

SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS GRADUAÇÃO
IFG CAMPUS GOIÂNIA
MESTRADO EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS SUSTENTÁVEIS

WELLINGTON DE SOUZA BORGES JUNIOR

**APLICAÇÃO DE PECTINASES, LACASES E HEMICELULASES NO PRÉ-
TRATAMENTO DAS FIBRAS DA CANA ENERGIA PARA A PRODUÇÃO DE
BIOGÁS**

Goiânia, 2019

SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS GRADUACAO
IFG CAMPUS GOIÂNIA
MESTRADO EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS SUSTENTÁVEIS

Wellington de Souza Borges Junior

**APLICAÇÃO DE PECTINASES, LACASES E HEMICELULASES NO PRÉ-
TRATAMENTO DAS FIBRAS DA CANA ENERGIA PARA A PRODUÇÃO DE
BIOGÁS**

Programa de Pós-Graduação stricto sensu em
Tecnologia de Processos Sustentáveis do IFG
(PPGTPS - IFG) - Dissertação de Mestrado
Profissional. Área de Concentração: Tecnologia
de Sistemas de Produção Limpa. Linha de
Pesquisa: Fontes renováveis de água.

Orientador: Prof. Dr. Mariângela Fontes
Santiago

Coorientador: Prof. Dra. Fabrícia Paula De
Faria

Goiânia, 2019

FICHA CATALOGRÁFICA

B64488a Borges Junior, Wellington de Souza.
Aplicação de pectinases, lacases, hemicelulases no pré-tratamento das fibras da cana energia para a produção de biogás / Wellington de Souza Borges Junior. – Goiânia: Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás, 2019.
71 f. : il.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Mariângela Fontes Santiago.
Coorientadora: Prof^ª. Dra. Fabrícia Paula De Faria.

Dissertação (Mestrado) – Mestrado em Tecnologia de Processos Sustentáveis,
Coordenação do Programa de Mestrado em Tecnologia de Processos Sustentáveis, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás.

1. Biogás. 2. Fontes alternativas de energia. 3. Hemicelulases. 3. Lacases. 4. Pectinases.
I. Santiago, Mariângela Fontes (orientadora). II. Faria, Fabrícia Paula de (coorientadora).
III. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás. IV. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Karol Almeida da Silva Abreu CRB1/ 2.740
Biblioteca Professor Jorge Félix de Souza,
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás, Câmpus Goiânia.

**TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAÇÃO
NO REPOSITÓRIO DIGITAL DO IFG - ReDi IFG**

Com base no disposto na Lei Federal nº 9.610/98, AUTORIZO o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás, a disponibilizar gratuitamente o documento no Repositório Digital (ReDi IFG), sem ressarcimento de direitos autorais, conforme permissão assinada abaixo, em formato digital para fins de leitura, download e impressão, a título de divulgação da produção técnico-científica no IFG.

Identificação da Produção Técnico-Científica

- | | |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> Tese | <input type="checkbox"/> Artigo Científico |
| <input checked="" type="checkbox"/> Dissertação | <input type="checkbox"/> Capítulo de Livro |
| <input type="checkbox"/> Monografia – Especialização | <input type="checkbox"/> Livro |
| <input type="checkbox"/> TCC - Graduação | <input type="checkbox"/> Trabalho Apresentado em Evento |
| <input type="checkbox"/> Produto Técnico e Educacional - Tipo: _____ | |

Nome Completo do(a) Autor(a): **WELLINGTON DE SOUZA BORGES JUNIOR**

Matrícula: **20162011140238**

Título do Trabalho: **APLICAÇÃO DE PECTINASES, LACASES E HEMICELULASES NO PRÉ-TRATAMENTO DAS FIBRAS DA CANA ENERGIA PARA PRODUÇÃO DE BIOGÁS**

Restrições de Acesso ao Documento

Documento confidencial: Não Sim, justifique: _____

Informe a data que poderá ser disponibilizado no ReDi/IFG: ____/____/____

O documento está sujeito a registro de patente? Sim Não

O documento pode vir a ser publicado como livro? Sim Não

DECLARAÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO NÃO-EXCLUSIVA

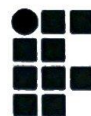
O/A referido/a autor/a declara que:

- o documento é seu trabalho original, detém os direitos autorais da produção técnico-científica e não infringe os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade;
- obteve autorização de quaisquer materiais inclusos no documento do qual não detém os direitos de autor/a, para conceder ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás os direitos requeridos e que este material cujos direitos autorais são de terceiros, estão claramente identificados e reconhecidos no texto ou conteúdo do documento entregue;
- cumpriu quaisquer obrigações exigidas por contrato ou acordo, caso o documento entregue seja baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás.

GOIÂNIA, 28 DE JUNHO DE 2019.



Assinatura do(a) Autor(a) e/ou Detentor dos Direitos Autorais



INSTITUTO FEDERAL
Goiás
Câmpus Goiânia

SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
IFG CÂMPUS GOIÂNIA
MESTRADO EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS SUSTENTÁVEIS

Wellington de Souza Borges Junior

**“APLICAÇÃO DE PECTINASES, LACASES E HEMICELULASES NO
PRÉ-TRATAMENTO DAS FIBRAS DA CANA ENERGIA PARA
PRODUÇÃO DE BIOGÁS”**

Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Tecnologia de Processos Sustentáveis do IFG (PPGTPS - IFG) -
Dissertação de Mestrado Profissional. Área de Concentração: Tecnologia de Sistemas de Produção Limpa. Linha de Pesquisa: Fontes Alternativas de Água.

Prof(a). Dr(a). MARIÂNGELA FONTES SANTIAGO (presidente e orientadora – PPGTPS / UFG)

Assinatura

Prof(a). Dr(a). FABRÍCIA PAULA DE FARIA (avaliadora externa – UFG)

Assinatura

Prof(a). Dr(a). SÉRGIO BOTELHO DE OLIVEIRA (avaliador – PPGTPS / IFG)

Assinatura

Prof(a). Dr(a). ROSÁLIA SANTOS AMORIM JESUINO (avaliadora externa – UFG)

Assinatura

Prof(a). Dr(a). FERNANDO SCHIMIDT (suplente – PPGTPS / IFG)

Assinatura _____

Aprovado em: 28/06/2019

AGRADECIMENTOS

A Deus e a toda espiritualidade que propiciou a oportunidade de realização desse trabalho.

À Professora Dr^a Mariângela Fontes Santiago pela orientação e apoio, assim como a professora Dr^a Fabrícia Paula de Faria que sem seu apoio e paciência não seria possível chegar até aqui.

Ao professor Dr. Sérgio Botelho de Oliveira, por ter cedido a amostra de cana energia necessária a realização do experimento.

A minha mãe, Mainan Rosa Pimentel, a minha esposa Alcyone Cardoso Novais pelo incentivo e orações incessantes.

A Cleidilene Gomes Dos Santos, Izadora Cristina Moreira de Oliveira, Janaina Dias Da Costa e a Vanderly Melo, pela ajuda e orientações durante a minha prática laboratorial.

A todos os amigos e familiares que sempre me apoiaram.

Ao Instituto Federal de Goiás e à Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás que me deram suporte para realização desta pesquisa.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para que esse trabalho fosse realizado.

TÍTULO: Aplicação de pectinases, lacases e hemicelulases no pré-tratamento das fibras da cana energia para a produção de biogás

AUTOR: WELLINGTON DE SOUZA BORGES JUNIOR

ORIENTADOR: DRA. MARIÂNGELA FONTES SANTIAGO

COORIENTADOR: DRA. FABRÍCIA PAULA DE FARIA

RESUMO

Com o aumento da população mundial, a demanda por energia também aumenta substancialmente, nesse cenário a busca por fontes alternativas de energia passa a ter uma importância significativa, já que o uso do petróleo como recurso energético e não renovável torna-se cada vez mais escasso. Fontes alternativas de energia aparecem como uma saída viável e limpa para a resolução desse problema. O biogás é produzido a partir da degradação biológica anaeróbia da matéria orgânica contida em diferentes resíduos e é constituído por uma mistura de metano (CH₄) e CO₂. A produção de biogás a partir de biomassa vegetal vem sendo ampliada em todo o mundo, no Brasil tem sido estudada a produção de biogás a partir de bagaço de cana-de-açúcar e da variedade cana energia. O objetivo deste trabalho foi analisar o pré-tratamento enzimático da cana energia com hemicelulases, lacases e pectinases que possa facilitar a digestão anaeróbica para a produção de biogás. Inicialmente, as hemicelulases (endoxilanase e arabinofuranosidase) foram produzidas pelo fungo *Humicola grisea*, as lacases foram produzidas pelo fungo *P.sanguineus* CCT 4518 e as pectinases foram produzidas pelo fungo *Penicillium* sp. C2 por fermentação submersa, as enzimas produzidas obtiveram os seguintes valores de atividades enzimáticas: Lacases (2700U.mL⁻¹), Hemicelulases (567U.mL⁻¹) e Pectinases(375U.mL⁻¹). O bagaço de cana energia foi submetido a hidrólise com diferentes formulações enzimáticas a 36°C, por 48 horas sob agitação constante de 120 rpm. O hidrolisado foi avaliado quanto ao teor de Açúcares Redutores Totais (ART) e glicose por DNS e avaliado quanto ao teor de xilose por HPLC. Os resultados obtidos indicam que o tratamento que apresentou melhor rendimento relativo foi utilização da lacase e após 24 h adição de hemicelulases.

PALAVRAS-CHAVE: Biogás; Hemicelulases; hidrolises enzimática; lacases; Pectinase.

TITLE: Application of pectinases, laccases and hemicellulases in the pre-treatment of sugarcane fibers for the production of biogas

AUTHOR: WELLINGTON DE SOUZA BORGES JUNIOR

ADVISER: DRA. MARIÂNGELA FONTES SANTIAGO

CO-ADVISER: DRA. FABRÍCIA PAULA DE FARIA

ABSTRACT

With the increase in world population, the demand for energy also increases substantially, in this scenario the search for alternative energy sources now has a significant importance, since the use of oil as an energy resource and nonrenewable becomes increasingly scarce . alternative energy sources appear as a viable and clean exit for the resolution of this problem. Biogas is produced from the anaerobic biological degradation of organic matter contained in various waste and consists of a mixture of methane (CH₄) and CO₂. The production of biogas from biomass is being expanded around the world, Brazil has been studied the production of biogas from sugarcane bagasse and sugarcane variety energy. The aim of this study was to analyze the enzymatic pretreatment of sugarcane energy hemicellulases, laccases and pectinases that may facilitate the anaerobic digestion to produce biogas. Initially, hemicellulases (endoxylanase and arabinofuranosidase) were produced by the fungus *Humicola grisea*, laccases produced by the fungus were *P.sanguineus* CCT 4518 and pectinases were produced by the fungus *Penicillium* sp. C2 submerged fermentation by the produced enzymes obtained the following values of enzymatic activities: Laccases (2700U.mL⁻¹), hemicellulases (567U.mL⁻¹) and Pectinases (375U.mL⁻¹). The power bagasse was subjected to enzymatic hydrolysis with different formulations at 36 ° C for 48 hours under constant agitation at 120 rpm. The hydrolyzate was evaluated for content of total reducing sugars (TRS) and glucose by DNS and evaluated for xylose content by HPLC. The results indicate that treatment showed the best performance on use of laccase was 24 h and after addition of hemicellulases.

KEYWORDS: Biogas; Hemicellulase; Enzymatic hydrolysis; Laccase; Pectinase; Enzymatic pretreatment.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Etapas de produção do Biogás-----	22
FIGURA 2 - Diferença visual entre a cana tradicional e a cana energia-----	23
FIGURA 3 - Dados referentes ao número de colheitas da cana energia-----	24
FIGURA 4 – Esquema da parede celular vegetal-----	27
FIGURA 5 – Estrutura molecular da celulose-----	27
FIGURA 6 – Representação esquemática da organização das cadeias de celulose-----	27
FIGURA 7 – Representação da molécula de hemicelulose-----	28
FIGURA 8 – Pontos de ataque das enzimas-----	34
FIGURA 9 – Ação Enzimática-----	44
FIGURA 10 – Teor de glicose liberada nas hidrolise-----	48
FIGURA 11 – Teor de AR liberado nas hidrolises -----	48
FIGURA 12 – Ação enzimática na fibra vegetal -----	54

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- Relação por litro de biogás com outras fontes de energia-----	21
TABELA 2 – Comparativo entre a cana tradicional e a cana energia-----	25
TABELA 3 – Composição do bagaço da cana energia <i>in natura</i> -----	25
TABELA 4 – Tratamento Enzimático-----	41
TABELA 5 – Valores de atividades enzimáticas-----	44
TABELA 6 – Valores de açúcares solubilizado após a realização das hidrolises-----	45
TABELA 7 – Análise Tukey para AR-----	49
TABELA 8 - Análise Tukey para glicose-----	49
TABELA 9 – Grau de sinergismo-----	51
TABELA 10 -Resultado de HPLC no sobrenadante hidrolisado-----	52
TABELA 11 -Resultado de HPLC para águas de lavagem-----	53
TABELA 12 -Resultados de C.M.C-----	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABFase- α -L-Arabinofuranosidase

AMPTS II - *Automatic Methane Potential Test System*

ANEEL – Agência Nacional de Energia Elétrica

AR – Açúcar Redutor

DNS - Ácido 3,5-Dinitrosalicílico

ϵ - Coeficiente de Extinção Molar

FAO – *United Nations Food and Agriculture Organization*

GEE - Gases de Efeito Estufa

Hem - Hemicelulase

KTOE - *Kilotonne of Oil Equivalent*

Lac- Lacase

LiP - Lignina Peroxidase

MM - Meio Mínimo

Pect - Pectinase

RPM - Rotações por Minuto

RSU - Resíduos Sólidos Urbanos

ST - Sólidos Totais

STV - Sólidos Totais Voláteis

Sumário

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	17
2.1 OBJETIVO GERAL	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICO	17
3.1 CRISE ENERGÉTICA MUNDIAL	18
3.2 BIOMASSA VEGETAL.....	19
3.3 BIOGÁS.....	21
3.4 CANA ENERGIA	24
3.5 PRODUÇÃO DE BIOGÁS A PARTIR DE RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS	27
3.5.1 A PAREDE CELULAR VEGETAL	27
3.5.2 CELULOSE	28
3.5.3 HEMICELULOSE	29
3.5.4 LIGNINA.....	30
3.5.6 HEMICELULASE.....	32
3.5.7 LACASES.....	34
3.5.8 PECTINASES	35
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
4.1 ORIGEM DA CANA ENERGIA UTILIZADA.....	37
4.2 PRODUÇÃO DE LACASE	37
4.2.5 PRODUÇÃO DE PECTINASE	39

4.2.8 PRODUÇÃO DAS HEMICELULASES	41
4.2.9 REAÇÕES DE HIDRÓLISE COM CANA ENERGIA (VARIEDADE #26)	42
4.3.1 TESTE DE HPLC (“High Performance Liquid Chromatography”).....	43
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1 PRODUÇÃO DE ENZIMAS	46
5.2 HIDROLISES DO SUBSTRATO #26	46
5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....	57
6 REFERÊNCIAS	58

1 INTRODUÇÃO

O modelo de produção de energia utilizado por países industrializados e em desenvolvimento se baseia no uso fontes não renováveis e poluentes, como o petróleo. O agravamento da crise energética mundial se dá porque ocorre a finitude desses recursos juntamente e a pressão internacional, oriunda da preocupação ambiental, para que as emissões de poluentes na atmosfera sejam diminuídas (KUNZ; 2006). Como forma de amenizar ou até mesmo encerrar essa problemática energética, pesquisas para o desenvolvimento de fontes alternativas e limpas de produção de energia tem avançado de forma importante, dentro desse contexto a utilização de biomassa vegetal figura como uma promessa energética de grande potencial, para a produção de energia e de combustíveis (GOLDEMBERG, 2005).

A biomassa sólida engloba os resíduos de origem animal ou vegetal oriundos e os resíduos provenientes de ações florestais, tais como desmatamentos controlados. Com relação aos resíduos industriais e urbanos são tratados como biomassa sólida apenas as frações biodegradáveis da sua composição, ou seja, aqueles que possam ser decompostos por ação biológica em sistemas anaeróbios. (TOLMASQUIM, 2005).

