósicos (CS, CA, SPM e FT) foram triturados, em moinho do tipo martelo (Marconi, MA 048), com peneiras de 0,5, 1,0 e 1,5 mm, antes do tratamento enzimático empregando celulase comercial.

#### **3.4.2 Efeito do pré-tratamento alcalino**

Em etapa que antecedia o tratamento enzimático empregando celulase comercial, os resíduos lignocelulósicos foram submetidos a tratamento com hidróxido de sódio comercial a 1, 3 e 5 % a 100 °C por 30, 60 e 90 minutos. Foram preparados aproximadamente 100 g de cada resíduo. Os materiais recuperados após a fervura foram lavados com água destilada corrente, e após secados em estufa a 60 °C até recuperarem a umidade natural do resíduo.

#### **3.4.3 Combinação da granulometria e pré-tratamento alcalino**

Para avaliar os efeitos da combinação da granulometria e pré-tratamento alcalino, os substratos lignocelulósicos (CS, CA, SPM e FT) moídos em granulometria

de 0,5 mm, foram submetidos a tratamento com hidróxido de sódio comercial a 3% em 100°C por 90 minutos. Após tal procedimento fez-se a hidrólise enzimática com celulase comercial em diluição de 1:50, nas melhores condições de temperatura, tempo e agitação alcançados nas etapas anteriores. Em seguida, os substratos (CS, CA, SPM e FT) moídos em granulometria de 0,5 mm, foram submetidos a tratamento com hidróxido de sódio comercial (NaOH) em diferentes concentrações (3, 5, 7,5 e 10%), também nas melhores condições de temperatura, tempo e agitação alcançados nas etapas anteriores. Tais procedimentos foram realizados pois se tratam das melhores condições obtidas nos ensaios anteriores.

### **3.5 CARACTERIZAÇÃO CENTESIMAL**

Com o as melhores condições de tempo, temperatura e agitação dos diferentes resíduos lignocelulósicos, empregando celulase e pectinase comercial e não comercial, foram realizadas análises bromatológicas de fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), nutrientes digestíveis totais (NDT) e extrativos não-nitrogenados (ENN), dos diferentes substratos linocelulósicos (CS, CA, SPM e FT) hidrolisados e não hidrolisados (controle). Os ensaios para obtenção dos resultados foram realizados no Centro de Pesquisa em Alimentação (CEPA) da Universidade de Passo Fundo, pelo método da Espectrofotometria de Reflectância no Infravermelho Próximo (NIR).

### **3.6 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS**

#### **3.6.1 Quantificações dos açúcares redutores totais (ART)**

O complexo celulase é composto por três enzimas que atuam em sinergia sobre a molécula de celulose. Durante a ação das enzimas, formam-se produtos intermediários (oligossacarídeos e celobiose), sendo o produto final da hidrólise, a glicose (LYND & ZHANG, 2002).

Desta forma os resultados, após a hidrólise enzimática dos resíduos lignocelulósicos, devem ser expressos em ART (açúcares redutores totais), visto que, além de glicose, são quantificados também açúcares redutores como oligossacarídeos e celobiose.

As concentrações de açúcares redutores foram determinadas pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) descrito por Miller (1959). Para a quantificação dos açúcares redutores (AR), adicionou-se 0,5 mL das amostras a serem quantificadas em 0,5 mL de DNS. Os tubos de ensaio foram mantidos em um banho a 95°C por 5 minutos para desenvolvimento da coloração avermelhada. Após este tempo reacional, as amostras foram resfriadas imediatamente pela imersão dos tubos em um banho de gelo fundente, adicionando-se em seguida 8 mL da solução estabilizante de tartarato de sódio e potássio tetrahidratado. Os tubos foram agitados para homogeneizar a solução e as leituras da absorbância, efetuadas no espectrofotômetro a 540 nm ( $\lambda_{540}$ ). Para zerar o espectrofotômetro, preparou-se um tubo onde o volume da amostra foi substituído por água destilada. Para determinar a concentração dos ART em cada uma das amostras analisadas utilizou-se a curva-padrão de glicose, ao empregar-se enzima celulase. Para os ensaios com enzima pectinase, utilizou-se a curva-padrão do ácido galacturônico.

Para quantificar apenas os ART provenientes da ação das enzimas celulases sobre os substratos, os valores de absorbância dos brancos foram descontados dos valores de absorbância das amostras. O branco da hidrólise enzimática consistiu em proceder a etapa de hidrólise sem a adição da enzima e refere-se aos ART presentes nos substratos (casca de arroz, casca de soja, sabugo/palha de milho e feno de Tifton 85).

O percentual de sacarificação foi calculado conforme a Equação 1 descrita por Garcia-Aparicio et al. (2007).

$$\text{Sacarificação (\%)} = \frac{\text{AL} \times 0,9 \times 100}{\text{P}} \quad (1)$$

Sendo que:

AL = açúcar liberado (AR líquido da amostra em mg) convertido pela equação da reta da curva padrão de glicose (celulase) ou curva padrão do ácido galacturônico (pectinase).

0,9 = fator de correção para compensar adição de uma molécula de água durante a hidrólise.

P = polissacarídeos no substrato lignocelulósico (mg amostra x percentual de celulose e hemicelulose).

Quanto aos polissacarídeos presentes nos substratos lignocelulósicos, para a casca de soja considerou-se o valor de 0,505 que representa o percentual de celulose e hemicelulose presentes em 1 g de casca de soja (BRIJWANI et al., 2010). Para a casca de arroz considerou-se o valor de 0,600 (KRISHNANI et al., 2008). Para o sabugo/palha de milho usou-se o valor de 0,584 (CRUZ,1992). Já, para o feno de Tifton 85, atribuiu-se o valor de 0,623 (REIS et al., 1990).

### **3.6.2 Determinação da atividade enzimática**

#### **3.6.2.1 Celulases**

##### *Atividade da FPase*

Para a enzima celulase, a atividade foi determinada como atividade de papel filtro (FPA) e expressa em unidades de papel filtro (FPU – Filter Paper Units) por volume de enzima original (GHOSE, 1987) e quantificada seguindo o método de DNS (MILLER, 1959), nas condições de ensaio (tampão citrato de sódio 0,05 mol/L, pH 5,3, 50 °C, 60 min). Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1  $\mu\text{mol}$  de açúcar redutor por minuto ( $U=\mu\text{mol}/\text{min}$ ). A curva padrão foi estabelecida utilizando glicose nas concentrações de 0,1-6,7 mg/mL.

A atividade da FPase foi expressa em unidade de atividade por mL de extrato bruto enzimático (U/mL).

##### *Atividade da Carboximetilcelulase (CMCase)*

A atividade da enzima CMCase foi determinada pela medida dos açúcares redutores (GHOSE, 1987) seguido do método de DNS (MILLER, 1959), nas condições de ensaio (tampão citrato de sódio 0,05 mol/L, pH 4,8, 50 °C, 30 min). Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1  $\mu\text{mol}$  de açúcar redutor por minuto ( $U=\mu\text{mol}/\text{min}$ ), nas condições de reação e segundo a curva padrão, utilizando glicose nas concentrações de 0,1-6,7 mg/mL. A atividade para CMCase foi expressa em unidade de atividade por mL de extrato bruto enzimático (U/mL).

### *Atividade da Xilanase*

A atividade da enzima xilanase foi determinada pela quantidade de açúcares redutores liberados a partir de xilana (BAILEY et al., 1992) e medida pelo método de DNS (MILLER, 1959), nas condições de ensaio (tampão citrato de sódio 0,05 mol/L, pH 5,3, 50 °C, 5 min). Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1  $\mu\text{mol}$  de açúcar redutor por minuto ( $U = \mu\text{mol}/\text{min}$ ). A curva padrão foi estabelecida utilizando xilose nas concentrações de 0,1-5,0 mg/mL. A atividade da xilanase foi expressa em unidade de atividade por mL de extrato bruto enzimático (U/mL).

### *Atividade Avicelase (exo-glucanase)*

A atividade de avicelase (EC 3.2.1.91) consiste na adição de 1 mL do extrato enzimático bruto em 1 mL de solução 1% de celulose microcristalina (avicel), em tampão acetato 0,05M, pH 5,0 e incubado a 50°C, por 30 minutos. Periodicamente, o sistema substrato-enzima foi agitado com a finalidade de manter a celulose em suspensão. Os açúcares redutores liberados foram determinados pelo método do ácido-3,5-dinitrosalicílico (DNS), de acordo com Miller (1959).

## 3.6.2.2 Pectinase

### *Atividade da Poligalaturonase (exo-PG)*

A atividade da exo-PG foi mensurada pela quantificação dos grupos redutores, expressos em ácido galacturônicos liberados durante incubação de 0,8 mL de solução de pectina cítrica (0,5 % m/v, diluída em tampão acetato de sódio (200 mmol/L) e previamente aquecida em banho-maria, 37 °C/15 min) e 0,2 mL do sobrenadante (extrato enzimático), por 6 minutos a 37 °C. Passado o tempo de reação, imediatamente, a cada tubo de ensaio, adicionou-se 1 mL de reagente de ácido 3,5-dinitrosalicílico, DNS (MILLER, 1959), encaminhou-os para aquecimento (banho de água em ebulição) por um período de 8 min (desnaturação da enzima e formação da cor) seguido de resfriamento em banho de gelo. Adicionou-se então, 8 mL de solução



de tartarato duplo de sódio-potássio (50 mmol/L, Vetec) procedendo-se à homogeneização e efetivação da leitura da medida da absorbância em espectrofotômetro (Agilent Technologies, modelo 8453), no comprimento de onda de 540 nm ( $\lambda 540$ ). Realizaram-se ensaios de controle e pectina, seguindo as mesmas condições descritas anteriormente, porém sem adição de pectina cítrica na solução tampão e no extrato bruto (adição de solução tampão), respectivamente. Uma unidade de atividade (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1  $\mu\text{mol}$  de ácido galacturônico por minuto ( $U = \mu\text{mol}/\text{min}$ ), nas condições de reação e segundo a curva padrão estabelecida, utilizando ácido  $\alpha$ -D-galacturônico monoidratado (peso molecular 212,16 g/mol, Sigma) como açúcar redutor, na faixa de 0 a 1 mg/mL. A atividade da exo-PG foi expressa em unidade de atividade por grama de meio úmido fermentado (U/gbu).

#### *Atividade da Pectina Metilesterase (PME)*

A atividade de pectina metilesterase (PME) foi determinada segundo método titulométrico descrito por Hultin et al. (1966). Um mililitro do sobrenadante (extrato bruto enzimático) foi adicionado sobre 30 mL de pectina cítrica (1 % m/v, diluída em NaCl 0,2 mol/L, pH 7,0, 30 °C  $\pm$  2). O pH da solução foi mantido em 7,0  $\pm$  0,2 durante 10 min, titulando-se com NaOH (0,01 mol/L). Uma unidade de PME foi definida como a quantidade de enzima capaz de catalisar a desmetilação de pectina correspondente ao consumo de 1  $\mu\text{mol}$  de NaOH  $\text{min}^{-1} \text{mL}^{-1}$ , nas condições do ensaio. Realizaram-se ensaios de branco, seguindo as mesmas condições descritas anteriormente, porém utilizando água destilada com agente de reação. A atividade da PME foi expressa em unidade de atividade por grama de meio úmido fermentado (U/gbu).

#### *Atividade da Pectina Liase (PMGL)*

A atividade da pectina liase (PMGL) foi determinada segundo método de Ayers et al. (1966), descrito por Pitt (1988). O método determina os produtos insaturados finais da degradação da pectina pelo ácido tiobarbitúrico. A mistura de reação, constituída de 5,0 mL da solução de pectina cítrica (1 % m/v, Sigma, diluída em tampão Tris-HCl (0,05 mol/L, pH 4,5), 1,0 mL da solução de  $\text{CaCl}_2$  (0,01 mol/L), 1,0 mL do sobrenadante (extrato enzimático) e 3,0 mL de água destilada foi disposta em

tubo tipo *Falcon*, homogeneizada e incubada por 20 min a 55°C. Passado o tempo de reação, adicionou-se a mistura, 0,6 mL de uma solução de ZnSO<sub>4</sub> 7.H<sub>2</sub>O (9 % m/v) e 0,6 mL de NaOH (0,5 mol/L) e a mistura de reação foi centrifugada (4.000 rpm, 10 min, 5 °C; MPW Med. Instruments, modelo 351R). Em seguida, uma alíquota de 5 mL do sobrenadante (mistura de reação) foi transferida a um tubo de ensaio e adicionado 3,0 mL de ácido tiobarbitúrico (0,04 mol/L), 1,5 mL de HCl (0,1 mol/L) e 0,5 mL de água destilada. Os tubos foram fechados, encaminhados para aquecimento (banho de água em ebulição) por um período de 30 min e resfriados. Em seguida foi efetivada a medida de absorvância em espectrofotômetro (Agilent Technologies, modelo Agilent 8453) no comprimento de onda de 550 nm ( $\lambda$ 540). Uma unidade da atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que causa a mudança de 0,01 na absorvância a  $\lambda$ 550, nas condições do ensaio (PITT, 1988). A atividade da pectina liase foi expressa em unidade de atividade por grama de meio úmido fermentado (U/gbu). Realizaram-se ensaios de branco, seguindo as mesmas condições descritas anteriormente, porém sem adição de pectina cítrica na solução.

### 3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados obtidos referentes ao efeito do tempo e diluição da enzima foram tratados estatisticamente pela Análise de Variância (ANOVA) e a comparação entre as diferenças das médias (triplicata de amostra destrutiva de cada ensaio) pelo teste de Tukey com auxílio do software *Statistica* versão 5.0, com nível de significância de 95 % de confiança. Os resultados obtidos nos planejamentos fatoriais foram tratados estatisticamente segundo metodologia de planejamentos de experimentos, com auxílio do software *Statistica* versão 5.0, com nível de significância de 95 % de confiança. Para validação dos modelos foi utilizada a análise de variância, verificando-se o coeficiente de correlação (R) e a amplitude de grandeza do F calculado em relação ao F tabelado ( $p < 0,05$ ). Os resultados de hidrólise dos substratos lignocelulósicos utilizando celulasas e pectinases não comerciais foram tratados pelo teste teste t de Student ( $p < 0,05$ ).

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Neste capítulo serão apresentados, primeiramente, os resultados e discussões referentes à influência do tempo, diluição da enzima, temperatura e agitação empregando-se enzimas celulase e pectinase comerciais e não comerciais na hidrólise dos resíduos lignocelulósicos. Em seguida serão apresentados os efeitos da interação entre celulase e pectinase comerciais na hidrólise dos substratos lignocelulósicos. Posteriormente será mostrado os efeitos de pré-tratamentos na hidrólise de resíduos lignocelulósicos. Finalizando esse capítulo, será revelada a caracterização dos resíduos lignocelulósicos antes e após a hidrólise enzimática.

### **4.1 HIDRÓLISE DE SUBSTRATOS LIGNOCELULÓSICOS COM ENZIMAS COMERCIAIS**

#### **4.1.1 Influência do tempo**

##### *Celulases*

A Tabela 4 apresenta os resultados da cinética de hidrólise de casca de soja, casca de arroz, sabugo/palha de milho e feno de Tifton 85 empregando a enzima celulase, onde verifica-se que o melhor resultado da hidrólise (%) foi observado com 22 horas para a casca de soja, 10 horas, para a casca de arroz, 14 horas para o sabugo/palha de milho, e 12 horas para o feno de Tifton 85. Estes tempos reacionais foram fixados e utilizados nos demais experimentos.

Tabela 4 - Percentual de hidrólise de casca de soja (CS), casca de arroz (CA), sabugo e palha de milho (SPM) e feno de Tifton 85 (FT), em diferentes tempos, empregando celulase comercial.

Tempo (h)	CS	CA	SPM	FT
0,1	7,67 <sup>k</sup> ± 0,01	2,99 <sup>e</sup> ± 0,13	2,06 <sup>f</sup> ± 0,22	9,60 <sup>e</sup> ± 0,01
2	8,38 <sup>jk</sup> ± 0,01	4,04 <sup>d</sup> ± 0,04	4,55 <sup>e</sup> ± 0,47	-
4	9,18 <sup>ij</sup> ± 0,05	4,20 <sup>d</sup> ± 0,04	5,08 <sup>e</sup> ± 0,01	14,55 <sup>d</sup> ± 0,01
6	10,94 <sup>fgh</sup> ± 0,26	5,96 <sup>bc</sup> ± 0,21	6,93 <sup>d</sup> ± 0,02	-
8	11,57 <sup>ef</sup> ± 0,21	6,30 <sup>b</sup> ± 0,07	7,19 <sup>cd</sup> ± 0,40	15,38 <sup>c</sup> ± 0,04
10	12,12 <sup>de</sup> ± 0,09	7,60 <sup>a</sup> ± 0,14	7,43 <sup>cd</sup> ± 0,01	-
12	12,72 <sup>cd</sup> ± 0,01	6,39 <sup>b</sup> ± 0,31	7,76 <sup>c</sup> ± 0,01	17,65 <sup>a</sup> ± 0,13
14	12,77 <sup>cd</sup> ± 0,14	-	9,98 <sup>a</sup> ± 0,10	-
16	13,22 <sup>c</sup> ± 0,07	-	8,76 <sup>b</sup> ± 0,05	16,49 <sup>b</sup> ± 0,03
18	15,04 <sup>b</sup> ± 0,75	-	-	-
20	15,48 <sup>b</sup> ± 0,97	-	-	-
22	17,10 <sup>a</sup> ± 0,57	-	-	-
24	11,41 <sup>efg</sup> ± 0,09	-	-	-

As médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 95 % de probabilidade.

Analisando o comportamento da atividade enzimática em diferentes tempos de hidrólise de palha de milho, palha de trigo e bagaço de cana, Aguiar (2010) observou que os maiores valores de atividade enzimática não foram obtidos com o mesmo tempo de hidrólise para três resíduos, havendo ligeira redução na atividade após 50 minutos para a palha de milho, após 40 minutos para a palha de trigo e após 60 minutos para o bagaço de cana. A redução após certo tempo de hidrólise, em 24 horas para a casca de soja, 12 horas para a casca de arroz e 16 horas para o sabugo e palha de milho e feno de Tifton 85, observadas neste trabalho, pode ter ocorrido devido à desativação enzimática pelo fator temperatura, como afirmam Bailey & Ollis (1986). Este comportamento pode ter ocorrido devido ao complexo celulásico ser composto por três enzimas que atuam de maneira sinérgica sobre o substrato. Este complexo deve se apresentar estável durante a atividade celulolítica (RABELO, 2007). Portanto, qualquer alteração do meio reacional pode influenciar a atuação sinérgica do sistema, alterando a atividade de uma ou mais enzimas envolvidas. Por outro lado, conforme Zhang et al. (2006), tempos muito curtos de reação não são suficientes para a degradação tanto da fração amorfa como da fração cristalina da celulose. Então, o tempo de hidrólise deve ser suficiente para garantir a degradação total da celulose sem que ocorra desativação enzimática.

### Pectinases

A Tabela 5 apresenta os resultados da cinética de hidrólise de casca de soja, casca de arroz, sabugo/palha de milho e feno de Tifton 85 empregando pectinase. Verifica-se que o melhor resultado da hidrólise (%), empregando-se a enzima pectinase comercial foi observado em 22 horas para a casca de soja e para o sabugo com palha de milho, 10 horas, para a casca de arroz, e 14 horas para o feno de Tifton 85. Estes tempos reacionais foram fixados e utilizados nos demais experimentos.

Tabela 5 - Percentual de hidrólise de casca de soja (CS), casca de arroz (CA), sabugo/palha de milho (SPM) e feno de Tifton 85 (FT), em diferentes tempos, empregando-se pectinase comercial.

<b>Tempo (h)</b>	<b>CS Hidrólise (%)</b>	<b>CA Hidrólise (%)</b>	<b>SPM Hidrólise (%)</b>	<b>FT Hidrólise (%)</b>
<b>0,1</b>	1,10 <sup>f</sup> ± 0,01	0,52 <sup>c</sup> ± 0,12	0,88 <sup>g</sup> ± 0,02	0,95 <sup>e</sup> ± 0,21
<b>2</b>	8,70 <sup>e</sup> ± 0,70	1,14 <sup>b</sup> ± 0,24	1,38 <sup>f</sup> ± 0,16	1,90 <sup>de</sup> ± 0,12
<b>4</b>	12,70 <sup>d</sup> ± 0,10	1,26 <sup>b</sup> ± 0,24	1,42 <sup>f</sup> ± 0,02	2,53 <sup>d</sup> ± 0,08
<b>6</b>	16,20 <sup>c</sup> ± 1,27	1,25 <sup>b</sup> ± 0,05	1,98 <sup>e</sup> ± 0,12	2,73 <sup>d</sup> ± 0,11
<b>8</b>	18,97 <sup>b</sup> ± 0,40	1,40 <sup>b</sup> ± 0,10	3,28 <sup>d</sup> ± 0,18	3,52 <sup>cd</sup> ± 0,29
<b>10</b>	20,67 <sup>b</sup> ± 0,06	2,21 <sup>a</sup> ± 0,15	3,29 <sup>d</sup> ± 0,07	4,06 <sup>c</sup> ± 0,68
<b>12</b>	20,70 <sup>b</sup> ± 0,81	2,13 <sup>a</sup> ± 0,21	3,05 <sup>d</sup> ± 0,06	5,69 <sup>b</sup> ± 0,39
<b>14</b>	20,30 <sup>b</sup> ± 0,10	2,23 <sup>a</sup> ± 0,25	3,99 <sup>c</sup> ± 0,08	7,22 <sup>a</sup> ± 0,34
<b>16</b>	19,87 <sup>b</sup> ± 0,15	2,31 <sup>a</sup> ± 0,16	3,63 <sup>cd</sup> ± 0,10	5,57 <sup>b</sup> ± 0,30
<b>18</b>	19,67 <sup>b</sup> ± 0,61	2,10 <sup>a</sup> ± 0,20	3,91 <sup>c</sup> ± 0,19	6,40 <sup>ab</sup> ± 0,46
<b>20</b>	20,0 <sup>b</sup> ± 0,60	2,29 <sup>a</sup> ± 0,11	4,72 <sup>b</sup> ± 0,18	6,20 <sup>ab</sup> ± 0,26
<b>22</b>	26,17 <sup>a</sup> ± 0,96	2,23 <sup>a</sup> ± 0,25	5,20 <sup>a</sup> ± 0,08	6,21 <sup>ab</sup> ± 0,18
<b>24</b>	25,27 <sup>a</sup> ± 0,15	2,28 <sup>a</sup> ± 0,05	5,21 <sup>a</sup> ± 0,37	6,50 <sup>ab</sup> ± 0,52

As médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 95 % de probabilidade.

#### 4.1.2 Influência da Diluição de Enzima

A Tabela 6 apresenta os resultados da influência da diluição de celulase na hidrólise de casca de soja, casca de arroz, sabugo/palha de milho e feno de Tifton 85.

Tabela 6 - Percentual de hidrólise de casca de soja (CS), casca de arroz (CA), sabugo/palha de milho (SPM) e feno de Tifton 85 (FT), empregando diferentes diluições de celulase comercial.

Diluição	CS	CA	SPM	FT
	22 horas	10 horas	14 horas	14 horas
<b>1:50</b>	23,70 <sup>a</sup> ± 0,81	8,95 <sup>a</sup> ± 0,45	13,22 <sup>a</sup> ± 0,70	12,4 <sup>a</sup> ± 0,66
<b>1:75</b>	20,21 <sup>b</sup> ± 0,10	4,80 <sup>b</sup> ± 0,60	9,59 <sup>b</sup> ± 0,16	11,0 <sup>b</sup> ± 0,43
<b>1:100</b>	16,72 <sup>c</sup> ± 0,18	3,95 <sup>b</sup> ± 0,15	7,81 <sup>c</sup> ± 0,35	7,80 <sup>c</sup> ± 0,55
<b>1:125</b>	14,29 <sup>d</sup> ± 0,38	2,75 <sup>c</sup> ± 0,15	7,39 <sup>c</sup> ± 0,18	4,62 <sup>cd</sup> ± 0,84
<b>1:150</b>	9,79 <sup>e</sup> ± 0,14	2,60 <sup>c</sup> ± 0,5	5,76 <sup>d</sup> ± 0,46	3,65 <sup>de</sup> ± 0,53
<b>1:175</b>	8,10 <sup>f</sup> ± 0,07	1,50 <sup>d</sup> ± 0,10	4,87 <sup>de</sup> ± 0,04	3,06 <sup>de</sup> ± 1,55
<b>1:200</b>	7,30 <sup>f</sup> ± 0,12	1,40 <sup>d</sup> ± 0,70	4,54 <sup>e</sup> ± 0,08	2,87 <sup>e</sup> ± 0,14

As médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 95% de probabilidade.

Os maiores valores de hidrólise foram obtidos quando utilizou-se a diluição de 1:50 (m:v enzima:água) para todos os substratos, sendo estes diferentes estatisticamente ( $p > 0,05$ ) dos demais ensaios realizados. A partir destes resultados, a diluição de 1:50 foi adotada para os próximos experimentos.

Menegol et al. (2014) estudaram o emprego de diferentes concentrações de enzimas (5, 10, 15, 20 e 25 FPA/g substrato) em capim elefante e observaram que quanto mais elevada a carga de enzima celulase, maior era a hidrólise (MENEGOL et al., 2014).

Rabelo (2007), ressalta que, quanto ao comportamento das enzimas durante o processo hidrolítico, a maior concentração da enzima conduz a maior hidrólise. Tais resultados corroboram aqueles obtidos neste trabalho, confirmando que quanto maior a carga enzimática, maior a hidrólise.

Para a pectinase comercial, não foram avaliadas diferentes diluições pois esta enzima apresentou menor atividade de hidrólise dos resíduos lignocelulósicos.

#### 4.1.3 Efeito da temperatura e agitação

Visando maximizar a atividade de hidrólise, avaliou-se os efeitos da temperatura e da agitação sobre as atividades da celulase e da pectinase, separadamente para cada um dos substratos estudados.

#### 4.1.3.1 Celulase com casca de soja e sabugo/palha de milho

Para avaliar os efeitos da temperatura e agitação na hidrólise de casca de soja e sabugo/palha de milho utilizando celulase comercial empregou-se um planejamento fatorial completo  $2^2$  (Tabela 7).

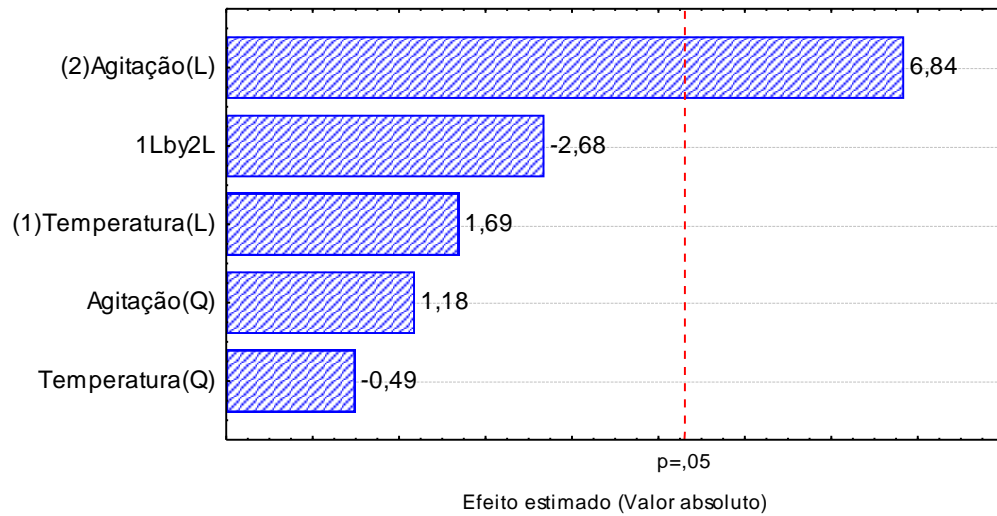
Tabela 7 - Matriz do planejamento fatorial completo  $2^2$  completo (valores reais e codificados) para a hidrólise de casca de soja e sabugo/palha de milho com celulase comercial em diferentes temperaturas e agitações.

