

Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas - FCF

**Hidrólise enzimática da fração polissacarídica do
resíduo oriundo do processamento de carragena
de *Kappaphycus alvarezii***

Fernando Roberto Paz Cedeño

Araraquara

2017

Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas - FCF

**Hidrólise enzimática da fração polissacarídica do
resíduo oriundo do processamento de carragena
de *Kappaphycus alvarezii***

Fernando Roberto Paz Cedeño

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-graduação em Alimentos e
Nutrição para obtenção do título de
Mestre em Alimentos e Nutrição.

Área de concentração: Ciência dos
Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Fernando Masarin

Araraquara

2017

Hidrólise enzimática da fração polissacarídica do resíduo oriundo do processamento de carragena de *Kappaphycus alvarezii*

Fernando Roberto Paz Cedeño

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Alimentos e Nutrição para obtenção do título de Mestre em Alimentos e Nutrição.

Área de concentração: Ciência dos Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Fernando Masarin

Araraquara

2017

Ficha Catalográfica

Elaborada por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

P348h Paz Cedeño, Fernando Roberto
Hidrólise enzimática da fração polissacarídica do resíduo oriundo do processamento de carragena de *Kappaphycus alvarezii* / Fernando Roberto Paz Cedeño. – Araraquara, 2017.
126 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.
Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição. Área de pesquisa em Ciências dos Alimentos.

Orientador: Fernando Masarin.

1. Macroalga. 2. *Kappaphycus alvarezii*. 3. Resíduo. 4. Composição química. 5. Hidrólise enzimática e Bioprodutos. I. Masarin, Fernando, orient. II. Título.

CAPES: 50700006

FERNANDO ROBERTO PAZ CEDENO

**Hidrólise enzimática da fração polissacarídica do resíduo oriundo do
processamento de carragena de Kappaphycus alvarezii.**

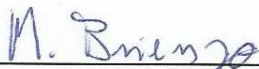
Dissertação de Mestrado apresentada à
Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade Estadual Paulista – UNESP,
Campus de Araraquara como requisito para a
obtenção do título de Mestre em Alimentos e
Nutrição.

Araraquara, 08 de fevereiro de 2017.

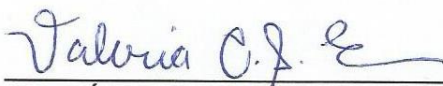
BANCA EXAMINADORA



FERNANDO MASARIN



MICHEL BRIENZO



VALÉRIA DE CARVALHO SANTOS EBINUMA

Dedico este trabalho aos meus pais Lourdes e Fernando.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Fernando Masarin, pela orientação, os ensinamentos e dedicação durante o desenvolvimento da pesquisa;

Ao Prof. Dr. Rubens Monti pelos ensinamentos, e por ter me recebido no Laboratório de Enzimologia;

Ao Prof. Dr. Samuel Conceição de Oliveira, do Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia da FCFAr, pelo apoio no desenvolvimento dos modelos matemáticos utilizados na descrição da cinética de hidrólise enzimática;

Ao Prof. Dr. João Atilio Jorge, da USP de Ribeirão Preto, pela ajuda na identificação do fungo *Aspergillus* sp. utilizado neste trabalho;

Ao Departamento de Alimentos e Nutrição e ao Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia da FCFAr, por toda a infraestrutura e apoio;

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Campus Araraquara – UNESP;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de mestrado;

À Seção Técnica da Pós-graduação;

Ao Instituto de Pesca da Secretaria de Agricultura e Abastecimento, pelo fornecimento das macroalgas para o projeto;

Aos professores, funcionários e pós-graduandos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara.

Agradecimentos pessoais

A Deus por este presente maravilhoso que é a vida;

À minha esposa, pelo amor, paciência, compreensão e apoio. Obrigado por ser parte da minha vida;

Aos meus pais, por serem modelos de coragem, pelo apoio e amor incondicional. Meu infinito agradecimento;

Às minhas irmãs, aos meus sogros e meus cunhados, pelo apoio, carinho e confiança;

Aos meus amigos e colegas de laboratório: Eddyn, Julián, Elen, Juliana, Natalia, Clariana e Thamyres;

A todos que, por ventura, esqueci.

*“...de cierto os digo que todo cuanto pidáis al Padre en mi nombre, os lo dará.
Hasta ahora nada habéis pedido en mi nombre; pedid y recibiréis, para que
vuestro gozo sea completo.”*

Juan 16:23-24

Resumo

A macroalga vermelha *Kappaphycus alvarezii* é rica em carboidratos, porém contém outras frações constituídas de proteínas, inorgânicos e aromáticos. O presente trabalho foi justificado devido ao fato de que o resíduo gerado no processamento de carragena semi-refinada ser menos recalcitrante comparado a resíduos lignocelulósicos. **Objetivo:** Avaliar o potencial da conversão enzimática das frações geradas no processamento de carragena oriundo da macroalga *Kappaphycus alvarezii* em açúcares monoméricos fermentescíveis.

Métodos: A parte experimental envolveu a obtenção de um resíduo a partir do processamento de carragena semi-refinada de *K. alvarezii*. A fração não tratada e as frações obtidas no processamento foram caracterizadas quimicamente e hidrolisadas enzimaticamente. Na hidrólise enzimática foram utilizados extratos enzimáticos comerciais e um extrato enzimático obtido a partir de *Aspergillus* sp.

Resultados: O processamento de carragena semi-refinada e a obtenção do resíduo foram realizadas com sucesso. Os rendimentos globais de obtenção de carragena semi-refinada e do resíduo foram de 46,8% e 19,2%, respectivamente. As frações, não tratada, tratada com KOH, o resíduo e a carragena semi-refinada mostraram teores brutos de 44,8%, 41,5%, 32,7% e 53,6% (galactana), 12,4%, 13,4%, 38,4% e 8,3% (glucana), 15,8%, 14,9%, 8,6% e 18,2% (cinzas) e 12,6%, 13,8%, 8,1% e 13,3% (grupos sulfato), respectivamente. A fração do resíduo mostrou ser rica em glucana enquanto a fração de carragena semi-refinada rica em galactanas e cinzas. Os extratos enzimáticos comerciais utilizados foram caracterizados e mostraram níveis máximos de atividade específica de celulasas e galactanases de 1,3 FPU.mg⁻¹ e 0,3 UI.mg⁻¹, respectivamente. O extrato obtido a partir de *Aspergillus* sp. mostrou níveis máximos de atividade de β -galactosidases e galactanases de 0,3 UI.mL⁻¹ e 0,2 UI.mL⁻¹, respectivamente. A hidrólise enzimática da fração de glucana foi eficiente atingindo 100% de conversão. Entretanto, a fração de galactana mostrou uma conversão máxima de aproximadamente 35%. Após 72 horas de hidrólise enzimática, as concentrações máximas de glicose e galactose na fração do resíduo foram de 10 g.L⁻¹ e 1,2 g.L⁻¹, respectivamente. Um tratamento com ácido sulfúrico em condições brandas, após a etapa de hidrólise enzimática, culminou em uma conversão máxima da fração de galactana de 47%. Nesta condição a concentração de galactose no hidrolisado atingiu 1,6 g.L⁻¹. **Conclusão:** Em resumo, temos demonstrado um novo aspecto dentro do conceito de biorrefinarias de *K. alvarezii* para produzir não somente carragena, mas também bioprodutos a partir do hidrolisado oriundo da fração do resíduo. Esses avanços podem contribuir para uma melhor concepção de estratégias de produção de biocombustíveis no setor de produção de hidrocoloides. Desta forma, esse método poderia ser considerado como um modelo de produção de biocombustíveis de quarta geração.

Palavras-chave: Macroalga, *Kappaphycus alvarezii*, Resíduo, Composição química, Hidrólise enzimática e Bioprodutos.

Abstract

The red macroalgae *Kappaphycus alvarezii* is rich in carbohydrates, but contains other fractions constituted of proteins, inorganic and aromatics. The present study was justified due to the fact that the residue generated in the processing of semirefined carrageenan is less recalcitrant compared to lignocellulosic residues.

Objective: Evaluate the potencial of the enzymatic conversion of the fractions generated in the carrageenan processing from macroalgae *Kappaphycus alvarezii* in fermentable monomeric sugars. **Methods:** The experimental part involved the obtaining of a residue from the processing of semirefined carrageenan of *K. alvarezii*. The untreated fraction and fractions obtained in the processing were chemically characterized and enzymatically hydrolyzed. In the enzymatic hydrolysis were used commercial enzymatic extracts and an enzymatic extract obtained from *Aspergillus* sp. **Results:** Processing of semirefined carrageenan and the recovery of the residue were carried out successfully. Overall yields of semirefined carrageenan and residue were 46.8% and 19.2%, respectively. The content of untreated fraction, treated with KOH, residue and semirefined carrageenan were 44.8%, 41.5%, 32.7% and 53.6% (galactan), 12.4%, 13.4%, 38.4% e 8.3% (glucan), 15.8%, 14.9%, 8.6% and 18.2% (ash) and 12.6%, 13.8% , 8.1% and 13.3% (sulfate groups), respectively. The fraction of the residue showed to be rich in glucan while the fraction of semirefined carrageenan rich in galactan and ashes. Commercial enzymatic extracts used were characterized and maximum values of specific activity of cellulases and galactanases were 1.3 FPU.mg⁻¹ and 0.3 IU.mg⁻¹, respectively. Extract obtained from *Aspergillus* sp. used characterized and maximum values of specific activity of β -galactosidase and galactanases were 0.3 IU.mL⁻¹ and 0.2 IU.mL⁻¹, respectively. The enzymatic hydrolysis of the glucan fraction was efficient reaching 100% conversion. However, the enzymatic hydrolysis of the galactan fraction showed a maximum conversion of approximately 35%. After 72 hours of enzymatic hydrolysis, the maximum concentration of glucose and galactose in the residue fraction were 10 g.L⁻¹ and 1.2 g.L⁻¹, respectively. A treatment with sulfuric acid under mild conditions, after the enzymatic hydrolysis step, reaching in a maximum conversion of the galactan fraction of 47%. In this condition, the concentration of galactose in the hydrolyzate reached 1.6 g.L⁻¹. **Conclusion:** In summary, we have demonstrated a new aspect of the biorefinery of *K. alvarezii* for developing not only carrageenan, but also bioproducts starting of the hydrolyzate from residue. Such insights can further advances this hydrocolloid sector towards better design of biofuel production strategies. Therefore, this method would be a fourth generation model for the production of biofuels.

Keywords: Macroalgae, *Kappaphycus alvarezii*, Residue, Chemical composition, Enzymatic hydrolysis and Bioproducts.

LISTA DE ABREVIATURAS

CAGR	Taxa de crescimento anual composta
CBD	Domínio de ligação à celulose
CBH	Celobiohidrolase
CE	Carga enzimática
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CMC	Carboximetilcelulose
DFRC	Derivatização seguida por clivagem redutora
DNS	Ácido 3,5 dinitrosalicílico
FPU	Filter paper units
HMF	Hidroximetilfurfural
NREL	National Renewable Energy Laboratory
PVC	Policloroeteno

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tipos de carboidratos e carboidratos totais de algumas classes e espécies de macroalgas (6,19–22).	29
Tabela 2. Teores de lipídeos, proteínas e cinzas de algumas classes e espécies de macroalgas (6).	30
Tabela 3. Composição do meio Vogel (50).	58
Tabela 4. Composição do meio descrito por Araújo e Ward (38).	59
Tabela 5. Níveis dos fatores utilizados no planejamento fatorial completo 2^3 com ponto central.	62
Tabela 6. Matriz de planejamento referente aos fatores avaliados no planejamento fatorial completo 2^3 com triplicata no ponto central....	63
Tabela 7. Rendimento da biomassa de <i>K. alvarezii</i> após o tratamento com KOH e obtenção do resíduo e carragena semi-refinada.	65
Tabela 8. Teores de hidroximetilfurfural (HMF), ácido fórmico e ácido levulínico nas frações não tratada, tratada com KOH, resíduo e carragena semi-refinada.	70
Tabela 9. Composição química e rendimento da fração não tratada e tratada com KOH.	73
Tabela 10. Composição química e rendimento das frações tratada com KOH, resíduo e carragena.	75
Tabela 11. Atividades enzimáticas específicas e teor de proteínas dos extratos comerciais de celulases.	77

Tabela 12. Atividades específicas e teor de proteínas dos extratos comerciais de pectinases.	78
Tabela 13. Atividades enzimáticas dos extratos obtidos a partir do fungo <i>Aspergillus</i> sp. após 2, 4, 6, 8, e 10 dias de cultivo.	81
Tabela 14. Atividade enzimática do extrato obtido a partir do fungo <i>Aspergillus</i> sp. após 6 dias de cultivo e concentrado 100 vezes.	82
Tabela 15. Análise de variância do ajuste do modelo. Ref: Cellic CTec II (CE: 10 FPU/g)	100
Tabela 16. Análise de variância do ajuste do modelo. Ref: Celluclast (CE: 10 FPU/g)	101
Tabela 17. Análise de variância do ajuste do modelo. Ref: <i>Trichoderma</i> (CE: 10 FPU/g)	102
Tabela 18. Análise de variância do ajuste do modelo. Ref: Ultra Clear (CE: 20 UI/g)	103
Tabela 19. Análise de variância do ajuste do modelo. Ref: Cellic CTec II + Smash XXL (CE: 10 FPU+20 UI/g).	104
Tabela 20. Análise de variância do ajuste do modelo. Ref: Cellic CTec II + <i>Aspergillus</i>	105
Tabela 21. Análise de variância do ajuste do modelo. Ref: Cellic CTec II (CE: 100 FPU/g)	106
Tabela 22. Conversão de galactana em galactose após hidrólise enzimática e conversão de galactana em galactose e formação de HMF após a hidrólise enzimática + tratamento ácido brando.	112

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de balsa ancorada utilizada para cultivos de <i>Kappaphycus alvarezii</i>	24
Figura 2. Morfologia e ultraestrutura de <i>Calliarthron Thalli</i>	26
Figura 3. Morfologia e ultraestrutura de <i>Arapdopsis</i>	27
Figura 4. Informação estrutural dos principais polissacarídeos encontrados em macroalgas (6).	29
Figura 5. Modo de ação das enzimas do complexo celulolítico de <i>Trichoderma reesei</i> (26).	34
Figura 6. Fluxograma geral das etapas desenvolvidas no projeto.	38
Figura 7. Sistema de cultivos experimental de <i>K. alvarezii</i> no oceano atlântico na praia do Itaguá, Ubatuba, SP, Brasil	39
Figura 8. Fluxograma das etapas de obtenção das diferentes frações de <i>Kappaphycus alvarezii</i>	41
Figura 9. Diferentes frações de <i>K. alvarezii</i> . (a) Material não tratado. (b) Material tratado com KOH. (c) Resíduo. (d) Carragena semi-refinada.	64
Figura 10. (a) Cromatograma de padrões autênticos de (A) glicose, (B) galactose, (C) ácido fórmico e (D) ácido levulínico para a coluna HPX-87H. (b) Cromatograma de padrões autênticos de (A) celobiose, (B) glicose, (C) xilose, (D) galactose e (E) manose para a coluna HPX-87P.....	67
Figura 11. Cromatogramas do hidrolisado ácido da fração do resíduo.	69
Figura 12. Fungo isolado da borra do café.....	80

Figura 13. Hidrólise enzimática das frações de <i>K. alvarezii</i> utilizando extratos enzimáticos comerciais de celulasas.	84
Figura 14. Hidrólise enzimática das frações de <i>K. alvarezii</i> utilizando o extrato enzimático Cellic CTec II.	86
Figura 15. Hidrólise enzimática das frações de <i>K. alvarezii</i> utilizando extratos enzimáticos comerciais de pectinases.	87
Figura 16. Hidrólise enzimática das frações de <i>K. alvarezii</i> utilizando o extrato enzimático Pectinex Smash XXL.	89
Figura 17. Hidrólise enzimática do resíduo de <i>K. alvarezii</i> utilizando os extratos enzimáticos Cellic CTec II e Pectinex Smash XXL.	90
Figura 18. Hidrólise enzimática do resíduo de <i>K. alvarezii</i> utilizando extrato enzimático de <i>Aspergillus</i> sp.	91
Figura 19. Hidrólise enzimática do resíduo de <i>K. alvarezii</i> utilizando extratos enzimáticos de <i>Aspergillus</i> sp. e Cellic CTec II.	92
Figura 20. Hidrólise enzimática do resíduo de <i>K. alvarezii</i> utilizando extrato enzimático comercial Cellic CTec II 100FPU/g de substrato.	94
Figura 21. Ajuste do modelo proposto aos dados cinéticos obtidos com o extrato enzimático Cellic CTec II (CE: 10 FPU/g).	100
Figura 22. Ajuste do modelo proposto aos dados cinéticos obtidos com o extrato enzimático Celluclast (CE: 10 FPU/g).	101
Figura 23. Ajuste do modelo proposto aos dados cinéticos obtidos com o extrato enzimático <i>Trichoderma</i> (CE: 10 FPU/g).	102

Figura 24. Ajuste do modelo proposto aos dados cinéticos obtidos com o extrato enzimático Ultra Clear (CE: 20 UI/g)	103
Figura 25. Ajuste do modelo proposto aos dados cinéticos obtidos com o extrato enzimático Cellic CTec II + Smash XXL (CE: 10 FPU+20 UI/g)	104
Figura 26. Ajuste do modelo proposto aos dados cinéticos obtidos com o extrato enzimático Cellic CTec II + <i>Aspergillus</i>	105
Figura 27. Ajuste do modelo proposto aos dados cinéticos obtidos com o extrato enzimático Cellic CTec II (CE: 100 FPU/g)	106

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1. Sequência de reações irreversíveis de 1ª ordem.....	95
Equação 2. Reação irreversível de 1ª ordem modificada.....	95
Equação 3. Taxa de variação temporal da concentração de glicose	95
Equação 4. Equação proposta para r_1	96
Equação 5. Perfil temporal de concentração de glicose	96
Equação 6. Velocidade máxima de reação	97
Equação 7. Teste F de Fischer	98

Sumário

Resumo.....	viii
Abstract.....	ix
1. Introdução.....	20
2. Revisão bibliográfica	22
2.1. Cultivos de macroalgas e produção comercial de carragena.....	22
2.2. Classificação, ultraestrutura e morfologia celular de macroalgas	24
2.3. Composição química de macroalgas	27
2.3.1. Carboidratos	28
2.3.2. Proteínas, lipídeos e cinzas.....	30
2.4. Hidrólise ácida e enzimática de celulose	32
2.5. Obtenção de galactanases e hidrólise enzimática de galactana.....	34
3. Objetivo	36
4. Material e Métodos	38
4.1. Obtenção do material bruto e geração das frações de <i>K. alvarezii</i>	38
4.1.1. Preparo da biomassa de <i>K. alvarezii</i>	40
4.1.2. Tratamento químico do material com hidróxido de potássio	40
4.1.3. Extração de carragena e obtenção do resíduo.....	42
4.2. Composição química das amostras de macroalgas.....	43
4.2.1. Teor de cinzas.....	43
4.2.2. Teores de carboidratos e compostos aromáticos insolúveis	44
4.2.3. Teor de hidroximetilfurfural (HMF).....	46
4.2.4. Teor de proteínas	47
4.2.5. Teor de grupos sulfato.....	48
4.3. Determinação de proteínas totais em extratos enzimáticos.....	48
4.4. Determinação das atividades enzimáticas em extratos comerciais	50
4.4.1. β -glicosidase	50
4.4.2. β -galactosidase	51
4.4.3. Endoglucanase.....	51

4.4.4.	Exoglucanase	52
4.4.5.	Celulases totais	53
4.4.6.	Galactanases totais	55
4.5.	Isolamento de fungo e obtenção de extratos enzimáticos a partir do mesmo.....	55
4.5.1.	Isolamento de fungo	55
4.5.2.	Preparação e obtenção do inóculo	56
4.5.3.	Preparo dos cultivos e inoculação do fungo	57
4.6.	Hidrólise enzimática das frações geradas.....	60
4.7.	Tratamento ácido	61
5.	Resultados e Discussão	64
5.1.	Obtenção e rendimento das frações de macroalga <i>K. alvarezii</i>	64
5.2.	Avaliação da composição química das frações em estudo.....	66
5.3.	Avaliação de atividades enzimáticas em extratos comerciais.....	76
5.4.	Identificação do fungo e obtenção de extratos enzimáticos a partir do mesmo.....	79
5.5.	Avaliação da hidrólise enzimática das frações de <i>K. alvarezii</i>	82
5.5.1.	Hidrólise enzimática com extratos enzimáticos comerciais contendo atividades de celulases.....	83
5.5.2.	Hidrólise enzimática com extratos enzimáticos comerciais contendo atividades de galactanases	86
5.5.3.	Hidrólise enzimática com extratos Cellic CTec II + Pectinex Smash XXL	89
5.5.4.	Hidrólise enzimática com extrato enzimático de <i>Aspergillus</i> sp. contendo atividade de galactanases	90
5.5.5.	Hidrólise enzimática com extratos de <i>Aspergillus</i> . sp. + Cellic CTec II	91
5.5.6.	Hidrólise enzimática com 100FPU de Cellic CTec II por grama de substrato.....	92
5.6.	Modelagem cinética da hidrólise enzimática.....	94
5.7.	Considerações finais sobre a hidrólise enzimática das frações de <i>K. alvarezii</i>	107

5.8. Tratamento ácido brando após hidrólise enzimática com 100FPU de Cellic CTec II por grama de substrato.....	109
6. Conclusão.....	113
7. Referências	116

1. Introdução

Os biocombustíveis representam um tema de grande repercussão global devido à atual dependência de derivados do petróleo para a produção de energia e sua consequência nas mudanças climáticas do planeta. Nesse cenário, o Brasil tem uma excelente oportunidade para atuar em novas matrizes energéticas associadas à produção de combustíveis e produtos químicos através de fontes renováveis. Atualmente, grandes quantidades de etanol são produzidas a partir da sacarose e/ou melaço de cana de açúcar, e materiais lignocelulósicos, sendo que este último tem muitas vantagens em termos de disponibilidade de recursos, considerando a grande quantidade de materiais lignocelulósicos produzidos por atividades florestais e de agricultura. Entretanto, os materiais lignocelulósicos são muito recalcitrantes frente à hidrólise enzimática de polissacarídeos, sendo necessário primeiro um pré-tratamento químico do material e posteriormente a hidrólise enzimática para conversões acima de 30% (1). Outra fonte renovável que pode ser utilizada para a produção de biocombustíveis são as algas, que também podem ser cultivadas em grandes quantidades no Brasil. As algas são plantas terrestres e aquáticas e muitas espécies contêm altos teores de carboidratos e baixo conteúdo de lignina e no futuro próximo essa fonte se tornará essencial para o uso em processos biotecnológicos de fermentação (2–6). Além disso, algumas espécies de algas também contêm lipídeos que podem ser pré-extraídos e utilizados para a produção de biodiesel (7).

O baixo conteúdo de lignina em algas faz com que os polissacarídeos sejam mais acessíveis a tratamentos químicos e enzimáticos o que torna as algas menos recalcitrantes do que as plantas terrestres (2,5,8,9). As algas também produzem mais oxigênio do que utilizam na respiração, ao contrário das plantas terrestres. Desta forma, as algas têm um ganho ambiental que pode ser convertido em um ganho econômico com a comercialização de créditos de carbono. Além disso, em média as algas têm uma produtividade de $22 \text{ kg.m}^2.\text{ano}^{-1}$ (dados em base seca) superiores as plantas terrestres que tem uma produtividade média de $0,5\text{-}4,4 \text{ kg.m}^2.\text{ano}^{-1}$ (dados em base seca) (2,10).

Nesse contexto, o presente projeto teve como objetivo estudar a viabilidade da hidrólise enzimática da fração polissacarídica do resíduo de *Kappaphycus alvarezii* (gerado após o processo de extração de carragena) para produzir açúcares monoméricos fermentescíveis. A seguir será apresentada uma revisão bibliográfica sobre o estado da arte do tema abordado no projeto.

2. Revisão bibliográfica

2.1. Cultivos de macroalgas e produção comercial de carragena

A carragena kappa é um importante hidrofílico coloide (hidrocoloide) que se acumula em numerosas espécies de macroalgas vermelhas. A indústria global de carragena foi avaliada em 762,35 milhões de dólares em 2016. O maior produtor de carragena é Filipinas, que representa cerca do 77% da oferta mundial. O valor do mercado para carragena na Ásia-Pacífico é extremamente maior em comparação com os mercados da América do Norte e Europa. A China é o principal exportador de carragena para Estados Unidos e Europa. A produção mundial de carragena excedeu de 56 mil toneladas em 2013 e tem um mercado muito competitivo na Argentina, Canadá, Chile, Dinamarca, França, Japão, México, Marrocos, Portugal, Coreia do Sul, Espanha, Rússia e Estados Unidos. O mercado da carragena teve uma taxa de crescimento anual composta (CAGR) de 5,2% nos anos 2013 a 2016 (11–15).

Na indústria de alimentos a carragena é utilizada principalmente como um agente estabilizante e espessante. Nos Estados Unidos a principal aplicação é na indústria do chocolate, utilizando a carragena para manter o chocolate em suspensão. A carragena é utilizada também na indústria farmacêutica, de cosméticos e em outros segmentos (11–15).

Cultivos comerciais de macroalgas vermelhas (principalmente de *K. alvarezii*) foram iniciados em meados de 1970 nas Filipinas e desde então tem sido transferido com sucesso para a Indonésia, Tanzânia, Vietnam e algumas

ilhas do pacífico, sendo responsáveis por mais de 88% da produção industrial mundial de carragena. A introdução de *K. alvarezii* no Brasil ocorreu em 1995 em Ubatuba-SP e em 1998 no estado do Rio de Janeiro. Após o ano de 2008 foi permitida a produção comercial de *K. alvarezii* pelo governo brasileiro na baía de Sepetiba-RJ, onde encontram-se, aproximadamente, 30 fazendas de cultivo. No Brasil a produção de carragena é inferior a 10 toneladas por ano. Parte da produção de carragena no Brasil é obtida de bancos naturais de *Hypnea musciformis*, porém esses bancos são limitados e o cultivo de *H. musciformis* não foi desenvolvido com sucesso, consequentemente o Brasil importa anualmente 1 tonelada de carragena e 2 toneladas de *K. alvarezii* das Filipinas (11–14).

As macroalgas são cultivadas comercialmente para a extração de carragena através de técnicas de aquacultura, (cultivo de organismos aquáticos). O principal método de cultivo de macroalgas é o sistema de balsa ancorada (Figura 1). Esse sistema consiste em uma balsa ancorada na superfície da água com 0,5 m a 1,0 m de profundidade. A balsa ancorada é dividida em módulos que contém tubos de PVC (policloreto de polivinila) fechados em sua extremidade (Figura 1). Sob cada módulo é amarrada uma rede de nylon. Os módulos principais também podem ser divididos em módulos secundários (Figura 1). Ao longo dos módulos são alinhadas linhas de nylon com um espaçamento adequado entre elas para amarrar os brotos em crescimento vegetativo das macroalgas, sistema conhecido como “TIE-TIE” (sistema de amarração) (Figura 1) (11–14).

