

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
CURSO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS

APLICAÇÃO DE ENZIMAS EM RAÇÃO ANIMAL PARA RUMINANTES

Bruno Martins Campos

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
em cumprimento às exigências do curso de
Bacharelado em Engenharia de Bioprocessos
da Universidade Federal de São João Del-Rei

Orientador: Alessandra Costa Vilaça

Ouro Branco
Junho/2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
CURSO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS

APLICAÇÃO DE ENZIMAS EM RAÇÃO ANIMAL PARA RUMINANTES

Bruno Martins Campos

A Banca examinadora, composta pelos membros abaixo, avaliou este TCC:

Alessandra Costa Vilaça

Ênio Nazaré Oliveira Júnior

Flávia Donária Reis Gonzaga

Ouro Branco, 17/06/2015

Resumo

A pecuária é uma das atividades econômicas mais importantes do Brasil, tanto para exportação quanto para fornecimento interno do setor alimentício. Os ruminantes, em especial, bovinos, representam grande parte da pecuária brasileira. A alimentação desses animais é regida por suas necessidades nutricionais, modelo de pecuária, finalidade econômica e subprodutos agrícolas da região em que são criados. Para gerarem produtos de qualidade, lucro máximo para o produtor e redução de impactos ambientais da produção, o aproveitamento nutricional da dieta por parte dos ruminantes deve ser otimizado. Uma das possíveis maneiras de se conseguir esta otimização é pela adição de enzimas específicas à ração, capazes de melhorar a degradação dos nutrientes ingeridos pelos animais por meio de reações de hidrólise. Embora o organismo dos ruminantes tenha evoluído para se alimentar de vegetais, este tipo de alimentação, devido às características estruturais e bioquímicas, encontra alguns obstáculos para sua completa degradação no rúmen, especialmente animais muito jovens, que anatomicamente e fisiologicamente, comportam-se como monogástricos e demoram meses para serem capazes de digerir determinados nutrientes. Além da dificuldade na degradação dos nutrientes que são base da dieta, o organismo dos ruminantes precisa, ainda, lidar com componentes vegetais que desempenham efeitos antinutricionais que atrapalham a digestão, e enzimas hidrolíticas também se mostram como possíveis soluções para a minimização dos efeitos destes compostos. Nesta revisão bibliográfica, foram detalhados os aspectos bioquímicos teóricos nos quais se baseia a possibilidade de utilização de enzimas em ração animal para ruminantes, como as estruturas bioquímicas a serem degradadas e os mecanismos de ação das enzimas sobre estas estruturas. No entanto, a discrepância de resultados variando entre positivos e irrelevantes nos vários trabalhos publicados sobre utilização de enzimas em ração para ruminantes, sugere que muito ainda precisa ser feito para que esta tecnologia, que é bastante promissora, seja, de fato, dominada.

Palavras-chave: Alimentação de ruminantes, efeitos antinutricionais, enzimas hidrolíticas

Sumário

1.	Introdução	1
2.	Objetivos	4
3.	Revisão Bibliográfica	4
3.1	Agropecuária e alimentação de ruminantes no Brasil	4
3.2	Composição bioquímica da dieta dos ruminantes	5
3.3.	Fatores antinutricionais	6
3.3.1	Polissacarídeos não amiláceos	7
3.3.2	Inibidores de proteases	7
3.3.3	Taninos	8
3.3.4	Fitatos	10
3.4	Enzimas em ração animal para ruminantes	12
3.4.1	Fitases	13
3.4.2	Tanases	15
3.4.3	Celulases e Xilanases	17
3.4.4	Amilases	25
3.4.5	Pectinases	28
3.5	Estudos de casos e trabalhos futuros.....	30
4.	Conclusão	32
5.	Referências Bibliográficas	32

1. Introdução

Algumas moléculas de origem protéica que possuem estruturas terciárias e quaternárias são capazes de catalisar reações de diferentes naturezas. Estas moléculas de proteína são chamadas de enzimas, também conhecidas como catalisadores biológicos. As enzimas atuam diminuindo a energia de ativação de uma reação química específica, aumentando amplamente a velocidade desta, e sem ser consumida, o que significa que uma única molécula de enzima pode catalisar várias vezes uma reação [1].

Embora a biocatálise seja utilizada pelo homem há milênios em processos fermentativos para produção de queijo, pão e vinho, por exemplo, os primeiros registros científicos de catálise biológica são do século XVIII, em estudos relacionados à digestão de carne a partir de secreções estomacais, os quais levaram à constatação de que o processo digestivo não era meramente mecânico. Ainda no século XVIII, também foram feitos estudos sobre a conversão do amido em açúcar por saliva e extratos vegetais. Em meados do século XIX, Louis Pasteur postulou o vitalismo, que era a visão de que o processo fermentativo do açúcar em álcool era catalisado por “fermentos” que funcionavam juntamente com toda a estrutura viva das células, e, portanto, inseparáveis. O conceito do vitalismo de Pasteur, porém, foi desbancado por Eduard Buchner em 1897, quando este descobriu a possibilidade de fermentar açúcar em álcool apenas com extratos de levedura, levantando forte evidência de que os agentes catalisadores mantinham sua função ativa mesmo quando separados das células. Esses agentes catalisadores foram chamados de “enzimas” por Frederick W. Kühne [1].

Apesar das descobertas feitas no século XIX, apenas no início do século XX foi levantada a possibilidade de utilização técnica das enzimas. O químico japonês Jokishi Takamine foi o primeiro a perceber tal possibilidade, especialmente do uso de enzimas fúngicas, e foi o responsável por introduzi-las na indústria, tendo desenvolvido um processo fermentativo para produzir amilase fúngica em escala industrial, visto que, no Japão, vários alimentos eram produzidos por meio de processos envolvendo cogumelos chamados “koji” [7].

A aplicação de enzimas em processos industriais cresceu muito ao longo do século passado, mas tem crescido ainda mais nos últimos anos devido ao avanço tecnológico e às vantagens da substituição de catalisadores químicos por enzimas. Dentre os principais mercados estão as indústrias de alimentos e bebidas, detergentes,

biocombustíveis, aplicações técnicas e outros. O mercado global de enzimas foi estimado em 3,3 bilhões de dólares em 2010, tendo uma projeção de alcance de 4,4 bilhões de dólares até o fim de 2015, como é possível observar na Figura 1. O setor de aplicações técnicas pode ser dividido em enzimas para indústria têxtil, papel e celulose e, principalmente, etanol combustível [2].

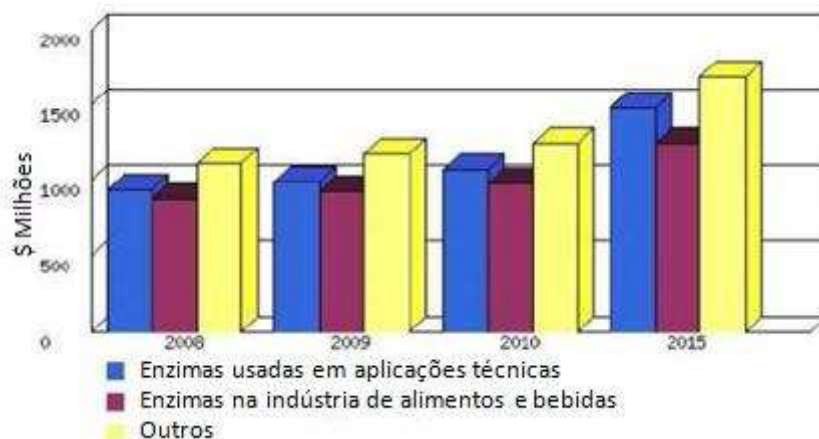


Figura 1. Crescimento do mercado global de enzimas entre os anos de 2008 ao fim de 2015.