Ensaio	Variáveis Independentes*		Hidrólise CS (%)	Hidrólise SPM (%)
	Temperatura (°C)	Agitação (rpm)		
1	29 (-1)	100 (-1)	14,34	5,40
2	29 (-1)	200 (1)	31,83	8,01
3	45 (1)	100 (-1)	26,19	11,20
4	45 (1)	200 (1)	32,08	15,62
5	25,7 (-1,41)	150 (0)	21,00	9,50
6	48,3 (1,41)	150 (0)	19,75	11,65
7	37 (0)	79,5 (-1,41)	16,90	9,50
8	37 (0)	220,5 (1,41)	29,95	12,05
9	37 (0)	150 (0)	25,73	6,64
10	37 (0)	150 (0)	23,01	7,48
11	37 (0)	150 (0)	21,46	7,68

\*Variáveis independentes fixas: 5 mL (diluição 1/50), 22 horas de reação para casca de soja e 14 horas para sabugo/palha de milho.

Os dados da tabela 7 foram tratados estatisticamente e na figura 5 é apresentado o gráfico de Pareto da hidrólise de casca de soja, onde verificou-se que a agitação apresentou efeito significativo positivo ( $p < 0,05$ ), indicando que um aumento na agitação possivelmente ocasionará um aumento na hidrólise da casca de soja.

Figura 5 - Gráfico de Pareto com o efeito estimado (valor absoluto) das variáveis testadas no planejamento fatorial  $2^2$  completo para a hidrólise de casca soja com celulase comercial.



Já quando os resultados de hidrólise de SPM foram tratados, foi possível a partir da ANOVA, a construção de modelo de 2º ordem que descreve a hidrólise de sabugo/palha de milho em função das variáveis analisadas (temperatura e agitação), dentro das faixas estudadas. O modelo foi validado pela análise de variância, onde obteve-se um coeficiente de correlação  $R^2$  de 0,80 e o F calculado foi 1,34 vezes maior que o valor tabelado (Tabela 1 e 2 do Apêndice), os quais permitiram a construção das superfícies de resposta e curva de contorno apresentadas na Figura 10.

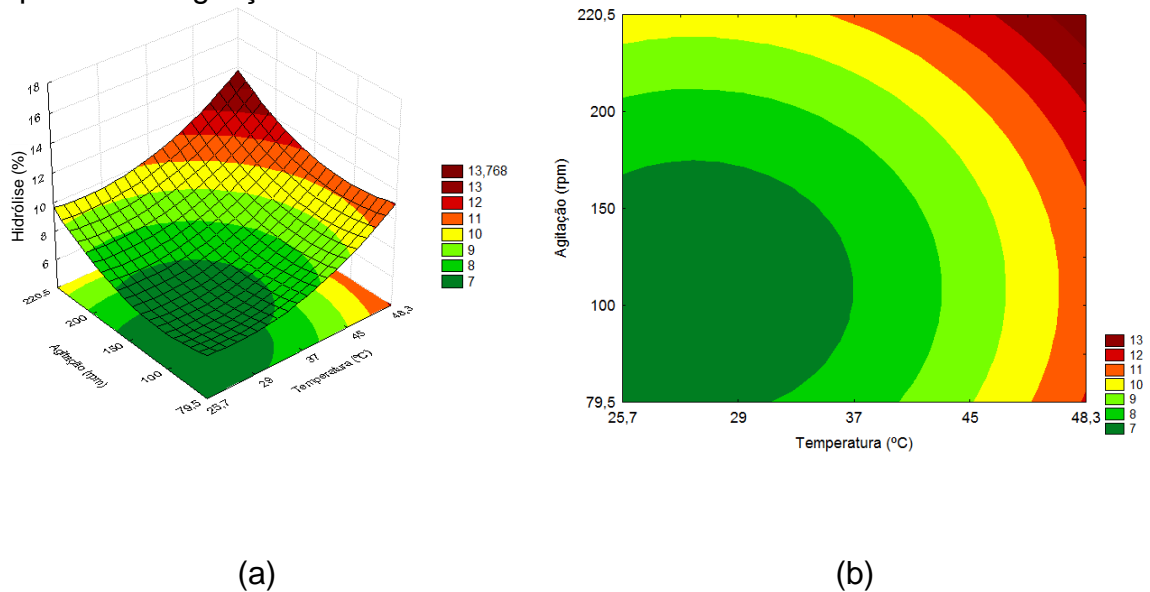
$$\text{Hidrólise (\%)} = 7,27 + 2,06.X_1 + 1,49.X_1^2 + 1,33.X_2 + 1,59.X_2^2 \quad (2)$$

Onde: Hidrólise (%) = hidrólise de sabugo/palha de milho (%);  $X_1$  = Temperatura (°C);  $X_2$  = Agitação (rpm).

Na Figura 6 pode-se observar que os maiores percentuais de hidrólise são obtidos com as mais altas temperaturas e maiores agitações avaliadas.

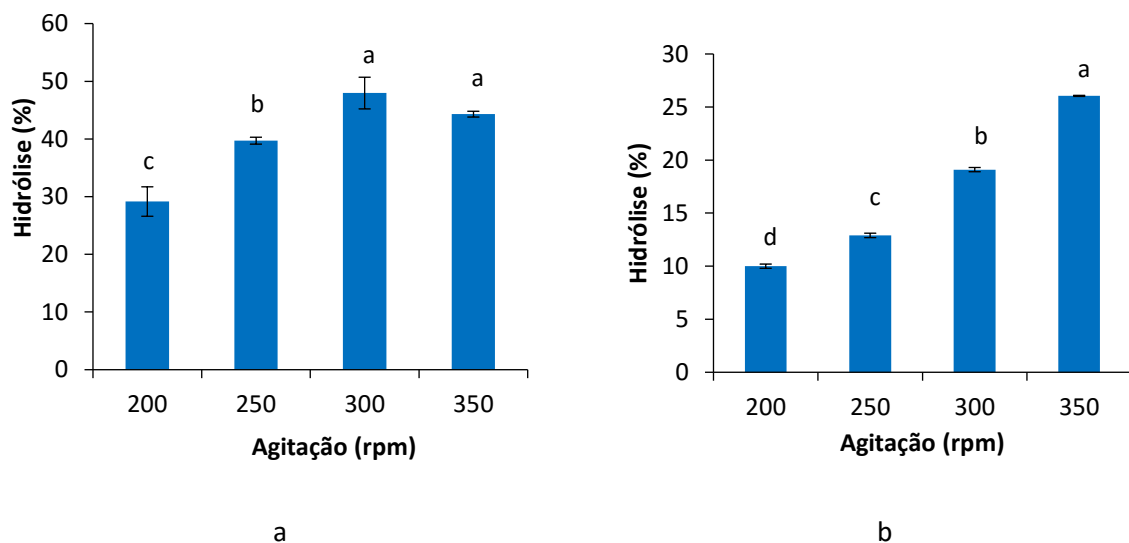


Figura 6 - Superfícies de resposta (a) e curvas de contorno (b) para a hidrólise (%) de sabugo/palha de milho com aplicação de celulase comercial, em função da temperatura e agitação.



A partir dos resultados obtidos para CS e SPM foram realizados ensaios, em triplicata, visando avaliar o efeito do aumento da agitação sobre a hidrólise (200 a 350 rpm), fixando-se a temperatura em 45 °C pois temperaturas acima de 48,3°C (+1,41) podem ser limitantes para a enzima (Figura 7).

Figura 7 - Influência da agitação na hidrólise de casca de soja (a) e sabugo/palha de milho (b) com celulase comercial.



\*Variáveis independentes fixas: tempo de reação 22 h para casca de soja e 14 h para sabugo/palha de milho, temperatura 45°C, quantidade de enzima: 5 mL (diluição 1:50). Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Para casca de soja, observa-se que a agitação teve efeito significativo, obtendo-se os maiores percentuais de hidrólise a partir de 300 rpm (47,95%), permanecendo estatisticamente estável com 350 rpm. Pode-se considerar o resultado da hidrólise de casca de soja com celulase comercial excelente, pois segundo Rojas et al. (2014), quando não se utilizou pré tratamento o máximo de conversão da casca de soja foi de apenas 14 % após 24 h, após o que a conversão diminuiu para cerca de 10% em 72 h.

Para sabugo/palha de milho verifica-se que a agitação teve efeito significativo, obtendo-se os maiores percentuais de hidrólise em 350 rpm, com 26,05 %.

Em temperaturas e agitações menores (Tabela 7) a hidrólise da casca de soja e palha/sabugo de milho também foi menor. Então, a temperatura de 45 °C promoveu as melhores condições para a hidrólise enzimática dos dois substratos.

Há fatores outros que afetam a hidrólise enzimática da celulose, como o substrato, a atividade das celulasas, as condições de pH, a agitação e a temperatura das reações (NUNES, CARVALHO & PINHEIRO, 2001).

Krishna & Chowdary (2000), em estudos de produção e aplicação de celulasas de *T. reesei* QM-9414, realizaram sacarificação de resíduos lignocelulósicos e a temperatura ideal para a condução da hidrólise enzimática foi 50°C. Os resultados do presente trabalho indicam que a temperatura de 45° C e pH 5,0 promoveram maiores percentuais de hidrólise da casca de soja e sabugo/palha de milho.

Singh (2009), em estudo de otimização das condições de sacarificação de palha de trigo com celulasas produzidas por *Aspergillus heteromorphus*, obteve maiores resultados de açúcares redutores à pH 5,0. Krishna (1997) realizou hidrólise de folhas de *Antigonum leptopus* e palha de cana-de-açúcar a pH 4,5. Chen, Xia & Xue (2007) trabalharam com condições de pH 4,8 na hidrólise enzimática de sabugo de milho.

#### 4.1.3.2 Celulase com casca de arroz e feno de Tifton 85

A fim de avaliar os efeitos da temperatura e agitação na hidrólise de casca de arroz e feno de Tifton 85 utilizando celulase comercial, empregou-se um planejamento fatorial 2<sup>2</sup> (Tabela 8).

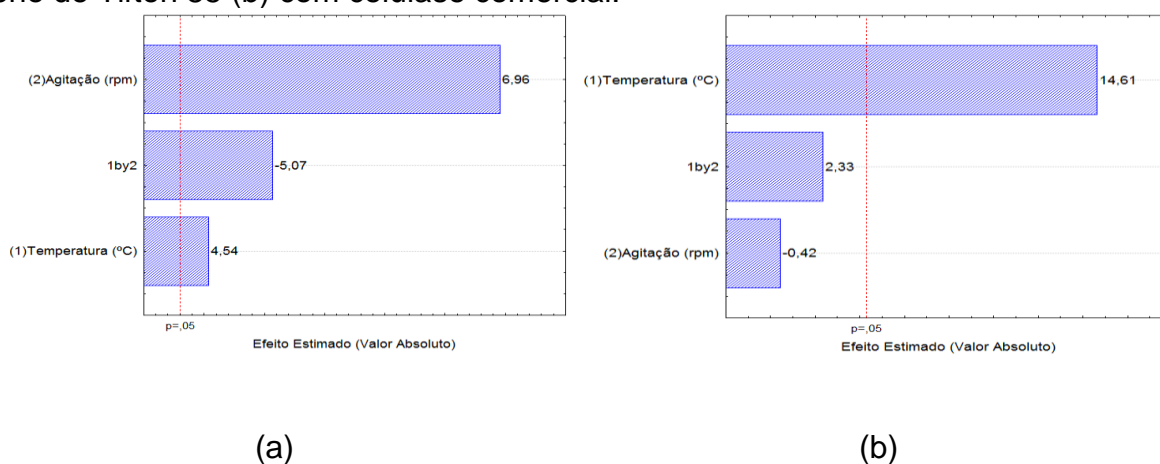
Tabela 8 - Matriz do planejamento fatorial  $2^2$  (valores reais e codificados) para a hidrólise de casca de arroz e feno de Tifton 85 com aplicação de celulase comercial em diferentes temperaturas e agitações.

Ensaio	Variáveis Independentes*		Hidrólise de CA (%)	Hidrólise de FT (%)
	Temperatura (°C)	Agitação (rpm)		
1	29 (-1)	100 (-1)	6,35	11,32
2	29 (-1)	200 (1)	10,87	9,86
3	45 (1)	100 (-1)	9,96	17,83
4	45 (1)	200 (1)	10,67	18,84
5	37 (0)	150 (0)	6,90	18,70
6	37 (0)	150 (0)	6,94	19,24
7	37 (0)	150 (0)	6,27	19,76

\*\*Variáveis independentes fixas: tempo de reação 10 h para casca de arroz e 12 horas para feno de Tifton 85 , quantidade de enzima: 5 mL (diluição 1:50).

Os melhores resultados de hidrólise foram obtidos em temperatura de 29 e 37° C e agitação de 200 e 150 rpm para CA e FT, respectivamente. Os resultados da Tabela 8, foram tratados estatisticamente e a Figura 8 (a, b) apresenta os gráficos de Pareto, os quais demonstram os efeitos estimados das variáveis estudadas para a hidrólise de casca de arroz e feno de Tifton 85 .

Figura 8 - Gráfico de Pareto com o efeito estimado (valor absoluto) das variáveis testadas no planejamento fatorial  $2^2$  completo para a hidrólise de casca de arroz (a) e feno de Tifton 85 (b) com celulase comercial.



Para a casca de arroz (Figura 8a), verifica-se que a agitação e temperatura apresentaram efeito significativo positivo ( $p < 0,05$ ) o que significa que um aumento na agitação e temperatura, possivelmente ocasionará um aumento na hidrólise da casca de arroz. Para o feno de Tifton 85 (Figura 8b) verifica-se que apenas a temperatura

teve efeito significativo positivo o que significa que um aumento na temperatura da reação possivelmente ocasionará um aumento na hidrólise do feno de Tifton 85.

De acordo com as observações dos resultados apresentados na figura 8 a e b foi realizado um novo planejamento  $2^2$  para ambos os substratos (CA e FT), sendo que para CA as variáveis temperatura e agitação foram deslocadas para o nível +1, e para o FT a variável temperatura foi deslocada para o nível +1 e a agitação também. (Tabela 9)

Tabela 9 - Matriz do planejamento fatorial  $2^2$  completo (valores reais e codificados) para a hidrólise de casca de arroz e feno de Tifton 85 com celulase comercial em diferentes temperaturas e agitações.

Ensaio	Variáveis Independentes*			Hidrólise de CA (%)	Hidrólise de FT (%)
	Temperatura (°C)	CA Agitação (rpm)	FT Agitação (rpm)		
1	37 (-1)	150 (-1)	100 (-1)	5,80	6,10
2	37 (-1)	250 (1)	100 (-1)	9,45	7,35
3	53 (1)	150 (-1)	200 (1)	8,05	12,25
4	53 (1)	250 (1)	200 (1)	11,50	11,70
5	33,7 (-1,41)	150 (0)	150 (0)	7,80	12,10
6	56,3 (1,41)	150 (0)	150 (0)	8,70	14,65
7	45 (0)	129,5 (-1,41)	79,5 (-1,41)	5,90	6,75
8	45 (0)	270,5 (1,41)	220,5 (1,41)	9,55	15,95
9	45 (0)	200 (0)	150 (0)	10,10	19,80
10	45 (0)	200 (0)	150 (0)	10,30	20,30
11	45 (0)	200 (0)	150 (0)	10,00	20,50

\*\*Variáveis independentes fixas: tempo de reação 10 h para casca de arroz e 12 horas para feno de Tifton 85, quantidade de enzima: 5 mL (diluição 1:50).

A máxima percentagem de hidrólise (11,50 %) de casca de arroz foi observada no ensaio 4 à 53 °C e 250 rpm, seguida das hidrólises obtidas nos ensaios do ponto central (9, 10 e 11) (Tabela 9) com valores de aproximadamente 10 %, em uma temperatura de 45 °C e agitação de 200 rpm, durante 10 horas de reação com uma diluição de 1:50.

A Equação 3 apresenta o modelo codificado de segunda ordem, que descreve a hidrólise de casca de arroz em função das variáveis analisadas (temperatura e agitação), dentro das faixas estudadas. O modelo foi validado pela análise de variância, onde obteve-se um coeficiente de correlação  $R^2$  de 0,83 e o F calculado 1,66 vezes maior que o valor tabelado (Tabelas 3 e 4 do Apêndice), os quais

permitiram a construção das superfícies de resposta e curva de contorno apresentadas na Figura 9.

$$\text{Hidrólise (\%)} = 10,13 + 1,05.X_1 - 0,76.X_1^2 + 1,18.X_2 - 1,03.X_2^2 \quad (3)$$

Onde: Hidrólise (%) = hidrólise de casca de arroz (%);  $X_1$ = Temperatura (°C);  $X_2$ = Agitação (rpm).

Ao analisar-se a Tabela 9, observa-se também que a máxima percentagem de hidrólise de feno de Tifton 85 foi obtida nos ensaios do ponto central com valores próximos de 20 %, correspondentes a uma temperatura de 45 °C e agitação de 150 rpm, durante 12 horas de reação com uma diluição de 1:50, caracterizando desta forma a otimização da hidrólise enzimática do feno de Tifton 85.

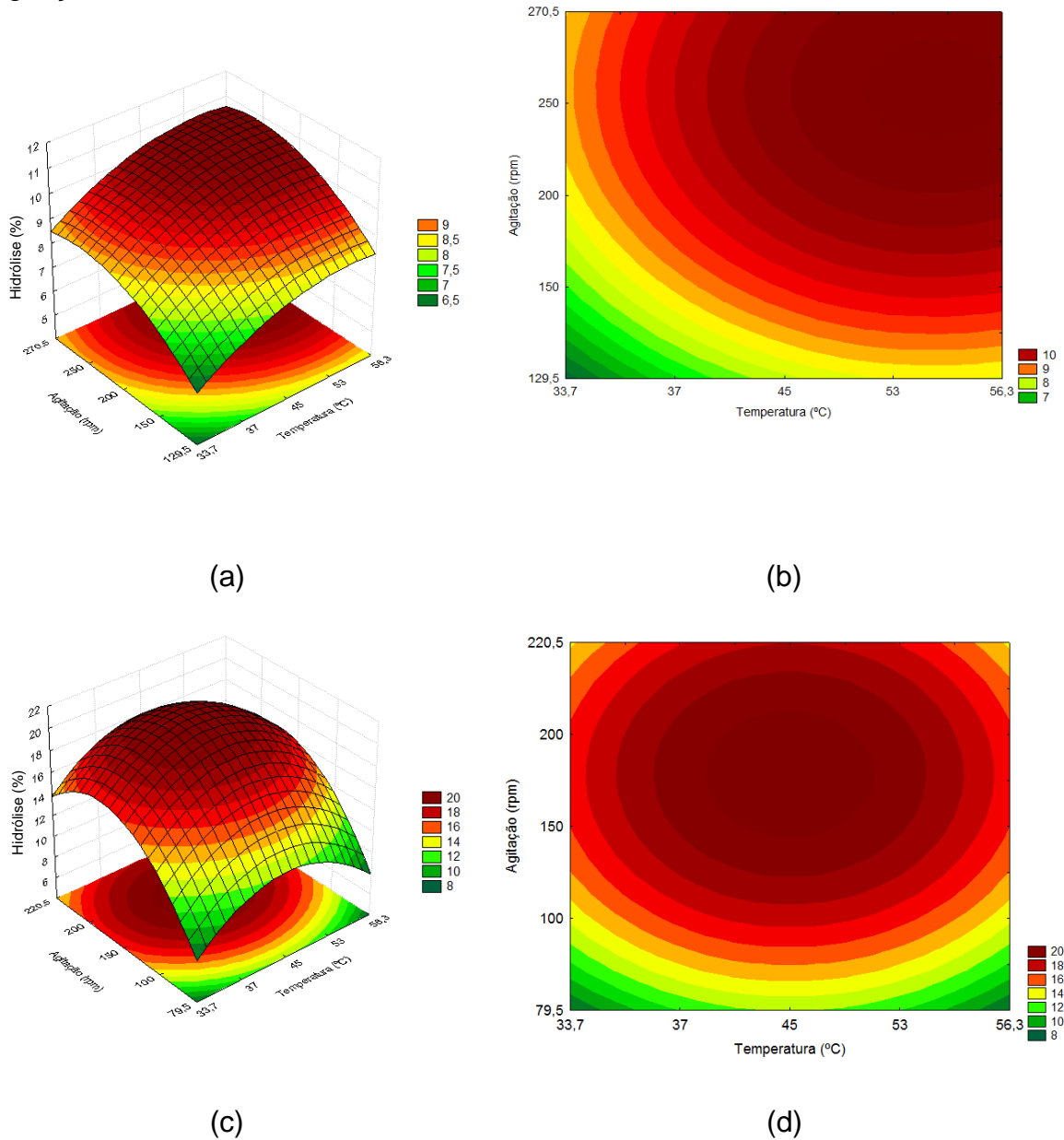
A Equação 4 apresenta o modelo codificado de segunda ordem, que descreve a hidrólise do feno de Tifton 85 em função das variáveis analisadas (temperatura e agitação), dentro das faixas estudadas. O modelo foi validado pela análise de variância, onde obteve-se um coeficiente de correlação  $R^2$  de 0,92 e o F calculado 6,25 vezes maior que o valor tabelado (Tabelas 5 e 6 do Apêndice), os quais permitiram a construção das superfícies de resposta e curva de contorno apresentadas na Figura 9.

$$\text{Hidrólise (\%)} = 20,21 - 4,18.X_1^2 + 2,94.X_2 - 5,20.X_2^2 \quad (4)$$

Onde: Hidrólise (%) = hidrólise do feno de Tifton 85 (%);  $X_1$ = Temperatura (°C);  $X_2$ = Agitação (rpm).

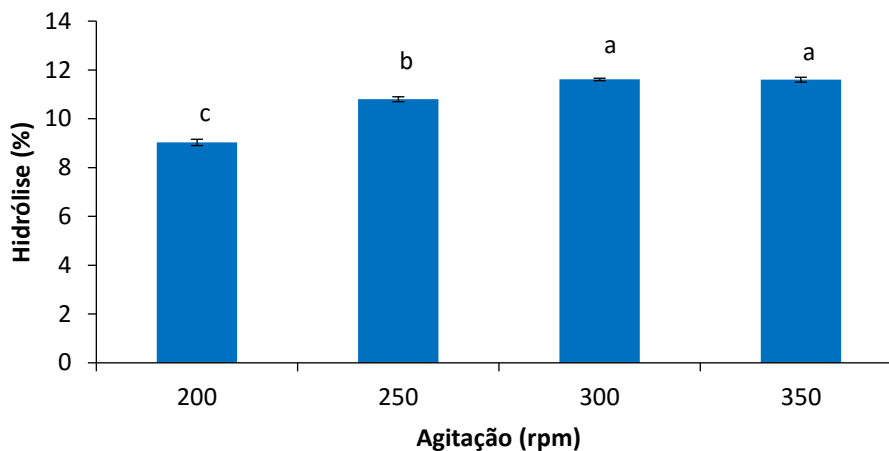
A Figura 9 (a,b) demonstra que os maiores percentuais de hidrólise de casca de arroz ocorrem com as maiores temperaturas e agitações avaliadas, em 10 horas de reação e diluição de 1:50. Para o feno de Tifton 85 a Figura 9 (c,d) aponta a máxima hidrólise (20 %) com uma temperatura de 45 °C e agitação de 150 rpm, durante 12 horas de reação com uma diluição de 1:50, os quais caracterizam a otimização da hidrólise do feno de Tifton 85, dentro da faixa estudada.

Figura 9 - Superfícies de resposta (a,b) e curvas de contorno (c,d) para a hidrólise da casca de arroz e feno de Tifton 85 com celulase comercial em função da temperatura e agitação.



Considerando que temperaturas acima de  $56,3^{\circ}\text{C}$  (+1,41) no caso da casca de arroz podem ser limitantes para a enzima celulase comercial, foram realizados testes em triplicata, variando apenas a agitação (200 a 350 rpm) com temperatura fixa em  $45^{\circ}\text{C}$ . (Figura 10).

Figura 10 - Influência da agitação na hidrólise de casca de arroz com celulase comercial.



\*Variáveis independentes fixas: tempo de reação 10 h, temperatura 45°C, quantidade de enzima: 5 mL (diluição 1:50).

Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

De acordo com os resultados (Figura 10), observa-se que a agitação teve efeito significativo para hidrólise de casca de arroz, alcançando-se os maiores percentuais de hidrólise em 300 rpm (11,61%), permanecendo estável com 350 rpm.

Aguiar (2010) observou comportamento similar da atividade enzimática para três resíduos (bagaço de cana, palha de milho e palha de trigo), a qual aumentou gradativamente até a temperatura de 50°C, com 0,340 U/mL, 0,536 U/mL e 0,469 U/mL para , respectivamente, caindo drasticamente, nas temperaturas de 60 a 80°C. O aumento da atividade enzimática se deve a ativação da enzima pela temperatura (SHULER & KARGI, 1992), na qual os átomos adquirem muita energia e grande tendência a se moverem. Após este período ocorre a desnaturação ou desativação térmica causada pelo rompimento das fracas interações que mantém unida a estrutura globular da proteína (BAILEY & OLLIS, 1986).

#### 4.1.3.3 Pectinase comercial com Casca de Soja e Sabugo/palha de milho

Para avaliar os efeitos da temperatura e agitação na hidrólise da casca da soja e sabugo/palha de milho utilizando a enzima comercial pectinase empregou-se um planejamento fatorial  $2^2$  (Tabela 10), onde observa-se os valores codificados e reais das variáveis independentes em estudo e a resposta em hidrólise da casca de soja e sabugo/palha de milho. As variáveis independentes fixas foram tempo, 22 horas e

5 mL da enzima comercial (não diluída). O maior percentual de hidrólise da casca de soja, 31,9 %, foi encontrado nos ensaios do ponto central (5, 6 e 7), correspondendo a uma temperatura de 37°C e agitação de 150 rpm. Para sabugo/palha de milho a maior hidrólise deu-se no ensaio 4 (6,18 %) correspondendo a uma temperatura de 45°C e agitação de 200 rpm.

Tabela 10 - Matriz do planejamento fatorial 2<sup>2</sup> (valores reais e codificados) para a hidrólise de casca de soja e sabugo/palha de milho com pectinase comercial.