A biomassa líquida é formada por compostos oxigenados como: fenóis, álcoois e ácidos carboxílicos que são obtidos por pirólise rápida a partir de uma grande variedade de fontes, tais como: resíduos florestais como o bagaço de cana-de-açúcar e cascas de cereais, resíduos da indústria da madeira. A biomassa líquida pode ser armazenada, bombeada e transportada como os produtos derivados do petróleo. A biomassa gasosa que também é designada por Biogás, tem origem nos efluentes agropecuários, da agroindústria e urbanos (lamas das estações de tratamento de águas residuais) e ainda nos aterros de resíduos sólidos urbanos (TOLMASQUIM, 2005).

A biomassa é uma fonte renovável de energia e de baixo impacto ambiental o que justifica o esforço para o desenvolvimento de novas tecnologias para a utilização da biomassa vegetal como fonte alternativa de energia (SILVEIRA, 2016).

O biogás é resultado da degradação biológica anaeróbia da matéria orgânica contida nos resíduos anteriormente referidos e é constituído por uma mistura de metano (CH₄) em porcentagens que variam entre os 50% e os 70% vol. em massa, o restante é formado essencialmente por CO₂. O biogás também pode ser utilizado em centrais de cogeração para a produção de energia elétrica e até mesmo como combustível em diversos meios para a produção de trabalho. Contudo, no processo de produção de energia, considera-se biomassa todo material orgânico renovável que pode ser usado para produzir energia (MANOCHIO, 2015).

A cana-energia trata-se de uma variedade pesquisada e desenvolvida a partir do cruzamento de espécies progênie e híbridos comerciais de cana-de-açúcar, o resultado desse cruzamento é uma cana mais forte, com um teor de fibra maior que as variedades comerciais e menor conteúdo de sacarose, mas com alto potencial produtivo, características essas que a tornam eficientes para produção de biocombustíveis e bioquímicos de segunda geração e para geração e/ou cogeração de energia elétrica (MANOCHIO, 2015).

Entre seus maiores benefícios, está o fato dessa variedade de cana-de-açúcar poder ser plantada em áreas com pouca propensão agrícola, facilitando a exploração de regiões com solos mais pobres, o que pode ocasionar desenvolvimento para populações dessas áreas mais pobres, com uma produtividade alta por hectare, a cana energia, não compete com a produção de alimentos, o que em teoria explica o atual interesse no cultivo, produção e estudo dessa variedade de cana (SILVEIRA, 2016).

O bagaço de cana energia tem sido utilizado para a produção de biogás. Na composição do bagaço há polímeros como a celulose, hemicelulose, pectina e lignina. A adição de enzimas modificadoras destas moléculas ao sistema de tratamento anaeróbio tem sido estudada, pois pode ajudar na degradação dos biopolímeros que formam a matéria orgânica, liberando uma maior quantidade de nutrientes para o crescimento dos microrganismos, melhorando também eventuais pós-tratamentos de secagem do material (AYOL, 2005).

A aplicação de enzimas é uma alternativa aos processos químicos convencionais por se tratar de uma tecnologia mais limpa, que consome pouca energia e gera mínimo impacto ambiental.

Este trabalho se propõe de forma mais específica em utilizar as enzimas: Lacase, Pectinase e Hemicelulase, em diversas concentrações e combinações em um pré-tratamento (hidrolises) da cana energia, para que com a medida de açúcares redutores liberados, se proponha uma condição ótima na qual auxilie e implemente a produção de biogás a partir das fibras tratadas por este método.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Propor um pré-tratamento enzimático, ao bagaço da cana energia com a utilização das enzimas: Lacase, Pectinase e Hemicelulase para ser implementado e possibilitar o auxílio na produção de biogás.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a combinação ótima de: lacase, pectinase e hemicelulase para promover um pré-tratamento do bagaço da cana energia, com o intuito de facilitar a acessibilidade das enzimas as fibras do bagaço, promovendo uma melhor biodigestão das fibras.
- Hidrólise do bagaço de cana energia com formulações de lacase, pectinase e hemicelulase. Análise da liberação de glicose, xilose e açúcares redutores totais.
- Estabelecer a melhor concentração de cada uma das enzimas citadas acima para tratar as fibras da cana energia.
- Verificar especificamente se a adição de Pectinase á hidrolise da cana energia auxiliaria na liberação de açúcares redutores totais.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 CRISE ENERGÉTICA MUNDIAL

Atualmente parte da energia consumida no planeta se baseia na utilização de fontes de energia não renováveis em destaque os combustíveis fósseis, os quais já possuem tecnologia difundida, mas possuem um alto impacto ambiental (BARRETO, 2016). O consumo de energia, e de alimentos é fundamental para o desenvolvimento da sociedade humana, porém, a sua geração e seu uso de forma impropria acarretam consequências danosas ao meio ambiente e à sustentabilidade do planeta (ROSSETO, 2016).

O processo de formação de combustíveis fósseis envolve diversas alterações físicas e químicas da matéria orgânica ao longo de milhões de anos. O termo combustíveis fósseis se refere a origem do material que iniciou o processo de degradação anaeróbica, a medida em que estes têm origem em matéria orgânica subsecivo que se encontra em profundidade (RABONI, 2017). Os combustíveis fósseis são a principal fonte energética da sociedade. Tal fato deve-se, em parte, ao fato das suas reservas apresentarem uma grande relação de energia por unidade de volume, à sua disponibilidade, à sua facilidade de exploração, entre outros. Atualmente, aproximadamente 66,5% da energia consumida mundialmente tem origem em combustíveis fósseis: petróleo, carvão ou gás natural (*International Energy Agency*, 2015).

O petróleo é formado por uma mistura de hidrocarbonetos, que de forma natural, podem surgir no estado líquido, gasoso ou sólido. Entre as frações do petróleo, as fases líquida e gasosa são as mais importantes. Estas frações passam por processos de refino para a obtenção de vários combustíveis e matérias-primas tais como gasolina, gasóleo, asfalto, entre outros (RABONI, 2017). A combustão dos combustíveis fósseis é responsável pelo aumento das emissões de dióxido de carbono para a atmosfera terrestre (MARTINEZ, 2009) assim como, pela formação secundária de poluentes capazes de afetar a saúde humana. Os poluentes emitidos para a atmosfera provocam efeitos que vão desde o aumento da mortalidade devida a doenças respiratórias e cardíacas, infecções no trato respiratório superior ou inferior, até outras patologias fora do trato respiratório. (MATSUOKA, 2010).

Os combustíveis fósseis são obtidos a partir de fontes não renováveis de energia, o que implica que esses recursos irão se esgotar em algum momento. Seu esgotamento com certeza trará uma crise de amplo aspecto, seja na economia, na mobilidade humana, na geração de energia, enfim em toda a forma de produção e consumo da sociedade humana moderna (CORTEZ, 2008). Diante desse cenário, a busca por fontes de energia limpa e renováveis se torna de suma importância, destacando-se a utilização de biomassa para a produção de biogás.

3.2 BIOMASSA VEGETAL

O fogo ainda hoje figura entre as maiores descobertas feitas pelo homem, recurso esse que o homem dominou no período paleolítico, conhecido como o período mais extenso da evolução humana, que durou cerca de dois milhões e meio de anos, porém o mais importante é que com a utilização do fogo ocorreu a maior evolução humana até então. O fogo permitiu que alimentos fossem cozidos (ou assados) e forneceu mais calorias com menos gasto de energia. O que possibilitou a espécie humana se desenvolver até atingir o topo dominante da cadeia alimentar. Desde tempos imemoriais a biomassa tem sido importante como fonte energética. Os historiadores estimam que a descoberta do fogo data de 500.000 a.C., o que certamente corresponde às primeiras utilizações da biomassa (principalmente madeira de árvores) para geração de calor para cozimento de alimentos e proteção contra o frio (COSTA, 2006).

A palavra biomassa foi utilizada pela primeira vez por Eugene Adam e compreende todo material orgânico produzido pelos seres vivos (animais, vegetais, fungos e protistas) em seus diferentes processos, desde quando ocorre a fixação da energia solar nas moléculas constituintes de suas células, passando por todas as etapas da cadeia alimentar, ou trófica (CRIVELLARI, 2016). A biomassa vegetal engloba todo material derivado da vida vegetal e que seja renovável em um período de tempo inferior a 100 anos (PROBSTEIN E HICKS, 1982; KLASS, 1998), e sob essa visão, os recursos energéticos como o petróleo, carvão mineral e xistos betuminosos não são considerados renováveis, apesar da sua origem vegetal e/ou animal. Diante do exposto o conceito energético de biomassa, abordado pelo CENBIO

estabelece que biomassa compreende todo recurso renovável oriundo de matéria orgânica (de origem animal ou vegetal) que pode ser utilizado para produção de energia (ANDRADE;2012).

Nos combustíveis fósseis, a energia que é liberada em sua queima é proveniente da energia química presente em sua estrutura, no caso da biomassa o processo energético ocorre de forma análoga que nos combustíveis fósseis, através da liberação da energia química, que está diretamente associada com os átomos de carbono e hidrogênio presentes nas moléculas orgânicas. A organização dessas moléculas orgânicas está intrinsicamente associada à assimilação da luz e dos nutrientes envolvidos no processo de fotossíntese, tendo como consequência a produção de biomassa vegetal, ocorrendo a bioconversão do dióxido de carbono e da água para uma forma de combustível orgânico (BORSCHIVER, 2014).

O processo de fotossíntese pode ser resumido na equação 01.



Nas reações de fotossíntese, os organismos participantes conseguem absorver de 0,1% a 3,0% da energia solar total envolvida no processo, esses valores referem-se a medida da energia máxima que poderá ser recuperada pelo organismo participante, caso ocorra a conversão do material fotossintetizado em um combustível sintético. Nesse processo, parte dessa energia poderá ser degradada pela formação de produtos intermediários, e, portanto, ocorrerão perdas associadas à bioconversão da biomassa em um combustível tradicional (COSTA, 2006).

Durante todo o curso de evolução da humanidade, o uso de madeira proveniente de áreas florestais foi considerado o grande responsável pelo desmatamento das áreas vegetais do planeta, incluindo-se aí a Europa e os Estados Unidos. Mesmo no Brasil, nos dias atuais a destruição de áreas de Mata Atlântica e de grande parte da Floresta Amazônica é consequência do desmatamento indiscriminado e criminoso, em grande parte para utilização

da madeira como fonte de energia de forma não sustentável e no caso da Amazônia expansão de áreas voltadas à pecuária. Por este motivo, durante muito tempo, a biomassa foi vista de forma pejorativa, como sendo um combustível para ser usado apenas por países subdesenvolvidos (GUIMARÃES., 2017). Contudo, as crises do petróleo durante a década de 1970 tiveram um papel de suma importância para mudar esta visão, para tanto o uso da biomassa como fonte de energia limpa e renovável passou a ser visto como uma excelente alternativa em substituição aos derivados de petróleo.

A biomassa é uma fonte renovável de energia e de baixo impacto ambiental o que justifica o esforço para o desenvolvimento de novas tecnologias para a utilização da biomassa vegetal como fonte alternativa de energia (SILVEIRA, 2016).

A produção de biogás que utiliza biomassa vegetal vem sendo ampliada em todo o mundo, em especial no Brasil essa perspectiva vem aumentando nos últimos anos. O Brasil é um potencial gerador de energia por fontes renováveis, à produção agropecuária, em especial, produz uma quantidade relevante de resíduos, que podem ser utilizados para a produção de biomassa, o combustível produzido a partir da biomassa vegetal, passa por um processo de fermentação de óleos vegetais extraídos do caule de plantas, folhas, lenha, carvão vegetal e cana-de-açúcar. A biomassa vegetal também pode incorporar resíduos vindos de atividades florestais, como a extração de madeira (MONLAU.,2012).

Dentre possíveis alternativas para o uso da biomassa vegetal é o seu uso em biodigestores, para a obtenção de biogás. Os biodigestores podem ser definidos como câmaras que não contém oxigênio, permitindo que bactérias fermentativas metanogênicas, acetogênicas e archaeas decomponham os dejetos orgânicos, produzindo como produto final adubo orgânico, biofertilizantes e biogás (MARQUES; 2014).

3.3 BIOGÁS

Os investimentos em energia renovável apresentam, em sua maioria, custos maiores aos necessários para a adoção de fontes tradicionais. No entanto as energias renováveis trazem consigo diversos pontos positivos passíveis de serem citados, como o desenvolvimento das áreas econômica e social, investimentos na geração de energia que se utiliza do biogás como fonte combustível podem ser viáveis economicamente devido a um aumento considerável na disponibilidade e produção de biomassa. No Brasil principalmente pelos frequentes aumentos de produtividade do agronegócio brasileiro, essa disponibilidade, assim como o reaproveitamento de resíduos sanitários e da comercialização dos créditos de carbono (KARLSSON, 2014). O biogás pode ser produzido em estações de tratamento de esgotos e outras fontes de biomassa, aumentando a oferta e possibilitando a geração descentralizada de energia (PITARELO, 2007).

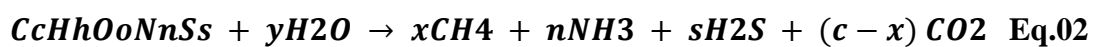
O biogás é formado a partir da degradação biológica anaeróbia da matéria orgânica contida nos resíduos derivados do agronegócio brasileiro, resíduos florestais e resíduos sanitários. Este combustível é constituído por uma mistura de metano (CH_4) em porcentagens em volume que variam entre os 50% Vol e os 70% Vol sendo o restante essencialmente CO_2 . Segundo Oliver (2008), o biogás é um gás que pode ser utilizado como combustível, que tem por característica uma combustão de forma limpa, e renovável, seu poder calorífico varia de 5000 a 7000 Kcal/m³ (OLIVER et al., 2008). Pode-se comparar a relação de equivalência energética de 1m³ de biogás com outras fontes de energia como mostrado na Tabela 1.

Tabela 1: Relação de equivalência energética do biogás (1m³) comparada a outras fontes de energia

0,61 litros gasolina	0,45 litros de gás de cozinha
0,58 litros de querosene	1,5 quilos de lenha
0,55 litros óleo diesel	0,79 litros de álcool

Fonte: Oliver et al., 2008.

O metano se forma de maneira natural em ambientes isentos de ar, a partir da biomassa ou de matéria orgânica que possua carboidratos, lipídeos, proteínas entre outros nutrientes na sua composição. O processo é realizado por bactérias anaeróbicas, onde as moléculas sofrem decomposição formando metano e impurezas. A formação do biogás a partir da biomassa resulta, em geral, da equação 02:



O processo de produção de biogás possui quatro fases básicas: a hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese, sendo que na metanogênese ocorre geração do biogás no processo. No processo de produção do biogás, as reações bioquímicas devem ocorrer de forma sinérgica, sendo que as fases 1-2 e 3-4 ocorrem sempre através de forma seletiva e intrínseca, assim são organizadas em dois estágios distintos. (SZKLARZ, 1999). A Figura 1 representa o conjunto dos processos bioquímicos envolvidos na formação do biogás.

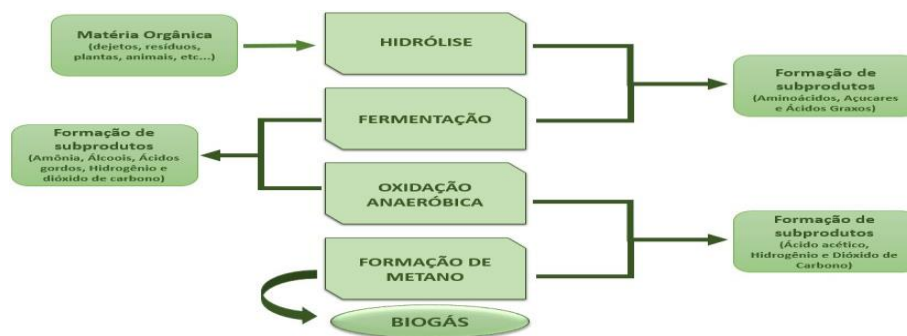


Figura 1: Etapas de produção do Biogás.