Fonte: Adaptado de Enzymes in Industrial Applications: Global Markets (2015)

Na indústria de ração animal, o objetivo da adição de enzimas é otimizar o valor nutritivo da dieta, uma vez que, utilizadas como suplemento alimentar, as enzimas promovem um melhoramento da digestão, com aproveitamento de nutrientes que não se encontram disponíveis sem a suplementação [3].

A princípio, há duas finalidades básicas para a adição de enzimas na alimentação animal [4]:

- Complementação das próprias enzimas digestivas endógenas do animal.
- Fornecer enzimas exógenas, que não se encontram naturalmente disponíveis no organismo do animal.

O primeiro grupo visa fornecer enzimas que os animais já possuem naturalmente em seu sistema digestivo. Essa complementação proporciona um aumento da taxa de degradação do alimento e melhor aproveitamento nutritivo, aumentando assim a taxa de crescimento do ruminante. Animais jovens, que em determinada etapa da fase de crescimento não produzem certas enzimas endógenas em quantidades adequadas, são os que mais necessitam deste tipo de suplementação [3].

O segundo grupo engloba enzimas que não estão presentes naturalmente no organismo dos animais, tanto jovens quanto adultos, mas que são de grande importância para a otimização do aproveitamento nutricional da dieta, uma vez que tornam disponíveis nutrientes que não estão nesta condição quando submetidos apenas às enzimas endógenas. Elas podem, ainda, serem utilizadas para eliminar fatores anti-nutricionais, como metabólitos vegetais presentes na dieta do animal que interferem negativamente no processo digestivo [3], [4].

É possível, ainda, enumerar mais uma finalidade básica para a utilização de enzimas em ração animal, que é o fator ambiental. Quanto melhor o animal aproveita os nutrientes presentes em sua dieta, menor a excreção fecal, diminuindo a poluição causada principalmente pelo nitrogênio. Ainda referente ao fator ambiental, há enzimas que podem ser adicionadas especificamente com a finalidade de reduzir a poluição, como as que reduzem os níveis de fósforo excretado [3], [4].

A suplementação de enzimas em ração animal é bastante específica em relação à espécie. Ruminantes, suínos e aves possuem características digestivas completamente diferentes, bem como as necessidades nutricionais. Desta maneira, enzimas que são essenciais para o melhoramento do valor nutritivo da dieta de uma espécie não possuem, necessariamente, a mesma importância para outra. Outro fator importante para a determinação das enzimas que farão parte da composição da ração é a idade dos animais a serem alimentados, pois durante a fase de crescimento e desenvolvimento do animal, há etapas em que a síntese endógena de determinadas enzimas importantes é insatisfatória, ou até mesmo inexistente [4].

A alimentação animal, assim como a humana, possui imposições quanto à legislação. Embora o grau de pureza das enzimas adicionadas em ração animal não necessite ser alto, as biomoléculas precisam ter origem apropriada. O Ministério da Agricultura proíbe, por lei, segundo o artigo 3º da Instrução Normativa 49/2008 da Lei nº 6.198, que ruminantes sejam alimentados ou tratados com componentes de origem animal. Isto ocorre devido ao alto risco de contaminação com a Encefalopatia Espongiforme Bovina, popularmente conhecida como “doença da vaca louca” [5].

Considerando as limitações impostas pela legislação, a opção mais interessante para a obtenção das enzimas a serem adicionadas na ração animal é por fermentação microbiana, sendo esta a melhor maneira de se produzir biocatalisadores em grande escala e num curto período de tempo, além de possibilitar o uso de técnicas de biologia molecular para melhoramento do processo e viabilizar novos bioprodutos [3].

2. Objetivos

O presente trabalho tem como objetivo detalhar o embasamento teórico da aplicação de enzimas em rações para ruminantes, que visa melhoras em taxas de digestibilidade do alimento pelos animais. Para isso, traçou-se um paralelo entre a alimentação de ruminantes no Brasil, a composição bioquímica das dietas destes animais e o mecanismo de ação das enzimas hidrolíticas sobre os componentes bioquímicos ingeridos pelos ruminantes, bem como os efeitos esperados.

3. Revisão bibliográfica

3.1. Agropecuária e alimentação de ruminantes no Brasil

Para se formular a ração animal para ruminantes, assim como o suplemento de enzimas digestivas a ela, é necessário caracterizar a dieta destes animais. Como o Brasil é um país de proporções continentais, a alimentação dos ruminantes varia consideravelmente de região para região, de acordo com a produção agrícola e com os tipos de vegetação e forragem característicos das respectivas regiões.

Dentre as maiores produções agrícolas no Brasil, segundo a Embrapa e o IBGE, destacam-se amplamente em relação às demais a cana-de-açúcar, a soja e o milho [8], [9]. Desta forma, pode-se traçar um paralelo entre o perfil geral da produção agrícola no Brasil (majoritariamente cana-de-açúcar, milho e soja) e a nutrição de ruminantes. A Tabela 1 relaciona dados quantitativos e geográficos da produção agrícola em 2012.

Tabela 1: Quantidades anuais de alguns produtos agrícolas e principais produtores

Produto	Quantidade (toneladas)	Principais estados produtores
Cana-de-açúcar	721.077.287	SP, MG, GO, MS, MT, PR
Milho	72.979.500	MT, GO, MS, PR, SC, MG
Soja	66.383.000	MT, GO, MS, PR, RS, BA
Mandioca	23.044.557	MA, PA, BA, PR, SP, AM
Arroz	11.599.500	RS, SC, MA, MT, RO, TO
Café	3.037.534	MG, ES, SP, PR, RO, BA

Fonte dos dados: Conab, 2012.

Ou seja, os principais produtos agrícolas do país e as regiões nas quais são cultivados são parte crucial na determinação da dieta adotada para o gado ruminante, uma vez que a formulação da ração animal está associada aos principais subprodutos agrícola de uma determinada região, pois estes são o suporte da ração. Deve-se levar em consideração, evidentemente, as necessidades nutricionais da espécie segundo o interesse comercial (corte, leite, etc). Compõem a dieta dos animais, ainda, as forragens e vegetações nativas de cada região no caso de animais mantidos em regime de pasto. No entanto, a proporção desta dieta, assim como o regime diário do animal, divide a pecuária bovina em alguns modelos, que também são variáveis a serem consideradas para a formulação de uma ração [10].

Existem basicamente três tipos de modelos de produção de gado: extensivo, semi-extensivo e intensivo. O modelo extensivo é o mais comum, sendo largamente utilizado em todo o país. Neste modo de produção, a principal fonte da alimentação do gado é a forragem vegetal nativa da própria região, característica dos respectivos ecossistemas. O modelo semi-extensivo, mais utilizado na região centro-sul do país, é caracterizado por suplementação na dieta animal, porém com os animais sendo mantidos em regime de pasto, onde também se alimentam de vegetação nativa. Por fim, o modelo intensivo, no qual os animais são mantidos em regime de confinamento e sua alimentação se limita praticamente à silagem e à ração [11].

3.2. Composição bioquímica da dieta dos ruminantes

Para se relacionar as hidrolases a serem adicionadas na formulação da ração para ruminantes, bem como compreender a função de cada uma, é necessário caracterizar bioquimicamente a alimentação destes animais. Na seção anterior foram relacionados os principais produtos agrícolas do país, como a cana-de-açúcar e, especialmente, grãos (soja, milho, arroz, etc), sendo estes últimos utilizados como suporte para a maioria das rações. Também foram citadas as silagens e as forragens naturais como fonte de alimento para os ruminantes, e elas variam de acordo com o tipo de pecuária, finalidade e a região do país na qual é praticada.