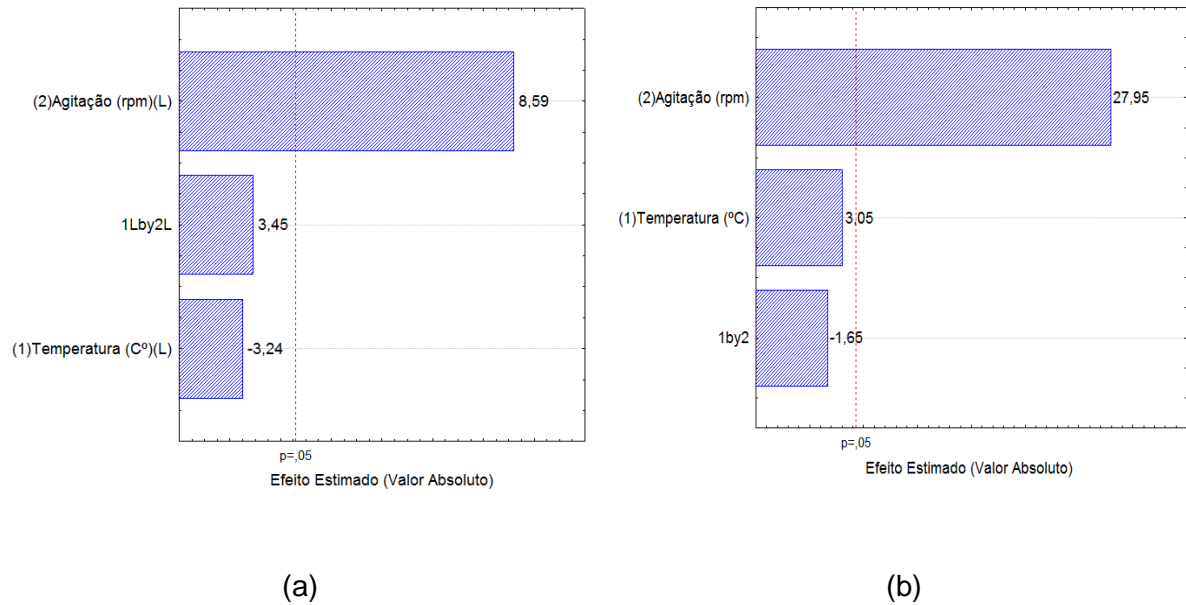
Ensaio	Variáveis Independentes*		Hidrólise de CS (%)	Hidrólise de SPM (%)
	Temperatura (°C)	Agitação (rpm)		
1	29 (-1)	100 (-1)	28,34	3,08
2	29 (-1)	200 (1)	29,60	6,04
3	45 (1)	100 (-1)	26,70	3,55
4	45 (1)	200 (1)	29,65	6,18
5	37 (0)	150 (0)	31,88	5,60
6	37 (0)	150 (0)	31,63	5,40
7	37 (0)	150 (0)	32,12	5,50

\*\*Variáveis independentes fixas: tempo de reação: 22 horas, quantidade de enzima: 5 mL (sem diluição).

Os resultados da Tabela 10 foram tratados estatisticamente e a Figura 11 apresenta o gráfico de Pareto com os efeitos estimados das variáveis estudadas para a hidrólise de casca de soja (a) e sabugo/palha de milho (b). Verifica-se que a agitação apresentou efeito significativo positivo ( $p < 0,05$ ) para ambos os substratos, o que significa que um aumento na agitação possivelmente ocasionará um aumento na hidrólise da casca de soja e sabugo/palha de milho.

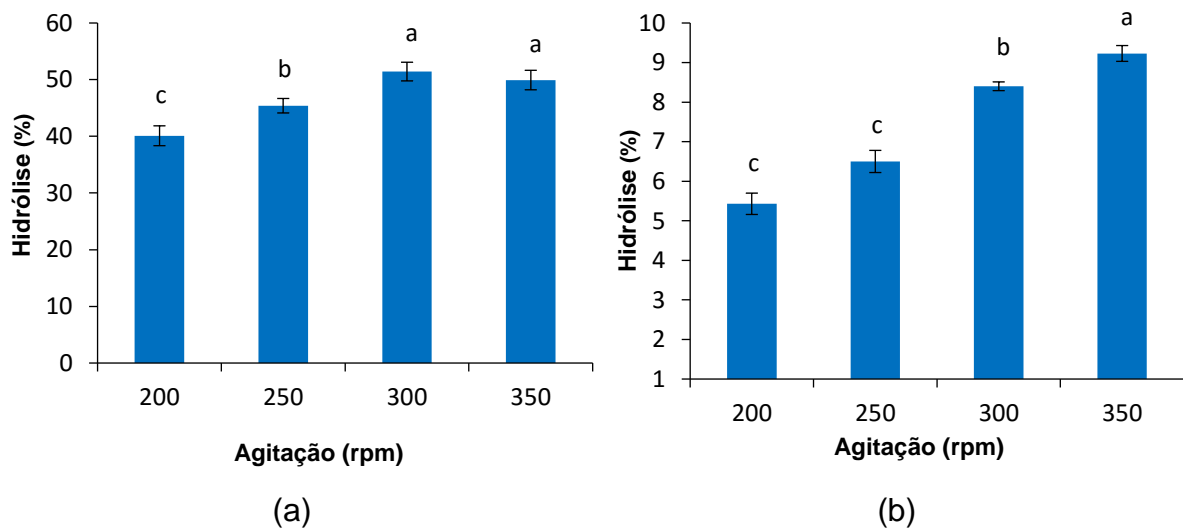


Figura 11 - Gráfico de Pareto com o efeito estimado (valor absoluto) das variáveis testadas no planejamento fatorial  $2^2$  para a hidrólise de casca soja (a) e sabugo/palha de milho (b) com pectinase comercial.



Visando maximizar a hidrólise casca de soja e sabugo/palha de milho com pectinase comercial, foram realizados testes em triplicata, variando a agitação (200 a 350 rpm) e mantendo fixa a temperatura (45°C), cujos resultados são apresentados na Figura 12.

Figura 12 - Influência da agitação na hidrólise de casca de soja (a) e sabugo/palha de milho (b) com pectinase comercial e temperatura de 45 °C.



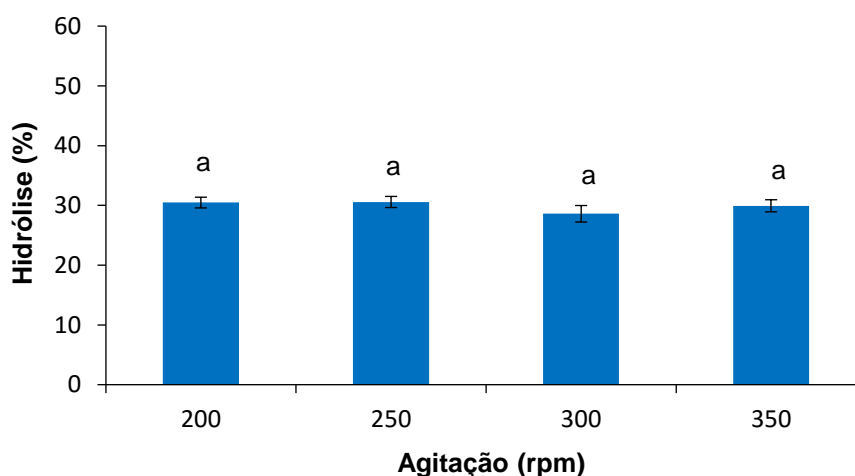
\*Variáveis independentes fixas: tempo de reação 22 h, temperatura, 45°C, quantidade de enzima: 5 mL. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Para sabugo/palha de milho a agitação teve efeito significativo (Figura 12 (a)), obtendo-se os maiores percentuais de hidrólise em 350 rpm, com 9,23%. Ao comparar estes resultados como uso de celulase comercial, a mesma apresentou maior hidrólise com 26,05 em 22 horas nas condições de 45 °C e diluição de 1:50 (m:v). Para casca de soja foi observado maior hidrólise (Figura 12 (a)) em 300 rpm, sendo maior que a obtida quando usou-se celulase comercial (47,97%).

O NRC (2001) avaliando a fração de carboidratos solúveis em detergente neutro, menciona que a casca de soja apresenta a maior fração de pectina (62%), enquanto amido (19%) e açúcares simples (19%) estão presentes em menor proporção.

Para casca de soja empregando-se a enzima pectinase, avaliou-se também a temperatura de 37°C com diferentes agitações (Figura 13), onde observa-se que esta temperatura e agitações não tiveram efeito significativo.

Figura 13 - Influência da agitação na hidrólise de casca de soja com pectinase comercial e temperatura de 37 °C.



\*Variáveis independentes fixas: tempo de reação 22 h, temperatura, 37°C, quantidade de enzima: 5 mL. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

#### 4.1.3.4 Pectinase com Casca de Arroz e Feno de Tifton 85

Para avaliar os efeitos da temperatura e agitação na hidrólise da casca de arroz e feno de Tifton 85, utilizando a enzima pectinase comercial, empregou-se um planejamento fatorial 2<sup>2</sup> (Tabela 11), onde observa-se os valores codificados e reais das variáveis independentes estudadas e a variável resposta em hidrólise de casca

de arroz e feno de Tifton 85. As variáveis independentes fixas foram o tempo de 10 horas para casca de arroz e 14 horas para o feno de Tifton 85 e 5 mL da enzima comercial (não diluída).

Tabela 11 - Matriz do planejamento fatorial  $2^2$  (valores reais e codificados) para a hidrólise de casca de arroz (CA) e feno de Tifton 85 (FT) com pectinase comercial.

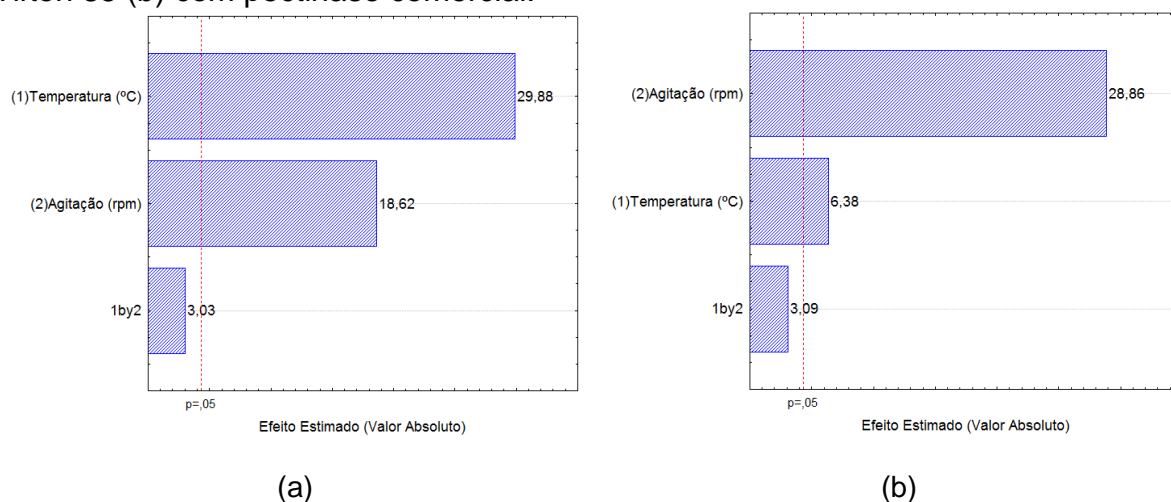
Ensaio	Variáveis Independentes*		Hidrólise de CA (%)	Hidrólise de FT (%)
	Temperatura (°C) X <sub>1</sub>	Agitação (rpm) X <sub>2</sub>		
1	29 (-1)	100 (-1)	0,22	3,54
2	29 (-1)	200 (1)	0,58	7,54
3	45 (1)	100 (-1)	0,84	4,05
4	45 (1)	200 (1)	1,34	9,01
5	37 (0)	150 (0)	0,07	6,28
6	37 (0)	150 (0)	0,07	6,42
7	37 (0)	150 (0)	0,03	6,59

\*\*Variáveis independentes fixas: tempo de reação: 10 horas para casca de arroz e 14 horas para o feno de Tifton 85; quantidade de enzima: 5 mL (sem diluição).

De acordo com a Tabela 11, as maiores hidrólises da casca de arroz e do feno de Tifton 85 foram no ensaio 4, com 1,34 % e 9,01 %, respectivamente, correspondendo a uma temperatura de 45 °C e agitação de 200 rpm.

A Figura 14 (a, b) demonstra o gráfico de Pareto com os efeitos estimados das variáveis estudadas para a hidrólise de casca de arroz e feno de Tifton 85, com pectinase comercial.

Figura 14 - Gráfico de Pareto com o efeito estimado (valor absoluto) das variáveis testadas no planejamento fatorial  $2^2$  para a hidrólise de casca de arroz (a) e feno de Tifton 85 (b) com pectinase comercial.



Verifica-se (Figura 14, a) que a agitação e temperatura apresentaram efeito significativo positivo ( $p < 0,05$ ) para a casca de arroz, o que significa que um aumento na agitação e na temperatura possivelmente ocasionará um aumento na hidrólise da casca de arroz. Desta forma, os parâmetros agitação e temperatura foram deslocados e um novo planejamento fatorial  $2^2$  completo foi realizado para casca de arroz, sendo que os resultados são apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 - Matriz do planejamento fatorial  $2^2$  completo (valores reais e codificados) para a hidrólise de casca de arroz com pectinase comercial.

Ensaio	Variáveis Independentes*		Hidrólise de CA (%)
	Temperatura (°C)	Agitação (rpm)	
1	37 (-1)	150 (-1)	0,10
2	37 (-1)	250 (1)	0,85
3	53 (1)	150 (-1)	1,25
4	53 (1)	250 (1)	0,85
5	33,7 (-1,41)	150 (0)	1,55
6	56,3 (1,41)	150 (0)	1,20
7	45 (0)	129,5 (-1,41)	0,40
8	45 (0)	270,5 (1,41)	1,85
9	45 (0)	200 (0)	2,40
10	45 (0)	200 (0)	2,30
11	45 (0)	200 (0)	2,00

\*\*Variáveis independentes fixas: tempo de reação 10h, quantidade de enzima: 5 mL (diluição 1/50).

A máxima percentagem de hidrólise de casca de arroz foi observada nos ensaios do ponto central (9, 10 e 11) com valores de aproximadamente 2,2 %, à uma temperatura de 45°C e agitação de 200 rpm, durante 10 horas de reação com 5 mL de extrato enzimático (sem diluição).

A Equação 5 apresenta o modelo codificado de segunda ordem, que descreve a hidrólise de casca de arroz em função das variáveis analisadas (temperatura e agitação), dentro das faixas estudadas.

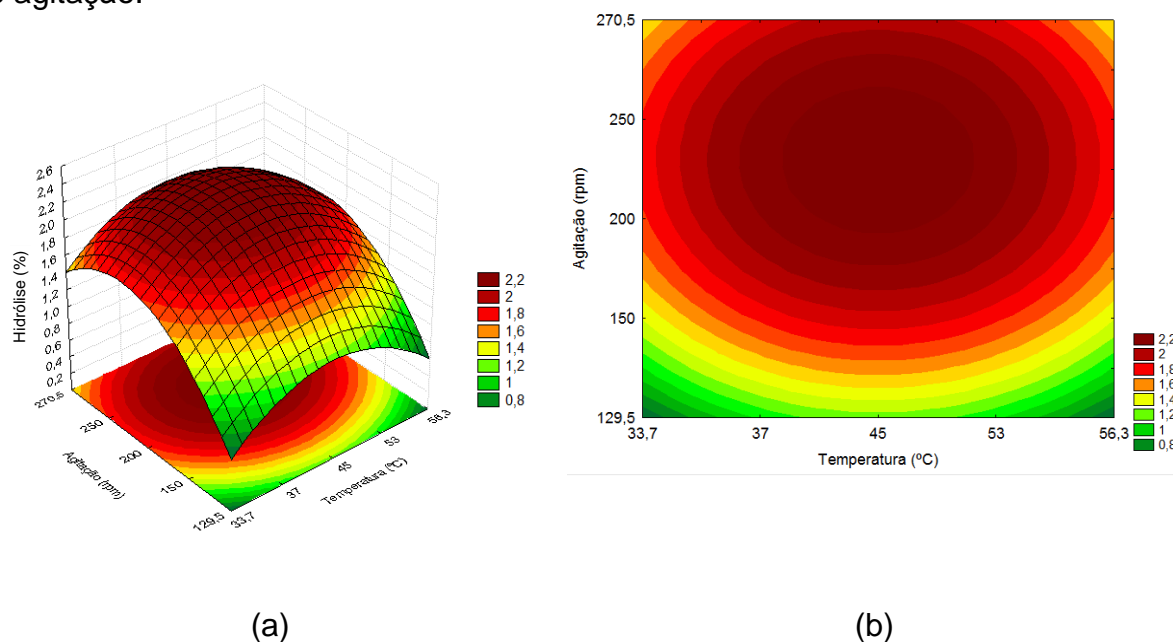
$$\text{Hidrólise (\%)} = 2,23 - 0,55.X_1^2 + 0,40.X_2 - 0,67.X_2^2 \quad (5)$$

Onde: Hidrólise (%) = hidrólise de casca de arroz (%);  $X_1$  = Temperatura (°C);  $X_2$  = Agitação (rpm).

O modelo foi validado pela análise de variância, onde obteve-se um coeficiente de correlação  $R^2$  de 0,81 e o F calculado 2,33 vezes maior que o valor tabelado

(Tabelas 7 e 8 do Apêndice), os quais permitiram a construção das superfícies de resposta e curva de contorno apresentadas na Figura 15.

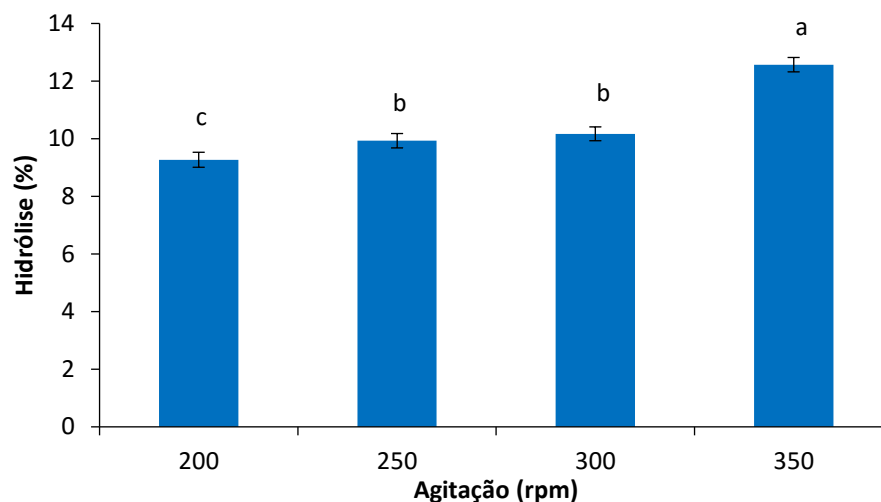
Figura 15 - Superfícies de resposta (a) e curvas de contorno (b) para a hidrólise da casca de arroz (a, b) com aplicação de pectinase comercial, em função da temperatura e agitação.



A Figura 15 apresenta a otimização da hidrólise da casca de arroz com pectinase comercial com uma temperatura de 45 °C e agitação de 200 rpm, durante 10 horas de reação com 5 mL de pectinase não diluída. Para casca de arroz, a pectinase comercial empregada neste trabalho apresentou hidrólise (%) inferior ao obtido com a utilização da celulase comercial que foi de 11,50 %.

Para feno de Tifton (Figura 14, b) observa-se que tanto a agitação quanto a temperatura apresentaram efeito positivo, o que significa que se aumentarmos os níveis possivelmente ocorrerá aumento na hidrólise. Porém, como para a CA quando deslocou-se a temperatura para níveis maiores não foi observado aumento na hidrólise. Para o feno de Tifton não foi realizado este estudo, mas sim um ensaio em triplicata com maiores níveis de agitação visando a maximização da hidrólise. Os resultados deste estudo podem ser visualizados na Figura 16, onde observa-se que a agitação teve efeito significativo, obtendo-se os maiores percentuais de hidrólise em 350 rpm, com 12,6%. Ao comparar-se este resultado de hidrólise com o obtido quando utilizou-se celulase comercial (20%), constatou-se que é menor.

Figura 16 - Influência da agitação na hidrólise de feno de Tifton 85 com pectinase comercial.



\*Variáveis independentes fixas: tempo de reação 14 h, temperatura, 45°C, quantidade de enzima: 5 mL (sem diluição).

Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

#### 4.1.4 Efeito da combinação das enzimas comerciais na hidrólise dos substratos lignocelulósicos

Para avaliar o efeito da interação entre celulases e pectinases comerciais na hidrólise dos substratos lignocelulósicos (casca de soja, casca de arroz, sabugo/palha de milho e feno de Tifton 85), foram avaliados diferentes proporções do volume das enzimas utilizadas na reação de hidrólise (Tabela 13). As variáveis tempo reacional, diluição das enzimas, temperatura e agitação foram mantidas fixas conforme os melhores resultados obtidos nos ensaios dos resíduos, com a enzima celulase comercial. As reações de hidrólise na mistura das enzimas celulase e pectinase foram conduzidas em temperatura de 45°C, quantidade de enzima: 5 mL com tempo de reação de 22, 10, 14 e 12 horas e agitação de 300, 300, 350 e 150 rpm para casca de soja, casca de arroz, sabugo/palha de milho e feno de Tifton 85, respectivamente.

Tabela 13 - Efeito da interação entre celulase e pectinase comerciais na hidrólise dos substratos lignocelulósicos (casca de soja, casca de arroz, sabugo/palha de milho e feno de Tifton 85).

Resíduo	Misturas Celulase/Pectinase (%)				
	100/0	75/25	50/50	25/75	0/100
<b>CS</b>	50,23 <sup>aA</sup> ± 4,81	44,31 <sup>bA</sup> ± 4,02	43,00 <sup>bA</sup> ± 3,98	43,70 <sup>bB</sup> ± 4,02	50,23 <sup>aA</sup> ± 4,65
<b>CA</b>	12,07 <sup>aE</sup> ± 1,10	10,27 <sup>bE</sup> ± 1,02	8,17 <sup>cD</sup> ± 0,65	2,74 <sup>dF</sup> ± 2,03	0,41 <sup>eE</sup> ± 0,03
<b>SPM</b>	26,16 <sup>aC</sup> ± 2,41	24,37 <sup>bC</sup> ± 2,21	17,73 <sup>cB</sup> ± 1,65	9,98 <sup>dC</sup> ± 8,12	2,52 <sup>eD</sup> ± 0,17
<b>FT</b>	20,63 <sup>aD</sup> ± 1,90	18,06 <sup>bD</sup> ± 1,77	12,50 <sup>cC</sup> ± 1,23	6,23 <sup>dD</sup> ± 5,83	2,13 <sup>eD</sup> ± 0,19

Médias seguidas de mesmas letras minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas não diferem significativamente pelo teste de Tukey com 95% de confiança.

A = hidrólise determinada com a curva padrão de glicose.

Na Tabela 13 observa-se que para CA, SPM e FT, a maior hidrólise foi obtida com os maiores percentuais de celulase (100%). Neste caso, acredita-se que devido a composição majoritária destes resíduos em celulose, obteve-se maior hidrólise nos ensaios em que a enzima celulase predominava.

Para a casca de soja a hidrólise foi diferente, apresentando valores de hidrólise maiores tanto com percentuais maiores de celulase comercial quanto de pectinase comercial. Tal resultado pode ter ocorrido devido a marcante presença de pectina na composição da casca de soja, a qual apresenta celulose (39,7%) em quantidade significativa (CASSALES et al., 2011). A pectina da casca do grão de soja corresponde a 62,4% dos carboidratos não-fibrosos (CNF), o que equivale a 8,8% da MS (NRC, 2001).

Rojas et al. (2014) utilizando tratamento prévio ácido na hidrólise de casca de soja nas condições de 50 °C, pH 4,8, e 200 rpm, com 20 FPU por grama de celulose de enzima celulase, alcançaram 55% de conversão de celulose em glicose. Quando os autores suplementaram o meio com beta-glucosidase a 120 UI/g de celulose e pectinase, Novo-ProD<sup>®</sup>(1%, m/m) no intuito de aumentar o percentual de hidrólise, a conversão permaneceu semelhante (49-55%).

Os carboidratos da soja são diferentes daqueles da biomassa lignocelulósica comum; a maior parte dos polissacarídeos de soja é pectina e só uma pequena porção é de celulose. Além disso, mesmo que a pectina seja o componente principal, uma significativa quantidade de hemicelulose e pequena quantidade de celulose presentes são acreditadas por exercer significativa restrição sobre a hidrólise (HUISMAN, SCHOLS & VORAGEN, 1998).

O desempenho geral da hidrólise da biomassa pode ser atribuído à ação

sinérgica das diversas enzimas constituintes de um complexo enzimático, incluindo uma variedade de celulases, hemicelulases, e enzimas acessórias. Os extratos celulolíticos comerciais, comumente empregados nos processos de hidrólise enzimática, são formados por uma mistura complexa de enzimas hidrolíticas. Um exemplo de enzimas hidrolíticas é o encontrado nas preparações comerciais denominadas Celluclast 1.5L e Novozym 188. A mistura denominada Celluclast, derivada de uma cepa de *Trichoderma reesei*, contém atividades elevadas de endoglucanases e celobiohidrolases, porém baixa atividade de  $\beta$ -glicosidases. Por outro lado, a preparação comercial Novozym 188, derivada de *Aspergillus niger*, é basicamente composta de atividade  $\beta$ -glicosidase. A mistura dos dois preparados comerciais é comumente empregada nos estudos de hidrólise enzimática (SUN & CHENG, 2002).

Diferentes grupos de enzimas com ação em sinergia podem ser mais eficientes na desagregação de polissacáridos complexos. Um desafio para o processo de hidrólise enzimática, são os elevados custos de enzimáticos envolvidos na sacarificação do componente celulósico (REIS et al., 2013). Além disso a hemicelulose é conhecida por exercer uma influência significativa sobre a hidrólise enzimática de celulose (VÁRNAI et al., 2010).

Neste contexto, há estudos que sugerem o uso de coquetéis enzimáticos para a eficaz degradação enzimática de materiais lignocelulósicos (HU & SADDLER, 2011; KIM & KIM, 2014) e em muitas situações, enzimas a partir de vários microrganismos são produzidos numa mistura.

## **4.2 HIDRÓLISE DE SUBSTRATOS LIGNOCELULÓSICOS UTILIZANDO ENZIMAS NÃO COMERCIAIS**

### **4.2.1 Celulase não comercial**

Para avaliar o tempo de reação foi realizada a hidrólise (%) dos diferentes substratos (CS, CA, SPM e FT) empregando-se a enzima celulase não comercial comparando com os resultados obtidos com a enzima celulase comercial (Tabela 14). Para os ensaios com a celulase não comercial, as variáveis tempo reacional, temperatura e agitação foram mantidas fixas conforme os melhores resultados de hidrólise obtidos com a enzima celulase comercial empregada nos substratos. As



reações de hidrólise foram conduzidas em temperatura de 45°C, quantidade de enzima: 5 mL com tempo de reação de 22, 10, 14 e 12 horas e agitação de 300, 300, 350 e 150 rpm para casca de soja, casca de arroz, sabugo/palha de milho e feno de Tifton 85, respectivamente. Foram determinadas atividades para as enzimas Fpase, xilanase, CMCase e avicelase, as quais apresentaram valores de 6,02; 972,74; 7,76 e 2,02 U/g, respectivamente.

Tabela 14 - Hidrólise dos substratos lignocelulósicos (casca de soja, casca de arroz, sabugo/palha de milho e feno de Tifton 85) empregando-se celulase comercial e não comercial.

<b>Substrato</b>	<b>Celulase Comercial (%)</b>	<b>Celulase não Comercial (%)</b>	<b>p</b>	<b>% Hidrólise celulase não comercial/comercial</b>
CS	47,95 ± 0,15	9,93 ± 0,62	<0,01	20,71
CA	11,61 ± 0,15	2,10 ± 0,19	<0,01	18,09
SPM	26,05 ± 0,14	4,47 ± 0,22	<0,01	17,16
FT	20,00 ± 0,08	4,73 ± 0,35	<0,01	23,65

Teste t de student

Observa-se que os percentuais de hidrólise da enzima celulase não comercial alcançam níveis muito baixos quando comparados a hidrólise dos substratos com enzima celulase comercial. O melhor percentual de hidrólise da enzima não comercial em relação a comercial foi obtido com o feno de Tifton 85, em um nível de 23,65% do total de hidrólise obtido com celulase comercial. A hidrólise da casca de arroz e sabugo/palha de milho hidrolisaram apenas 18,09 e 17,16% do total alcançado com a enzima comercial. Para casca de soja o resultado foi de 20,71%.