Fonte: <<<http://www.ecycle.com.br> >> Acesso em 23/05/2018.

Contudo, dentre as alternativas do ponto de vista tecnológico mais favorável, está o aproveitamento da biomassa para geração de energia, assim, a adoção do método de utilização do biogás no país deve caminhar lado a lado ao desenvolvimento tecnológico, propiciando o surgimento de novos projetos eficazes no aproveitamento energético do biogás. (GALBIATTI et al., 2010).

3.4 CANA ENERGIA

Trata-se de uma variedade desenvolvida a partir do cruzamento de espécies progênes e híbridos comerciais de cana-de-açúcar. Esta espécie é obtida a partir do cruzamento de *Saccharum officinarum* – selvagem e rica em açúcar – e *Saccharum spontaneum* – selvagem. Esta variedade de cana apresenta uma quantidade maior de fibras vegetais, bem como taxas produtivas maiores que as apresentadas pela cana-de-açúcar tradicional, características que a tornam ideal para fabricação de biocombustíveis e bioquímicos de segunda geração e para geração e/ou cogeração de energia elétrica (PAIVA 2017).

De acordo com Verissimo, (2016) a cana energia é classificada em duas categorias: Cana Tipo I: com médio nível de açúcar (acima de 12% de sacarose) e alto teor de fibra (acima de 18%); Cana Tipo II: com baixíssimo nível de açúcar (sacarose menor que 6%) e elevado nível de fibra (acima de 28%). A figura 2 representada abaixo mostra a diferença visual entre a cana tradicional e a cana energia.



Figura 2: Diferença visual entre a cana tradicional e a cana energia. Fonte: <<<http://www.biomassaworld.com.br>>> Acesso em 10/08/2018.

A cana energia apresenta vantagens interessantes em relação a cana de açúcar tradicional, uma delas é poder ser cultivada em áreas com poucas condições de produtividade, seja em relação a falta ou excesso de minerais importantes no solo, seja pela posição geográfica em relação ao relevo, o que permite a exploração de regiões mais pobres, devido a sua alta produtividade por hectare, outra característica importante, o cultivo dessa espécie não compete com a produção de alimentos (SILVEIRA, 2014).

A cana energia é, portanto, formada basicamente por lignocelulose, as quais quase sempre precisam passar por um processo de pré-tratamento para separação, e então utilização, da celulose. Segundo Matsuoka (2014), a cana energia possui características estruturais que a separa da cana de açúcar tradicional: a cana energia apresenta uma lâmina de folha mais estreita, uma haste mais fina e um perfilhamento mais profuso. Ainda sobre a caracterização da cana energia de acordo com Kumar (2015), a cana energia produz mais talos e permite maior proporção de multiplicação, permitindo um maior número de colheitas, graças ao

rizoma de *S. spontaneum*. Em relação aos números de colheitas referentes a cana energia, a figura 3, demonstra os valores de colheitas produzidos por essa variedade de cana energia.

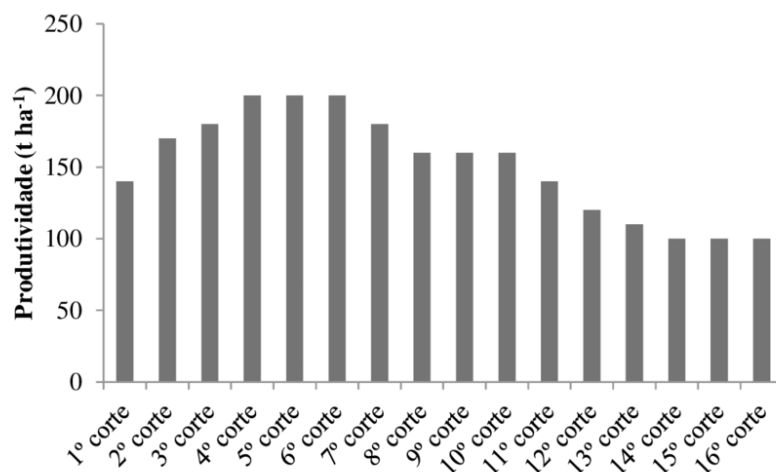


Figura 3: Dados referentes aos números de colheitas da cana energia. Fonte: <<<http://www.biomassaworld.com.br>>> Acesso em 10/08/2018.

A tabela 2 apresenta um quadro comparativo importante entre as características da cana de açúcar comum em relação a cana energia. Os dados demonstram potencial energético desse material, é de grande relevância em um contexto de busca por fontes limpas de energia e desenvolvimento sustentável.

Tabela 2: Comparativo da cana- de- açúcar tradicional x cana energia

Características	Cana-de-açúcar tradicional	Cana Energia
Fibras	17,4%	27%
Açúcares	12,6%	8,5%
Produtividade (massa verde ton/hA)	92	180
Produtividade (Fibra ton/hA)	16	48,6
Produtividade (açúcares ton/hA)	11,6	15,3

Fonte: <<<http://www.biovertis.com.br>>> Acesso em 10/07/2018.

3.5 PRODUÇÃO DE BIOGÁS A PARTIR DE RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS

Resíduos lignocelulósicos como o bagaço de cana-de-açúcar têm sido utilizados para a produção de biogás. Os materiais lignocelulósicos são compostos por três diferentes tipos de polímeros associados entre si: celulose, hemicelulose e lignina (SILVA; 2016). Estes componentes estão distribuídos na cana energia da seguinte forma (Tabela 3)

Tabela 3: **Composição do bagaço de cana energia *in natura***

Componentes	Fração (% m/m)
Celulose	34,1 ± 1,2
Hemicelulose	29,6 ± 1,4
Lignina	19,4 ± 0,4
Cinzas	7,9 ± 1,1
Umidade	4,4 ± 0,1
Total	95,5 ± 4,3

Fonte: MAEDA et al,2011

3.5.1 A PAREDE CELULAR VEGETAL

A estrutura da parede celular vegetal é dividida em três camadas: lamela média, parede primária e parede secundária (Figura 4). A parede primária é constituída por uma estrutura de celulose, formada por dois tipos de parede classificados pelos tipos de ligantes. O primeiro tipo é encontrado em dicotiledôneas e possui quantidades iguais de glucana e xiloglucana internalizado em uma matriz de pectina (ZHU., 2010). O segundo tipo está presente em cereais e tem glucuroarabinoxilanas como seus ligantes, mas mostra ausência de pectinas e algumas proteínas estruturais. A parede secundária é formada por três subcamadas: S1 (camada externa), S2 (camada média) e S3 (camada interna).

As microfibrilas de celulose da parede secundária estão inseridas em lignina, funcionando comparativamente com uma estrutura contendo “hastes de aço” cobertas por “concreto”, mas mantendo certa flexibilidade.

Nas fibras que constituem a madeira, a concentração de celulose aumenta da lamela média para a parede secundária, tendo as regiões S2 (camada média) e S3 (camada interna) como as que possuem as maiores concentrações de celulose (VÁZQUEZ, 2007). As hemiceluloses têm sua distribuição parecida com a celulose, concentrando-se na parede secundária (MCMILLAN, 1994).

A figura 4 esquematiza a parede celular, apontando suas camadas e seus componentes, apresentando as estruturas e a forma como estão distribuídos nas estruturas vegetais.

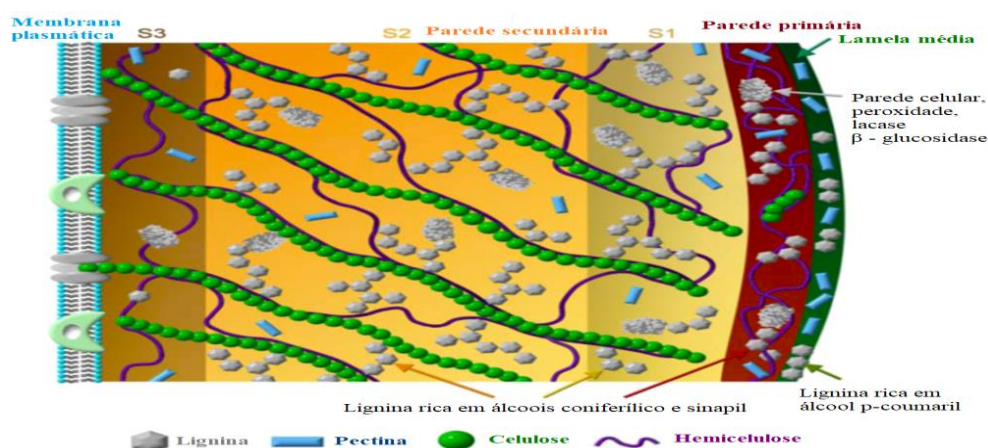


Figura 4: Esquema da parede celular vegetal apontando suas camadas e seus componentes.

Fonte: <<<http://www. www.mdpi.com> >> Acesso em 02/01/2019

3.5.2 CELULOSE

A celulose é um polímero linear que possui como unidade básica de repetição de a celobiose, um dímero de glicose, e tem como função dar proteção, forma e suporte às células vegetais (Figura 5) (KUKRETY et al., 2017). As cadeias de celulose são unidas por forças de Van der Waals e ligações de Hidrogênio. A celulose encontra-se associada a outros componentes como hemicelulose, pectina, proteínas e lignina (SOUZA, 2012).

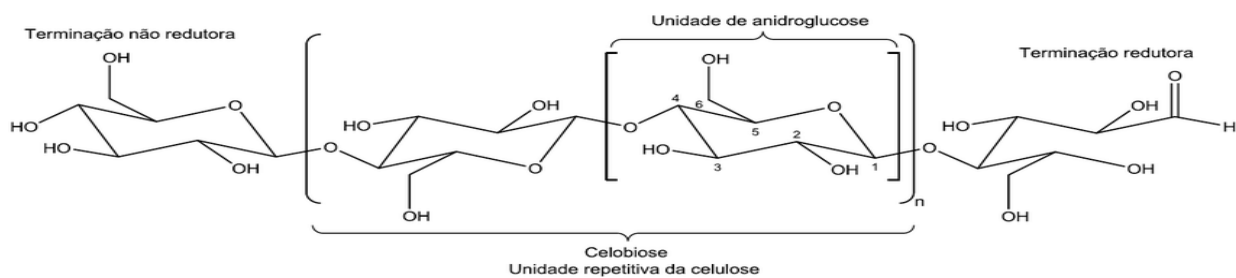


Figura 5: Estrutura molecular da celulose. Fonte: Modificado de Klemm e colaboradores (2005).

A presença das ligações de hidrogênio na molécula celulose explica a rigidez da sua estrutura, a tornando praticamente insolúvel em água, ajudando na proteção contra a degradação das fibras, o que tende a atrapalhar os processos de hidrólises (CHAVES,1982). A organização das cadeias de celulose forma regiões cristalinas intercaladas por regiões amorfas (Figura 6), sendo que a região cristalina (onde estão localizados os grupos hidroxilas) é fortemente organizada conferindo resistência e proteção contra a degradação externa, e a região amorfa não possui uma organização molecular, tornando-a mais susceptível à degradação externa (CHAVES; 1982).

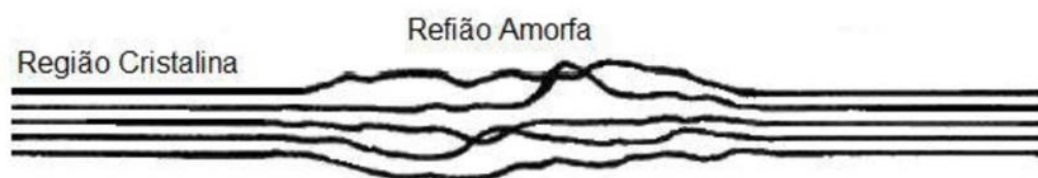


Figura 6: Representação esquemática da organização das cadeias de celulose
Fonte: adaptada de Gurgel (2010).

3.5.3 HEMICELULOSE

A hemicelulose é uma classe de carboidratos com composição e estrutura variáveis de acordo com o tipo de planta. De forma específica, as hemiceluloses são polissacarídeos de estrutura amorfa com cadeia ramificada e podem conter pentoses (β -D-xilose, α -L-arabinose), hexoses (β -D-manose, β -D-glicose, α -D-galactose) e ácidos urônicos. Além disso, grupos

hidroxila nos açúcares podem ser parcialmente substituídos por grupos acetila (PEREIRA, 2013).

As hemiceluloses são classificadas de acordo com a identidade dos principais açúcares presentes, como gincanas, xilanas, mananas, galactanas e galacturanas. Em termos de composição química a xilana é a principal hemicelulose presente na parede celular das plantas, sendo, após a celulose, o polissacarídeo mais abundante encontrado na natureza. Em plantas, situa-se entre a lignina e as fibras de celulose, formando ligações covalentes com a lignina e ligações de hidrogênio com as fibras de celulose (MELO, 2010).

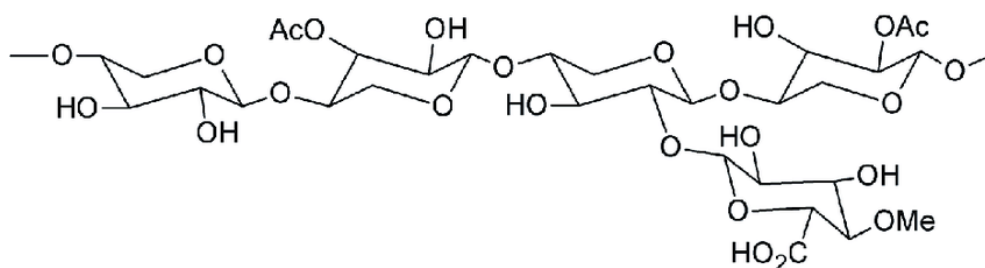


Figura 7: Representação da molécula de hemicelulose

Fonte: Sousa Neto et al. (2012).

Hemiceluloses são utilizadas na produção de enzimas, produtos de fermentação como solventes, ração para animais, revestimentos, adesivos, remédios, aditivos plásticos, impressões têxteis e nano partículas (GUERRIERO et al., 2016).

3.5.4 LIGNINA

Trata-se de um polímero tridimensional, de estrutura variada, formada por monômeros de fenil propano, sua molécula é bastante ramificada e amorfa, sua estrutura e composição química variam de acordo com a fonte. As ligninas se apresentam em associações com a hemicelulose e contribuindo com a resistência à degradação natural da

lignocelulose. Em composição percentual a lignina representa 33 % dos materiais lignocelulósicos, ficando atrás em termos percentuais de massa apenas da celulose e da hemicelulose. A lignina pode ser considerada o terceiro componente mais abundante do planeta, com cerca de 300 bilhões de toneladas por todo o globo (CASTRO; 2010).

A lignina é responsável pelo suporte mecânico e elástico, facilitando o transporte de água e nutrientes pela planta, paralelamente a isso ela atua evitando entrada de patógenos microbianos, zelando assim pela saúde do vegetal, apresenta-se em maior quantidade em plantas menos lenhosas, oferecendo maior resistência à ataques contra sua integridade estrutural, justamente essa resistência é um dos maiores obstáculos para o aumento da acessibilidade à celulose, pois a lignina atua como uma barreira física e química para a ação de enzimas celulolíticas (LUCENA; 2004).

Traçando um paralelo comparativo em torno da sua estrutura, as hemiceluloses são mais parecidas com a celulose do que com a lignina e são depositadas na parede celular em um estágio anterior a lignificação. Sua estrutura apresenta ramificações e cadeias laterais que interagem facilmente com a celulose, proporcionando flexibilidade e estabilidade ao conjunto, comparada as celulosas, as hemiceluloses apresentam maior susceptibilidade à hidrólise ácida, pois oferecem uma maior acessibilidade aos ácidos.

3.5.5 PRÉ TRATAMENTO ENZIMÁTICO

Os resíduos lignocelulósicos podem ser utilizados para a produção de biocombustíveis como biogás e etanol celulósico. Para aumentar a disponibilidade dos carboidratos aos processos de fermentação alcoólica e digestão anaeróbica tem sido proposto o pré-tratamento enzimático com enzimas midificadoras da lignina, pectina e hemicelulose. A utilização de enzimas em sistemas de tratamento anaeróbio tem despertado o interesse da comunidade acadêmica para projetos de pesquisas, pois a adição de enzimas pode potencializar a degradação dos biopolímeros que formam a matéria orgânica, liberando uma quantidade maior de açúcares favorecendo o crescimento dos microrganismos, melhorando também eventuais pós-tratamentos de secagem do material (AYOL, 2005).

