

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO – CAMPUS RIO VERDE
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA

USO DE RESÍDUOS AGRÍCOLAS PARA OBTENÇÃO DE
XILANAS

Autor: Giovani Deminski Ozanski
Orientador: Dr. Carlos Frederico de Souza Castro

RIO VERDE – GO
Fevereiro de 2018

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO – CAMPUS RIO VERDE
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA

USO DE RESÍDUOS AGRÍCOLAS PARA OBTENÇÃO DE
XILANAS

Autor: Giovani Deminski Ozanski

Orientador: Dr. Carlos Frederico de Souza Castro

Coorientador(a) interno(a): Dr(a). Eloiza da Silva Nunes

Coorientador externo: Dr. Jeferson Aparecido Moreto

Dissertação apresentada como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM AGROQUÍMICA, no Programa de Pós-Graduação em Agroquímica do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde – Área de concentração Agroquímica.

RIO VERDE – GO

Fevereiro de 2018

Sistema desenvolvido pelo ICMC/USP
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas - Instituto Federal Goiano

Ou Ozanski, Giovani Deminski
 Uso de Resíduos Agrícolas Para Obtenção de Xilanas /
 Giovani Deminski Ozanski; orientador Carlos Frederico
 de Souza Castro; co-orientadora Eloiza da Silva
 Nunes. -- Rio Verde, 2018.
 60 p.

 Dissertação (Graduação em Mestrado em Agroquímica) -
 Instituto Federal Goiano, Câmpus Rio Verde, 2018.

 1. Renovável. 2. Otimização. 3. Polissacarídeos. 4.
 Hidrólise. 5. Enzimática. I. Castro, Carlos Frederico
 de Souza, orient. II. Nunes, Eloiza da Silva, co-
 orient. III. Título.


INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO – CÂMPUS RIO VERDE
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA

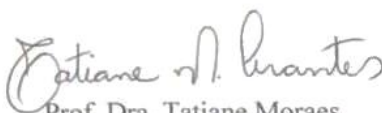
**USO DE RESÍDUOS AGRÍCOLAS PARA
OBTENÇÃO DE XILANAS**


Autor: Giovani Deminski Ozanski
Orientador: Carlos Frederico de Souza Castro

TITULAÇÃO: Mestre em Agroquímica – Área de concentração
Agroquímica.

APROVADA em 26 de fevereiro de 2018.


Prof.^a Dra. Cibele Silva Minafra
Avaliadora externa
IF Goiano/RV


Prof. Dra. Tatiane Moraes
Arantes
Avaliadora externa
UFG - Jataí


Prof. Dr. Carlos Frederico de Souza Castro
Presidente da banca
IF Goiano/RV

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sempre estar me iluminando, mostrando o melhor caminho e dando força para continuar e não desistir.

Aos meus pais, Giomar Ozanski e Adelaide Deminski, que nunca mediram esforços para que eu pudesse estudar, sempre me apoiaram e incentivaram.

À minha namorada Andressa Pereira de Jesus, que também foi minha IC, por me apoiar, ajudar nas análises, incentivar, cobrar e me aturar nos momentos de estresse, muito obrigado, sem você eu teria desistido e claro que não poderia deixar de agradecer também ao meu sogro Sr. Eliel e minha sogra dona Rosilene por sempre estarem nos apoiando.

Ao meu orientador Dr. Carlos Frederico de Souza Castro, meu muito obrigado por todas as vezes que me cobrou, deu alternativas, fazendo buscar o conhecimento e não deixou eu desistir.

Aos meus amigos e equipe do Laboratório de Química Tecnológica, Antonio, Matheus, Hellen e professor Igor, os quais nunca mediram esforços para me ajudar e pelos momentos de descontração os quais me davam animo para continuar.

Aos meus coorientadores Dr.^a Eloiza, Dr. Jeferson Aparecido e a professora Thais Moraes, que sempre me ajudaram com a construção do meu aprendizado, troca de informações e análises dos meus dados.

Ao professor Dr. Fernando Júnior Quites (in memoriam), por todas as ajudas que me ofereceu durante as realizações das análises.

Ao professor Dr. Rômulo, que me aceitou como IC durante minha graduação em química e me direcionou à realização do mestrado.

A galera do ônibus que me proporcionaram diversos momentos de descontração, e me ajudaram nos momentos mais difíceis que passei.

A todos os professores e equipe do Mestrado em Agroquímica por me proporcionar essa experiência em que aprendi que posso superar muitos obstáculos e crescer com cada desafio.

A todos os professores e amigos que conquistei durante minha jornada desde o jardim até a conclusão do meu mestrado.

Ao Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde, muito obrigado por me proporcionar essa oportunidade.

À CAPES pela concessão de bolsa de estudo, ao CNPQ e FAPEG.

O meu muito obrigado a todos vocês!

BIOGRAFIA DO AUTOR

Giovani Deminski Ozanski, natural de Cascavel – PR, filho de Adelaide Deminski e Giomar Ozanski, possui curso técnico em Alimentos e Licenciatura e Bacharelado em Química respectivamente iniciados em 2005 e 2010, ambos pelo Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde. Em 2016 ingressou no mestrado em Agroquímica no mesmo instituto e concluiu sua graduação em química. Lecionou a disciplina de química no Colégio Estadual Rafael Nascimento em Montividiu – GO, entre os anos de 2014 e 2016, atualmente é supervisor de qualidade em empresa privada.

ÍNDICE

	Página
AGRADECIMENTOS.....	IV
BIOGRAFIA DO AUTOR.....	VI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VIII
ÍNDICE DE TABELAS.....	IX
LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES.....	X
RESUMO.....	XI
ABSTRACT.....	XII
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Resíduos Agrícolas.....	2
1.1.1. Celulose.....	3
1.1.2. Hemicelulose.....	5
1.1.3. Lignina.....	6
1.1.4. Sabugo de Milho.....	8
1.1.5. Casca de Arroz.....	8
1.2. Xilana.....	9
1.3. Xilanases.....	10
1.3.1. Emprego de Xilanases.....	12
1.3.2. Obtenção de Xilanases.....	13
1.4. Referências.....	15
2. OBJETIVOS.....	21
2.1. Objetivo Geral.....	21
2.2. Objetivos Específicos.....	21

3. Emprego de Carboidratos Estruturais Obtidos de Resíduos Agroindustriais na Otimização Enzimática.....	22
Resumo.....	22
Abstract.....	23
3.1.Introdução.....	24
3.2.Material e Métodos.....	25
3.2.1. Obtenção e pré-tratamento da matéria-prima.....	25
3.2.2. Obtenção de carboidratos estruturais.....	25
3.2.3. Determinação e identificação dos carboidratos estruturais.....	26
3.2.4. Procedimento para bioprospecção de xilanases.....	26
3.2.5. Otimização da hidrólise enzimática da xilana.....	28
3.3.Resultados e Discussão.....	30
3.4.Conclusão.....	39
3.5.Referências.....	40

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Revisão Bibliográfica	
Figura 1: Estrutura da celulose formada por unidades de β -(1 \rightarrow 4)-D-glicopirranose, denominada de celobiose e destaque a ligação glicosídica (Adaptado de SANTOS <i>et al.</i> , 2012 e FARINAS, 2011).....	3
Figura 2: Representação estrutural da celulose demonstrando as ligações de hidrogênio intermoleculares e intramoleculares (Adaptado de SANTOS <i>et al.</i> , 2012).....	4
Figura 3: Típica estrutura de xiloglucano, hemicelulose de maior predominância, destacando a presença dos monossacarídeos presentes na cadeia principal (Adaptado de BUCKERIDGE <i>et al.</i> , 2000).....	5
Figura 4: Unidades precursoras e suas unidades formadas, posições suscetíveis a reações químicas, forma de enumeração dos carbonos no anel aromático e destaque para os carbonos α , β e γ (Adaptado de BRASIL, 2017).....	7
FIGURA 5: Estrutura do polímero xilana apontando a ação de enzimas xilanolíticas (Adaptado de GOMES, 2014).....	12
Emprego De Carboidratos Estruturais Obtidos De Resíduos Agroindustriais Na Otimização Enzimática	
Figura 01: Determinação da concentração de açúcares redutores totais produzidos pela atividade enzimática do fungo <i>Aspergillus fumigatus</i> (FLQT3-2), após a utilização dos parâmetros adotados no planejamento fatorial para pH e temperatura.....	36
Figura 02: Determinação da concentração de açúcares redutores totais produzidos pela atividade enzimática do fungo <i>Aspergillus novoparsiticus</i> (FLQT5-1), após a utilização dos parâmetros adotados no planejamento fatorial para pH e temperatura.....	37

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Tabela 01: Fungos utilizados para determinar a capacidade de degradação da xilana através da degradação de açúcares redutores.....	27
Tabela 02: Codificação do pH e da temperatura do experimento de otimização.....	29
Tabela 03: Tratamentos para otimização da hidrólise enzimática.....	29
Tabela 04: Parâmetros físicos obtidos do processo de obtenção de carboidratos estruturais de sabugo de milho (SM) e casca de arroz (CA).....	30
Tabela 05: Determinação quantitativa de monossacarídeos presentes nos hidrolisados de xilana de SM e de CA.....	31
Tabela 06: Avaliação de atividade dos fungos utilizados no bioprocesso, com destaque aos fungos <i>Aspergillus fumigatus</i> (FLQT3-2 e FLQT3-3), <i>Aspergillus niger</i> (FLQT4-1) e <i>Aspergillus novoparsiticus</i> (FLQT5-1).....	32
Tabela 07: Análise de variância estimados para liberação de ART pelo emprego da espécie de <i>Aspergillus fumigatus</i> (FLQT3-2) frente às variações de pH e temperatura...34	34
Tabela 08: Análise de variância estimados para liberação de ART pelo emprego da espécie de <i>Aspergillus novoparsiticus</i> (FLQT5-1) frente às variações de pH e temperatura.....	35

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES

%.....	Porcentagem
(C ₆ H ₅ O ₅) _n	Celulose
B.....	Beta
α.....	Alfa
γ.....	Gama
XyG.....	Xiloglucanos
GAX.....	Glucuronoarabinoxilanos
MN.....	Mananos
kg.....	Quilogramas
MJ.....	Megajoule
pH.....	Potencial hidrogeniônico
mm.....	Milímetro
NaOH.....	Hidróxido de Sódio
SM.....	Sabugo de Milho
CA.....	Casca de Arroz
min.....	Minuto
mL.....	Mililitro
°C.....	Graus Celsius
μL.....	Microlitro
M.....	Molaridade
BDA.....	Batata, dextrose, ágar
g.....	Gramas
atm.....	Atmosfera
cm.....	Centímetro
rpm.....	Rotações por minuto
mg.....	Miligrama
(C ₇ H ₄ N ₂ O ₇)	Ácido 3-5 diinitrosalicílico
DNS.....	Ácido 3-5 diinitrosalicílico
nm.....	Nanômetros
A.....	Absorbância
ART.....	Açúcares redutores totais
L.....	Litros

RESUMO

OZANSKI, GIOVANI DEMINSKI. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano Campus Rio Verde – GO, fevereiro de 2018. **Uso de resíduos agrícolas para obtenção de xilanas.** Carlos Frederico de Souza Castro “Orientador”; Eloiza da Silva Nunes “Coorientadora interna”; Jeferson Aparecido Moreto “Coorientador externo”.

O uso de resíduos agrícolas para obtenção de novos compostos possui vantagens como o baixo custo de obtenção e grande disponibilidade, além de se agregar valor a estes resíduos que muitas vezes são utilizados para obtenção de matéria orgânica através da decomposição dos mesmos. Aliar a utilização de resíduos agrícolas para obtenção de carboidratos estruturais, otimização de condições ideais de pH e temperatura para hidrólise enzimática, além de avaliar taxa de xilose e maior atividade volumétrica de fungos sobre os substratos selecionados, foram os objetivos do presente trabalho. Utilizou-se farinhas de sabugo de milho (SM) e de casca de arroz (CA) para hidrólise alcalina a fim de obter carboidratos estruturais (xilana), com rendimento de extração em torno de 21% para ambas as farinhas utilizadas, após a obtenção das xilanas, foi determinado o teor de xilose através da técnica *High-Performance Anion Exchange Chromatography Coupled with Pulsed Amperometric Detection* (HPAEC-PAD), sendo possível determinar em 73,52% e 37,99% o teor de xilose, respectivamente nas xilanas de SM e CA, levando a escolha da xilana de SM para continuação dos experimentos. Através da determinação de atividade volumétrica das espécies de fungos utilizadas, escolheu-se os fungos das espécies *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus novoparsiticus* por apresentarem maior valor de atividade volumétrica, respectivamente 0,273 U/ml e 0,033 U/ml. Com o emprego de condições variadas de pH e temperatura, determinou-se as condições ideais para hidrólise enzimática empregando a xilana de SM e as espécies

fúngicas citadas, sendo que para ambos os fungos utilizados as condições ideais de temperatura e pH encontradas estão na faixa de temperatura em torno de 35°C e pH 3,5, condições essas principalmente de temperatura pontos satisfatórios, pois, assemelha-se a temperatura ambiente e não há necessidade de consumo de energia excessiva para manutenção desta condição, a faixa de pH baixo, também não se demonstra como problema, pois muitos fungos possuem faixa ideal de atuação em torno de 4,0. A utilização de xilana de SM e do fungo da espécie *Aspergillus fumigatus* para otimização de hidrólise enzimática apresentaram resultados satisfatórios, empregando técnicas de obtenção de carboidratos estruturais de baixo custo e de fácil manipulação utilizando um resíduo agrícola de grande disponibilidade.

Palavras-chave: renovável, otimização, polissacarídeos, hidrólise, enzimática.

ABSTRACT

OZANSKI, GIOVANI DEMINSKI. Goiano Federal Institute of Education, Science and Technology, Rio Verde Campus - GO, February 2018. **Use of agricultural residues to obtain xylans.** Carlos Frederico de Souza Castro “Advisor”; Eloiza da Silva Nunes “Internal Co-Advisor”; Jeferson Aparecido Moreto “External Co-Advisor”.