Considerando esta base da alimentação dos ruminantes utilizada no Brasil, de um modo geral, os compostos bioquímicos e nutrientes ingeridos por animais ruminantes relevantes para o presente estudo são basicamente, carboidratos estruturais ou fibras (celulose e hemiceluloses), carboidratos de reserva (amido), dissacarídeos (sacarose, maltose, celobiose, etc), lipídeos (ácidos graxos e gorduras), proteínas e compostos de

natureza química diferentes, como fitatos e taninos, que desempenham efeitos antinutricionais na alimentação de ruminantes. Algumas das principais fontes de energia fornecidas pela alimentação, como as celuloses, podem também desempenhar efeitos antinutricionais.

As celuloses e hemiceluloses são provenientes das estruturas dos vegetais. Compõem a maior parte da massa seca de uma planta. O amido é o carboidrato de reserva dos vegetais, sendo mais concentrado em grãos (especialmente milho e arroz) e raízes (batata, mandioca). Os dissacarídeos são muito abundantes na natureza, e na dieta dos ruminantes, são provenientes da ingestão de resíduos de cana-de-açúcar, cevada, etc. Os lipídeos são provenientes principalmente da ingestão de oleaginosas, embora também sejam componentes estruturais de vegetais de outros tipos, e do leite, no caso de animais jovens. As proteínas são abundantes em qualquer ser vivo, e desta forma, são provenientes de todo tipo de dieta adotado para ruminantes. Também são abundantes no leite. Os fatores antinutricionais estão presentes em maior ou menor concentração em praticamente toda parte vegetal alimentação de ruminantes. Inibidores de proteases, taninos e fitatos, por exemplo, estão presentes em grandes concentrações em produtos como a soja, o sorgo, e outros [3].

As características bioquímicas destes substratos, tanto nutrientes quanto fatores antinutricionais, serão detalhadas mais adiante no estudo.

3.3. Fatores antinutricionais

Os fatores antinutritivos são aqueles que, de algum modo, proporcionam efeitos contrários à nutrição adequada. Podem ser gerados pelos alimentos *in natura*, assim como pela degradação ou inativação de alguns nutrientes [4], [12].

Os fatores antinutricionais podem possuir diversas naturezas bioquímicas, e são comumente encontrados em várias matérias-primas alimentícias, como na cevada (β -glucanos e arabinosilanos) e no café (taninos). Estes componentes antinutritivos não são caracterizados como tóxicos para o organismo dos animais, porém sua presença pode causar várias adversidades fisiológicas, não só diminuindo a disponibilidade dos nutrientes da dieta, como, em casos mais graves, até mesmo lesionando órgãos internos [12], [13].

As características dos fatores antinutricionais, assim como os efeitos provocados pela presença destes na dieta, dependem de suas concentrações na ração e de suas concentrações finais no processo digestivo. Vale destacar que as características

antinutritivas de um componente nem sempre estão associadas somente às propriedades químicas, bioquímicas e físicas do mesmo. A espécie do animal, assim como a natureza de sua microbiota, também é determinante [14], [4].

3.3.1. Polissacarídeos não amiláceos

Os chamados polissacarídeos não amiláceos (PNA's) são polissacarídeos formados por açúcares simples, mas devido à natureza das ligações bioquímicas entre seus resíduos, que são do tipo β -1,4, não conseguem ser hidrolisados no processo digestivo de animais com a mesma facilidade que o amido, por exemplo. No entanto, são nutrientes acessíveis para ruminantes adultos, que possuem sua microbiota já completamente desenvolvida, capaz de expressar as enzimas necessárias para a hidrólise de PNA's, que são as xilanases, celulasas e glucanases [4].

Os polissacarídeos não amiláceos, contudo, são problemáticos para animais ruminantes jovens. Isto ocorre porque, nos primeiros meses de vida, os animais ruminantes possuem anatomia e fisiologia do sistema digestivo muito similares à de animais monogástricos. Com a microbiota ainda pouco desenvolvida, a produção de algumas enzimas endógenas é inadequada ou inexistente nesta etapa da vida do animal [15].

Os PNA's, quando não hidrolisados, promovem efeitos antinutritivos por terem, evidentemente, baixa digestibilidade e por possuírem uma elevada capacidade de se ligarem à água, o que resulta num grande aumento na viscosidade do conteúdo intestinal. Tal aumento de viscosidade promove uma diminuição do aproveitamento de outros componentes da dieta, como gorduras, proteínas e carboidratos, pois os tornam fisicamente menos acessíveis às enzimas endógenas. Desta forma, a adição de enzimas capazes de hidrolisar PNA's na ração de ruminantes muito jovens visa a degradação dos complexos e fibras solúveis que promovem o aumento da viscosidade da digesta e, assim, proporcionar maior disponibilidade dos nutrientes, aumentar a taxa de crescimento do animal e ainda promover uma considerável diminuição na excreção das chamadas fezes úmidas [4].

3.3.2. Inibidores de proteases

Além dos PNA's, existem outros tipos de fatores antinutricionais oriundos de alimentos diferentes. Rações à base de grãos de soja, por exemplo, possuem fatores antinutricionais em grandes quantidades, principalmente os chamados inibidores de

proteases, que são proteínas e representam cerca de 6% de toda a carga protéica do grão de soja. Podem agir inibindo a ação da tripsina, quimotripsina e carboxipeptidase. Como o alvo dos inibidores de proteases são as próprias proteases, a hidrólise enzimática não cabe como solução para os efeitos deste tipo de fator antinutritivo [12].

3.3.3. Taninos

Os taninos são outro grande obstáculo para a nutrição de animais ruminantes, por causarem efeitos antinutricionais bastante evidentes. Trata-se de metabólitos vegetais flavonóides secundários, presentes em altas concentrações em dicotiledôneas herbáceas e lenhosas, soja, café, sorgo, uva, cacau e diversos outros vegetais. Embora em outros segmentos estes compostos sejam desejáveis em doses apropriadas, como nas indústrias de vinho e cerveja, devido aos efeitos de suas propriedades no paladar (promove adstringência), estes mesmos efeitos são a causa de grandes perdas de aproveitamento nutricional em alimentação animal [3], [16].

Os taninos podem ser divididos em dois tipos: hidrolisáveis ou não-hidrolisáveis (condensados).

Taninos hidrolisáveis são poliésteres ligados, na maioria das vezes, a um resíduo central de β -D-glicose; e hidroxilas esterificadas pelo ácido gálico (figura 2). Estes taninos são passíveis de serem submetidos à hidrólise enzimática.

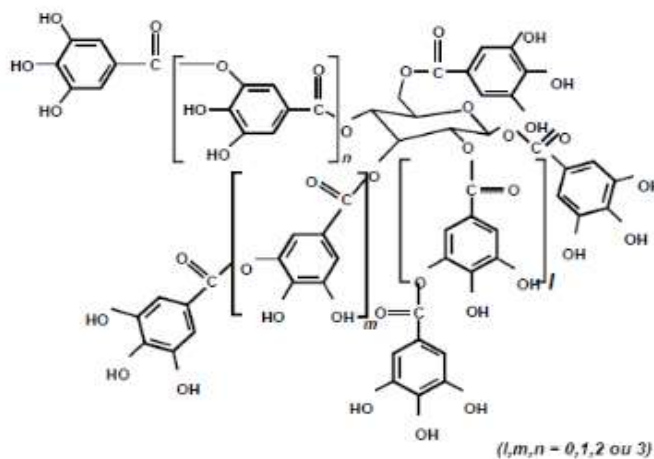


Figura 2. Estrutura molecular de um tanino hidrolisável

Fonte: NAKAMURA et al. (2003)

Taninos não hidrolisáveis, também chamados de condensados ou de proantocianidinas, são polímeros de flavan-3-ol e flavan-3,4-diol originados pelo metabolismo do fenilpropanol (figura 3). São normalmente encontrados em plantas

lenhosas e em alguns frutos, como uva e maçã. Na alimentação animal, a ingestão destes compostos é mais comum em pecuária exclusivamente extensiva [16].