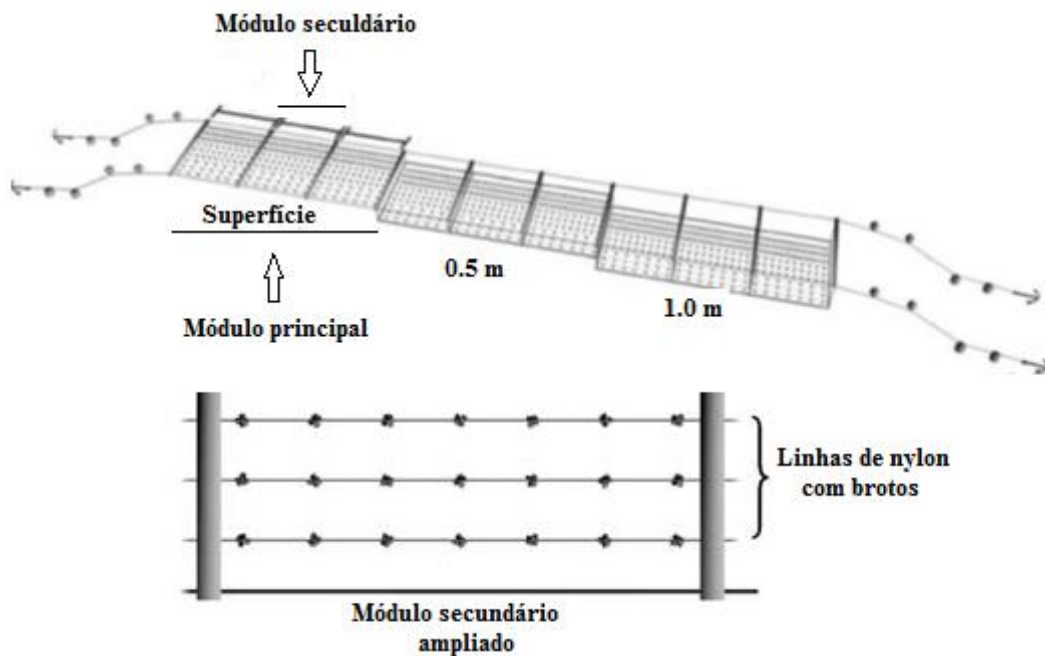


Figura 1. Esquema de balsa ancorada utilizada para cultivos de *Kappaphycus alvarezii*. Sistema conhecido como “TIE – TIE” ou sistema de amarração (13).

2.2. Classificação, ultraestrutura e morfologia celular de macroalgas

As algas são plantas aquáticas ou terrestres e existem em uma grande variedade de espécies que vivem em vários tipos de ambientes. Elas podem ser autotróficas ou heterotróficas. As algas autotróficas são fotossintetizantes e utilizam a luz solar para fixar o carbono inorgânico da atmosfera (CO_2). O carbono assimilado é transformado em moléculas orgânicas mais complexas (como, por exemplo, os carboidratos) e utilizado como reserva alimentar ou como constituinte estrutural da parede celular da planta. As algas heterotróficas são capazes de assimilar pequenas moléculas orgânicas que são transformadas em compostos mais complexos como lipídeos, carboidratos e proteínas (5).

Geralmente as algas são agrupadas em duas categorias: microalgas e macroalgas baseando-se em sua morfologia e tamanho. As microalgas são organismos microscópios, unicelulares e fotossintetizantes. As macroalgas são compostas de múltiplas células organizadas em estruturas semelhantes a raízes, talo e folhas de plantas superiores. As algas também podem ser divididas em classes: verdes, pardas e vermelhas. A classe das algas pardas contém apenas macroalgas (pluricelulares). Entretanto, a classe das algas verdes e vermelhas contém ambos os tipos unicelulares e pluricelulares (5,6,16).

Macroalgas como, por exemplo, *Calliarthron Thalli* contém em sua parede celular carbonato de cálcio. As regiões calcificadas são denominadas de “intergeniculum” e as regiões que não contém carbonato de cálcio são denominadas de “geniculum” (Figura 2A-C). As regiões periféricas da geniculum contém células com paredes celulares mais espessas (maduras - Figura 2C e 1E) enquanto na região central da geniculum as células têm paredes celulares mais finas (imaturas- Figura 2C e 2D) (3).

Imagens de microscopia eletrônica de transmissão na direção transversal e longitudinal da parede celular de *C. Thalli* mostram a deposição da lamela média (M), parede celular primária (P) e distintas paredes celulares secundárias (S1) nas células de geniculum maduras e imaturas, sendo notável na geniculum madura (Figura 2D-E) (3). As regiões da intergeniculum contém apenas a parede celular primária não sendo encontrada parede celular secundária (Figura 2F). Paredes celulares secundárias também não têm sido descritas na literatura em algas vermelhas (3). Nos lignocelulósicos, a maior parte da lignina se encontra

nas paredes celulares secundárias (17). A ausência desta parede nas algas vermelhas pode explicar o baixo teor de lignina na sua composição (Figura 2).

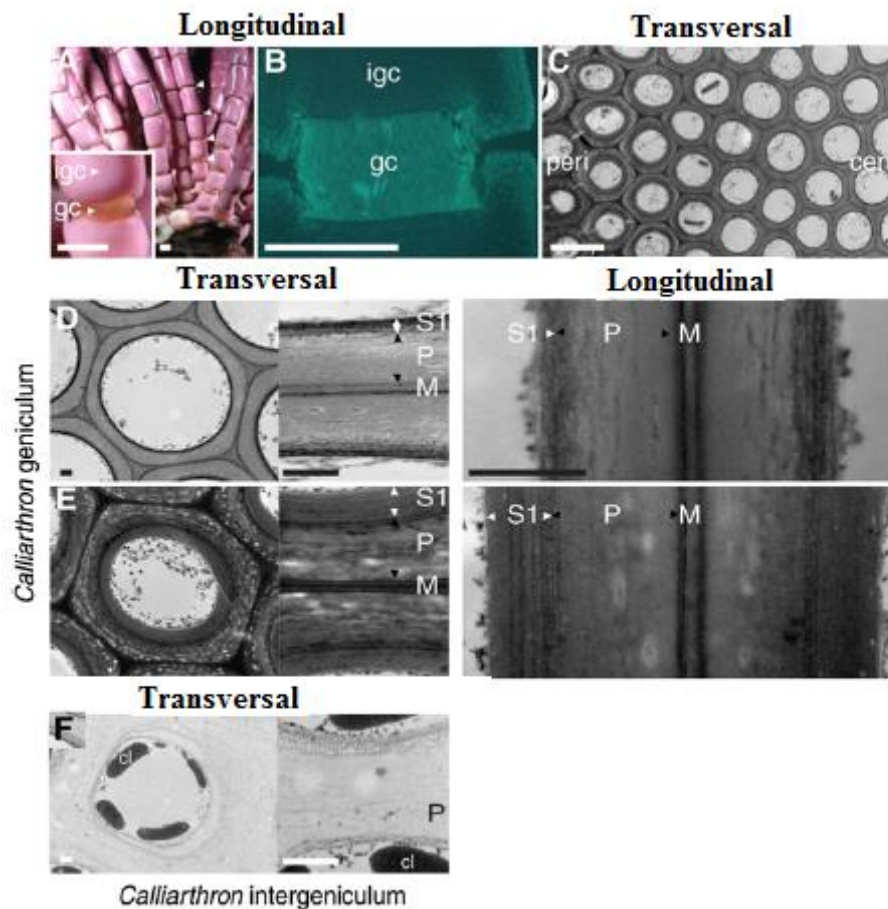


Figura 2. Morfologia e ultraestrutura de *Calliarthron Thalli* com pontuações flexíveis denominadas geniculum e separado por segmentos calcificados denominados intergeniculum. (A) Aspecto geral, (B) seção longitudinal (vista sobre luz UV) e (C) seção transversal de geniculum. (D) Célula genicular imatura com parede celular primária desenvolvida e parede celular secundária desprezível. (E) Célula genicular madura com parede secundária mais espessa, (F) Célula intergenicular contendo apenas parede celular primária. Abreviações: cen=células; gc=células geniculares; igc=células intergeniculares; ceri=células

geniculares centrais; peri=células geniculares periféricas; cl=cloroplastos; M=lamela média; P=parede celular primária; S1=parede celular secundária. A barra de escala representa 1 mm (A e B), 10 mm (C) e 0.5 mm (D-F).

A figura 3 mostra a microscopia eletrônica de transmissão de uma célula de fibra de planta terrestre do gênero *Arapdopsis* que pertence à família *Brassicaceae* (que incluem as couves e mostardas). A microscopia mostra uma parede celular secundária mais desenvolvida e com subcamadas visuais (parede secundária S1, S2 e S3) e uma parede celular primária mais fina quando comparado a parede celular de *C. Thalli* (Figura 2D e 2E) (3).

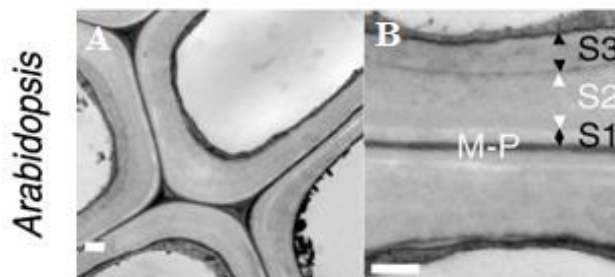


Figura 3. Morfologia e ultraestrutura de *Arapdopsis*. (A e B) seção transversal da fibra com barra de escala de 0,5 mm. M=lamela média; P=parede celular primária; S1-S2-S3= camadas da parede celular secundária.

2.3. Composição química de macroalgas

As macroalgas contém carboidratos, lipídeos, proteínas, cinzas e aromáticos (3,6,18). A composição química de macroalgas pode ser muito variável dependendo das classes e espécies avaliadas (6).

2.3.1. Carboidratos

Muitos tipos de carboidratos poliméricos são encontrados em macroalgas. Os principais tipos de carboidratos que compõem as macroalgas pardas são a laminarina (polissacarídeo de cadeia linear consistindo de unidades de glicose conectados por ligações do tipo β -1-3 com poucas ramificações conectadas através de ligações do tipo β -1-6), manitol (um tipo de açúcar álcool) e celulose (polissacarídeo de cadeia linear consistindo de unidades de glicose conectados por ligações do tipo β -1-4). As macroalgas pardas podem conter ainda o alginato (polímero de cadeia linear consistindo de unidades de ácido β -D-manurônico e α -D-gulurônico conectados por ligações do tipo 1-4) (Figura 4 e Tabela 1) (6). As macroalgas vermelhas contêm Agar (polissacarídeo de cadeia linear consistindo de unidades de β -D-galactose e 3-6- α -L-anidrogallactose conectados em ligações do tipo 1-4 alternadas em ligações do tipo 1-3), carragena (polissacarídeo linear consistindo de unidades de β -D-galactose-4-sulfato e 3-6- α -D-anidrogallactose-2-sulfato conectados em ligações do tipo 1-4 alternadas em ligações do tipo 1-3) e celulose (Figura 4 e Tabela 1) (6).

As macroalgas verdes contêm amido (polissacarídeo linear e ramificado consistindo de unidades de glicose conectadas através de ligações do tipo α -1-4 e α -1-6), pectina (polímero consistindo de unidades de ácido galacturônico interrompidas por unidades de L-ramnose) e celulose (Figura 4 e Tabela 1) (6).

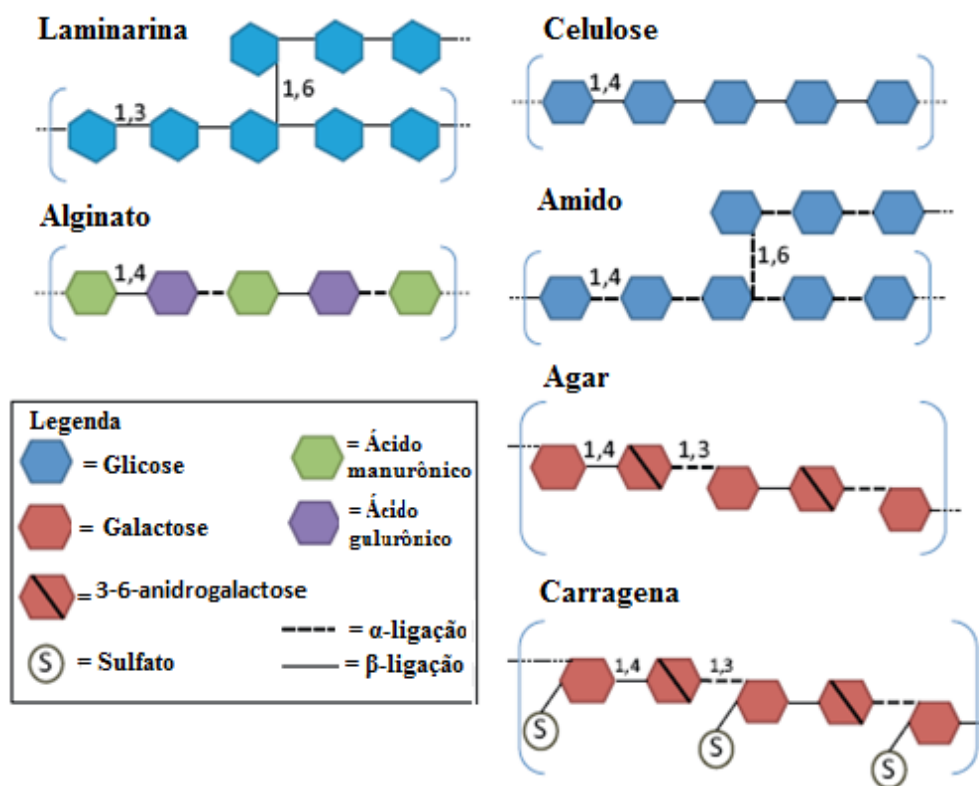


Figura 4. Informação estrutural dos principais polissacarídeos encontrados em macroalgas (6).

Tabela 1. Tipos de carboidratos e carboidratos totais (% massa/massa de biomassa seca) de algumas classes e espécies de macroalgas (6,19–22).

Algas	Classes	Tipos de carboidratos	Carboidratos totais (%)	Referência
<i>Gelidium amanssi</i>	Vermelha	Agar, carragena, celulose	75,2	(22)
<i>Kappaphycus alvarezii</i>		Celulose, carragena	55,4-78,3	(19)
<i>Laminaria japonica</i>	Marrom	Laminarina, manitol, alginato, celulose	51,9	(20)
<i>Sargassum fulvellum</i>			39,6	(20)
<i>Ulva lactuca</i>	Verde	Amido, celulose	54,3	(20)
<i>Ulva pertusa</i>			65,2	(21)

2.3.2. Proteínas, lipídeos e cinzas

O teor de proteínas em macroalgas é também variável dependendo das espécies avaliadas. Em média o teor de proteínas em macroalgas é de 12% (% massa/massa, biomassa seca) (Tabela 2) (6,18). O conteúdo de lipídeos é também variável dependendo das espécies avaliadas. Os lipídeos podem ser extraídos da biomassa e utilizados para a produção de biodiesel. Em média o teor de lipídeos em macroalgas é de 5% (% massa/massa, biomassa seca) (Tabela 2) (6,7,18). O conteúdo de cinzas em macroalgas também é bastante variável dependendo das espécies avaliadas. Compostos químicos inorgânicos são comuns de serem encontrados em macroalgas. O teor de cinzas é maior nas macroalgas pardas (em média 35%) seguido pelas macroalgas verdes (em média 22%) e macroalgas vermelhas (em média 6%) (% massa/massa, biomassa seca) (Tabela 2) (6,18).

Tabela 2. Teores de lipídeos, proteínas e cinzas (% massa/massa de biomassa seca) de algumas classes e espécies de macroalgas (6).

Algas	Classes	Lipídios (%)	Proteínas (%)	Cinzas (%)
<i>Gelidium amanssi</i>	Vermelha	0,6	18,5	5,7
<i>Gelidium amanssi</i>		1,1	13,1	8,6
<i>Gelidium amanssi</i>		0,9	12,2	3,3
<i>Laminaria japonica</i>	Parda	1,8	14,8	31,5
<i>Laminaria japonica</i>		1,5	8,1	30,9
<i>Sargassum fulvellum</i>		1,4	13,0	46,0
<i>Ulva lactuca</i>	Verde	6,2	20,6	18,9
<i>Ulva pertusa</i>		2,6	7,0	25,2

Segundo o reportado por Meinita *et al* (19), *K. alvarezii* apresenta teores de proteína entre 2,3% e 5,4%, de lipídios entre 0,6% e 0,9%, e cinzas entre 12,6% e 19,5%.

2.3.3. Aromáticos

Recentemente a detecção de compostos aromáticos em paredes celulares de macroalgas vem sendo avaliada. Martone *et al.* (3) demonstraram através da técnica de DFRC (do inglês - Derivatization followed by reductive cleavage) que paredes celulares de *C. thalli* contém componentes derivados de reações radicalares de acoplamento de alcoóis hidroxicinâmicos (monolignols) que são componentes precursores da formação da lignina e são utilizados para caracterizar ligninas de plantas terrestres. O método de DFRC é considerado como um diagnóstico de lignina, pois esse método cliva apenas as ligações do tipo β -aril-éter de monolignols acetilados. A aplicação do método de DFRC em *C. Thalli* mostrou a presença de acetatos oriundos de alcoóis p-cumaril, coniferil e sinapílico (monômeros de DFRC), tipicamente derivados de unidades de p-hidroxifenil (H), guaiacil (G) e siringil (S). Os acetatos de p-cumaril, coniferil e sinapílico são comumente encontrados em fibras de plantas terrestres após a aplicação do método de DFRC (3).

Para cada grama de biomassa de *C. Thalli* genicula foi obtido aproximadamente 0.25 mg de monômeros de DFRC (razão molar H:G:S = 1:1.5:traços) e a intergenicula não calcificada foi obtido 0.19 mg de monômeros

de DFRC (razão molar H:G:S = 1:2.4:0.1). O rendimento de monômeros de DFRC de gimnosperma (*Pine loblolly*) foi de 50 mg por grama de biomassa e essencialmente 100% (G). *Arabidopsis* mostrou um rendimento de DFRC de 20 mg por grama de biomassa (razão molar HGS = traços: 4:1) (3).

Yaich *et al.* (18) quantificaram o teor de aromáticos em biomassa da macroalga *Ulva lactuca* pelo método de lignina Klason (lignina insolúvel). O teor de aromáticos foi de 1.5% (% massa/massa de biomassa seca). Wi *et al.* (2) mostraram a presença de 1.5% de aromáticos insolúveis e 3.2% de aromáticos solúveis (% massa/massa de biomassa seca) em biomassa da macroalga *Gelidium amanssi*. Entretanto, os teores médios de lignina total em gimnospermas e angiospermas são em média de 30% e o de canas de açúcares de 20% (9,23,24).

2.4. Hidrólise ácida e enzimática de celulose

A celulose pode ser hidrolisada em resíduos de glicose por tratamento enzimático ou ácido. Existem algumas propriedades físico-químicas que dificultam a hidrólise enzimática e podem ser entendidos. No caso da hidrólise ácida, condições de reações mais severas são necessárias (altas temperaturas e concentrações de ácido). Isso significa que parte dos açúcares liberados dos polissacarídeos são degradados antes do final da hidrólise ácida. Além disso, a hidrólise química pode promover a formação de pequenas quantidades de compostos que inibem subseqüentes fermentações. No caso da hidrólise

enzimática, a reação é realizada sob condições mais amenas, porém requer tempos mais longos de tratamento (até 72 horas) (25).

A acessibilidade de enzimas para o substrato é crítica durante a hidrólise enzimática. Adicionalmente, adsorção de celulasas na superfície do substrato também tem uma importante função (26). Celulasas que adsorvem no substrato ampliam sua extensão mostrando um aumento na velocidade de hidrólise da celulose cristalina comparada a celulasas que adsorvem menos fortemente. A descoberta de domínios de ligação para celulose (CBDs) em algumas enzimas celulolíticas explica em parte as diferenças da habilidade de celulasas em adsorver na celulose (27). Uma correlação entre a hidrofobicidade de endoglucanases e sua habilidade em adsorver na celulose tem sido reportado (28). Certamente, a hidrofobicidade da lignina também pode favorecer a adsorção de celulasas. Durante o tratamento enzimático do material lignocelulósico com celulasas, acima de 70% do total da enzima adicionada pode não ser produtiva devido à adsorção na lignina (29–31). A literatura tem reportado um conteúdo desprezível de lignina e/ou aromáticos em biomassa de macroalgas (2–6). Desta forma, celulasas podem ser mais efetivas nesta biomassa devido a menor probabilidade de adsorção improdutiva da enzima.

Para uma eficiente hidrólise da celulose é necessária a ação sinérgica de enzimas, divididas em três grupos principais: endo-1,4- β -D-glucanases (EC 3.2.1.4), que clivam aleatoriamente o interior da cadeia de celulose; exo-1,4- β -D-glucanases, ou celobiohidrolases (CBH) (EC 3.2.1.91), que clivam as extremidades redutoras e não redutoras da cadeia de celulose e liberam

unidades de celobiose; e 1,4- β -D-glicosidases, ou celobíases, (EC 3.2.1.21), que hidrolisam a celobiose em glicose, além de clivarem oligossacarídeos. Os três grupos catalisam a hidrólise de ligações β -1,4 glicosídicas, e atuam sinergicamente, criando novos sítios para hidrólise, além de reduzir a inibição pelo produto (32,33) (Figura 5).

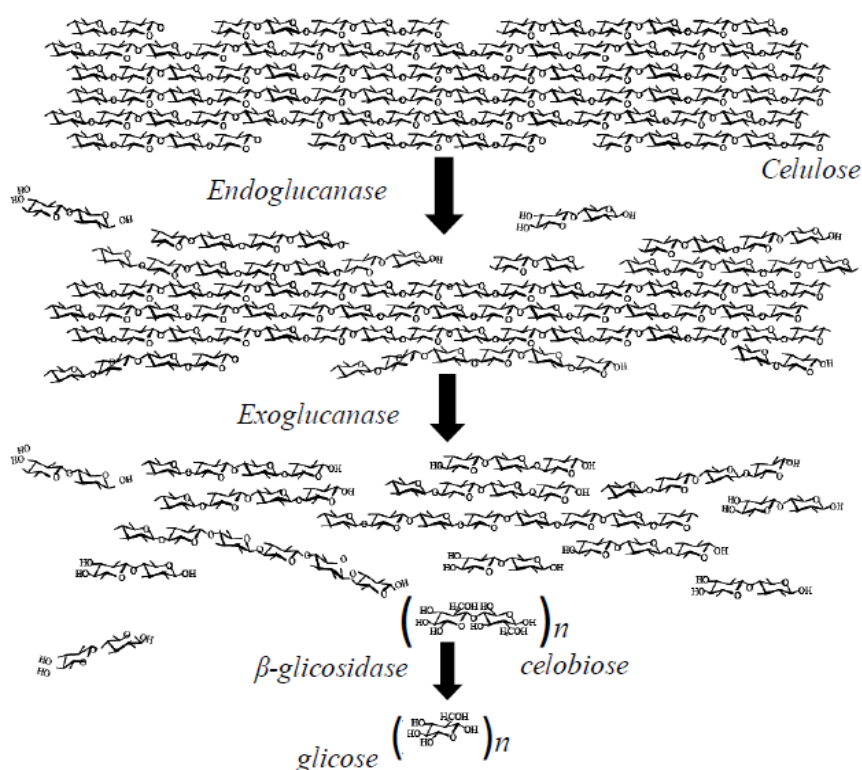


Figura 5. Modo de ação das enzimas do complexo celulolítico de *Trichoderma reesei* (26).

2.5. Obtenção de galactanases e hidrólise enzimática de galactana

Carragenas são galactanas lineares sulfatadas presentes na parede celular de macroalgas vermelhas (*Rhodophyta*) (34). A carragena pode ser degradada utilizando tratamento ácido (35), ou hidrólise enzimática (36,37). Carragenases

são enzimas que clivam especificamente as ligações glicosídicas das carragenas, são ferramentas poderosas para pesquisa estrutural de carragenas, pois reduzem drasticamente a viscosidade de uma suspensão concentrada de carragenas (37).

As enzimas galactanases tem potencial como importantes enzimas na conversão de polissacarídeos a hexoses e podem ser utilizadas para hidrolisar cadeias de galactanas presentes na biomassa da macroalga *K. alvarezii* (38). Algumas variedades de microrganismos mesófilos produzem galactanases. *Sclerotium rolfsii*, *Rhizopus niveus* e espécies de *Aspergillus* produzem uma combinação de galactanases e mananases (38). Yamaguchi *et al* (39), mostraram a purificação da enzima endo- β -1,4-D-galactanase a partir de uma preparação comercial de enzimas de *Aspergillus niger* (Cellulase A Amano 3 - Amano Pharmaceutical Co., Ltd., Nagoya, Japan).

3. Objetivo

O objetivo principal foi estudar o potencial da conversão enzimática das frações geradas no processamento de carragena oriundo da macroalga *Kappaphycus alvarezii* em açúcares monoméricos fermentescíveis. A seguir são apresentados os objetivos específicos do projeto:

- Processamento da biomassa de *K. alvarezii* a fim de obter as seguintes frações para os estudos posteriores: não tratada, tratada com KOH, carragena semi-refinada e o resíduo insolúvel;
- Determinação da composição química (cinzas, aromáticos insolúveis, carboidratos, grupos sulfato e proteínas) das frações em estudo;
- Obter um extrato enzimático com atividade de galactanases e β -galactosidases a partir do fungo *Aspergillus* sp.;
- Determinar as atividades enzimáticas (celulases e galactanases) presentes em extratos comerciais e extratos obtidos a partir do fungo *Aspergillus* sp.;
- Hidrolisar enzimaticamente as frações em estudo (amostra não tratada, tratada com KOH e o resíduo) com os extratos descritos anteriormente e avaliar o potencial de produção de açúcares fermentescíveis;

- Elaborar modelos matemáticos da cinética da hidrólise enzimática da fração do resíduo;
- Realizar um tratamento térmico com ácido (em condições brandas) após a hidrólise enzimática melhor sucedida e avaliar o potencial de produção de açúcares fermentescíveis;

4. Material e Métodos

A Figura 6 mostra um fluxograma geral das etapas envolvidas no projeto. Os detalhes de cada etapa são descritos a seguir.