The use of agricultural residues to obtain new compounds has advantages such as the low cost to obtain and high availability, besides adding value to these residues that are often used to produce organic matter through their decomposition. The objective of this work was to evaluate the use of agricultural residues to obtain structural carbohydrates, optimization of pH and temperature conditions for enzymatic hydrolysis, and to evaluate the xylose rate and higher volumetric activity of fungi on selected substrates. Corn (SM) and rice husk (CA) flours were used for alkaline hydrolysis in order to obtain structural carbohydrates (xylan), with extraction yield around 21% for both flours. After obtaining the xylan the xylose content was determined by *High Performance Anion Exchange Chromatography Coupled with Pulsed Amperometric Detection* (HPAEC-PAD), and was of 73.52% and 37.99% for SM and CA xilans respectively, which led to the choice of SM xylan to continue the experiments. The fungi of *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus novoparsiticus* were selected for their volumetric activity, as they had a higher value of it 0.273 U / ml and 0.033 U / ml, respectively. Evaluating a varied conditions of pH and temperature, the ideal conditions for enzymatic hydrolysis using SM xylan and fungal species were determined, and for both fungi used the ideal conditions of temperature and pH found are in the range around 35 ° C and pH 3.5, respectively. These conditions, mainly temperature are satisfactory points because it resembles the ambient temperature

so there is no need for excessive energy consumption to maintain this condition. The low pH range is also is not a problem because many fungi have an ideal range around 4.0. The use of SM xylan and the *Aspergillus fumigatus* fungus for optimization of enzymatic hydrolysis presented satisfactory results, using low cost and easy to handle structural carbohydrate techniques with a highly available agricultural residue.

Key words: renewable, optimization, polysaccharides, hydrolysis, enzymatic.

1. INTRODUÇÃO

Atividades agroindústrias como a produção de cereais, geram quantidades de resíduos consideravelmente altas, estes resíduos por sua vez recebem destinações como, o emprego para alimentação animal, decomposição de material orgânico, utilização para geração de energia através da queima, dentre outros. Uma vez que estes resíduos não recebam destinação correta ou emprego em atividades como a geração de energia, eles são fontes geradoras de problemas ambientais (PINTO *et al.*, 2005).

Diariamente, diversas fontes e formas são utilizadas para se obter novos produtos, assim fibras vegetais oriundas de resíduos agrícolas estão no foco. Essas fibras vegetais aliam a alta disponibilidade, baixo custo de obtenção e muitas vezes baixa aplicabilidade, as quais podem ser empregadas para obtenção de novos produtos ou utilizadas para aperfeiçoamento de técnicas (MEDRONHO *et al.*, 2012).

Resíduos agrícolas, geralmente são fontes de polissacarídeos ou carboidratos poliméricos os quais exercem a função central nos organismos como reserva energética, manutenção da integridade celular, sinalizadores e protetores celulares (PERSIN *et al.*, 2011).

O sabugo de milho, um dos resíduos agrícolas gerados da produção do grão, encontra-se entre as 2,3 toneladas de resíduos gerados na produção de cada tonelada deste cereal, e estão inclusos a palha, folhas, caule e o sabugo, mostrando uma alternativa atraente na busca de fonte para novos produtos (PRETO *et al.*, 2010).

Sendo um dos mais abundantes subprodutos gerados da agricultura, a casca de arroz, gerada do beneficiamento, pode ser empregada desde complementação em cimentos e borrachas, até a fabricação de chips eletrônicos, e destinação para alimentação animal, a casca de arroz também é destinada a obtenção de matéria orgânica ou obtenção

de energia através da queima da mesma, sendo que os dois últimos empregos são processos emissores de dióxido de carbono na atmosfera (BERGQVIST *et al.*, 2008).

A busca pelo desenvolvimento de novos materiais, que possam ser de fontes renováveis, através de técnicas sustentáveis e que tenham menor impacto ambiental, têm se mostrado cada vez mais atraentes, por apresentarem características que aliam a utilização da fibra vegetal e o emprego da mesma têm assumido papel importante nesta busca.

1.1. Resíduos Agrícolas

Ao se tratar do meio ambiente, a grande quantidade de material residual proveniente de atividades agrícolas é gerado constantemente. Estes resíduos muitas vezes não possuem destinação eficaz, sendo em sua maioria empregados na decomposição orgânica como fonte de adubo para o solo, alimentação animal ou queimados para geração de energia, levando a emissão de gases intensificadores do efeito estufa ocasionando grande impacto ambiental negativo (SCHULZ, 2013).

Materiais lignocelulósicos, com enorme potencial de uso, mostram-se como recursos orgânicos mais abundantes da terra. Sendo que o material lignocelulósico obtido de resíduos agrícolas como bagaço de cana-de-açúcar, palha de trigo ou arroz, sabugo de milho, casca de soja, aveia ou arroz, entre outros são fontes de materiais lignocelulósicos e empregados em processos industriais, como geração de energia, biocombustíveis e biofertilizantes (TENGERDY; SZAKACS, 2003).

As fibras vegetais presentes nos resíduos agrícolas são constituídas principalmente de polímeros como celulose, hemicelulose e lignina nas proporções respectivas de 20 a 60%, 20 a 30% e 15 a 30%, estas proporções dos principais constituintes variam conforme a parte da planta em análise, a idade e a espécie em estudo (MENEZES *et al.*, 2015).

O desenvolvimento de novos produtos principalmente com base em fibras naturais, está sendo constantemente obtido de diferentes formas e fontes, a utilização dos mesmos também tem sido descrita. A utilização de técnicas de caracterização de morfologia e constituição se fazem necessárias para que o desenvolvimento desses novos produtos seja visto como relevante (MEDRONHO *et al.*, 2012).

As matérias-primas de fonte vegetal, além de serem provenientes de fontes renováveis, apresentam características como baixa densidade e estruturas químicas que possibilitam a utilização das mesmas como precursores de novos compostos (SILVÉRIO, 2013 e TAIPINA *et al.*, 2011).

1.1.1. Celulose

Com estrutura rígida, cristalina e linear, a celulose $(C_6H_5O_5)_n$, representado na Figura 1, é formada por unidades de β -(1 \rightarrow 4)-D-glicopirranose as quais são unidas por ligações glicosídicas (β -1,4), arranjadas de forma que os grupos OH (2), OH (3) e CH_2OH fiquem posicionados formando cadeias lineares equatoriais nas unidades da fibra β -(1 \rightarrow 4)-D-glicopirranose. Essa conformação confere rigidez à fibra, que pode conter até 10.000 unidades de glicose repetidas em duas unidades de glicose anidra (celobiose), esta característica faz com que para quebrar esta conformação, tratamentos severos (ROCHA *et al.*, 2017), como utilização de ataque alcalino em alta temperatura seja usado.

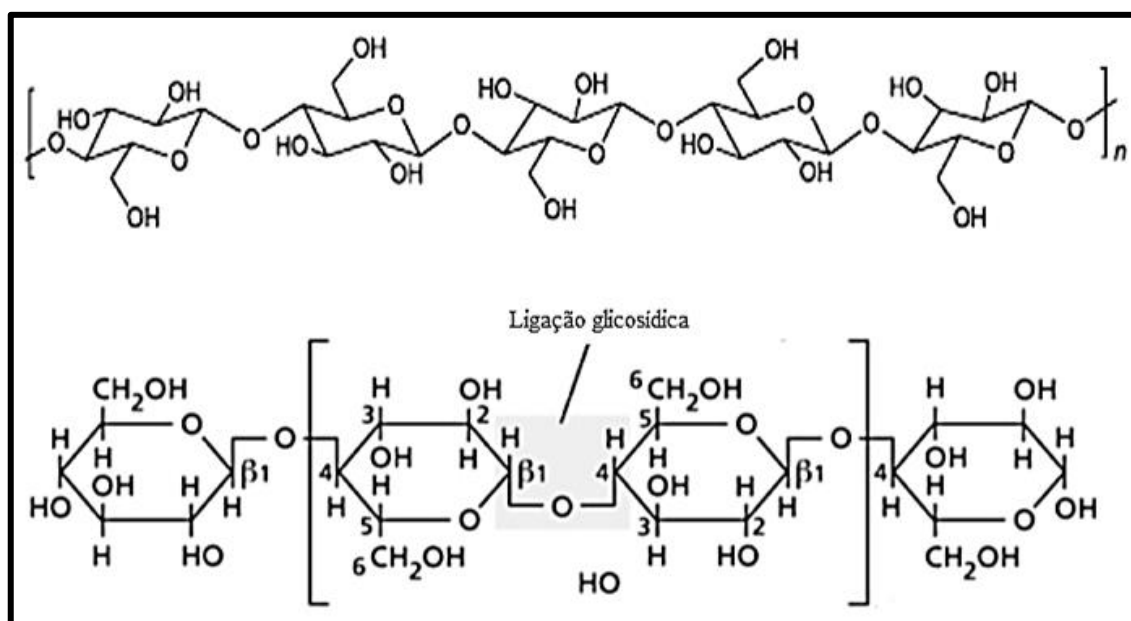


Figura 1: Estrutura da celulose formada por unidades de β -(1 \rightarrow 4)-D-glicopirranose, denominada de celobiose e destaque a ligação glicosídica (Adaptado de SANTOS *et al.*, 2012 e FARINAS, 2011).

A celulose é classificada como carboidrato ou polissacarídeo, é o polímero natural de maior abundância e essencial para os vegetais, como a unidade fundamental da macromolécula é a anidro-*d*-glicose, que possui hidroxilas, as quais fazem ligações de

hidrogênio intramoleculares e intermoleculares que são responsáveis respectivamente pela resistência de formação da fibra vegetal, como apresentado na Figura 2. Essas ligações também mantêm as regiões cristalinas, tornando a celulose resistente ao ataque ácido, ou ataque ocasionado por enzimas e substâncias alcalinas (SANTOS *et al.*, 2012).

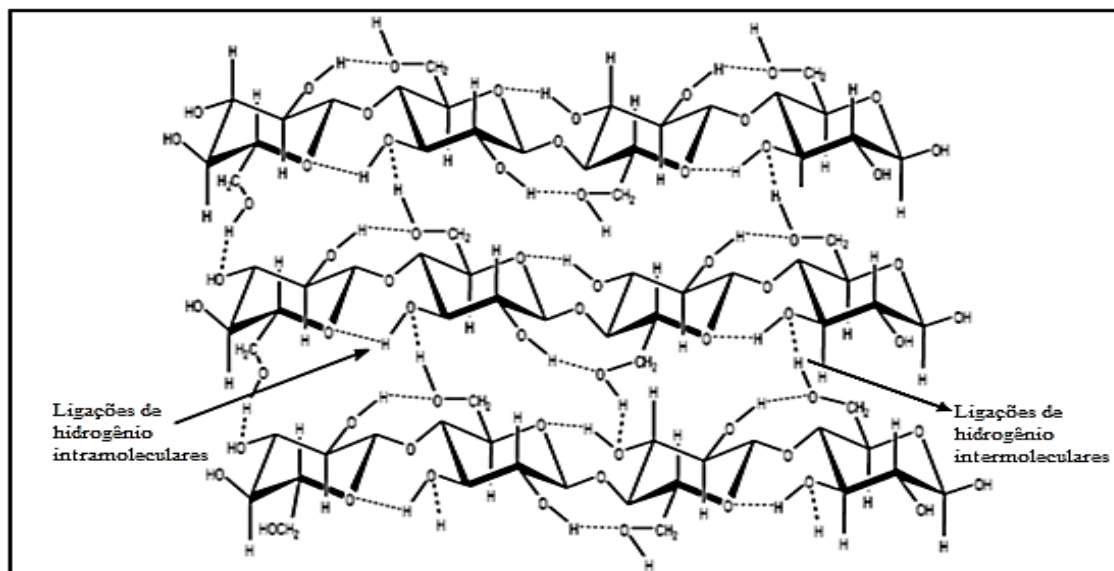


Figura 2: Representação estrutural da celulose demonstrando as ligações de hidrogênio intermoleculares e intramoleculares (Adaptado de SANTOS *et al.*, 2012).

Devido as ligações glicosídicas, a celulose apresenta tendência de cristalização distinta, quando comparada com outros polímeros naturais, além de ligações de hidrogênio intramoleculares e intermoleculares (MARIANO, 2016).

Outra característica da celulose é a formação de cristais, que dão a característica de insolubilidade, sendo atribuída a baixa flexibilidade das ligações glicosídicas, a capacidade de formar ligações de hidrogênio e a rigidez da celulose, pela baixa entropia em solução. Essa insolubilidade resultante das ligações de hidrogênio, resulta em melhoria das propriedades mecânicas e de barreira dos compostos celulósicos (MEDRONHO *et al.*, 2012).

As hidroxilas e acetais, são descritas como as funções químicas mais importantes presentes na celulose, influenciando nas características estruturais e químicas. Essas características conferem resistência aos agentes oxidantes, estabilidade térmica, baixa reatividade, rede rígida dos nanocristais, proteção mecânica e controle ao acesso de compostos químicos, enzimas ou degradação microbiana aos grupos funcionais (MARIANO *et al.*, 2016).

1.1.2. Hemicelulose

As hemiceluloses presentes nos resíduos agrícolas, são classificadas como heteropolímeros ramificados e lineares, de massa molecular menor que a celulose. Estas hemiceluloses realizam a conexão entre a lignina e celulose e atuam como reserva energética. As hemiceluloses são compostas de D-xilose, L-arabinose (pentoses), D-glicose, D-manose e D-galactose (hexoses), sendo que a origem do material lignocelulósico faz com que varie a taxa de hemicelulose, os compostos como xilose e arabinose são os monômeros principais da hidrólise das hemiceluloses. As hemiceluloses são classificadas conforme a predominância do monossacarídeo nas ramificações e cadeia principal (SILVEIRA, 2010). Os xiloglucanos (XyG), glucuronoarabinoxilanos (GAX) e mananos (MN), são as hemiceluloses mais encontradas nas plantas, porém em todas as hemiceluloses encontradas, observa-se uma cadeia principal de monossacarídeos de glicose, xilose e manose, esta cadeia principal pode ter ramificações com monossacarídeos diversos (FARINAS, 2011). A Figura 3 mostra uma típica estrutura de hemicelulose e destaca também os grupos de monossacarídeos presentes na estrutura.