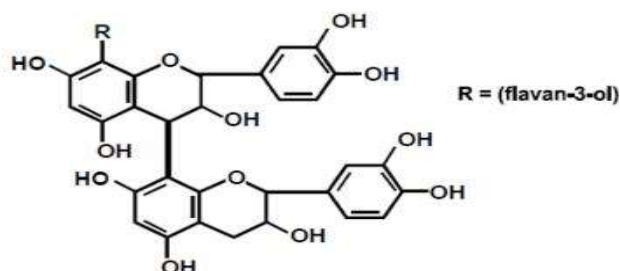


Figura 3. Estrutura química de um tanino condensado.

Fonte: LEHKA e LONSANE (1997)

As propriedades químicas dos taninos são muito particulares e, por esta razão, estes compostos são desejáveis em alguns segmentos e problemáticos em outros. Algumas destas propriedades são [16]:

- Capacidade de se complexarem com polissacarídeos como celulose e pectina, formando complexos insolúveis em água;
- Solubilidade em água;
- Capacidade de se complexarem com proteínas, promovendo a precipitação destas;
- Antioxidantes;
- Flexíveis (elásticos);

Quando animais ruminantes ingerem taninos, a propriedade destes compostos de se complexarem com proteínas promove uma precipitação de enzimas do processo digestivo, como enzimas celulolíticas, amilolíticas e proteolíticas. A complexação destas enzimas com as moléculas de tanino faz com que os animais tenham diminuída sua capacidade de degradar moléculas, uma vez que as enzimas precipitadas tornam-se indisponíveis para as reações de hidrólise, tendo tal diminuição, efeitos negativos consideráveis nas taxas de crescimento do animal. A capacidade dos taninos de se complexarem com polissacarídeos como celulose, amido, xilana, etc também se traduz em efeito antinutricional desses compostos, pois os complexos do tipo tanino-polissacarídeo são estáveis e insolúveis, promovendo diminuição da disponibilidade desses nutrientes e interferindo negativamente nas taxas de crescimento do animal [3], [16].

3.3.4. Fitatos

Os fitatos fazem parte de uma classe de compostos de ocorrência natural que se formam durante o processo de maturação de sementes e grãos de cereais. Nas sementes leguminosas, o ácido fítico pode corresponder a até 70% do total de fosfatos [19].

Quantidades substanciais de ácido fítico (fitato) ocorrem em dietas para a criação de animais ao redor do mundo. Esse ácido apresenta uma baixa digestibilidade em animais ruminantes jovens, que ainda são monogástricos, o que aumenta os custos para a produção, considerando que outras fontes de fósforo devem ser utilizadas para o fornecimento desse nutriente nas rações, para que o valor nutricional seja adequado [3].

As principais fontes de fitato na alimentação animal são os cereais, como a cevada, as sementes de leguminosas e oleaginosas, como a soja, como mostrado na Tabela 2. Entre outros fatores, os fitatos são capazes de formar complexos com algumas espécies químicas que são nutrientes importantes, como cálcio, magnésio, zinco e ferro, além de também formarem complexos com proteínas, aminoácidos ou enzimas endógenas [14].

Tabela 2. Conteúdo de fitato em diversos ingredientes da ração.

Ingredientes	Fósforo fítico (g/100 g MS*)	Fósforo fítico (% de fósforo total)
Milho	0,24	72
Cevada	0,27	64
Trigo	0,27	69
Aveia	0,29	67
Arroz	0,27	77
Farinha de arroz	10,31	80
Farinha de trigo	0,92	71
Farelo de raiz de mandioca	0,04	28

Adaptado de COUSINS (1999)

*Massa Seca

Estruturalmente, o fitato é um anel de mio-inositol completamente fosforilado, Figura 4. A sua estrutura é consistente com sua alta capacidade de quelar cátions multivalentes, possuindo capacidade de formação de complexos com Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} e Fe^{2+} . Esses complexos podem existir na forma solúvel ou na forma

de precipitados insolúveis, dependendo da concentração do ácido fítico, da concentração do mineral e do pH da solução [3].

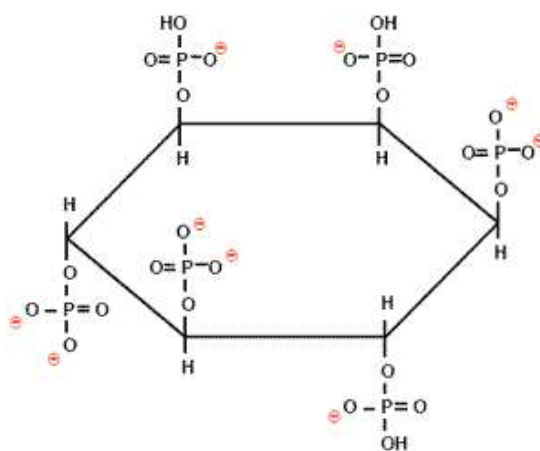


Figura 4. Estrutura do ácido fítico

Fonte: FERNÁNDEZ (2007)

Os grupos fosfatos carregados do fitato podem fazer associações eletrostáticas, especificamente no terminal amino com proteínas ou com grupo amino livre em resíduos de lisina e arginina [3].

Os complexos fitatos-minerais-proteínas podem ser formados com os cátions agindo como uma ponte entre os grupos fosfato carregados e o terminal carboxil de proteínas, Figura 5. Essa interação pode tornar a proteína menos susceptível à ação de proteases durante a passagem no intestino [3].

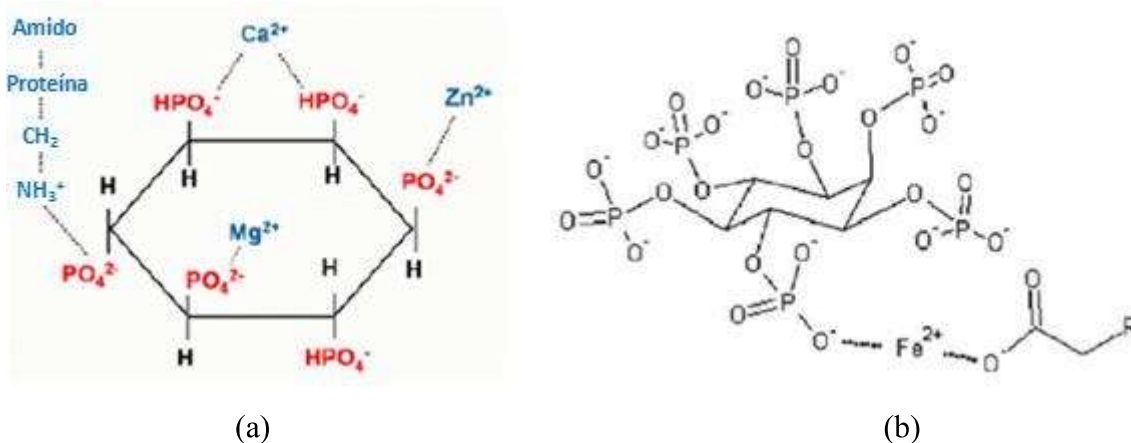


Figura 5. Exemplos de interações da molécula de fitato: (a) poder quelante do fitato sobre cátions multivalentes; (b) complexo fitato-mineral (ferro)-proteína.