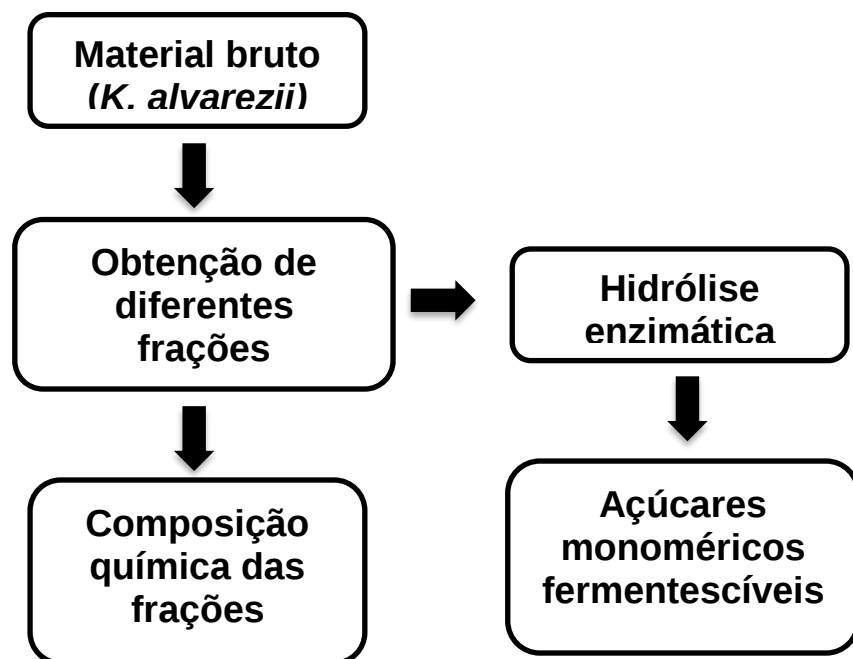


Figura 6. Fluxograma geral das etapas desenvolvidas no projeto.

4.1. Obtenção do material bruto e geração das frações de *K. alvarezii*

Para o presente estudo foram utilizadas 4 diferentes cepas da macroalga *K. alvarezii*. As cepas da macroalga foram obtidas em colaboração com o grupo de pesquisa do Instituto de Pesca da secretaria do governo do estado de São Paulo, Ubatuba-SP. Foram utilizadas as seguintes cepas da macroalga, como se segue: marrom, vermelha, verde e G11. As 4 diferentes cepas da macroalga *K. alvarezii* foram cultivadas no oceano atlântico no campo experimental na praia do

Itaguá, Ubatuba, SP, Brasil (coordenadas GPS 23°27'5,8"Sul; 45°02'49,3"Oeste) no Instituto de Pesca (Figura 7).



Figura 7. Sistema de cultivos experimental de *K. alvarezii* no oceano atlântico na praia do Itaguá, Ubatuba, SP, Brasil, (coordenadas GPS 23°27'5,8"Sul; 45°02'49,3"Oeste).

A estrutura utilizada para cultivar as cepas da macroalga consistiu de uma balsa ancorada na baía (11,13). A balsa ancorada de 9,0m x 2,5m (22,5m²) continha 3 módulos principais de 3,0m x 2,5m (7,5m²) munidos de tubos de policloroeteno (PVC) fechados em suas extremidades. Uma rede de linhas de nylon com largura de 60 mesh foi utilizada sob a balsa para evitar perda de brotos das cepas em estudo. Cada módulo principal foi dividido em 5 módulos secundários de 0,6m x 2,5m (1,5m²). Cada módulo secundário foi composto por uma linha de nylon de 2,5m que foi utilizada para amarrar as macroalgas de cada cepa em estudo que foram cultivadas (método conhecido como "TIE-TIE"). 10 brotos em crescimento vegetativo de cada cepa em estudo contendo cada uma aproximadamente 70g (dados em base úmida) foram previamente pesados e

amarrados em uma linha de nylon em um módulo secundário na superfície da água do mar, o que proporcionou uma densidade de 6,7 plantas por m² de cultivo. Os cultivos das cepas em estudo permaneceram na estrutura por 30 dias. Após 30 dias de cultivo as cepas em estudo foram retiradas da estrutura, misturadas e homogeneizadas.

4.1.1. Preparo da biomassa de K. alvarezii

A biomassa misturada e homogeneizada das 4 cepas de *K. alvarezii* foi seca a temperatura ambiente. A biomassa foi lavada com água destilada sob agitação em béquer de polipropileno de 10L por 45min na proporção de 100g (base seca) de biomassa de macroalga para 2,8L de água destilada. Após esse período a solução oriunda da biomassa foi removida por meio de uma peneira com malha de 1mm. A condutividade elétrica da solução foi monitorada (condutímetro portátil). A lavagem foi repetida até a solução de lavagem oriunda da biomassa indicar uma condutividade elétrica similar a água destilada. Após as lavagens a amostra foi seca novamente a temperatura ambiente. Esse material foi denominado de amostra não tratada.

4.1.2. Tratamento químico do material com hidróxido de potássio

A Figura 8 mostra um fluxograma geral das etapas envolvidas na obtenção das diferentes frações de *K. alvarezii*. Os detalhes de cada etapa são descritos a seguir.

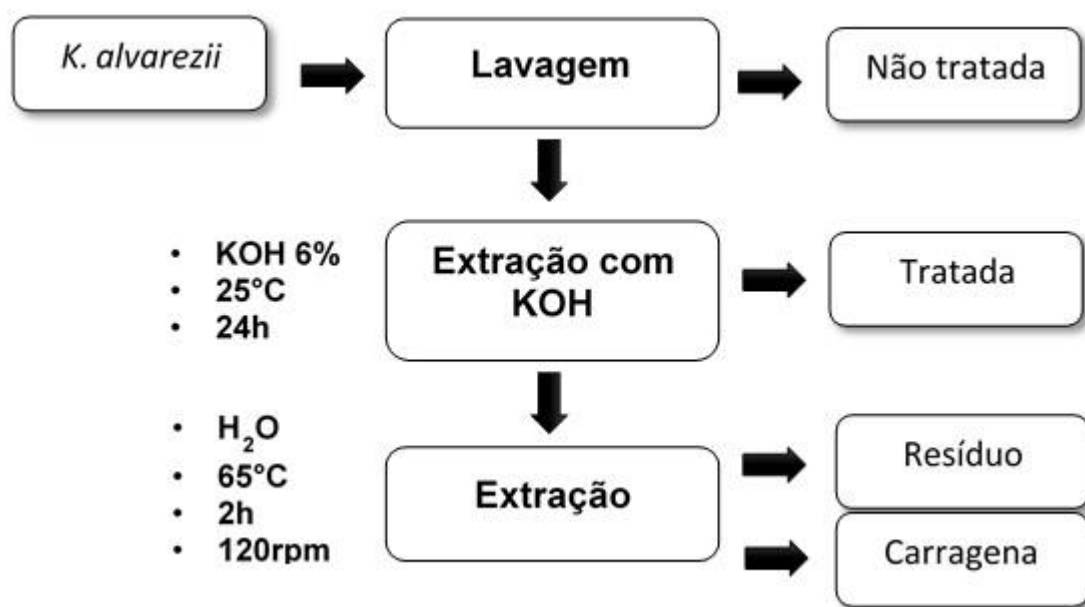


Figura 8. Fluxograma das etapas de obtenção das diferentes frações de *Kappaphycus alvarezii*.

Aproximadamente 35g (dados em base seca) de biomassa não tratada foram colocadas em um béquer de polipropileno de 4L contendo 100mL de solução de KOH 6% (massa/volume). O recipiente foi fechado e mantido a temperatura ambiente (25°C) por 24h. Após esse período a solução alcalina foi removida por meio de uma peneira com malha de 1mm e os mesmos recipientes contendo os fragmentos da macroalga ainda embebidos na solução alcalina foram fechados e expostos ao sol por 1 dia para o branqueamento. A biomassa após o branqueamento foi lavada durante 45min utilizando 285mL de água destilada por cada 100g (base seca) de biomassa (o processo foi repetido por 5 vezes) para neutralização do álcali e posteriormente secas em estufa a 40°C. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Essa biomassa foi denominada de macroalga tratada em solução alcalina a frio (ATF) (13,14). Foi calculado o rendimento da biomassa da macroalga tratada considerando a massa seca da biomassa da macroalga não tratada, com a que se iniciou o tratamento químico, como 100%.

4.1.3. Extração de carragena e obtenção do resíduo

Aproximadamente 4g (dados em base seca) de biomassa de macroalga tratada em solução alcalina a frio (ATF) foram colocadas em frascos Erlenmeyer de 2L e embebidas em 640 ml de água destilada. Posteriormente os frascos foram colocados em um shaker a 65°C com uma agitação de 120rpm por 2h. Ao final da extração a suspensão obtida foi filtrada em um sistema a vácuo composto por um Kitassato de 1L e um funil de büchner dotado de um filtro de nylon. Posteriormente a parte que passou pelo filtro foi seca em estufa a 40°C até a obtenção de massa constante. Essa biomassa foi denominada de carragena semi-refinada (13,14). O resíduo retido no filtro foi lavado com água destilada e seco em estufa a 40°C até a obtenção de massa constante. A carragena e o resíduo foram pesados. Os experimentos foram realizados em triplicata. Foram calculados os rendimentos de carragena semi-refinada e resíduo considerando a massa seca da biomassa da macroalga tratada, com a que se iniciou a extração, como 100%. Foram também calculados o rendimento global de carragena semi-refinada e resíduo considerando como 100% a massa seca da biomassa da macroalga não tratada com a que se iniciou o processo.

4.2. *Composição química das amostras de macroalgas*

As amostras geradas nos processamentos descritos nos itens 3.1.2 e 3.1.3 foram caracterizadas quimicamente. As amostras foram as seguintes, como se segue: (a) biomassa obtida após a lavagem com água a frio (não tratada), (b) biomassa obtida após o tratamento químico (tratada com KOH), (c) resíduo e (d) carragena semi-refinada. Uma carragena comercial (C1013-100G, Lot# SLBK3896V, Sigma) também foi caracterizada. Todas as amostras foram previamente moídas em moinho de facas (0,84 mm).

4.2.1. *Teor de cinzas*

Cadinhos de porcelana foram colocados em um forno de mufla a $575 \pm 25^{\circ}\text{C}$ por 180 minutos utilizando uma rampa de aquecimento com a seguinte programação (40):

- Aumentar a temperatura até 105°C
- Manter a 105°C por 12 minutos
- Aumentar até 250°C em intervalos de 10°C / minuto
- Manter a 250°C por 30 minutos
- Aumentar até 575°C em intervalos de 20°C / minutos
- Manter a 575°C por 180 minutos
- Deixar a temperatura cair até 105°C

Então, os cadinhos foram retirados do forno de mufla e colocados em um dessecador com sílica para o resfriamento a temperatura ambiente (25°C). Após

1h (aproximadamente) os cadinhos foram pesados. Posteriormente, foram pesados aproximadamente 1g (dados em base seca) das amostras, colocadas nos cadinhos e levadas ao forno de mufla novamente. O forno de mufla foi ligado e se utilizou a mesma rampa de aquecimento mostrada acima. Os cadinhos permaneceram no forno de mufla por 3h após a temperatura atingir $575 \pm 25^{\circ}\text{C}$. Após o término de 3h, os cadinhos foram mantidos no forno de mufla até a temperatura atingir aproximadamente 105°C . Os cadinhos foram retirados do forno de mufla e colocados em um dessecador munido com sílica para o resfriamento a temperatura ambiente (25°C). Após 1h (aproximadamente) os cadinhos foram pesados e a diferença entre os pesos resultou no teor de cinzas. Todos os experimentos foram realizados em triplicata (40).

4.2.2. Teores de carboidratos e compostos aromáticos insolúveis

As amostras foram hidrolisadas com ácido sulfúrico 72% (massa/massa) (9,41). Porções de cerca de 300mg (dados em base seca) das amostras foram tratadas com 3mL de ácido sulfúrico 72% (massa/massa) por 1h a 30°C . Em seguida, o conteúdo dos tubos de ensaio foi transferido, quantitativamente, para frascos Erlenmeyer de 250mL com auxílio de 79mL de água destilada. A mistura foi autoclavada por 1h, a 121°C , resfriada e filtrada em filtros de vidro sinterizados de porosidade número 3 (Schott, Alemanha) (previamente secos em estufa a 105°C por 2h, esfriados em dessecador munido com sílica a temperatura de 25°C e pesados). O material retido foi lavado, com 2 porções de 5mL de água, e seco

em estufa a 60°C por 12h. Posteriormente o material retido foi seco a 105°C por 2h, resfriado em dessecador munido com sílica a temperatura de 25°C e pesado. O material retido nos filtros de vidro sinterizados correspondeu aos aromáticos insolúveis. Para a detecção dos açúcares monoméricos uma pequena alíquota do filtrado foi passada através de membranas de 0,45µm e na sequência passado através de cartuchos do tipo SEP-PACK C₁₈ e injetados em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A análise cromatográfica foi feita, utilizando-se uma coluna BIORAD AMINEX HPX-87P, com água Milli-Q como eluente a 0,6 mL.min⁻¹ a 80°C e detecção por índice de refração a temperatura de 60°C (Shimadzu, modelo C- R7A), a fim de detectar glicose, galactose, xilose e manose nas amostras em estudo. As amostras também foram analisadas em uma coluna BIORAD AMINEX HPX-87H, com ácido sulfúrico 0,005M como eluente a um fluxo de 0,6 mL.min⁻¹ a 80°C e detecção por índice de refração a temperatura de 60°C. Nesta última coluna foram detectados e quantificados glicose, galactose, ácido fórmico e ácido levulínico nas amostras em estudo. Os experimentos foram realizados em triplicata. Para a quantificação foi elaborada uma curva de calibração com padrões autênticos de glicose (G1008.01.AG, Lot# 86333, Synth), galactose (G0625-100G, Lot# SLBJ2471V, Sigma), ácido fórmico (F0507-100ML, Lot# SHBF0916V, Sigma) e ácido levulínico (W262701-100G-K, Lot# MKBS8027V, Sigma).

Para o cálculo de massa de glucana nas amostras, a massa de hidroximetilfurfural (HMF) foi multiplicada pelo fator de conversão em glicose (1,429) e adicionada à massa de glicose previamente calculada. A massa total

de glicose foi multiplicada pelo fator de conversão de hidrólise ácida de glicose para glucana (0,9) e o resultado foi considerado como massa de glucana na amostra. Para o cálculo da massa de galactana foi realizado o seguinte procedimento: as massas de ácido fórmico e ácido levulínico foram multiplicadas pelo fator de conversão de ácido fórmico e ácido levulínico para anidrogactose (3,523 e 1,396, respectivamente). A massa de gactose foi multiplicada pelo fator de conversão de gactose para galactana (0,9). A massa de galactana oriunda da massa de gactose foi somada a massa de anidrogactose. A massa total foi considerada como a massa de galactana na amostra.

4.2.3. Teor de hidroximetilfurfural (HMF)

Para a detecção e quantificação de hidroximetilfurfural (HMF) utilizou-se o filtrado obtido após da hidrólise ácida das amostras em estudo. Para a detecção de HMF uma pequena alíquota do filtrado foi passada através de membranas de 0,45µm, o filtrado foi injetado em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Perkin-Elmer, modelo Flexar), equipado com uma coluna C₁₈ de 250mm de comprimento e 4mm de diâmetro externo (Hypersil; Thermo-Scientific) utilizando como eluente acetonitrila:água (1:8) com 1% (volume/volume) de ácido acético com um fluxo de 0,8 mL.min⁻¹. A análise foi realizada a 25°C. O HMF foi detectado a 276nm por meio de um detector UV-Visível. Os experimentos foram realizados em triplicata. Para os cálculos foi

elaborada uma curva de calibração com padrão autêntico de HMF (W501808-25G-K, Lot# STBD9762V, Sigma).

4.2.4. *Teor de proteínas*

Para a determinação de proteínas nas amostras em estudo foi utilizada a metodologia de Kjeldahl com modificações realizadas pelo NREL (18,42). Foram pesadas aproximadamente 200mg de amostra em tubos de ensaio, adicionados a 5mL de solução digestora (0,0208 mols de selenito de sódio; 0,1506 mols de sulfato de sódio; 4g de sulfato de cobre pentaidratado; 200mL de ácido sulfúrico concentrado e 175mL de água destilada) e deixadas em digestão a frio (25°C) por 12h. Após a digestão a frio, as amostras foram submetidas a digestão à quente em bloco digestor. A temperatura do bloco digestor foi monitorada através de uma rampa de aquecimento (50°C a cada 30min) até atingir a temperatura máxima de 350°C. Após a completa digestão das amostras foi realizada a etapa da destilação. Para isso, foi admitido ao sistema hidróxido de sódio 18M até neutralização do ácido sulfúrico nas amostras para, então iniciar-se o processo de destilação. No sistema de destilação foi colocado, em um frasco Erlenmeyer de 125mL, o volume de aproximadamente 10mL de solução indicadora de ácido bórico e a destilação chegou ao fim assim que o volume no frasco Erlenmeyer atingiu aproximadamente 20mL, então essa solução foi titulada com uma solução padronizada de ácido sulfúrico 0,025M. O teor de proteínas foi determinado utilizando um fator de

conversão de nitrogênio em proteínas de 6,25. Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.2.5. Teor de grupos sulfato

O conteúdo de grupos sulfato foi quantificado utilizando métodos de espectrofotometria modificados (14). Aproximadamente 0,05g (dados em base seca) de amostra moída foi pesada e colocada em tubos de ensaio. Um mililitro de solução de HCl 0,5N foi adicionada a cada tubo, os tubos foram tampados com papel de alumínio e autoclavados a 120°C por 1 hora a 1 atm de pressão. No fim da reação, a amostra foi transferida a um tubo Falcon de 15mL. Foi adicionada então água ao tubo para se obter um volume final de 10mL seguido de centrifugação a 7000xg por 10min. Assim, 2mL do sobrenadante, 18mL de água destilada e 2mL de HCl 0,5N foram colocados em um tubo de ensaio e agitado em vortex por alguns segundos. Em seguida 1mL de gelatina de BaCl₂ (Difco-Laboratories, Detroit, EUA) foram adicionados. Os tubos foram mantidos a 25°C por 30min com agitação em vortex e foram tomadas leituras em espectrofotômetro (Ultraspec 3100 Pro, Amersham Biosciences) a 550nm.

4.3. Determinação de proteínas totais em extratos enzimáticos

Todos os extratos enzimáticos utilizados foram dosados frente a presença de proteínas totais. Para a determinação foi utilizada a metodologia de Lowry modificada por Hartree (43). O princípio do método baseia-se em uma mistura

contendo molibdato, tungstato e ácido fosfórico, (reagente Folin-Ciocalteu), que sofre uma redução quando reage com proteínas, na presença do catalisador cobre (II), e produz um composto com absorção em 660nm. É um método bastante sensível e utiliza como reagentes as seguintes soluções: solução (a): carbonato de sódio 2% (massa/volume) em hidróxido de sódio 0,1N, Solução (b): tartarato de sódio e potássio 1% (massa/volume) em água destilada e solução (c): Sulfato de cobre 1% (massa/volume) em água destilada.

No momento da dosagem, as soluções a, b e c foram misturadas na proporção de 100:1:1, respectivamente. Alíquotas de 0,1mL de extrato enzimático previamente diluído em água destilada foram adicionadas em 2,5mL, contendo a mistura das soluções a, b e c (proporção 100:1:1, respectivamente). A mistura foi homogeneizada em vortex mantendo-a em repouso durante 15min e então foi adicionado à 0,25mL de Folin- Ciocalteu (F9252-500ML, Lot# BCBP1022V, Sigma-Aldrich) 1N, agitando-se em vortex novamente para completa homogeneização. Após 30min, foram realizadas leituras em 660nm em espectrofotômetro (Ultraspec 3100 Pro, Amersham Biosciences). Para a determinação quantitativa de proteínas foi construída uma curva de calibração utilizando soro de albumina bovina (SBA) como padrão de proteína bovina (1870. Lot# 831.354, Inlab). Os experimentos foram realizados em triplicata. Os dados foram expressos em mg de proteína por mL de extrato enzimático.

4.4. Determinação das atividades enzimáticas em extratos comerciais

A determinação das atividades enzimáticas foi realizada para 6 extratos comerciais, como se segue: Cellic CTec II (Novozymes), Celluclast (Novozymes), Cellulase from *Trichoderma* (Sigma), Pectinase (Sigma), Pectinex Ultra Clear (Novozymes), Pectinex Smash XXL (Novozymes). Também foi determinada a atividade enzimática dos extratos enzimáticos obtidos a partir do fungo *Aspergillus* sp. As seguintes determinações foram realizadas:

4.4.1. β -glicosidase

A atividade de β -glicosidase foi determinada segundo Yu *et al* (44), através da liberação de p-nitrofenol durante a hidrólise do reagente comercial p-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (pNPG) (N700G-1G, Lot# BCBK3820V, Sigma). Foi preparada uma solução de pNPG 0,1% (massa/volume) em tampão acetato de sódio 50mM pH 5,0 e uma alíquota de 0,8mL da solução foi adicionada à 0,2mL do extrato enzimático devidamente diluído e a mistura foi incubada a 50°C por 30min sem agitação. Após esse tempo, a reação foi interrompida pela adição de 2mL de bicarbonato de sódio 10% (massa/volume) e a absorbância foi medida em espectrofotômetro (Ultraspec 3100 Pro, Amersham Biosciences) a 410nm. O branco foi preparado da mesma forma, adicionando-se, no entanto, o bicarbonato de sódio antes do extrato enzimático. Os valores de absorbância foram convertidos em concentração de p-nitrofenol utilizando uma curva de calibração com padrão autêntico deste. Uma unidade de β -glicosidase foi definida como a

quantidade de enzima necessária para liberar um μmol de p-nitrofenol por minuto, a 50°C.

4.4.2. β -galactosidase

A atividade de β -galactosidase foi determinada com um procedimento semelhante ao utilizado para atividade de β -glicosidase, através da liberação de p-nitrofenol durante a hidrólise do reagente comercial p-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (N1252-5G, Lot# 107K5315, Sigma). Uma unidade de β -galactosidase foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar um μmol de p-nitrofenol por minuto, a 50°C.

4.4.3. Endoglucanase

A atividade de endo-1,4- β -glucanase foi determinada segundo Tanaka *et al* (45). O método consiste na hidrólise de carboximetilcelulose, resultando na formação de extremidades redutoras, detectadas pelo método do ácido dinitrossalicílico – DNS (46). Uma alíquota de 0,9mL de solução composta por carboximetilcelulose (C4146-100G, Lot# SLBB3991V, Sigma) 0,44% (massa/volume, dissolvida em tampão acetato de sódio 50mM pH 5,5), foi adicionada à 0,1mL do extrato enzimático devidamente diluído e a mistura foi incubada a 50°C por 60min. A reação foi interrompida pela adição de 1,5mL de DNS. Os tubos foram fervidos por 5min e a leitura foi feita em espectrofotômetro (Ultraspec 3100 Pro, Amersham Biosciences) a 540nm. Um controle foi feito

adicionando DNS antes do extrato enzimático. O branco foi feito adicionando água destilada no lugar do extrato enzimático. Os valores de absorbância foram convertidos em concentração de glicose utilizando uma curva de calibração com padrão autêntico de glicose (G1008.01.AG, Lot# 86333, Synth). Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar um μmol de açúcares redutores por minuto, a 50°C.

4.4.4. *Exoglucanase*

A atividade de exo-1,4- β -glucanase foi determinada segundo Tanaka *et al* (45). O método consiste na hidrólise de avicel, resultando na formação de extremidades redutoras, detectadas pelo método do ácido dinitrossalicílico – DNS (46). Uma alíquota de 0,9mL de suspensão composta por avicel (11365-1KG, Sigma) 0,5% (massa/volume) em tampão acetato de sódio 50mM pH 5,0, foi adicionada à 0,1mL do extrato enzimático devidamente diluído e a mistura foi incubada a 50°C por 120min. A reação foi interrompida pela adição de 1,5mL de DNS. Os tubos foram fervidos por 5min, seguido de centrifugação (Excelsa baby I, FANEM) da suspensão obtida. O sobrenadante foi recuperado e analisado em espectrofotômetro (Ultraspec 3100 Pro, Amersham Biosciences) a 540nm. Um controle foi feito adicionando DNS antes do extrato enzimático. O branco foi feito adicionando água destilada no lugar do extrato enzimático. Os valores de absorbância foram convertidos em concentração de glicose utilizando uma curva de calibração com padrão autêntico de glicose (G1008.01.AG, Lot# 86333,

Synth). Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar um μmol de açúcares redutores por minuto, a 50°C .

4.4.5. *Celulases totais*

A atividade de celulases totais foi determinada segundo a metodologia descrita por Ghose (47). A reação enzimática foi conduzida em tubos de ensaio de 30mL contendo 1mL de tampão acetato de sódio 50mM, pH 4,8, uma tira de papel de filtro 1cm x 5cm (aproximadamente 50mg) e 0,5mL de extrato enzimático, diluído nas seguintes proporções: 1:100, 1:200, 1:300 e 1:400. Os tubos de ensaios foram aquecidos em banho maria a 50°C por 60min. Após esse tempo, adicionou-se 3mL de DNS e a mistura foi fervida por 5min (46). Foram adicionados então 20mL de água destilada em cada tubo e agitou-se a mistura em vortex para sua completa homogeneização. A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro (Ultraspec 3100 Pro, Amersham Biosciences) a 540nm. Foram feitos controles para cada diluição, adicionando o reagente de DNS antes do extrato enzimático. Para o branco foi adicionada água destilada no lugar da amostra. Os valores de absorbância foram convertidos em massa de glicose através de curva de calibração com padrão autêntico de glicose e usados para construir um gráfico correlacionando o inverso das diluições do extrato enzimático versus a quantidade de glicose liberada. A equação da reta obtida foi usada para determinar o valor da diluição da enzima que correspondesse a liberação de 2,0mg de glicose. O valor de 0,37 foi dividido por esse valor de

diluição e o resultado obtido foi definido como atividade de celulasas totais do extrato em FPU.mL⁻¹. Uma curva de calibração foi usada no cálculo da atividade de FPU e foi preparada a partir de uma solução padrão de glicose (G1008.01.AG, Lot# 86333, Synth) de 10 mg.mL⁻¹. Alíquotas de 1mL dessa solução foram adicionados a tubos de ensaio de 30mL com diferentes volumes de tampão acetato de sódio 50mM, pH 4,8 (0,5, 1,0, 2,0 e 4,0) o que culminou nas seguintes concentrações de glicose (6,7, 5,0, 3,3 e 2,0 mg.mL⁻¹, respectivamente). De cada solução obtida foram adicionados 0,5mL de padrão, 1mL de tampão acetato de sódio 50mM, pH 4,8, 3mL de DNS e fervidos por 5min. Após a etapa de fervura foram adicionados então 20mL de água destilada em cada tubo, agitando-se a mistura em vortex para completa homogeneização. A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro (Ultraspec 3100 Pro, Amersham Biosciences) a 540nm.