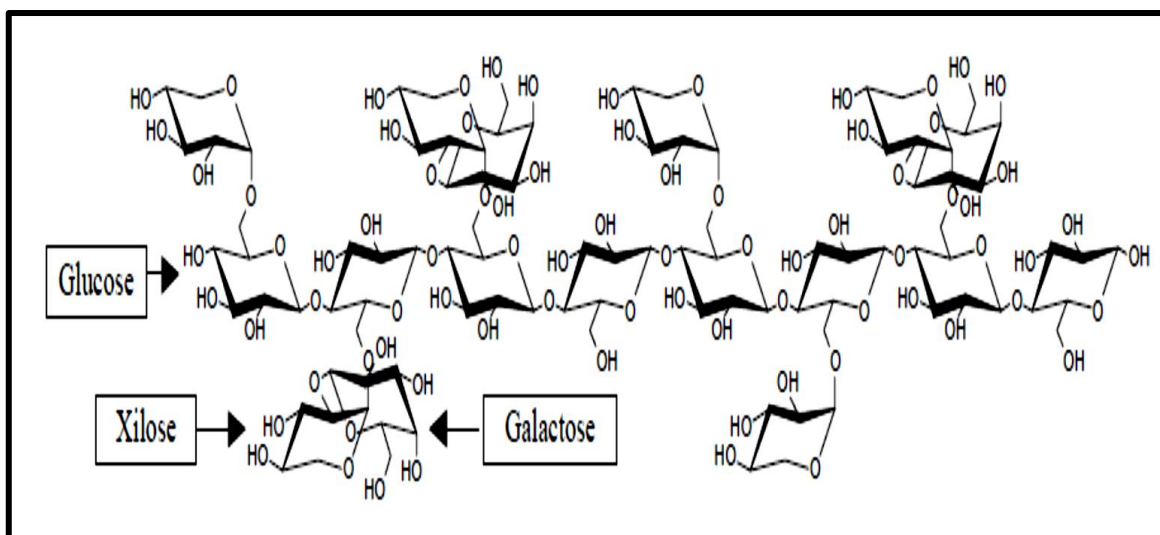


Figura 3: Típica estrutura de xiloglucano, hemicelulose de maior predominância, destacando a presença dos monossacarídeos presentes na cadeia principal (Adaptado de BUCKERIDGE *et al.*, 2000).

As hemiceluloses são mais solúveis que a celulose, por apresentarem menor massa molecular e sofrem hidrólise rapidamente, pelas ligações glicosídicas se quebrarem

facilmente, permitindo a utilização de seus açúcares como a D-xilose (SANTOS *et al.*, 2005).

Os polissacarídeos denominados de heteroxilanas ou xilanas, são formados por unidades de D-xilose unidas por ligações glicosídicas β -1 \rightarrow 4 na cadeia principal e nas cadeias laterais estruturas como ácidos urônicos, L-arabinose e oligossacarídeos, são frequentemente encontrados como os constituintes principais das xilanas (SILVEIRA, 2010).

1.1.3. Lignina

O terceiro e último constituinte, mas não menos importante, a lignina apresenta-se como polímeros constituído da união de monômeros, os quais são ligados covalentemente. A estrutura da lignina parte da polimerização de unidades de fenilpropanoides, a partir de três precursores primários, que são os álcoois sinapílico, p-cumarílico e coniferílico, que são precursores respectivamente das unidades siringil, p-hidroxifenílicas e unidades guaiacil. Na Figura 4 estão presentes as estruturas dos três principais precursores da lignina e suas unidades formadas, destaca-se também as posições mais suscetíveis a sofrerem ataques de outros grupos químicos, o que proporciona grande possibilidade de combinações para formação estrutural, que provoca certa incerteza na demonstração da estrutura da lignina, além de indicar o carbono denominado α (carbono benzílico da cadeia alifática) e os demais carbonos β e γ , é apresentado também a forma de enumeração dos carbonos presentes no anel aromático que deve ser do carbono ligado a cadeia alifática indo para o substituinte próximo (BRASIL, 2017).

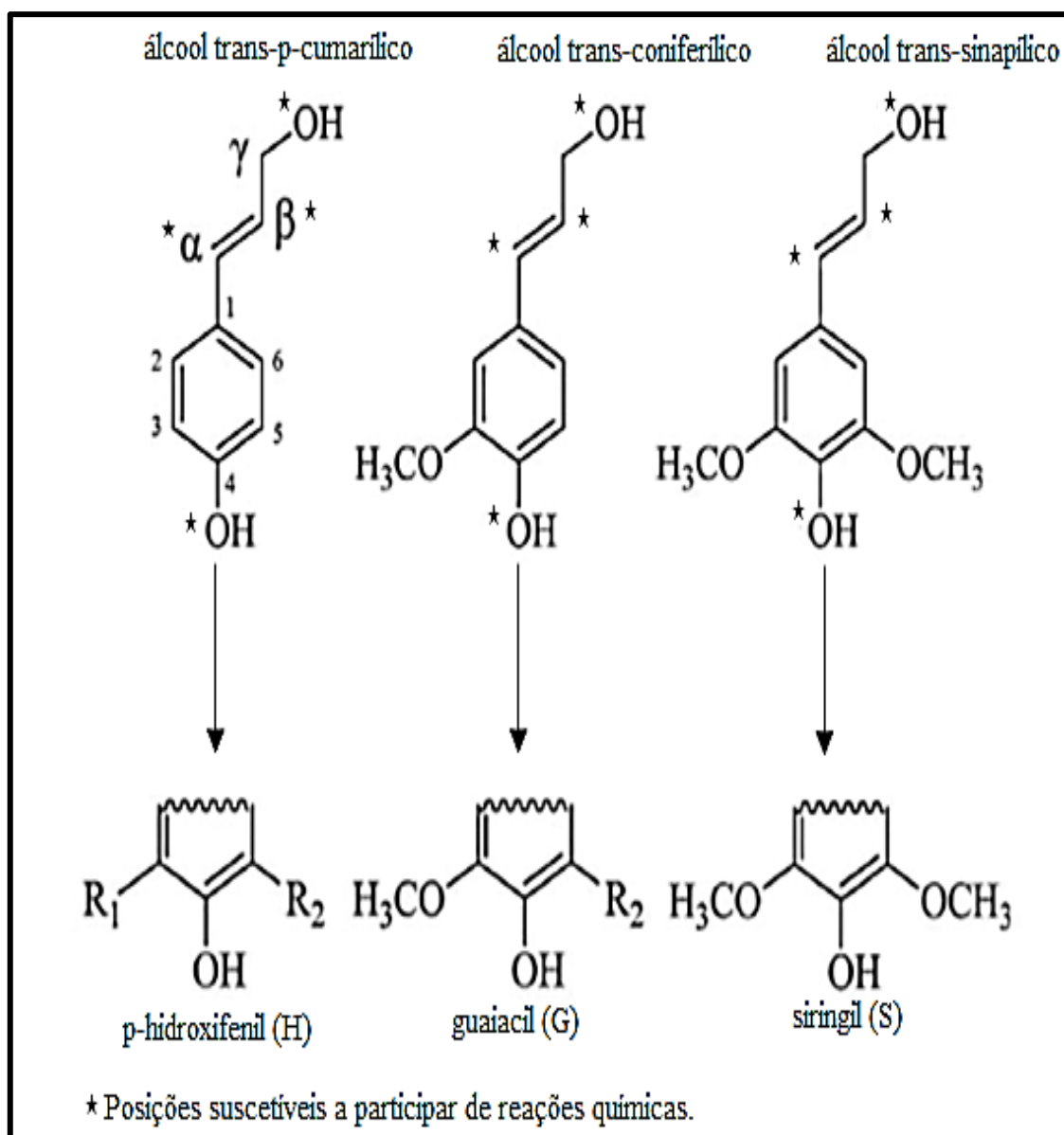


Figura 4: Unidades precursoras e suas unidades formadas, posições suscetíveis a reações químicas, forma de enumeração dos carbonos no anel aromático e destaque para os carbonos α , β e γ (Adaptado de BRASIL, 2017).

A quantidade de lignina assim como a quantidade do monômero estrutural da mesma, variam de acordo com a espécie, idade, tecido e fração da parede celular de cada planta. A lignina é o composto fenólico mais abundante da natureza, com estrutura tridimensional em rede macromolecular disposta de forma aromática é mais hidrofóbica que as outras duas estruturas da fibra vegetal, servindo como ligante das fibras vegetais, conferindo força e rigidez a estrutura dos vegetais, proporcionando resistência a entrada da grande parte de microrganismos, a lignina também possui a função de impermeabilizar a parede celular (MENEZES *et al.*, 2015).

1.1.4. Sabugo de milho

Do ponto de vista ambiental e comercial, a utilização de resíduos agrícolas como o sabugo de milho, mostra-se uma alternativa plausível. Além da geração de novos produtos a partir de resíduos, também fornece valor agregado e diminuição de resíduos em decomposição no meio ambiente, ocasionando redução no impacto ambiental negativo ocasionado pela emissão de gases (SCHULZ, 2013).

Pertencente à família *Gramineae*, o milho (*Zea mays*), produz o sabugo, que sustenta os grãos, este é tratado como resíduo após o grão ser debulhado e muitas vezes não recebe uma aplicação com valor agregado maior. A produção de sabugo de milho chega a 180 kg por tonelada de milho processado (ROCHA *et al.*, 2017).

Segundo o décimo levantamento referente à safra de 2016/2017, realizado pela Conab em julho de 2017, reunindo a primeira e segunda safra de milho no Brasil, a área plantada atingiu cerca de 17.391,3 mil hectares com produção recorde do grão de aproximadamente 96.026,2 mil toneladas, com acréscimo percentual de 44,3% em relação à safra 2015/2016 (CONAB, 2017).

O sabugo de milho, um dos rejeitos gerados, é fonte de celulose, hemicelulose e lignina, e um tratamento adequado a essa matéria-prima deve ser considerado, para que se possa dar destinação mais nobre e para que o mesmo possa ser utilizado no desenvolvimento de novos produtos além da utilização na alimentação animal, obtenção de matéria orgânica e geração de energia. (VIEIRA, 2014).

1.1.5. Casca de Arroz

Sendo um dos mais abundantes subprodutos gerados da agricultura, a casca de arroz gerada do beneficiamento, gira em torno de 23% da massa de arroz em casca, ou seja, grande quantidade de casca de arroz como consequência (DELLA, *et al.*, 2001), onde se faz necessário uma destinação mais nobre a esta fonte de material lignocelulósico que pode ser utilizada de diversas formas.

Com baixo custo de produção, a casca de arroz se apresenta um composto de difícil reaproveitamento, pelo alto teor de sílica e poucas propriedades nutritivas, formada por materiais inorgânicos, celulose e lignina, com poder calorífico de aproximadamente 16 MJ/kg, cerca de 13% de cinzas, representa 20% de peso do grão a que recobre o mesmo

e com esses valores elevados, principalmente de poder calorífico, a casca de arroz é muito empregada em reatores na geração de energia, reduzindo o impacto ambiental que causaria, caso a mesma fosse deixada no solo para decomposição e obtenção de matéria orgânica (FERNANDES, *et al.*, 2015).

A casca de arroz pode ser empregada desde a fabricação de chips eletrônicos até a complementação em cimentos e borrachas. Porém, a casca de arroz tem sido utilizada na produção de energia, em que é queimada, ou alternativamente, deixada no solo para obtenção de matéria orgânica, sendo os dois processos emissores de dióxido de carbono na atmosfera, outra utilização é como complemento em ração para animais (BERGQVIST *et al.*, 2008).

1.2. Xilana

A segunda maior estrutura orgânica da parede vegetal, a hemicelulose com seu maior polímero a xilana e o emprego deste componente em processos biotecnológicos é de grande relevância no âmbito industrial, através da aplicação e utilização de complexos enzimáticos através da utilização de fungos, sendo que a xilana pode ser empregada na área alimentícia, de biocombustíveis, de bebidas, indústria têxtil, de papel até na lavoura (SILVA, *et al.*, 2015).

Arabinogalactana, galactoglicomanana, xiloglicana, glicomanana e xilana, formam um complexo polimérico formador das hemiceluloses, com destaque para o principal polímero a xilana, formada na cadeia principal por unidades de D-xilopiranosas unidas por ligações glicosídicas β -(1→4) (SHALLOM, *et al.*, 2003; HABIBI, *et al.*, 2005).

A xilana é um polímero que ocorre nas estruturas de plantas terrestres e o teor deste polímero varia de planta para planta e da parte da planta em análise, o mesmo além de ser encontrado e extraído de plantas, também é encontrado e extraído de resíduos agroindustriais (HABIBI, *et al.*, 2005).

Para utilização da xilana em processos biotecnológicos como a produção de xilooligosacarídeos, os quais são formados por unidades de xilose e que são amplamente utilizados na indústria farmacêutica e alimentícia, a xilana deve ser separada do material lignocelulósico, podendo ser empregadas técnicas que utilizam de tratamento enzimático com enzimas nativas de xilanas contidas no material lignocelulósico, fracionamento

químico de xilana através de compostos álcalis e amônia ou mistura destes compostos seguido de quebra enzimática, sendo que a utilização de compostos alcalinos é favorecido pela estabilidade do pH da xilana que pode ser recuperada através de precipitação com cetonas, ácidos ou álcoois (MENEZES, *et al.*, 2008).

Um dos produtos gerados da utilização da xilana é o xilitol, um álcool de xilose (pentahidroxiado), que possui alto poder adoçante, o mesmo é obtido através de hidrogenação catalítica da xilose pura e para que se tenha rendimento bom a fonte lignocelulósica deve ser rica em xilana, a produção de xilitol deve-se ao fato do mesmo ser uma substância de baixa toxicidade e destacar-se por ser um adoçante empregado na dieta para diabéticos, utilizado na produção de bebidas, geleias, sorvetes, chocolates, balas e etc., além de não possuir em sua estrutura grupos funcionais cetônicos ou aldeídicos que participam de reações de escurecimento nos alimentos, o xilitol pode ser empregado também na substituição da lactose em alimentos destinados para alérgicos e os alimentos que receberam xilitol em vez de sacarose, possuem sabor aceitável e maior tempo de conservação, pois o xilitol não é degradado por muitos microrganismos (SILVA, *et al.*, 1994).

Diversos processos industriais utilizam a xilana, como na produção de furfural e papel, em produtos alimentícios como na panificação em que as xilanas presentes na farinha de trigo deixam as massas mais macias após o cozimento pela capacidade que a xilana possui de absorver água aumentando o tempo de vida das massas por causa das interações entre o amido e a xilana presente na massa (SILVA, *et al.*, 1998).

1.3. Xilanases

Bioprocessos que empregam resíduos agrícolas possibilitam a destinação dos resíduos que causariam problemas ambientais, pela decomposição e acúmulo dos mesmos na natureza, além de fornecerem valor agregado a matérias-primas pouco utilizadas as quais podem ser utilizadas como substrato para crescimento celular desde a geração de bioprodutos como enzimas e até processos que utilizem o crescimento celular para fermentação (PERRET *et al.*, 2015).