Fonte: Adaptado de WEAVER e KANNAN (2002).

Os fitatos também possuem a capacidade de inibir a ação de várias enzimas endógenas, como pepsina, tripsina e α -amilase. Essa inibição ocorre, provavelmente, devido aos efeitos quelantes dos fitatos, agindo sobre os íons de cálcio, que são co-fatores para a ação de diversas enzimas, ou à formação de complexos fitato-enzimas menos reativos [20].

A interação do fitato com proteínas pode ter uma influência negativa na digestibilidade e absorção das proteínas e dos aminoácidos. Este tipo de interação é dependente do pH, a partir do comportamento descrito na Tabela 3 [20].

Tabela 3. Interações moleculares entre fitatos e proteínas de acordo com o pH.

<i>Condições de pH</i>	<i>Interação</i>
Baixo	Fitato forma interações eletrostáticas com resíduos como arginina, lisina e histidina, resultando em um complexo insolúvel.
Próximo ao ponto isoelétrico	A carga da proteína é neutra e ela não se liga ao fitato.
Alto	O fitato forma complexos com proteínas na presença de cátions divalentes (Ca, Mg, Zn, etc).

A poluição por fósforo também é uma grande preocupação, visto que as excreções dos animais são a fonte primária de fósforo na prática da agricultura. Sendo assim, a diminuição do ácido fítico, o qual não é aproveitado naturalmente pelo animal, promove a diminuição da carga de fósforo no ambiente proveniente da agricultura [4].

3.4. Enzimas em ração animal para ruminantes

A otimização do aproveitamento nutricional da dieta alimentar pelos animais ruminantes pode ser alcançada pela utilização de enzimas que auxiliem o processo de degradação dos nutrientes ao longo do processo digestivo. Vários obstáculos para um bom aproveitamento nutricional podem ser vencidos a partir de reações de hidrólise

promovidas por enzimas da classe das hidrolases, como os fatores antinutricionais, os monômeros de açúcares e proteínas que são pouco acessíveis devido a estruturas de difícil digestão [3].

Ruminantes adultos, com sua microbiota completamente desenvolvida, conseguem níveis relativamente bons de aproveitamento nutricional quando criados em pecuária extensiva ou semi-intensiva, pois se alimentam de forragens naturais, silagem e ração, estimulando a diversidade da microbiota. No entanto, os animais adultos criados em modelo de pecuária intensiva possuem microbiota limitada, pois se alimentam apenas de ração e são mantidos em regime de confinamento, não tendo acesso à microbiota diversificada do meio ambiente. Ou seja, para animais adultos, cada tipo de alimentação devido ao modelo de pecuária e à finalidade (leite ou corte) exigirá tipos específicos de enzimas hidrolíticas [3], [15].

Para animais jovens, no entanto, uma grande diversidade de hidrolases é necessária, uma vez que a produção de enzimas endógenas digestivas é deficiente nesta etapa da vida dos animais ruminantes, que nos primeiros meses de vida são chamados de ruminantes não funcionais, que na prática, são animais monogástricos [15].

Com base nestas distinções, e noutras citadas anteriormente, determinar-se-ão as enzimas a serem adicionadas na formulação de uma ração para ruminantes. As enzimas que podem ser utilizadas na indústria de ração animal serão citadas e analisadas a seguir.

3.4.1. Fitases

Uma maneira de promover a diminuição dos efeitos antinutricionais causados pelos fitatos ingeridos pelos animais, assim como o efeito poluente destes compostos, devido ao fósforo, é a aplicação de enzimas que hidrolisem esses fitatos, conhecidas como fitases. Estas enzimas são sintetizadas por vários tipos de micro-organismos, como bactérias, fungos e leveduras. Industrialmente, a fitase é obtida, na maioria das vezes, a partir do metabolismo de fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* [4].

A digestibilidade do fitato é altamente dependente da capacidade das fitases em degradá-lo. As enzimas fitases também são encontradas em plantas e animais, embora em menor quantidade neste último. A reação catalisada por essa enzima é uma hidrólise e é dependente da atividade total da fitase e das condições em que a reação ocorre [3].

O modo de ação dessa enzima consiste em transferir o grupo fosfato do substrato para a enzima e da enzima para a água, Figura 6. O fitato, durante o processo de

hidrólise, possui cinco classes de produtos intermediários, que são mio-inositol penta, tetra, tri, bi e monofosfatado [4].

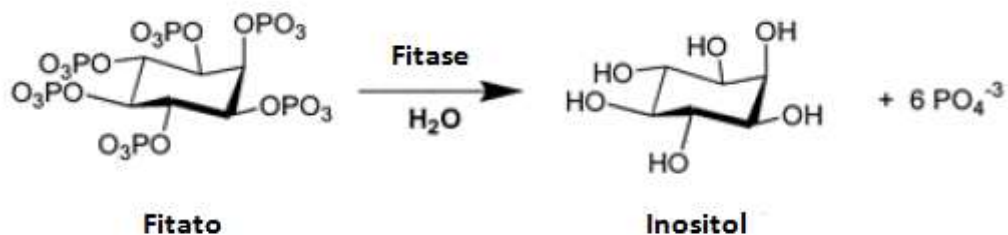


Figura 6. Mecanismo de ação da enzima fitase.

Fonte: Adaptado de MITTAL et al. (2011)

A fitase é uma fosfatase capaz de hidrolisar um ou mais grupos fosfatos na molécula de fitato e pode ter três classificações: 4/6-fitase, 3-fitase e 6-fitase. Essa classificação se dá pelo local da molécula de fitato em que a reação de hidrólise inicia-se, como mostra a Figura 7.

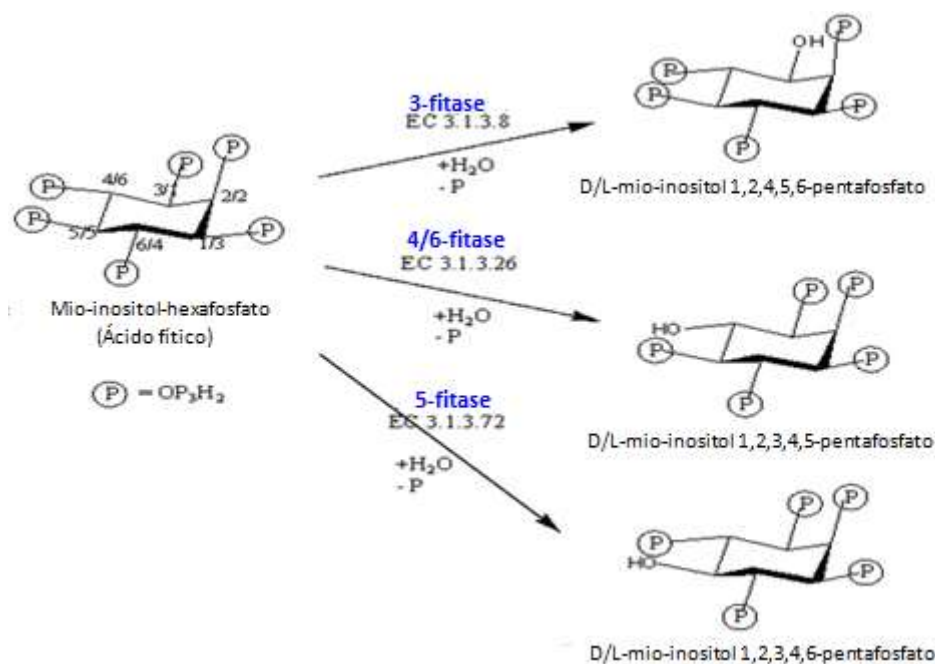


Figura 7. Classificação da enzima fitase de acordo com o grupo fosfato inicialmente hidrolisado.