De acordo com Bochmann et al. (2007), a digestão anaeróbia de grãos utilizados para fabricação de cerveja, com a utilização de um pré-tratamento enzimática com uma mistura enzimática produzida por obtido com uma fermentação em estado sólido, aumentou a qualidade do biogás produzido. Como resultado o biogás produzido apresentou uma maior concentração de CH₄ e concentração menores de CO₂ e H₂S em comparação ao biogás produzido pelos cereais não tratados com a enzima.

Angelidaki e Ahring (2000) adicionaram um pré-tratamento enzimático a fibras separadas do esterco bovino com a bactéria B4 que degrada hemicelulose. Essa adição aumentou em 30% a produção de metano, em comparação às fibras não tratadas, A utilização de enzimas em processos de digestão de anaeróbia apresenta-se então como uma tecnologia promissora, podendo ser aplicada com sucesso no tratamento de diferentes substratos.

As enzimas são proteínas com a função de acelerar reações químicas nas células, funcionando como um catalisador, o termo enzima foi introduzido por Kuhne em 1878 para intitular a presença no lêvedo (fermento) de um princípio químico responsável por sua atividade fermentativa (de produzir etanol a partir de um açúcar, na ausência de oxigênio).

Ainda dentro da conceituação das enzimas, elas podem ser definidas como moléculas protéicas, tratando-se de polímeros constituídos por aminoácidos ligados por ligações peptídicas covalentes. Algumas são capazes de aumentar em 10¹⁴ vezes a velocidade de determinada reações, sem requerer condições extremas de pH, temperatura e pressão, Atuando como catalisadores biológicos, sendo capazes de aumentar a velocidade de reação sem alterar a constante de equilíbrio ou a variação de energia livre (SOUZA,2012).

Com o intuito de utilizar enzimas em um pré tratamento das fibras vegetais que constituem o bagaço da cana energia, torna-se necessário discorrer sobre sua composição e estrutura.

3.5.6 HEMICELULASE

As hemicelulases (xilanases) são glicosidases (O-glicosidases hidrolases, EC 3.2.1.x) que catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas β 1,4 entre os monômeros de xilose da

cadeia central da xilana. Foram inicialmente nomeadas de pentonases e então reconhecidas pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) em 1961 quando foram codificadas como EC 3.2.1.8. A xilanase tem como nome oficial “endo-1,4- β -xilanase”, porém ela é normalmente chamada por seus diversos sinônimos: xilanase, endoxilanase, 1,4- β -D-xilana-xilanohidrolase, endo-1,4- β -D-xilanase, β -1,4-xilanase e β -xilanase. As xilanases são divididas em duas famílias principais: F/10 e G/11), as xilanases da família 10 são maiores, mais complexas e produzem oligossacarídeos menores; as xilanases da família 11 são mais específicas para a xilana (MELO, 2010).

Como dito anteriormente, por se tratar de uma estrutura muito heterogênea e altamente complexa, a hidrólise completa da xilana depende de diversas enzimas atuando de forma cooperativa. A endo-1,4- β -D-xilanase (EC 3.2.1.8) atua na cadeia de xilana em pontos diferenciados dependendo da estrutura da molécula, tamanho e presença de substituintes enquanto que a β -D-xilosidases atua em extremidades não redutoras na formação de monômeros de xilose, sendo que a retirada dos substituintes é catalisada por enzimas como: α -L-arabinofuranosidases - ABFases (EC 3.2.1.55), α -D-glucuronidasas (EC 3.2.1.139), acetilxilan esterase (EC 3.2.1.72), ácido ferúlico esterase (EC 3.2.1.73) e ácido p-coumarico esterase (EC 3.1.1.-) (MELO; 2010).

As ABFases são enzimas que atuam em conjunto com outras enzimas acessórias, de forma sinérgica para degradar os açúcares de xilana. A indução principalmente na desconstrução da xilana fazendo a retirada das cadeias laterais de arabinose do esqueleto de xilose de arabinoglucuronoxilano. As ABFases são classificadas em quatro famílias de glicosil hidrolases (GH) 43, 51, 54 e 62) e podem hidrolisar ligações glicosídicas com inversão líquida (GH 43) ou retenção (GH 51, 54), a principal hemicelulose do bagaço da cana de açúcar é a arabinoxilana, constituída de uma cadeia central de xilose com ramificações de arabinofuranose. Crivelari (2012), afirma que a arabinoxilana representa entre 25% a 33% da parede celular de cana-de-açúcar, e que existem algumas ramificações específicas, além de monossacarídeos, que podem se apresentarem ligadas às arabinoxilanas, entre elas o termo substituinte metila, ácido ferúlico e ácido paracumárico.

Durante uma possível acetilação o grupo de entrada pode reagir diretamente na cadeia principal, enquanto os compostos fenólicos se ligam à arabinose, podendo haver nas ramificações com ácido ferúlico, levando a formação de diferulatos, unindo duas cadeias de arabinoxilanas de forma a estabelecer uma interação intramolecular entre as cadeias orgânicas envolvidas, dando origem a formação de lignina. Processo no qual os ácidos ferúlicos são considerados como os iniciadores da formação da lignina na parede celular (BUANAFINA, 2009).

3.5.7 LACASES

As lacases (EC 1.10.3.2) são polifenoloxidasas que catalisam a oxidação de uma diversidade de substâncias orgânicas e inorgânicas, incluindo mono e polifenóis, aminas, metoxifenóis e aminas aromáticas, com redução do oxigênio para água. A lacase utiliza o oxigênio dissolvido na água como receptor final de elétrons, tornando este processo mais atrativo em relação àqueles que utilizam peroxidases, onde o peróxido de hidrogênio é o agente oxidante. (OGATA; 2013).

Em termos históricos a lacase foi observada pela primeira vez em uma árvore japonesa produtora de Laca, chamada de *Rhus vernicifera Stokes* (Anacardiaceae) (MOROZOVA et al., 2007; GIARDINA et al., 2010). Se tornando uma das primeiras enzimas a ser estudada, sendo cientificamente descrita pela primeira vez, em 1883, por Yoshida. No ano de 1896, Bertrand e Laborde descobriram fungos produtores de lacase e, com essa descoberta elas começaram a ser encontradas em uma grande variedade de fungos, assim como, em alguns insetos, plantas e bactérias, sendo produzidas em grande quantidade pelos chamados fungos de ‘podridão branca’, responsáveis pela degradação da lignina (OGATA; 2013).

Contudo a função das lacases em plantas e fungos ainda não foi descrita pela ciência, porém estipula-se que, em plantas elas estão envolvidas na síntese de lignina e catalisam a polimerização radicalar de unidades estruturais de álcoois p-cumarilílico, coniferilílico isso nas plantas. Para os fungos teoriza-se que a função é inversa, ou seja, a degradação de lignina, além da destruição de patógenos, destoxificação e desenvolvimento morfológico do fungo, grande parte das diferentes lacases conhecidas apresentam como características gerais: D)

massa molecular (MM) na faixa de 60-100 kDa. II) possuem 2 ou 3 isoenzimas, em geral denominadas La (ou lcc) I, II e III. III) possuem estrutura de glicoproteína, com 15-20% de conteúdo relativo de carboidratos IV). Todas as lacases conhecidas contém cobre, os quais apresentam um número de oxidação 2+ (SILVA, 2006).

3.5.8 PECTINASES

As pectinases compõem um grupo de enzimas que degeneram substâncias pécticas, através de hidrolises que atacam as ligações glicosídicas ao longo da cadeia carbônica, são classificadas como ser despolimerizantes ou desesterificantes e são produzidas por plantas, fungos filamentosos, bactérias e leveduras. Entre as aplicações destas enzimas nas indústrias, incluem amadurecimento de frutas, clarificação e redução de viscosidade em sucos de frutas, tratamento preliminar do suco de uva para indústrias vinícolas, extração de polpa de tomate, fermentação de chá e chocolate, tratamento de resíduos vegetais, degomagem de fibras nas indústrias têxtil e de papel, nutrição animal, enriquecimento protéico de alimentos infantis e extração de óleos. (FAVELA & TORRES et al., 2005).

Esse grupo de enzimas pode ser sintetizado por uma grande variedade de microrganismos capazes de produzir enzimas pectinolíticas, incluindo bactérias, fungos filamentosos, leveduras, protozoários, insetos e nematoides. Contudo, devido à fácil produção e à diversidade de pectinases, os fungos filamentosos são os mais empregados para a produção em escala industrial dessas enzimas, o pH ideal das pectinases produzidas por fungos, aproxima-se do valor de pH de muitos sucos de frutas, na faixa de 3,0 a 5,5. Assim esse grupo enzimático atua diretamente em processos fisiológicos relacionados à reestruturação da parede celular da planta, sendo responsáveis pela degradação da pectina, (BLANDINO *et al.*, 2002; HARHOLT; SUTTANGKAKUL; SCHELLER, 2010; TU *et al.*, 2014).

São descritos três grupos de enzimas: as protopectinases, as esterases (pectinesterases) e as despolimerases (hidrolases e liases). Protopectinases: são enzimas que degradam a protopectina insolúvel gerando a pectina polimerizada altamente solúvel. Esterases:

catalisam a desesterificação da pectina por remoção do grupo metoxil das substâncias pecticas, formando ácido pectico. A pectina de baixa metoxilação liberada pode ser hidrolisada pela poligalacturonase. As pectinesterases (PE) são produzidas por fungos, bactérias, leveduras e plantas superiores e estão presentes em praticamente todos os preparados comerciais (MARTINS, 2006).

As enzimas despolimerizantes são classificadas de acordo com a clivagem hidrolítica (hidrolases) ou transeliminativa (liases) das ligações glicosídicas; mecanismos endo-(randômica) ou exo- (a partir do final da molécula) de ação e preferência por ácido pectico ou pectina como substrato. Envolve as hidrolases (catalisam a hidrólise de ligações α -1,4) e as liases (catalisam β -eliminação) (Uenojo, 2003). Os pontos de ataque das enzimas pecticas na molécula de pectina estão representados na Figura 8.

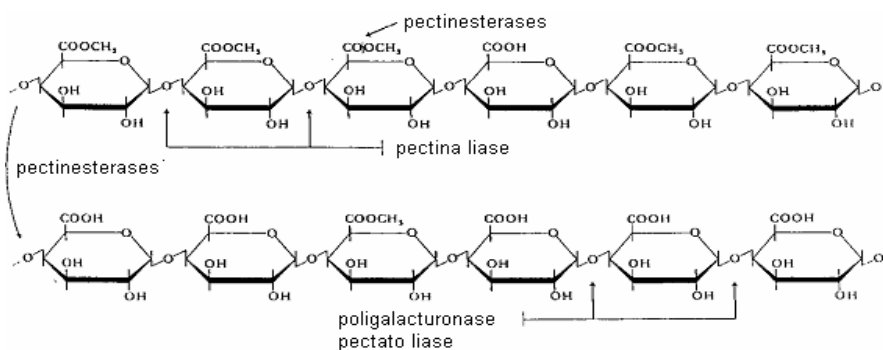


Figura 8: Pontos de ataque das enzimas Fonte: Martins (2006)

A combinação de pectinases, celulases e hemicelulases, chamadas coletivamente de enzimas de maceração, é usada na extração e clarificação de sucos de frutas e vegetais, tratamento enzimático conduz a uma extensa degradação da lamela média e da pectina das paredes celulares por ação de poligalacturonase, pectina metil esterase e pectina liase (FAVELA & TORRES et al., 2005).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados nos Laboratório de Enzimologia e Biocatálise Ambiental da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, no Laboratório de

Biotecnologia de Fungos do Instituto de Ciências Biológicas, também da Universidade Federal de Goiás e nos laboratórios de Química do Instituto Federal de Goiás.

4.1 ORIGEM DA CANA ENERGIA UTILIZADA

A cana energia utilizada para a realização do experimento foi cedida pela empresa Vignis Bioenergia Ltda, que participa do projeto “*Biogás redutor de cana energia para redução de minérios lateríticos*”, em parceria com o Instituto Federal de Goiás (IFG). É uma variedade de cana energia desenvolvida pela empresa, que foi entregue já triturada, com a identificação #26. Este material foi mantido sob refrigeração, a - 8°C, conforme protocolo do grupo de pesquisa em biogás, até seu uso.

4.2 PRODUÇÃO DE LACASE

A lacase utilizada na realização do trabalho foi fornecida pelo Laboratório de Enzimologia e Materiais Bioativos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás (LENZIBIO), produzida por Cleidilene Gomes dos Santos seguindo o protocolo de produção do grupo de estudos enzimáticos sob a orientação da professora Dr^a Mariângela Fontes Santiago (SANTOS 2019).

4.2.1 MATERIAL VEGETAL

O Resíduo de escolha para indução natural foi a casca do pequi (*Caryocar brasiliense camb*), a secagem da casca do pequi foi feita em estufa, durante quatro dias em temperatura de 40° C, o processamento foi feito triturando-se o resíduo em moinho. A granulometria foi padronizada para 60 mesh. O resíduo seco e triturado foi armazenado em dessecador.

4.2.2 ORIGEM E MANUTENÇÃO DO FUNGO

A linhagem de *P. sanguineus* CCT 4518 foi obtida junto à Fundação André Tosello em Campinas-SP. O fungo foi mantido em meio BDA (Batata Dextrose Ágar), no escuro, à

temperatura ambiente, armazenados a 4° C e repicados mensalmente para a manutenção das culturas.

O meio de cultura utilizado para repique do fungo foi o BGA (Batata, glicose, ágar). Foram utilizados 5,0 g de dextrose, 3,750 g de ágar, 50 ml do caldo batata e água destilada q.s.p para 250 ml. O caldo da batata foi obtido a partir do cozimento de 1 kg de batata em 1 litro de água mineral (Não foi filtrado e utilizado todo o conteúdo). Foi autoclavado o meio a 1 Atm, 120° C por 20 min, e em seguida distribuído cerca de 20 mL nas placas de Petri. Depois da solidificação do meio, foi adicionado 5 mm de diâmetro do fungo. A placa com o fungo foi incubada e em estufa BOD à 28°C por 7 dias.

4.2.3 PRODUÇÃO DA LACASE

Em erlenmeyers de 250 mL foram acrescentados 120 mL do meio de cultura CBD (caldo batata e dextrose) para o meio foi utilizado 0,6 g de dextrose, 1,2 g da casca do pequi, 24 mL caldo batata e água destilada qsp para 120 mL.

A autoclavagem foi feita a 1 Atm 120° C por 20 min, foram incubados 10 discos de 5 mm retirados do meio sólido com o fungo mantido em BOD por 7 dias, em seguida foram colocados em uma incubadora refrigerada com agitação com rotação de 150 rpm durante 6 dias a 28 ° C.

O controle negativo foi feito com o microrganismo crescido na ausência do material vegetal (resíduo da casca do pequi), e o controle positivo foi feito com 2 microlitros de Xilidina e 0,0005 % de cobre que são indutores sintéticos. A produção da lacase utilizada neste trabalho foi com 8 dias.

4.2.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA LACASE

A atividade da lacase foi determinada pela oxidação do substrato, sendo essa oxidação acompanhada por 5 min. Utilizou-se a seringaldazina (Sigma Chemical Company) como

substrato. A metodologia utilizada para determinação da enzima Lacase (Lac) foi a descrita por Szklarz et al. (1989 - modificado).

Foram utilizados 10 µL de extrato bruto, 890 µL de tampão acetato de sódio 50 mol.L⁻¹ (pH 5,0) e 100 µL de seringaldazina 1,0 mmol.L⁻¹ preparada em etanol. A reação iniciou-se pela adição da seringaldazina (Coeficiente de extinção molar = 525 nm = 65000 L. mol⁻¹.cm⁻¹) e foi acompanhada por 5 min a 525 nm em espectrofotômetro, à temperatura ambiente.

O branco constitui-se de 10 µL do extrato bruto e 990 µL do tampão acetato de sódio 50 mol.L⁻¹ pH 5,0, sem adição de seringaldazina. A atividade enzimática foi determinada em triplicata.