Substratos lignocelulósicos podem ser utilizados na indução de enzimas e crescimento de fungos, dentre as enzimas destacam-se ligninases, pectinases, celulases e as hemicelulases (xilanases), a xilose presente em hemiceluloses podem ser

transformadas em ácidos orgânicos de cadeia curta como os ácidos fórmico e acético ou em xilitol e furanos (MARTINS *et al.*, 2011).

A ação conjunta de enzimas, as chamadas endoenzimas, quebram os polímeros do segundo maior polissacarídeo da natureza, ou seja, a hemicelulose, as endoenzimas quebram a cadeia principal deste polissacarídeo, liberando açúcares monoméricos através da ação das exoenzimas, dependendo do tipo de hemicelulose, as cadeias laterais são quebradas liberando mono ou dissacarídeos (SOUZA, 2014).

Com a capacidade de catalisar a hidrólise do xilano por causa da estrutura heterogênea das xilanases, as quais para fazerem sua total degradação demandam de um complexo xilanolítico, e dependem de sua origem, sendo que os componentes de maior destaque para este tipo de sistema é das endoxilanases e as β -xylosidases, clivando o xilano randomicamente, uma ou mais isoformas de endo-1,4- β -xilosidase (1,4- β -D-xilano-hidrolase, EC 3.2.1.8), em suas ligações β -1,4 em fragmentos pequenos como xilobiose e xilotriose. Sendo uma enzima muito importante industrialmente, a xilanase pode ser aplicada em diversos processos como a bioconversão de material lignocelulósico em produtos fermentescíveis, digestibilidade de rações, melhoramento de características como consistência de cervejas e clarificação de sucos (KANIMOZHI *et al.*, 2014).

A reatividade e a conformação física da cadeia principal das hemiceluloses, são determinadas pelas cadeias laterais, ou seja pelo tipo e quantidade de cadeias laterais, sendo que estas características também influenciam na clivagem da hemicelulose, a diversificação e quantidade de componentes da hemicelulose, são influenciados pela idade e parte da planta, assim como a composição do solo que esta planta está enraizada, sendo que o componente predominante na grande parte de biomassas agrícolas é a xilana que dependendo da quantidade de ramificações na cadeia principal, podem ser classificadas como homoxilanas, glucuronoxilanas, glucuronoarabinoxilanas ou arabinoxilanas (MOTTA *et al.*, 2013; KANIMOZHI *et al.*, 2014).

A Figura 5 apresenta a estrutura da xilana e pontos em que enzimas xilanolíticas quebram a estrutura do polissacarídeo.

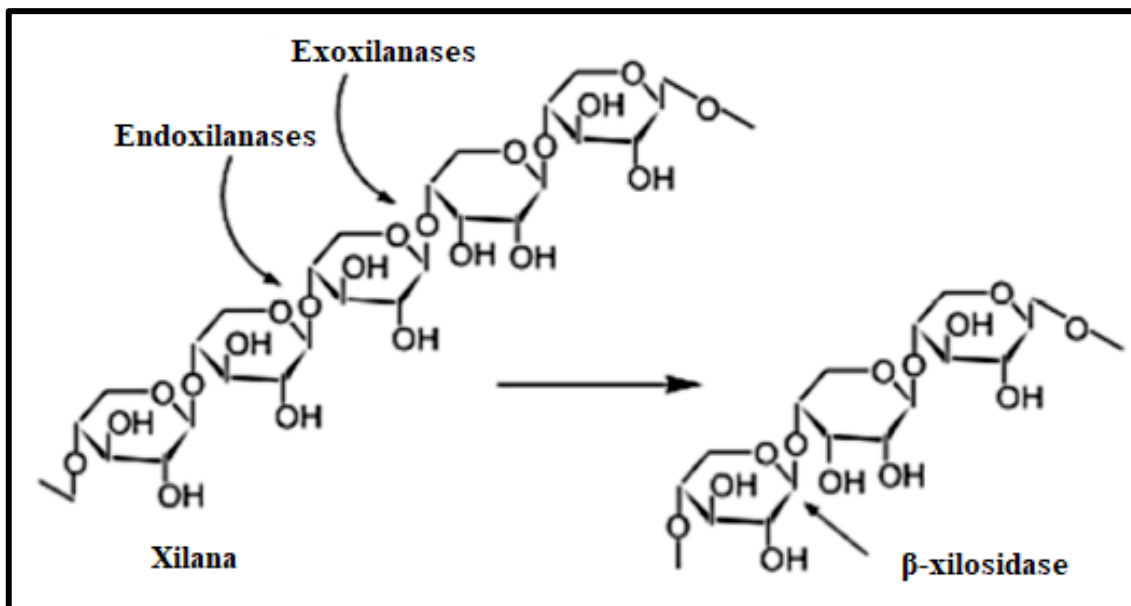


FIGURA 5: Estrutura do polímero xilana apontando a ação de enzimas xilanolíticas (Adaptado de GOMES, 2014).

1.3.1. Emprego de Xilanases

O emprego de xilanases na área industrial, varia desde o emprego na fabricação de pães, produção de cerveja até clarificação de papel e produção de biodiesel. Em razão da capacidade de interagir com o glúten e absorção de água, as xilanas são utilizadas para melhorar a qualidade de pães, através da hidrólise do amido e da arabinoxilana que deixa o glúten livre, e influencia na estrutura da massa, no volume, estrutura do miolo e facilita o manuseio da massa, estas xilanases não são apenas utilizadas para massas de pães, também são empregadas na produção de biscoitos, bolos e demais produtos da área de panificação (BUTT *et al.*, 2008).

Na produção de vinhos e sucos, extração, clarificação de frutas têm-se o emprego de xilanases, para estabilizar, clarificando os sucos. Abre-se mão da utilização de xilanases na produção de cervejas, e ocorre a liberação de cadeias de arabinoxilanas longas que podem deixar a cerveja mais turva e aumentam a viscosidade da bebida, as xilanases são utilizadas neste processo para diminuir a turbidez e viscosidade, pois estas enzimas solubilizam as arabinoxilanas em oligossacarídeos menores (BUTT *et al.*, 2008 e MOTTA *et al.*, 2013).

No processo de fabricação de rações para animais, os xilooligossacarídeos produzidos pelas xilanases, atuam como pré-bióticos no trato digestivo do animal, pois

estimulam a atividade de microrganismos através do crescimento da flora intestinal, as xilanases atuam também intensificando a absorção e aumentando a digestibilidade dos ingredientes das rações no organismo do animal, além da redução no custo das rações (LAFOND *et al.*, 2011 e HARRIS *et al.*, 2010).

A produção de papel utiliza também xilanases, pois estas hidrolisam a xilana liberando a lignina sem danificar a celulose durante o processo de polpação e branqueamento da fibra vegetal na produção de papel, estas enzimas são usadas pois aumentam e facilitam o processo de branqueamento das fibras vegetais em estágios posteriores com agentes como o cloro, diminuindo a poluição ambiental (LOMBARDI, 2013). As xilanases aumentam o brilho e a resistência do papel, quando o processo de branqueamento é totalmente livre de compostos clorados (BORGES, 2010). Porém para que se tenha maior eficiência destas enzimas no processo de branqueamento, deve-se utilizar coquetéis enzimáticos com resistência a alta temperatura e alcalinidade e livres de celulases (LOMBARDI, 2013).

Quando se trata da geração de energia limpa como a produção de biocombustíveis, o emprego de enzimas também ocorre, através da conversão da biomassa lignocelulósica em açúcares fermentáveis para produção de etanol (segunda geração) (OGEDA *et al.*, 2010). Porém tratamentos preliminares como tratamentos com ácidos ou alcalino, são de extrema importância antes da hidrólise enzimática, pois estes separam a celulose e hemicelulose da lignina, após os tratamentos preliminares, a biomassa então é submetida a ação de enzimas que hidrolisam a hemicelulose e celulose em partículas menores, para que ocorra a fermentação da biomassa através de microrganismos, a xilose obtida da ação de xilanases pode ser convertida em etanol por meio de fermentação (BUTT *et al.*, 2008; HARRIS *et al.*, 2010; FALKOSKI, 2011).

1.3.2. Obtenção de Xilanases

O cultivo de fungos para obtenção de enzimas hidrolíticas mostra-se um sistema com muitas vantagens, como, liberação eficiente de enzimas, grande quantidade de enzimas produzidas e grande capacidade de crescimento e produção em diversos substratos, incluindo substratos sólidos, os fungos dos gêneros *Aspergillus* sp, *Penicillium* sp, *Melanocarpus* sp e *Fusarium* sp, são os mais empregados para obtenção

de xilanases pela capacidade de produção das mesmas (FALKOSKI, 2011 e KRONBAUER *et al.*, 2007).

Para que os fungos possam obter alimentos os nutrientes presentes no substrato devem estar em solução, pois os fungos realizam a absorção dos mesmos pela parede das células, alguns fungos ligninolíticos segregam enzimas que agem sobre as substâncias através do micélio, em outros fungos o micélio emite os haustórios, órgãos que penetram nos tecidos e absorvem os alimentos, as enzimas liberadas pelos fungos possuem a função de auxiliarem na nutrição dos mesmos, através da deterioração dos substratos e os mesmos estão presentes, a utilização de enzimas lignocelulolíticas possui grande aplicabilidade na reaproveitamento de resíduos agroindustriais, além de emprego em correção de solos e tratamento de efluentes e os fungos pertencentes ao grupo dos Ascomycetes são os principais produtores de enzimas lignocelulósicas, as quais podem ser empregadas sobre resíduos agroindustriais para produção de novos compostos ou reaproveitamento dos mesmos de maneira mais eficiente (FASANELLA, 2008).

As fontes mais comuns hemicelulases como as xilanases são os fungos, que produzem xilanases termofílicas de grande importância comercial (BUTT *et al.*, 2008).

Fungos filamentosos são os fungos que constituem o gênero *Aspergillus*, o qual possui grande número de espécies, estes são encontrados principalmente em matéria orgânica em decomposição, em grande diversidade de ambientes e condições, algumas espécies do gênero produzem esporos sexuados e assexuados, porém em algumas espécies a forma sexuada ou é rara ou nunca foi observada, como sua dispersão é ampla em praticamente todos os ambientes, em torno de 250 espécies são reconhecidas oficialmente, formando o grupo Ascomycetes, grupo de fungos filamentosos, que é morfológicamente caracterizado pelo seu conidióforo, e é encontrado os conidiósporos ou esporos e pelas células da hifa, ramificando-se os conidióforos, sendo que a cor, arranjo e tamanho dos conidiósporos, são utilizados para identificação e divisão do gênero em subgrupos, observa-se também neste grupo representantes causadores de doenças em humanos, ou seja, agente patogênicos como é o caso do *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* (BENNETT, 2010).

A bioconversão de material lignocelulósico por xilanases, tem grande destaque e aplicabilidade do ponto de vista industrial e a utilização de fungos filamentosos produtores destas enzimas são de grande importância devido os mesmos liberarem enzimas capazes de converter o xilano sem a necessidade de interrupção celular ou

purificação dos resíduos por processos que demandem grande gasto de energia ou recursos (HARRIS *et al.*, 2010).

1.4. Referências

BENNETT, J. W. An Overview of the Genus *Aspergillus*. ***Aspergillus Molecular Biology and Genomics***, Edited by Mosayuki Machida and Katsuya Gomi, Caister Academic Press, ISBN: 978-1-904455-53-0, 2010.

BERGQVIST, M. M; WÅRDH, K. S; DAS, A; AHLGREN, E. O. A techno-economic assessment of rice husk-based power generation in the mekong river delta of Vietnam. **Wiley InterScience**, 65p, ago, 2008.

BORGES, M. T. Efeitos da aplicação de xilanase na polpa kraft-o de eucalipto. **Dissertação (mestrado)** – Universidade Federal de Viçosa, Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal, 2010.

BRASIL, H. F. F. Conversão de composto modelo de lignina por óxidos mistos derivados de hidrotalcitas [Mg, Ni, Cu-Al-CO₃]. **Dissertação (mestrado)** – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, 2017.

BUCKERIDGE, M. S.; TINÉ, M. A. S.; SANTOS, H. P.; LIMA, D. U. Polissacarídeos de reserva de parede celular em sementes. Estrutura, metabolismo, funções e aspectos ecológicos. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, 12 (Edição Especial), p. 137-162, 2000.

BUTT, M. S.; TAHIR-NADEEM, M.; AHMAD, Z.; SULTAN, M. T. Xylanases and Their Applications in Baking Industry. **Food Technol. Biotechnol.** 46 (1) 22-31, ISSN 1330-9862, 2008.

CONAB. *Acompanhamento da Safra Brasileira Grãos*. ISSN 2318-6852. **Acomp. safra bras.grãos**, v.4 – Safra 2016/17 – Décimo levantamento, Brasília, p.1-171, julho 2017.

DELLA, V. P.; KÜHN, I.; HOTZA, D. Caracterização de cinza de casca de arroz para uso como matéria-prima na fabricação de refratários de sílica. **Química Nova**. Vol. 24, No. 6, p. 778-782, 2001.

FALKOSKI, D. L. Enzimas Lignocelulolíticas de Fungos de Podridão Branca e Fitopatógenos: Produção, Caracterização e Aplicação em Processos de Sacarificação da Biomassa. **Tese (doutorado)** – Universidade Federal de Viçosa, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, 2011.

FARINAS, C. S. A parede celular vegetal e as enzimas envolvidas na sua degradação. **Embrapa Instrumentação**. Documentos: 54, ISSN: 1518-7179, São Carlos, 2011.

FASANELLA, C. C. Ação das enzimas ligninolíticas produzidas por *Aspergillus niger* e *Penicillium* sp. em bagaço de cana-de-açúcar tratado quimicamente. **Dissertação (mestrado)** – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2008.

FERNANDES, I. J.; SANTOS, E. C. A.; OLIVEIRA, R.; REIS, J. M.; CALHEIRO, D.; MORAES, C. A. M.; MODOLO, R. C. E. Caracterização do Resíduo Industrial Casca de Arroz com Vistas a sua Aplicação como Biomassa. **6º Fórum Internacional de Resíduos Sólidos**, São José dos Campos – SP, 2015.

GOMES, K. S. Purificação e caracterização de xilanases do fungo *Chrysosporthe cubensis* e utilização na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar. **Dissertação (mestrado)** – Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola. II, 2014.

HABIBI, Y.; VIGNON, M. R. Isolation and characterization of xylans from seed pericarp of *Argania spinosa* fruit. **Carbohydrate Research**, v. 340, n. 7, p. 1431-1436, 2005.