Fonte: Adaptado de KEROVUO et al. (2000)

A fitase deve ser resistente ao processo de fabricação e armazenagem. Quando a ração, durante seu processo de fabricação, é submetida a altos valores de temperatura, a enzima pode desnaturar, perdendo sua atividade catalítica e o benefício de sua inclusão na dieta dos animais a partir da ração. Quando os processos de produção de ração

possuem etapas em que as temperaturas superam 75°C, recomenda-se que a enzima seja adicionada após tal etapa, por meio de aspersão. A fitase obtida por fermentação em escala industrial é extracelular, e se caracteriza como um pó amarelo pardo ou por um líquido incolor, que é submergido em tampão para a aspersão [20], [21].

A ação da fitase é máxima no rúmen dos animais adultos e no rúmen primitivo dos animais jovens, pois é extremamente resistente à ação da pepsina, que é a protease endógena que existe em maiores quantidades nesse órgão. No entanto, é pouco resistente à tripsina e quimotripsina, presentes no duodeno [3].

Além da já citada formação de complexos insolúveis entre o fitato e íons de metais multivalentes (Ca^{2+} , Mg^{2+} , etc), promovida pelo aumento da concentração de minerais, especialmente em ruminantes muito jovens, outro fator que influencia na eficiência da ação da fitase é o pH. Este, além de ter influência sobre a formação de complexos insolúveis fitato-minerais, como a ligação do fitato ao Zn^{2+} , por exemplo, que é favorecida em valores de pH próximos ao neutro, altera a estrutura tridimensional da proteína da fitase. Ou seja, a diminuição dos valores de pH acarreta na diminuição dos efeitos inibitórios dos minerais [3].

A adição de produtos contendo fitase na dieta de animais ruminantes jovens é uma prática que tem potencial para aumentar a utilização do fósforo proveniente da molécula de fitato e diminuir a saída de fósforo nas fezes. No entanto, a fitase é importantíssima pelo fato de também minimizar os efeitos antinutricionais dos fitatos, que diminui a digestibilidade de proteínas, sendo a digestão destas biomoléculas a mais importante para a aceleração da taxa de crescimento do animal, devido à contribuição disso para o aumento das fibras musculares, etc [3].

3.4.2. Tanases

Assim como o fitato, que pode ter seus efeitos antinutricionais minimizados pela fitase, os problemas digestivos causados pelos taninos, que também são fatores antinutritivos, podem ser minimizados pela ação de outra hidrolase, que é a tanase. A tanase é uma enzima que hidrolisa ésteres e ligações laterais de taninos hidrolisáveis, produzindo glicose e ácido gálico. Esta enzima pode ser produzida por diversos tipos de micro-organismos, mas fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* são mais eficientes em produzir a enzima por fermentação na presença de ácido tânico, que é o método para produção de tanases [16].

A reação catalisada pela tanase é mostrada na Figura 8:

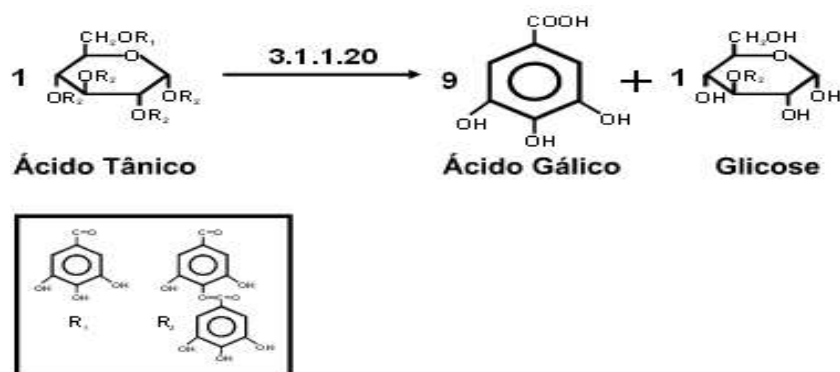


Figura 8. Reação catalisada pela tanase (3.1.1.20).

Fonte: BATTESTIN et al. (2004)

A expressão desta enzima pode ser intra ou extracelular, inclusive para uma mesma cepa microbiana. O tipo de ocorrência da enzima pode ser determinado pelas características do processo fermentativo, pois a tanase é extracelular quando produzida por fermentação em estado sólido (por *Aspergillus*), mas permanece adsorvida ao micélio quando é produzida por fermentação submersa [16].

A tanase é uma glicoproteína esterase e pode ser separada em duas esterases, sendo uma específica para ésteres alifáticos como o metilgalato, e uma depsidase, que hidrolisa ligações depsídicas, como o ácido m-gálico. Esta enzima se mantém estável numa faixa de pH entre 3,5 e 8,0 e em temperaturas entre 30°C e 60°C. Suas condições ótimas de pH e temperatura são, respectivamente, 5,5 – 6,0 e 30 – 40°C. A tanase pode ser inibida por íons metálicos bivalentes, como Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} e Mn^{2+} , além de outras substâncias químicas, como sulfatos e cloretos de cálcio e magnésio [16].

A utilização desta enzima pode se dar de duas maneiras: por contato direto dos extratos enzimáticos (purificados ou não) com o material a ser tratado, e assim hidrolisando os polifenóis, a fim de evitar complexações e polimerizações indesejadas; ou pelo cultivo de linhagens de fungos produtores de tanase em substratos ricos em taninos, os quais são degradados a compostos mais simples que não possuem as características problemáticas dos taninos. Assim, a tanase não precisa ser purificada antes de ser adicionada à ração, o que elevaria consideravelmente o preço da mesma, diminuindo o índice de custo/benefício para o produtor [16].

Desta maneira, as tanases podem ser adicionadas às rações para ruminantes com o intuito de impedir que os taninos presentes na composição da ração ou em outra parte da alimentação dos ruminantes (em casos de pecuária extensiva ou semi-intensiva) diminuam o valor nutricional da dieta, agindo como fatores antinutricionais,

especialmente complexando-se a carboidratos e proteínas (tornando-os indisponíveis) e complexando-se a outras enzimas importantes no processo digestivo, inutilizando-as. Vale ressaltar que a ação da tanase ainda fornece glicose, que é oriunda da hidrólise das moléculas de tanino.

3.4.3. Celulases e Xilanases

A celulose e a hemicelulose são os polissacarídeos mais abundantes do planeta, podendo chegar a 70% da massa de uma planta. A parede celular é constituída de 40% a 45% de celulose. Além disso, servem como fontes renováveis para a indústria alcooleira, indústrias têxteis, indústrias de papel e celulose e na indústria de ração animal (principalmente para ruminantes). Estes polissacarídeos não amiláceos são um paradoxo para a alimentação animal, pois se por um lado podem agir como fatores antinutricionais enquanto não são hidrolisados, por outro eles representam a maior fonte de carboidratos da dieta da maioria dos ruminantes, à exceção de alguns casos ligados à pecuária intensiva [3].