A Tabela 15 apresenta os resultados da cinética de hidrólise de casca de soja, casca de arroz, sabugo/palha de milho e feno de Tifton 85 empregando a enzima celulase não comercial, onde verifica-se que o melhor resultado da hidrólise (%) foi observado com 20 horas para a casca de soja, 12 horas para a casca de arroz, 18 horas para o sabugo/palha de milho, e 16 horas para o feno de Tifton 85.

Tabela 15 - Percentual de hidrólise de casca de soja (CS), casca de arroz (CA), sabugo e palha de milho (SPM) e feno de Tifton 85 (FT), em diferentes tempos, empregando celulase não comercial.

Tempo/horas	CS	CA	SPM	FT
0	0,50 <sup>g</sup> ± 0,03	0,20 <sup>f</sup> ± 0,01	0,06 <sup>g</sup> ± 0,04	0,58 <sup>f</sup> ± 0,04
2	1,20 <sup>f</sup> ± 0,09	0,49 <sup>e</sup> ± 0,03	0,36 <sup>f</sup> ± 0,03	0,88 <sup>e</sup> ± 0,07
4	1,40 <sup>e</sup> ± 0,09	0,79 <sup>cd</sup> ± 0,05	0,62 <sup>e</sup> ± 0,05	2,96 <sup>d</sup> ± 0,25
6	1,50 <sup>e</sup> ± 0,12	0,69 <sup>d</sup> ± 0,05	1,87 <sup>d</sup> ± 0,15	3,63 <sup>c</sup> ± 0,29
8	1,79 <sup>de</sup> ± 0,14	0,89 <sup>c</sup> ± 0,07	2,89 <sup>c</sup> ± 0,21	4,18 <sup>b</sup> ± 0,38
10	1,82 <sup>d</sup> ± 0,16	1,29 <sup>b</sup> ± 0,09	2,88 <sup>c</sup> ± 0,22	3,78 <sup>c</sup> ± 0,29
12	2,20 <sup>d</sup> ± 0,19	2,69 <sup>a</sup> ± 0,19	3,47 <sup>b</sup> ± 0,29	4,29 <sup>b</sup> ± 0,38
14	4,53 <sup>c</sup> ± 0,21	2,60 <sup>a</sup> ± 0,21	3,58 <sup>b</sup> ± 0,31	4,18 <sup>b</sup> ± 0,39
16	3,99 <sup>c</sup> ± 0,26	-	3,49 <sup>b</sup> ± 0,32	4,78 <sup>a</sup> ± 0,37
18	6,29 <sup>b</sup> ± 0,20	-	4,59 <sup>a</sup> ± 0,39	4,57 <sup>a</sup> ± 0,41
20	10,04 <sup>a</sup> ± 0,21	-	4,39 <sup>a</sup> ± 0,40	-

\*Variáveis independentes fixas: temperatura: 45°C, quantidade de enzima: 5 mL (não diluída). Casca de soja: agitação: 300 rpm. Casca de arroz: agitação: 300 rpm. Sabugo/palha de milho: agitação: 350 rpm. Tifton 85: agitação: 150 rpm.

As médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 95 % de confiança.

#### 4.2.2 Pectinase não comercial

A Tabela 16 apresenta os resultados da hidrólise dos diferentes substratos (CS, CA, SPM e FT) utilizando pectinase não comercial e pectinase comercial. Para a realização dos ensaios com a enzima pectinase não comercial, as variáveis tempo reacional, temperatura e agitação foram mantidas fixas conforme os melhores resultados obtidos com a enzima pectinase comercial. As reações de hidrólise com as pectinases foram conduzidas em 45°C, quantidade de enzima: 5 mL e agitação de 350, 200, 300 e 350 rpm para casca de soja, casca de arroz, sabugo/palha de milho e feno de Tifton 85, respectivamente. Foram determinadas atividades para as enzimas PG; PME e PMGL, as quais apresentaram valores de 1,83; 3,80 e 29,0 U/g, respectivamente.

Tabela 16 - Hidrólise dos substratos lignocelulósicos (casca de soja, casca de arroz, Sabugo/palha de milho e feno de Tifton 85) empregando-se pectinase comercial e não comercial

<b>Resíduo</b>	<b>Pectinase Comercial (%)</b>	<b>Pectinase Não Comercial (%)</b>	<b>p</b>	<b>% Hidrólise pectinase não comercial/comercial</b>
CS	51,4±1,75	15,27 ± 0,96	<0,01	29,71
CA	3,55±0,35	0,92 ± 0,16	<0,01	25,91
SPM	9,23±0,75	0,67 ± 0,05	<0,01	7,26
FT	9,01±0,68	2,71 ± 0,19	<0,01	30,07

Teste t de student

Observa-se que os percentuais de hidrólise dos substratos lignocelulósicos com a enzima pectinase não comercial alcançaram níveis de aproximadamente 30% do total da hidrólise dos substratos com a enzima pectinase comercial. A exceção foi o sabugo/palha de milho que alcançou apenas 7,26% da hidrólise da pectinase comercial. O melhor percentual de hidrólise da enzima não comercial foi obtido com o feno de Tifton 85, em um nível de 30,07%. Mesmo sendo relativamente baixos, tais resultados podem ser considerados satisfatórios, já que o custo de obtenção da enzima pectinase não comercial é inferior ao da enzima comercial.

A Tabela 17 apresenta os resultados da cinética de hidrólise de casca de soja (CS), casca de arroz (CA), sabugo/palha de milho (SPM) e feno de Tifton 85 (FT) empregando a enzima pectinase não comercial.

Verifica-se que o melhor resultado da hidrólise (%) ocorreu em 20 horas, para a casca de soja, 16 horas para a casca de arroz, 18 horas para o sabugo/palha de milho e 20 horas para o feno de Tifton 85.

Tabela 17 - Percentual de hidrólise de casca de soja (CS), casca de arroz (CA), sabugo e palha de milho (SPM) e feno de Tifton 85 (FT), em diferentes tempos, empregando pectinase não comercial.

Tempo/horas	CS	CA	SPM	FT
	Hidrólise (%)	Hidrólise (%)	Hidrólise (%)	Hidrólise (%)
0	1,61 <sup>e</sup> ± 0,12	0,10 <sup>d</sup> ± 0,01	0,10 <sup>d</sup> ± 0,01	0,08 <sup>f</sup> ± 0,01
2	4,32 <sup>d</sup> ± 0,32	1,04 <sup>bc</sup> ± 0,08	0,10 <sup>d</sup> ± 0,01	0,09 <sup>f</sup> ± 0,01
4	4,07 <sup>d</sup> ± 0,38	1,02 <sup>bc</sup> ± 0,07	0,08 <sup>d</sup> ± 0,04	0,09 <sup>f</sup> ± 0,01
6	4,00 <sup>d</sup> ± 0,36	1,12 <sup>b</sup> ± 0,09	0,08 <sup>d</sup> ± 0,05	0,29 <sup>e</sup> ± 0,02
8	3,89 <sup>d</sup> ± 0,37	0,82 <sup>c</sup> ± 0,05	0,51 <sup>c</sup> ± 0,04	0,50 <sup>d</sup> ± 0,04
10	3,76 <sup>d</sup> ± 0,35	0,79 <sup>c</sup> ± 0,05	0,68 <sup>c</sup> ± 0,05	0,49 <sup>d</sup> ± 0,04
12	3,89 <sup>d</sup> ± 0,35	0,79 <sup>c</sup> ± 0,04	1,28 <sup>b</sup> ± 0,09	0,69 <sup>d</sup> ± 0,05
14	4,1 <sup>d</sup> ± 0,39	1,31 <sup>b</sup> ± 0,10	1,48 <sup>b</sup> ± 0,18	1,03 <sup>c</sup> ± 0,08
16	7,54 <sup>c</sup> ± 0,65	2,91 <sup>a</sup> ± 0,25	1,37 <sup>b</sup> ± 0,09	3,18 <sup>b</sup> ± 0,29
18	11,28 <sup>b</sup> ± 0,98	2,80 <sup>a</sup> ± 0,24	1,88 <sup>a</sup> ± 0,10	3,41 <sup>b</sup> ± 0,30
20	15,93 <sup>a</sup> ± 1,20	-	1,93 <sup>a</sup> ± 0,17	4,51 <sup>a</sup> ± 0,41
22	-	-	-	4,82 <sup>a</sup> ± 0,42

\*Variáveis independentes fixas: temperatura: 45°C, quantidade de enzima: 5 mL (não diluída). Casca de soja: agitação: 350 rpm. Casca de arroz: agitação: 200 rpm. Sabugo/palha de milho: agitação: 300 rpm. Tifton 85: agitação: 350 rpm.

As médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 95 % de confiança.

### 4.3 EFEITO DE PRÉ-TRATAMENTOS NA HIDRÓLISE DE RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS

#### 4.3.1 Efeito da granulometria

A Tabela 18 apresenta o efeito da moagem na hidrólise dos substratos lignocelulósicos (casca de soja, casca de arroz, sabugo/palha de milho e feno de Tifton 85) em diferentes granulometrias, empregando-se a enzima celulase comercial. As variáveis tempo reacional, diluição das enzimas, temperatura e agitação foram mantidas fixas conforme os melhores resultados obtidos nas análises anteriores com a enzima celulase comercial.

Tabela 18 - Hidrólise dos resíduos lignocelulósicos (casca de soja, casca de arroz, sabugo/palha de milho e feno de Tifton 85), moídos em diferentes granulometrias, aplicando-se a enzima celulase comercial.

Granulometria	CS		CA		SPM		FT	
	Média	%	Média	%	Média	%	Média	%
<b>5 a 10 mm</b>	47,95 <sup>b</sup> ± 4,01	0	11,54 <sup>c</sup> ± 1,12	0	26,05 <sup>a</sup> ± 2,16	0	20,00 <sup>c</sup> ± 1,78	0
<b>1,5 mm</b>	48,21 <sup>b</sup> ± 4,05	0,54	11,36 <sup>c</sup> ± 1,10	-1,53	25,89 <sup>a</sup> ± 2,10	-0,60	20,76 <sup>b</sup> ± 1,75	3,8
<b>1,0 mm</b>	49,55 <sup>a</sup> ± 4,01	3,33	12,34 <sup>b</sup> ± 1,02	6,99	25,86 <sup>a</sup> ± 2,18	-0,71	21,10 <sup>a</sup> ± 1,98	5,55
<b>0,5 mm</b>	49,92 <sup>a</sup> ± 3,87	4,12	12,69 <sup>a</sup> ± 0,98	9,96	26,07 <sup>a</sup> ± 2,16	0,07	21,30 <sup>a</sup> ± 1,97	6,5

\*Variáveis independentes fixas: temperatura: 45 °C, quantidade de enzima: 5 mL (diluição 1:50). Casca de soja: tempo de reação: 22 h, agitação: 350 rpm. Casca de arroz: tempo de reação: 10 h, agitação: 300 rpm. Sabugo/palha de milho: tempo de reação: 22 h, agitação: 350 rpm. Tifton 85: tempo de reação: 12 h, agitação: 150 rpm.

Letras diferentes na coluna, indicam diferença significativa pelo teste de Tukey (p<0,05).

Mesmo apresentando uma pequena melhoria no percentual de hidrólise em quase todos níveis de moagem e substratos, o tratamento físico, isoladamente, não produziu efeito positivo na hidrólise dos resíduos lignocelulósicos. Em nenhum dos substratos lignocelulósicos o tratamento físico (moagem) alcançou um aumento percentual de 10% na hidrólise dos resíduos lignocelulósicos. O único substrato que apresentou aumento de hidrólise próximo a 10 % foi a casca de arroz moída em granulometria de 0,5 mm, apresentando hidrólise (9,96%) superior ao obtido com granulometria de 5 a 10 mm. Como a operação de moagem é um processo que envolve custos, os resultados alcançados indicam que não se justifica realizá-la isoladamente antes da hidrólise enzimática empregando celulase comercial.

Baudel (2006), menciona que os métodos físicos para realização de pré-tratamento consistem na redução do tamanho das partículas da biomassa, fazendo com que a superfície específica da celulose torne-se mais desenvolvida, de modo que a hidrólise da mesma possa ocorrer mais facilmente. Conforme o autor, a redução das partículas, em muitos casos, não é suficiente para que as etapas posteriores, de hidrólise enzimática e fermentação, sejam eficazes.

#### 4.3.2 Efeito do pré-tratamento alcalino

Para avaliar os efeitos do pré tratamento alcalino com NaOH (1, 3 e 5%) em temperatura de 100°C, por 30, 60 e 90 minutos na hidrólise de casca de soja, casca de arroz, sabugo/palha de milho e feno de Tifton 85 (sem pré-tratamento físico), com enzima celulase comercial empregou-se um planejamento fatorial 2<sup>2</sup> (Tabela 19).

Tabela 19 - Matriz do planejamento fatorial 2<sup>2</sup> (valores reais e codificados) para a hidrólise de casca de soja, casca de arroz, sabugo/palha de milho e feno do Tifton 85a com celulase comercial sob efeito de pré tratamento com NaOH (1 a 5 %) em temperatura de 100 °C, por 30 a 90 minutos.

Ensaio	Variáveis Independentes*		Hidrólise CS (%)	Hidrólise de CA (%)	Hidrólise SPM (%)	Hidrólise FT (%)
	NaOH (%)	Tempo (Min)				
1	1(-1)	30 (-1)	48,86	12,66	26,87	20,18
2	1(-1)	90 (1)	48,84	12,54	27,04	20,31
3	3 (1)	30 (-1)	49,16	13,16	27,18	21,07
4	3 (1)	90 (1)	49,29	13,23	27,37	21,76
5	5 (0)	60 (0)	49,23	13,19	27,31	21,20
6	5 (0)	60 (0)	49,16	13,19	27,30	20,98
7	5 (0)	60 (0)	49,22	13,20	27,30	21,00

\*\*Variáveis independentes fixas temperatura: 45 °C, quantidade de enzima: 5 mL (diluição 1:50). Casca de soja: tempo de reação: 22 h, agitação: 350 rpm. Casca de arroz: tempo de reação: 10 h, agitação: 300 rpm. Sabugo/palha de milho: tempo de reação: 22 h, agitação: 350 rpm. Feno de Tifton 85: tempo de reação: 12 h, agitação: 150 rpm.

Analisando-se os resultados dos ensaios na Tabela 19, pode-se observar que o tratamento alcalino, isoladamente, promoveu pequena melhoria no percentual de hidrólise de todos os resíduos lignocelulósicos, quando empregou-se a enzima celulase comercial. O maior percentual de hidrólise de todos os resíduos (CS, CA, SPM e FT) pré tratados com NaOH, empregando celulase comercial foi observado no ensaio 4 com 49,2; 13,23; 27,37; e 21,76, respectivamente para CS, CA, SPM e FT, com o emprego de 3% de NaOH, 100 °C e 90 minutos.

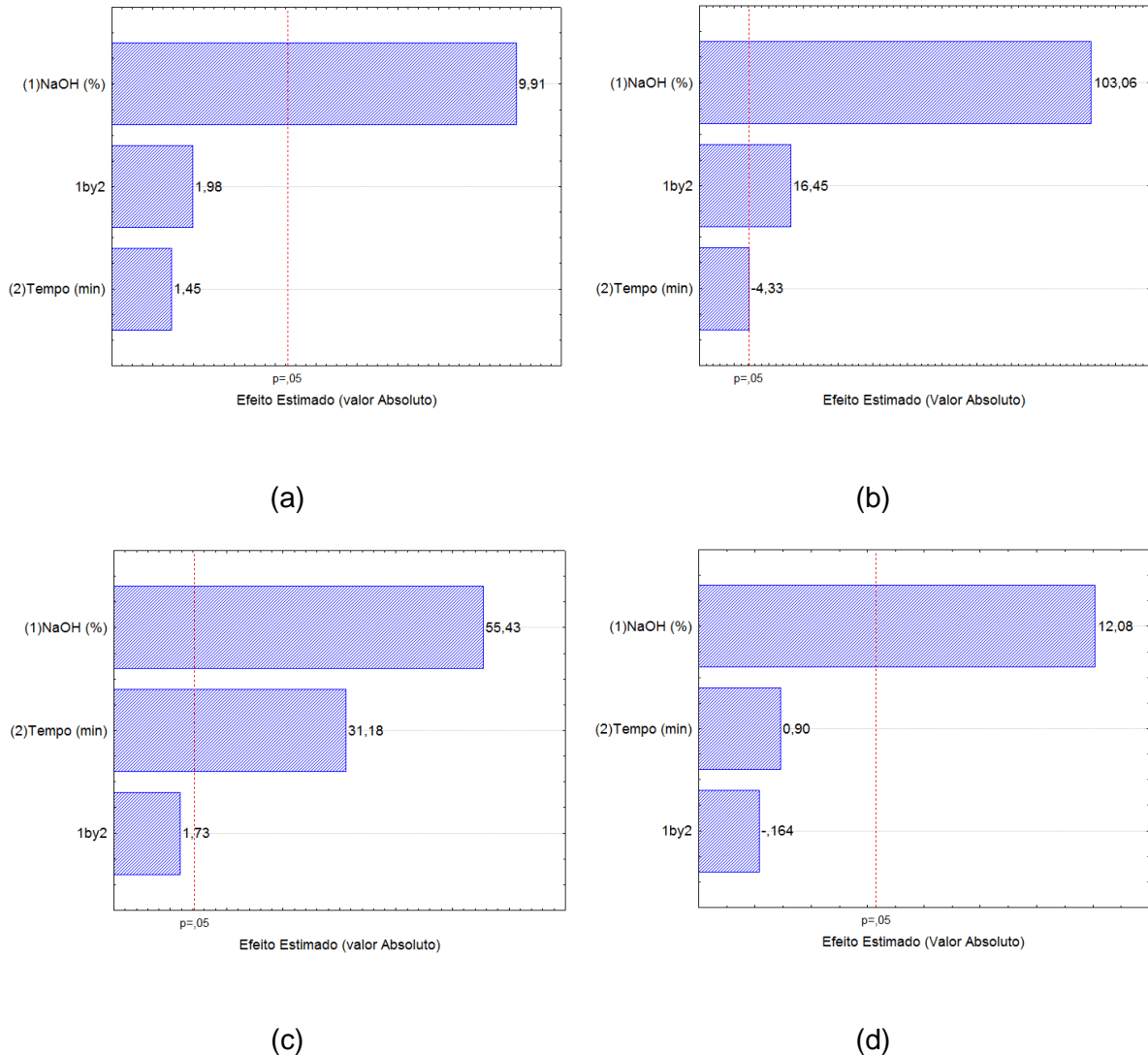
Segundo D'Almeida, (1988) durante o cozimento com hidróxido de sódio os produtos das reações acídicas dos carboidratos consomem a maior parte do álcali do licor de cozimento. É possível assim, que a quantidade presente de hidróxido de sódio nos ensaios foi insuficiente para a neutralização dos ácidos (grupos acetil) gerados durante o processo e a deslignificação da biomassa. Sendo assim, um aumento nas quantidades utilizadas de NaOH, poderia conduzir a uma maior porcentagem de deslignificação e maior hidrólise.

A partir dos resultados obtidos na Tabela 19, construiu-se o gráfico de Pareto (Figura 17) com os efeitos estimados das variáveis estudadas para a hidrólise de casca de soja, casca de arroz, sabugo/palha de milho e feno de Tifton 85.

A Figura 17 (a, b, c e d) demonstra o gráfico de Pareto com os efeitos estimados das variáveis estudadas para a hidrólise de casca de soja, casca de arroz

sabugo/palha de milho e feno de Tifton 85, sob efeito de pré tratamento com NaOH por 30 a 90 minutos em temperatura de 100 °C, empregando celulase comercial.

Figura 17 - Gráfico de Pareto com o efeito estimado (valor absoluto) das variáveis testadas no planejamento fatorial  $2^2$  para a hidrólise de casca de soja (a), casca de arroz (b), sabugo/palha de milho (c) e feno de Tifton 85 (d) com celulase comercial sob efeito de de pré tratamento com NaOH (1 a 5 %) em temperatura de 100 °C, por 30 a 90 minutos.



Para todos os substratos lignocelulósicos (CS, CA, SPM e FT) verifica-se que a concentração de NaOH apresentou efeito significativo positivo ( $p<0,05$ ), indicando que um aumento na concentração de NaOH possivelmente ocasionará um aumento na hidrólise dos substratos.

Para o sabugo/palha de milho (SPM), verifica-se que a variável tempo também apresentou efeito significativo positivo ( $p<0,05$ ) o que significa que um aumento no

tempo de reação do NaOH, possivelmente ocasionará um aumento na hidrólise de sabugo/palha de milho. Como para os demais substratos (CS, CA e FT) o tempo de reação não apresentou efeito significativo positivo, foram realizados testes com todos os substratos (CS, CA, SPM e FT), aplicando-se as enzimas celulase e pectinase comerciais, variando apenas a concentração de NaOH (3 a 10%) em temperatura de 45°C, e as demais variáveis fixas, conforme os melhores resultados obtidos nas análises anteriores com as referidas enzimas (Tabela 20).

#### 4.3.3 Efeito combinado da granulometria e pré-tratamento alcalino na hidrólise de resíduos lignocelulósicos

Na Tabela 20, estão apresentados os valores de hidrólise de cascas de soja e sabugo/palha de milho, sem prévio tratamento e moídos em granulometria de 0,5 mm e tratados com NaOH (3, 5, 7,5 e 10%) em temperatura de 100°C por 90 minutos, aplicando-se as enzimas celulase e pectinase comercial.

Tabela 20 – Hidrólise (%) de CS e SPM, sem pré-tratamento e moídos em granulometria de 0,5 mm, tratados com NaOH (3, 5, 7,5 e 10%) em temperatura de 100°C por 90 minutos, aplicando-se as enzimas celulase e pectinase comercial.

Pré-tratamento	Casca de soja		Sabugo/palha de milho	
	Celulase	Pectinase	Celulase	Pectinase
<b>Sem pré-tratamento</b>	49,92 <sup>c</sup> ± 3,87	51,40 <sup>b</sup> ± 3,28	26,07 <sup>c</sup> ± 2,16	9,23 <sup>c</sup> ± 0,56
<b>3% de NaOH</b>	50,06 <sup>c</sup> ± 2,16	52,55 <sup>b</sup> ± 2,85	30,20 <sup>b</sup> ± 2,32	11,6 <sup>c</sup> ± 0,95
<b>5% de NaOH</b>	55,55 <sup>b</sup> ± 2,56	52,2 <sup>b</sup> ± 2,80	30,30 <sup>b</sup> ± 2,52	15,0 <sup>b</sup> ± 0,98
<b>7,5% de NaOH</b>	73,08 <sup>a</sup> ± 4,58	59,52 <sup>a</sup> ± 3,02	34,40 <sup>a</sup> ± 2,68	17,7 <sup>a</sup> ± 1,10
<b>10% de NaOH</b>	72,80 <sup>a</sup> ± 4,52	58,71 <sup>a</sup> ± 4,06	34,00 <sup>a</sup> ± 2,49	17,9 <sup>a</sup> ± 1,25

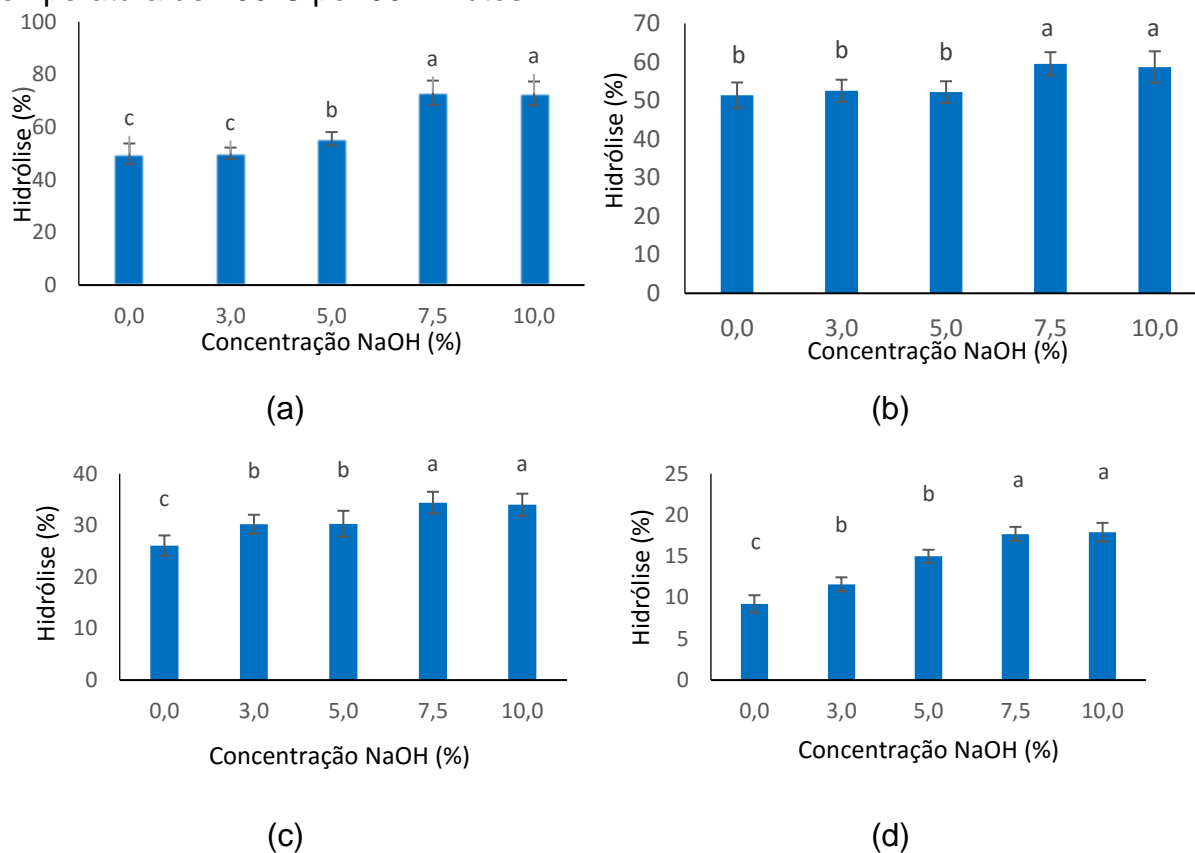
\*Variáveis independentes fixas temperatura: 45°C, quantidade de enzima: 5 mL (diluição 1:50 para celulase). Casca de soja para celulase e pectinase: tempo de reação: 22 h, agitação: 300 rpm. Sabugo/palha de milho para celulase: tempo de reação: 14 h, agitação: 350 rpm. Sabugo/palha de milho para pectinase: tempo de reação: 22 h, agitação: 350 rpm.

As médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 95 % de probabilidade.

Para melhor visualização dos resultados foram traçados gráficos mostrando o comportamento da hidrólise enzimática ao empregar diferentes concentrações de NaOH. Estes resultados são apresentados na Figura 18



Figura 18 – Hidrólise (%) de casca de soja empregando celulase (a) e pectinase (b) e sabugo/palha de milho com celulase (c) e pectinase (d), moídos em granulometria de 0,5 mm, sem pré-tratamento alcalino e tratados com NaOH (3, 5, 7,5 e 10%) em temperatura de 100°C por 90 minutos.



A Figura 18 (a) demonstra que os maiores percentuais de hidrólise (73,08%) de casca de soja (a) ocorrem na concentração de 7,5 % de NaOH com a enzima celulase comercial não diferindo significativamente da concentração de 10 %, quando usou-se celulase comercial. Já, quando usou-se a enzima pectinase comercial a hidrólise (59,52%) também foi maior Figura 18 (b), para casca de soja na concentração de 7,5 %, não diferindo significativamente da concentração de 10 %.