HARRIS, A. D.; RAMALINGAM, C. Xylanases and its Applications in Food Industry: A Review. **Journal of Experimental Sciences**, Vol. 1, Issue 7, Pages 01-11, 2010.

KANIMOZHI, K.; NAGALAKSHMI, P. K. Xylanase production from *Aspergillus niger*

by Solid State Fermentation using Agricultural waste as substrate. **Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.** 3(3): 437-446, 2014.

KRONBAUER, E. A. W.; PERALTA, R. M.; OSAKU, C. A.; KADOWAKI, M. K. Produção de xilanases por *Aspergillus casielus* com diferentes fontes de carbono. **B. CEPPA**, Curitiba v. 25, n. 2, p. 207-216 jul/dex. 2007.

LAFOND, M.; TAUZIN, A.; DESSEAUX, V.; BONNIN, E.; AJANDOUZ, H.; GIARDINA, T. GH10 xylanase D from *Penicillium funiculosum*: biochemical studies and xylooligosaccharide production. **Microbial Cell Factories**, 10:20, 2011.

LOMBARDI, L. R. Qualidade da madeira de eucalipto e *Acacia Mangium* consorciadas para produção de polpa kraft branqueada. **Dissertação (mestrado)** – Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Engenharia Florestal, Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal. II, 2013.

MARIANO, M.; EL KISSI, N.; DUFRESNE, A. Cellulose nanocrystal reinforced oxidized natural rubber nanocomposites. **Carbohydrate Polymers** v. 137, n. February, p. 174–183 , 2016.

MARTINS, D. A. B.; PRADO H. F. A.; LEITE, R. S. R.; FERREIRA, H.; MORETTI M. M. S.; SILVA, R.; GOMES, E. Agroindustrial Wastes as Substrates for Microbial Enzymes Production and Source of Sugar for Bioethanol Production. **Integrated Waste Management, Mr. Sunil Kumar**, v. 2, 2011.

MEDRONHO, Bruno *et al.* Rationalizing cellulose (in)solubility: Reviewing basic physicochemical aspects and role of hydrophobic interactions. **Cellulose** v. 19, n. 3, p. 581–587 , 2012.

MENEZES, C. R.; BARRETO, A. R. Biodegradação de resíduos lignocelulósicos por fungos basidiomicetos: Caracterização dos resíduos e estudo do complexo enzimático fúngico. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, e-ISSN 2236 1170 – V. 19, n. 2, p. 1365-1391, mai – ago. 2015.

MENEZES, C. R.; DURRANT, L. R. Xilooligossacarídeos: produção, aplicações e efeitos na saúde humana. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n.2, p.587-592, ISSN 0103-8478, mar-abr, 2008.

MOTTA, F. L.; ANDRADE, C. C. P.; SANTANA, M. H. A. A Review of Xylanase Production by the Fermentation of Xylan: Classification, Characterization and Applications. **Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass – Techniques, Applications and Commercialization (INTECH – open science/open minds)**, Chapter 10, p. 251-275, 2013.

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise Enzimática de Biomassa. **Quim. Nova**, Vol. 33, No. 7, 1549-1558, 2010.

PERRET, B. A. M.; OTERO, D. M.; TEIXEIRA, L. M.; KALIL, S. J. Uso de substratos lignocelulósicos para cultivo de *Cryptococcus laurentii* visando a produção de endo xilanase. **XI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica**, Unicamp – Campinas – SP, 2015.

PERSIN, Z; *et al.* Challenges and opportunities in polysaccharides research and technology: The EPNOE views for the next decade in the areas of materials, food and health care. **Carbohydrate Polymers** v. 84, p.22-32, 2011.

PINTO, G. A. S; *et al.* Fermentação em estado sólido: uma alternativa para o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais tropicais. **Comunicado Técnico 102**. ISSN 1679-6535, Fortaleza – CE, 2005.

PRETO, E. V.; MORTOZA, G. L. Geração de Energia Elétrica Utilizando Biomassa. 2010. Monografia (Bacharel em Engenharia Elétrica) – Faculdade de Tecnologia, Universidade de Brasília, Brasília – DF.

ROCHA, M. S. R. S.; ALMEIDA, R. M. R. G.; CRUZ, A. J. G. Evolution of energy potential of the agroindustrial residues from different brazilian regions. **ENGEVISTA**, V. 19, n. 1, p. 217-235, Janeiro 2017.

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. **Quim. Nova**, Vol. 35, No. 5, 1004-1010, 2012.

SANTOS, J. C. *et al.* Influence os aeration rate and carrier concentration on xylitol production from sugarcane bagasse hydrolysate in immobilized-cell fluidized bed reactor. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 113-118, 2005.

SCHULZ, Peter a. Nanomateriais e a interface entre nanotecnologia e ambiente. **Vigilância Sanitária em Debate** v. 1, n. 4, p. 53–58 , 2013.

SHALLOM, D.; SHOHAM, Y. Microbial hemicellulases. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 219-228, 2003.

SILVA, J. B. A.; FRANTZ, S. C.; MARQUES, A. K.; COELHO, C. M.; MORAIS, P. B. Produção de enzimas extracelulares por fungos associados à decomposição de materiais vegetais em riachos. **J. Bioen. Food Sci.**, v. 2, n. 4: p.208-212, eISSN 2359-2710, 2015.

SILVA, S. S.; CARVALHO, R. R.; FONSECA, J. L. C.; GARCIA, R. B. Extração e Caracterização de Xilanas de Sabugos de Milho. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, Abr/Jun – 1998.

SILVA, S. S.; VITOLO, M.; MANCILHA, I. M.; ROBERTO, I. C.; FELIPE, M. G. A. Xilitol: um adoçante alternativo para a indústria de alimentos. **Alim. Nutr.**, São Paulo, 5: 109-117, 1993/94.

SILVEIRA, R. F. M. Atividades biológicas de xilana de sabugo de milho. **Dissertação (Mestrado)** apresentada ao Programa de Pós Graduação em Bioquímica – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal – RN, 2010.

SILVÉRIO, Hudson Alves *et al.* Extraction and characterization of cellulose nanocrystals from corncob for application as reinforcing agent in nanocomposites. **Industrial Crops and Products** v. 44, p. 427–436 , 2013.

SOUZA, R. F. R. Produção de etanol a partir de hidrolisado enzimático do bagaço da cana-de-açúcar por leveduras isoladas do bioma amazônico. **Dissertação (mestrado)**, Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Biotecnologia Industrial, 2014.

TAIPINA, Márcia O.; F.FERRAREZI, Márcia M.; GONÇALVES, Maria C. Whiskers de celulose: preparação, caracterização e modificação de superfície. **11º Congresso Brasileiro de Polímeros** p. 3391–3396 , 2011.

TENGERDY, R. P.; SZAKACS, G. Bioconversion of lignocellulose in solid substrate fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v.13, p. 169-179, 2003.

VIEIRA, K. O. Preparação e caracterização de nanomateriais contendo pontos quânticos de CdTe e nanotubos de carbono para aplicações em dispositivos fotovoltaicos. **Revista Científica Vozes dos Vales - UFVJM - MG - Brasil**.Nº 06 - Ano III - p. 1–19 , 2014.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo obter e caracterizar polissacarídeos estruturais a partir de resíduos agrícolas e empregar fungos para otimização de hidrólise enzimática destes polissacarídeos.

2.2. Objetivos Específicos

- Obtenção de carboidratos estruturais (xilana) por reação alcalina a partir de casca de arroz e sabugo de milho.
- Determinar e identificar os carboidratos obtidos.
- Selecionar o substrato com maior taxa de xilose.
- Selecionar microrganismos com maior atividade sob o substrato selecionado através da determinação de açúcares redutores totais.
- Otimizar condições ideais de pH e temperatura para hidrólise enzimática.

3. EMPREGO DE CARBOIDRATOS ESTRUTURAIS OBTIDOS DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS NA OTIMIZAÇÃO ENZIMÁTICA

(Normas de acordo com a revista Ciência Rural)

Resumo

A obtenção de novos compostos empregando resíduos agrícolas possui suas vantagens, como o baixo custo de obtenção e grande disponibilidade da matéria-prima, além de se agregar valor a estes resíduos. Aliar a utilização de resíduos agrícolas para obtenção de carboidratos estruturais, otimização de condições ideais de pH e temperatura para hidrólise enzimática, além de avaliar taxa de xilose e maior atividade volumétrica de fungos sobre os substratos selecionados, foram os objetivos do presente trabalho em que se utilizou farinhas de sabugo de milho (SM) e de casca de arroz (CA) para hidrólise alcalina afim se obter carboidratos estruturais (xilana), obtendo-se o rendimento de extração em torno de 21% para ambas as farinhas utilizadas, após a obtenção das xilanas, foi determinado o teor de xilose através da técnica Cromatografia de Troca Aniônica de Alta Performance Acoplada a Detector Amperométrico (HPAEC-PAD), sendo possível determinar em 73,52% e 37,99% o teor de xilose, respectivamente nas xilanas de SM e CA, e levou a escolha da xilana de SM para continuação dos experimentos. Através da determinação de atividade volumétrica das espécies de fungos utilizadas, escolheu-se os fungos das espécies *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus novoparsiticus* por apresentarem maior valor de atividade volumétrica, respectivamente 0,273 U/mL e 0,033 U/mL, para emprego na otimização da hidrólise enzimática, em que se empregou condições variadas de pH e temperatura afim de se determinar as condições ideais para hidrólise enzimática, sendo que para ambos os fungos utilizados as condições ideais encontradas estão na faixa de temperatura em torno de 35°C e pH 3,5, condições essas principalmente de temperatura pontos satisfatórios pois assemelha-se a temperatura ambiente e não há necessidade de

consumo de energia ou consumo próximo a zero para manutenção desta condição, a faixa de pH baixa e não apresenta problema, pois muitos fungos possuem faixa ideal de atuação em torno de 4,0. A utilização de xilana de SM e do fungo da espécie *Aspergillus fumigatus* para otimização de hidrólise enzimática apresentaram resultados satisfatórios, empregando técnicas de obtenção de carboidratos estruturais de baixo custo e de fácil manipulação utilizando um resíduo agrícola de grande disponibilidade.

Palavras-chave: hidrólise, alcalina, xilana, atividade.

Abstract

Obtaining of new compounds using agricultural residues has its advantages, such the low cost of obtaining and great availability of the raw material, besides adding value to these residues. The objective of the present work was to evaluate the use of agricultural residues to obtain structural carbohydrates, optimization of pH and temperature conditions for enzymatic hydrolysis, besides evaluating the xylose rate and higher volumetric activity of fungi on the selected substrates. Corn flour (SM) and rice husk (CA) flours were submitted to alkaline hydrolysis in order to obtain structural carbohydrates (xylan), having a extraction yield of around 21% for both flours. After xylan extraction, xylose content was determined by High Performance Anion Exchange Chromatography Coupled with Pulsed Amperometric Detection (HPAEC-PAD), and xylan content of xylans of 73.52% and 37.99% for SM and CA, xilans, respectively, which led to the choice of SM xylan to continuous the experiments. The *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus novoparsiticus* fungi were selected for their volumetric activity, as they had a higher value of it 0.273 U/mL and 0.033 U/mL, respectively, for use in the optimization of enzymatic hydrolysis. Different conditions of pH and temperature were employed in order to determine the ideal conditions for enzymatic hydrolysis it, and for both fungi used the ideal conditions found are in the range around 35°C and pH 3.5, respectively. These conditions, mainly temperature, are satisfactory points because it resembles the ambient temperature so there is no need of energy consumption or consumption close to zero to maintain this condition. The low pH range is also not a problem, since many fungi have an ideal range of around 4.0. The use of SM xylan and the *Aspergillus fumigatus* fungus for optimization of enzymatic hydrolysis presented satisfactory results, using low cost and easy to handle structural carbohydrate techniques with a highly available agricultural residue.

Key word: hydrolysis, alkaline, xylan, activity.

3.1.Introdução

O desenvolvimento de novos produtos principalmente com base em fibras naturais, constantemente são obtidos de diferentes formas e fontes, assim como a utilização dos mesmos também tem sido descrita, porém técnicas de caracterização, de morfologia, de obtenção e constituição se fazem necessárias, para que o emprego desses novos produtos seja visto como relevante (MEDRONHO *et al.*, 2012).

Com potencial bioativo, carboidratos estruturais pertencentes ao grupo das hemiceluloses, são encontrados nas camadas da parede celular dos vegetais, principalmente na parede celular secundária, estes são polímeros em que os monossacarídeos integrantes estão unidos por ligações $\beta(1-4)$ equatorial, associados fortemente à celulose (SCHELLER *et al.*, 2010).

Resíduos provenientes da agricultura, apresentam-se como alternativa para obtenção de novos compostos, assim como, geração de energia, novas tecnologias e aplicação em processos tecnológicos, também é uma forma de reduzir impactos negativos sobre o meio ambiente requerendo soluções inovadoras que levem em consideração fatores econômicos e ambientais, sendo que para tal, conhecer a composição do material em estudo é essencial para que se possa utilizá-lo como fonte de recursos renováveis com a possibilidade de geração de novos produtos (RAMBO *et al.*, 2015 e ROCHA, *et al.*, 2017).

A casca de arroz é um dos mais abundantes subprodutos gerados da agricultura, girando em torno de 20% do peso do grão, e pode ser empregada desde a fabricação de chips eletrônicos até a complementação em cimentos e borrachas. Porém, a casca de arroz tem sido utilizada na produção de energia, e é queimada, ou alternativamente, deixada no solo para obtenção de matéria orgânica, sendo os dois processos emissores de dióxido de carbono na atmosfera, outra utilização é como complemento em ração para animais (BERGQVIST *et al.*, 2008).

O sabugo de milho, um dos resíduos gerados na atividade agrícola, possui função de sustentação dos grãos de milho e após o grão ser removido do mesmo o sabugo em muitos casos é descartado ou deixado ao solo para adubação ou destinado a alimentação

animal, sendo que para cada tonelada de grãos processados cerca de 180 kg de sabugo são gerados (ROCHA *et al.*, 2017).

Muitos resíduos agrícolas, são fontes de lignina, hemicelulose e celulose, compostos estes que podem ser empregados em processos bioativos, conferindo alto valor agregado a rejeitos, criando novos processos, novas metodologias ou adequando os mesmos para melhores resultados, estes resíduos ricos em material lignocelulósico podem induzir o crescimento de fungos e conseqüentemente desenvolver enzimas como as xilanases ou hemicelulases, as celulases, ligninases e pectinases, com tratamento adequado a xilose presente nas hemiceluloses pode ser transformada em ácidos orgânicos de cadeia curta como os ácidos acético e fórmico, em furanos e xilitol (MARTINS *et al.*, 2011).