Para determinação do cálculo de atividade enzimática foi utilizada a Equação 1, descrita por Leonowicz e Grzywnowicz (1981) com modificações:

$$U = \frac{10^6 \cdot A}{\epsilon \cdot R \cdot t} \quad Eq. 3$$

Na qual:

A = Absorbância no comprimento de onda específico (nm);

ε = Coeficiente de extinção molar para cada substrato (L.mol⁻¹.cm⁻¹);

R = Quantidade de extrato bruto (mL);

t = Tempo de reação (min).

Uma unidade U foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 µmol.L⁻¹ de substrato por minuto. O resultado é expresso em U.mL⁻¹.

4.2.5 PRODUÇÃO DE PECTINASE

A Pectinase utilizada na realização do trabalho foi cedida, pela Professora Dr^a Mariângela Fontes Santiago e produzida pelas alunas: Jéssica Souza e Silva, Germany Borges Barbosa e Karine Rodrigues dos Santos seguindo o protocolo de produção do grupo de estudos enzimáticos do LENZIBIO .

4.2.6 ORIGEM, MANUTENÇÃO DO FUNGO E PREPARO DO INÓCULO

O fungo *Penicillium* sp. C2 foi isolado do solo do Distrito Federal e classificado por análises morfológicas. O fungo foi selecionado quanto à capacidade de metabolizar celulases e xilanases em placa (COSTA; FARIA; TEIXEIRA, 2014). A cultura do fungo foi mantida a 4°C em ágar aveia e repicado a cada 30 dias.

A partir da cultura de manutenção em ágar aveia foi padronizado o inóculo em placas de Petri incubadas a 25 °C ± 2,5 por 5 dias.

Toda manipulação do microrganismo foi realizada em cabine de fluxo laminar após a utilização de métodos de limpeza e esterilização, luz ultravioleta, álcool de 70% e na presença de chama de bico de Bunsen. Todos os materiais e meios de cultura utilizados foram submetidos à autoclavação.

4.2.7 PRODUÇÃO DA ENZIMA E DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Os experimentos foram conduzidos em triplicata utilizando frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL de meio com Pectina cítrica 1,5% e meio mineral (KH₂ PO₄ 0,5%, FeSO₄ 7H₂O 0,0001%, ZnSO₄ 7H₂O 0,0008%, MgSO₄ 7H₂O 0,0004%, CuSO₄ 5H₂O 0,0001%). Em cada frasco foram inoculados 7 discos obtidos da etapa de padronização e estes foram mantidos por 15 dias na temperatura de 35°C e pH 5,8 para a produção enzimática. Durante o período de produção a determinação da atividade enzimática foi realizada através do método DNS, que avalia a velocidade de formação de oligossacarídeos insaturados a partir da absorbância a 540 nm (MILLER, 1959). A atividade enzimática foi expressa em ABS/min.

Após esse período foi realizado a filtração a vácuo do meio de produção, onde o filtrado contendo a enzima foi congelado.

4.2.8 PRODUÇÃO DAS HEMICELULASES

As hemicelulases foram produzidas no Laboratório de Biotecnologia de Fungos do Instituto de Ciência Biológicas, da Universidade Federal de Goiás. Foi adotado o protocolo utilizado por Faria (2011). A linhagem do fungo termofílico *Humicola grisea* var *thermoidea* utilizada no presente trabalho foi isolada de compostagem na Universidade Federal de Viçosa (MG) por Chaves (1982). A escolha do fungo se deu devido ao mesmo produzir um eficiente complexo de enzimas celulolíticas (endoglicanases, celobiohidrolases e β -glicosidases) e xilanolíticas (endoxilanases e β -xilosidase) com alta termoestabilidade quando cultivado em diferentes substratos lignocelulósicos (FARIA, 2011).

Para a produção de esporos, o fungo *H. grisea* foi semeado em meio Ágar Aveia (farinha de aveia 4,0 % (p/v) e ágar 1,5 % (p/v) e incubado por 4 dias, a 42 °C. Os esporos foram ressuspensos em solução salina 0,15 mol. L⁻¹ e contados em câmara de Neubauer.

No preparo do substrato, o farelo de trigo (FT) foi lavado por 5 min em água corrente e após a lavagem, foi submerso na água por 24 h. Após a submersão o farelo foi mantido a 50 °C por 3 h e posteriormente a 30 °C por 2 dias, para sua secagem. Após a secagem o substrato foi moído em moinho de facas e peneirado em peneira de 20 *mesh*. (Araujo 2017).

Aproximadamente, $3,5 \times 10^5$ de esporos /mL foram inoculados em Meio Mínimo (MM) (NaNO₃ a 0,6 % (p/v); KCl a 0,05 % (p/v); KH₂PO₄ a 0,15 % (p/v); ZnSO₄ a 0,001 % (p/v) e FeSO₄ a 0,001 % p/v, pH 6,8 (PONTECORVO *et al.*, 1953)) acrescido de FT a 3%, em *Enlenmeyer* de 500 mL, a cultura foi mantida a 42 °C, sob agitação de 120 rpm. Para a produção da enzima ABFase a cultura foi mantida por 24 h e para produção de xilanase a cultura foi mantida por 144 h. A cultura foi submetida a centrifugação por 20 min, a 4500 rpm e o sobrenadante de cultura coletado foi analisado quanto à atividade xilanolítica pela metodologia de quantificação de açúcares redutores liberados pelo método DNS (MILLER, 1959). Nesse intuito adicionou-se a 10 μ L do sobrenadante enzimático a quantidade de 150

μL de DNS. As amostras foram aquecidas por 5 min a uma temperatura de 100 °C, após o resfriamento das amostras em banho de gelo foi realizada a leitura espectrofotométrica a 540 nm.

A atividade da ABF foi determinada utilizando como substrato ρ -nitrofenil-L-arabinopiranosídeo (pNPA, Sigma N3641) e o ρ -nitrofenil-D-xilopiranosídeo (pNPX, Sigma N2132), respectivamente, na concentração de 5 mmol/L. Os ensaios foram realizados em tampão citrato de sódio 50 mmol/L, em pH 4,8. A mistura de reação, contendo 10 μL de sobrenadante de cultura, 100 μL de tampão e 40 μL de uma solução 5 mmol/L de pNPA ou pNPX, foi incubada por 5 min a 40 °C, a reação foi encerrada pelo resfriamento em banho de gelo e pela adição de 100 μL de uma solução de Na_2CO_3 0,5 mol/L⁻¹, interrompendo a reação por deslocar o pH para o meio básico, onde as enzimas não apresentam mais atividade e por ser o pH onde o ρ -nitrofenol exibe coloração amarela.

Uma unidade (U) de atividade foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol de 4-nitrophenol/min, medida pela absorbância a 405 nm. A quantidade de ρ -nitrofenol (pNP) liberada foi determinada por leitura realizada por leitor automático de microplacas.

Após a determinação da atividade enzimática, as enzimas produzidas foram armazenadas para utilização nos ensaios de hidrólise (ARAUJO; 2018).

4.2.9 REAÇÕES DE HIDRÓLISE DA CANA ENERGIA (VARIEDADE #26)

A cana energia utilizada no trabalho foi triturada em liquidificador doméstico. Para as reações de hidrólise foram utilizados 0,5 g de cana energia triturada, em um volume reacional final de 5 mL, em uma proporção de 10 % de substrato de cana energia. A reação foi realizada em tampão citrato de sódio (pH 4,8) a 50 mmol. L⁻¹ em tubos *falcon* de 50 mL. Os tratamentos enzimáticos foram realizados com as enzimas: hemicelulases (xilanase e ABFases) do *H. grisea*, pectinases do *Penicillium* sp. C2 e lacases do *P. sanguineus* CCT 4518 nas seguintes concentrações: lacase (2700 U/mL⁻¹), xilanases (375 U/mL⁻¹), ABFases (375 U/mL⁻¹) e pectinase (567 U/mL⁻¹). As reações de hidrólise foram mantidas sob agitação constante de

120 rpm, a 36 °C, por 48 h. Após 48 h, as reações de hidrólise foram submetidas a centrifugação a 4400 rpm, por 15 min. O sobrenadante foi analisado quanto ao teor de Açúcares Redutores Totais (ART) por DNS, glicose (kit Glicose Oxidase – Doles[®]) e xilose por HPLC.

Os tratamentos enzimáticos foram realizados de três formas: 1. As enzimas foram adicionadas isoladamente e a reação mantida por 48 h, 2. As enzimas foram adicionadas em tratamentos enzimáticos sequenciais onde a primeira enzima foi adicionada no início da reação e a segunda enzima foi adicionada após 24 h de incubação, e 3. As enzimas foram adicionadas em reações simultâneas (Tabela 04).

Tabela 04: Tratamento Enzimático

Tratamento Enzimático			
Único	Sequencial		Simultâneo
	Enzima 1	Enzima 2	
Lacase	Lacase	Pectinase	Lacase + Hemicelulases + Pectinase
Hemicelulases	Lacase	Hemicelulases	Lacase + Pectinase
Pectinase	Pectinase	Hemicelulases	Pectinase + Hemicelulases
	Pectinase	Lacase	
	Hemicelulases	Lacase	
	Hemicelulases	Pectinase	

Os tratamentos enzimáticos seguiram o seguinte programa:

1. Controle: Tampão citrato de sódio
2. Lacase
3. Hemicelulases (Xilanase + ABFaes)
4. Pectinase

Tratamentos enzimáticos sequenciais Utilização de enzimas combinadas com intervalo de 24h entre a utilização da segunda enzima.

- Lacases + Pectinase
- Lacases + Hemicelulases
- Pectinases + Hemicelulases
- Pectinases + lacases
- Hemicelulases + Lacases
- Hemicelulases + Pectinases

Utilização de enzimas combinadas sem o intervalo de 24h

- Lacases + Hemicelulases + Pectinases
- Lacases + Pectinases
- Pectinases + Hemicelulases

4.3 DOSAGEM DE GLICOSE, XILOSE E ART

A dosagem do teor de açúcares redutores totais (ART), foi realizado pelo método DNS, incubando-se 50 µL da amostra, 450 µL de tampão citrato de sódio (pH 4,8, a 50 mmol. L-1) e 750 µL de DNS a 100 °C por 5 min e realizada a leitura espectrofotométrica a 540 nm. Para a determinação do teor de ART, primeiro foi produzida uma curva padrão de xilose nas concentrações de 0,3 a 4,2 mg/mL (ARAUJO 2017).

A concentração de glicose nas amostras foi utilizado o kit de glicose oxidase (DOLES Reagentes ®) seguindo as orientações do fabricante. Para o cálculo da quantidade glicose no sobrenadante da hidrólise enzimática da cana energia, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{Quantidade de glicose (mg.dL}^{-1}\text{)} = (\text{Abs. da amostra média padrão}) \times 100 \text{ (Eq. 03)}$$

Os resultados foram expressos em unidades enzimáticas, definidas como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol de açúcar redutor por minuto sobre as condições do experimento (ARAÚJO 2017).

A dosagem de xilose foi realizada no Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) do Setor de Engenharia de Alimentos – EA/UFG com HPLC na coluna Shimpack SCR-102 (H) com fase móvel.

As dosagens foram realizadas em triplicata e as análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste de Turkey. O Teste proposto por Tukey é também conhecido como teste de Tukey da diferença honestamente significativa (*honestly significant difference*) e teste de Tukey da diferença totalmente significativa (*wholly significant difference*). O teste de Tukey é, portanto, um teste *a posteriori* ou *post-hoc*. Faz comparações não planejadas (*unplanned comparisons*), ou seja, o pesquisador não precisa estabelecer as comparações de médias que irá fazer sem ter visto os dados.

$$\Delta(\alpha) = q \cdot a \sqrt{QMRe \frac{s}{r}} \text{ (Eq.04)}$$

4.3.1 TESTE DE HPLC (“High Performance Liquid Chromatography”),

Essas amostras foram diluídas 10 vezes com ácido sulfúrico 5 milimol/L, tratadas com Sep-Pack C18 e injetadas em colunas HPX-87H 300 mm x 7,8 mm (Bio-Rad). A fase móvel usada foi ácido sulfúrico 5 milimol/L a uma taxa de fluxo de 0,5 mL/min a 50 °C.

A cromatografia líquida empregada foi acoplada a um detector de RID. As amostras foram filtradas em filtros Millex – HV com membrana de PVDF 0,45 μm e injetadas, sem diluição, em colunas HPX-87H 300 mm x 7,8 mm (Bio Rad). A fase móvel usada foi o ácido sulfúrico 5 milimol/L com uma taxa de fluxo de 0,6 mL/min

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PRODUÇÃO DE ENZIMAS

As enzimas lacase, xilanase, ABFase e pectinase foram produzidas de acordo com as metodologias propostas. Para avaliar se o processo ocorreu da forma que se esperava, foi realizada a determinação de suas atividades enzimáticas. Os resultados de atividade enzimática foram expressos em U. mL⁻¹. Uma unidade U foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 μmol. L⁻¹ de substrato por minuto. Os valores obtidos encontram-se na tabela 5.

Tabela 5: Valores de atividade enzimáticas obtidos

Enzimas	Atividade enzimática U.mL⁻¹
Lacases	2700
Hemicelulases	375
Pectinases	567

Fonte: Autor

O valor de atividade enzimática para as hemicelulases demonstram que a produção superou as expectativas, a produção de hemicelulases nos estudos realizados pelos autores mencionados e neste trabalho apresentam diferenças que podem ser justificadas por alguns fatores, tais como o tipo de substrato utilizado (DEKKER *et al* 2007). Os valores enzimáticos estão de acordo com resultados anteriores na produção destas enzimas.

5.2 HIDROLISE ENZIMÁTICA DA CANA ENERGIA SUBSTRATO #26

Nas reações de hidrólise foram utilizadas enzimas que modificam os polímeros de hemicelulose, pectina e lignina o que aumentaria o conteúdo de carboidratos solúveis a partir da hemicelulose e aumentaria o acesso a celulose. Esses resultados representam a quantidade de açúcares liberados após a reação enzimática, o que indica qual tratamento foi mais

eficiente do ponto de vista teórico em promover maior quebra dos componentes da parede celular. A Tabela 6 apresenta os valores de açúcar solubilizado após a hidrólise da cana energia variedade #26.

Tabela 6: Valores de açúcar solubilizado após a realização das hidrolises

ENZIMAS	ART (mg/g substrato)	Glicose (mg/g substrato)	Xilose (mg/g substrato)
Tratamento enzimático			
1. Lacase	380	6,30	76,9
2. Hemicelulases	30	0,15	13,3
3. Pectinases	27	0,20	62,7
Tratamento enzimático Sequencial			
4. Lacase + pectinase	760	5,6	80,2
5. Lacase + Hemicelulase	890	9,5	100,6
6. Pectinase + Hemicelulase	280	4,8	64,8
7. Pectinase + Lacase	340	5,1	55,7
Tratamento enzimático Simultâneo			
8. Hemicelulase + Lacase	430	5,4	75,0
9. Hemicelulase + Pectinase	250	3,7	71,1
10. Lacase + Hemicelulase +Pectinase	420	6,9	64,4
Controle	0,00	0,00	57,8

Fonte: Autor

O tratamento com maior quantidade de açúcares liberados foi com o tratamento de lacase por 24 h seguido de Hemicelulase por 24 h, nos tratamentos com a utilização de enzimas isoladas foi o com maior rendimento de açúcares foi com a Lacase.

O resultado do tratamento LAC+HEM faz sentido, pois de acordo com a estrutura da fibra vegetal, o que envolve as cadeias de celulose e hemicelulose é a lignina (Figura 09)

(ROSSETO, 2012; SANTOS *et al.* 2012). Assim, desestruturando-se a lignina, a ação das hemicelulases foi otimizada conforme a figura 09.