Para sabugo/palha de milho pode-se ver na Figura 18 (c e d) que os maiores percentuais de hidrólise também ocorrem na concentração de 7,5 % de NaOH tanto com a celulase comercial como com a pectinase comercial, não diferindo significativamente da concentração de 10 %.

Comparando-se as duas enzimas, a hidrólise do sabugo/palha de milho com pré-tratamento alcalino foi superior quando empregou-se a enzima celulase (34,4 %) do que quando empregou-se a enzima pectinase (17,9 %)

Na Tabela 21, estão apresentados os valores de hidrólise casca de arroz e feno de Tifton 85, sem prévio tratamento e moídos em granulometria de 0,5 mm e tratados com NaOH (3, 5, 7,5 e 10%) em temperatura de 100 °C por 90 minutos, aplicando-se as enzimas celulase e pectinase comercial.

Tabela 21 - Hidrólise de CA e FT, sem pré-tratamento e moídos em granulometria de 0,5 mm tratados com NaOH (3, 5, 7,5 e 10%) em temperatura de 100°C por 90 minutos, aplicando-se as enzimas celulase e pectinase comercial.

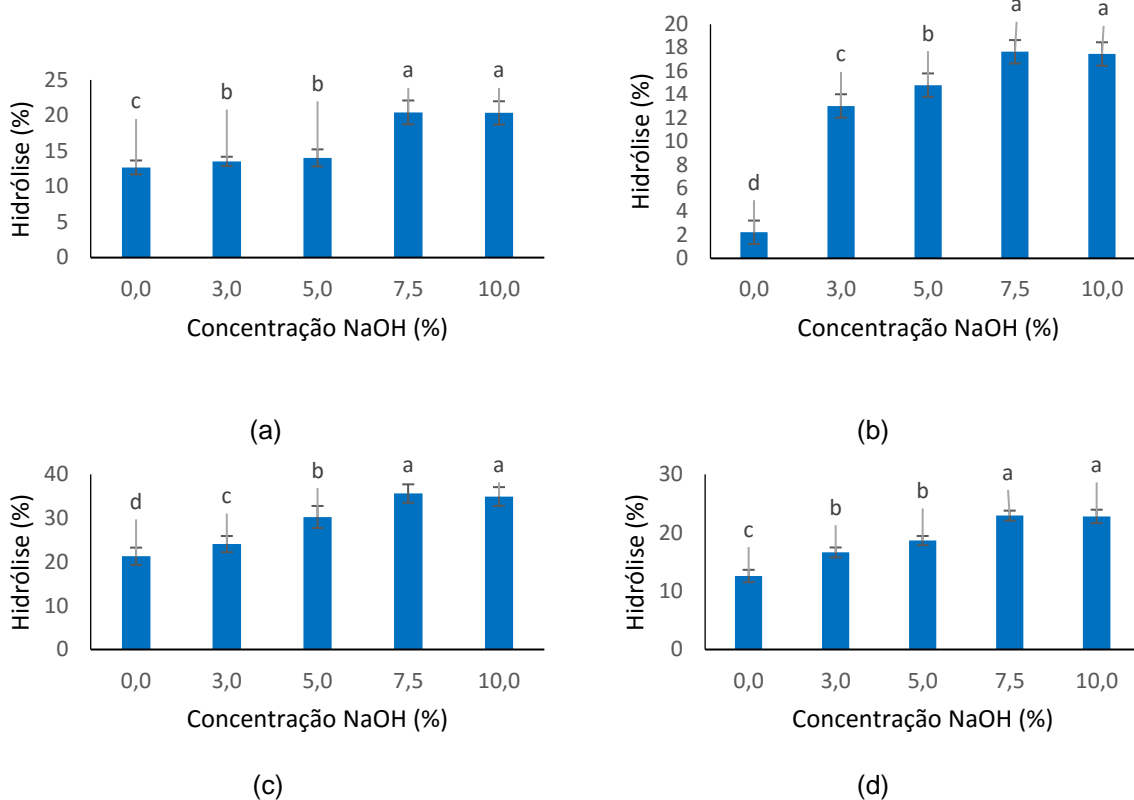
Pré-tratamento	Casca de Arroz		Feno de Tifton 85	
	Celulase	Pectinase	Celulase	Pectinase
<b>Sem pré-tratamento</b>	12,69 <sup>c</sup> ± 0,98	2,23 <sup>d</sup> ± 0,15	21,30 <sup>d</sup> ± 1,97	12,60 <sup>c</sup> ± 1,05
<b>3% de NaOH</b>	13,54 <sup>b</sup> ± 0,65	13,02 <sup>c</sup> ± 0,87	24,08 <sup>c</sup> ± 1,85	16,63 <sup>b</sup> ± 0,85
<b>5% de NaOH</b>	14,03 <sup>b</sup> ± 1,20	14,80 <sup>b</sup> ± 0,78	30,27 <sup>b</sup> ± 2,52	18,66 <sup>b</sup> ± 0,79
<b>7,5% de NaOH</b>	20,43 <sup>a</sup> ± 1,68	17,65 <sup>a</sup> ± 1,06	35,63 <sup>a</sup> ± 2,10	22,93 <sup>a</sup> ± 0,86
<b>10% de NaOH</b>	20,36 <sup>a</sup> ± 1,64	17,46 <sup>a</sup> ± 1,19	34,95 <sup>a</sup> ± 2,14	22,80 <sup>a</sup> ± 1,15

\*Variáveis independentes fixas temperatura: 45°C, quantidade de enzima: 5 mL (diluição 1:50 para celulase). Casca de arroz para celulase: tempo de reação: 10 h, agitação: 300 rpm. Casca de arroz para pectinase: tempo de reação: 10 h, agitação: 200 rpm. Feno de Tifton 85 para celulase: tempo de reação: 12 h, agitação: 150 rpm. Feno de Tifton 85 para pectinase: tempo de reação 14 h, agitação: 350 rpm.

Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 95 % de probabilidade.

A Figura 19 ilustra os resultados de hidrólise da casca de arroz e feno de Tifton 85 tratados e não tratados com NaOH e hidrolisados com o emprego das enzimas celulase e pectinase comerciais.

Figura 19 - Hidrólise de casca de arroz com celulase (a) e pectinase (b) e feno de Tifton 85 com celulase (c) e pectinase (d), moídos em granulometria de 0,5 mm, sem pré-tratamento alcalino e tratados com NaOH (3, 5, 7,5 e 10%) em temperatura de 100°C por 90 minutos.



A Figura 19 (a) demonstra que os maiores percentuais de hidrólise de casca de arroz (20,43%) ocorrem na concentração de 7,5 % de NaOH ao empregar celulase (a) e pectinase comercial (b) (17,65%) não diferindo significativamente da concentração de 10 %.

Para feno de Tifton 85 pode-se ver na Figura 19 (c e d) que os maiores percentuais de hidrólise, 35,63% e 22,93%, ocorrem na concentração de 7,5 % de NaOH com celulase e pectinase, respectivamente, não diferindo significativamente da concentração de 10 %.

Ao se comparar os resultados de hidrólise com a casca de arroz e o feno de Tifton 85 sem pré-tratamento com NaOH (Tabela 21), os resíduos submetidos à pré-tratamento apresentaram hidrólises superiores, mesmo que tenham sido recuperados, após o pré-tratamento, 61,58 e 74,95 % do material tratado com NaOH 7,5%, para casca de arroz e feno de Tifton 85, respectivamente.

O complexo lignocelulósico é composto de uma matriz de celulose e lignina ligada por correntes de hemicelulose. Faz-se pré-tratamento para quebrar tal matriz,

afim de reduzir o grau de cristalinidade da celulose e aumentar a fração de celulose amorfa que é a forma mais apropriada para o ataque enzimático (FARRELL et al., 2006, SANCHEZ & CARDONA, 2008; TAHERZADEH & KARIMI, 2008).

Segundo Rabelo (2007), o pré-tratamento resulta na ampliação da área superficial interna das partículas do substrato, realizada através da solubilização e/ou pela degradação parcial da hemicelulose e da lignina. Isto leva ao fracionamento dos três componentes e promovendo à abertura da estrutura da celulose. Portanto, um ou mais fatores citados podem ter sido responsáveis pelos melhores resultados de hidrólise obtidos neste trabalho, após o pré-tratamento.

Analisando-se os resultados deste trabalho, pode-se observar que o tratamento alcalino associado a moagem dos resíduos em 0,5 mm, promoveu melhoria no percentual de hidrólise em todos os substratos lignocelulósicos (CS, CA, SPM e FT), quando empregou-se as enzimas celulase e pectinase comercial. Rojas et al. (2014) utilizando tratamento prévio ácido na hidrólise de casca de soja nas condições de 50 °C, pH 4,8, e 200 rpm com 7 FPU por grama de celulose, obtiveram conversões de cerca de 40% que foram obtidas após 72 h de hidrólise. Considerando tais resultados, a hidrólise obtida com casca de soja, no presente trabalho pode ser considerada muito eficiente.

Menegol et al. (2014) avaliando o potencial de um complexo enzimático de *Penicillium echinulatum* produzido tanto em culturas submersas ou em estado sólido para hidrólise enzimática do capim-elefante em amostras não tratadas e pré-tratadas (3% NaOH) com cinco concentrações diferentes de enzimas (5, 10, 15, 20 e 25 FPA/g de substrato), verificaram que na maior parte das amostras, uma carga mais elevada da enzima liberava mais açúcares redutores. Outras experiências foram realizadas por Menegol et al. (2014), para determinar a concentração ótima de caldo de enzima (5, 10, 15, 20 ou 25 FPA/g de capim-elefante com um 1, 2, 3, 4 ou 5 % de concentração de substrato durante a hidrólise. Para os testes de comparação, complexos enzimáticos de *P. echinulatum* produzidos em culturas em estado sólido ou submersas, foram empregadas em capim-elefante não tratado e pré-tratado com 3% de NaOH. Os melhores resultados em açúcares redutores obtidos a partir da hidrólise enzimática de capim-elefante, ocorreram quando Menegol et al. (2014) utilizaram uma combinação de 2% de substrato e uma carga de enzima de 10 FPA/g de substrato. Em 48 h de hidrólise, as amostras tratadas com 3% e 4% de NaOH mostraram uma liberação semelhante de açúcares redutores, com valores de  $578,91 \pm 11,55$  mg/g e

558,56 ± 41,18 mg/g, respectivamente. Neste caso, foi de 3% de NaOH o melhor pré-tratamento.

Cardona et al. (2014), obtiveram 146,9 mg/g de açúcares redutores, com capim-elefante pré-tratado com NaOH a 1%, após 45 h de hidrólise enzimática. Após este resultado, os autores otimizaram o pré-tratamento alcalino e alcançaram a maior quantidade de açúcares redutores de capim-elefante (711,2 mg/g) em condições de pré-tratamento de 100 C, 2 h, 1,5 % de NaOH com relação sólido/líquido de 1 g de material por 17,5 mL de solução.

Conforme Gupta (2008), a degradação de carboidratos é um grande problema que afeta o rendimento da hidrólise enzimática. Ferreira et al. (2006), citados por Fasanella (2008), relatam que o tratamento com hidróxido de sódio retira parcialmente a lignina e solubiliza a hemicelulose. Segundo Chang et al. (2002), o principal efeito do pré-tratamento com hidróxido de sódio é a remoção da lignina da biomassa, melhorando assim a reatividade dos polissacarídeos restantes. Os autores afirmam que este pré-tratamento remove os grupos acetil e a adição de ar/oxigênio à mistura reacional melhora a deslignificação da biomassa, especialmente para materiais altamente lignificados como a madeira.

O trabalho de Mendes et al. (2011) avaliou o efeito do tratamento alcalino na deslignificação do bagaço de cana para a subsequente sacarificação enzimática. O uso de tratamento alcalino (NaOH) promoveu remoção de 33% da lignina inicial, e de 13% da hemicelulose. O rendimento de hidrólise obtido foi da ordem de 50%, alcançado na hidrólise do substrato pré-tratado em condições alcalinas.

Em experimento onde foram aplicados NaOH e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em bagaço de cana, palha de milho e palha de trigo, Aguiar (2010) comparou os resultados dos teores de celulose e lignina para os dois tratamentos e observou que com NaOH foi mais efetivo na disponibilidade da celulose, já que o aumento do teor de celulose e a redução do teor de lignina foram mais significativos em todos os resíduos do que com o tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Tal resultado corrobora a decisão de aplicação de NaOH no presente trabalho.

Vieira et al. (2014) realizaram ensaios de hidrólises enzimáticas, com 16,7 g/L de substrato, utilizando 1,0 e 2,0 mL da enzima comercial celulase de *Aspergillus niger*, em tampão acetato com pH 4,5. As amostras foram colocadas em Shaker, à 50 °C durante 48 e 72 horas e logo em seguida foi realizada análise dos açúcares redutores (AR) para cada ensaio. Antes da hidrólise enzimática foi realizada a

deslignificação do sabugo e palha do milho, em pré-tratamento por explosão a vapor, por meio de um reator do tipo autoclave. A melhor condição encontrada para os dois resíduos foi 48 horas de hidrólise e 1,0 mL da enzima comercial, obtendo-se 0,14 g e 0,07 g de AR por grama de palha e sabugo hidrolisados, respectivamente.

Santos et al. (2014), realizaram pré-tratamento e hidrólise, com a enzima Accellerase 1500, em sabugo de milho. Os fatores avaliados foram: tempo, temperatura e concentração de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, com respostas de acidez e açúcares redutores totais (ART). Os maiores teores de ART foram dados nos ensaios à 120°C, 15 min, 0,5% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e à 110°C, 7 min, 2% de ácido: 42,6% e 61,5% de ART, respectivamente.

Em trabalho realizado por Lucarini et al. (2014) comparando a deslignificação por peróxido de hidrogênio alcalino seguida de hidrólise enzimática para o sabugo de milho, foram testados 2, 5 e 10% de peróxido de hidrogênio alcalino. Após a deslignificação a 2%, houve redução de 51,8% da lignina do sabugo de milho. A hidrólise enzimática foi realizada utilizando-se celulase obtida por fermentação semi-sólida de *Aspergillus niger*. Com os resultados experimentais os autores realizaram o balanço de massa e obtiveram, a partir de uma tonelada de biomassa *in natura*, após deslignificação e hidrólise, 2,1 kg de glicose na hidrólise do sabugo de milho com o extrato celulolítico de *Aspergillus niger*.

Vancov & McIntosh (2011), em estudos sobre o pré-tratamento alcalino de resíduos de cereais (sorgo e trigo), verificaram que a hidrólise enzimática da celulose correspondia a um aumento da temperatura de pré-tratamento, tempo de residência e a concentração de álcali. A temperatura que produziu os rendimentos mais elevados de glicose (540 e 567 mg/g, respectivamente) para o sorgo e trigo palha foi de 121° C por 90 min em 2% NaOH.

Kim & Kim (2014) compararam vários pré-tratamentos alcalinos para várias biomassas e observaram que a digestibilidade enzimática de casca de arroz e cevada que tinham sido pré-tratadas por imersão em soluções aquosas com amoníaco era 85 e 95%, respectivamente.

Devido à insolubilidade do material lignocelulósico em água, as reações heterogêneas envolvidas no processo de sacarificação requerem um contato físico direto entre enzimas e substrato (CHANG & HOLTZAPPLE, 2000). Com isso, a hidrólise enzimática acontece em três etapas: adsorção das enzimas na superfície da celulose, clivagem das ligações glicosídicas e por fim a desorção das enzimas (CHUNDAWAT et al., 2011) que é uma das etapas mais importantes na hidrólise de

substratos lignocelulósicos. A hidrólise sofre influência da distribuição de lignina. Ligações improdutivas das celulasas à lignina limitam o acesso das mesmas ao substrato polissacarídico, impedindo assim sua ação sobre a celulose (MANSFIELD; MOONEY & SADDLER, 1999; RAHIKAINEN et al., 2011). Resultados de trabalhos (BERLIN e al., 2005; NAKAGAME et al., 2010) indicam ainda que interações com compostos derivados da degradação da lignina podem causar a inibição das celulasas. No entanto Nakagame et al. (2010) afirmam que os mecanismos da inibição por derivados da lignina não estão completamente elucidados.

Zhang & Lynd (2004) reportam que mesmo havendo resultados conflitantes relacionados ao índice de cristalinidade, o mesmo é um aspecto importantíssimo na elevação do rendimento da hidrólise enzimática. Pitarelo (2007) relata que o álcali tende a reduzir o índice de cristalinidade da cadeia de celulose.

Tanto a hemicelulose quanto a lignina formam uma barreira física contra o ataque enzimático à celulose, sendo a lignina um dos principais fatores que limitam a hidrólise enzimática da celulose (BERLIN et al., 2005), pois as celulasas adsorvem irreversivelmente à superfície da lignina permitindo apenas que pequenas quantidades destas enzimas sejam adsorvidas na celulose (MANSFIELD, MOONEY & SADDLER, 1999; PALONEN et al., 2004).

Conforme Chang et al., (2002), o principal efeito do pré-tratamento com hidróxido é a remoção da lignina da biomassa, melhorando assim a reatividade dos polissacarídeos restantes.

Nascimento (2011) reporta que usando pré-tratamento com NaOH na faixa de 1-7%, na condição de 7% NaOH por 30 minutos, ocorreu a maior deslignificação, resultando em torno de 5% de lignina na biomassa, o maior teor de celulose em torno de 38% e a menor perda de celulose em torno de 2%, garantindo assim um alto conteúdo acessível de celulose para a degradação enzimática, com uma conversão em torno de 75,5% de hidrólise do bagaço de cana. Os resultados de Nascimento (2011) foram superiores aos encontrados neste trabalho que necessitou de 7,5 % de NaOH para alcançar os maiores níveis de hidrólise dos substratos avaliados.

Kahar (2013) relata que o inchaço da celulose de casca de arroz combinado com a deslignificação por tratamento com cloreto de sódio e bicarbonato de sódio resultou em maior eficiência de sacarificação enzimática do que casca de arroz submetido apenas à deslignificação. Ishizawa et al. (2009) reportam que a remoção completa ou quase completa de xilana e lignina pode gerar agregação das

microfibrilas de celulose, resultando em menor acessibilidade da celulase e mais baixa eficiência de hidrólise.

O tratamento alcalino, além de promover a redução da lignina da estrutura, atua reduzindo o grau de polimerização da cadeia de celulose (GUPTA, 2008), o que pode ter sido decisivo para a obtenção dos melhores resultados na hidrólise dos resíduos pré-tratados deste trabalho.

Conforme Pitarelo (2007) a celulose amorfa, por causa da sua maior área superficial, é mais suscetível à hidrólise enzimática. Fasanella (2008) verificou que o bagaço de cana tratado com solução de NaOH 4% causou poucas mudanças na área superficial e na quebra das fibras. Esta condição vem ao encontro dos resultados alcançados com as menores concentrações de NaOH deste trabalho que não diferiram dos ensaios sem pré-tratamento.

No trabalho de Aguiar (2010), o autor cita que o tratamento com  $H_2O_2$  pode ter extraído uma fração menor de hemiceluloses do que o tratamento com NaOH. Tal resultado confirma a escolha do NaOH como pré-tratamento mais eficaz no presente trabalho.

Pietrobon (2008), em estudo onde o bagaço de cana-de-açúcar foi tratado com álcali, menciona que apesar de não ter ocorrido redução no teor de lignina o pré-tratamento é necessário, pois, além de facilitar o acesso das enzimas às fibras de celulose, promove modificações na cristalinidade das mesmas. Aguiar & Menezes (2000) conduziram experimento empregando o pré-tratamento com NaOH 4% a 121°C por 30 minutos em bagaço de cana e observaram redução da lignina de 24,5% para 10,7%. O teor de celulose aumentou de 37% para 60,5%. Fasanella (2008) realizou tratamento de bagaço de cana com NaOH 4% a temperatura de 121°C por 20 minutos com posterior incubação do material por 12 horas, e obteve redução do teor de lignina do bagaço de 10,44% para 8,26% e redução do teor de celulose de 54,55% para 48,57%.

O trabalho de Mendes et al. (2011), avaliou o efeito do tratamento alcalino na deslignificação do bagaço de cana para a subsequente sacarificação enzimática. O uso de tratamento alcalino (NaOH) promoveu remoção de 33% da lignina inicial, e de 13% da hemicelulose. O rendimento de hidrólise obtido foi da ordem de 50%, alcançado na hidrólise do substrato pré-tratado em condições alcalinas.

O ideal é que não haja degradação da celulose, porém, como a lignina está ligada às hemiceluloses, uma degradação parcial das hemiceluloses ocorre durante o



processo de pré-tratamento, e dependendo das condições empregadas, a celulose pode também ser degradada (SILVA, 2011).

Mielenz et al. (2009), alcançaram rendimentos elevados de sacarificação da casca de soja, sem pré-tratamento (devido ao baixo conteúdo de lignina). No entanto, o tempo de fermentação foi muito longo (cerca de 9 dias), para assegurar a conversão quase completa de celobiose.

No trabalho realizado por Jeya et al. (2009) foi realizada a sacarificação da casca de arroz pré-tratada com álcali (NaOH) com o uso de celulases produzidas por uma cepa de *Trametes hirsuta*. A composição química do material pré-tratado era de 52,2% de celulose, 18% hemicelulose e 9,8% de lignina. Um estudo inicial da hidrólise foi realizado com uma concentração de 20 FPU de celulases por grama de casca de arroz pré-tratada, a uma temperatura de 37°C e em pH 5,0. Nessas condições foi alcançado um rendimento de açúcares redutores de 70 %, em 48 horas. Em outro ensaio de sacarificação da casca de arroz pré-tratada os mesmos autores utilizaram uma carga de enzimas de 30 FPU por grama de resíduo pré-tratado, à temperatura de 35°C e pH de 5,2, e alcançaram um rendimento de açúcares redutores de 88% em 48 horas. Os rendimentos de sacarificação, obtidos neste trabalho com celulases comerciais, foram inferiores aos obtidos por Jeya et al. (2009), para casca de arroz. Contudo, apesar dos altos rendimentos de hidrólise evidenciados com uso de celulases produzidas por *T. hirsuta*, elevada carga de enzimas foi necessária na sacarificação do substrato. Assim, uma comparação dos rendimentos de hidrólise obtidos com celulases de *T. hirsuta* e com celulases comerciais (por exemplo, de *Aspergillus niger*) só pode ser realizada em experimentos de hidrólises com parâmetros similares de reação.

A deslignificação de resíduos agrícolas, melhora o rendimento de açúcares redutores. Em trabalho de Singh & Sharma (1984), na temperatura 50 °C, com a proporção líquido-sólido de 12:1, tamanho de partícula inferior a 417 micrometros para a hidrólise e tempo de aquecimento de 3 horas a 100 °C, após a diluição com 3 volumes de água, foram consideradas as condições ideais para a hidrólise do bagaço de cana e palha de arroz. Sob estas condições, a sacarificação atingida foi de 78 e 74,5% para bagaço e casca de arroz deslignificadas com NaOH 7,5, 58 e 49,5% para o bagaço e casca de arroz sem tratamento.

Vários trabalhos abordam a importância da redução do conteúdo de lignina na taxa de hidrólise de materiais lignocelulósicos pré-tratados (BERLIN et al., 2005;

MUSSATO et al., 2008; RAHIKAINEN et al., 2011; MENDES et al., 2011). Como evidenciado por Mendes et al. (2011), a biomassa lignocelulósica submetida a distintas severidades de tratamentos apresentam diferentes rendimentos de hidrólise enzimática. Isso está relacionado ao teor de lignina e hemicelulose residual presentes nesses materiais, já que esses componentes lignocelulósicos apresentam-se como uma barreira limitante ao acesso das celulasas à celulose, reduzindo dessa forma, a eficiência da sacarificação.

Diante de tais limitações no processo de hidrólise enzimática, empresas produtoras de celulasas focam suas pesquisas no desenvolvimento de coquetéis enzimáticos específicos para sacarificação da biomassa lignocelulósica (GUSAKOV, 2011; SINGHANIA et al., 2010). Neste contexto, é justificável o estudo de tais enzimas com o propósito de se desenvolver novas formulações enzimáticas para uso em processos de sacarificação da biomassa lignocelulósica.

Fan et al. (1982) e Gharpuray (1983), citados por Rabelo (2007), mencionam que os pré-tratamentos químicos têm recebido maior atenção, já que os pré-tratamentos físicos são relativamente ineficientes no aumento da digestibilidade da biomassa e os tratamentos combinados raramente têm digestibilidade melhorada quando comparados aos tratamentos simples.

Segundo Rabelo (2007), o pré-tratamento resulta na ampliação da área superficial interna das partículas do substrato, realizada através da solubilização e/ou pela degradação parcial da hemicelulose e da lignina. Isto conduz ao fracionamento dos três componentes e leva à abertura da estrutura da celulose. Esta mudança na composição da maioria dos substratos ocorre devido ao processo de tratamento, o qual promove a redução das frações hemicelulose e lignina (FASANELLA, 2008), aumentando o teor de celulose no substrato (AGUIAR & MENEZES, 2000). Portanto, um ou mais fatores citados acima podem ter sido responsáveis pelos melhores resultados alcançados neste trabalho com o pré-tratamento alcalino.

Gupta (2008), cita que durante o pré-tratamento com NaOH, a degradação de carboidratos é um grande problema que afeta o rendimento da hidrólise enzimática.

Apesar de resultados conflitantes em estudos relacionados ao índice de cristalinidade, citados por Zhang & Lynd (2004), alguns autores afirmam que o índice de cristalinidade é um fator importantíssimo na elevação do rendimento da hidrólise enzimática. Para Gómez (1985), os pré-tratamentos alcalinos rompem a estrutura cristalina da celulose, abrindo a estrutura para a ação das enzimas. Segundo Rabelo

(2007), o pré-tratamento resulta na ampliação da área superficial interna das partículas do substrato, conduzindo ao fracionamento dos três componentes e levando à abertura da estrutura da celulose. Pitarelo (2007) afirma que o álcali tende a reduzir o índice de cristalinidade da cadeia de celulose.

Segundo Gupta (2008), o tratamento alcalino, além de promover a redução da lignina da estrutura, é responsável pela redução do grau de polimerização da cadeia de celulose, o que pode conduzir a melhores resultados na hidrólise.

De acordo com Pitarelo (2007) a celulose amorfa, devido à sua maior área superficial, é mais suscetível à hidrólise enzimática. Fasanella (2008) verificou que o bagaço de cana tratado com solução de NaOH 4% causou poucas mudanças na área superficial e na quebra das fibras. Possivelmente o tratamento realizado neste trabalho (3% de NaOH) não tenha sido suficiente para promover uma maior hidrólise da celulose, devido principalmente ao alto teor de lignina dos resíduos avaliados (CA, SPM e FT).

Gómez (1985) reporta melhores rendimentos de hidrólise em frações de bagaço de cana-de-açúcar com maiores teores de lignina, mas com altos teores de hemicelulose. Ferreira et al. (2006), citados por Fasanella (2008), afirmam que o tratamento com hidróxido de sódio retira parcialmente a lignina e solubiliza a hemicelulose.

A lignina não precisa ser completamente removida para aumentar a digestibilidade da celulose, já que apresenta maior efeito negativo quando está “blindando” as microfibrilas da mesma (EPOBIO, 2006 citado por RABELO (2007)). Para efeito de comparação, após tratamento de bagaço de cana com NaOH 4% a 121°C por 30 minutos, Aguiar & Menezes (2000) obtiveram resultados de lignina reduzidos de 24,5% para 10,7%. O teor de celulose aumentou de 37% para 60,5%.