O presente trabalho objetivou a extração seletiva da hemicelulose do sabugo de milho e da casca de arroz, resíduos agrícolas, e hidrólise enzimática para obtenção de xilose, além da prospecção de microrganismos produtores de enzimas xilolíticas.

3.2. Material e Métodos

3.2.1. Obtenção e pré-tratamento da matéria-prima

O sabugo de milho e a casca de arroz foram obtidos na região de Montividiu – Goiás. Os mesmos foram lavados com água destilada para retirada de sujidades, secos em estufa até peso constante, em seguida triturados em moinho de facas e peneirados para obtenção de grânulos com diâmetro inferior a 0,500 mm (35 *mesh*) e conservados sob refrigeração a 0°C.

3.2.2. Obtenção de carboidratos estruturais

Para obtenção dos carboidratos estruturais provenientes de sabugo de milho e da casca de arroz, foi adaptada uma metodologia já estabelecida, e as farinhas obtidas foram submetidas a ataque alcalino, com solução de NaOH 2% durante 90 min, temperatura controlada em 90°C e com agitação vigorosa, foi utilizada a proporção de 1g de farinha para 20 mL de solução alcalina.

Após o término da reação os materiais foram filtrados e então procedeu-se precipitação com quatro volumes de metanol (800 ml), ficando em repouso por 48 horas,

seguido de nova filtragem e secagem do filtrado durante 48 horas sob circulação de ar com temperatura de 35°C, o produto obtido passou a ser denominado de xilana (LI *et al.*, 2012b).

3.2.3. Determinação e identificação dos carboidratos estruturais

A xilana obtida após a secagem foi preparada para determinação dos carboidratos estruturais seguindo o protocolo *Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass* (NREL/TP-510-42618, adaptado), (SLUITER, *et al.*, 2008).

A técnica utilizada para determinação e identificação dos carboidratos estruturais foi a Cromatografia de Troca Aniônica de Alta Performance Acoplada a Detector Amperométrico Pulsado (*High-Performance Anion Exchange Chromatography Coupled with Pulsed Amperometric Detection* HPAEC-PAD), operando no sistema Dionex ICS-3000 Ion Chromatography DC System, ED40 Electrochemical Detector, Autosampler AS40-1, coluna CarboPac PA-1 (2 × 250 mm) com CarboPac PA1 Guard Column (2 × 50 mm) com fluxo de 0,2 mL.min⁻¹, com temperatura entre 21 - 23°C, volume de amostra 10 µL e os cromatogramas foram analisados com Chromeleon 6.8 software (Dionex).

As condições de corrida utilizada para determinação foram: eluente A = 0,2 M NaOH (preparado a partir de uma solução NaOH 50-52% da marca Fluka, própria para cromatografia de troca iônica) e eluente B = Água ultrapura (Mili-Q).

Os padrões (arabinose, galactose, glicose, xilose e manose) utilizados são da Sigma.

3.2.4. Procedimento para bioprospecção de xilanases

Para realização do procedimento de bioprospecção de xilanases, utilizaram-se os fungos descritos na Tabela 01. As colônias de fungos foram crescidas em placas de Petri contendo BDA por sete dias, em seguida discos de aproximadamente 1 cm de diâmetro contendo micélio foram transferidos para frascos de penicilina contendo meio BDA e armazenados em geladeira.

Tabela 01: Fungos utilizados para determinar a capacidade de degradação da xilana através da degradação de açúcares redutores.

FUNGOS	
ESPÉCIE	SIGLA
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	FLQT1-1
<i>Aspergillus flavus</i>	FLQT2-2
<i>Aspergillus fumigatus</i>	FLQT3-1
<i>Aspergillus fumigatus</i>	FLQT3-2
<i>Aspergillus fumigatus</i>	FLQT3-3
<i>Aspergillus novoparsiticus</i>	FLQT5-1
<i>Aspergillus tubingensis</i>	FLQT6-1
<i>Aspergillus niger</i>	FLQT4-1
<i>Fusarium fujikuroi</i>	FLQT7-1
<i>Fusarium proliferatum</i>	FLQT9-1
<i>Paecilomyces formosus</i>	FLQT11-1
<i>Paecilomyces formosus</i>	FLQT11-2
<i>Paecilomyces formosus</i>	FLQT11-3
<i>Paecilomyces parvisporus</i>	FLQT12-1

A avaliação dos microrganismos foi realizada de acordo com sua capacidade de degradação da xilana, sendo avaliado a partir da atividade enzimática, esse processo foi realizado seguindo o protocolo de Ghose (1987) e o método desenvolvido por Miller (1959) para quantificação de açúcares redutores.

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Química Tecnológica e no Laboratório de Microbiologia Agrícola do Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde, onde em erlenmeyers de 125 mL foram adicionados 50 mL de meio basal (pH 4,5) proposto por Mandels & Weber (1969), acrescentando farinha de sabugo de milho a 1% m/v (~ 0,50 g), que foi utilizada como substrato, fonte de xilana para crescimento do fungo, o material foi autoclavado a 1 atm e 121°C durante 20 min. Após a esterilização, foram inoculados nos frascos, em duplicata, 1 disco de micélio fúngico (1 cm de diâmetro) e incubados por um período de 7 dias à 28 °C sob agitação de 150 rpm. Tais discos de micélio foram obtidos de placas BDA com 7 dias de cultivo a 28°C. Após 7 dias, o material foi centrifugado a 3000 rpm durante 5 min. O sobrenadante foi utilizado na hidrólise enzimática para determinação da atividade xilolítica das enzimas produzidas por estes fungos.

Após a retirada dessas alíquotas, porções da xilana obtida de sabugo de milho no item 3.2.2, foram utilizadas como fonte de carboidratos para a hidrólise enzimática pelo caldo enzimático bruto dos fungos. Para tanto, 1,0 mL do caldo enzimático bruto foi adicionado a um tubo de ensaio contendo a xilana (~50 mg) e submetido a hidrólise enzimática em banho-maria (50°C) durante 60 min, preparou-se também um branco (controle negativo) usando caldo enzimático bruto fervido (95°C por 5 min) seguindo a mesma proporção da amostra.

A quantificação dos açúcares redutores liberados na hidrólise enzimática foi realizada segundo método de Miller (1959) utilizando-se o ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). O reativo DNS foi preparado seguindo as seguintes proporções: 300 g de tartarato duplo de sódio e potássio [(CHOH)₂COONaCOOK] foi dissolvido em água destilada com 16 g de hidróxido de sódio (NaOH), em seguida adicionou-se 10 g de ácido 3-5 dinitrosalicílico (C₇H₄N₂O₇) e, por fim, o volume foi completado para 1 litro com água destilada.

Após os 60 min de hidrólise foram adicionados 1,5 mL do reativo DNS preparado e a amostra foi incubada em banho-maria (100°C) durante 5 min para produção de cor, resfriado e, em seguida, foram adicionados 20 mL de água destilada, os mesmos homogeneizados e os açúcares redutores quantificados através da leitura em espectrofotômetro com absorvância de 540 nm, os dados obtidos foram substituídos em uma curva padrão de xilose. As concentrações de açúcares redutores foram usadas para determinar a atividade xilolítica dos caldos enzimáticos brutos.

Ao mesmo tempo, a concentração de proteínas foi avaliada por leitura em espectrofotômetro em 260 e 280 nm, com cubetas de quartzo, os dois comprimentos de onda foram usados devido a diferença de composição das proteínas e o cálculo para determinar a concentração de proteínas está indicado na Equação (1) (BRADLEY, *et al.*, 2007):

Equação (1):

$$[\text{Proteína}](\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}) = (1,55 \times A_{280}) - (0,76 \times A_{260})$$

3.2.5. Otimização da hidrólise enzimática da xilana

Para a otimização da hidrólise enzimática foi realizado um planejamento fatorial de segunda ordem com base em cinco níveis e duas variáveis para estudar a influência da combinação do pH e da temperatura na atividade das xilanases presentes no caldo

enzimático bruto. O planejamento consistiu em 9 tratamentos sendo oito deles realizados em duplicata e o ponto central em quintuplicata, totalizando 21 experimentos como indicado nas Tabelas 02 e 03, o programa utilizado para estudo da influência dos parâmetros observados constitui no Programa Estatística Minitab®, versão 17 .

Tabela 02: Codificação do pH e da temperatura do experimento de otimização.

Codificação	pH	Temperatura (°C)
-1,414	3,4	34
-1	4	40
0	5,5	55
+1	7	70
+1,414	7,6	76
Incremento	1,5	15

Em tubos de ensaio adicionou-se 0,05 g da xilana, 0,5 mL de caldo enzimático e 0,5 mL de solução tampão citrato de sódio, em seguida as amostras foram incubadas durante 60 min na temperatura e pH correspondentes a cada tratamento, conforme a Tabela 03 abaixo.

Tabela 03: Tratamentos para otimização da hidrólise enzimática.

Experimento	pH	Temperatura	Replicata
1	4,0	40	2
2	7,0	40	2
3	4,0	70	2
4	7,0	70	2
Ponto Central	5,5	55	5
Ponto Axial	7,6	55	2
Ponto Axial	3,4	55	2
Ponto Axial	5,5	76	2
Ponto Axial	5,5	34	2

A eficiência enzimática foi determinada através da concentração de açúcares redutores totais liberados, os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e metodologia de superfície de resposta (com confiança de 95%) para determinar as

diferenças significativas entre os valores de pH, de temperatura e dos tratamentos e obter os valores ótimos de temperatura e pH para atividade xilolítica máxima.

3.3. Resultados e Discussão

A metodologia de extração de xilose através de ataque alcalino de resíduos agrícolas se mostra como uma alternativa para realização da mesma, pois apresenta-se como técnica de fácil execução, prática e de baixo risco quando comparado com demais técnicas, como a hidrólise com ácido concentrado (PAIVA, *et al.*, 2009 e CANETTI, *et al.*, 2002).

Na Tabela 04, estão apresentados os dados da extração de carboidratos estruturais tanto para o sabugo de milho quanto para a casca de arroz.

Tabela 04: Parâmetros físicos obtidos do processo de obtenção de carboidratos estruturais de sabugo de milho (SM) e casca de arroz (CA).

	Massa inicial de (g)	Massa de carboidratos extraídos (g)	Rendimento de extração (%)
SM	10,0071	2,1805	21,79
CA	10,0018	2,0832	20,83

Conforme os resultados apresentados na Tabela 04, é possível observar uma eficiência de extração de carboidratos estruturais através de hidrólise alcalina e precipitação com metanol, tanto para o sabugo de milho quanto para a casca de arroz, com aproximadamente 22 e 21% de rendimento respectivamente, apresentando-se como rota eficiente de obtenção, pela simplicidade da técnica utilizada.

O material obtido, após hidrólise alcalina e precipitação com metanol, filtragem e secagem, foi preparado segundo o método NREL/TP-510-42618, com adaptações para se adequar aos materiais em questão e então as amostras foram analisadas pela técnica HPAEC-PAD (SLUITER, *et al.*, 2008).

Na Tabela 05 estão expostos as características das xilanas de SM e CA, e é possível observar uma mistura de monossacarídeos tanto para SM quanto para CA.

Tabela 05: Determinação quantitativa de monossacarídeos presentes nos hidrolisados de xilana de SM e de CA.

MONOSSACARÍDEOS	% de monossacarídeos encontrados	
	SM	CA
Arabinose	11,93 ± 0,57	8,00 ± 0,06
Galactose	3,27 ± 0,14	0,00 ± 0,00
Glicose	11,28 ± 0,65	54,01 ± 0,835
Xilose	73,52 ± 0,225	37,99 ± 0,895

Os hidrolisados de SM e CA, compreendem uma mistura de monossacarídeos respectivamente, arabinose (11,93 e 8%), glicose (11,28 e 54,01%) e xilose (73,52 e 37,99%), observa-se também a presença do monossacarídeo galactose no hidrolisado de SM na proporção de 3,27%.

A presença de xilose no hidrolisado de SM é alta em torno de 73%, enquanto o mesmo não ocorre no hidrolisado de CA, que apresenta maior teor de glicose (54%) em relação a xilose. A diferença de monossacarídeos nos hidrolisados ocorre pela diferença da composição química de cada material, a técnica proposta de hidrólise alcalina de resíduos agrícolas, pode evitar a formação de compostos tóxicos, principalmente o furfural, que é formado pela exposição do material em meio ácido quando ocorre a degradação da xilose pelo ácido, sendo assim a utilização da técnica evitaria também etapas de purificação do material hidrolisado para aplicação da xilose obtida (SOUZA, *et al.*, 2015).

Como observado nos resultados apresentados na Tabela 05, em que a xilana de SM apresentou maior teor de xilose, sendo então o substrato selecionado para avaliação na produção de xilanases.

Através da avaliação de degradação da xilana obtida de SM, partindo da atividade enzimática dos microrganismos utilizados em que se quantificou os açúcares redutores e concentração de proteínas através do protocolo de Ghose (1987) e o método de Miller (1959), obteve-se os valores de atividade volumétrica (U/ml) e atividade específica (U/mg) para cada fungo utilizado, os dados estão dispostos na Tabela 06, destaca-se as atividades de maior importância para os fungos *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus novoparsiticus*.

Tabela 06: Avaliação de atividade dos fungos utilizados no bioprocesso, com destaque aos fungos *Aspergillus fumigatus* (FLQT3-2 e FLQT3-3), *Aspergillus niger* (FLQT4-1) e *Aspergillus novoparsiticus* (FLQT5-1).

Sigla	Atividade Volumétrica (U/mL)	Atividade Específica (U/mg)
FLQT1-1	0,008	0,002
FLQT2-2	0,012	0,005
FLQT3-1	0,006	0,002
FLQT3-2	0,273	0,125
FLQT3-3	0,032	0,030
FLQT6-1	0,001	0,000
FLQT5-1	0,033	0,023
FLQT4-1	0,031	0,042
FLQT11-3	0,001	0,001
FLQT12-1	0,008	0,005
FLQT11-1	0,004	0,002
FLQT11-2	0,006	0,003
FLQT9-1	-0,002	-0,001

Como pode-se observar nos resultados apresentados na Tabela 06 ocorreu grande variação nos valores de atividade volumétrica e específica entre os fungos utilizados, essa variação pode ter ocorrido pelo substrato utilizado, pois o substrato pode agir como fonte de energia e carbono para os fungos, como propulsor ou inibidor na produção de enzimas, pois o mecanismo regulador da indução das enzimas xilanases geralmente apresenta complexo e a produção enzimática varia conforme o microrganismo, sendo que um substrato pode levar a maior atividade em uma espécie e ser um inibidor em outra espécie de microrganismo (KULKARNI *et al.*, 1999).