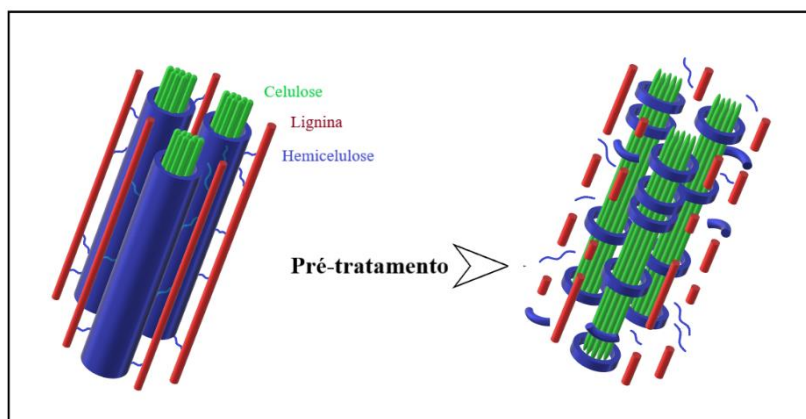


Figura 09: Ação enzimática sobre a fibra vegetal. Fonte: O Autor

Os resultados também apontam que a ação da pectinase na modificação dos polímeros do bagaço de cana energia contribuiu pouco para a solubilização de açúcares, esse resultado faz sentido, pois a cana energia trata-se de uma espécie que possui níveis muito baixos de pectina em sua composição (RAMOS 2017).

O teor de açúcares redutores é um indicador que representa a quantidade total de açúcares da cana, no caso da cana os principais açúcares são glicose proveniente da hidrólise da celulose, xilose e arabinose provenientes da hidrólise da arabinosilana. A concentração de açúcares na cana varia, em geral, dentro da faixa de 13 a 17,5%. Entretanto, é importante lembrar que canas muito ricas e com baixa percentagem de fibras estão mais sujeitas a danos físicos e ataque de pragas e microrganismos. Os estudos mostram que nas primeiras 14 horas de deterioração da cana, 93% das perdas de sacarose foram devidas à ação de microrganismos, 5,7% por reações enzimáticas e 1,3% por reações químicas, resultantes da acidez (MCWILLIAMS 2016).

Ao avaliar as figuras 10 e 11, verificamos o teor de açúcares liberados referentes aos valores de AR e Glicose nas hidrólises, demonstrando valores em relação as triplicatas

realizadas para este trabalho, permitindo verificar posteriormente, à análise estatística das amostras são significativamente diferentes em relação aos teores de AR e glicose liberados, apontando para uma cana com alto teor de fibras e baixo teor de açúcares reduzidos.

Já o teste de glicose oxidase obteve resultados que corroboram as análises de AR, indicando que ocorreu a hidrólise das fibras de celulose, o que originou uma quantidade de glicose livre considerada pequena, mas dentro dos resultados esperados (Tabela 6) (BIELY 2003).

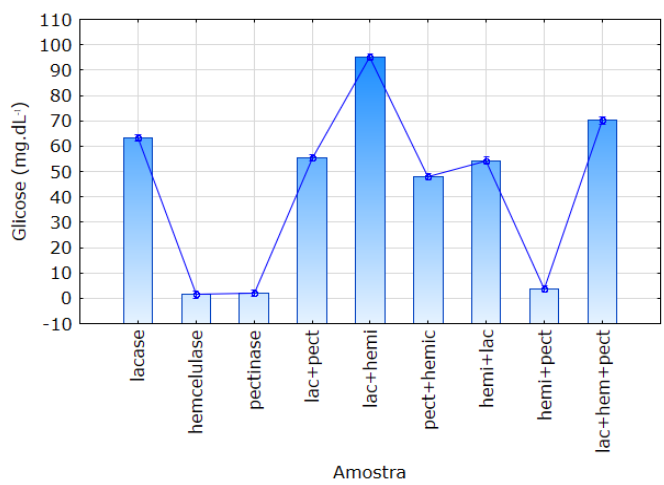


Figura 10: Teor de glicose Liberado nas hidrolises Fonte: Autor

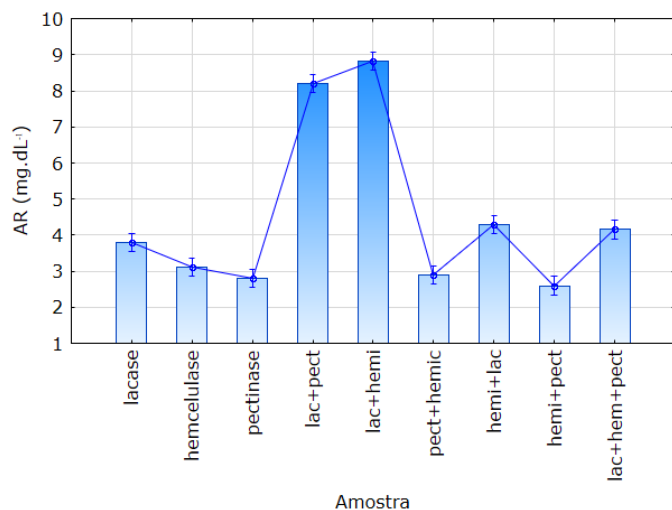


Figura 11: Teor de AR Liberado nas hidrolises Fonte: Autor

Com relação as tabelas 07 e 08, foram realizados ensaios estáticos com o intuito de verificar a “diferença honestamente significativa”, também conhecido como teste de Tukey.

O Teste proposto por Tukey, é também conhecido como teste de Tukey da diferença honestamente significativa (*honestly significant difference*) e teste de Tukey da diferença totalmente significativa (*wholly significant difference*). O teste de Tukey é, portanto, um teste *a posteriori* ou *post-hoc*. Faz comparações não planejadas (*unplanned comparisons*), ou seja, o pesquisador não precisa estabelecer as comparações de médias que irá fazer sem ter visto os dados. Aplicando a equação 03 em referência aos dados contidos tabela 07 e 08.

$$\Delta(\alpha) = q. a \sqrt{QMRe \frac{s}{r}} \quad (\text{Eq.04})$$

Observamos de acordo com o teste de Tukey, ao nível de 5%, que o tratamento 5 na tabela 07, apresenta uma média maior em relação ao teor de ART no hidrolisado, da mesma forma que o tratamento 5 na tabela 08 em relação ao teor de glicose. De acordo com o teste, duas médias são estatisticamente diferentes ao nível de significância *a* toda vez que o valor absoluto da diferença entre elas for igual ou maior do que a diferença honestamente significativa, ou seja, igual ou maior do que o valor *HSD*.

Tabela 07: Análise estatística do ART no hidrolisado dos diferentes pré-tratamentos.

Teste de Tukey HSD: variação de AR (mg.dL⁻¹)(planilha 1) grupos homogêneos, alfa=0,5000

Erro: entre MS= 0,04275, df= 18,000

	Amostra	AR	1	2	3	4
8	Hemi+pect	2,600000	****			
3	Pectinase	2,803333	****			
6	Pect+hemi	2,900000	****			
2	Hemcelulase	3,106667	****			
1	Lacase	3,796667		****		
9	Lac+hem+pect	4,153333		****		
7	Hemi+lac	4,300000		****		
4	Lac+pect	8,200000			****	
5	Lac+hemi	8,833333				****

Fonte: Autor

Tabela 08: Análise estatística da glicose no hidrolisado dos diferentes pré-tratamentos

Teste de Tukey HSD: variação de Glicose (mg.dL⁻¹)(planilha 1) grupos homogêneos, alfa=0,5000

Erro: entre MS = 1,2053, df= 18,000

	Amostra	Glicose M	1	2	3	4	5	6
2	Hemcelulase	1,50000	****					
3	Pectinase	2,00000	****					
8	Hemi + pect	3,73333	****					
6	Pect + hemi	48,00000			****			
7	Hemi + lac	54,33333		****				
4	Lac + pect	55,43333		****				
1	Lacase	63,26667				****		
9	Lac+ hem+pect	70,16667					****	
5	Lac+hemi	95,16667						****

Fonte: Autor

O sinergismo é a interação positiva de duas ou mais enzimas em uma reação enzimática. Isso pode ser traduzido em um número, conhecido como grau de sinergismo. Abaixo é representada a equação para o seu cálculo:

$$S = \frac{[glicose]_{mistura}}{\sum_{i=1}^m [glicose]_m} \quad \text{Eq.04}$$

Sendo S o sinergismo, $[glicose]_{mistura}$ a concentração de glicose liberada na mistura e $\sum_{i=1}^m [glicose]_m$ o somatório da concentração de glicose liberada pela ação das enzimas individualmente. Neste experimento, a quantidade proteica a ser adicionada na mistura é a soma das quantidades que são adicionadas em cada ensaio individual.

Observando a Tabela 09, verifica-se que o tratamento contendo pectinase e Hemicelulase apresenta o maior grau de interação positiva entre as enzimas, sendo seguido pela combinação de Lacase e Hemicelulase. O sinergismo entre a Lacase e a Hemicelulase quando atuam sobre a fibra vegetal, pode ser atribuído à ação simultânea e complementar dessas duas enzimas. Desta forma, ao clivar a cadeia em regiões aleatórias, libera novos terminais celulolíticos. Estas, por sua vez, clivam a fibra de celulose de maneira sucessiva, devido à sua forte ligação à fibra e seu modo de ação, removendo a camada da parede vegetal mais externa e expondo a inferior para ação das enzimas (VÄLJAMÄE et al., 1998).

Baseando-se nos demais dados apresentados verifica-se, que o grau de sinergismo isoladamente não se relaciona intrinsecamente com o processo de acesso as fibras da estrutura vegetal, porém quando o sinergismo é avaliado em um conjunto de fatores, a interação positiva entre a Lacase e Hemicelulase potencializam a remoção da camada mais externa da parede vegetal (DELABONA et al. 2013)

Tabela 09- Grau de sinergismo entre as enzimas empregadas no tratamento enzimático sequencial.

Tratamento Enzimático Sequencial					
1ª. Reação	2ª. Reação	Xilose (mg/g da cana)	Sinergismo	Glicose (mg/g da cana)	Sinergismo
Lacase	-	76,9		6,3	
Hemicelulase	-	13,3		0,15	
Pectinase	-	62,7		0,2	
Lacase	Pectinase	80,2	0,57	5,6	0,86
Lacase	Hemicelulase	100,6	1,11 *	9,5	1,47 **
Pectinase	Hemicelulase	64,8	0,85	4,8	13,7 **
Pectinase	Lactase	55,7	0,40	5,1	0,78

Fonte: Autor

Os sobrenadantes provenientes das hidrólises foram analisados por cromatografia líquida HPLC (“High Performance Liquid Chromatography”), inicialmente para determinação das concentrações de xilose, porém foi possível identificar ácido acético, glicerol e etanol.

Tabela 10- Resultados de HPLC

Reações de Hidrólise	Xilitol g/L	Glicerol g/L	Etanol g/L	Ác. Acético mg/L
1. Lacase	1,06	0,00	0,00	239,71
2. Hemicelulases	1,23	0,93	1,21	147,91
3. Pectinases	1,18	0,94	1,26	471,72
4. Lacase + pectinase	1,48	0,95	0,92	339,37
5. Lacase + Hemicelulase	1,04	0,92	0,93	381,17
6. Pectinase + Hemicelulase	1,36	0,00	0,94	158,20
7. Pectinase + Lacase	0,88	0,93	0,94	0,00
8. Hemicelulase + Lacase	0,91	0,95	0,00	154,76
9. Hemicelulase + Pectinase	1,46	0,96	0,93	123,45
10.Lacase + Hemicelulase +Pectinase	1,02	0,00	1,05	212,89
Controle	1,13	0,00	0,00	0,00

Fonte: Autor

Analisando a tabela 10, o etanol presente nos sobrenadantes poderia ser explicado, pela presença de etanol celulósico, também chamado etanol de lignocelulose, é a denominação dada ao etanol obtido a partir da fermentação da glicose e xilose que podem ser produzidos por leveduras da cana energia (BANERJEE et al., 2010).

O etanol obtido a partir da biomassa lignocelulósica é referido como uma segunda geração de biocombustíveis, cujo processamento conta com uma das mais promissoras tecnologias em desenvolvimento (COSGROVE, 2000).

A presença de ácido acético no hidrolisado pode ser explicado, por reações de oxidações do etanol e açúcares presentes nos sobrenadantes. A produção de ácido acético a partir de derivados de biomassa refere-se à geração de ácido acético a partir do etanol, através de processos não fermentativos. Estes processos tradicionalmente compreendem duas etapas: na primeira gera-se acetaldeído via reação de desidrogenação ou oxidação do etanol; na segunda o aldeído obtido é oxidado a ácido acético (HU et al., 2011).

Com o intuito de comprovar que a presença do etanol e do ácido acético, nos sobrenadante das hidrolises não eram resultados de processos fermentativos derivados das ações enzimáticas, ou da presença de leveduras naturais ou contaminantes ao meio, realizou-se uma análise por HPLC, utilizando-se dessa vez a água de lavagem do próprio substrato.

Foram lavados 5g de substrato” *in natura* “, utilizando-se 20ml de água destilada. Foram realizadas quatro lavagens, sendo que cada lavagem se utilizou 5ml da água que foram recolhidas e analisadas seguindo o protocolo de HPLC descrito no texto.

A tabela 11 contém os resultados obtidos das análises realizadas com as águas de lavagem.

Tabela 11 Resultado de HPLC das águas de lavagem da cana energia

Resultados de HPLC Etanol (g/L) e Ácido Acético (mg/L)		
Amostras	Etanol	Ácido acético
1ª agua de analise	1,573	279,991
2º agua de analise	1,67	281,456
3º agua de analise	1,54	274,554

Fonte: Autor

Analisando os resultados contidos na tabela 11, pode-se concluir que os processos oxidativos descritos fazem sentido, pois comprova-se a presença das substâncias citadas, antes da realização das hidrolises.

Nas reações de hidrólise descritas na Tabela 06 podemos observar que a glicose também foi liberada nas reações de hidrólise. Para analisar se as enzimas com atividade de celulases estavam ativas nas reações foi dosada a atividade de celulase (CMCase) nos hidrolisados (Tabela 12).

Tabela 12. Resultados do teste de CMCase nos hidrolisados

Atividade Enzimática teste (CMC)	($\mu\text{mol}/\text{min}$)
Lacases	0,583
Hemicelulases	0,542
Pectnases	0,503
Lacases + Pectnases	0,585
Lacases + Hemicelulase	0,698
Pectnase + Hemicelulase	0,545
Pectnase + Lacase	0,404
Hemicelulase + Lacase	0,588
Hemicelulase + Pectnase	0,499
Lacase Hemicelulase+ Pectnase	0,578

No entanto, convém destacar que em relação aos demais tratamentos, o uso de lacase (e após 24 h as hemicelulases) resultou em uma quantidade maior de glicose livre no sobrenadante, indicando que a acessibilidade entre as partes que compõe a parede celular.

Com relação as concentrações enzimáticas, foram realizados os mesmos ensaios citados acima porem com variações nas concentrações das enzimas, as concentrações foram aumentadas para cada ensaio obedecendo o seguinte critério:

Na primeira rodada de hidrolises as concentrações foram aumentadas em 50% do valor citado na metodologia, para a segunda rodada as concentrações foram aumentadas em 70% do valor inicial e por fim na terceira rodada de experimentos as concentrações foram dobradas em relação as iniciais.

Após realizado o mesmo protocolo citado acima para as hidrolises e cálculos de açúcares redutores totais, os valores obtidos não sofreram alterações significativas, em termos de rendimentos valores contidos na tabela (5),sofreram variações do ordem de 0,2% em média, o que demonstra que a concentração enzimática não altera na ação das enzimas sobre as fibras, talvez utilizando as teorias que envolvam a cinética química, o tempo de hidrolise poderia ser diminuído com o aumento da concentração, mas essa verificação não foi testada nesse trabalho.

A dificuldade de se fazer bioconversão de materiais lignocelulósicos sem a utilização de reagentes químicos e técnicas mais agressivas como, acidificação do meio, pode ser explicada pela própria morfologia da parede Celular. Sabendo que a lignina e a hemicelulose atuam como uma camada protetora natural a própria degradação enzimática (GOURLAY et al., 2013)

Nos processos de hidrolises enzimáticas as enzimas atuam em relação as fibras, reduzindo a formação de subprodutos indesejáveis no processo reacional, essa especificidade das enzimas evita justamente a degradação da glicose no meio reacional. O que explica a dificuldade de se promover um ensaio menos agressivo, com a utilização de enzimas para promover o afrouxamento das fibras e componentes da parede celular, já que as enzimas atuam de forma específica.