Para os extratos enzimáticos obtidos a partir do fungo *Aspergillus* sp., não se utilizou o método de determinação de celulasas totais descrito acima, pois os extratos obtidos através dos cultivos de *Aspergillus* sp. não continham um nível suficiente de atividade de celulasas, assim não sendo possível detectar atividades em diferentes diluições dos extratos enzimáticos. Desta forma, a reação enzimática foi conduzida em tubos de ensaio de 30mL contendo 1,2mL de tampão acetato de sódio 50mM, pH 4,8, uma tira de papel de filtro 1cm x 5cm (aproximadamente 50mg) e 0,3mL de extrato enzimático sem diluição prévia. Foi feito um controle adicionando o reagente de DNS antes do extrato enzimático.

Para o branco foi adicionada água destilada no lugar da amostra. Uma nova curva de calibração foi construída considerando as condições do método modificado.

4.4.6. Galactanases totais

As atividades de galactanases totais foram determinadas utilizando um volume de 0,9mL de suspensão de carragena comercial 0,5% (massa/volume) (C1013-100G, Lot# SLBK3896V, Sigma) como substrato em tampão acetato de sódio 50mM (pH 5,5) adicionado à 0,1mL de extrato enzimático. A mistura foi incubada a 50°C por 60min. A reação foi interrompida pela adição de 1,5mL de DNS e os tubos foram fervidos por 5min (46). A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Ultraspec 3100 Pro, Amersham Biosciences) em comprimento de onda de 540nm. Os valores de absorbância foram convertidos em concentração de galactose utilizando uma curva de calibração com padrão autêntico deste (G0625-100G, Lot# SLBJ2471V, Sigma). Um controle foi feito adicionando o DNS antes do extrato enzimático. Para o branco foi adicionada água destilada no lugar da amostra.

4.5. Isolamento de fungo e obtenção de extratos enzimáticos a partir do mesmo.

4.5.1. Isolamento de fungo

Foi observado o crescimento fúngico na superfície da borra do café. Com o auxílio de uma alça estéril e dentro de uma câmara de fluxo laminar, foi

transferido o fungo para uma placa de Petri contendo meio composto de 2% ágar (massa/volume) e 4% de farinha de aveia (Quaker®) (massa/volume). Após 3 dias de crescimento, se fez um isolamento do fungo que apresentou maior crescimento e liberação de conídios. O fungo isolado foi transferido para meio ágar – aveia em tubo inclinado. Após a realização de repiques do fungo isolado foi possível verificar a pureza da cultura através de análise microscópica. O fungo isolado foi transferido para placa de Petri (meio ágar – aveia) e após 5 dias de crescimento foram retirados conidióforos (com ajuda de uma fita adesiva transparente Durex®) e transferidos para à uma lâmina microscópica. Foi utilizado um microscópio óptico OLYMPUS BX40 com objetivas de 10x e 40x para identificação morfológica do fungo em estudo.

4.5.2. Preparação e obtenção do inóculo

A reativação e obtenção do pré-inóculo do fungo *Aspergillus* sp (previamente identificado como descrito no item 4.5.1) foi realizada através de repiques em tubos de ensaio contendo meio inclinado de 2% de ágar (massa/volume) e 4% de farinha de aveia (Quaker®) (massa/volume). A reativação do fungo *Aspergillus* sp. foi realizada através de repique de um tubo de ensaio contendo o fungo com ajuda de uma alça de platina flambada. Esse procedimento foi realizado em condições assépticas em câmara de fluxo laminar. Os tubos de ensaio contendo os cultivos foram fechados com rolha de algodão e mantidos em incubadora a 25°C. Após quatro dias de crescimento os tubos foram

armazenados a 4°C. A manutenção do fungo foi realizada através de repiques periódicos (aproximadamente cada 3 meses).

4.5.3. *Preparo dos cultivos e inoculação do fungo*

Para a obtenção do fungo *Aspergillus* sp., foram adicionados 10mL de água autoclavada em tubos de cultivo do fungo (item 4.5.1) a temperatura de 25°C de onde foi retirado um volume de 1mL de suspensão (5×10^7 células.mL⁻¹) (48). O volume de 1mL de suspensão de *Aspergillus* sp. foi adicionado em frascos Erlenmeyer de 125mL contendo 25mL de meio líquido com 1% (massa/volume) de diferentes fontes de carbono (pó de bagaço de cana-de-açúcar e goma de alfarroba (G0753-500G, Lot# SLBL2324V, Sigma)) previamente autoclavada a 120°C por 15min (38). Foram utilizados dois meios líquidos, sendo o primeiro baseado segundo reportado por Vogel (49) adicionando bagaço de cana como fonte de carbono, e o segundo baseado no reportado por Araújo e Ward (38) que foi adicionado à goma de alfarroba como fonte de carbono. O meio Vogel é composto por sais de Vogel, biotina e água, como mostra a Tabela 3 a seguir.

Tabela 3. Composição do meio Vogel (49).

Solução traços	
Composto	Quantidade
Ácido cítrico	0,5g
ZnSO ₄ .H ₂ O	0,5g
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ .6H ₂ O	0,1g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025g
MnSO ₄ .H ₂ O	0,005g
H ₃ BO ₃	0,005g
NaMoO ₄ .H ₂ O	0,005g
CHCl ₃	0,1mL
H ₂ O destilada	10mL

Sais de Vogel	
Composto	Quantidade
KH ₂ PO ₄	2,5g
NH ₄ NO ₃	1,0g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,1g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,05g
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	1,5g
Solução de traços	0,05mL
CHCl ₃	0,02mL
H ₂ O destilada	10mL

Meio Vogel	
Composto	Quantidade
Sais de Vogel	2mL
Biotina	2μL
H ₂ O destilada	100mL
Ajustar pH a 6,0	

A composição do meio descrito por Araújo e Ward (38) é apresentada na Tabela

4.

Tabela 4. Composição do meio descrito por Araújo e Ward (38).

Para 100mL de volume final	
Composto	Quantidade
KH ₂ PO ₄	0,2g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,03g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,03g
Goma de alfarrobo	1g
NaNO ₃	0,2g
Extrato de batata (20%v/v)	20mL
H ₂ O	Avolumar até 100mL
Ajustar pH a 6,0	

O extrato de batata utilizado na preparação do meio (20% volume/volume) foi preparado através da fervura de 300g de batata previamente cortadas na forma de cubos em 500mL de água destilada durante 1h. O extrato foi recuperado por filtração utilizando um filtro de nylon e avolumado até 1 L com água destilada.

Os cultivos foram incubados a 35°C com agitação constante (120rpm) em uma mesa incubadora (Innova 40R, New Brunswick Scientific) com movimento orbital. Foram realizados ensaios individuais com 2, 4, 6, 8 e 10 dias de cultivo. Os micélios resultantes das culturas agitadas foram separados por filtração em funil de büchner dotado de um papel de filtro e auxílio de uma bomba de vácuo. O filtrado (meio de cultura livre de células) foi usado como um preparado de enzimas extracelulares. O ensaio onde se obteve o extrato enzimático que culminou em maior atividade de galactanases totais, foi repetido nas mesmas condições experimentais (45 frascos Erlenmeyer de 125mL contendo 25mL) com

o intuito de obter um volume de extrato maior. 1L do extrato enzimático obtido então foi liofilizado (Modulyod Freeze Dryer, Thermo Electron Corporatio) e redissolvido em 10mL de água Milli-Q.

4.6. Hidrólise enzimática das frações geradas

As amostras em estudo foram hidrolisadas individualmente com os extratos comerciais de celulasas (Cellic CTec II, Celluclast, Cellulase from Trichoderma) e pectinases (Pectinase, Pectinex Ultra Clear, Pectinex Smash XXL) utilizando 10 FPU.g⁻¹ de substrato (celulasas) e 20 UI.g⁻¹ de substrato (galactanases). Posteriormente foram realizados ensaios de hidrólise utilizando simultaneamente os extratos enzimáticos Cellic CTec II e Pectinex Smash XXL.

Foram também realizados ensaios de hidrólise enzimática com o extrato enzimático obtido a partir de *Aspergillus* sp. concentrado utilizando 0,02 UI.g⁻¹ de substrato (galactanases). Posteriormente foram realizados ensaios de hidrólise utilizando simultaneamente o extrato enzimático comercial Cellic CTec II (10 FPU.g⁻¹ de substrato) e o extrato obtido a partir de *Aspergillus* sp. concentrado (0,02 UI.g⁻¹ de substrato).

Finalmente foi realizada uma hidrólise enzimática utilizando o extrato enzimático comercial Cellic CTec II com uma carga enzimática de 100 FPU.g⁻¹ de substrato. Todas as reações foram realizadas a 2% (massa/volume) de consistência em tampão acetato de sódio 50mM, pH 4,8 sob agitação de 120rpm a 45°C por 72h em shaker (Gyromax 737R, Amerex Instruments). Um branco sem adição de enzimas também foi realizado a fim de se detectar um efeito

abiótico ou mesmo a presença de açúcares livres nas amostras. Durante o processo de sacarificação enzimática as reações foram monitoradas em intervalos de 4, 8, 24, 48, e 72h. A amostragem foi feita retirando-se uma alíquota de 0,5mL do sobrenadante, a qual foi fervida durante 10min para a inativação das enzimas e posteriormente congelada e estocada. Para a determinação e quantificação dos açúcares resultantes da hidrólise enzimática, as alíquotas foram descongeladas, centrifugadas e o sobrenadante foi previamente diluído e analisado por um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (item 3.4.3). Os extratos enzimáticos (na mesma diluição das hidrólises enzimáticas dos substratos) também foram analisados por CLAE a fim de detectar a presença de açúcares livres. Foram calculadas as concentrações de glicose e galactose no hidrolisado enzimático e nos extratos enzimáticos. A partir dos dados de composição química e dos fatores de hidrólise enzimática (0,9, ambos para glicose e galactose) foram calculadas as porcentagens de conversão de glucana em glicose e de galactana em galactose. Para o cálculo, também foram previamente descontadas as massas de glicose e galactose presentes nos extratos enzimáticos utilizados em cada reação.

4.7. Tratamento ácido

A partir dos experimentos de hidrólise enzimática foi selecionado o ensaio onde se obteve um hidrolisado com maiores conversões de glucana em glicose e galactana em galactose. O ensaio selecionado foi repetido e, ao final das 72h de hidrólise enzimática, foi realizado um tratamento ácido em condições brandas

com o intuito de aumentar a conversão de galactana presente no resíduo de *K. alvarezii*. Diferentes tempos, concentrações de ácido e temperaturas foram testadas para a otimização do tratamento utilizando a técnica de planejamento estatístico fatorial completo 2^3 (50), como mostra a Tabela 6. A matriz do planejamento fatorial completo 2^3 com triplicata no ponto central está mostrada na Tabela 6. Os níveis dos fatores utilizados no planejamento estão mostrados na Tabela 5, onde (-1) significa o menor nível, (+1) significa o maior nível e (0) significa o ponto central.

Tabela 5. Níveis dos fatores utilizados no planejamento fatorial completo 2^3 com ponto central.

Fatores	Siglas	Níveis		
		(-1)	(0)	(+1)
Temperatura (°C)	A	60	70	80
Tempo (minutos)	B	30	60	90
Concentração do ácido (%)	C	0,5	1	2

Tabela 6. Matriz de planejamento referente aos fatores avaliados no planejamento fatorial completo 2^3 com triplicata no ponto central.

Níveis codificados das variáveis				Níveis reais das variáveis		
Exp	A	B	C	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Concentração (massa/massa) (%)
1	-	-	-	60	30	0,5
2	+	-	-	80	30	0,5
3	-	+	-	60	90	0,5
4	+	+	-	80	90	0,5
5	-	-	+	60	30	2
6	+	-	+	80	30	2
7	-	+	+	60	90	2
8	+	+	+	80	90	2
9	0	0	0	70	60	1
10	0	0	0	70	60	1
11	0	0	0	70	60	1

A hidrólise enzimática foi realizada com uma consistência de 2%, utilizando 50mg (dados em base seca) de resíduo em solução de 2,5mL composta de tampão acetato de sódio 50mM pH 4,8 e extrato enzimático comercial Cellic CTec II com uma carga enzimática de 100 FPU.g⁻¹ de substrato. A reação foi realizada sob agitação a 120rpm e 45°C em shaker (Gyromax 737R, Amerex Instruments). Imediatamente após as 72h de hidrólise enzimática, iniciou-se o tratamento ácido adicionando a cada tubo Falcon uma alíquota de 0,166mL de ácido sulfúrico em concentrações de 8%, 16% e 32% (massa/massa) obtendo-se um volume final de 2,66mL e concentrações finais de 0,5%, 1% e 2% (massa/volume) de ácido sulfúrico nas suspensões contidas nos tubos Falcon. Os experimentos foram realizados às temperaturas e tempos indicados na Tabela 6.

5. Resultados e Discussão

5.1. Obtenção e rendimento das frações de macroalga *K. alvarezii*.

A biomassa não tratada de *K. alvarezii* foi submetida a processos de obtenção de carragena semi-refinada (13,14). O processo de obtenção de carragena semi-refinada a partir da biomassa não tratada de *K. alvarezii* gerou mais três frações, como se segue: biomassa tratada com KOH, resíduo e carragena semi-refinada (Figura 9).

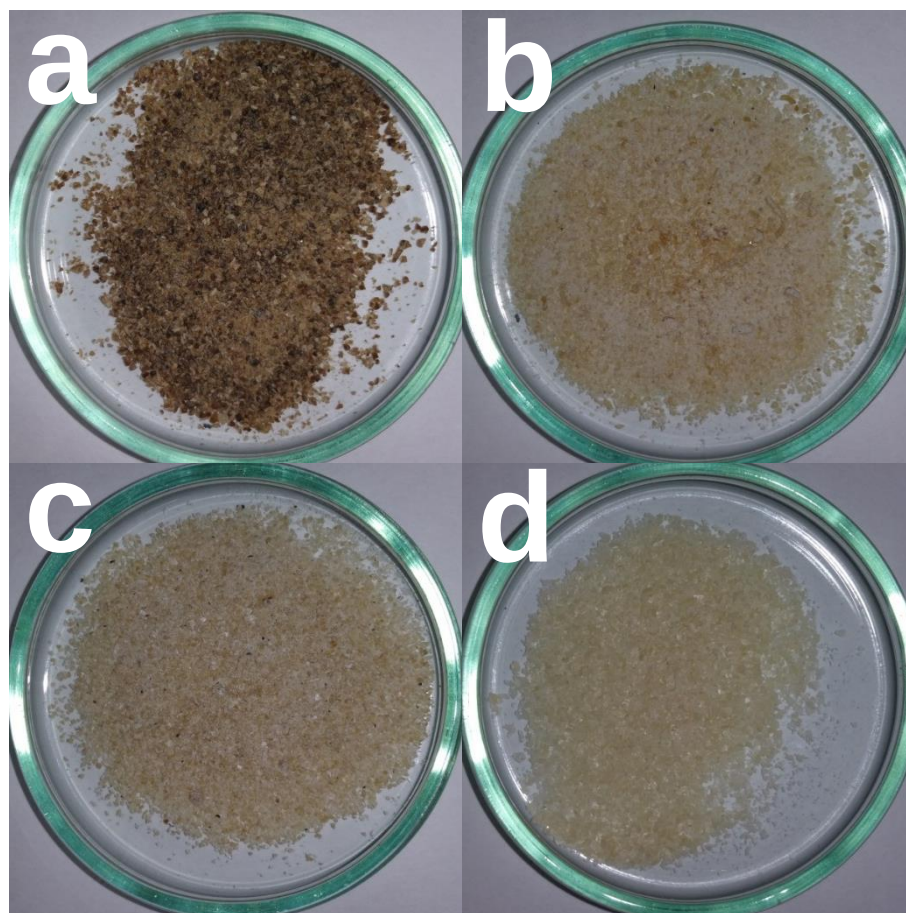


Figura 9. Diferentes frações de *K. alvarezii*. (a) Material não tratado. (b) Material tratado com KOH. (c) Resíduo. (d) Carragena semi-refinada.

O rendimento do tratamento químico com KOH sob a biomassa não tratada de *K. alvarezii* foi de 72,4% (%massa/massa) (dados em base seca) (Tabela 7). A extração com água à quente sob a biomassa tratada com KOH gerou mais duas frações: o resíduo (fração insolúvel) o qual o rendimento foi de 26,6% (%massa/massa) (dados em base seca) e a carragena semi-refinada (fração líquida) o qual o rendimento foi de 64,5% (%massa/massa) (dados em base seca) (Tabela 7). Houve uma perda de aproximadamente 8,9% durante o processo de extração, pois não foi possível recuperar parte do material que ficou no filtro.

Tabela 7. Rendimento da biomassa de *K. alvarezii* após o tratamento com KOH e obtenção do resíduo e carragena semi-refinada. Teores apresentados em gramas/100 gramas de material original e tratado com KOH (dados em base seca).

Amostras	Rendimento (%)
	(g/100g de biomassa não tratada)
Não tratada	100
Tratada com KOH	72,4 ± 6,9
Amostras	Rendimento (%)
	(g/100g de biomassa tratada com KOH)
Tratada com KOH	100
Resíduo	26,6 ± 2,6
Carragena semi-refinada	64,5 ± 1,2

Todos os dados apresentados são os valores médios seguidos pelo desvio padrão amostral.

Os rendimentos globais obtidos a partir do resíduo e da carragena semi-refinada oriundos da amostra não tratada foram de 19,2% (%massa/massa) e 46,8% (%massa/massa), respectivamente. O rendimento global de carragena foi superior ao reportado na literatura (20 – 35%) (13,14).

5.2. Avaliação da composição química das frações em estudo

Para a avaliação da composição química das frações obtidas no presente estudo foi utilizada a metodologia de hidrólise ácida para materiais lignocelulósicos (9,41). Após as etapas de hidrólise ácida foram analisados os teores de açúcares monoméricos presentes nos hidrolisados previamente obtidos. Além disso, também foram analisados os teores de hidroximetilfurfural (HMF), ácido fórmico e ácido levulínico nos hidrolisados previamente obtidos, pois esses compostos são derivados da oxidação de açúcares em meio ácido (51).

Previamente as análises de açúcares monoméricos e seus derivados em meio ácido foram testadas duas colunas cromatográficas (CLAE) distintas, como se segue: HPX-87P (específica para açúcares) e a HPX-87H (específica para ácidos orgânicos). A Figura 10a mostra o cromatograma típico obtido quando foi utilizada a coluna HPX-87H para a eluição dos seguintes padrões autênticos, com os seus respectivos tempos de retenção: glicose (9,46min), galactose (9,97min), ácido fórmico (13,8min) e ácido levulínico (14,67min). O cromatograma mostra um perfil de separação dos padrões testados com uma boa resolução. A Figura 10b mostra o cromatograma típico obtido quando foi utilizada a coluna HPX-87P para a eluição dos seguintes padrões autênticos, com os seus respectivos tempos de retenção: celobiose (10,07min), glicose (12,25min), xilose (13,29min), galactose (14,09min) e manose (16,27min). O cromatograma também mostra um perfil de separação dos padrões testados com uma boa resolução.

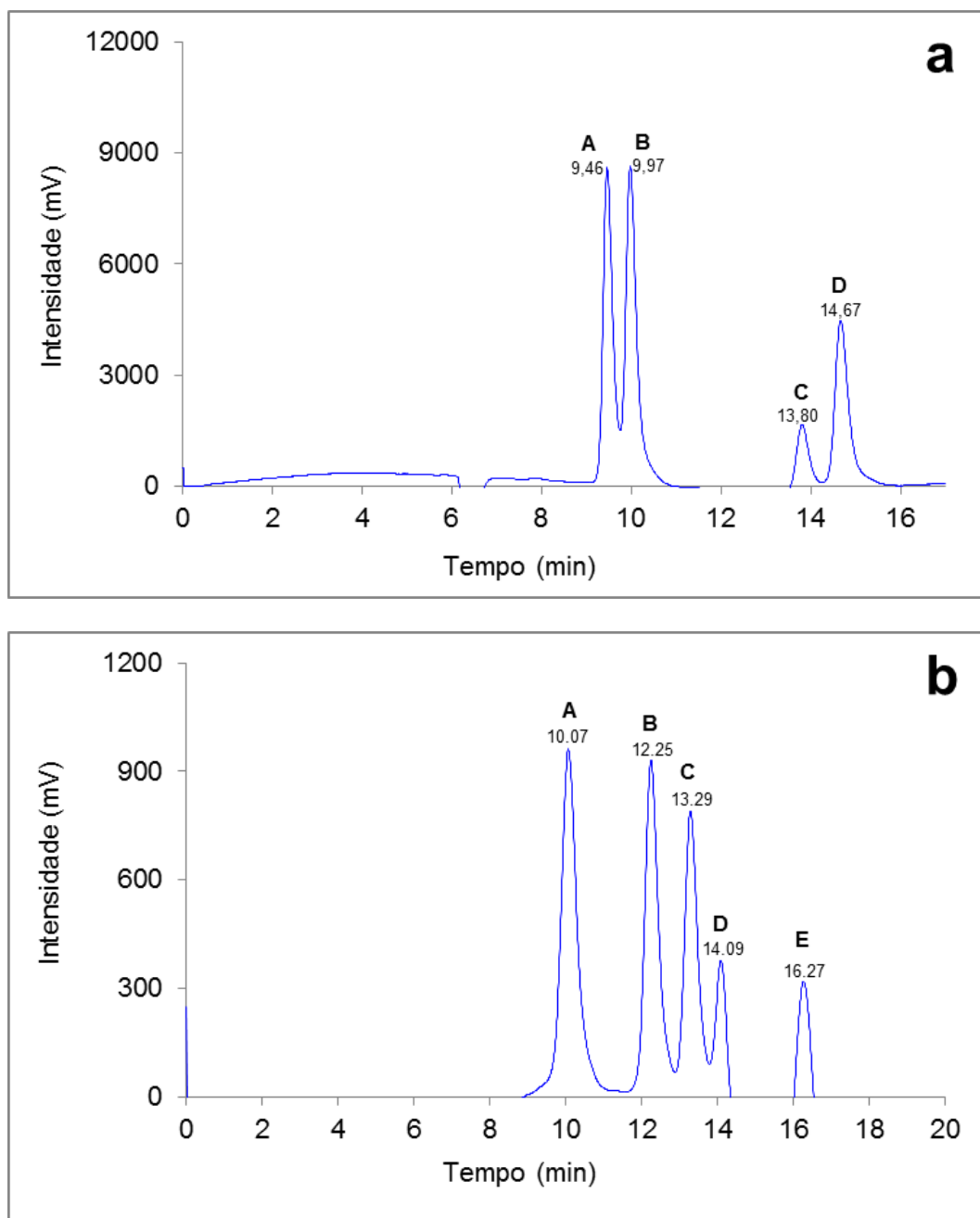


Figura 10. (a) Cromatograma de padrões autênticos de (A) glicose, (B) galactose, (C) ácido fórmico e (D) ácido levulínico para a coluna HPX-87H. (b) Cromatograma de padrões autênticos de (A) celobiose, (B) glicose, (C) xilose, (D) galactose e (E) manose para a coluna HPX-87P.

A Figura 11a apresenta o perfil do cromatograma do hidrolisado ácido da fração do resíduo quando foi utilizada a coluna HPX-87H. Com base nos tempos de retenção dos padrões apresentados na Figura 11a podemos confirmar a presença de glicose, ácido fórmico e ácido levulínico na amostra. Entretanto, quando se utiliza a coluna HPX-87H, os açúcares galactose, xilose e manose coeluem em um mesmo tempo de retenção (9,97min). Assim, por esse motivo foi necessário analisar o hidrolisado ácido utilizando a coluna HPX-87P, a qual permite separar os açúcares monoméricos galactose, xilose e manose (Figura 10b).

A Figura 11b apresenta o perfil do cromatograma do hidrolisado ácido da fração do resíduo obtido com a coluna HPX-87P. Os picos confirmam a presença de galactose e ausência de xilose e manose na presente amostra. Desta forma, podemos considerar que o pico mostrado no tempo de retenção de 9,97min na Figura 11a corresponde somente à molécula de galactose. O cromatograma obtido com a utilização da coluna HPX-87P mostrou uma linha base crescente ao longo do tempo de análise (Figura 11b). Além disso, o tempo de análise de glicose e galactose para a coluna HPX-87P (25min) foi superior quando comparado com o da coluna HPX-87H (11min). Outra vantagem da utilização da coluna HPX-87H foi a quantificação dos ácidos fórmico e levulínico na mesma análise, mantendo-se um tempo máximo de 15min de análise. Assim, optou-se pela utilização da coluna HPX-87H para a quantificação de açúcares monoméricos e seus derivados.

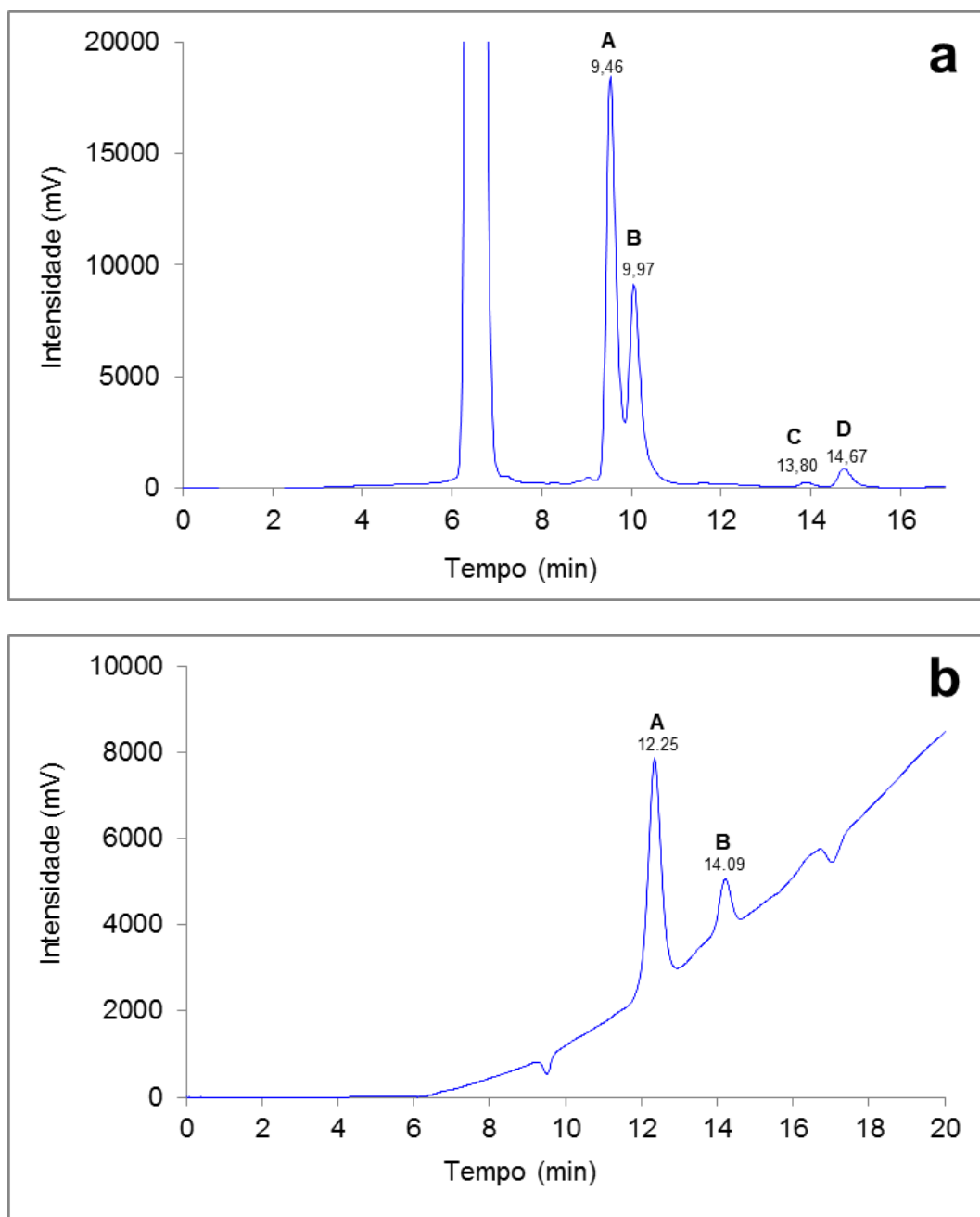


Figura 11. Cromatogramas do hidrolisado ácido da fração do resíduo. (a) Tempo de retenção de (A) glicose, (B) galactose, (C) ácido fórmico e (D) ácido levulínico utilizando a coluna HPX-87H. (b) Tempo de retenção de (A) glicose e (B) galactose utilizando a coluna HPX-87P.