Anteriormente, foram descritas as características antinutricionais dos polissacarídeos não amiláceos. Agora será descrita a relação entre as propriedades estruturais dessas moléculas e a ação das enzimas celulolíticas, uma vez que a quebra da estrutura da celulose não se resume a apenas um tipo de hidrólise. A celulose é um polímero linear, com estrutura primária simples formada por resíduos de glicose unidos por ligações do tipo β -1,4 (Figura 9), [3], [22].

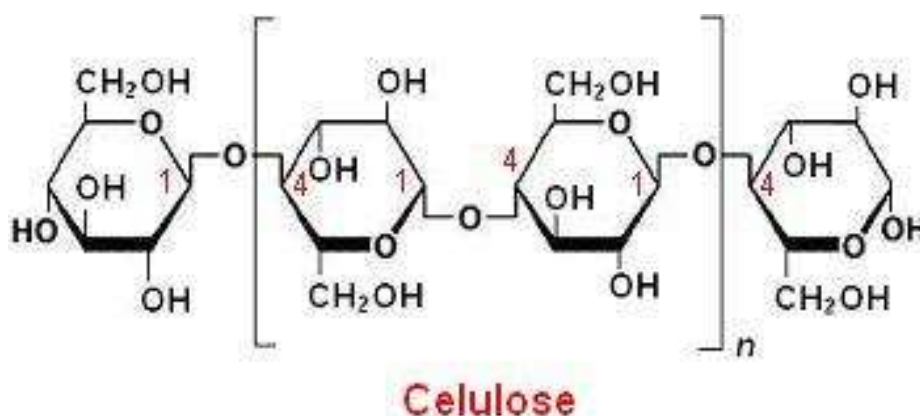


Figura 9. Ligações β -1,4 glicosídicas da molécula de celulose.

Fonte: Adaptado de LEHNINGER, Princípios de Bioquímica (2000)

O grau de polimerização de uma cadeia de celulose varia de 500 a 14000 unidades. As cadeias de celulose estão orientadas em paralelo, com diferentes graus de ordenação. Em algumas regiões da molécula, as cadeias possuem um alto grau de ordenação e estão fortemente ligadas por pontes de hidrogênio, formando a região cristalina, enquanto em outras regiões encontra-se a cadeia com um menor grau de organização, que é a chamada região amorfa. Essas regiões descritas podem ser observadas na Figura 10 a seguir. O grau de cristalização das cadeias glicosídicas da celulose pode variar de acordo com a sua origem ou de acordo com o tratamento utilizado na celulose isolada [23].

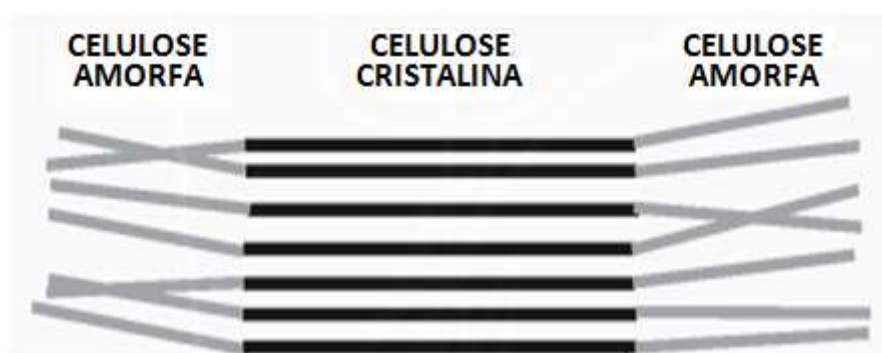


Figura 10. Regiões cristalina e amorfa da estrutura molecular da celulose.

Fonte: QUIRÓZ-CASTAÑEDA e FOLCH-MALLOL (2013)

As regiões cristalinas da celulose formam uma estrutura rígida que não é susceptível à ação das endo-celulases, enquanto as regiões amorfas possuem maior susceptibilidade à ação de enzimas. Pode se obter a degradação otimizada da celulose por meio de dois caminhos: a hidrólise química ou um conjunto de enzimas atuando conjuntamente de modo a catalisar reações de hidrólise tanto na região cristalina quanto na região amorfa [23].

A ação conjunta das enzimas para a degradação da celulose é chamada de sinérgica. O sinergismo pode ser definido como o aumento do efeito catalítico de duas ou mais enzimas agindo de forma conjunta [23].

Essa ação sinérgica enzimática para a degradação da celulose, mostrada na Figura 11 a seguir, normalmente envolve três tipos de enzimas: exoglucanases, endoglucanases e β -glucosidases [24].

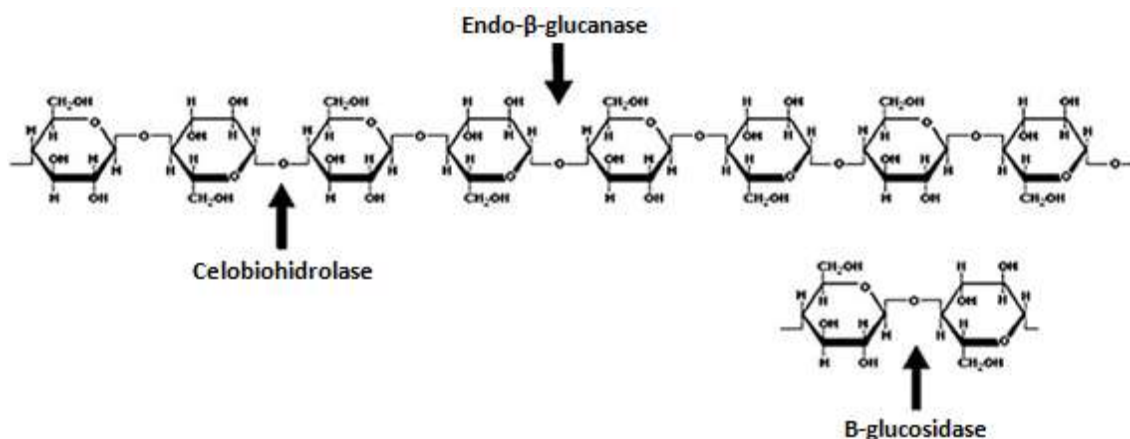


Figura 11. Ação sinérgica das endoglucanases, exoglucanases (celobiohidrolase) e β-glucosidases.

Fonte: Adaptado de (KUMAR, et al., 2008)

As endoglucanases, ou endo-1,4- β-glucanases, são as enzimas responsáveis por iniciar o processo de hidrólise da celulose. O prefixo 'endo' é referente ao local de ação da enzima na molécula de celulose. Esta enzima age de maneira aleatória no interior da molécula, promovendo a hidrólise de ligações β-1,4-glicosídicas (Figura 12) na região amorfa da celulose, porém são praticamente inativas na região cristalina da celulose e sobre a celobiose [3], [23].

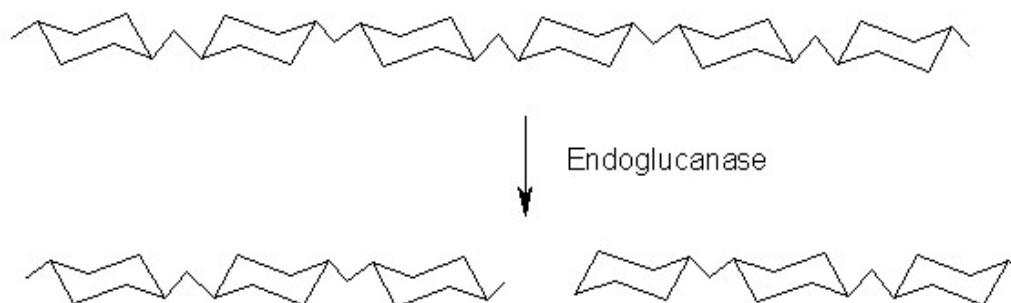


Figura 12. Mecanismo de ação da endoglucanase sobre a celulose.