5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES

O presente estudo ainda não pode concluir efetivamente que a utilização de enzimas pode favorecer a hidrólise da cana energia. Porém os dados obtidos, apontam que a hidrólise realizada com a lacase e após 24h a adição de hemicelulases tiveram os melhores valores sobre a liberação dos ART e a glicose. A interpretação dos resultados obtidos indica que a lignina e a hemicelulose sofreram uma desestruturação, fato esse que pode proporcionar um ganho no processo de obtenção de biogás, pois facilitaria a ação dos microrganismos envolvidos no processo.

Com relação as concentrações enzimáticas os dados obtidos não demonstraram nenhuma grande interferência ao processo de hidrólise, com uma alteração pouco significativa nos valores de AR e glicose, alterações em média na casa de 0,2% de aumento.

Sobre a presença das pectinases nas hidrólises baseando-se nos valores obtidos, não houve nenhuma interferência relevante no processo de desestruturações lignocelulosicas. Porém houve uma sinergia com um valor interessante entre a pectinase e a lacase, outra observação interessante observando os dados obtidos, é que aparentemente a pectinase libera algum bloqueador enzimático desfavorecendo a ação de outras enzimas no processo, fato esse que poderá ser estudado em trabalhos futuros.

Com relação a análise dos resultados de HPLC, além da identificação dos açúcares presentes foram encontradas frações de etanol e ácido acético. A presença do etanol e do ácido acético podem ser explicados pela oxidação de parte dos açúcares presentes na própria fibra da cana energia utilizada nas hidrólises, admitindo que a cana cedida para o trabalho esteve armazenada por um longo período de tempo, período esse em que não se pode garantir que a temperatura e o isolamento foram totalmente controlados. Demonstrando que o tratamento enzimático não interfere no processo oxidativo de formação de etanol e ácido acético.

6 REFERÊNCIAS

AGUIAR FILHO, J. M. M. Análise enzimática de fungos lignocelulolíticos cultivados em vinhaça e bagaço de cana-de-açúcar. 2008. 79 f. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2008.

ALEXANDRINO, A. M., FARIA, H. G., SOUZA, G. M. Aproveitamento do resíduo de laranja para a produção de enzimas lignocelulolíticas por *Pleurotus ostreatus* (Jack: Fr). *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 27(2): 364-368, abr.-jun. 2007.

ALVES, A. L. Produção, purificação e caracterização de uma lacase de *Phlebia rufa* (Pers.) MP Christ. 2011. 111 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real 2011.

AYOL, A.; DENTEL, S. K.; FILIBELI, A. Dual Polymer Conditioning of Water Treatment Residuals. *Journal of Environmental Engineering*. v. 131, 8 ed. p. 1132 – 1138, 2005.

AMPTS II - Automatic Methane Potential Test Syste: Operation And Maintenance Manual. Bioprocess Control Sweden Ab. Sweden. Version 1.7, January 2014.

ANDRADE, H. O., PINHEIRO, G. D., PEREIRA, A.I.S., FERREIRA, J. C. S., BORGES, M. V. F. Aspectos teóricos na produção de biogás e biofertilizante pelo mecanismo de biodigestão e geração de energia elétrica limpa através de um gerador específico. In: VII CONNEPI- Congresso Norte Nordeste de Pesquisa e Inovação. Palmas, Tocantins, Brasil, 2012.

ANEEL - Agência Nacional de Energia Elétrica. Projeto de P&D Estratégico nº 014/2012: Arranjos Técnicos e Comerciais para Inserção da Geração de Energia Elétrica a partir do Biogás oriundo de Resíduos e Efluentes Líquidos na Matriz Energética Brasileira. Brasília, julho de 2012. Disponível em: < http://www2.aneel.gov.br/arquivos/PDF/PeD-2012-Chamada%20PE%2014_23-07-12.pdf> Acesso em: 22 fev. 2017.

ANEEL. Matriz de energia elétrica. Disponível em: <
<http://www2.aneel.gov.br/aplicacoes/capacidadebrasil/OperacaoCapacidadeBrasil.cfm>>.

Acesso em 02 Nov. 2017.

APHA - AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Standard methods for the examination of water and wastewater. New York: APHA, WWA, WPCR, 20 ed. 2012.

ARANTES, V.; MILAGRES, A. M. F. Relevância de compostos de baixa massa molar produzidos por fungos e envolvidos na biodegradação da madeira. Quím. Nova, São Paulo, v. 32, n. 6, p. 1586-1595, 2009. Disponível em:

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422009000600043&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 02 Nov. 2017.

BADSHAH, M., LAM, D.M., LIU, J. AND MATTIASSON, B. Use of an Automatic Methane Potential Test System for evaluating the biomethane potential of sugarcane bagasse after different treatments. Bioresource Technology. 114, 262-269. 2012.

BANERJEE, G.; SCOTT-CRAIG, J. S.; WALTON, J. D. Improving Enzymes for Biomass Conversion: A Basic Research Perspective. BioEnergy Research, v. 3, n. 1, p. 82–92, 2010.

BAPTISTA, N. M. de Q., SANTOS, A. C., ARRUDA, F. V. F., GUSMÃO, N. B. Produção das enzimas lignina peroxidase e lacase por fungos filamentosos. Scientia Plena, v. 8, n. 1, 2012.

BARRETO, A. R.; MENEZES, C. R. Biodegradação de resíduos lignocelulósicos por fungos basidiomicetos: Caracterização dos resíduos e estudo do complexo enzimático fúngico. Electronic Journal of Management, Education and Environmental Technology (RE-GET), v. 19, n. 2, p. 1365-1391, 2015.

BARRETO, F., MOURA, I., SAMPAIO, M., LIBERAL, V., NASCIMENTO, W., LOPES, J. M. Uma visão sobre a região centro oeste na perspectiva do bionegócio. Revista Diálogos & Ciências, v. 1, n. 36, 2016.

- BIELY, P. Xylanolytic enzymes. In: WHITAKER, J.R., VORAGEN, A.G.J., WONG, D.W.S. (Eds.) Handbook of Food Enzymology, Marcel Dekker, Inc. New York, p.879-916, 2003.
- BISTRATINI, E. A. S. Enzimas degradadoras de parede celular de plantas produzidas por *Rhizoctonia solani* AG-1 IA: estudo da produção extracelular, purificação e caracterização. 2016. 213 f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2016.
- BOCHMANN, G. & MONTGOMERY, L. F. R. Storage and pre-treatment of substrates for biogas production. Woodhead Publishing Limited: Cambridge, UK, 2013.
- BORSCHIVER, S.; DA SILVA, A. L. R. Mapeamento tecnológico para purificação de biogás e seu aproveitamento: panorama mundial e iniciativas nacionais. In: Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química. Florianópolis, Santa Catarina. 2014.
- BORTOLAZZO, N. G. Isolamento e seleção de fungos celulolíticos para hidrólise enzimática do bagaço de cana de açúcar. 2011. 76 f. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, 2011.
- BRADFORD M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochemistry*. 72, 248–254, 1976.
- BRASIL, Lei n.º 12.305/2010. Institui a Política Nacional de Resíduos Sólidos; altera a Lei n.º 9.605, de 12 de fevereiro de 1998; e dá outras providências. Brasília, 2010.
- BRASIL. Secretaria Nacional de Saneamento Ambiental. Probiogás. Guia técnico de aproveitamento energético de biogás em estações de tratamento de esgoto / Probiogás; organizadores, Ministério das Cidades, Deutsche Gesellschaft für Internationale Zusammenarbeit GmbH (GIZ), Brasília, DF: Ministério das Cidades, 183 f., 2015.

BRASIL. Ministério de Minas e Energias – MME. Portaria nº 538, de 15 de dezembro de 2015. Diário Oficial da União. Brasília. 2015. Cria o programa de geração distribuída de energia elétrica – ProGD.

BRASIL. Ministério de Minas e Energia – MME. Decreto nº 5.025, de 30 de março de 2004. Regulamenta o inciso I e os §§ 1o, 2o, 3o, 4o e 5o do art. 3o da Lei no 10.438, de 26 de abril de 2002. Diário Oficial da União, Brasília. 2004. Dispõem sobre o Programa de Incentivo às Fontes Alternativas de Energia Elétrica - PROINFA, primeira etapa, e dá outras providências.

BRITO, F. L. S. Biodigestão anaeróbia em duplo estágio do bagaço de cana-de-açúcar para obtenção de biogás. 2011. 184 f. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

BRONDANI, J. C. Biodigestores e biogás: balanço energético, possibilidades de utilização e mitigação do efeito estufa. 2010. 118f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

BUONAFINA, M.M.O. Feruloylation in grasses: current and future perspectives. *Molecular Plant*. 2: 861-872, 2009.

BUFFIERE, P., LOISEL, D., BERNET, N. AND DELGENES, J.P. 2006. Towards new indicators for the prediction of solid waste anaerobic digestion properties. *Water Science and Technology*. 53(8), 233-241.

BRUICE, Paula Y. Fundamentos de química orgânica. 2. Ed. São Paulo: Pearson Education do Brasil, 2014. E-book. Disponível em: . Acesso em: 05 nov. 2018.

CANILHA, L., SANTOS, V. T., ROCHA, G. J., ALMEIDA E SILVA, J. B., GIULIETTI, M., SILVA, S. S., FELIPE, M. G., FERRAZ, A., MILAGRES, A. M., CARVALHO, W. A study on the pretreatment of a sugarcane bagasse sample with dilute sulfuric acid. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, New York, v. 38, p. 1467-1475, 2011.

CANTERI, M. H. G., MORENO, L., WOSIACKI, G., SCHEER, A. D. P. Pectina: da matéria-prima ao produto final. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 22, n. 2, 2012.

Caracterização da poligalacturonase produzida por *Penicillium* sp isolado do cerrado. In: ISSN - 2176-0667 Brazilian Journal of Pharmacy - V99 - N2 - Suplemento - 2018, 2018, GOIÂNIA. 3o. Congresso de Ciências Farmacêuticas do Brasil Central. São Paulo: USP-Universidade de São Paulo, 2018. v. 99. p. 2703-2703.

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

CHAVES, V.M.G. Algumas características fisiológicas e propriedades do complexo celulase de um fungo termófilo isolado de compostagem. 1982. 107 f. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1982.

COELHO, A. C. D. Bolsa de Resíduos: Portal de oportunidades em produção mais limpa. Bahia, 2001. 67 f. Trabalho de conclusão de curso (Monografia) - Especialização em Gerenciamento e Tecnologias Ambientais na Indústria, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia. 2001.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). Acompanhamento da Safra Brasileira de cana-de-açúcar. Brasília: v. 3 - Safra 2016/17, n. 4 - Quarto levantamento, p. 1-77, abril 2017. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_04_19_11_27_36_boletim_cana_portugues_-_4o_lev_-_16-17.pdf>. Acesso em: 2 abr. 2017.

CONCEIÇÃO, T. de A. Estudo da produção de enzimas ligninolíticas por fungos Agaricomycetes cultivados em resíduos agroindustriais do estado da Bahia. 2010. 93 f. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2010.

CORTEZ, L. A. B., LORA, E. E. S., GOMEZ, E. O. Biomassa para energia. Campinas, SP: Editora Unicamp, 2008.

COSTA, D. F. Geração de energia elétrica a partir do biogás de tratamento de esgoto. 2006. 194 f. Dissertação (Mestrado em Energia) – Programa Inter-unidades de Pós-Graduação em Energia, Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, 2006.

COSGROVE, D. J. Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature*, v. 407, n. September, p. 321–326, 2000.

CRIVELLARI, A. C. Caracterização estrutural das hemiceluloses de paredes celulares de cana-de-açúcar. 2016. 95 f. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2016.

CYSNEIROS, C. S. S. FERREIRA, R. N., OLIVEIRA, M. A., FAVORETTO, A. O., ARNHOLD, E., ULHOA, C. J. Produção, caracterização e avaliação de enzimas fibrolíticas na digestibilidade da forragem de milho. *Cienc. anim. bras.*, Goiânia, v.14, n.4, p. 426-435, out./dez. 2013.

DELABONA, P. D. S.; COTA, J.; HOFFMAM, Z. B.; et al. Understanding the cellulolytic system of *Trichoderma harzianum* P49P11 and enhancing saccharification of pretreated sugarcane bagasse by supplementation with pectinase and α -L-arabinofuranosidase. *Bioresource Technology*, v. 131, p. 500–7, 2013.

ELLENRIEDER J., SCHIEDER D., MAYER W. AND FAULSTICH M. Combined mechanical enzymatic pre-treatment for an improved substrate conversion when fermenting biogenic resources. *Engineering in Life Sciences*, 10, 6, 544–551. 2010.

FALKOSKI, D.L., GUIMARÃES, V. M., ALMEIDA, M. N., ALFENAS, A. C., COLODETTE, J. L., REZENDE, S. T. Characterization of cellulolytic extract from *Pycnoporus sanguineus* PF-2 and its application in biomass saccharification. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 166: 1586-1603, 2012.

FAVELA-TORRES E. et al. Pectinases. In: *Enzyme technology*. New Delhi: Asiatech publisher; p. 273–296. 2005.

FARIA, R. de A. Estudo da produção de enzimas ligninolíticas por *Ceriporiopsis subvermispora*. 2010. 102 f. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2010.

FARIA, S. Análise de diferentes misturas enzimáticas do fungo *Humicola grisea* var. *thermoidea* na hidrólise da fração de hemicelulose de bagaço de cana de açúcar. 2011. 107 f. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Programa de Pós- Graduação em Biologia, Goiânia, 2011.

FARINAS, C. S. A parede celular vegetal e as enzimas envolvidas na sua degradação. São Carlos: Embrapa Instrumentação, 2011. 13 p.

FERREIRA, A. L. O. Síntese enzimática de ampicilina em reator integrado. 2004. 213 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Carlos São Carlos, 2004.

FERREIRA, V.F., ROCHA, D. R., SILVA, F. D. C. Potencialidades e oportunidades na química da sacarose e outros açúcares. *Química Nova*, v. 32, n. 3, p. 623-638, 2009.

FREITAS, C. F. S. de. Biocombustíveis avançados da cana: oportunidades, limites e características de uma indústria emergente. 2013. 190 f. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Rio de Janeiro, 2013.

FREITAS JR., G. Fundadores da CanaVialis criam cana só para biomassa. *Valor Econômico*, São Paulo, 8 agosto 2011, *Agronegócios*, p. B11.

FRIEHE, J.; WEILAND, P.; SCHATTAUER, A. Guia prático do Biogás – Geração e Utilização. 5. ed. Cap. 2 - Fundamentos da fermentação anaeróbia. p. 20-30. (FNR), 2010.

FRIGON, J.C., MEHTA, P. AND GUIOT, S.R. Impact of mechanical, chemical and enzymatic pre-treatments on the methane yield from the anaerobic digestion of switchgrass. *Biomass and Bioenergy*. 36, 1-11. 2012.

GALHAUP, C., WAGNER, H., HINTERSOISSERB, B., HALTRICH, D. Increased produc-

tion of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens*. *Enzyme and Microbial Technology*, 30, 529–536, 2002.

GARCIA T.A. Purificação e caracterização das lacases de *Pycnoporus sanguineus*. 2006. 90 f. Tese de doutorado em Biologia Molecular. Universidade de Brasília, Brasília, 2006.

GERBELLI, L. G. Agronegócio: região centro-oeste é a que mais cresce no Brasil. *Jornal Rural Pecuária. Jornal Estadão. São Paulo*, 2012. Disponível em:

<<http://economia.estadao.com.br/noticias/geral,puxada-pelo-agronegocio-centro-oeste-e-a-regiao-que-mais-cresce-no-brasil-imp-,925096> > Acesso em: 26 nov. 2017.

GIL, A. C. Como elaborar projetos de pesquisa. São Paulo: Atlas, 2008.

GOLDEMBERG, J.; MOREIRA, J. R. Política energética no Brasil. *Estudos avançados*, v. 19, n. 55, p. 215-228, 2005.