A Tabela 8 apresenta os teores dos derivados de açúcares em meio ácido das amostras em estudo. A amostra não tratada, tratada com KOH, o resíduo, a carragena semi-refinada e a carragena comercial mostraram teores de 2,5%, 1,2%, 2,3%, 4,3% e 3,4% (HMF), 3,2%, 3,5%, 2,5%, 4,5% e 3,9% (ácido fórmico) e 5,2%, 6,1%, 4,1%, 8,1% e 6,6% (ácido levulínico), respectivamente (Tabela 8). A quantidade de HMF produzida pelo tratamento ácido na fração não tratada foi similar à reportada na literatura para biomassa lignocelulósica submetida ao mesmo tratamento (52). Os dados indicaram que as carragenas semi-refinada e comercial foram mais suscetíveis a oxidação em meio ácido, mostrando teores maiores de HMF quando comparado as amostras não tratada, tratada com KOH e o resíduo. A fração de carragena semi-refinada e carragena comercial são mais ricas em galactana e conseqüentemente contém mais anidrogactose, que é uma molécula menos estável em meio ácido (51).

Tabela 8. Teores de hidroximetilfurfural (HMF), ácido fórmico e ácido levulínico nas frações não tratada, tratada com KOH, resíduo e carragena semi-refinada. Teores apresentados em gramas/100 gramas de material bruto (dados em base seca).

Amostras	HMF (%)	Ácido Fórmico (%)	Ácido Levulínico (%)
Não tratada	2,5 ± 0,1	3,2 ± 0,5	5,2 ± 1,3
Tratada com KOH	1,2 ± 0,2	3,5 ± 0,3	6,1 ± 0,9
Resíduo	2,3 ± 0,1	2,5 ± 0,2	4,1 ± 0,9
Carragena semi-refinada	4,3 ± 0,1	4,5 ± 0,1	8,1 ± 1,0
Carragena comercial	3,4 ± 0,1	3,9 ± 0,4	6,6 ± 1,3

Todos os dados apresentados são os valores médios seguidos pelo desvio padrão amostral.

As Tabelas 9 e 10 apresentam a composição química das diferentes frações de *K. alvarezii* (amostra não tratada, tratada com KOH, resíduo, carragena semi-refinada e carragena comercial). Além disso, as Tabelas 9 e 10 também mostram a composição química em relação ao material de partida após aplicar um balanço de massa. Para a elaboração das Tabelas 9 e 10 foram escolhidos os principais componentes encontrados na biomassa em estudo, como se segue: galactanas, glucanas, cinzas, proteínas, aromáticos insolúveis e grupos sulfato. Os aromáticos solúveis não foram quantificados, pois o espectro ultravioleta de moléculas de aminoácidos oriundas de proteínas das biomassas em estudo e a formação de HMF em meio ácido pode se sobrepor com as moléculas dos aromáticos solúveis (52).

As amostras não tratada e tratada com KOH (componentes brutos) mostraram teores de galactana (44,8% e 41,5%), glucanas (12,4% e 13,4%), cinzas (15,8% e 14,9%), proteínas (2,7% e 0,6%), aromáticos insolúveis (4,0% e 2,4%) e grupos sulfato (12,6% e 13,8%), respectivamente (Tabela 9). A soma dos componentes das amostras não tratada e tratada com KOH foram de 98,5% e 85,5%, respectivamente (Tabela 9). O teor de carboidratos totais na fração não tratada de *K. alvarezii* (soma de galactanas + glucanas) foi de 57,2%, valor similar aos reportados por Abd-Rahim *et al* para *K. alvarezii* (59,6%) (53) e Meinita *et al* (19) para diferentes cepas de *K. alvarezii* (55,4% a 78,3%). Entretanto, esses teores de carboidratos totais em *K. alvarezii* foram inferiores ao reportado para *Gelidium amanssi* (macroalga vermelha) que foi de aproximadamente 75% (6). O segundo maior componente das frações foram as cinzas (Tabela 9). O teor de

cinzas na fração não tratada (15,8%) ficou dentro do patamar reportado na literatura para *K. alvarezii* (entre 12,6% e 19,5%) (18,50). Porém, maior que o reportado para *Gelidium amanssi* (entre 3,3% e 8,6%) (6). O teor de proteínas na fração não tratada foi de 2,7%, o que foi similar ao reportado na literatura para cepas da mesma espécie (entre 2,3% e 5,7%) (19,53).

O balanço de massa é necessário para compararmos o material tratado com KOH diretamente com o material não tratado (original). Os teores de galactanas, glucanas, cinzas, proteínas, aromáticos insolúveis e grupos sulfato foram reduzidos na biomassa tratada com KOH quando comparado com a biomassa não tratada em 33,0%, 21,8%, 31,6%, 85,2%, 57,5% e 20,6%, respectivamente (Tabela 9).

Tabela 9. Composição química e rendimento da fração não tratada e tratada com KOH. Teores apresentados em gramas/100 gramas de material bruto e original (dados em base seca).

Componentes da biomassa (g/100g de material bruto)								
Amostras	Rendimento (%)	Galactanas (%)	Glucanas (%)	Cinzas (%)	Proteínas (%)	Aromático insolúveis (%)	Grupos sulfato (%)	Soma (%)
Não tratada	100	44,8 ± 3,4	12,4 ± 1,9	15,8 ± 0,1	2,7 ± 0,4	4,0 ± 1,1	12,6 ± 0,6	98,5 ± 4,2
Tratada com KOH	72,4 ± ,9	41,5 ± 0,9	13,4 ± 1,7	14,9 ± 0,2	0,6 ± 0,4	2,4 ± 0,1	13,8 ± 0,4	85,5 ± 2,1
Componentes da biomassa (g/100g de material original)								
Amostras	Rendimento (%)	Galactanas (%)	Glucanas (%)	Cinzas (%)	Proteínas (%)	Aromático insolúveis (%)	Grupos sulfato (%)	Soma (%)
Não tratada	100	44,8 ± 3,4	12,4 ± 1,9	15,8 ± 0,1	2,7 ± 0,4	4,0 ± 1,1	12,6 ± 0,6	98,5 ± 4,2
Tratada com KOH	72,4 ± 6,9	30,0 ± 0,9	9,7 ± 1,7	10,8 ± 0,2	0,4 ± 0,4	1,7 ± 0,1	10,0 ± 0,4	61,9 ± 2,1

A amostra não tratada apresentou um teor de lipídios de 5,2 ± 1,7 (g/100g de material bruto). Não foi detectado lipídeos na amostra tratada com KOH.

Todos os dados apresentados são os valores médios seguidos pelo desvio padrão amostral.

As amostras, tratada com KOH, o resíduo, a carragena semi-refinada e a carragena comercial (componentes brutos) mostraram teores de galactanas (41,5%, 32,7% 53,6% e 44,3%), glucanas (13,4%, 38,4%, 8,3% e 5,9%), cinzas (14,9%, 8,6%, 18,2% e 34,8%), proteínas (0,6%, 0,4%, 0,3% e 0,5%), aromáticos insolúveis (2,4%, 8,3%, 0,2% e 0,7%) e grupos sulfato (13,8%, 8,1%, 13,3% e 12,8%), respectivamente (Tabela 10). A soma dos componentes das amostras tratada com KOH, o resíduo, a carragena semi-refinada e a carragena comercial foram de 85,5%, 96,5%, 98,5% e 99,0% respectivamente (Tabela 10).

O balanço de massa é necessário para compararmos o resíduo e a carragena semi-refinada diretamente com o material tratado com KOH (original). Os teores de galactanas, cinzas, proteínas, aromáticos insolúveis e grupos sulfato foram reduzidos no resíduo quando comparado com a biomassa tratada com KOH em 79,0%, 84,6%, 83,3%, 8,3% e 84,0%, respectivamente (Tabela 10). Considerando o desvio padrão o teor de glucanas não foi reduzido no resíduo quando comparado com a amostra tratada com KOH (Tabela 10). Os teores de galactanas, glucanas, cinzas, proteínas, aromáticos insolúveis e grupos sulfato foram reduzidos na carragena semi-refinada quando comparado com a biomassa tratada com KOH em 16,6%, 60,4%, 21,5%, 66,7%, 95,8% e 37,7%, respectivamente (Tabela 10).

Tabela 10. Composição química e rendimento das frações tratada com KOH, resíduo e carragena. Teores apresentados em gramas/100 gramas de material bruto e tratado com KOH (dados em base seca).

Componentes da biomassa (g/100g de material bruto)								
Amostras	Rendimento (%)	Galactanas (%)	Glucanas (%)	Cinzas (%)	Proteínas (%)	Aromáticos insolúveis (%)	Grupos sulfato (%)	Soma (%)
Tratada com KOH	100	41,5 ± 0,9	13,4 ± 1,7	14,9 ± 0,1	0,6 ± 0,4	2,4 ± 0,1	13,8 ± 0,4	85,5 ± 2,1
Resíduo	26,6 ± 2,6	32,7 ± 3,1	38,4 ± 1,7	8,6 ± 0,2	nd	8,3 ± 1,1	8,1 ± 0,2	96,5 ± 5,2
Carragena semi-refinada	64,5 ± 1,2	53,6 ± 2,6	8,3 ± 1,4	18,2 ± 0,1	nd	nd	13,3 ± 1,0	98,5 ± 1,9
Carragena comercial	-	44,3 ± 4,4	5,9 ± 0,3	34,8 ± 0,1	0,5 ± 0,2	0,7 ± 0,1	12,8 ± 0,1	99,0 ± 5,2
Componentes da biomassa (g/100g de material original)								
Amostras	Rendimento (%)	Galactanas (%)	Glucanas (%)	Cinzas (%)	Proteínas (%)	Aromáticos insolúveis (%)	Grupos sulfato (%)	Soma (%)
Tratada com KOH	100	41,5 ± 0,9	13,4 ± 1,7	14,9 ± 0,1	0,6 ± 0,4	2,4 ± 0,1	13,8 ± 0,4	85,5 ± 2,1
Resíduo	26,6 ± 2,6	8,7 ± 3,1	10,2 ± 1,7	2,3 ± 0,2	nd	2,2 ± 1,1	2,2 ± 0,2	25,7 ± 5,2
Carragena semi-refinada	64,5 ± 1,2	34,6 ± 2,6	5,3 ± 1,4	11,7 ± 0,1	nd	nd	8,6 ± 1,0	63,5 ± 1,9

nd = não detectado

Todos os dados apresentados são os valores médios seguidos pelo desvio padrão amostral.

5.3. Avaliação de atividades enzimáticas em extratos comerciais

O presente projeto propôs estudos de hidrólise enzimática das frações de *K. alvarezii* previamente obtidas (não tratada, tratada com KOH e resíduo) após a obtenção de carragena semi-refinada. Para esses estudos três extratos enzimáticos comerciais contendo principalmente atividade de celulasas e três extratos enzimáticos comerciais contendo principalmente atividades de pectinases foram caracterizados, como se segue: Cellulase (Sigma), Cellic CTec II (Novozymes), Celluclast (Novozymes), Pectinase (Sigma), Pectinex Smash XXL (Novozymes) e Pectinex Ultra Clear (Novozymes). Os extratos contendo atividades de celulasas foram caracterizados frente aos teores de proteínas totais e atividades de celulasas (celulasas totais, endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidases). Os extratos contendo atividades de pectinases foram caracterizados frente aos teores de proteínas totais e atividades de galactanases totais. A Tabela 11 apresenta os teores de proteínas totais e atividades específicas dos extratos enzimáticos comerciais contendo principalmente atividades de celulasas. Os teores de proteínas totais dos extratos enzimáticos Cellic CTec II, Cellulase e Celluclast foram de 68,4 mg.mL⁻¹, 40 mg.mL⁻¹ e 25,4 mg.mL⁻¹, respectivamente (Tabela 11). As atividades específicas dos extratos enzimáticos Cellic CTec II, Cellulase e Celluclast foram de 1,3 FPU.mg⁻¹, 0,8 FPU.mg⁻¹ e 1,0 FPU.mg⁻¹ (celulasas totais), 27,8 UI.mg⁻¹, 22,0 UI.mg⁻¹ e 13,1 UI.mg⁻¹ (endoglucanases), 1,1 UI.mg⁻¹, 0,9 UI.mg⁻¹ e 0,8 UI.mg⁻¹ (exoglucanases) e 26,3 UI.mg⁻¹, 0,3 UI.mg⁻¹ e 0,4 UI.mg⁻¹ (β -glicosidases), respectivamente (Tabela 11). Além disso, o extrato enzimático Cellic CTec II apresentou uma

atividade específica de galactanases totais de 0,01 UI.mg⁻¹, enquanto os extratos enzimáticos Cellulase e Celluclast não apresentaram atividade de galactanases totais. As atividades específicas de celulases totais, endoglucanases e exoglucanases do extrato enzimático Cellic CTec II foram um pouco superiores quando comparado ao extrato enzimático Cellulase (Sigma) e Celluclast (Novozymes) (Tabela 11). O extrato Cellic CTec II mostrou uma atividade específica de β -glicosidases significativamente alta (26,3 UI.mg⁻¹) em comparação com os extratos enzimáticos Cellulase e Celluclast (0,3 UI.mg⁻¹ e 0,4 UI.mg⁻¹, respectivamente). A alta atividade de β -glicosidases no extrato Cellic CTec II indica que não deve haver à necessidade de suplementação dessa enzima para uma hidrólise enzimática completa de um substrato que contenha glucanas. As atividades específicas de celulases totais, endoglucanases e exoglucanases de ambos os extratos comerciais em estudo foram similares ao reportado por Mendes *et al* (1), onde foi utilizado o extrato enzimático Celluclast (Novozymes), com exceção do extrato comercial Cellic CTec II que mostrou um alta atividade de β -glicosidases.

Tabela 11. Atividades enzimáticas específicas e teor de proteínas dos extratos comerciais de celulases.

Preparados Enzimáticos	Proteínas Totais (mg.ml ⁻¹)	Celulases Totais (FPU.mg ⁻¹)	Endoglucanases (UI.mg ⁻¹)	Exoglucanases (UI.mg ⁻¹)	β -glicosidases (UI.mg ⁻¹)
Cellic CTec II (Novozymes)	68,4	1,3 $\pm$ 0,1	27,8 $\pm$ 1,2	1,1 $\pm$ 0,2	26,3 $\pm$ 0,5
Cellulase (Sigma)	40,0	0,8 $\pm$ 0,1	22,0 $\pm$ 1,4	0,9 $\pm$ 0,4	0,3 $\pm$ 0,01
Celluclast (Novozymes)	25,4	1,0 $\pm$ 0,1	13,1 $\pm$ 0,1	0,8 $\pm$ 0,1	0,4 $\pm$ 0,01

Valores médios seguidos pelo desvio padrão amostral.

Nos extratos enzimáticos comerciais contendo atividade de pectinases foi dosado o teor de proteínas e a atividade de galactanases totais. As atividades de galactanases totais foram dosadas utilizando-se carragena comercial como substrato, pois a utilização de goma arábica como substrato para dosar galactanases totais não mostrou ser eficaz quando comparado ao substrato carragena (dados não apresentados). Desta forma, como ambas as frações da biomassa de *K. alvarezii* e a carragena comercial contêm em sua estrutura o polissacarídeo de galactana (Tabela 9 e 10) foi considerada apenas as atividades de galactanases totais utilizando-se o substrato carragena comercial para fins de cálculos de carga enzimática para as etapas de hidrólise enzimática das frações previamente obtidas. Os teores de proteínas totais dos extratos enzimáticos Pectinase (Sigma), Pectinex Smash XXL e Pectinex Ultra Clear (Novozymes) foram de 22,1 mg.mL⁻¹, 4,8 mg.mL⁻¹ e 20,6 mg.mL⁻¹, respectivamente (Tabela 12).

Tabela 12. Atividades específicas e teor de proteínas dos extratos comerciais de pectinases.

Preparados Enzimáticos	Proteínas Totais (mg.mL⁻¹)	Galactanases Totais (UI.mL⁻¹)	Galactanases Totais (UI.mg⁻¹)
Pectinase (Sigma)	22,1	3,9	0,2
Smash XXL (Novozymes)	4,8	1,5	0,3
Ultra Clear (Novozymes)	20,6	3,8	0,2

As atividades de galactanases totais dos extratos enzimáticos Pectinase, Pectinex Smash XXL e Pectinex Ultra Clear foram de 3,9 UI.mL⁻¹, 1,5 UI.mL⁻¹ e 3,8 UI.mL⁻¹, respectivamente (Tabela 12). Considerando as atividades específicas, o extrato Pectinex Smash XXL mostrou uma atividade de galactanases totais um pouco superior aos extratos Pectinase e Pectinex Ultra Clear (Tabela 12).

5.4. *Identificação do fungo e obtenção de extratos enzimáticos a partir do mesmo.*

Foram obtidas imagens de microscopia ótica conforme apresentado na Figura 12. Conidióforos altamente desenvolvidos geralmente tem formas e arranjos de conídios característicos, desta forma, a identificação do fungo é possível a partir da morfologia do conidióforo. O gênero *Aspergillus* sp. tem um conidióforo não ramificado que surge de uma célula ampliada do micélio vegetativo e termina numa porção inchada que é chamada de vesícula. A partir desta, emergem pequenas estruturas em forma de frasco chamadas fiálides. As pontas destes fiálides são pontos de crescimento e os conídios são sucessivamente cortados (54). Segundo as análises das características morfológicas observadas na microscopia ótica (Figura 12) o fungo pode ser classificado como um *Aspergillus* sp. Esta identificação morfológica foi realizada com a contribuição do Professor Doutor João Atilio Jorge da USP de Ribeirão Preto. Posteriormente o fungo será enviado para caracterização no Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP,

campus de Rio Claro-SP. Além disso, a classificação genética molecular será realizada na Fundação André Tosello localizada em Campinas-SP.

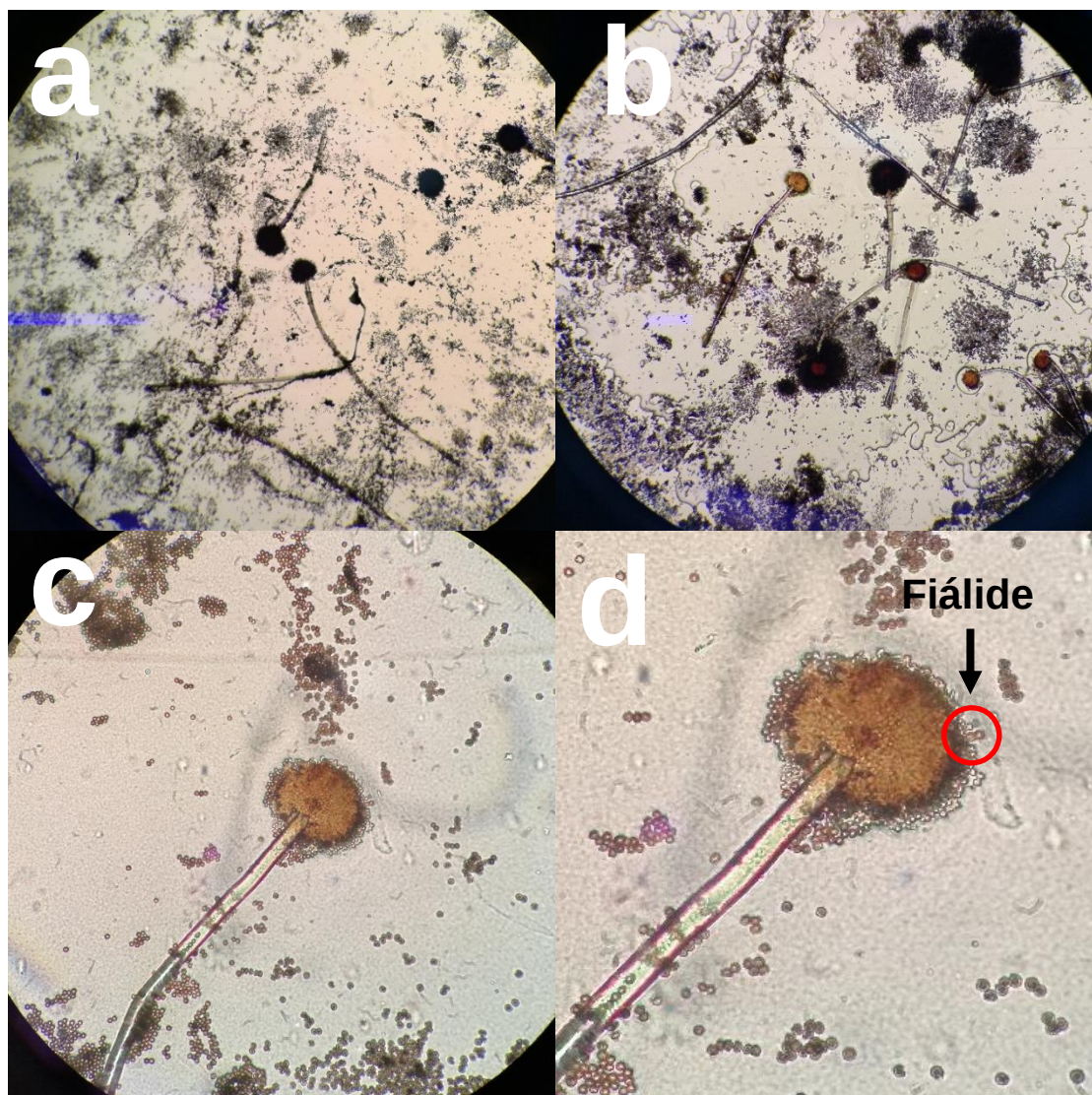


Figura 12. Fungo isolado da borra do café após 5 dias de crescimento em meio ágar – aveia à temperatura ambiente. Microscópio OLYMPUS BX40. (a, b) Objetiva 10x. (c) Objetiva 40x. (d) Ampliação digital.

Foram obtidos dois extratos enzimáticos a partir do fungo *Aspergillus* sp. visando a produção de galactanases. A Tabela 13 mostra as atividades de galactanases totais, β -galactosidases e celulasas totais ao longo do tempo dos cultivos em estudo. O extrato enzimático produzido com o substrato de bagaço de cana como fonte de carbono mostrou atividades enzimáticas de galactanases e β -galactosidases inferiores quando comparado com o obtido a partir do substrato de goma de alfarroba, com exceção da atividade de celulasas a qual foi superior (Tabela 13).

Pode-se destacar que o extrato enzimático produzido com o substrato de goma de alfarroba como fonte de carbono apresentou um pico de produção de galactanases totais em 6 dias de cultivo ($0,019 \text{ UI.mL}^{-1}$) (Tabela 13), valor inferior em comparação ao reportado por Araújo e Ward que foi de 0.09 UI.mL^{-1} (38)

Tabela 13. Atividades enzimáticas dos extratos obtidos a partir do fungo *Aspergillus* sp. após 2, 4, 6, 8, e 10 dias de cultivo.

Fontes de carbono	Dias de cultivo	FPU (UI.mL^{-1})	β -galactosidases (UI.mL^{-1})	Galactanases totais (UI.mL^{-1})
Goma de alfarroba	2	0,014	nd	nd
	4	0,013	nd	0,012
	6	0,007	0,007	0,019
	8	0,028	0,007	0,005
	10	0,018	0,004	0,010
Bagaço de cana	2	0,033	nd	nd
	4	0,044	nd	nd
	6	0,062	nd	0,010
	8	0,043	nd	0,007
	10	0,047	nd	0,007

nd = não detectado

Desta forma, o extrato enzimático de *Aspergillus* sp. utilizando goma de alfarroba como fonte de carbono durante 6 dias de cultivo foi produzido em maiores quantidades e posteriormente concentrado 100 vezes por meio de liofilização com o intuito de aumentar o nível de atividade de galactanases totais e β -galactosidases. O extrato concentrado foi redissolvido e mostrou uma atividade de $0,2 \text{ UI.mL}^{-1}$ de galactanases totais e $0,3 \text{ UI.mL}^{-1}$ de β -galactosidases (Tabela 14). Nesta condição houve um aumento de 9 vezes no nível de atividade de galactanases totais e 44 vezes no nível de atividade de β -galactosidases. O referido extrato enzimático foi testado na hidrólise enzimática da fração do resíduo de *K. alvarezii*.

Tabela 14. Atividade enzimática do extrato obtido a partir do fungo *Aspergillus* sp. após 6 dias de cultivo e concentrado 100 vezes.

Preparado Enzimático	Galactanases Totais (UI.mL⁻¹)	β-galactosidases (UI.mL⁻¹)
Extrato de <i>Aspergillus</i> sp. concentrado 100 vezes	$0,2 \pm 0,02$	$0,3 \pm 0,004$

5.5. Avaliação da hidrólise enzimática das frações de *K. alvarezii*

A proposta do presente projeto foi hidrolisar enzimaticamente o resíduo gerado após a extração de carragena semi-refinada. Porém, também foram testadas as hidrólises enzimáticas com extratos comerciais das frações não tratada, tratada com KOH, além do resíduo. Os resultados foram apresentados

na forma de gráficos, utilizando os valores de concentrações de glicose e galactose versus tempo de hidrólise enzimática e conversões de glucanas em glicose e galactanas em galactose versus tempo de hidrólise enzimática. Para os ensaios de hidrólise enzimática foram utilizados separadamente os três extratos enzimáticos de celulasas e os três extratos enzimáticos de pectinases. Também foram realizados testes com a mistura de dois tipos de extratos enzimáticos.