Krishna et al. (1998), citados por Rabelo (2007), analisaram três tipos de pré-tratamento para o bagaço de cana-de-açúcar: autoclavagem por 20 min a 15 psi, tratamento alcalino (NaOH 1%) e peróxido de hidrogênio alcalino (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + NaOH, 1%). A hidrólise enzimática do bagaço após pré-tratamento com o peróxido de hidrogênio alcalino mostrou-se superior em relação ao bagaço pré-tratado por autoclavagem e com o hidróxido de sódio.

Ja'afaru & Fagade (2007) realizaram estudo de produção de celulases e hidrólise enzimática de resíduos lignocelulósicos utilizando celulase de *Aspergillus niger*, no qual resíduos lignocelulósicos como sabugo de milho, serragem e casca de

amendoim pré-tratados com NaOH 0,25M a vapor, apresentaram melhores rendimentos na sacarificação do que o papel filtro.

Trabalhando com soqueira de algodão, na relação sólido/líquido 10% (w/v), com pré-tratamento com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NaOH, e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas concentrações de 0,5%, 1% e 2% (m/v), nas temperaturas de 90 °C e 121 °C com 15 psi, com tempos de 30, 60, e 90 min, Silverstein et al. (2007), verificaram que o NaOH resultou no maior nível de deslignificação (65,63 %) na condição de 2% de NaOH, 90 minutos, 121°C/15 psi. A conversão de celulose em glicose foi de 60,8%.

Playne (1984) trabalhou com bagaço de cana e álcali por 192 horas em temperatura ambiente, e observaram aumento da digestibilidade da celulose de 20 para 72% após o pré-tratamento.

Xu et al. (2010) trabalharam com gramíneas aplicando NaOH nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 % (massa, volume), temperatura de 121, 50 e 21°C, relação sólido-líquido: de 0,1g/mL e enzima Cellulase 15 FPU/g de biomassa seca e cellobiase, 20 CBU/g de biomassa seca. A melhor condição foi em 50°C, 12 h, e 1,0 % de NaOH. A redução da lignina foi de 85,8% para 121°C, 77,8% para 50°C e 62,9% com 21°C. Na hidrólise enzimática atingiram 453 mg de açúcares redutores totais por g de biomassa bruta (3,78 vezes maior que a biomassa não tratada).

Em trabalho de Kim et al. (2006) usando palha de milho com 0,5 g de Ca(OH)<sub>2</sub>/g de biomassa em condições oxidativas e não oxidativas a 25, 35, 45 e 55°C, os autores observaram diminuição da cristalinidade com a retirada da lignina, deslignificação de 60%, remoção e solubilização de lignina e hemicelulose, não ocorrendo degradação de celulose entre 25- 55°C.

#### **4.4.CARACTERIZAÇÃO DOS RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS ANTES E APÓS A HIDRÓLISE ENZIMÁTICA**

Com a finalidade de avaliar a composição centesimal dos resíduos lignocelulósicos antes e após o emprego das enzimas celulase e pectinase, comerciais e não comerciais, efetuou-se a determinação da fibra em detergente neutro (FDN g/100 g (bs)), fibra em detergente ácido (FDA g/100 g (bs)), nutrientes digestíveis totais (NDT g/100 g (bs)) e extrativos não-nitrogenados (ENN g/100 g (bs)), os resultados estão apresentados na Tabela 22. Foram analisados os quatro substratos lignocelulósicos (CS, CA, SPM e FT) com e sem o emprego das enzimas

celulase comercial (CC), celulase não comercial (CNC), pectinase comercial (PC) e pectinase não comercial (PNC).

As análises bromatológicas apontaram que em todos os substratos avaliados (CS, CA, SPM e FT), a fibra em detergente neutro (FDN) e a fibra em detergente ácido (FDA) reduziram com o emprego de todas as enzimas (CC, CNC, PC e PNC). Tal resultado é considerado positivo, pois quanto menor o percentual de FDN, que é a fração nutricional correspondente a soma de hemicelulose, celulose e lignina, melhor é o valor nutricional do alimento.

Para a casca de soja, tanto a FDN, quanto a FDA diminuíram com o tratamento enzimático, apresentando os melhores resultados com a enzima pectinase comercial (PC) e não comercial (PNC). Conforme Ipharraguerre & Clark (2003) a boa degradação da FDN apresentada pelas rações contendo casca do grão de soja decorre da composição química desse alimento, que contém alto teor de celulose e hemicelulose e baixo teor lignina.

Tabela 22 - Composição centesimal dos resíduos lignocelulósicos antes e após o emprego das enzimas celulase e pectinase, comerciais e não comerciais.

TRATAMENTO	FDN g/100 g (bs)	%	FDA g/100 g (bs)	%	NDT g/100 g (bs)	%	ENN g/100 g (bs)	%
<b>CS</b>	<b>76,28</b>		<b>53,75</b>		<b>29,54</b>		<b>43,38</b>	
CS + CC	60,36	(20,87)	46,16	(14,12)	35,67	20,75	46,61	7,45
CS + CNC	61,54	(19,32)	48,43	(9,89)	34,52	16,86	44,09	1,63
CS + PC	59,26	(22,31)	41,47	(22,84)	37,1	26,3	47,54	9,59
CS+ PNC	67,01	(12,15)	43,35	(19,35)	33,18	12,32	43,98	1,38
<b>CA</b>	<b>92,62</b>		<b>70,48</b>		<b>19,21</b>		<b>28,13</b>	
CA + CC	65,14	(29,67)	38,64	(45,18)	31,11	61,94	47,7	69,57
CA + CNC	79,85	(13,79)	61,08	(13,34)	21,12	9,94	32,44	15,32
CA + PC	75,05	(18,97)	59,65	(15,37)	24,35	26,75	35,92	27,69
CA + PNC	78,75	(14,98)	62,49	(11,34)	20,58	7,13	31,24	11,05
<b>SPM</b>	<b>81,36</b>		<b>49,6</b>		<b>53,12</b>		<b>46,93</b>	
SPM + CC	64,37	(20,88)	41,18	(16,98)	73,01	37,44	71,33	51,99
SPM + CNC	67,87	(16,58)	42,33	(14,66)	61,01	14,85	53,28	13,53
SPM + PC	64,55	(20,66)	40,87	(17,60)	63,58	19,69	68,93	46,88
SPM + PNC	69,52	(14,55)	43,34	(12,62)	61,00	14,83	52,98	12,89
<b>FT</b>	<b>68,13</b>		<b>33,71</b>		<b>64,24</b>		<b>55,68</b>	
FT + CC	53,98	(20,77)	29,06	(13,79)	67,70	5,38	62,97	13,10
FT + CNC	57,84	(15,10)	30,98	(8,09)	65,53	2,01	58,89	5,77
FT + PC	54,79	(19,58)	28,72	(14,80)	69,78	8,62	60,12	7,97
FT + PNC	60,56	(11,11)	31,02	(7,98)	65,13	1,39	57,27	2,85

Para casca de arroz o emprego das enzimas reduziram a FDN e a FDA, destacando-se o resultado alcançado com a enzima celulase comercial (CC). As análises, para sabugo/palha de milho, demonstraram que o emprego das enzimas reduziram os percentuais de FDN e FDA, com valores de aproximadamente 20 e 17%, respectivamente, menores do que o resíduo não tratado, para as enzimas celulase e pectinase comerciais. Com sabugo/palha de milho (SPM), para as demais enzimas (CNC e PNC), os percentuais de redução de FDN e FDA foram menores. O feno de Tifton 85 (FT) apresentou comportamento semelhante ao SPM, para FDN, com redução de aproximadamente 20 % com o emprego das enzimas CC e PC. Já, para FDA o feno de Tifton 85 apresentou redução de aproximadamente 14%, com as referidas enzimas. Com as enzimas não comerciais o FT teve seus percentuais de FDA reduzidos em apenas 8%.

Conforme Mandebvu (1998), a digestibilidade *in vitro* da matéria seca de feno de Tifton 85 (FT) do primeiro corte, com 3,5 semanas de descanso, foi de 63,6% e do segundo corte, realizado, 3,5 semanas após o primeiro (59,9%) foi semelhante, e maior do que para FT colhido após 7 semanas de crescimento (48,7%) ou para uma outra gramínea de bermuda colhida após 4 semanas de crescimento (52,0%). Os autores reportam também que a digestão de FDN *in vitro* em 72 h de incubação para FT colhidas no primeiro corte (74,5%) foi semelhante ao de 3,5 semanas FT (67,4%), mas mais elevada do que a outra gramínea de bermuda (63,7%) ou FT com 7 semanas (53,7%).

Para determinar a fibra em detergente neutro e a fibra em detergente ácido considera-se o método de “Van Soest”, proposto por Van Soest (1967) que consiste na solubilidade de frações em solução detergente. O método caracteriza melhor a fração carboidratos (CHO) do alimento, principalmente a fibra e é indicado para avaliação de alimentos para ruminantes. Conforme o autor, a fibra em detergente neutro - FDN insolúvel = Celulose + Hemicelulose + Lignina (CHO estrut) 2- Fibra em detergente ácido - FDA insolúvel = celulose + lignina.

Mertens (1992) e Resende et al. (1995) observaram que a fibra em detergente neutro é o melhor indicador para a estimativa do potencial de consumo dos alimentos em animais ruminantes, querendo dizer que o menor percentual de FDN, aumenta o consumo dos alimentos. Já Rodrigues et al. (1996), não verificaram diferenças estatísticas no consumo de matéria seca entre bubalinos e bovinos (Nelores e Holandeses) alimentados com rações contendo diferentes níveis de FDN. Outra

(1996), trabalhando com rações de alta e baixa fibra (57,2 vs 38,7%), verificou maior ingestão de matéria seca para rações com baixa fibra, encontrando valores de 1,78 e 2,3% PV, respectivamente. Quanto à ingestão de FDN, este autor não encontrou diferenças entre as dietas, concluindo que, possivelmente, a ingestão tenha sido limitada pelo enchimento do trato gastrintestinal.

Os resultados da análise bromatológica (Tabela 22) demonstram que o emprego das enzimas, celulase e pectinase, melhorou os percentuais de nutrientes digestíveis totais (NDT) e de extrativos não nitrogenados (ENN) de todos os resíduos avaliados (CS, CA, SPM e FT), principalmente quando empregou-se as enzimas celulase e pectinase comerciais. Destacam-se os resultados de NDT e ENN obtidos com o emprego da enzima celulase comercial em casca de arroz e sabugo/palha de milho que apresentaram percentuais melhores de 61,94, e 69,57 % (CA) e de 37,44 e 51,99 % (SPM), respectivamente.

Segundo o NRC (2001), o NDT não tem vantagens particulares ou desvantagens sobre a ED, podendo ser utilizado para descrever valores de necessidades energéticas do animal. O NDT pode ser convertido para ED pela equação: 1 kg NDT = 4,4 Mcal ED. Segundo Valadares Filho (2000), grande parte da avaliação energética dos alimentos se baseia no NDT e que os cálculos de energia líquida (EL) são estimados a partir do NDT ou energia metabolizável (EM), oriunda também do NDT, o que faz com que o NDT possa ser considerado, no momento, como unidade possível de ser utilizada para formulação de rações.

O NDT (nutrientes digestíveis totais) é um dos modos mais empregados de expressão de energia para avaliação de alimentos na nutrição de ruminantes. Muitos componentes químicos são relacionados à concentração de energia disponível, sendo que os constituintes comumente avaliados são: proteína bruta digestível, extrato etéreo digestível, fibra em detergente neutro digestível (corrigida para cinzas e proteína) e carboidratos não fibrosos digestíveis (ROCHA JUNIOR et al., 2003).

Para obtenção dos valores dos ENN é realizado o seguinte cálculo:  $ENN = 100 - (\% \text{ umidade} + \% \text{ PB} + \% \text{ FB} + \% \text{ EE} + \% \text{ MM})$ . A determinação do ENN, por seu cálculo, se ressentir de todas as imprecisões pessoais e imperfeições inerentes às outras determinações laboratoriais, ou seja, acumula todos os erros que por ventura foram cometidos (SILVA & QUEIROZ, 2009).

Segundo Teixeira (2003), cerca de 75% da energia provém dos carboidratos, sendo que, para os herbívoros, 25% são extrativos não nitrogenados e o restante fibra

bruta. Os extrativos não nitrogenados da dieta são constituídos pelos açúcares e amido dos alimentos. A divisão dos carboidratos do alimento em fibra bruta e extratos não nitrogenados, pelas análises comuns realizadas em laboratórios, é bastante empírica. Dependendo do tipo de alimento, uma parte da lignina e da celulose podem estar presentes nos extrativos não nitrogenados. A lignina é de natureza puramente estrutural e, se presente nos extrativos não nitrogenados, diminui seu potencial energético. Os ENN são obtidos por meio de cálculos e são constituídos pelos açúcares, amidos, dextrinas, hemiceluloses, e variavelmente lignina. Essa fração do esquema de Weende corresponde predominantemente aos carboidratos mais digestíveis, ou como se diz comumente, “carboidratos solúveis” (PEIXOTO & MAIER, 1993). Na maioria dos vegetais, com exceção das sementes oleaginosas, o carboidrato é em geral o principal componente. Na análise proximal dos alimentos, a fração carboidrato é representada por açúcares solúveis (extrativo não nitrogenado) e fibra bruta que representa os carboidratos estruturais (BERTECHINI, 2006).



## 5. CONCLUSÕES

Considerando a hidrólise de casca de soja, sabugo/palha de milho, casca de arroz e feno de Tifton 85 empregando celulases e pectinases comerciais e não comerciais, conclui-se que:

- As cinéticas de hidrólise com celulase e pectinase comerciais e não comerciais demonstraram diferentes tempos para casca de soja e sabugo/palha de milho, apontando que cinética de tempo muito curtos não são suficientes para a degradação tanto da fração amorfa como da fração cristalina da celulose. Já, para casca de arroz e feno de Tifton 85, os tempos ótimos de hidrólise foram menores.

- Os maiores valores de hidrólise com a enzima celulase comercial foram obtidos quando utilizou-se a diluição de 1:50 (m:v enzima:água) para todos os substratos, apontando que as maiores concentrações de enzima geram hidrólise mais eficiente.

- Os maiores valores de hidrólise foram observados quando empregou-se celulases e pectinases comerciais e não comerciais a 45°C. Os maiores percentuais de hidrólise em agitação de 300 rpm revelam importância da agitação para a eficiência da hidrólise da casca de soja e casca de arroz. Para sabugo/palha de milho foi necessário 350 rpm e para o feno de Tifton 85 a agitação de 150 rpm promoveu o maior percentual de hidrólise com a enzima celulase.

- A combinação das duas enzimas comerciais (celulases e pectinases) em comparação as hidrólises obtidas quando aplicou-se as enzimas separadamente, não melhorou a hidrólise dos substratos avaliados.

- A hidrólise da enzima celulase não comercial foi baixa quando comparado a hidrólise dos substratos com enzima celulase comercial.

- A moagem isoladamente não melhorou a hidrólise dos substratos lignocelulósicos. Porém, quando a moagem foi associada ao pré tratamento com NaOH a hidrólise foi incrementada de maneira importante para todos os substratos avaliados.

- Os resultados bromatológicos dos resíduos tratados enzimaticamente, apontaram melhoria nos parâmetros fibra em detergente neutro, fibra em detergente ácido, nutrientes digestíveis totais e extrativos não nitrogenados com celulase e pectinase tanto comerciais como não comerciais.

- As enzimas pectinase comercial e não comercial podem ser aplicadas em casca de soja quando se visa melhorar a qualidade deste resíduo para alimentação animal. As enzimas celulase e pectinase comerciais são as mais indicadas para tratar sabugo/palha de milho. Os melhores resultados, para a casca de arroz, revelam a eficiência, principalmente da enzima celulase comercial. Quando tratado com celulase e pectinase comercial, o feno de Tifton 85 (FT), pode ter um interessante incremento na qualidade visando a alimentação animal. Desta forma, o emprego das enzimas celulase e pectinase comercial revelaram ser mais eficientes na hidrólise dos substratos avaliados.

## 6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Como perspectiva futura, sugere-se:

- Avaliar a utilização dos resíduos tratados enzimaticamente na composição de dietas para ruminantes.

- Avaliar outros pré- tratamentos físicos (ex. micro-ondas), físico-químico (ex. autohidrólise), químicos (ex. ácidos, agentes oxidantes), biológicos, elétricos e a combinação deles no desempenho e enzimas celulasas e pectinases sobre resíduos lignocelulósicos.

- Utilizar outros resíduos provenientes da agricultura, como por exemplo as palhas de trigo, de aveia e cevada, para serem tratados enzimaticamente com celulasas e pectinases.

- Empregar enzimas obtidas de outros micro-organismos, como por exemplo bactérias anaeróbicas e aeróbicas, actinomicetos, plantas e animais, sobre resíduos lignocelulósicos.

## 7. REFERÊNCIAS

- LUCARINI, A.C.; MARIN, M.P.A.; CARNEIRO, J.S.; GARCIA, L.G.; dos REIS, R.A. e ARAÚJO, T.P.A.. Estudo comparativo do pré-tratamento por peróxido de hidrogênio seguido de hidrólise enzimática de palha de cana de açúcar e sabugo de milho. **XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química**. 19 a 22 de outubro de 2014. Florianópolis, SC. 2014. **Disponível (on line)** <http://pdf.blucher.com.br.s3-sa-east-1.amazonaws.com/chemicalengineeringproceedings/cobeq2014/1890-17024-173498.pdf>. (22 de maio de 2016)
- ABUD, A.K.S.; NARAIN, N.. Incorporação da farinha de resíduo do processamento de polpa de fruta em biscoitos: uma alternativa de combate ao desperdício. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 12, n. 4, p. 257-265, 2009.
- ADEL, A.M.; EL-WAHAB, Z.H.A.; IBRAHIMA, A.A.; AL-SHEMY, M.T.. Characterization of microcrystalline cellulose prepared from lignocellulosic materials. Part II: Physicochemical properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, p. 676-687, 2011.
- ADEN, A. RUTH, M.; IBSEN, K.; JECHURA, J.; NEEVES, K.; SHEEHAN, J.. Lignocellulosic biomass to ethanol process design and economics utilizing co-current dilute acid prehydrolysis and enzymatic hydrolysis for corn stover. **Technical report**, NRL/TP-510-32438. National Renewable Energy Laboratory, 2002.
- AGUIAR, C.M.. **Hidrólise enzimática de resíduos lignocelulósicos utilizando celulasas produzidas pelo fungo *Aspergillus niger***. 2010. 106 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Toledo, PR, 2010. **Disponível (on line)** <http://200.201.88.199/portalpos/media/File/caroline.pdf>. (12 de maio de 2016)
- AKHTAR, M.S.; SALEEM, M.; AKHTAR, M.W. Saccharification of Lignocellulosic Materials by the Cellulases of *Bacillus subtilis*. **International Journal of Agriculture & Biology**, v. 3 (2), 2001.
- ALBERTON, L.R.; VANDENBERGHE, L.P.S.; ASSMAN, R.; MÜNCHEN, L.; CIFFONI, E.M.G.; PACHALY, J.R.; SOCCOL, C.R. Efeito do extrato bruto enzimático de *Streptomyces viridosporus* T7A sobre a digestibilidade de matéria seca in vitro para ruminantes. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, Umuarama, v. 9, n. 1, p.29-36, 2006.
- ALMEIDA, M.C.O.. **Indução de Celulase e Xilanase por *Trichoderma reesei* e *Penicillium variable* em Cultivo em Estado Sólido a partir de Substratos Lignocelulósicos**. 145 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC. 2012. **Disponível (on line)** <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/100563>. Acesso em 28 de maio de 2016.
- ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJO, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M.J.. Pretreatment Technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4851-4861, 2010.

ANG, T.N.; CHENG, N.G.; CHUA, A.S.M.. Comparative study of various pretreatment reagentes on rice husk and structural changes assessment of the optimized pretreated rice husk. **Bioresource Technology**. v. 145, p. 116-119, 2013.

AWANO, T.; TAKABE, K.; FUJITA, M. Xylan and lignin deposition on the secondary wall of *Fagus crenata* fibers. In: MOROHOSHI, N.; KOMAMINE, A. (Ed.). **Molecular breeding of woody plants**. Arnstadt: Elsevier Science, p. 137-142, 2001.

AZEVEDO, J.L. Genética de fungos. In: ESPÓSITO, E. **Fungos: uma introdução a biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul. Educs, Cap. 5, p. 173-214, 2004.

BADGER, P.C.. Trends in New Crops and New Uses. In: JANICK, J.; WHIPKEY, A., eds., **ASHS Press Releases**: Alexandria, 2002.

BAILEY, J. M; OLLIS, D.F., **Biochemical Engineering Fundamental**. Nova York: Mc Graw Hill Intl Editions, Ed. 2, p. 928, 1986.

BAILEY, M.J.; BIELY, P.; POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **Journal of Biotechnology**, vol. 23, p. 257-270, 1992.

BALAT, M.; BALAT, H., O'ZB, C. Progress in bioethanol processing. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 34, p.551-573, 2008.

BALÁZSY, A.T.; EASTOP, D. **Chemical principles of textile conservation**. Hungria: Ed Plant a Tree, 1999.

BAUDEL, H.M. III Workshop Tecnológico sobre: Hidrólise para Produção de Etanol (Pré Tratamento e Hidrólise). 2006. **Disponível (on line)** <http://www.inovacao.unicamp.br/etanol/report/Hidrolise%20Baudel%20Pr%E9%20Tratamento%20e%20Hidr%F3lise.pdf>. Acesso em: 16 jul. 2009.

BEAUCHEMIN, K.A.; COLOMBATTO, D.; MORGAVI, D.P. YANG, W.Z. Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. **Journal of Animal Science**, v.81. suppl. 2 p. E37.E47, 2003.

BEAUCHEMIN, K.A.; RODE, L.M.; MAEKAWA, M.; MORGAVI, D.P.; KAMPEN, R.. Evaluation of a nonstarch polysaccharidase feed enzyme in dairy cow diets. **Journal of dairy Science**, v.83, n. 3, p. 543-553, 2000.

BEAUCHEMIN, K.A.; RODE, L.M.; SEWALT, V.J.H.. Fibrolytic enzymes increase fiber digestibility and growth rate of steers fed dry forages. **Canadian Journal Animal Science**, v. 75, p. 641-644, 1995.

BEAUCHEMIN, K.A.; RODE, L.M.; YANG, W,Z.; McALLISTER, T. A.. Use of feed enzymes in ruminant nutrition. In: PACIFIC NORTHWEST NUTRITION CONFERENCE, 33rd. Vancouver. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. Vancouver, 14 p, 1998.

BERLIN, A.; GILKES, N.; KURABI, A.; BURA, R.; TU, M.; KILBURN, D.; SADDLER, J. Weak lignin-binding: a novel approach to improve activity of cellulases for hydrolysis of lignocellulosics enzymes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 121–124, p. 163-170, 2005.

BERLIN, A.; MAXIMENKO, V.; GILKES, N.; SADDLER, J. Optimization of enzyme complexes for lignocellulose hydrolysis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 97, p. 287–296, 2007.

BERTECHINI, A. G. **Nutrição de Monogástricos**. Lavras: Editora UFLA, 301 p. 2006.

BORSZCZ, V. **Produção de pectinases por *Aspergillus niger* ATCC 9642 em cultivo estado sólido e aplicação na remoção de biofilmes microbianos**. Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Engenharia de Alimentos URI Campus de Erechim, 2015.

BRAITHWAITE, K.L., BLACK, G.W., HAZLEWOOD, G.P., ALI, B.R., GILBERT, H.J.. A non-modular endo- $\beta$ -1,4-mannanase from *Pseudomonas fluorescens* subspecies cellulose. **Biochemical Journal**, v.305, part 3, p.1005-1010, 1995.

BRIJWANI, K.; OBEROI, H.S.; VADLANI, P.V., Production of a cellulolytic enzyme system in mixed-culture solid-state fermentation of soybean hulls supplemented with wheat bran. **Process Biochemistry**. v. 45, p.120-128, 2010.

BUXTON, D. R.; REDFEARN, D.. Plant Limitations to Fiber Digestion and Utilization. **The Journal of Nutrition**, v. 127, n.5, p. 814-818,1997.

CANILHA, L., MILAGRES, A.M.F., SILVA, S.S., SILVA, J.B.A., FELIPE, M.G.A., ROCHA, G.J.M., FERRAZ, A., CARVALHO, W.. Sacarificação da Biomassa Lignocelulósica através de Pré-Hidrólise Ácida seguida por Hidrólise Enzimática: uma Estratégia de “Desconstrução” da Fibra Vegetal. **Revista Analytica**, n. 44. 2010.

CAO, Y.; TAN, H.. Effects of cellulase on the modification of cellulose. **Carbohydrate Research**, v.337, n.14, p.1291–1296, 2002.

CARDONA E, RIOS J, PEÑA J, RIOS L. Effects of the pretreatment method on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentability of the cellulosic fraction from elephant grass. **Fuel**;118:41–7, 2014.

CARPITA, N.C.; GIBEAUT, D.M.. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. **The Plant Journal**, Oxford, v. 3, p.1-30, 1993.

CARRILLO, F.; LIS, M.J.; COLOM, X.; LÓPEZMESAS, M.; VALLDEPERAS, J.. Effect of alkali pretreatment on cellulase hydrolysis of wheat straw: Kinetic study. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 10, p. 3360-3364, 2005.

CARVALHO, F.A.N., BARBOSA, F.A. e MCDOWELL, L.R.. **Nutrição de bovinos a pasto**. CARVALHO, F.A.N. e F.A. BARBOSA (eds.). 2ª ed. Belo Horizonte. 428 p. 2003.

CASSALES, A.; SOUZA-CRUZ, P. B.; RECH, R.; AYUB, M.A.Z.. Optimization of soybean hull acid hydrolysis and its characterization as a potential substrate for bioprocessing. **Biomass and bioenergy**. v. 35. p. 4675-4683. 2011.

CASTRO, A.M.; PEREIRA JR, N.. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.

CECAVA, M.J., MERCHEN, N.R., GAY, L.C. Composition of ruminal bacteria harvested from steers as influenced by dietary energy level, feeding frequency and isolation techniques. **Journal of Dairy Science**, 73:2480-2488, 1990.

CHAMPE, P.C.; HARVEY, R.A. **Bioquímica ilustrada**. 2.ed. São Paulo: Artes Médicas, p.53-66, 1989.

CHANDRA, M.; KALRA, A.; SANGWAN, N.; GAURAV, S.; DAROKAR, M.P.; SANGWAN, R.S.. Development of a mutant of *Trichoderma citrinoviride* for enhanced production of cellulases. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 1659–1662, 2009.

CHANG, V. S.; HOLTZAPPLE, M. T. Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v.84, n. 86, p. 5–37, 2000.

CHANG, V.S.; NAGWANI, M.; HOLTZAPPLE, M.T. Lime pretreatment of crop residues bagasse and wheat straw. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Chemistry, v. 74, p. 1271, 2002.

CHEFTEL, J.C.; CHEFTEL, H.. **Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos**. Acribia, p. 162-175, 1999.

CHEN, M.; XIA, L.; XUE, P. Enzymatic hydrolysis of corncob and ethanol production from cellulosic hydrolysate. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 59, p. 85–89, 2007.

CHERRY, J.R.; FIDANTSEF, A.F.. Directed evolution of industrial enzymes: na update. **Current Opinion in Biotechnology**, vol. 14, p. 438-443, Aug. 2003.

CHUNDAWAT, S.P.S.; BECKHAM, G.T.; HIMMEL, M.E.; DALE, B.E.; COHEN, R.; SUZUKI, M.R.; HAMMEL, K.E.. Processive Endoglucanase Active in Crystalline Cellulose Hydrolysis by the Brown Rot Basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n., p. 2412-2417, 2005.