O método DNS foi utilizado para se obter a atividade dos fungos através da determinação de açúcares redutores e proteínas, em que os valores de atividade da enzima xilanolítica variaram de 0,001 a 0,273 (U/mL), como demonstrado na Tabela 06, sendo que os fungos FLQT3-2 e FLQT3-3 (ambos *Aspergillus fumigatus*), FLQT5-1 (*Aspergillus novoparsiticus*) e FLQT4-1 (*Aspergillus niger*), apresentaram os maiores resultados perante o substrato utilizado.

Os fungos filamentosos do gênero *Aspergillus*, apresentam-se como os melhores produtores de endo e exoglicosidases, os quais são reconhecidos por suas altas concentrações de β -glicosidase (CASTRO, *et al.*, 2010).

Os isolados fúngicos, FLQT3-2 e FLQT5-1, apresentaram os maiores resultados de atividade enzimática, respectivamente 0,273 e 0,033 U/mL, valores significativos quando comparados com o isolado do trabalho de Silva (2015), que trabalhou com isolados de bactérias xilanolíticas e obteve o maior valor de atividade enzimática com média de 0,43 U/mL.

Em seu trabalho Almeida (2013), avaliou a produção de xilanases através de isolado de *Aspergillus fumigatus*, empregando diversas fontes de carbono para indução das enzimas, o autor descreve que a palha de milho utilizada foi a que apresentou a melhor resposta para atividade enzimática com o valor de 11,95 U/mL, porém encontrou valores inferiores com até 0,07 U/mL, logo os valores obtidos para os fungos da mesma espécie utilizados no presente trabalho permanecem na faixa descrita, já para o fungo da espécie *Aspergillus niger* o mesmo autor apresenta valores muito superiores para a atividade enzimática com os substratos utilizados pelo mesmo, sendo o menor valor encontrado de 2,58 U/mL e, ao se comparar com o valor obtido no presente trabalho para o mesmo fungo constata-se que o substrato utilizado não se apresenta como indutor de atividade enzimática através do fungo *Aspergillus niger*. Aguiar (2010) utilizando o fungo *A. niger* e bagaço de cana-de-açúcar como substrato encontrou o valor de atividade enzimática de 0,208 U/mL, valor também superior ao encontrado para o mesmo fungo no presente trabalho.

Os valores obtidos de atividade enzimática no presente trabalho para a espécie de *Aspergillus fumigatus* (FLQT3-2), aproxima-se ao valor de atividade obtida por Reinehr *et al.* (2014), que apresenta o valor aproximado de 0,183 U/mg, corroborando para possível utilização da espécie e do substrato utilizado para obtenção de xilanases.

A eficiência da obtenção de xilanases, possui ligação direta a acessibilidade da enzima ao substrato, quantidade de xilose liberada e a natureza e liberação dos açúcares presentes, além de parâmetros como agitação, pH e temperatura afetam diretamente na atividade e produção de xilanases (KULKARNI *et al.*, 1999), sendo assim com os valores obtidos de atividade enzimática no presente estudo, foi escolhido as espécies de *Aspergillus fumigatus* (FLQT3-2) e *Aspergillus novoparsiticus* (FLQT5-1) para realização da otimização da hidrólise enzimática.

Os modelos utilizados para otimização da hidrólise enzimática da xilana, são analisados através da liberação de açúcares redutores totais (ART g.L⁻¹) para as duas espécies escolhidas, FLQT3-2 e FLQT5-1, sendo utilizadas a equação (2), para a espécie FLQT3-2 e a equação (3) para a espécie FLQT5-1:

Equação (2):

$$[\text{ART g.L}^{-1}] = 3,961 - 0,741 \text{ pH} - 0,0396 \text{ Temperatura} + 0,0413 \text{ pH} \times \text{pH} + 0,000087 \text{ Temperatura} \times \text{Temperatura} + 0,00339 \text{ pH} \times \text{Temperatura}$$

Equação (3):

$$[\text{ART g.L}^{-1}] = 0,563 - 0,0569 \text{ pH} - 0,01044 \text{ Temperatura} + 0,00116 \text{ pH} \times \text{pH} + 0,000052 \text{ Temperatura} \times \text{Temperatura} + 0,000667 \text{ pH} \times \text{Temperatura}$$

As equações 2 e 3 apresentam os modelos propostos para determinação da influência dos parâmetros utilizados, sendo os dados estatísticos significativos, pois apresenta valor $p = 0,000$ para ambos as espécies utilizadas no presente trabalho, respectivamente às equações 2 e 3 as Tabelas 07 e 08 correspondem as análises estatísticas para as espécies FLQT3-2 (*Aspergillus fumigatus*) e FLQT5-1 (*Aspergillus novoparsiticus*).

Tabela 07: Análise de variância estimados para liberação de ART pelo emprego da espécie de *Aspergillus fumigatus* (FLQT3-2) frente às variações de pH e temperatura.

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Soma Sequencial de Quadrados	Contribuição (%)	Soma dos Quadrados Ajustada	Quadrados Médios Ajustados	Teste F	Valor p
Modelo	5	0,99687	87,54	0,996869	0,199374	28,09	0,000
Linear	2	0,82928	72,82	0,829280	0,414640	58,43	0,000
pH	1	0,35931	31,55	0,359308	0,359308	50,63	0,000
Temperatura	1	0,46997	41,27	0,469971	0,469971	66,22	0,000
Square	2	0,12108	10,63	0,121077	0,060538	8,53	0,002
pH * pH	1	0,11573	10,16	0,120285	0,120285	16,95	0,001
Temperatura * Temperatura	1	0,00535	0,47	0,005348	0,005348	0,75	0,396
Interação de fatores	2	0,04651	4,08	0,046512	0,046512	6,55	0,019

pH	*	1	0,04651	4,08	0,046512	0,046512	6,55	0,019
Temperatura								
Erro		20	0,14193	12,46	0,141934	0,007097		
Falta de Ajuste		3	0,13408	11,77	0,134079	0,044693	96,73	0,000
Erro Puro		17	0,00785	0,69	0,007855	0,000462		
Total		25	1,13880	100,00				

Tabela 08: Análise de variância estimados para liberação de ART pelo emprego da espécie de *Aspergillus novoparsiticus* (FLQT5-1) frente às variações de pH e temperatura.

Fonte de Variação		Graus de Liberdade	Soma Sequencial de Quadrados	Contribuição (%)	Soma dos Quadrados Ajustada	Quadrados Médios Ajustados	Teste F	Valor p
Modelo		5	0,009608	63,62	0,009608	0,001922	6,99	0,001
Linear		2	0,005873	38,88	0,005873	0,002936	10,69	0,001
pH		1	0,002014	13,33	0,002014	0,002014	7,33	0,014
Temperatura		1	0,003859	25,55	0,003859	0,003859	14,05	0,001
Square		2	0,001936	12,82	0,001936	0,000968	3,52	0,049
pH * pH		1	0,000017	0,11	0,000095	0,000095	0,35	0,562
Temperatura	*	1	0,001919	12,70	0,001919	0,001919	6,98	0,016
Temperatura								
Interação de fatores		2	0,001800	11,92	0,001800	0,001800	6,55	0,019
pH	*	1	0,001800	11,92	0,001800	0,001800	6,55	0,019
Temperatura								
Erro		20	0,005495	36,38	0,005495	0,000275		
Falta de Ajuste		3	0,003808	25,21	0,003808	0,001269	12,79	0,000
Erro Puro		17	0,001687	11,17	0,001687	0,000099		
Total		25	0,015103	100,00				

A adequação do modelo faz-se através da verificação e observação das suposições dos erros existentes no modelo matemático e se estes são aleatórios, distribuídos normalmente de forma independente, com variância constante e média zero (CALADO; MONTGOMERY, 2003).

Analisando-se os dados obtidos, através das equações indicadas acima, obteve-se os valores de R^2 , para a espécie FLQT3-2 o R^2 foi de 87,54% e para a espécie FLQT5-1 o R^2 foi de 63,62%.

Na Figura 01 são apresentados as concentrações de açúcares redutores totais (ART g.L⁻¹), as quais foram obtidas através das condições empregadas no planejamento fatorial para o fungo da espécie *Aspergillus fumigatus* (FLQT3-2).

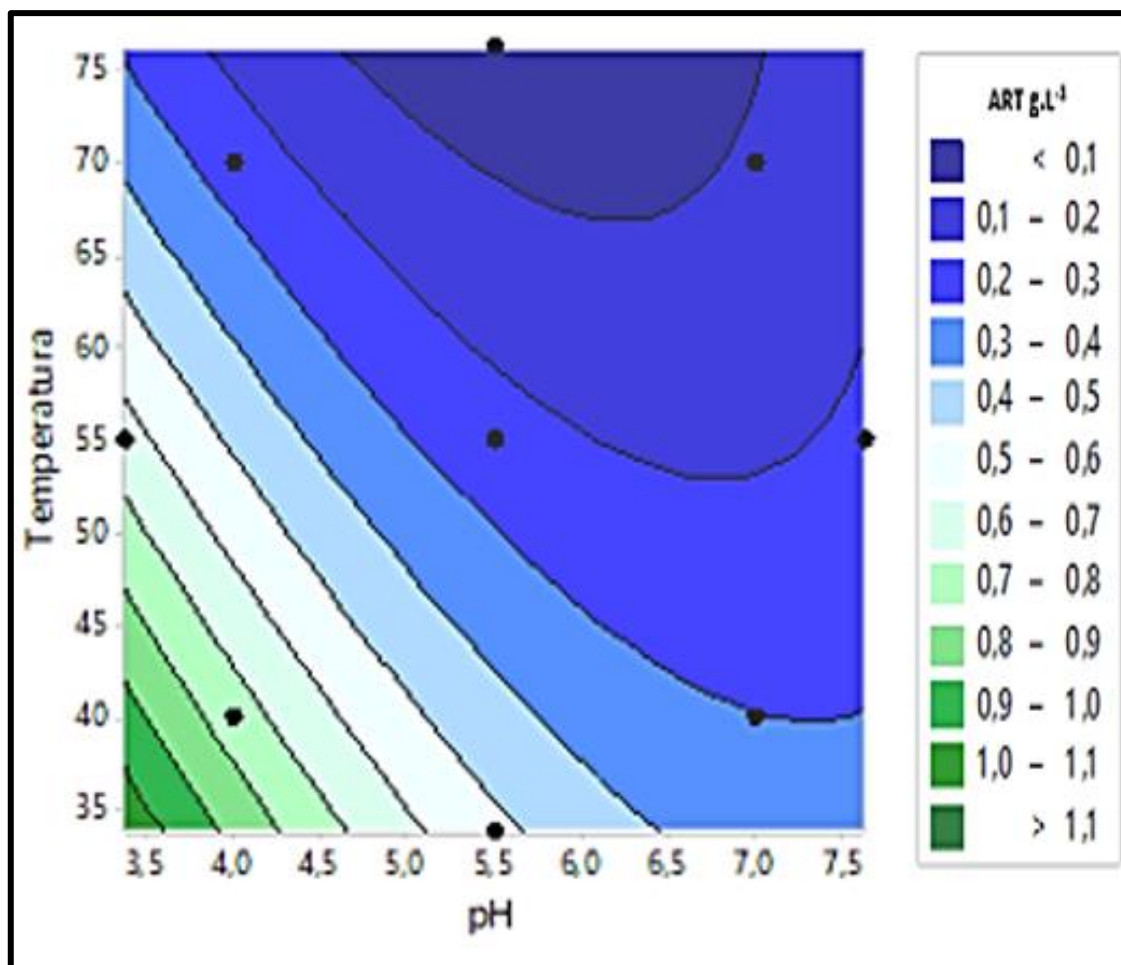


Figura 01: Determinação da concentração de açúcares redutores totais produzidos pela atividade enzimática do fungo *Aspergillus fumigatus* (FLQT3-2), após a utilização dos parâmetros adotados no planejamento fatorial para pH e temperatura;

É possível observar na Figura 01 a) e b) que a faixa de pH e temperatura que apresentaram os maiores resultados gira em torno de pH 3,5 e temperatura aproximada de 35°C, segundo os parâmetros adotados no planejamento fatorial da otimização enzimática e um afastamento desta faixa provocou considerável queda na liberação de açúcares redutores.

As concentrações de ART (g.L⁻¹) obtidos dos experimentos de otimização com os parâmetros adotados no planejamento fatorial para o fungo *Aspergillus novoparsiticus* (FLQT5-1) são apresentados na Figura 02.