5.5.1. Hidrólise enzimática com extratos enzimáticos comerciais contendo atividades de celulasas

As Figuras 13 e 14 apresentam a hidrólise enzimática dos substratos citados anteriormente, utilizando extratos enzimáticos comerciais de celulasas. A concentração de glicose liberada após 72h de hidrólise enzimática do resíduo foi de aproximadamente 10 g.L⁻¹, em ambos os ensaios com os três extratos enzimáticos. Porém, o material não tratado e tratado com KOH mostraram uma concentração de glicose máxima de aproximadamente 3 g.L⁻¹ (Figura 13b, 13d e 13f). A conversão de glucana em glicose após 72h de hidrólise enzimática em ambas as frações em estudo foram de aproximadamente 100% (Figura 13a, 13c, 13e).

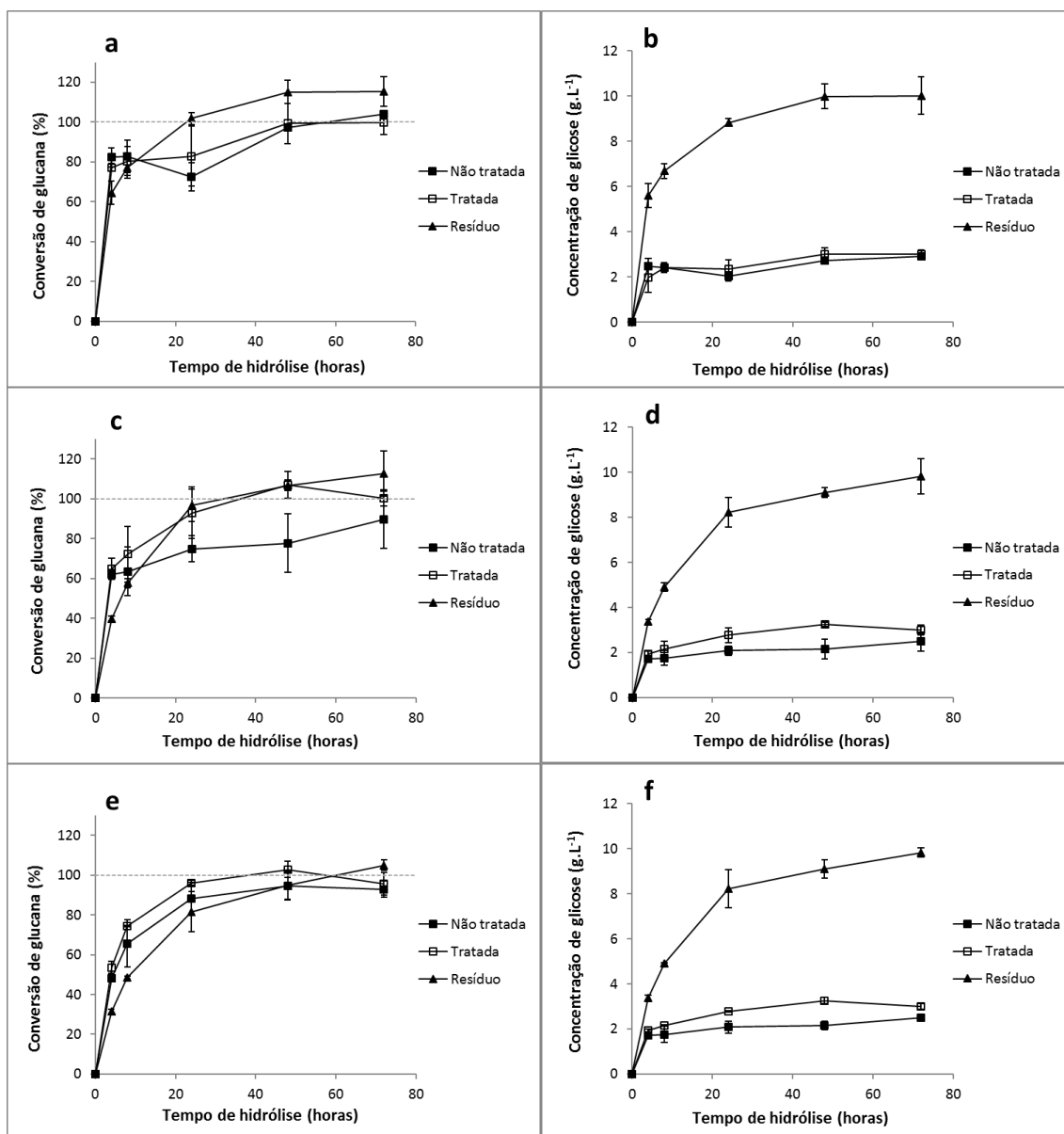


Figura 13. Hidrólise enzimática das frações de *K. alvarezii* utilizando extratos enzimáticos comerciais de celulasas. **(a)** Conversão de glucana em glicose e **(b)** concentração de glicose utilizando o extrato enzimático Cellic CTec II (Novozymes). **(c)** Conversão de glucana em glicose e **(d)** concentração de glicose utilizando o extrato enzimático Celluclast (Novozymes). **(e)** Conversão de glucana em glicose e **(f)** concentração de glicose utilizando o extrato enzimático Cellulase de *Trichoderma* (Sigma). As barras de erro correspondem ao desvio padrão amostral.

Apesar de a hidrólise enzimática atingir uma conversão de 100% após 72h em ambas as frações e com todos os extratos enzimáticos comerciais de celulasas em estudo, podemos observar que a concentração de glicose foi 3 vezes maior na fração do resíduo quando comparado às frações não tratadas e tratada com KOH (Figura 13b, 13d e 13f). Esse efeito pode ser explicado pela composição química das frações hidrolisadas. O material não tratado e o material tratado com KOH apresentaram teores de glucanas de aproximadamente 13% (g/100g de amostra, dados em base seca) (Tabela 9) enquanto que o resíduo apresentou um teor de glucanas de aproximadamente 38,4% (g/100g de amostra, dados em base seca) (Tabela 10). Desta forma, o teor de glucana presente no resíduo foi, aproximadamente, três vezes maior em comparação ao material não tratado e tratado com KOH.

Entretanto, o extrato enzimático Cellic CTec II foi o único dos extratos enzimáticos contendo atividades de celulasas que possibilitou a hidrólise da fração polissacarídica de galactana em estudo, porém, a porcentagem de conversão de galactana em galactose após 72 horas de hidrólise foi de 4,7%, 3,5% e 14,7% nas frações não tratada, tratada com KOH e do resíduo, respectivamente (Figura 14a).

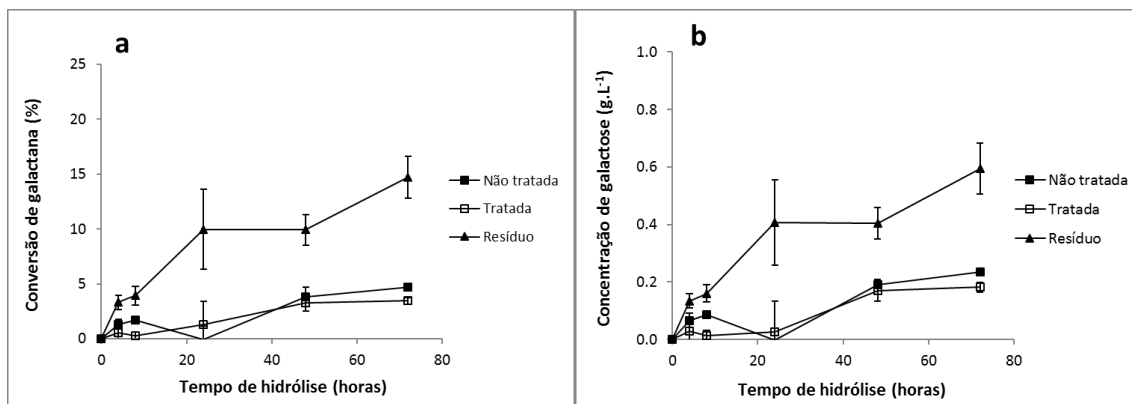


Figura 14. Hidrólise enzimática das frações de *K. alvarezii* utilizando o extrato enzimático Cellic CTec II. (a) Conversão de galactana em galactose e (b) concentração de galactose. As barras de erro correspondem ao desvio padrão amostral (no caso de não aparecer a barra no gráfico significa que o erro é muito pequeno).

5.5.2. Hidrólise enzimática com extratos enzimáticos comerciais contendo atividades de galactanases

As Figuras 15 e 16 apresentam a hidrólise enzimática das frações citadas anteriormente, utilizando extratos enzimáticos comerciais contendo atividades de galactanases. As concentrações de glicose liberada após 72h de hidrólise enzimática do resíduo foram diferentes entre os extratos enzimáticos em estudo, atingindo um patamar de 3,1 g.L⁻¹, 0,6 g.L⁻¹ e 5,4 g.L⁻¹ com os extratos enzimáticos Pectinase, Pectinex Smash XXL e Pectinex Ultra Clear, respectivamente (Figura 15b, 15d e 15f). Entretanto, o material não tratado e tratado com KOH mostraram concentrações de glicose de aproximadamente 2 g.L⁻¹, 0,5 g.L⁻¹ e 2,5 g.L⁻¹ com a utilização dos extratos enzimáticos Pectinase,

Pectinex Smash XXL e Pectinex Ultra Clear, respectivamente (Figura 15b, 15d e 15f).

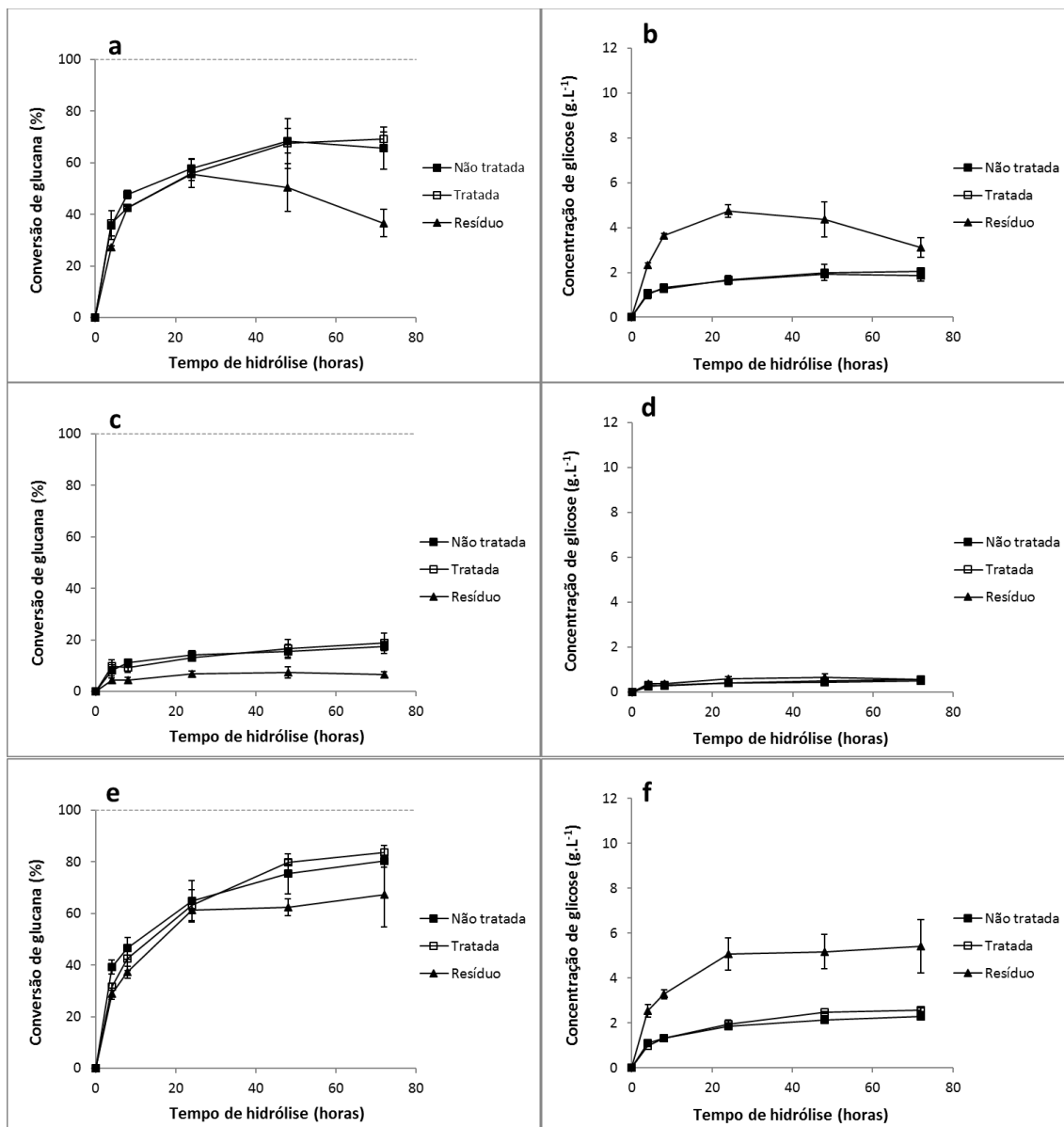


Figura 15. Hidrólise enzimática das frações de *K. alvarezii* utilizando extratos enzimáticos comerciais de pectinases. (a) Conversão de glucana em glicose e (b) concentração de glicose utilizando Pectinase (Sigma). (c) Conversão de glucana em glicose e (d) concentração de glicose utilizando Pectinex Smash XXL (Novozymes). (e) Conversão de glucana em glicose e (f) concentração de glicose

utilizando Pectinex Ultra Clear (Novozymes). As barras de erro correspondem ao desvio padrão amostral.

A conversão de glucana em glicose atingiu aproximadamente 70% e 83% após 72h de hidrólise enzimática quando foram utilizados os extratos enzimáticos Pectinase e Pectinex Ultra Clear, respectivamente (Figura 15a e 15e). Entretanto, quando foi utilizado o extrato Pectinex Smash XXL a conversão de glucana em glicose na fração do resíduo após 4h de hidrólise enzimática foi de aproximadamente 4,3% atingindo um patamar de 6,5% no final das 72h (Figura 15c). Porém, as frações não tratada e tratada com KOH tiveram ambas uma conversão de glucana em glicose de aproximadamente 9,5% após 4h de hidrólise enzimática atingindo um patamar de aproximadamente 18% de conversão após 72h (Figura 15c).

Entretanto, o extrato enzimático Pectinex Smash XXL foi o único dos extratos enzimáticos de pectinases que proporcionou uma hidrólise enzimática da fração polissacarídica de galactana das amostras em estudo, porém, a porcentagem de conversão e a concentração de galactose após 72h de hidrólise enzimática foi de aproximadamente 5,0% e $0,2 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente em ambas as frações em estudo (Figura 16a).

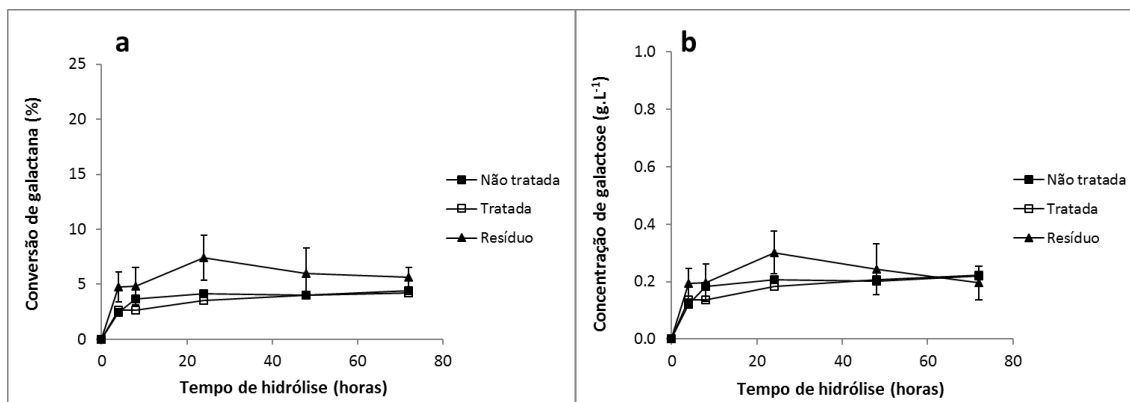


Figura 16. Hidrólise enzimática das frações de *K. alvarezii* utilizando o extrato enzimático Pectinex Smash XXL. (a) Conversão de galactana em galactose e (b) concentração de galactose. As barras de erro correspondem ao desvio padrão amostral.

5.5.3. Hidrólise enzimática com extratos Cellic CTec II + Pectinex Smash XXL

Foi avaliada a hidrólise enzimática da fração do resíduo de *K. alvarezii* utilizando os extratos Cellic CTec II + Pectinex Smash XXL, pois foram os dois extratos que mostraram separadamente capacidade de hidrolisar a galactana contida nos substratos. A Figura 17 apresenta a hidrólise enzimática do resíduo de *K. alvarezii*, utilizando os extratos enzimáticos mencionados. A concentração de glicose e galactose liberada após 72h de hidrólise enzimática atingiu um patamar de 6,7 g.L⁻¹ e 0,8 g.L⁻¹, respectivamente (Figura 17b). Entretanto, a porcentagem de conversão de glucana e galactana foi de, aproximadamente, 78% e 19%, respectivamente (Figura 17a). Pode-se observar um aumento na conversão de galactanas em galactose quando comparado com a conversão atingida utilizando separadamente os extratos enzimáticos (5% com Pectinex

Smash XXL e 14% com Cellic CTec II). Porém, a conversão de glucana em glicose culminou em uma diminuição quando comparamos com a hidrólise enzimática utilizando somente o extrato Cellic CTec II (100%), o que sugere que o extrato Pectinex Smash XXL pode ter exercido uma atividade inibidora sob a hidrólise de glucana.

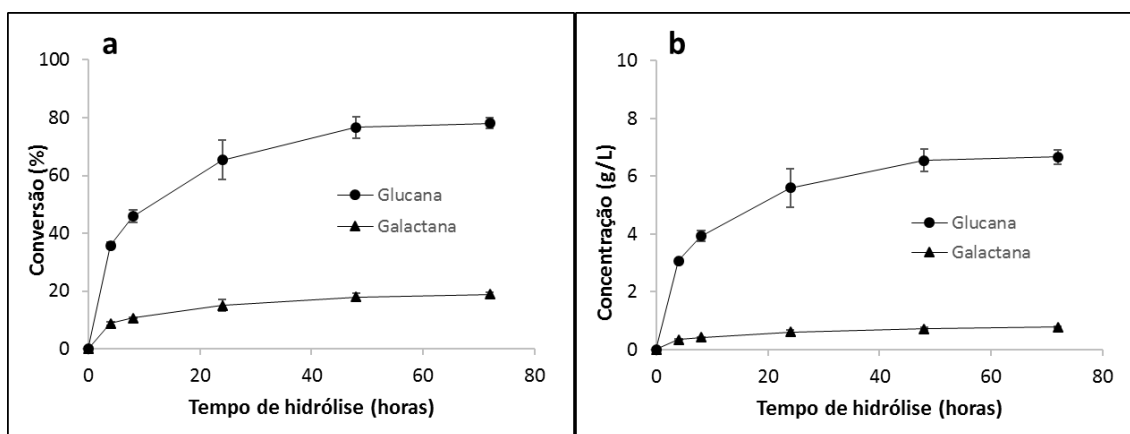


Figura 17. Hidrólise enzimática do resíduo de *K. alvarezii* utilizando os extratos enzimáticos Cellic CTec II e Pectinex Smash XXL. (a) Conversão de glucana em glicose e de galactana em galactose. (b) Concentração de glicose e de galactose. As barras de erro correspondem ao desvio padrão amostral (no caso de não aparecer a barra no gráfico significa que o erro é muito pequeno).

5.5.4. Hidrólise enzimática com extrato enzimático de *Aspergillus* sp. contendo atividade de galactanases

Foi avaliada a hidrólise enzimática da fração do resíduo utilizando o extrato enzimático obtido a partir de *Aspergillus* sp. concentrado 100 vezes. A Figura 18 apresenta a hidrólise enzimática do resíduo de *K. alvarezii*, utilizando o extrato enzimático mencionado. A concentração de galactose liberada após 72h de hidrólise enzimática atingiu um patamar de 1,4 g.L⁻¹ (Figura 18b) e a

porcentagem de conversão de galactana foi de aproximadamente 35% (Figura 18a). O extrato enzimático de *Aspergillus* sp. não foi capaz de hidrolisar a fração de glucana. Pode-se observar um acréscimo na conversão de galactana em galactose quando comparado com a conversão atingida utilizando os extratos enzimáticos Pectinex Smash XXL (5%) e Cellic CTec II (14%).

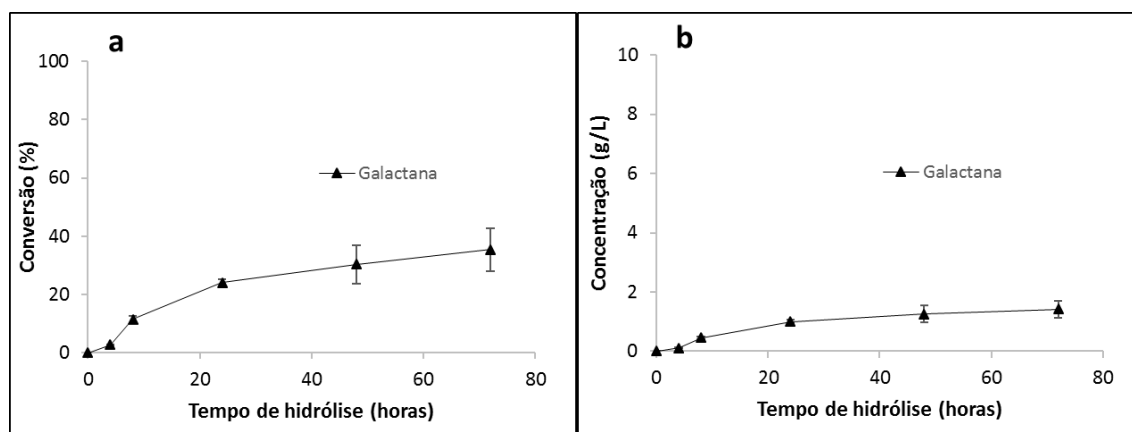


Figura 18. Hidrólise enzimática do resíduo de *K. alvarezii* utilizando extrato enzimático de *Aspergillus* sp. (a) Conversão de galactana em galactose. (b) Concentração de galactose. As barras de erro correspondem ao desvio padrão amostral (no caso de não aparecer a barra no gráfico significa que o erro é muito pequeno).

5.5.5. Hidrólise enzimática com extratos de *Aspergillus* sp. + Cellic CTec II

Foi avaliada a hidrólise enzimática da fração do resíduo de *K. alvarezii* utilizando o extrato enzimático obtido a partir de *Aspergillus* sp. concentrado 100 vezes em conjunto ao extrato enzimático comercial Cellic CTec II. A Figura 19 apresenta a hidrólise enzimática do resíduo de *K. alvarezii*, utilizando os extratos enzimáticos mencionados. A concentração de glicose e galactose liberada após 72h de hidrólise enzimática atingiu um patamar de 8,2 g.L⁻¹ e 1,3 g.L⁻¹,

respectivamente (Figura 19b). Entretanto, a porcentagem de conversão de glucana e galactana foi de aproximadamente 95% e 35%, respectivamente (Figura 19a). Com a utilização dos dois extratos mencionados pode-se observar uma hidrólise quase completa da fração de glucana devido à alta atividade de enzimas celulolíticas contidas no extrato Cellic CTec II e uma hidrólise de galactana acima do atingido com os extratos comerciais devido à utilização do extrato de *Aspergillus* sp.

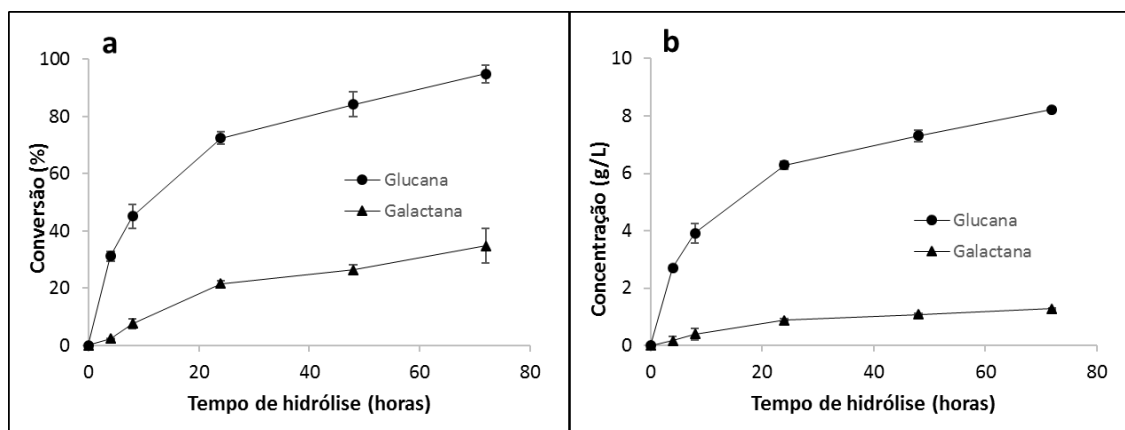


Figura 19. Hidrólise enzimática do resíduo de *K. alvarezii* utilizando extratos enzimáticos de *Aspergillus* sp. e Cellic CTec II. **(a)** Conversão de glucanas em glicose e de galactana em galactose. **(b)** Concentração de glicose e galactose. As barras de erro correspondem ao desvio padrão amostral.

5.5.6. Hidrólise enzimática com 100FPU de Cellic CTec II por grama de substrato

Foi avaliada a hidrólise enzimática da fração do resíduo de *K. alvarezii* utilizando o extrato enzimático comercial Cellic CTec II em uma quantidade 10 vezes superior à utilizada anteriormente com o intuito de melhorar a hidrólise da

fração de galactana. A Figura 20 apresenta a hidrólise enzimática do resíduo de *K. alvarezii*, utilizando o extrato enzimático mencionado. As concentrações de glicose e galactose liberadas após 72h de hidrólise enzimática atingiram um patamar de 9,3 g.L⁻¹ e 1,2 g.L⁻¹, respectivamente (Figura 20b). Entretanto, as porcentagens de conversão de glucana e galactana foram de aproximadamente 100% e 30%, respectivamente (Figura 20a). Com a utilização da carga enzimática do extrato mencionado pode-se observar uma hidrólise quase completa da glucana nas primeiras 4 horas de hidrólise devido à alta atividade de enzimas celulolíticas contidas no extrato Cellic CTec II. Também podemos observar um aumento significativo da conversão de galactana (30%) quando comparada com a hidrólise enzimática utilizando o mesmo extrato, mas com uma carga enzimática de 10FPU.g⁻¹ de substrato (14%). Além disso, o nível de 30% de conversão de galactana em galactose foi próximo ao obtido com extrato enzimático de *Aspergillus* sp. (35%).