COLOMBATTO, D.; MORGAVI, D.P.; FURTADO, BEAUCHEMIN, K. A.. Screening of exogenous enzyme for ruminant diets: relationship between biochemical characteristics and in vitro ruminal degradation. **Journal Animal Science**, v. 81, p. 2628 - 2638, 2003.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. Previsão de grãos em 2015 já chega a 204,5 milhões de toneladas. **Disponível (on line)** <http://www.conab.gov.br/imprensa-noticia.php?id=37258> (08 de julho de 2015).

CORREDOR, D.Y.; SUN, X.S.; SALAZAR, J.M.; HOHN, K.L.; WANG, D.. Enzymatic hydrolysis of soybean hulls using dilute acid and modified steam-explosion pretreatments. **Journal of Biobased Materials and Bioenergy**. v.2, p. 43-50, 2008.

COSGROVE, D.J. Expansive growth of plant cell walls. **Plants Physiology and Biochemistry**, 38: 109-124, 2000.

CRUZ, G.M.. Utilização dos restos de culturas e palhas na alimentação de ruminantes. In: **Simpósio Utilização De Subprodutos Agroindustriais E Resíduos De Colheita Na Alimentação De Ruminantes**. São Carlos. Anais. São Carlos: Embrapa. p. 99-121. 1992.

CZERKAWSKI, J.W. **Introducion To Rúmen Studies**. Oxford: Pergamon: Press, p. 236, 1986.

D'ALMEIDA, M.L.O. Composição química dos materiais lignocelulósicos. In. **Celulose e papel: tecnologia de fabricação da pasta celulósica**. 2. Ed. São Paulo: Instituto de Pesquisa Tecnológica do estado de São Paulo, 1988, v. 1, p. 45-106.

DARVILL e FRY, S.C. ALBERSHEIM, P. MACNEIL, M.; DARVILL, A.G.; FRY, S.C. ALBERSHEIM, P. Structure and function of the primary cell walls of plants. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 53, p. 625-663, 1984.

DELGENES, J.P.; MOLETTA, R.; NAVARRO, J.M. Effects of lignocellulose degradation Products on ethanol fermentations of Glucose and Xylose by *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme Microbiology Technology**, v.19, p.220-225, 1996.

DELMER, D.P. Cellulose biosynthesis: Exciting times for a difficult field of study. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. Palo Alto, v. 50, p. 245-276, 1999.

DETROY, R.W., LINDENFELSER, L.A. SOMMER, S. AND ORTON, W.L.. Bioconversion of wheatstraw to ethanol: Chemical modification, enzy-matic hydrolysis and fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**. 23 : 1527-1535, 1981.

DHUGGA, K.S. Building the wall: genes and enzyme complexes for polysaccharide synthases. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 4, p. 488-493, 2001.

DIENES, D.; EGYHÁZI, A.; RÉCZEY, K.. Treatment of recycled fiber with *Trichoderma* cellulases. **Industrial Crops and Products**, v.20, p.11-21, 2004.

EL-NASSER, N.H.A., HELMY, S.M. & EL-GAMMAL, A.A. Formation of enzymes by biodegradation of agricultural wastes with rot fungi. **Polymer Degradation and Stability**, v. 55, p. 249 - 253, 1997.



ELSHAFEI, A.M., VEGA, J.L., KLASSON, K.T., CLAUSEN, E.C., GADDY, J.L.. The saccharification of corn stover by cellulase from *Penicillium funiculosum*. **Bioresource Technology**, 35: 73–80. 1991.

ENGLEHARDT, J. Sources, industrial derivatives, and commercial applications of cellulose. **Carbohydrates Europea**, Amsterdam, v. 12, p. 5-14, 1995.

FAN, L. T.; LEE, Y. H.; GHARPURAY, M. M. The nature of lignocellulosics and their pretreatments for enzymatic hydrolysis. **Advances in Biochemical Engineering**, v. 23, p. 157-187, 1982.

FARRELL, A.E., PLEVIN R.J., TURNER B.T., JONES A.D, O'HARE M., KAMMEN D.M. Ethanol Can Contribute to Energy and Environmental Goals. **Science** 311:506-508. 2006.

FASANELLA, C.C. **Ação das enzimas ligninolíticas produzidas *Aspergillus niger* e *Penicillium* sp. em bagaço de cana-de-açúcar tratado quimicamente**. 79p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008. **Disponível (on line)** <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/111138/tde-10022009-082433/pt-br.php>. (12 de maio de 2016)

FENG, P.; HUNT, C.W.; PRITCHARD, G.T.; JULIEN, W.E.. Effect of enzyme preparations on in situ and in vivo additives degradation and in vivo digestive characteristic of mature cool-season grass forage in beef steers. **Journal of Animal Science**, v. 74(6), P. 1349-1357, 1996.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood chemistry, ultrastructure, reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, 1989.

FOGARTY, W.M.; KELLY, C.T.. Pectic enzymes. In: Fogarty, W.M. Microbial enzymes and biotechnology. London: **Applied Science Publishers**. p. 382, 1983.

FRY, S.C. The growing plant cell wall: chemical and metabolic analysis. London: **Longman Scientific and Technical**, 246 p, 1988.

GALL, L. W.; HUTTANEN, C.N. Criteria for considering a bacteria isol om the rumen as a bona flide rumen organism. **Journal of Animal Science**, Chanpaign, v.67, suppl. 1, p. 558, 1989.

GARCIA-APARICIO, M.P.; BALLESTEROS, M.; MANZANARES, P.; BALLESTEROS, I.; GONZALEZ, A.; NEGRO, M.J.. Xylanase contribution to the efficiency of cellulose enzymatic hydrolysis of barley straw. **Applied Biochemistry and Biotechnology**; 136–140:353–365, 2007.

GHOSE, T.K., Measurement of cellulase activities. **Pure Applied Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.

GIBEAUT, D.M.; CARPITA, N.C. Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides. **Federation of American Societies for Experimental Biology**, Bethesda, v. 8, p. 904-915, 1994.

GOLDESTINE, I.S. **Organic Chemicals from Biomass**. Boca Raton, FL: CRC Press, 1981. 320 p;

GOMIDE, J.A. Características de planta forrageira a ser fenada. **Informativo Agropecuário**, v.6, n.64, p.6-8, 1980.

GOUVEIA, E.R.; NASCIMENTO, R. T.; SOUTO-MAIOR, A. M. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, vol.32, N°.6, 1500-1503, 2009

GRAMINHA, E.B.N., GONC, ALVES, A.Z.L., PIROTA, R.D.P.B., BALSALOBRE, M.A.A., DA SILVA, R., GOMES, E.. Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition. **Animal Feed Science and Technology**, 144, 1–22, 2008.

GUPTA, R. **Alkaline pretreatment. of biomass for etanol production and Understanding the factors influencing the celulose hydrolysis**. 206 f. Dissertação (Doutorado de Filosofia) Auburn University, Alabama. 2008.

GUSAKOV, A.V. Alternatives to *Trichoderma reesei* in biofuel production. **Trends in Biotechnology**, v. 29, p. 419-425, 2011.

HADDAD, C.M., CASTRO, F.G.F.. Produção de feno. In: **SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DA PASTAGEM**, 15, 1998, Piracicaba. Anais. Piracicaba: ESALQ-USP, p.151-172, 1998.

HAHN-HÄGERDAL, B., GALBE, M., GORWA-GRAUSLUND, M.F., LIDÉN, G., ZACCHI, G. Bio-ethanol: the fuel of tomorrow from the residues of today. **Trends in Biotechnology**, v. 24, n. 12, 2006.

HAICHAR, F.Z.; ACHOUAK, W.; CHRISTEN, R.; HEULIN, T.; MAROL, C.; MARAIS, M.F. ; MOUGEL, C.; RANJARD, L.; BALESSENT, J.; BERGE, O.. Identification of cellulolytic bacteria in soil by stable isotope probing. **Environmental Microbiology**, v.9, n.3, p.625–634, 2007.

HAYASHI, T. Xyloglucans in the primary-cell wall. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 40, p. 139-168, 1989.

HICKERT, L.R.. **Otimização da hidrólise da casca de arroz (*Oryza sativa*) e a avaliação da capacidade de bioconversão deste hidrolisado a etanol e xilitol por leveduras**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia e do Ambiente). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2010.

HILL, G.M., GATES, R.N., WEST, J.W.. Pesquisa com capim bermuda cv. "Tifton 85" em ensaios de pastejo e de digestibilidade de feno com bovinos. In: **SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DA PASTAGEM**, 15, Piracicaba. Anais. Piracicaba: ESALQ-USP, 1998. p.7-22. 1998.

HOFRICHTER, M. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). **Enzyme and Microbial Technology**. New York, v. 30, p. 454-466, 2002.

HOOVER, W. H.; MILLER, T.K. Rumen digestive physiology and microbial ecology. **The Veterinary Clinics of North America**. In: SNIFFEN, C.J. & HERDT, T.H. (Eds), p.311-325.1991.

HRISTOV, A.N.; McALLISTER, T.A.; CHENG, K.J.. Intraruminal supplementation with increasing levels of exogenous polysaccharide-degrading enzymes: effects on nutrient digestion in cattle feed barley grain diets. **Journal of Animal Science**, v.78, p.477-487, 2000.

HU J, ARANTES V, SADDLER JN. The enhancement of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates by the addition of accessory enzymes such as xylanase: is it an additive or synergistic effect? **Biotechnol Biofuels**;4:36. 2011.

HULTIN, H.O.; SUN, B.; BULGER, J. Pectin methyl esterases of the banana. Purification and properties. **Journal of Food Science**, v. 31, n. 3, p. 320-327, 1966.

HUGGA, K.S. Building the wall: genes and enzyme complexes for polysaccharide synthases. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 4, p. 488-493, 2001.

HUISMAN, M. SCHOLS, H. VORAGEN, A. Cell wall polysaccharides from soybean (Glycine max) meal. Isolation and characterisation, **Carbohydr. Polym.** 37 87–95. 1998.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Estatísticas da produção pecuária, 2015. **Disponível (on line)** [http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/pesquisas/pesquisa\\_resultados.php?id\\_pesquisa=21](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/pesquisas/pesquisa_resultados.php?id_pesquisa=21) (08 de julho de 2015)

IPHARRAGUERRE, I.R.; CLARK, J.H. Soyhulls as an alternative feed for lactating cows: A review. **Journal of Dairy Science**, v.86, p.1052-1073, 2003.

ÍTAVO, L.C.V.; VALADARES FILHO, S.C.; SILVA, F.F.; VALADARES, R.F.D.; CECON, P.R.; ÍTAVO, C.C.B.F.; MORAES, E.H.B.K.; PAULINO, P.V.R.. Consumo, degradabilidade ruminal e digestibilidade aparente de fenos de gramíneas do gênero *Cynodon* e rações concentradas utilizando indicadores internos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.2, p.1024-1032, 2003.

IWAASA, A.D., RODE, L.M.; BEAUCHEMIN, K.A.. Cumulative gas production of alfalfa forage 33 treated with different cell wall-degrading enzymes. **Journal of Dairy Science**, 81, Suppl. 1, 291,1998.

JA'AFARU, M.I.; FAGADE, O.E. Cellulase Production and Enzymatic Hydrolysis of Some Selected Local Lignocellulosic Substrates by a Strain of *Aspergillus niger*. **Research Journal of Biological Sciences**, 2(1), p.13-16, 2007.

JALILVAND G.; ODONGO, N.E.; LÓPEZ, S.; NASERIAN, A.; VALIZADEH, R.; EFTEKHAR SHAHRODI, F.; KEBREAB, E.; FRANCE, J.. Effects of different levels of an enzyme mixture on in vitro gas production parameters of contrasting forages. **Animal Feed Science and Technology**, v. 146, p. 289 - 301, 2008.

JAYANI, R.S.; SAXENA, S.; GUPTA, R.. Microbial pectinolytic enzymes: a review. **Process Biochemistry - Journal**. 40: 2931-2944, 2005.

JEFFRIES, T.W.; SHI, N.Q.. Genetic engineering for improved xylose fermentation by yeasts. **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**, v. 65, p. 117-161, 1999.

JEYA, M.; ZHANG, Y.M.; KIM, I.W.; LEE, J.K. Enhanced saccharification of alkali-treated rice straw by cellulase from *Trametes hirsuta* and statistical optimization of hydrolysis conditions by RSM. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 5155-5161, 2009.

JOHAR, N.; AHMAD, I.; DUFRESNE, A.. Extraction, preparation and characterization of cellulose fibres and nanocrystals from rice husk. **Industrial Crops and Products**, v. 37, p. 93-99, 2012.

JUHÁSZ, T.; SZENGYEL, Z.; RÉCZEY, K.; SIKA-AHO, M.; VIKARI, L.. Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. **Process Biochemistry**, v.40, p.3519- 3525, 2005.

KAMRA, D.N. Rumen Microbial Ecosystem. **Current Science**, v.89, n.1, p. 124-134, 2005.

KAPDAN L.K., KAEGI F.. Biohydrogen production from waste materials. **Enzyme Microbial Technology**;38:569–82. 2006

KASHYAP, D.R., VOHRA, P.K., CHOPRA, S., TEWARI, R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 77, n. 3, p. 215-227, 2001.

KIM, T.H., KIM, T.H. Overview of technical barriers and implementation of cellulosic ethanol in the U.S. **Energy**;66:13–9. 2014.

KIM, S.; HOLTZAPPLE, M. T. Effect of structural features on enzyme digestibility of corn stover. **Bioresources and Technology**, v. 97, p. 583–591, 2006.

KOSARIC, N.; VARDAR-SUKAN, F.. Potential Source of Energy and Chemical Products. **The Biotechnology of Ethanol**. M. Roehr. Weinheim, WILEY-VCH. 2001

KOZLOSKI, G.V.. **Bioquímica dos ruminantes**. 1 ed. Santa Maria: UFSM, 140p, 2002.

KRAUSE, M.; BEAUCHEMIN, K. .; RODE, L.M.; FARR, B. I.; NORGAARD, P.. Fibrolytic enzyme 3 treatment of barley grain and source of forage in high grain diets fed to growing cattle. **Journal of Animal Science**, 96, 1010-1015, 1998.

KRISHNA, S.H. CHOWDARY, G.V. Optimization of Simultaneous Saccharification and Fermentation for the Production of Ethanol from Lignocellulosic Biomass **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 48, 1971–1976, 2000.

KRISHNANI, K.K, MENG, X., CHRISTODULATOS, C., BODDU, V.M.. Biosorption mechanism of nine different heavy metals onto biomatrix from Rice husk. **Journal of Hazardous Materials**, v. 153, p.1222-1234, 2008.

KUMAR P., BARRETT D.M., DELWICHE, M.J., STROEVE, P.. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficiente hydrolysis and biofuel production. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 28, n. 8, p. 3713- 3729, 2009.

KUMAR, R.; SINGHI, S.; SINGH, O.V. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, v. 35, p. 377-391, 2008.

KUNG JR, L.; KRECK, E.M.; TUNG, R.S.; HESSION, A.O.; SHEPERD, A.C.; COHEN, M.A.; SWAIN, H.E.; LEEDLE, J.A.Z. Effects of a live yeast culture and enzymes on in vitro ruminal fermentation and milk production of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 9, p. 2045-2051, 1997.

KUNG Jr., L.. Enzymes for lactating dairy cows: News theories and applications. In: 12th Annual Florida Ruminant Nutrition Symposium, Florida. **Proceedings Supplementary**. Florida: 2202. p. 29-43, 2002.

KUO, C.H.; LEE, C.K.. Enhanced enzymatic hydrolysis of sugarcanebagasse by N – methylmorpholine – N-oxide pretreatment. **Bioresource Technology**, 100, 866-871, 2009.

LADISCH, M.R., LIN, K.W., VOLOCH, M., TSAO, G.T.: Process considerations in the enzymatic hydrolysis of biomass. **Enzyme and Microbial Technology** , , 5: 82-102. 1983.

LAWOKO, M. **Lignin Polysaccharide Networks in Softwood and Chemical Pulps:Characterisation, Structure and Reactivity**. Tese de doutorado. Royal Institute of Technology. Estolcolmo. 2005.

LEE, J.. Biological conversion of lignocellulosic biomass to etanol. **Journal of Biotechnology**. 56, 1-24. 1997.

LEE, K.; MOON, S.H. Electroenzymatic oxidation of veratryl alcohol by lignin peroxidase. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 102, p. 261-268, 2003.

LEWIS, G.E., SANCHEZ, W.K., TREACHER, R., HUNT, C.W.; PRITCHARD, G.T.. Effect of direct-fed 16 fibrolytic enzymes on lactational performance of midlactation Holstein cows. Proceedings, Western 17 Section, **American Society of Animal Science**. Lethbridge, Alberta, 46, 310-313, 1995.

LEWIS, G.E.; HUNT, C.W.; SANCHEZ, P. Effect of direct-fed fibrolytic enzymes on the digestive characteristics of a forage-based diet fed to beef steers. **Journal of Animal Science**, v. 74, n. 12, p. 3020-3028, 1996.

LIMA, A.O.S.; RODRIGUES, A.L. Sacarificação de resíduos celululósicos com bactérias recombinantes como estratégia para redução do efeito estufa. **Revista de ciências ambientais**. v.1, n. 2, p. 5-18, 2007.

LIU, J.; LU, J.; CUI, Z.. Enzymatic hydrolysis of cellulose in a membrane bioreactor: assessment of operating conditions. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 34, p. 525-532, 2011.

LORENSETT, D.B.; NEUHAUS, M.; SCHWAB, N.T.. Gestão de resíduos e a indústria de beneficiamento de arroz. **Revista Gestão Industrial**. Universidade Tecnológica Federal do Paraná- UTFPR – Campus Ponta Grossa – PR– Brasil. V. 8, n. 01: p. 219-232, 2012.

LOURES, D.R.S. **Características do efluente e composição químico-bromatológica da silagem sob níveis de compactação e de umidade do capim-elfante (*Pennisetum purpureum* Schum.) cv. Cameroon**. Viçosa, 2000. 67 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa.

LYND, L.R.; ZHANG, Y. Quantitative determination of cellulase concentration as distinct from cell concentration in studies of microbial cellulose utilization: analytical framework and methodological approach. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 77, n. 4, p. 467-75, 2002.

MACNEIL, M.; DARVILL, A.G.; FRY, S.C. ALBERSHEIM, P. Structure and function of the primary cell walls of plants. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 53, p. 625-663, 1984.

MANDEBVU, P; WEST, J.W.; FROETSCHER, M.A.; HATFIELD, R.D.; GATES, R.N.; HILL, G.M.. Effect of enzyme or microbial treatment of bermudagrass forages before ensiling on cell wall composition, end products of silage fermentation and in situ digestion kinetics. **Animal Feed Science and Technology** 77 (1999) 317±329

MANSFIELD, S.D.; MOONEY, C.; SADDLER, J.N. Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis. **Biotechnology Progress**, v. 15, p. 804-816, 1999.

MARGEOT, A.; HAHN-HAGERDAL, B.; EDLUND, M.; SLADE, R. MONOT, F.. New improvements for lignocellulosic ethanol. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, p. 372-380, 2009.

MARTINS, A.S.. **Enzimas fibrolíticas exógenas na alimentação de bovinos**. Jaboticabal, 125p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências agrárias e Veterinária, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, SP, Brasil, 2003.

MARTINS, A.S.; VIEIRA, P.F.; BERCHIELLI, T.T.; DO PRADO, I.N.; LEMPP, B.; DE PAULA, M. C.. Degradabilidade in situ e observações microscópicas de volumosos em bovinos suplementados com enzimas fibrolíticas exógenas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.6, p.1927-1936, 2007.

MARTINS, L.F. **Caracterização do complexo celulásico de *Penicillium echinulatum***. 111f. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2005.

MARTINS, S.A.; VIEIRA, F.P.; BERCHIELLI, T.T.; DO PRADO, I.N.; CANESIN, R.C.; SETTI, M.C. Taxa de passagem e parâmetros ruminais em bovinos suplementados com enzimas fibrolíticas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 03, suppl. 0, p. 1-11, 2006.

MARTOS, M.A., ZUBRESKI, E. R., GARRO, O. A. AND HOURS, R. A. Production of pectinolytic enzymes by the yeast *Wickerhamomyces anomalus* isolated from citrus fruits peels. **Biotechnology Research International**, v. 2013, p.435-444, 2013.

McALLISTER, T.A.; HRISTOV, A.N.; BEAUCHEMIN, K.A.. Enzymes in ruminant diets. In: BEDFORD, M. R.; PARTRIDGE, G. G. **Enzymes in farm animal nutrition**. Oxon: Cab International, cap 11, p.273-298, 2001.

MCMILLAN, J.D. Pretreatment of lignocellulosic biomass. **In Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production** ; Himmel, M. E., Baker, J. O., Overend, R. P., Eds.; American Chemical Society, Washington, DC, p 292-324, 1994.

MENDES, F.M. SIQUEIRA, G.; CARVALHO, W. FERRAZ, A. MILAGRES, A. M.F.. Enzymatic hydrolysis of chemithermomechanically pretreated sugarcane bagasse and two experimental samples with reduced initial lignin content. **Biotechnology Progress**, v. 27, p. 395-401, 2011.

MENDES, F.M.; SIQUEIRA, G.; CARVALHO, W.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A.M.F. Enzymatic hydrolysis of chemithermomechanically pretreated sugarcane bagasse and two experimental samples with reduced initial lignin content. **Biotechnology Progress**, v. 27, p. 395-401, 2011.

MENEGOL, D., SCHOLL A. L., FONTANA, R. C., DILLON, A. J. P., CAMASSOLA, M.. Potential of a *Penicillium echinulatum* enzymatic complex produced in either submerged or solid-state cultures for enzymatic hydrolysis of elephant grass. **Fuel** 133, 232–240, 2014.

MENON, V., RAO, M.. Trends in Bioconversion of Lignocellulose: Biofuels, Platform Chemicals & Biorefinery Concept. **Process in Energy and Combustion Science**, v. 38, p. 522 – 550. 2012.

MERTENS, D.R. Creating a system for meeting the fiber requirements of dairy cows. **Journal of Dairy Science.**, 80:1463-1481, 1997.

MERTENS, D.R. Physical effective NDF and its use in formulating dairy rations. **In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL EM BOVINOS DE LEITE**, 2., 2001, Lavras. Anais... Lavras:UFLA-FAEPE, p.25-36. 2001.

MERTENS, D.R., BRODERICK, G.A.; SIMONS, R. Efficacy of carbohydrate sources for improving utilization of N in alfalfa silage. **Journal of Dairy Science**, v. 77(Suppl. 1), p.240 (Abstr.).1994.

MIELENZ, J.R.; BARDSLEY, J.S.; WYMAN, C.E.. Fermentation of soybean hulls to ethanol while preserving protein value. **Bioresource Technology**. v. 100, p. 3532-9, 2009.

MIELENZ, J.R. BARDSLEY, J.S. WYMAN, C.E. Fermentation of soybean hulls to ethanol while preserving protein value, **Bioresource Technology**. 100 3532–3539. 2009.

MILLER, G.L.. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, p. 426 - 428, 1959.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Produção brasileira de soja se aproxima da produção dos Estados Unidos. **Disponível (on line)** <http://www.agricultura.gov.br/politica-agricola/noticias/2013/08/producao-brasileira-de-soja-se-aproxima-da-producao-dos-estados-unidos>. (02 de agosto de 2015)

MINSON, D.J. Forage in ruminant nutrition. **Academic Press**, New York, 483p., 1990. **Molecular Sciences**. v. 9, 1621-1651, 2008.

MONTIPÓ. S.; PEDROSO, G.B.; BEVILAQUA, D.B. BRENNER, C.G.B. MARTINS, A.F.. Bioconversão de hidrolisado da casca de arroz a Ácido Láctico. II WSPI – Workshop em Sistemas e processos industriais, Santa cruz do Sul, RS, **(Disponível on line)** <http://online.unisc.br/acadnet/anais/index.php/wspi/article/view/10843>. (06 de junho de 2015)

MOORE, P.J.; DARVILL, A.G.; ALBERSHEIM, P.; STAEHELIN, A.L. Immunogold localization of xyloglucan and rhamnogalacturonan I in the cell walls of suspension-cultured sycamore cells. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 82, p. 787-794, 1986.

MORAIS, A.P.S. e BROETTO, F.. Pré-hidrólise Ácida de Bagaço de Cana-de-açúcar e sua Caracterização Físico-Química. **Revista Energia na Agricultura**, v. 27, nº 4, p. 01-12, 2012.

MORGAVI, D.P.; NEWBOLD, C.J.; BEEVER, D.E.. Stability and stabilization of potential feed additive enzyme sin rumen fluid. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, n. 1, p. 171-177, 2000.



- MOSIER, N., WYMAN, C., DALE, B., ELANDER, R., LEE, Y.Y., HOLTZAPPLE, M., LADISCH, M., Bioresource Technoly Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technoly**, v. 96, p. 673–686, 2005.
- MOSIER, N.S.; HENDRICKSON, R.; DRESCHER R.. Principles and economics of pretreating cellulose in water for ethanol production. Paper 103, BIOT Division, 225th. **American Chemical Society Meeting**, New Orleans, 26 March 2003, 2003.
- MUSSATTO, S.I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A.M.F.; ROBERTO, I.C.. Effect of hemicellulose and lignin on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, n. 2, p. 124-129, 2008.
- NAKAGAME, S.; CHANDRA, R.P.; SADDLER, J.N. The effect of isolated lignins, obtained from a range of pretreated lignocellulosic substrates, on enzymatic hydrolysis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 105, p. 871–879, 2010.
- NAKATA, Y.; SUZUKI, M.; OKUTANI, T. Preparation and properties of SiO<sub>2</sub> from rice hulls. **Nippon Seramikkusu Kyokai Gakujutsu Ronbunshi**, v. 97, p. 842-9, 1989.
- NASCIMENTO, V.M. **Pré-tratamento alcalino (NaOH) do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol e obtenção de xilooligômeros**. Dissertação de mestrado, UFSCar, São Carlos – São Paulo. 2011.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requeriments of dairy cattle**. 7.rev.ed. Washinton, D.C.: 381p. 2001.
- NCBE, National Center of Biotechnology Education. (2000). Enzymes in fruit juice production. **Disponível (online)** <http://www.ncbe.reading.ac.uk/ncbe/protocols/inajam/pdf/jam01.pdf> (08 de julho de 2015).
- NISHIDA, V.S., OLIVEIRA, R.F., SOUZA, C.G.M., INÁCIO, F.D., PERALTA, R.M.. Produção de β-glicosidasas por *Aspergillus* sp. em cultivo em estado sólido. **BBR – Biochemistry and Biotechnology Reports**, ISSN: 2316-5200, v. 2, nº 3, p. 368-371, 2013.
- NSEREKO, V.L.; MORGAVI, D.P.; RODE, L.M.; BEAUCHEMIN, K.A.; McALLISTER, T.A.. Effects of fungal enzyme preparations on hydrolysis and subseqente degradation of alfa hay fiber by mixed rumen microoganisms in vitro. **Animal Feed Science and Technology**, v. 88, p.153-170, 2000.
- NUNES, J.M.N.; CARVALHO, P.I.N.; PINHEIRO, I.R. Estudo da hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com peróxido de hidrogênio. **XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos**, Caxias do Sul/RS, 2001.
- O'SULLIVAN, A. C.; Cellulose: The structure slowly unravels. **Cellulose**, 4, 173, 1997.
- OGEDA, T.L., PETRI, D.F.S.; Hidrólise Enzimática de Biomassa. Biomass Enzymatic Hydrolysis. **Química Nova**. vol.33 nº.7. São Paulo. 2010.

OHGREN, K., BERGTSSON, O., GRAUSLUND, G., GALBE, M., HAHN—HARGEDAL, B, ZACCHI G. Simultaneous saccharification and co-fermentation of glucose and xylose in steam-pretreated corn stover at high fiber content with *Saccharomyces cerevisiae* TMB3400. **Journal of biotechnology**. 2006.