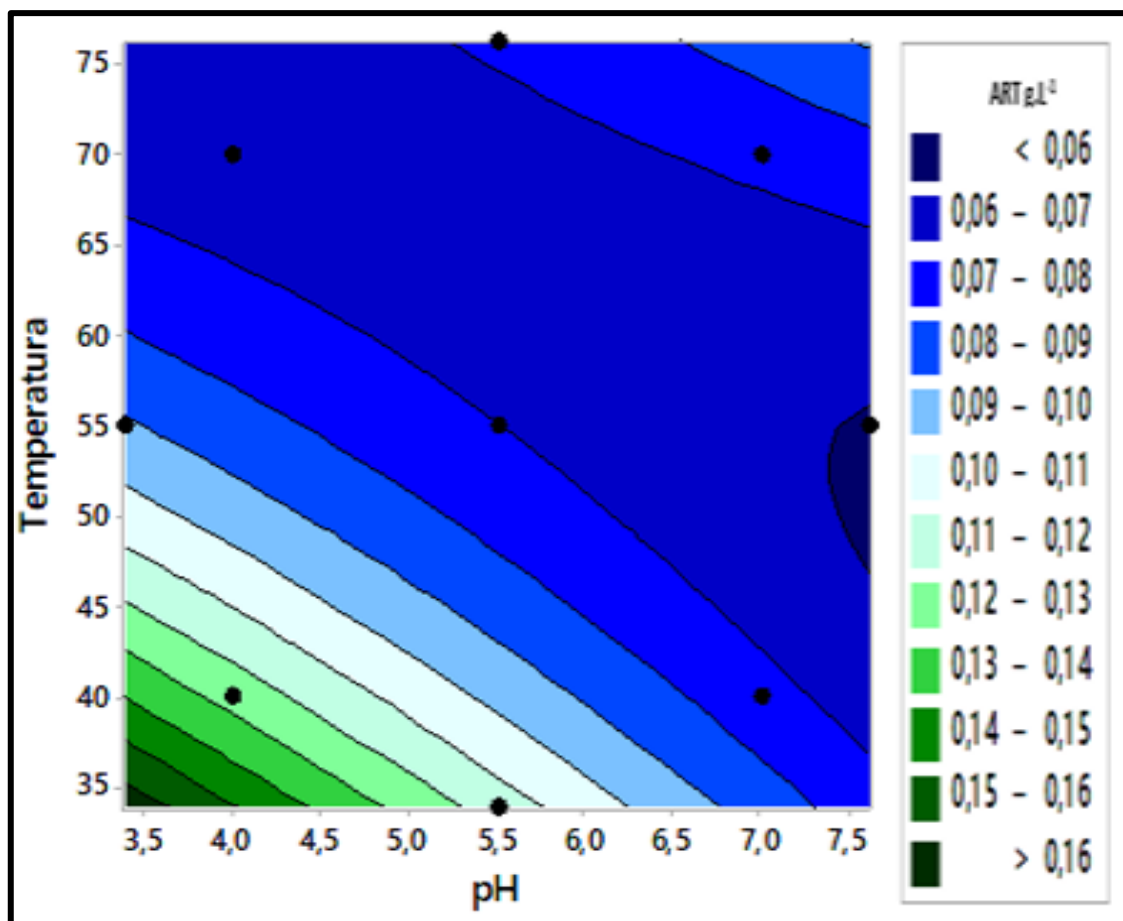


Figura 02: Determinação da concentração de açúcares redutores totais produzidos pela atividade enzimática do fungo *Aspergillus novoparsiticus* (FLQT5-1), após a utilização dos parâmetros adotados no planejamento fatorial para pH e temperatura;

Através da análise dos dados obtidos pela aplicação do planejamento fatorial nos experimentos, é observado na Figura 02, que a faixa de melhor atividade enzimática obtido em resposta a utilização do fungo *Aspergillus novoparsiticus* (FLQT5-1), compara-se aos resultados obtidos para a utilização do fungo *Aspergillus fumigatus* (FLQT3-2), com faixa de pH em torno de 3,5 e temperatura de aproximadamente 35°C.

Ao se comparar as respostas frente a utilização dos dois fungos, com o mesmo sequenciamento de parâmetros deduz-se que a espécie *Aspergillus fumigatus* (FLQT3-2), apresentou a maior atividade enzimática ao utilizar-se os parâmetros do planejamento fatorial, com concentração de açúcares totais redutores acima de 1,1 g.L⁻¹ enquanto nas mesmas condições o emprego da espécie *Aspergillus novoparsiticus* apresentou a faixa de concentração de açúcares redutores acima de 0,16 g.L⁻¹, diferença está que pode ser corroborada por Kulkarni et al. (1999), em que o autor relata que a eficácia das enzimas está diretamente ligada ao fato da enzima acessar o substrato, a facilidade que estas

enzimas possuem em liberar os açúcares presentes, a faixa de pH e temperatura utilizadas fazem com que cada espécie de fungo atue de maneira diferente, assim como o substrato utilizado que pode atuar sendo fonte de energia e carbono, ou inibindo a atividade enzimática.

Demais estudos reportam valores ideais para atuação das xilanases, Moreira et al. (2013), destaca que os valores ótimos para atuação das xilanases obtidas da espécie de *Aspergillus terreus* foram pH 5 e temperatura 45°C e pH 6 e temperatura 50°C, para as xilanases produzidas pelo fungo *Aspergillus fumigatus*, Ang et al. (2013) apresenta a atividade ótima das enzimas em pH 4 e temperatura em 60°C, apesar de serem valores diferentes aos relatados no presente trabalho, é possível observar que o substrato utilizado e as espécies utilizadas para avaliação de atividade enzimática, com destaque para a espécie de *Aspergillus fumigatus* (FLQT3-2), conseguem atuar em uma faixa de pH ácida com emprego de baixa temperatura, e gastaria menor quantidade de energia para se obter maior resposta de atividade enzimática e liberação de açúcares redutores totais.

Observa-se que muitas espécies do gênero *Aspergillus* sp. possuem atividade máxima com faixa de pH entre 4 e 6 temperatura ótima de atividade máxima entre 45 e 60°C (ANG, *et al.*, 2013; MOREIRA *et al.*, 2013), porém Chidi et al. (2008), apresenta maior atividade das xilanases do fungo *Aspergillus terreus* com temperatura de 35°C, valor semelhante as respostas encontradas frente aos tratamentos utilizados e as espécies empregadas no presente trabalho.

Como os valores de pH e temperatura obtidos são respectivamente baixos, ou seja, meio ácido e baixa temperatura, o emprego do substrato e dos fungos utilizados se mostra relevante, pois o aquecimento utilizado para realização da hidrólise seria nulo ou muito baixo, pela temperatura ideal de hidrólise ser próxima à temperatura ambiente e não necessitar de aquecimento, quando se observa o valor de pH ideal em torno de 3,5 o mesmo não seria problema uma vez que diversos estudos, como os já relatados acima, mostram que a faixa de pH ideal para muitos fungos está próximo a 4,0, logo os dados observados no presente trabalho são satisfatórios e relevantes para obtenção de enzimas capazes de atuar em condições diversificadas.

3.4. Conclusão

O emprego de resíduos agrícolas mostra-se uma alternativa viável para obtenção de novos compostos ou emprego dos mesmos em técnicas existentes.

Apesar do rendimento de extração de xilana tanto do SM quanto da CA apresentarem valores próximos a 21% a avaliação da composição da xilana obtida, mostra que o teor de xilose encontrado em xilana de SM é superior ao encontrado em xilana de CA, e levou a escolha da mesma para dar sequência as condições de otimização de hidrólise enzimática.

Através da avaliação de atividade enzimática dos fungos utilizados, observou-se que as espécies de *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus novoparsiticus* apresentaram os maiores valores e ao submeter estas duas espécies de fungos com a xilana de SM como substrato para determinação das condições ideais da hidrólise enzimática, ambos as espécies apresentaram valores maiores de atividade em pH na faixa de 3,5 e temperatura em 35°C, condições essas satisfatórias pois a faixa de pH é próximo ao relatado para outros fungos com outros substratos e a faixa de temperatura encontrada por ser baixa não necessitaria de aquecimento para realizar a hidrólise enzimática pois essa temperatura assemelha-se a temperatura ambiente.

3.5.Referências

AGUIAR, C. M. Hidrólise enzimática de resíduos lignocelulósicos utilizando celulasas produzidas pelo fungo *Aspergillus niger*. 2010. 118f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Programa de Pós-Graduação “Stricto Sensu” em Engenharia Química – Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

ALMEIDA, M. Seleção de fungos filamentosos produtores de xilanases e celulasas utilizando resíduos agroindustriais. 2013. 45f. Dissertação (Mestrado em Conservação e Manejo de Recursos Naturais) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde – Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

ANG, S. et al. Production of cellulases and xylanase by *Aspergillus fumigatus* SK1 using untreated oil palm trunk through solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 48, p. 1293-1302, 2013. Available from: <<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.06.019>>. Accessed: Jan, 16, 2018. doi: 10.1016/j.procbio.2013.06.019.

BERGQVIST, M. M; WÅRDH, K. S; DAS, A; AHLGREN, E. O. A techno-economic assessment of rice husk-based power generation in the mekong river delta of Vietnam. **WileyInterScience**, 65p, ago, 2008. Available from: <<https://doi.org/10.1002/er.1451>>. Accessed: Jan. 15, 2018. Doi: 10.1002/er.1451.

BRADLEY, J. S. C. O.; MARKWELL, J. Unit 3.4 Assays for Determination of Protein Concentration. **Current Protocols in Protein Science**, 3.4.1-3.4.29, 2007. Available from: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471140864.ps0304s48/abstract;jsessionid=1443D3ED1F759592A1414E9237864723.f03t02?userIsAuthenticated=false&deniedAccessCustomisedMessage=>>>. Accessed: Sep. 15, 2017. doi: 10.1002/0471140864.ps0304s48.

CALADO, V; MONTGOMERY, D. **Planejamento de experimentos usando o Statistica**, Rio de Janeiro : e-papers, 2003.

CANETTIERI, E. V. et al. Obtenção biotecnológica de xilitol a partir de cavacos de eucalipto. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, vol, 38, n. 3, p. 323-331, jul./set., 2002. Available from: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1516-93322002000300008>>. Accessed: Oct, 2, 2017. doi: 10.1590/S1516-93322002000300008.

CASTRO, A. M. et al. Cellulases from *Penicillium funiculosum*: production, properties and application to cellulose hydrolysis. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.37, p.151-158, 2010. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19902281>>. Accessed: Jan, 5, 2018. doi: 10.1007/s10295-009-0656-2.

CHIDI, S. et al. Production, purification and characterization of cellulase-free xylanase from *Aspergillus terreus* UL 4209. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 21, p. 3939-3948, 2008. Available from: <<https://doi.org/10.5897/AJB08.541>>. Accessed: Jan, 18, 2018. doi: 10.5897/AJB08.541.

CONAB. *Acompanhamento da Safra Brasileira Grãos*. ISSN 2318-6852. **Acomp. safra bras.grãos**, v.4 – Safra 2016/17 – Décimo levantamento, Brasília, p.1-171, julho 2017.

GHOSE. T. K. Measurement of Cellulase Activities. **Pure & Appl. Chem.**, Vol. 59, No. 2, pp. 257-268, 1987. Available from: <<http://dx.doi.org/10.1351/pac198759020257>>. Accessed: Sep, 10, 2017. doi: 10.1351/pac198759020257.

KULKARNI, N. et al. Molecular and biotechnological aspects of xilanases. **FEMS Microbiology Reviews**, 23, p. 411-456, 1999. Available from: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1574-6976.1999.tb00407.x/abstract>>. Accessed: Oct, 2, 2017. doi: 10.1111/j.1574-6976.1999.tb00407.x.

LI, J. et al. Homogeneous isolation of nanocellulose from sugarcane bagasse by high pressure homogenization. **Carbohydrate Polymers** v. 90, n. 4, p. 1609–1613 , 2012b. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22944423>>. Accessed: Dec. 9, 2017. doi: 10.1016/j.carbpol.2012.07.038.

MANDELS, M.; WEBER, J. The Production of Cellulases. **Advances in Chemistry**,

95, 391-413, 1969. Available from: <<http://dx.doi.org/10.1021/ba-1969-0095.ch023>>. Accessed: Sep, 10, 2017. doi: 10.1021/ba-1969-0095.ch023.

MARTINS, D. A. B. et al. Agroindustrial Wastes as Substrates for Microbial Enzymes Production and Source of Sugar for Bioethanol Production. **Integrated Waste Management**, Volume II, p. 319-360, August, 2011. Available from: <<https://www.intechopen.com/books/integrated-waste-management-volume-ii/agroindustrial-wastes-as-substrates-for-microbial-enzymes-production-and-source-of-sugar-for-bioetha>>. Accessed: Dec. 9, 2017. doi: 10.5772/23377.

MEDRONHO, Bruno *et al.* Rationalizing cellulose (in)solubility: Reviewing basic physicochemical aspects and role of hydrophobic interactions. **Cellulose** v. 19, n. 3, p. 581–587, 2012. Available from: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s10570-011-9644-6>>. Accessed: Dec. 10, 2017. doi: 10.1007/s10570-011-9644-6.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Anal. Chem.**, 31(3), pp 426-428, 1959. Available from: <<https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ac60147a030>>. Accessed: Sep, 10, 2017. doi: 10.1021/ac60147a030.

MOREIRA, L. et al. Two β -xylanases from *Aspergillus terreus*: Characterization and influence of phenolic compounds on xylanase activity. **Fungal Genetics and Biology**, v. 60, p. 46-52, 2013. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23892064>>. Accessed: Jan, 17, 2018. doi: 10.1016/j.fgb.2013.07.006.

PAIVA, J. E. et al. Xylose production from sugarcane bagasse by surface response methodology. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 13, n. 1, p.75-80, 2009. Available from: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1415-43662009000100011>>. Accessed: Oct, 2, 2017. doi: 10.1590/S1415-43662009000100011.

RAMBO, M. K. D. et al. Characterization of biomasses from the north and northeast regions of Brazil for processes in biorefineries. **Food Science and Technology**, 35(4): 605-611, Out.-Dez. 2015. Available from: <<http://dx.doi.org/10.1590/1678-457X.6704>>.

Accessed: Dec. 9, 2017. doi: 10.1590/1678-457X.6704.

REINEHR, C. O. et al. Produção de lipases de *Aspergillus niger* e *Aspergillus fumigatus* através de fermentação em estado sólido, avaliação da especificidade do substrato e seu uso em reações de esterificação e alcoólise. **Quim. Nova**, Vol. 37, No. 3, 454-460, 2014. Available from: <<http://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20140077>>. Accessed: Jan, 9, 2018. doi: 10.5935/0100-4042.20140077.

ROCHA, M. S. R. S. et al. Evolution of energy potential of the agroindustrial residues from different brazilian regions. ENGEVISTA, V. 19, n. 1, p. 217-235, Janeiro, 2017. Available from: <<http://www.uff.br/engevista/seer/index.php/engevista/article/view/821/406>>. Accessed: Dec. 9, 2017. doi: 10.22409/engevista.v19i1.821

SCHELLER, H.V; ULVSKOV, P. Hemicelluloses. **Annual Review Plant Biology**. 61:263-289, 2010. Available from: <<http://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev-arplant-042809-112315>>. Accessed: Dec. 10, 2017. doi: 10.1146/annurev-arplant-042809-112315.

SILVA, M. C. P. Bioprospecção de xilanases e α -amilase por meio de métodos independentes e dependentes de cultivo microbiano em um solo de manguezal. 2015. 98f. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Universidade de São Paulo.

SLUITER, A. et al. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. **Laboratory Analytical Procedure (LAP)**, NREL/TP-510-42618, p.1-16, NREL Laboratory Analytical Procedures for standard biomass analysis are available electronically at <http://www.nrel.gov/biomass/analytical_procedures.html>. Issue Date: April 2008.

SOUZA, B. V. et al. Avaliação do processo de hidrólise ácida para obtenção de xilose a partir de casca de *Pinus taeda* L. **Anais III Congresso de Ciência e Tecnologia UTFPR Câmpus Dois Vizinhos**, p. 526-528, 2015.

Minitab. Minitab, version 17: Statistical Software. Minitab, 2016. Conjunto de programa. Digital.