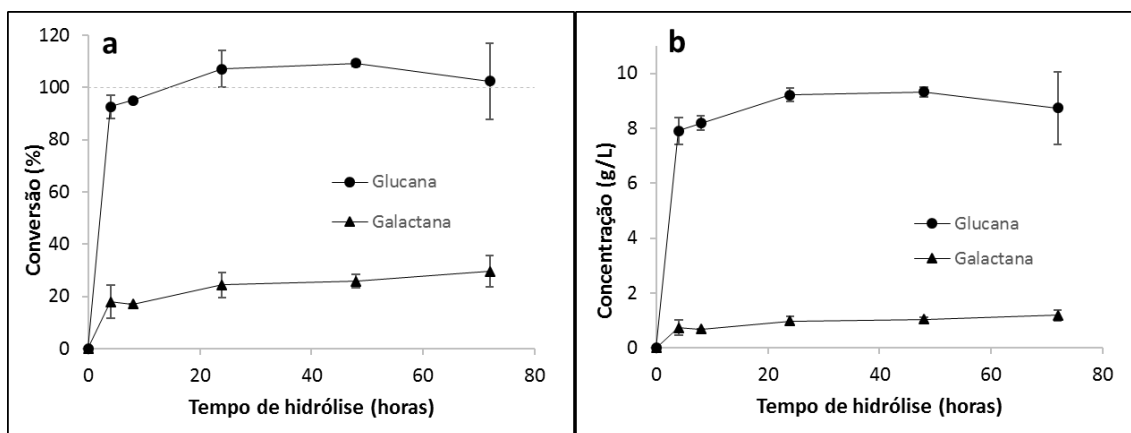


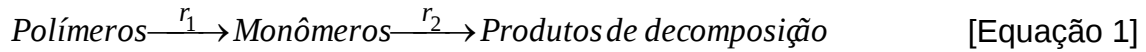
Figura 20. Hidrólise enzimática do resíduo de *K. alvarezii* utilizando extrato enzimático comercial Cellic CTec II 100FPU/g de substrato. (a) Conversão de glucanas em glicose e galactana em galactose. (b) Concentração de glicose e galactose. As barras de erro correspondem ao desvio padrão amostral.

5.6. Modelagem cinética da hidrólise enzimática

A modelagem matemática tem por objetivo na presente dissertação, compreender melhor o comportamento cinético da hidrólise de polissacarídeos (polímeros) visando desenvolver processos enzimáticos de hidrólise que possam atingir altos rendimentos em glicose e outros açúcares (monômeros) (55).

Reações de hidrólise de polissacarídeos são muito complexas, sendo afetadas por uma série de fatores de diferentes naturezas, a iniciar pelo fato de que o substrato está em uma fase sólida e o biocatalisador (enzima) em uma fase líquida, constituindo um sistema catalítico heterogêneo (56). Em face disso, os modelos propostos na literatura para estes sistemas reacionais, partem de uma abordagem pseudo-homogênea, descrevendo o processo de hidrólise como uma

sequência de reações irreversíveis de 1ª ordem, representada genericamente por (56):



É frequente a segunda reação da série ser significativa em processos de hidrólise ácida. Entretanto, em processos de hidrólise enzimática, dada a especificidade de ação do catalisador, não se observa a ocorrência de tal reação em extensão apreciável, o que permite considerar $r_2=0$ nestes casos.

Na presente dissertação, a cinética de hidrólise de glucana (polissacarídeo) utilizando diferentes complexos enzimáticos foi acompanhada e modelada matematicamente medindo-se a concentração de glicose (monômero) formada durante a reação. Para a modelagem matemática da cinética da reação, partiu-se da Equação 1 com a consideração de que $r_2=0$. Deste modo, a Equação 1 assume a seguinte forma:



Efetuando-se um balanço de massa de glicose no meio reacional, chega-se à seguinte equação para a taxa de variação temporal da concentração de glicose (g):

$$\frac{dg}{dt} = r_1 \quad [\text{Equação 3}]$$

Na Equação 3, a velocidade de produção de glicose r_1 ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) é comumente postulada como sendo de primeira ordem ($r_1=kg$). A integração da Equação 3 com esta expressão para r_1 , resultaria num crescimento exponencial para a concentração de glicose, o que não condiz com o comportamento dos dados experimentais verificado em todos os ensaios. Desta forma, uma pequena modificação na expressão de r_1 foi introduzida visando descrever o comportamento observado experimentalmente de que a concentração de glicose tende a um valor máximo assintótico (g_{max}) para tempos longos de reação. Assim, a seguinte equação modificada é proposta para r_1 , modificação esta que encontra respaldo no trabalho de Zinnai *et al* (57):

$$r_1 = k(g_{max} - g) \quad [\text{Equação 4}]$$

Nota-se que o caráter de primeira ordem da Equação 4 fica preservado mesmo com a introdução da modificação proposta. Substituindo-se a Equação 4 na Equação 3 e integrando a equação resultante, obtém-se, após manipulações algébricas, a seguinte equação que descreve o perfil temporal de concentração de glicose de acordo com o modelo proposto:

$$g = g_{max} \left(1 - e^{-kt}\right) \quad [\text{Equação 5}]$$

Devido aos parâmetros g_{max} e k serem oriundos de uma abordagem pseudo-homogênea, eles incorporam diversos aspectos intervenientes na cinética de hidrólise e, por esse motivo, foram estimados para cada ensaio realizado, visando incorporar as variações decorrentes das diferentes condições

reacionais utilizadas. Os parâmetros foram estimados por regressão não linear, minimizando-se a soma dos quadrados dos resíduos entre os valores experimentais e os calculados pelo modelo, de acordo com o algoritmo de Marquardt (58). Uma informação importante que pode ser extraída a partir do modelo matemático e que pode ser utilizada para comparação da capacidade catalítica dos diferentes extratos enzimáticos empregados é a velocidade máxima de reação (r_{1max}). Analisando-se a Equação 4, observa-se que r_1 é máxima quando g é mínima, o que ocorre no instante inicial ($t=0$) quando $g=0$. Assim, a velocidade máxima de reação (r_{1max}) é dada por:

$$r_{1max} = kg_{max} \quad \text{[Equação 6]}$$

Nas Figuras 21 a 27 estão mostrados os ajustes do modelo cinético aos dados experimentais obtidos com diferentes extratos enzimáticos enquanto que nas Tabelas 15 a 21 estão apresentadas as correspondentes análises de variância dos ajustes realizados. Analisando-se as Figuras 21 a 27 pode se observar que o modelo proposto descreve bem a tendência de comportamento dos dados experimentais para todos os ensaios realizados, o que é quantitativamente comprovado pelas análises de variância apresentadas. O modelo foi validado para todas as condições utilizadas, apresentando indicadores estatísticos (coeficiente de determinação R^2 , F_c e valor-p) bastante favoráveis à sua validação. Na validação do modelo cinético utilizou-se o teste F de Fischer apresentado por Froment e Bischoff (58), dado por:

$$F_c = \frac{\sum_{i=1}^n \frac{\hat{y}_i^2}{p}}{\sum_{i=1}^n \frac{(y_i - \hat{y}_i)^2}{n-p}} \begin{matrix} ? \\ > \\ < \end{matrix} F(p, n-p; 1-\alpha)$$

[Equação 7]

Na Equação 7, y_i e $\hat{y}_i$ são respectivamente os valores experimental e calculado da concentração de glicose no tempo i , n é o número de dados experimentais ($n=6$) e p é o número de parâmetros do modelo ($p=2$). Se o valor calculado de F (F_c) for maior que o correspondente valor tabelado para graus de liberdade p , $n-p$ e probabilidade $1-\alpha$ ($F(p, n-p; 1-\alpha)$), a regressão é considerada estatisticamente significativa, sendo 0.05 o valor comumente adotado para o nível de significância (α). Para todos os ajustes, o valor tabelado de F é $F(2,4;0.95)=6.9443$. O modelo também foi validado pelo teste do valor- p , segundo o qual rejeita-se a hipótese de o modelo ser inadequado se este valor for menor que o nível de significância (α) fixado para o teste. Como para todos os ajustes o valor- p foi muito inferior ao valor adotado para o nível de significância ($\alpha=0.05$), Tabelas 15 a 22, o modelo é válido em todos os casos. Analisando-se os valores estimados dos parâmetros cinéticos, observa-se que o valor de k é em torno de 0.1 h^{-1} , com exceção daquele ajustado para o ensaio realizado com o extrato enzimático Cellic CTec II (CE: 100 FPU/g), para o qual o valor de k foi de 0.5 h^{-1} , um valor muito superior aos verificados para os demais extratos. Este resultado pode ser atribuído à elevada carga enzimática empregada neste ensaio (100 FPU/g), o que aumentou significativamente a velocidade de reação. Com

relação ao valor do parâmetro g_{max} , este se apresentou como dependente das condições experimentais utilizadas, apresentando variações significativas em seu valor. Além disso, constata-se que os desvios-padrão dos parâmetros são pequenos, o que significa que as estimativas dos parâmetros são precisas.

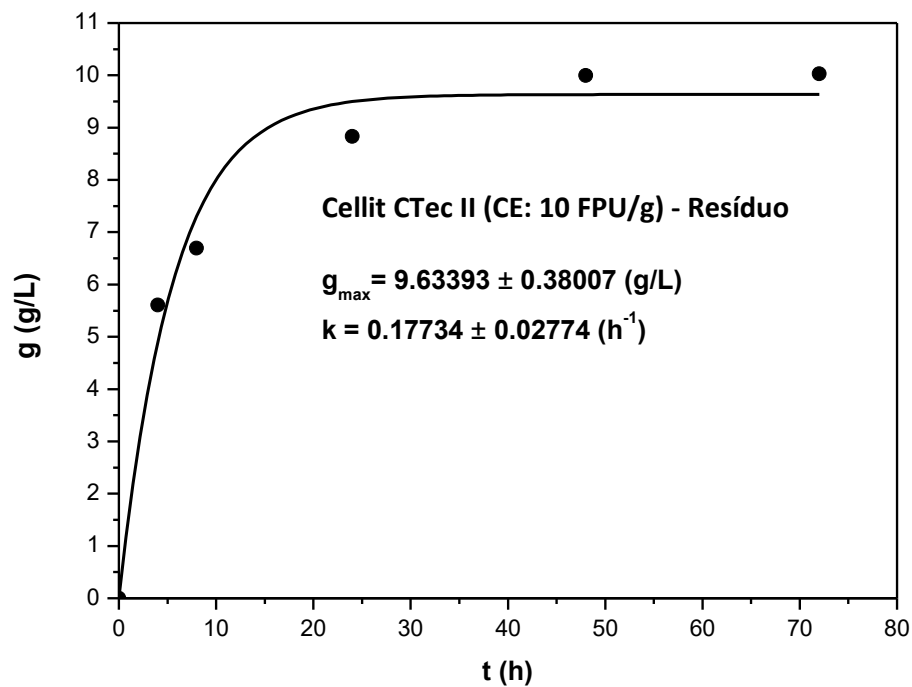


Figura 21. Ajuste do modelo proposto aos dados cinéticos obtidos com o extrato enzimático Cellic CTec II (CE: 10 FPU/g) - Hidrólise do resíduo.

Tabela 15. Análise de variância do ajuste do modelo. Ref: Cellic CTec II (CE: 10 FPU/g) - Resíduo

	GL	SQ	MQ=SQ/GL	F_c	valor-p
Regressão	2	353.0666	176.5333	438.99715	3.06663×10^{-5}
Resíduos	4	1.60851	0.40213		
$R^2 = 1 - \left[\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2} \right]$			0.9786		Modelo Validado

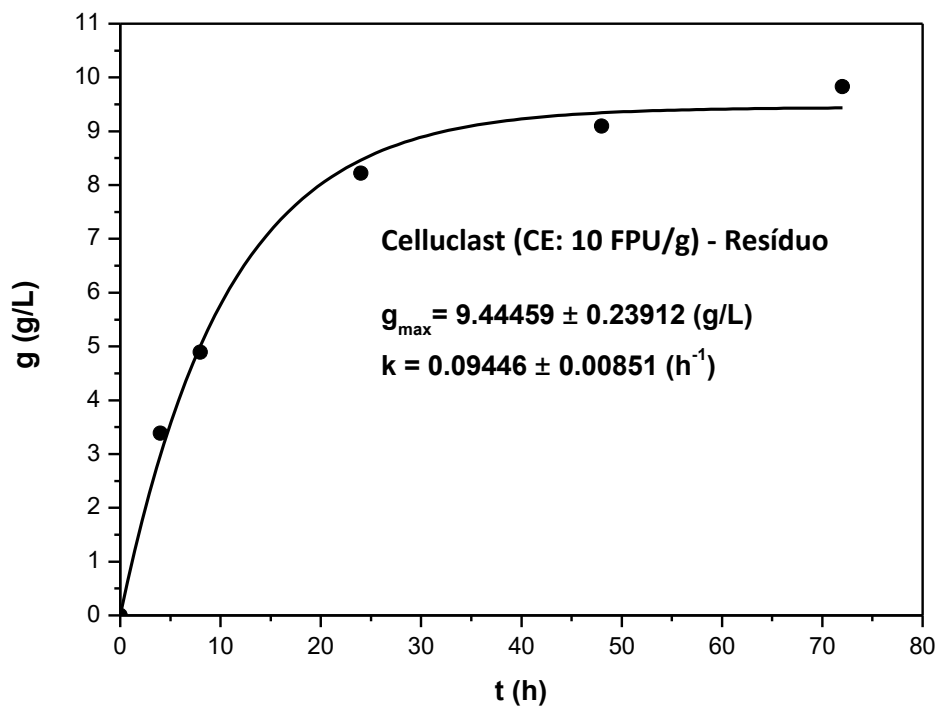


Figura 22. Ajuste do modelo proposto aos dados cinéticos obtidos com o extrato enzimático Celluclast (CE: 10 FPU/g) - Hidrólise do resíduo.

Tabela 16. Análise de variância do ajuste do modelo. Ref: Celluclast (CE: 10 FPU/g) - Resíduo

	GL	SQ	MQ=SQ/GL	F_c	valor-p
Regressão	2	281.88331	140.94165	1221.60565	3.99874x10 ⁻⁶
Resíduos	4	0.4615	0.11537		
R^2			0.9939		

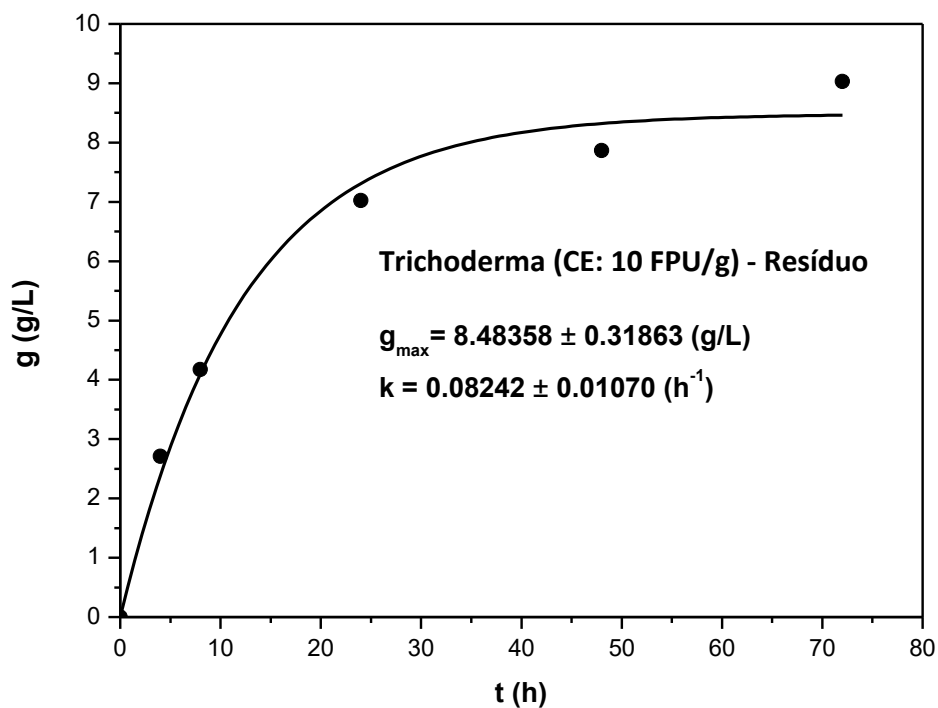


Figura 23. Ajuste do modelo proposto aos dados cinéticos obtidos com o extrato enzimático *Trichoderma* (CE: 10 FPU/g) - Hidrólise do resíduo.

Tabela 17. Análise de variância do ajuste do modelo. Ref: *Trichoderma* (CE: 10 FPU/g) – Resíduo.

	GL	SQ	MQ=SQ/G L	F_c	valor-p
Regressão	2	216.72661	108.36331	595.82217	1.67138x10 ⁻⁵
Resíduos	4	0.72749	0.18187		
R^2			0.9882		Modelo Validado

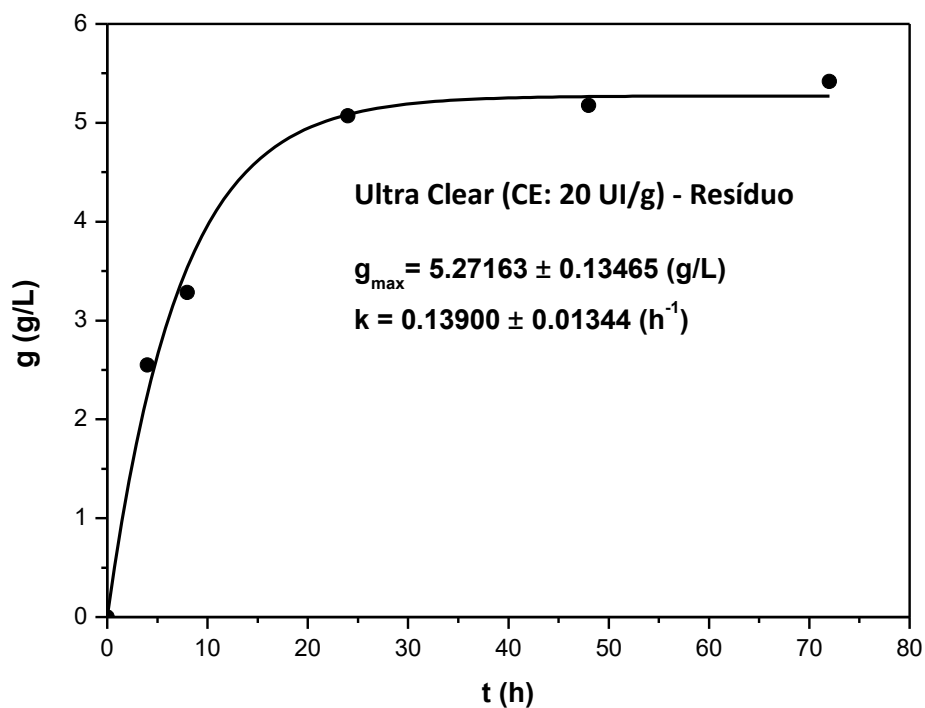


Figura 24. Ajuste do modelo proposto aos dados cinéticos obtidos com o extrato enzimático Ultra Clear (CE: 20 UI/g) - Hidrólise do resíduo.

Tabela 18. Análise de variância do ajuste do modelo. Ref: Ultra Clear (CE: 20 UI/g) – Resíduo

	GL	SQ	MQ=SQ/G L	F_c	valor-p
Regressão	2	98.92652	49.46326	1073.32571	5.17601×10^{-6}
Resíduos	4	0.18434	0.04608		
R^2			0.9919		Modelo Validado

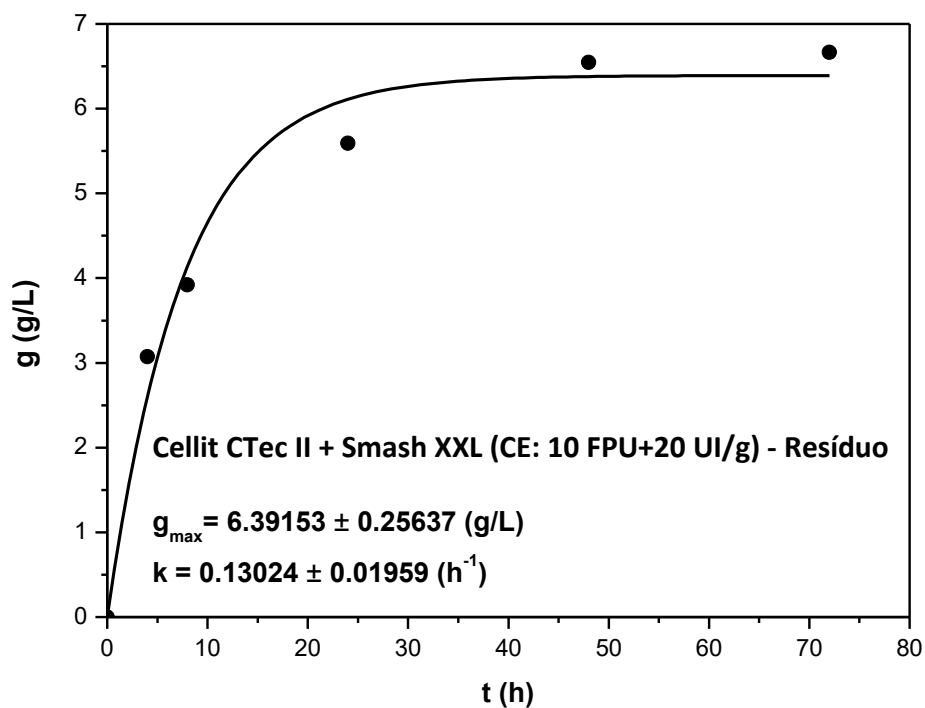


Figura 25. Ajuste do modelo proposto aos dados cinéticos obtidos com o extrato enzimático Cellit CTec II + Smash XXL (CE: 10 FPU+20 UI/g) - Hidrólise do resíduo.

Tabela 19. Análise de variância do ajuste do modelo. Ref: Cellit CTec II + Smash XXL (CE: 10 FPU+20 UI/g) – Resíduo.

	GL	SQ	MQ=SQ/ GL	F_c	valor-p
Regressão	2	142.73138	71.36569	440.37135	3.04766x10 ⁻⁵
Resíduos	4	0.64823	0.16206		
R^2			0.9810		Modelo Validado

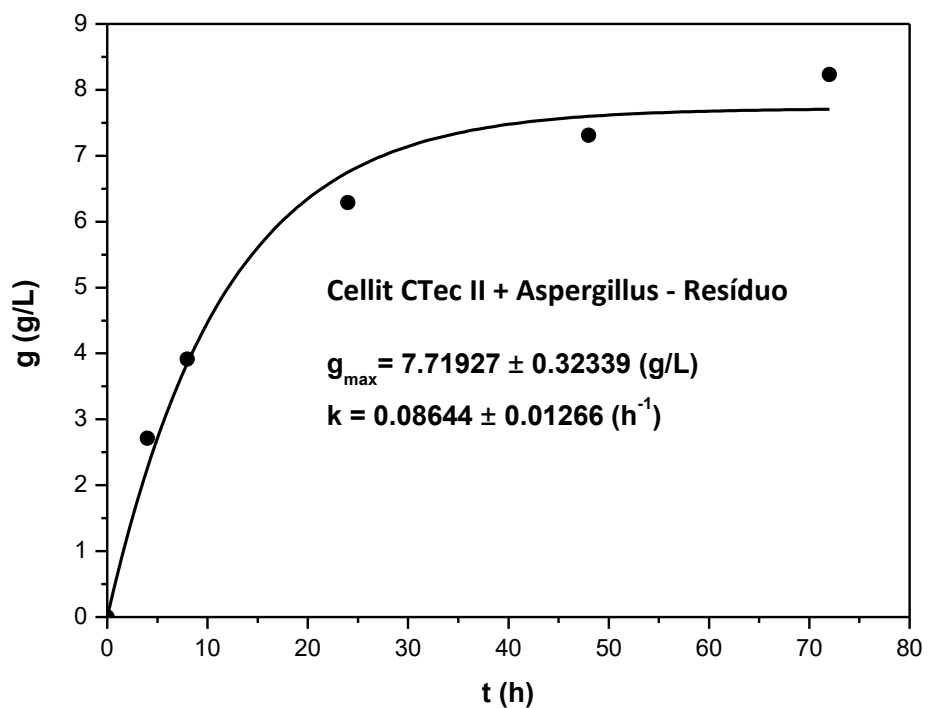


Figura 26. Ajuste do modelo proposto aos dados cinéticos obtidos com o extrato enzimático Cellit CTec II + *Aspergillus* - Hidrólise do resíduo.

Tabela 20. Análise de variância do ajuste do modelo. Ref: Cellit CTec II + *Aspergillus* – Resíduo.

	GL	SQ	MQ=SQ/ GL	F_c	valor-p
Regressão	2	182.56863	91.28432	466.06905	2.7231×10^{-5}
Resíduos	4	0.78344	0.19586		
R^2			0.9847		Modelo Validado

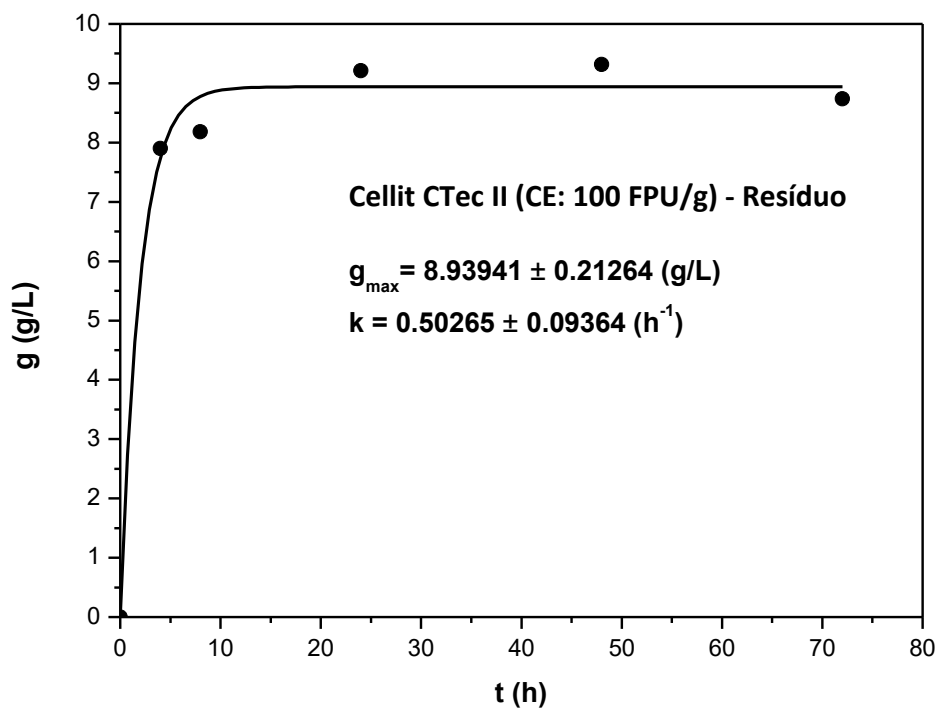


Figura 27. Ajuste do modelo proposto aos dados cinéticos obtidos com o extrato enzimático Cellic CTec II (CE: 100 FPU/g) - Hidrólise do resíduo.