OJUMU, T.V.; SOLOMON, B.O.; BETIKU, E.; LAYOKUN, S.K.; AMIGUN, B.. Cellulase Production by *Aspergillus flavus* Linn Isolate NSPR 101 fermented in sawdust, bagasse and corncob. **African Journal of Biotechnology**. v. 2, n. 6, p. 150-152, 2003.

OLIVEIRA, A.A. **Manejo do pasto de capim-marandu e suplementação com diferentes fontes de energia na recria de tourinhos Nelore**. 2014. (Tese de Doutorado em Zootecnia) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, 2014.

OLIVEIRA, F.M.V. **Avaliação de diferentes pré-tratamentos e deslignificação alcalina na sacarificação da celulose de palha de cana**. 2010. 98 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2010.

OLIVEIRA, G.D. de. **Obtenção de produtos extrusados expandidos e não-expandidos de casca de soja e milho**. (Dissertação de Mestrado) Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Tecnologia, 104p. 2007.

OLIVEIRA, V.S.; NETO, A.A.M.; WANDERLEY, M.C.A.; ROCHA, G.J.M.; GOUVEIA, E.R. Effect of Time and Temperature in the Alkaline Delignification on the Cellulose Hydrolysis. **XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos – SINAFERM**, 2011.

OLOFSSON, K.; BERTILSSON, M.; LIDÉN, G.. A short review on SSF—an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. **Biotechnology for Biofuels**, vol. 1, p. 7, 2008.

OOSHIMA, H., BURNS, D.S., CONVERSE, A.O.. Adsorption of cellulase from *Trichoderma reesei* on cellulose and lignaceous residue in wood pretreated by dilute sulfuric acid with explosive decompression. **Biotechnology Bioenergy**, 36, 446-452, 1990.

PALONEN, H., TJERNELD, F., ZACCHI, G., TENKANEN, M. Adsorption of *Trichoderma reesei* CBH I and EG II and their catalytic domains on steam pretreated softwood and isolated lignin. **Journal of Biotechnology**, v. 107, p. 65-72, 2004.

PEIXOTO, R.R.; MAIER, J.C. **Nutrição e alimentação animal**. 2.ed. Pelotas: UCPel, 1993. 169 p.

PENZ Jr., A.M. Enzimas em rações para aves e suínos, Botucatu, SP, 1998 In: **REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA**, 35., Botucatu. Anais... Botucatu: SBZ, 1998. p.165-178. 1998.

PEREIRA, V.M.. **Avaliação do Potencial Enzimático de Fungos Filamentosos e Otimização da Produção de Celulases por *Aspergillus sulphureus* (Fresen) Whemer**. 112 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG, 2012.

PETROVA, S.D.; BAKALOVA, N.G.; KOLEV, D.N.. Properties of two endoglucanases from a mutant strain *Trichoderma* sp. M7. **Biotechnology Letters**, v.24,p. 2107- 2111, 2002.

PILNIK, W.; ROMBOUTS, F.M. Pectic enzymes. In: Birch, G. G.; Blakebrough, N.; Parker, K. J. Enzymes and food processing. London: **Applied Science Publishers**. p. 296, 1981.

PINA, D.S.; VALADARES FILHO, S.C.; TEDESCHI, L.O.; BARBOSA, A.M.; VALADARES, R.F.D. Influence of different levels of concentrate and ruminally undegraded protein on the digestive parameters in beef heifers. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 87, n. 3, p. 1058 - 1067, 2009.

PINTO, B.; CALLONI, G.; SILVA, S.A.. Obtenção de acetato de celulose a partir da casca de arroz (*Oryza sativa*). **Revista Liberato**, Novo Hamburgo, v. 14, n. 21, p. 01-112, jan./jun.2013.

PITARELO, A.P. **Avaliação da susceptibilidade do bagaço e da palha de cana-de-açúcar bioconversão via pré-tratamento a vapor e hidrólise enzimática**. 109 f. Dissertação Mestrado em Química) - Universidade Federal do Paraná. Curitiba. **Disponível (On line)**  
<http://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/15870/?jsessionid=FA3999670CF98BE075BFE9A314F38B82?sequence=1>. (10 de abril de 2016)

PITT, D. Pectin lyase from *Phoma medicaginis* var. *pinodella*. **Methods in Enzymology**, v. 161, p. 350-354, 1988.

PLAYNE, M.J. Increased digestibility of bagasse by pretreatment with alkalis and steam explosion. **Biotechnol and Bioengineering**, v. 26, p. 426-433, 1984.

POLIZELI, M.L.T.M.; RIZZATI, A.C.S.; MONTI, R.; TERENCEI, H.F.; JORGE, J.A.; AMORIM, D.S.. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 67, p. 577-591, 2005.

POTUMARTHI, R.; BAADHE, R.R.; NAYAK, A; JETTY, A.. Simultaneous pretreatment and saccharification of rice husk by *Phanerochete chrysosporium* for improved production of reducing sugars. **Bioresource Technology** v.128. P. 113-117, 2013.

RABELO, S.C. **Avaliação de desempenho do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar**. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2007. Dissertação (Mestrado). **Disponível (on line)**  
<http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=vtls000418358>. (14 de maio de 2016)

RABELO, S.C.. **Avaliação e Otimização de Pré-Tratamentos e Hidrólise Enzimática do Bagaço de Cana-de-açúcar para a Produção de Etanol de Segunda Geração**. 447 f. Tese (doutorado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas - SP. 2010. **Disponível (on line)**  
<http://pct.capes.gov.br/teses/2010/33003017034P8/TES.PDF>. (21 de março de 2016)

RAHIKAINEN, J.; MIKANDER, S.; MARJAMAA, K.; TAMMINEN, T.; LAPPAS, A.; VIIKARI, L.; KRUIUS, K. Inhibition of Enzymatic Hydrolysis by Residual Lignins From Softwood—Study of Enzyme Binding and Inactivation on Lignin-Rich Surface. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 108, p. 2823–2834, 2011.

RAMOS, L.P.. The Chemistry involved in the pretreatment of lignocellulosic materials. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, p. 863-871, 2003.

RAMOS, L.P.. Aproveitamento integral de resíduos agrícolas e agroindustriais. In: **Seminário nacional sobre reuso/reciclagem de resíduos sólidos industriais**. São Paulo: Cetesb, 2000.

RAVEN, P.H., EVERT, R.F., EICHHORN, S.E. **Biologia vegetal**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 2001. 906p.

REIS, L.; SCHNEIDER, W.; FONTANA, R.; CAMASSOLA, M.; DILLON, A.P.. Cellulase and xylanase expression in response to different pH Levels of *Penicillium echinulatum* S1M29. **Bio Energy Resources Limited**:1–8. 2013

REIS, R.A.; RODRIGUES, L.R.A.; PEREIRA, J.R.A.. Composição química e digestibilidade de feno tratados com amônia anidra ou uréia. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 30. N.3. p. 666.673, 2001.

REITER, W.D. Biosynthesis and properties of the plant cell wall. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v.5, p. 536-542, 2002.

RESTLE, J.; FATURI, C.; FILHO, A. C. A.; BRONDANI, I. L.; SILVA, J. H. S.; KUSS, F., SANTOS, C. V. M. dos.; FERREIRA, J. J. Substituição do grão de sorgo por casca de soja na dieta de novilhos terminados em confinamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.33, n.4, p.1009- 1015, ago. 2004.

REXOVÁ-BENKOVÁ, L.; MARKOVIC, O.. Pectic enzymes. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, v. 33, p. 323-385, 1976.

RIDLEY, B.L.; O'NEILL, M.A.; MOHNEM, D.. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. **Phytochemistry**, v. 57, p. 929-967, 2001.

ROCHA JUNIOR, V.R.; VALARARES FILHO, S.C.; BORGES, A.M.; DETMANN, E.; MAGALHÃES, K.A.; VALADARES, R.F.D.; GONÇALVES, L.C.; CECON, P.R. Estimativa do valor energético dos alimentos e validação das 23 equações propostas pelo NRC (2001). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.32, n.2, p.480-490, 2003.

ROJAS, M.J.; Siqueira, P. F.; Miranda, L. C. Tardioli, P. W. Sequential proteolysis hydrolysis of soybean hulls for oligopeptides and ethanol production. **Industrial Crops and Products**, v. 61, p 202-210, 2014.

ROLAND, J.C.; REIS, D.; VIAN, B. Liquid crystal order and turbulence in the planar twist of the growing plant cell walls. **Tissue and Cell**, Siena, v. 24, n. 3, p. 335-345, 1992.

ROWELL, R.M.; PETERSEN, R.; HAN, J.S.; ROWELL, J.S.; TSHABALALA, M.A. Cell Wall Chemistry. cap. 3. **Handbook of Wood Chemistry and Wood Composites**. In: ROWELL R. M. New York, 2005.

RUEGGER, M.J.S.; TAUKE-TORNISIELO, S.M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da estação ecológica de Jureia-Itatins. São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, n. 2, p. 205-211, 2004.

RUSSEL, J.B.; CONNOR, J.D.; FOX, D.C.. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminant Fermentation. **Journal Animal Science**, v.70, p.3553-3561, 1992.

SAHA, S.; ROY, R.N.; SEN, S.K.; RAY, A.K.. Characterization of cellulose producing bacteria from the digestive tract of tilapia, *Oreochromis mossambica* (Peters) and grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Valenciennes). **Aquaculture Research**, v.37, n.1, p.1-9, 2006.

SANCHEZ ÓJ, CARDONA C.A.. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresource Technology**;99: 5270 5295, 2008.

SANTOS, D.S.. **Produção de Etanol de Segunda Geração por *Zymomonas mobilis* Naturalmente Ocorrente e Recombinante, Empregando Biomassa Lignocelulósica**. 243 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro – RJ, 2012.

SANTOS, F.A.; QUEIRÓZ, J.H.; COLODETTE, J.L.; FERNANDES, S.A.; GUIMARÃES, V.M.; REZENDE, S.T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, vol.XY, N°.00, 1-7, 2012;

SANTOS, M.S.R.; PIMENTEL, W.R.O.; SILVA, M.C.S.; ALMEIDA, R.M R G.; CRUZ, A.J.G.. "AVALIAÇÃO DO PRÉ-TRATAMENTO ÁCIDO DO SABUGO DE MILHO VISANDO A PRODUÇÃO DE ETANOL 2G", p. 7245-7252 . In: **Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química - COBEQ 2014 [= Blucher Chemical Engineering Proceedings, v.1, n.2]**. São Paulo: Blucher, 2015.

SARKANEN, S. Template polymerization in lignin biosynthesis. In Lignin and Lignan Biosynthesis; N.G. Lewis and S. Sarkanen, Eds.; **American Chemical Society**: Washington, DC, p 194-208, 1998.

SCHINGOETHE, D.J.; STEGEMAN, G, A.; TREACHER, R.J.. Response of lactating dairy cows to a cellulase and xylanase enzyme mixture applied to forages at the time of feeding. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 5, p. 996-1003, 1999.

SERRA, J.L.; ALKORTA, I.; LLAMA M.J.. Aplicación industrial de los enzimas pécticos: Producción, purificación, inmovilización y algunas propiedades de la pectina lisa de *Penicillium italicum*. **Alimentación, equipos y tecnología**. 11: 127-134, 1992.

SEWALT, V., GLASSER, W., BEAUCHEMIN, K.. Lignin impact on fiber degradation III: reversal of inhibition of enzymatic hydrolysis by chemical modification of lignin and by additives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 45: 1823-1828, 1997.

SHI, W.. Influence of ultrasonic pretreatment on the yield of bio-oil prepared by thermochemical conversion of rice husk in hot-compressed water. **Bioresource Technology**, v. 146; pg. 355-362, 2013.

SHULER, M.L.; KARGI, F., *Bioprocess Engineering – Basic Concepts*. Prentice Hall Int. **Series in the Physical and Chemical Engineering Sciences**. New Jersey, 1992.

SILVA, A.S.; , HIROYUKI, T.E.; YANO, S. BOM, E.P.. Milling pretreatment of sugarcane bagasse and straw for enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. **Bioresource Technology**, v.101 p. 7402-7409, 2010.

SILVA, D.J. *Análise de Alimentos. Métodos Químicos e Biológicos*. ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1981. 166p.

SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. **Análise de alimentos (métodos químicos e biológicos)**. 3.ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2009. 235 p. 40-61.

SILVA, V.F.N. **Estudos de pré-tratamento e sacarificação enzimática de resíduos agroindustriais como etapas no processo de obtenção de etanol celulósico**. 2009. 116 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2009.

SINGH, A.K.; SHARMA, D.K. Production of xylose, furfural, fermentable sugars and ethanol from agricultural residues. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**. v.2 p.51-61, 1984

SINGH, R.. A review on delignification of lignocellulosic biomass for enhancement of ethanol production potential. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. V. 32. p. 13-728, 2014.

SINGHANIA, R.R.; SUKUMARAN, R.K.; PATEL, A.K.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, p. 541–549, 2010.

SOEST, P.J. Van. **Nutritional ecology of the ruminant**. Corvallis: O e B Books, 374p. 1982.

SOUSA DA COSTA L, CHUNDAWAT S.P., BALAN V., DALE, B.E. Cradle-to-grave' assessment of existing lignocellulose pretreatment technologies. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, n. 3, p. 339- 347, 2009.

SOUZA, O. Aproveitamento de resíduos e subprodutos agropecuários pelos ruminantes. **Rural Soft** (Embrapa Tabuleiros Costeiros. Artigo de Divulgação na Mídia), v. 20, 2008.

SUN, Y., CHENG, J.J. Dilute acid pretreatment of rye straw and bermudagrass for ethanol production. **Bioresource Technology**, 96, 1599–1606. 2005.

SUN, Y.; CHENG, J.. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, Essex, v. 83, p.1-11, 2002.

TAHERZADEH, M.J.; KARIMI, K.. Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 9, 1621-1651, 2008.

TEIXEIRA, A.S. **Alimentos e alimentação dos animais**. Vol. I. 5.ed. Lavras: UFLA/Faepe, 241 p. 2003.

THEODOROU, M.K.; FRANCE, J. Rumen microorganisms and their interactions. In: **Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism**. DIJKSTRA, J.; FORBES, J.M.; FRANCE, J.(eds). 2 ed. p.207-228, 2005.

UENOJO, M.; PASTORE, G.M.. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, p. 388-394, 2007.

VALADARES FILHO, S.C.; PAULINO, P.V.R.; MAGALHÃES, K.A.. **Exigências nutricionais de zebuínos e tabelas de composição de alimentos**. BR-CORTE. Viçosa:UFV, DZO, 1ªed., 142p. 2006.

VAN SOEST, P.J.; ROBERTSON, J.B.; LEWIS, B.A.. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 74, n. 10, p. 3583-3597, 1991.

VAN SOEST, P.J., MOORE, L.A. New chemical methods for analysis of forages for the purpose of predicting nutritive value. In: **INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS**, 9., 1966, São Paulo, SP. Proceedings . São Paulo: , p. 783-789. 1966.

VANCOV T, MCINTOSH S.. Alkali pretreatment of cereal crop residues for second generation biofuels. **Energy Fuel**; 25:2754–63. 2011.

VARGA, G.A.; KOLVER, E.S.. Microbial and animal limitations to fiber digestion and utilization. **Journal of Nutrition**, v.127, n.5, p.819-823, 1997.

VÁRNAI, A., SIIKA-AHO M., VIKARI L. Restriction of the enzymatic hydrolysis of steam-pretreated spruce by lignin and hemicellulose. **Enzyme Microb Technol** 46:185–93. 2010.

VIEIRA, R.A.M.; PEREIRA, J.C.; MALAFAIA, P.A.M.; QUEIROZ, A.C.; GONÇALVES, A.L. Fracionamento dos carboidratos e cinética de degradação in vitro da fibra em detergente neutro da extrusa de bovinos a pasto. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 29, n. 3, p. 889-897, 2000.

VIEIRA, R. C.; ANTUNES, D. P. C.; SILVA, M. C. S.; ALMEIDA, R. M. R. G.; "ESTUDO DO PROCESSO DE HIDROLISE DE RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS DO MILHO PARA PRODUÇÃO DE BIOETANOL", p. 790-797 . In: **Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química - COBEQ 2014 [Blucher Chemical Engineering Proceedings, v.1, n.2]**. São Paulo: Blucher, 2015.

VILELA, D.; RESENDE, J.C.; LIMA, J (Editores). **Cynodon, forrageiras que estão revolucionando a pecuária brasileira**. 1. ed. Juiz de Fora: Ed. Embrapa Gado de Leite, Brasil, 250 p, 2005.

WALLACE, R.J., WALLACE, S.J.A., McKAIN, N., NSEREKO, V.L., HARTENELL, G.F.. Influence of supplementary fibrolytic enzymes on the fermentation of corn and grass silages by mixed ruminal microorganisms in vitro. **Journal of Animal Science**, v.79, p. 1905 - 1916, 2001.

WASCHEK, R.C.; DUTRA, A.R.; GRANDSIRE, C.; ALMEIDA, O.C.; MOREIRA, S.O.L.. Pectina: um carboidrato complexo e suas aplicados. **Estudos**, Goiânia. 35: 343-355, 2008.

WHITAKER, J.R.. Review: pectic substances, pectic enzymes and haze formation in fruit juices. **Enzyme and Microbial Technology – Journal**. 6: 341-349, 1984.

WILLATS, W.G.T.; KNOX, J.P.; MIKKELSEN, J.D.. Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, p. 97-104. 2006.

WILLIAMS, P.T.; NUGRANAD, N.. Comparison of products from the pyrolysis and catalytic of rice husks. **Energy**, v. 25, p. 493-513, 2000.

WULFF, N.A.. **Caracterização enzimática das celulasas XF-810, XF-818 e XF-2708 de Xylella fastidiosa e purificação da proteína XF-818, expressas em Escherichia coli**. 196 p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, USP, Piracicaba, 2002.

XU, P.; HUA, D.; MA, C.. Microbial transformation of propenylbenzenes for natural flavour production. **Trends Biotechnology**. v.25, n.12, p.571-576, 2007.

XU, J., CHENG, A.K., SHARMA-SHIVAPPA, R. R. BURNS, J.C.. Sodium hydroxide pretreatment of switchgrass for ethanol production. **Energy Fuels**, v. 24, n. 3, p. 2113–2119, 2010.

YADAV, S.; DUBEY, A.K.; ANAND, G.; YADAV, D. Purification and characterization of pectin lyase secreted by *Aspergillus flavus* MTCC 10938. **Applied Biochemistry and Microbiology**, 49: 400-405. 2013.

YANG, W.Z.; RODE, L.M.; BEAUCHEMIN, K.A. Effects of fibrolytic enzyme additives on milk 34 production of dairy cows. **Journal of Animal Science** 76, Suppl. 1, 320.Suppl. 1, 320, 1998.



YOO, J.; SAJID ALAVI, S.; PRAVEEN VADLANI, P.; AMANOR-BOAD, V., Thermo-mechanical extrusion pretreatment for conversion of soybean hulls to fermentable sugars. **Bioresource Technology**. v. 102. p. 7583- 7590. 2011.

YU, J., ZANGH, J., LIU, Z., YU, Z.. Combinations of mild physical or chemical pretreatment with biological pretreatment for enzymatic hydrolysis of rice hull. **Bioresource Technology**. 100, 903-908. 2009.

ZAMBOM, M. A.; SANTOS, G. T.; MODESTO, E.C.; ALCALDE, C.R.; GONÇALVES, G.D.; DA SILVA, D.C. ; DA SILVA, K.T. ; FAUSTINO, J.O. Valor nutricional da casca do grão de soja, **Acta Scientiarum**. Univ. Estadual de Maringá, Maringá – PR. v.23, n.4, p.937- 943, 2001.

ZANZI , R.. **Pyrolysis of biomass, Royal Institute of Technology**. Department of Chemical Engineering and Technology, Stockholm, 52, Dissertation, 2001.

ZHANG, Y-HP., LYND, L.R.. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Non complexed cellulase systems. **Biotechnol Bioeng** 88:797–824, 2004.

ZHANG, Y.H.P., CUI, J., LYND, L.R.; KUANG, L.R.; A transition from cellulose swelling to cellulose dissolution by o-phosphoric acid: Evidence from enzymatic hydrolysis and supramolecular structure. **Biomacromolecules**, 7, 644–648, 2006.

ZIGLIO, B.R.; BEZERRA, J.R.M.V.; BRANCO, I.G.; BASTOS, R.; RIGO, M.. Elaboração de Pães com Adição de Farinha de Sabugo de Milho. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, Vol.9 nº 1, Jan/Jun, 2007.

## **Apêndices**

## 1 – Sabugo/palha de milho/celulase comercial

A Tabela 1 apresenta os coeficientes de regressão, erro padrão, valores de p e t(2), para a hidrólise de sabugo/palha de milho a um nível de confiança de 95 %. Verifica-se que a variável interação entre a temperatura e a agitação não apresentou influência na hidrólise de sabugo/palha de milho. Os fatores não significativos foram adicionados à falta de ajuste para a análise de variância - ANOVA (Tabela 2).

Tabela 1 - Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de p e t do planejamento fatorial 2<sup>2</sup> completo para atividade de hidrólise de sabugo/palha de milho com aplicação de celulase comercial.

<b>Fator</b>	<b>Coeficientes de regressão</b>	<b>Erro padrão</b>	<b>t(2)</b>	<b>P</b>
Média	7,279197	0,308775	23,57441	0,001795
(1)Temperatura (°C)(L)	2,061320	0,189370	10,88517	0,008334
Temperatura (°C)(Q)	1,497357	0,225967	6,62644	0,022024
(2)Agitação (rpm)(L)	1,332151	0,189370	7,03466	0,019615
Agitação (rpm)(Q)	1,597956	0,225967	7,07163	0,019416

\*Fatores estatisticamente significativos (p<0,05)

Tabela 2 - Análise de variância para a hidrólise de sabugo/palha de milho com celulase comercial, do planejamento fatorial 2<sup>2</sup> completo.

<b>Fontes de variação</b>	<b>Soma dos quadrados</b>	<b>Graus de liberdade</b>	<b>Quadrados médios</b>	<b>F calculado</b>
Regressão	68,87	4	17,22	6,07
Resíduo	17,03	6	2,84	
Falta de Ajuste	16,45662	4		
Erro Puro	0,57207	2		
Total	85,89505	10		

Resíduos = Falta de ajuste + Erro puro; Coeficiente de Correlação R<sup>2</sup>= 0,80, F<sub>tab,95%</sub>=4,53

## 2- Casca de Arroz/celulase comercial

A Tabela 3 apresenta os coeficientes de regressão, erro padrão, valores de p e t(2), para a hidrólise de casca de arroz com celulase comercial, a um nível de confiança de 95 %. Verifica-se que a interação entre a temperatura e a agitação não apresentou influência na hidrólise de casca de arroz. Os fatores não significativos foram adicionados à falta de ajuste para a análise de variância - ANOVA (Tabela 4).

Tabela 3 - Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de p e t do planejamento fatorial 2<sup>2</sup> completo para atividade de hidrólise de casca de arroz com celulase comercial.

Fator	Coeficientes de regressão	Erro padrão	t(2)	P
Média	10,13046	0,088191	114,8699	0,000076
(1)Temperatura (°C)(L)	1,04925	0,054087	19,3993	0,002647
Temperatura (°C)(Q)	-0,76344	0,064539	-11,8291	0,007071
(2)Agitação (rpm)(L)	1,18434	0,054087	21,8970	0,002079
Agitação (rpm)(Q)	-1,02751	0,064539	-15,9207	0,003922

\*Fatores estatisticamente significativos (p<0,05)

Tabela 4 - Análise de variância para a hidrólise de casca de arroz com celulase comercial, do planejamento fatorial completo 2<sup>2</sup>.

Fontes de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrados médios	F calculado
Regressão	27,20	4	6,80	7,52
Resíduo	5,42	6	0,90	
Falta de Ajuste	5,37822	4		
Erro Puro	0,04667	2		
Total	32,62636	10		

Resíduos = Falta de ajuste + Erro puro; Coeficiente de Correlação R<sup>2</sup>= 0,83, F<sub>tab,95%</sub>=4,53

### 3 - Feno de Tifton 85/celulase comercial

A Tabela 5 apresenta os coeficientes de regressão, erro padrão, valores de p e t(2), para a hidrólise do feno de Tifton 85 a um nível de confiança de 95 %.

Verifica-se que a variável temperatura linear e a interação entre a temperatura e a agitação não apresentaram influência na hidrólise de feno de Tifton 85. Os fatores não significativos foram adicionados à falta de ajuste para a análise de variância - ANOVA (Tabela 6).

Tabela 5 - Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de p e t do planejamento fatorial 2<sup>2</sup> completo para atividade de hidrólise de feno de Tifton 85 com celulase comercial.

<b>Fator</b>	<b>Coeficientes de regressão</b>	<b>Erro padrão</b>	<b>t(2)</b>	<b>p</b>
Média	20,21176	0,208164	97,0953	0,000106
Temperatura (°C)(Q)	-4,18465	0,152338	-27,4694	0,001323
(2)Agitação (rpm)(L)	2,94275	0,127666	23,0505	0,001877
Agitação (rpm)(Q)	-5,20321	0,152338	-34,1556	0,000856

\*Fatores estatisticamente significativos (p<0,05)

Tabela 6 - Análise de variância para a hidrólise (%) de feno de Tifton 85 com aplicação de celulase comercial, do planejamento fatorial completo 2<sup>2</sup>.

<b>Fontes de variação</b>	<b>Soma dos quadrados</b>	<b>Graus de liberdade</b>	<b>Quadrados médios</b>	<b>F calculado</b>
Regressão	264,32	3	88,11	27,12
Resíduo	22,74	7	3,25	
Falta de Ajuste	22,4779	5		
Erro Puro	0,2600	2		
Total	287,0623	10		

Resíduos = Falta de ajuste + Erro puro; Coeficiente de Correlação R= 0,92, F<sub>tab,95%</sub>=4,34

#### 4 - Casca de arroz/pectinase comercial

A Tabela 7 apresenta os coeficientes de regressão, erro padrão, valores de p e t(2), para a hidrólise de casca de arroz a um nível de confiança de 95 %. Verifica-se que a variável temperatura linear e a interação entre a temperatura e a agitação não apresentaram influência na hidrólise de casca de arroz. Os fatores não significativos foram adicionados à falta de ajuste para a análise de variância - ANOVA (Tabela 8).

Tabela 7 - Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de p e t do planejamento fatorial 2<sup>2</sup> completo para atividade de hidrólise de casca de arroz com aplicação ode pectinase comercial.

<b>Fator</b>	<b>Coeficientes de regressão</b>	<b>Erro padrão</b>	<b>t(2)</b>	<b>p</b>
Média	2,235244	0,120184	18,59857	0,002878
Temperatura (°C)(Q)	-0,553816	0,087953	-6,29676	0,024305
(2)Agitação (rpm)(L)	0,400504	0,073708	5,43368	0,032241
Agitação (rpm)(Q)	-0,679564	0,087953	-7,72649	0,016341

\*Fatores estatisticamente significativos (p<0,05)

Tabela 8 - Análise de variância para a hidrólise de casca de arroz com pectinase comercial, do planejamento fatorial completo 2<sup>2</sup>.

<b>Fontes de variação</b>	<b>Soma dos quadrados</b>	<b>Graus de liberdade</b>	<b>Quadrados médios</b>	<b>F calculado</b>
Regressão	4,64	3	1,55	10,10
Resíduo	1,07	7	0,15	
Falta de Ajuste	0,986090	5		
Erro Puro	0,086667	2		
Total	5,714091	10		

Resíduos = Falta de ajuste + Erro puro; Coeficiente de Correlação R= 0,81, F<sub>tab,95%</sub>=4,34