GOLVEIA, J. C. de S. Indução de lacase de *Pycnoporus sanguineus* CCT 4518 induzida por resíduos agroindustriais e ensaio de biorremediação de estrogênio sintético (EE2). 2016. 82 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2016.

GOURLAY, K.; HU, J.; ARANTES, V.; et al. Swollenin aids in the amorphogenesis step during the enzymatic hydrolysis of pretreated biomass. *Bioresource Technology*, v. 142, p. 498–503, 2013. Elsevier Ltd

GOUVEIA, E. R., NASCIMENTO, R. D., SOUTO-MAIOR, A. M., ROCHA, G. D. M. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana de açúcar. *Quím. Nova*, São Paulo, v. 32, n. 6, p. 1500-1503, 2009. Disponível em

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422009000600026&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 20 abril 2017.

GUERI, M. V. D., BURATTO, W. G., RIBEIRO, C. B., SCHIRMER, W. N. Políticas Nacio-

nais de Incentivo ao Uso Energético do Biogás e Biometano. Acta Iguazu, v. 5, n. 5, p. 160-171, 2016.

GUIMARÃES, C. M. M. & GALVÃO, V. Produção e uso do biogás. In: 8º Congresso Internacional de Bioenergia. São Paulo, 2013. Disponível em <https://www.researchgate.net/profile/Viviane_Galvao/publication/264470016_PRODUCAO_E_USO_DO_BIOGAS_8_CONGRESSO_INTERNACIONAL_DE_BIOENERGIA_SAO_PAULO_-_SP_05_A_07_DE_NOVEMBRO_DE_2013/links/53e0c3cc0cf2235f352700e8.pdf> Acesso em: 20 fev. 2017.

JARDIM, M. A. C. Valorização Económica do Biogás: Geração Elétrica vs. Produção de Biometano para Injeção na Rede. 133 f. Dissertação (mestrado) – Instituto Politécnico de Setúbal, Portugal, 2013.

KARLSSON, T., KONRAD, O., LUMI, M., SCHMEIER, N.P., MARDER, M., CASARIL, C. E., KOCH, F.F., PEDROSO, A.G. Manual básico de biogás. Lajeado: Editora Univates, 2014. 69 p.

KIPPER, E. Tratamento enzimático e produção de biogás por resíduos sólidos de curtu-me. 2013. 123 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

KUMAR, S., SINGH, P. K., SINGH, J. Energy Cane: An Option for Sustainable Development of Sugar Industry. In: International day for biological diversity: Biodiversity for sustainable development, maio de 2015. Disponível em: <<http://www.upsbdb.org/pdf/Souvenir2015/ch-27.pdf>> Acesso em 16 fev. 2017.

KUNZ, A.; OLIVEIRA, P. A. V. Aproveitamento de dejetos de animais para geração de biogás. Revista de Política Agrícola, v.15, n.3, p.28-35, 2006.

LACERDA, M. F. A. R. Degradação de hormônio sintético por meio de lacases fúngicas imobilizadas em fibras de *Luffa cylindrica*. 2015. 83 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2015.

LEONOWICZ A; GRZYWNOWICZ K. Quantitative estimation of laccase forms in some white-rot fungi using syringaldazine as a substrate. *Enzyme Microbial Technol*, 3, 55–58, 1981.

LIMA, E. C. T. Cana-energia como potencial fonte energética: Caracterização dos subprodutos (frações sólida, líquida e gasosa) provenientes da pirólise. 2016. 113 f. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Mecânica. 2016.

LUCENA-NETO, A.D.S.; FERRERIA FILHO, E.X. Purification and characterization of a new xylanase from *Humicola grisea* var. *thermoidea*. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 35, p. 86 – 90, 2004.

MCWILLIAMS, Margaret. Alimentos: um guia completo para profissionais. 10. Ed. São Paulo: Manole, 2016. E-book. Disponível em: < <http://univates.bv3.digitalpages.com.br/users/publications/9788520436974/pages/-6>>. Acesso em: 06 nov. 2016.

MANOCHIO, C. Integração energética da produção de biogás em biorrefinarias de cana de açúcar integradas de 1ª e 2ª geração. 73 f. Dissertação (mestrado em Ciência e Engenharia Ambiental) – Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, Minas Gerais, 2015.

MARCONI, M. A.; LAKATOS, E. M. Fundamentos de metodologia científica. São Paulo: Atlas, 2007.

MARQUES, S. M. A., MONTEIRO, M. K. D., SILVA JR., F. J., VENTURA JR. R. Produção de biofertilizante, adubo orgânico e biogás para agricultura familiar. *Revista do Centro do Ciências Naturais e Exatas - UFSM, Santa Maria, Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental – REGET - V. 18 n. 3, 2014.*

MARTINEZ, A., RUIZ-DUEÑAS, F., MARTINEZ, M., DEL RIO, J., & GUTIÉRREZ, A.

Enzymatic Delignification of Plant Cell Wall: From Nature to Mill. *Current Opinion in Biotechnology*, 20:348-357, 2009.

MATSUOKA, S., BRESSIANI, J. A., MACCHERONI, W., FOUTO, I. Bioenergia da cana. *Cana-de-açúcar: bioenergia, açúcar e álcool: tecnologia e perspectivas*. Suprema, Visconde do Rio Branco, p. 487-517, 2010.

MATSUOKA S., KENNEDY A. J., SANTOS, E. G.D., TOMAZELA, A. L., RUBIO, L. C. S. Energy Cane: Its Concept, Development, Characteristics, and Prospects. *Advances in Botany: Hindawi Publishing Corporation Advances in Botany*, vol. 2014, 13 pages, 2014. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/archive/2014/597275/>> Acesso em 16 fev. 2017.

MELO, G. R. de. Produção de celulases e xilanases pelo fungo termofílico *Humicola grisea* var. *thermoidea* em diferentes substratos lignocelulósicos. 2010. 85 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2010.

MENEZES, C. R., SILVA, I. S. e DURRANT, L. R. Bagaço de cana: fonte para produção de enzimas ligninocelulolíticas. *Rev. Estudos Tecnológicos em Engenharia*, vol. 5, no. 1, pp. 68–78, 2009.

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

MONLAU, F., BARAKAT, A., STEYER, J.P. AND CARRÈRE, H. Comparison of seven types of thermo-chemical pretreatments on the structural features and anaerobic digestion of sunflower stalks. *Bioresource Technology*, 120, 241-247. 2012.

NOGUEIRA, AR de A. *Manual de laboratórios: solo, água, nutrição vegetal, nutrição animal e alimentos*. EMBRAPA-CPPSE, 2005.

NOVACANA, 2017. Cana-de-açúcar em Goiás tem cenário positivo na safra 2017/18. Disponível em <<https://www.novacana.com/n/cana/safra/cana-de-acucar-goias-cenario-positivo-safra-2017-18-111017/>> Acesso em: 02 nov. 2017.

OECD – ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT;
FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS.

OECD-FAO agricultural outlook 2014-2023. Rome: OECD; FAO, 2014. Disponível em: <http://www.keepeek.com/Digital-Asset-Management/oecd/agriculture-and-food/oecd-fao-agricultural-outlook-2014_agr_outlook-2014-en#page173> . Acesso em: 20 fev. 2017.

OGATA, B. H. Caracterização das frações celulose, hemicelulose e lignina de diferentes genótipos de cana de açúcar e potencial de uso em biorrefinarias. 2013. 108 f. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2013.

OLIVEIRA, R. D. Geração de energia elétrica a partir do biogás produzido pela fermentação anaeróbia de dejetos em abatedouro e as possibilidades no mercado de carbono. 98

f. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2009.

PACHECO, S.; SOARES, C. H. L. Immobilization and characterization of laccase and its use in the biodegradation of paper mill effluent. Química Nova, v. 37, n. 2, p. 209-214, 2014.

PAIVA, E.P.; LIMA, M. S.; PAIXÃO, J. A. Pectina: propriedades químicas e importância sobre a estrutura da parede celular de frutos durante o processo de maturação. Revista Iberoamericana de Polímero, v. 10, n. 4, p. 196-211, 2009.

PAIVA, L. A cana é 2G. Cana Online, Ribeirão Preto, setembro 2014, n. 14, p. 41-48. Disponível em: <<http://www.canaonline.com.br/edicao/edicao14-portal-canaonlinesetembro2014.html>>. Acesso em: 09 fev. 2017.

PAIVA, L. Cana energia é realidade. Cana Online, Ribeirão Preto, agosto 2015, n. 24, p. 48-67,. Disponível em: < <http://www.canaonline.com.br/conteudo/cana-energia-ja-e-realidade.html> >. Acesso em: 09 fev. 2017.

- PAKARINEN, A., ZHANG, J., BROCK, T., MAIJALA, P. AND VIIKARI, L. Enzymatic accessibility of fiber hemp is enhanced by enzymatic or chemical removal of pectin. *Biore-source Technology*. 107, 275-281. 2012.
- PARAWIRA, W. Enzyme research and applications in biotechnological intensification of biogas production. *Critical reviews in biotechnology*, v. 32, n. 2, p. 172-186, 2012.
- PARENTI, A., MURGUEZA, E., IROZ, A. R., OMARINI, A., CONDE, E., ALFARO, M., CASTANERA, R., SANTOYO, F., RAMIREZ, L., PISABARRO, A. G. Induction of laccase activity in the white rot fungus *Pleurotus ostreatus* using water polluted with wheat straw extracts. *Bioresource Technology*, 133, 142–149, 2013.
- PASSARINHO, A. T. P. Produção e caracterização de xilanases derivadas do gene *xynA* de *Orpinomyces* PC-2 e avaliação da eficiência para hidrólise de farinha e clarificação de suco. 2014. 67 f. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2014.
- PEREIRA, L., RIBEIRO, W. R., PEREIRA, A. A., LIMA, R. E. V. A Construção e o Papel Ambiental de um Biodigestor. *De Magistro de Filosofia, Anapólis, Ano V, nº. 09*, 2012.
- PEREIRA, D. E. P. Análise de celulasas e xilanases por fungo isolado a partir do Bioma Cerrado. 2013. 101 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013.
- PETERSEN M. O., LARSEN J., THOMSEN M. H. Optimization of hydrothermal pretreatment of wheat straw for production of bioethanol at low water consumption without addition of chemicals. *Biomass and Bioenergy*, 33, 5, 834- 840, 2009.
- PITARELO, A. P. Avaliação da susceptibilidade do bagaço e da palha de cana-de-açúcar à bioconversão via prétratamento a vapor e hidrólise enzimática. 2007. 125 p. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.
- PONTECORVO, G., ROPER J.A., HEMMONS L.M., MACDONALD K.D., BUFTON A.W.

The Genetics of *Aspergillus nidulans*. *Advances in Genetics*, 5:141-238, 1953.

RABELO, S.C., CARRERE, H., MACIEL FILHO, R., COSTA, A.C. Production of bioethanol, methane and heat from sugarcane bagasse in a biorefinery concept. *Bioresource Technology*, Philadelphia, v. 102, p. 7887-7895, 2011.

RABONI, M.; URBINI, G. Production and use of biogas in Europe: a survey of current status and perspectives. *Rev. Ambient. Água*, Taubaté, v. 9, n. 2, p. 191-202, June 2014 . Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1980-993X2014000200002&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 20 de fev. 2017.

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

RIZZONI, L. B., TOBIAS, A. C. T., DEL BIANCHI, M., GARCIA, J. A. D. Biodigestão anaeróbia no tratamento de dejetos de suínos. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, v. 9, n. 18, p. 1-20, 2012.

RODRIGUES, J. P. Efeito da adição de óleo e lipase sobre a biodigestão anaeróbia de dejetos suínos. 185 f. Tese de Doutorado. Universidade Federal da Grande Dourados. 2012

RODRIGUES, R. S. Produção, purificação e caracterização de celulases e hemicelulases do fungo da podridão branca *Pycnoporus sanguineus* PF-2. 146 f. Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2014.

ROMANO, R. T., ZHANG, R., TETER, S., MCGARVEY, J. A. The effect of enzyme addition on anaerobic digestion of JoseTall Wheat Grass. *Bioresource Technology*, v. 100, n. 20, p. 4564-4571, 2009.

ROSSETO, R. A bioenergia, a cana energia e outras culturas energéticas. *Pesquisa e Tecnologia*, v. 9, n. 1, p. 1-6, 2012.

SAMBUSITI, C. Physical, chemical and biological pretreatments to enhance biogas production from lignocellulosic substrates. 2013. 224 f. Doctoral dissertation. DICA (Department of Civil and Environmental Engineering), Environmental Section Doctoral Program in Environmental and Infrastructure Engineering, 2013.

SANCHEZ, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Bio-technol Adv* , 27 (2): 185-194, 2009.

SANTOS, F. A., QUEIROZ, J. D., COLODETTE, J. L., FERNANDES, S. A., GUIMARÃES, V. M., REZENDE, S. T. Potencial da palha de cana de açúcar para produção de etanol. *Quím. Nova*, São Paulo , v. 35, n. 5, p. 1004-1010, 2012 . Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422012000500025&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 16 de jun. 2017.

SANTOS, C. Biorremediação de bisfenol A pelas lacases produzidas pelo *Pycnoporus Sanguineus* utilizando resíduos de carijacar brasileiro com. 2019. Dissertação (Mestrado) Instituto Federal de Goiás.

SANTOS JÚNIOR, L. A. Degradação de antibióticos de uso veterinário em reator de carbonização hidrotermal. 2015. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Escola de Engenharia Civil (EEC), Programa de Pós-Graduação em Engenharia do Meio Ambiente, Goiânia, 2015.

SILVA, E. A. Atividade enzimática da lacase e crescimento micelial de três fungos amazônicos degradadores de madeira. Dissertação de Mestrado – Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 112 p., 2006.

SILVA, A. P. M. Lodo de Leito de Secagem (LLS): Caracterização, aproveitamento energético e avaliação do Ciclo de Vida. 183 f. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Itajubá, Pós-Graduação em Engenharia Mecânica, Itajubá, 2016.

SILVEIRA, L. C. I. Melhoramento genético da cana-de-açúcar para obtenção de cana energia. 84 f. Tese de doutorado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014. Dissertação

(mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Mecânica. Campinas, 2016.

SOUZA, A. R. de. Caracterização estrutural e biofísica de duas proteínas relacionadas: β -1,3-1,4-glicanase de *Bacillus subtilis* 168 e α -L-arabinofuranosidase termoestável de *Thermotoga petrophila* RKU-1. 2012. 97 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto, 2012.

SZKLARZ, G. D., ANTIBUS, R. K., SINSABAUGH, R. L., LINKINS, A. E. Production of Phenoloxidases and Peroxidases by Wood-Rotting Fungi. *Mycology*, 81, 234-240, 1989.

TERRASAN, C. R. F. Produção e caracterização do complexo xilanolítico de *Penicillium janczewskii*. 68f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada), Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2007.

TOLMASQUIM, M. T. Energia Renovável: Hidráulica, Biomassa, Eólica, Solar, Oceânica. EPE: Rio de Janeiro, 452 p., 2016.

VASCONCELOS, O. M. S. R. Degradação do antibiótico amoxicilina em efluente de indústria farmacêutica. 2011. 136 f. Dissertação (Mestrado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídrico), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

VÁZQUEZ, M., OLIVA, M., TÉLLEZ-LUIS, S. J., RAMÍREZ, J. A. Hydrolysis of sorghum straw using phosphoric acid: evaluation of furfural production. *Bioresour. Technol.*, 98, 3053– 3060, 2007.

VDI 4630. Fermentation of Organic Materials e Characterization of the Substrate, Sampling, Collection of Material Data, Fermentation Tests. Verein Deutscher Ingenieure (Association of German Engineers), Düsseldorf, Germany, 2006.

VIOLANTE, M. H. S. R. Potencial de produção de cana-energia em áreas agrícolas marginais no Brasil. 2012. 113 f. Dissertação (MPAGRO) - Escola de Economia de São Paulo, 2012.

ZANETTE, A. L. Potencial de aproveitamento energético do biogás no Brasil. 2009. 105

f. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

ZHU, L., O'DWYER, J.P., CHANG, V.S., GRANDA, C.B. AND HOLTZAPPLE, M.T. Multiple linear regression model for predicting biomass digestibility from structural features. *Bioresource Technology*. 101(13), 4971-4979. 2010.