Tabela 21. Análise de variância do ajuste do modelo. Ref: Cellic CTec II (CE: 100 FPU/g) – Resíduo.

	GL	SQ	MQ=SQ/G L	F_c	valor-p
Regressão	2	376.74942	188.37471	1181.39108	4.27481×10^{-6}
Resíduos	4	0.63781	0.15945		
R^2			0.9901		Modelo Validado

5.7. Considerações finais sobre a hidrólise enzimática das frações de *K. alvarezii*

A hidrólise enzimática de glucana da fração do resíduo de *K. alvarezii* mostrou ser satisfatória (atingindo 100% de conversão de glucana em glicose em 72h de reação) quando foi utilizado os extratos comerciais Cellic CTec II, Celluclast e Cellulases. Entretanto, o extrato comercial Cellic CTec II mostrou ser mais eficiente, pois esse extrato proporcionou uma velocidade máxima de produção de glicose de $1,7 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, superior quando comparado aos extratos Celluclast e Cellulases ($0,9$ e $0,7 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, respectivamente). Além disso, somente o extrato enzimático Cellic CTec II foi capaz de hidrolisar parcialmente a fração de galactana presente na fração do resíduo (atingindo 14,7% de conversão de galactana em galactose em 72h de reação).

Outros extratos enzimáticos comerciais contendo atividades de galactanases também foram testados, como se segue: Pectinase, Pectinex Smash XXL e Pectinex Ultra Clear. Esses extratos foram testados a fim de se obter uma melhor eficiência na hidrólise enzimática da fração de galactana da fração do resíduo. Entretanto, apenas o extrato comercial Pectinex Smash XXL foi capaz de hidrolisar a fração de galactana da amostra do resíduo, atingindo uma conversão máxima de 5,0% após 72h de reação. Assim, a conversão máxima da fração de galactana da amostra do resíduo com a utilização do extrato comercial Cellic CTec II foi de 14,7%, superior a conversão com o extrato comercial Pectinex Smash XXL (5,0%). Desta forma, a ideia foi suplementar o extrato Cellic CTec II com Pectinex Smash XXL para tentar propiciar uma melhor

conversão de galactana em galactose, além de manter a conversão de 100% de glucana em glicose. Os ensaios de hidrólise enzimática com a suplementação do extrato Pectinex Smash XXL ao extrato Cellic CTec II mostraram uma conversão máxima de galactana em galactose de 19,0%, porém, a conversão máxima de glucana em glicose foi de apenas 78,0%, sugerindo que o extrato Pectinex Smash XXL proporciona uma certa inibição ao extrato Cellic CTec II na reação de hidrólise enzimática da amostra do resíduo.

Na tentativa de melhorar os níveis de conversão de galactana em galactose da fração do resíduo de *K. alvarezii* foi produzido um extrato contendo atividades de galactanases a partir do fungo *Aspergillus* sp. Um ensaio de hidrólise enzimática contendo apenas o extrato concentrado de *Aspergillus* sp. e o resíduo mostrou uma conversão máxima de 35,0% de galactana em galactose, porém, a fração de glucana do resíduo não foi hidrolisada. Desta forma, o extrato comercial Cellic CTec II foi suplementado com o extrato *Aspergillus* sp. (obtido no laboratório) para tentar propiciar uma melhor conversão de galactana em galactose e manter a conversão de 100% de glucana em glicose. Os ensaios de hidrólise enzimática com a suplementação do extrato *Aspergillus* sp. ao extrato Cellic CTec II mostrou uma conversão máxima de galactana em galactose de 35,0% e de glucana em glicose de 95%, ambas em 72h de reação. O presente ensaio mostrou a melhor eficiência de conversão de hidrólise enzimática da fração de galactana da amostra do resíduo (35,0%). Entretanto, a atividade de galactanases produzidas a partir do fungo *Aspergillus* sp. foram muito baixas, mesmo após concentrar 100 vezes o extrato enzimático.

A fim de tentar melhorar a eficiência de hidrólise enzimática da fração de galactana da amostra do resíduo no ensaio com extrato comercial Cellic CTec II, foi proposto aumentar a carga enzimática (FPU/grama de substrato) em 10 vezes do extrato comercial Cellic CTec II. Esse ensaio mostrou uma conversão máxima de galactana em galactose de 30,0% e de glucana em glicose de 100%, ambas em 72h de reação. Além disso, o ensaio mostrou uma velocidade máxima de produção de glicose de $4,5 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ superior quando comparado ao ensaio com o extrato comercial Cellic CTec II com carga de 10 FPU/grama de substrato ($1,7 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$). Assim, neste presente ensaio em 4h de reação já foi possível atingir uma conversão de glucana em glicose de 92,7%, enquanto no ensaio com uma carga de 10 FPU/grama de substrato (10 vezes menor) a conversão atingida em 4 h de reação foi de 64,6%.

5.8. *Tratamento ácido brando após hidrólise enzimática com 100FPU de Cellic CTec II por grama de substrato*

O ensaio de hidrólise enzimática da fração do resíduo de *K. alvarezii* com uma carga enzimática do extrato comercial Cellic CTec II de 100 FPU por grama de substrato foi o mais eficiente na conversão de glucana em glicose (100%) e de galactana em galactose (29,6%), com exceção do extrato do fungo *Aspergillus* sp. que atingiu uma conversão de galactana em galactose de 35%. Entretanto, o nível de atividade de galactanases do extrato enzimático do fungo *Aspergillus* sp. foi muito baixo, tornando dificultosa sua produção. Desta forma, na tentativa de aumentar o nível de conversão de galactana em galactose da fração do resíduo

foram testados alguns experimentos com adição de ácido sulfúrico após 72 h de hidrólise enzimática da fração do resíduo utilizando-se o extrato comercial Cellic CTec II com uma carga enzimática de 100 FPU por grama de substrato (Tabela 15).

Os experimentos com ácido sulfúrico realizados em condições brandas da fração do resíduo de *K. alvarezii* após 72 h de hidrólise enzimática mostraram conversões finais de galactana em galactose e acúmulo de HMF que variaram de 38,6% a 47,4% e 0 a 0,079 g.L⁻¹, respectivamente, dependendo das condições experimentais testadas (Tabela 15). Além disso, a concentração de glicose no hidrolisado enzimático (9,3 g.L⁻¹, item 5.5.6) não foi alterada significativamente após o tratamento ácido em nenhuma das condições experimentais testadas (dados não mostrados). Desta forma, os tratamentos com ácido sulfúrico após a hidrólise enzimática proporcionaram um aumento percentual de conversão de galactana em galactose que variaram de 30,6% a 60,4%, dependendo das condições experimentais testadas (Tabela 15).

O maior aumento percentual obtido entre os tratamentos com ácido sulfúrico testados ocorreu na seguinte condição experimental: temperatura de 60°C, tempo de 90 minutos e concentração de ácido de 2% (%massa/massa). Nesta condição o percentual de aumento de conversão de galactana em galactose foi de 60,4% o que também culminou na formação de pequenas quantidades de HMF (0,01 g.L⁻¹) (Experimento 7, Tabela 15). Na condição mais drástica (Experimento 8, Tabela 15) houve um percentual de aumento de conversão de galactana em galactose de 53,1%, inferior aos 60,4% obtidos no experimento 7,

além disso, nesta condição (Experimento 8, Tabela 22) houve também o maior acúmulo de HMF (0,08 g/L), oito vezes maior ao encontrado no experimento 7 (Tabela 22).

Segundo reportado na literatura (59), concentrações inferiores a 1,5 g.L⁻¹ de HMF em hidrolisados contendo glicose e galactose não inibem de forma drástica fermentações alcoólicas realizadas com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Considerando que a melhor condição experimental para conversão de galactana em galactose (Experimento 7, Tabela 22) culminou em um acúmulo de apenas 0,01 g.L⁻¹ de HMF, podemos considerar o experimento 7 como melhor condição experimental para produção de galactose no hidrolisado enzimático.

Tabela 22. Conversão de galactana em galactose após hidrólise enzimática e conversão de galactana em galactose e formação de HMF após a hidrólise enzimática + tratamento ácido brando.

Variáveis				Conversão de galactana em galactose na hidrólise enzimática	Conversão de galactana em galactose após hidrólise enzimática + tratamento ácido	Aumento no nível de conversão após o tratamento ácido	Formação de HMF
Exp.	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Concentração (%)	(%)	(%)	(%)	g.L ⁻¹
1	60	30	0.5	29,6	40,5	36.9	0,000
2	80	30	0.5	29,6	38,6	30.6	0,001
3	60	90	0.5	29,6	41,1	39.1	0,001
4	80	90	0.5	29,6	41,1	39.1	0,004
5	60	30	2	29,6	38,4	29.9	0,005
6	80	30	2	29,6	38,7	30.9	0,014
7	60	90	2	29,6	47,4	60.4	0,013
8	80	90	2	29,6	45,3	53.1	0,079
9	70	60	1	29,6	43,7	47.7	0,018
10	70	60	1	29,6	43,8	48.2	0,010
11	70	60	1	29,6	38,7	30.9	0,006

6. Conclusão

O processamento da biomassa de *K. alvarezii* foi realizado com sucesso, o que gerou 4 frações, como se segue: amostra não tratada, tratada com KOH, resíduo e carragena semi-refinada. Os principais carboidratos poliméricos encontrados em todas as frações obtidas foram a galactana e glucana. Outros componentes importantes foram as cinzas, grupos sulfatos, proteínas e aromáticos insolúveis. A fração do resíduo mostrou ser um substrato rico em glucanas enquanto que a carragena semi-refinada e a carragena comercial mostraram ser um substrato rico em cinzas e galactanas.

Os extratos enzimáticos comerciais Cellulase (Sigma), Cellic CTec II (Novozymes), Celluclast (Novozymes) mostraram atividades enzimáticas específicas de endoglucanases e exoglucanases similares entre eles. Entretanto, o extrato Cellic CTec II mostrou uma maior atividade enzimática de β -glicosidases comparado aos extratos Celluclast e Cellulase.

Os extratos enzimáticos comerciais Pectinase (Sigma), Pectinex Smash XXL (Novozymes) e Pectinex Ultra Clear (Novozymes) mostraram atividades enzimáticas específicas de galactanases totais similares entre eles.

Foi obtido um extrato enzimático com atividade de galactanases e β -galactosidases a partir do fungo *Aspergillus* sp. Entretanto, os níveis de atividade de galactosidases foi inferior ao reportado na literatura.

As três frações obtidas (amostra não tratada, tratada com KOH e o resíduo) foram hidrolisadas com os extratos comerciais contendo atividades de celulasas o que culminou em uma conversão completa de ambas amostras da fração

polissacarídica de glucana. Os extratos comerciais contendo atividades de galactanases foram menos eficientes quando comparado aos extratos contendo atividades de celulasas para a hidrólise de glucana das frações em estudo, atingindo uma conversão máxima de 80% de glucana em glicose.

Somente os extratos comerciais Cellic CTec II (Novozymes) e Pectinex Smash XXL (Novozymes) foram capazes de hidrolisar a fração de galactana da amostra do resíduo, atingindo uma conversão máxima de 14,7%. Além disso, a mistura entre os dois extratos (Cellic CTec II + Pectinex Smash XXL) mostrou um aumento na conversão de galactana em galactose, atingindo um valor de 19% de conversão. Entretanto, também houve uma diminuição na conversão de glucana em glicose (78%), quando comparando com a conversão obtida utilizando o extrato Cellic CTec II individualmente (100%).

A fração do resíduo de *K. alvarezii* mostrou um nível de conversão de galactana em galactose de 35% quando hidrolisado enzimaticamente com o extrato produzido a partir de *Aspergillus* sp. Entretanto, o presente extrato individualmente não foi capaz de hidrolisar a fração de glucana do presente material. Além disso, a mistura entre os dois extratos (Cellic CTec II + *Aspergillus* sp.) mostrou o mesmo nível de conversão de galactana em galactose (35%), porém com uma conversão máxima de glucana em glicose de 95%.

Os testes com extrato enzimático comercial Cellic CTec II com 100FPU por grama de substrato na hidrólise enzimática da fração do resíduo de *K. alvarezii* após as quatro primeiras horas mostraram uma conversão de glucana em glicose e de galactana em galactose de 92,6% e 17,9%, respectivamente. Além disso, ao

final de 72 h de reação a conversão de glucana em glicose e de galactana em galactose atingiram 100% e 30%, respectivamente.

O tratamento com ácido sulfúrico da fração do resíduo de *K. alvarezii* após 72 h de hidrólise enzimática com o extrato enzimático comercial Cellic CTec II com 100FPU por grama de substrato mostrou um aumento percentual na conversão de galactana em galactose em 60,4% na melhor condição experimental avaliada (atingindo uma conversão final de galactana em galactose de 47,4%). Além disso, a concentração de glicose no hidrolisado enzimática após o tratamento com ácido sulfúrico ficou no mesmo patamar observado após as 72 h de hidrólise enzimática prévio a etapa do tratamento com ácido sulfúrico.

Os resultados de hidrólise enzimática da fração do resíduo indicam que pode haver um potencial de produção de bioprodutos a partir do melhor aproveitamento do resíduo gerado no processamento de carragena. Um exemplo seria a produção de etanol a partir de hidrolisado de glicose + galactose. Assim, como o resíduo obtido não é considerado uma fonte de alimento esse método poderia ser considerado como um modelo de produção de biocombustíveis de quarta geração.

Em resumo, temos demonstrado um novo aspecto dentro do conceito de biorrefinarias de *K. alvarezii* para produzir não somente carragena, mas também bioprodutos a partir do hidrolisado de glicose + galactose. Esses avanços podem contribuir para uma melhor concepção de estratégias de produção de biocombustíveis no setor de produção de hidrocoloides.

7. Referências

1. Mendes FM, Siqueira G, Carvalho W, Ferraz A, Milagres AMF. Enzymatic hydrolysis of chemithermomechanically pretreated sugarcane bagasse and samples with reduced initial lignin content. *Biotechnol Prog.* 2011;27(2):395–401.
2. Wi SG, Kim HJ, Mahadevan SA, Yang DJ, Bae HJ. The potential value of the seaweed Ceylon moss (*Gelidium amansii*) as an alternative bioenergy resource. *Bioresour Technol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2009;100(24):6658–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.07.017>
3. Martone PT, Estevez JM, Lu F, Ruel K, Denny MW, Somerville C, et al. Discovery of Lignin in Seaweed Reveals Convergent Evolution of Cell-Wall Architecture. *Curr Biol.* 2009;19(2):169–75.
4. Ge L, Wang P, Mou H. Study on saccharification techniques of seaweed wastes for the transformation of ethanol. *Renew Energy* [Internet]. Elsevier Ltd; 2011;36(1):84–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2010.06.001>
5. John RP, Anisha GS, Nampoothiri KM, Pandey A. Micro and macroalgal biomass: A renewable source for bioethanol. *Bioresour Technol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2011;102(1):186–93. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.139>
6. Wei N, Quarterman J, Jin YS. Marine macroalgae: An untapped resource for producing fuels and chemicals. *Trends Biotechnol* [Internet]. Elsevier

- Ltd; 2013;31(2):70–7. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.10.009>
7. Ahmad a. L, Yasin NHM, Derek CJC, Lim JK. Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: A review. *Renew Sustain Energy Rev* [Internet]. Elsevier Ltd; 2011;15(1):584–93. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2010.09.018>
 8. Harun R, Danquah MK. Influence of acid pre-treatment on microalgal biomass for bioethanol production. *Process Biochem* [Internet]. Elsevier Ltd; 2011;46(1):304–9. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2010.08.027>
 9. Masarin F, Gurpilhares DB, Baffa DC, Barbosa MH, Carvalho W, Ferraz A, et al. Chemical composition and enzymatic digestibility of sugarcane clones selected for varied lignin content. *Biotechnol Biofuels* [Internet]. 2011;4(1):55. Available from:
<http://www.biotechnologyforbiofuels.com/content/4/1/55>
 10. Lewandowski I, Scurlock JMO, Lindvall E, Christou M. The development and current status of perennial rhizomatous grasses as energy crops in the US and Europe. *Biomass and Bioenergy*. 2003;25(4):335–61.
 11. de Góes HG, Reis RP. Temporal variation of the growth, carrageenan yield and quality of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) cultivated at Sepetiba bay, southeastern Brazilian coast. *J Appl Phycol*. 2012;24(2):173–80.
 12. Hayashi L, Faria GSM, Nunes BG, Zitta CS, Scariot L a., Rover T, et al.

- Effects of salinity on the growth rate, carrageenan yield, and cellular structure of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) cultured in vitro. *J Appl Phycol*. 2011;23(3):439–47.
13. Hayashi L, Oliveira EC, Bleicher-Lhonneur G, Boulenguer P, Pereira RTL, Von Seckendorff R, et al. The effects of selected cultivation conditions on the carrageenan characteristics of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Solieriaceae) in Ubatuba Bay, São Paulo, Brazil. *J Appl Phycol*. 2007;19(5):505–11.
 14. Hayashi L, de Paula EJ, Chow F. Growth rate and carrageenan analyses in four strains of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) farmed in the subtropical waters of São Paulo State, Brazil. *J Appl Phycol* [Internet]. 2007;19(5):393–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s10811-006-9135-6>
 15. Intelligence M. Global Carrageenan Market- Trends and Forecasts:(2017 - 2022 (Segmented by types, applications, grades and geography). Hyderabad; 2017.
 16. Yanagisawa M, Nakamura K, Ariga O, Nakasaki K. Production of high concentrations of bioethanol from seaweeds that contain easily hydrolyzable polysaccharides. *Process Biochem* [Internet]. Elsevier Ltd; 2011;46(11):2111–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2011.08.001>
 17. Chen H. Biotechnology of lignocellulose: Theory and practice. *Biotechnology of Lignocellulose: Theory and Practice*. 2014. 1-511 p.

18. Yaich H, Garna H, Besbes S, Paquot M, Blecker C, Attia H. Chemical composition and functional properties of *Ulva lactuca* seaweed collected in Tunisia. *Food Chem* [Internet]. Elsevier Ltd; 2011;128(4):895–901. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.114>
19. Meinita MDN, Kang JY, Jeong GT, Koo HM, Park SM, Hong YK. Bioethanol production from the acid hydrolysate of the carrageenophyte *Kappaphycus alvarezii* (cottonii). *J Appl Phycol*. 2012;24(4):857–62.
20. Kim NJ, Li H, Jung K, Chang HN, Lee PC. Ethanol production from marine algal hydrolysates using *Escherichia coli* KO11. *Bioresour Technol*. 2011;102(16):7466–9.
21. Jang S, Shirai Y, Uchida M, Wakisaka M. Production of mono sugar from acid hydrolysis of seaweed. *African J Biotechnol* [Internet]. 2012;11(8):1953–63. Available from: <http://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/100367>
22. Yoon JJ, Kim YJ, Kim SH, Ryu HJ, Choi JY, Kim GS, et al. Production of Polysaccharides and Corresponding Sugars from Red Seaweed. *Adv Mater Res*. 2010;93–94:463–6.
23. Masarin F, Ferraz A. Evaluation of *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden biopulping with *Ceriporiopsis subvermispora* under non-aseptic conditions. *Holzforschung*. 2008;62(1):1–7.
24. Vicentim MP, De Almeida Faria R, Ferraz A. High-yield kraft pulping of *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden biotreated by *Ceriporiopsis subvermispora* under two different culture conditions. *Holzforschung*.

- 2009;63(4):408–13.
25. Ramos LP. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. *Quim Nova* [Internet]. SBQ; 2003 Dec [cited 2016 Oct 18];26(6):863–71. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422003000600015&lng=en&nrm=iso&tlng=en
 26. Martins LF, Kolling D, Camassola M, Dillon AJP, Ramos LP. Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates. *Bioresour Technol.* 2008;99(5):1417–24.
 27. Gilkes NR, Henrissat B, Kilburn DG, Miller RC, Warren R a. Domains in microbial beta-1, 4-glycanases: sequence conservation, function, and enzyme families. *Microbiol Rev* [Internet]. 1991;55(2):303–15. Available from: <http://mmbr.asm.org/content/55/2/303.abstract>
 28. Klyosov a a. Trends in biochemistry and enzymology of cellulose degradation. *Biochemistry.* 1990;29(47):10577–85.
 29. Jørgensen H, Olsson L. Production of cellulases by *Penicillium brasilianum* IBT 20888 - Effect of substrate on hydrolytic performance. *Enzyme Microb Technol.* 2006;38(3–4):381–90.
 30. Lu Y, Yang B, Gregg D, Saddler JN, Mansfield SD. Cellulase adsorption and an evaluation of enzyme recycle during hydrolysis of steam-exploded softwood residues. *Appl Biochem Biotechnol.* 2002;98–100:641–54.
 31. Berlin A, Gilkes N, Kilburn D, Bura R, Markov A, Skomarovsky A, et al.

- Evaluation of novel fungal cellulase preparations for ability to hydrolyze softwood substrates - Evidence for the role of accessory enzymes. *Enzyme Microb Technol.* 2005;37(2):175–84.
32. Brienzo M, Arantes V, Milagres AMF. Enzymology of the thermophilic ascomycetous fungus *Thermoascus aurantiacus*. *Fungal Biol Rev* [Internet]. Elsevier Ltd; 2008;22(3–4):120–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbr.2009.04.001>
 33. Henning Jørgensen JBK and CF. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. *Biofuels, Bioprod Biorefining.* 2007;1:119–34.
 34. Craigie JS. Cell Walls. In: *Biology of the red algae*, New York. New York: Cambridge University Press; 1990. p. 221–57.
 35. Myslabodski DE, Stancioff D, Heckert RA. Effect of acid hydrolysis on the molecular weight of kappa carrageenan by GPC-LS. *Carbohydr Polym.* 1996;31:83–92.
 36. Liu GL, Li Y, Chi Z, Chi ZM. Purification and characterization of ??-carrageenase from the marine bacterium *Pseudoalteromonas porphyrae* for hydrolysis of ??-carrageenan. *Process Biochem* [Internet]. Elsevier Ltd; 2011;46(1):265–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2010.08.021>
 37. Guibet M, Kervarec N, Génicot S, Chevolot Y, Helbert W. Complete assignment of ¹H and ¹³C NMR spectra of *Gigartina skottsbergii* ??-carrageenan using carrabiose oligosaccharides prepared by enzymatic

- hydrolysis. Carbohydr Res. 2006;341(11):1859–69.
38. Araujo A, Ward OP. Extracellular mannanases and galactanases from selected fungi. J Ind Microbiol. 1990;6(3):171–8.
 39. Yamaguchi F, Inoue S, Hatanaka C. Purification and Properties of Endo-B-I,4-D-galactanase from *Aspergillus niger*. Biosci Biotech Biochem. 1995;59(December):1742–4.
 40. Sluiter A, Hames B, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter J, Templeton D. Determination of ash in biomass: Laboratory Analytical Procedure (LAP). Nrel/Tp-510-42622 [Internet]. 2005;(April 2005):18. Available from: <http://www.nrel.gov/docs/gen/fy08/42622.pdf>
 41. Ferraz A, Baeza J, Rodriguez J, Freer J. Estimating the chemical composition of biodegraded pine and eucalyptus wood by DRIFT spectroscopy and multivariate analysis. Bioresour Technol. 2000;74(3):201–12.
 42. Hames B, Scarlata C, Nrel a S. Determination of Protein Content in Biomass. L 42625. 2008;(May).
 43. Hartree EF. Determination of protein: A modification of the lowry method that gives a linear photometric response. Anal Biochem. 1972;48(2):422–7.
 44. Yu EKC, Tan LUL, Chan MKH, Deschatelets L, Saddler JN. Production of thermostable xylanase by a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*. Enzyme Microb Technol. 1987;9(1):16–24.
 45. TANAKA M, TANIGUCHI M, MATSUNO R, KAMIKUBO T. Purification and Properties of Cellulases from *Eupencillium javanicum* : Studies on the Re-

- utilization of Cellulosic Resources(VII). J Ferment Technol [Internet]. The Society for Biotechnology, Japan; 1981 Jun [cited 2016 Jul 26];59(3):177–83. Available from: <http://ci.nii.ac.jp/naid/110002672575/en/>
46. Miller GL. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. Anal Chem. 1959;31(3):426–8.
 47. Ghose TK. Measurement of cellulase activities. Pure Appl Chem [Internet]. 1987;59(2):257–68. Available from: <http://www.iupac.org/publications/pac/1987/pdf/5902x0257.pdf%5Cnhttp://www.degruyter.com/view/j/pac.1987.59.issue-2/pac198759020257/pac198759020257.xml>
 48. Monti R. Produção de celulase e xilanase pelo fungo termófilo *Humicola grisea* variedade *thermoidea* RP-17: fatores que afetam a produção e propriedades bioquímicas das enzimas. Universidade de São Paulo; 1989.
 49. VOGEL HJ. A convenient growth medium for *Neurospora* (Medium N). Microbiol Genet Bull. 1956;13:42–3.
 50. PEREIRA FILHO ER. Planejamento fatorial em química: maximizando a obtenção de resultados. EdUFSCar. 2015;88p.
 51. Yun EJ, Kim HT, Cho KM, Yu S, Kim S, Choi IG, et al. Pretreatment and saccharification of red macroalgae to produce fermentable sugars. Bioresour Technol. 2016;199:311–8.
 52. Sluiter JB, Ruiz RO, Scarlata CJ, Sluiter AD, Templeton DW. Compositional analysis of lignocellulosic feedstocks. 1. Review and description of methods. J Agric Food Chem. 2010;58(16):9043–53.

53. Abd-Rahim F, Wasoh H, Zakaria MR, Ariff A, Kapri R, Ramli N, et al. Production of high yield sugars from *Kappaphycus alvarezii* using combined methods of chemical and enzymatic hydrolysis. Food Hydrocoll [Internet]. Elsevier Ltd; 2014;42(P2):309–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.05.017>
54. Funder S. Practical mycology: manual for identification of fungi. 3rd ed. Hafner; 1968. 146 p.
55. Xiang Q, Lee YY, Torget RW. Kinetics of glucose decomposition during dilute-acid hydrolysis of lignocellulosic biomass. Appl Biochem Biotechnol. 2004;113–116(1):1127–38.
56. Aguilar R, Ramírez JA, Garrote G, Vázquez M. Kinetic study of the acid hydrolysis of sugar cane bagasse. J Food Eng. 2002;55(4):309–18.
57. Zinnai A, Venturi F, Quartacci MF, Andreotti A, Andrich G. The kinetic effect of some wine components on the enzymatic hydrolysis of ??-glucan. South African J Enol Vitic. 2010;31(1):9–13.
58. Froment GF, Bischoff KB, De Wilde J. Chemical Reactor Analysis and Design. 3rd Editio. 2010. 900 p.
59. Hargreaves PI, Barcelos CA, da Costa ACA, Pereira N. Production of ethanol 3G from *Kappaphycus alvarezii*: Evaluation of different process strategies. Bioresour Technol [Internet]. Elsevier Ltd; 2013;134:257–63. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.02.002>