Fonte: Adaptado de Key Centre of Polymer and Colloids (2015)

Como resultado da ação da endoglucanase, tem-se uma diminuição do grau de polimerização e formação de novos terminais redutores e não redutores, sendo estes últimos, alvos da ação de outras enzimas na reação de hidrólise completa da celulose.

Outro tipo de enzima que também atua na hidrólise da celulose é a exo-1,4-β-glucanase, também chamada de celobiohidrolase. Assim como as endoglucanases, essa enzima age catalisando as ligações β-1,4 glicosídicas, porém não atuam de maneira

aleatória no interior da molécula de celulose. Essas exoglucanases atuam nas regiões terminais da celulose, liberando moléculas de celobiose (Figura 13) [23], [24].

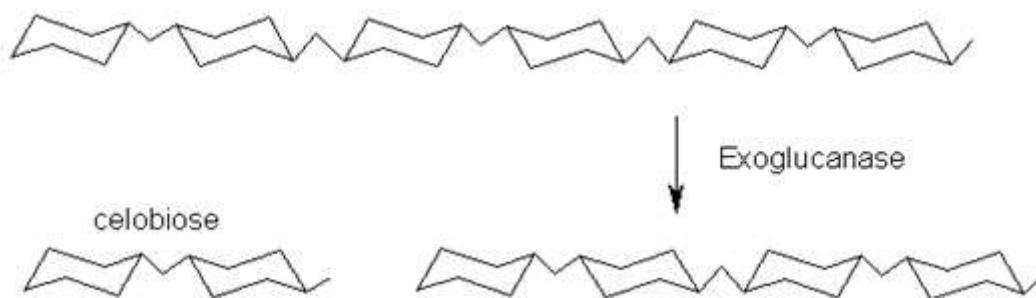


Figura 13. Ação da exoglucanase, gerando dímeros de celobiose à partir da hidrólise da celulose.

Fonte: Adaptado de Key Centre of Polymer and Colloids (2015)

As exoglucanases (celobiohidrolases) apresentam uma alta atividade na região amorfa da celulose, no entanto também apresenta atividade na região cristalina, embora menor, e sobre a celobiose [23].

Geralmente, as celobiohidrolases atacam as cadeias de celulose a partir dos terminais não redutores, porém existem dois tipos dessa enzima (Figura 14). Enquanto o tipo I catalisa preferencialmente a partir do terminal redutor, o tipo II catalisa preferencialmente a reação de hidrólise da celulose a partir do terminal não redutor [23].

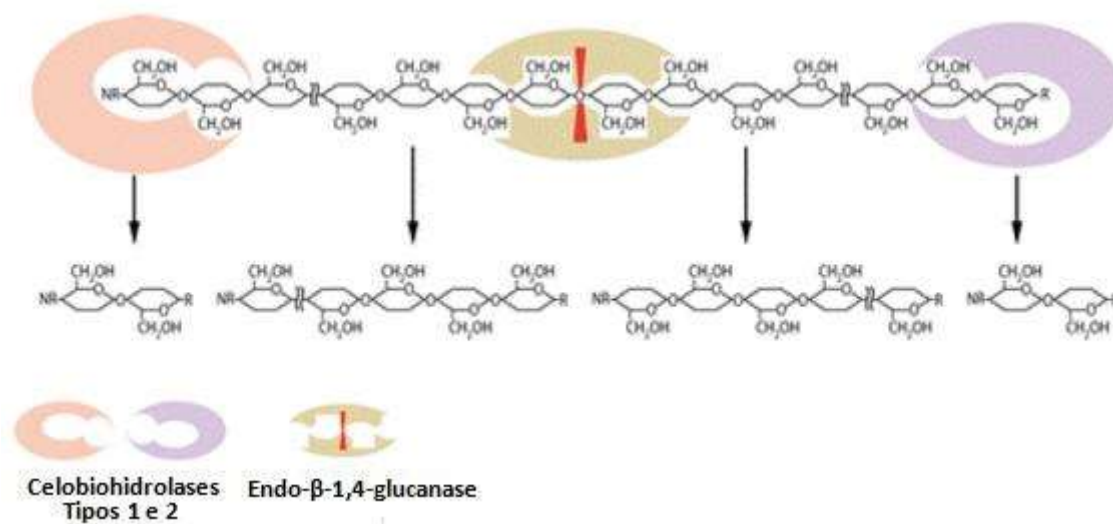


Figura 14. Celobiohidrolases do tipo I agindo no terminal redutor (direita) e do tipo II agindo no terminal não redutor (esquerda).

Fonte: Adaptado de WATANABE & TOKUDA (2010).

As celobiohidrolases são importantes para o processo de hidrólise, pois é a responsável pela amorfogênese no restante da cadeia da celulose. Ou seja, ao catalisar a reação de hidrólise, liberando celobioses, as pontes de hidrogênio intramoleculares, que são uma das principais forças estabilizantes da estrutura cristalina na celulose, são desestabilizadas, e assim há a formação de novas regiões amorfas, culminando em uma maior taxa de hidrólise da cadeia [23], [24].

O terceiro tipo de enzimas que atua em sinergismo com os citados anteriormente é o das β -glucosidases. Essas enzimas atuam na hidrólise de ligações β ,1-4-glicosídicas nas moléculas de celobiose e celodextrinas solúveis, degradando-as em glicose e completando, assim, a hidrólise da celulose. A Figura 15 mostra a reação catalisada pelas β -glucosidases.

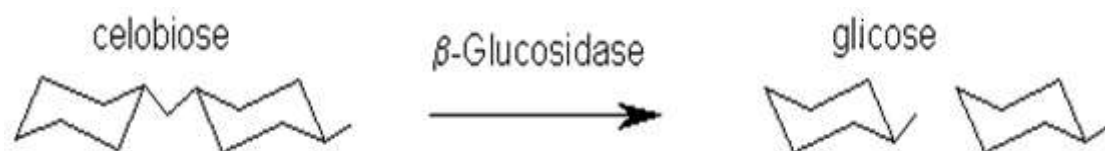


Figura 15. β -glucosidase catalisando a hidrólise de celobiose em glicoses.

Fonte: Adaptado de Key Centre of Polymer and Colloids (2015)

Estas enzimas agem no terminal não redutor, liberando moléculas de β -D-glicose oriundas da hidrólise. A celulose, enquanto polimerizada, não é assimilável pelo organismo dos animais, daí a necessidade de degradá-la até glicose. A ação sinérgica destes três tipos de enzima celulolíticas descritos nesta seção converte um dos fatores antinutricionais (um dos polissacarídeos não amiláceos) na principal fonte de carboidratos da dieta dos animais ruminantes, além de tornar disponíveis outras fibras que são inacessíveis devido à celulose [3].

As celulases podem ser produzidas por vários tipos de micro-organismos. Fungos do gênero *Aspergillus* e *Streptomyces*, bactérias como *Bacillus* sp, etc. Cada micro-organismo expressa celulases de características bioquímicas diferentes, como faixas de pH e temperatura em que a atividade enzimática existe ou é otimizada. O micro-organismo produtor, o método de produção e as características das celulases são determinantes para a metodologia de adição destes biocatalisadores na formulação da ração. Estudos indicam que as enzimas celulolíticas produzidas por fungos filamentosos em fermentação em estado sólido (FES) são mais apropriadas para a adição em ração

animal, tanto pelas características bioquímicas quanto pela baixa (ou nenhuma) quantidade de água aparente no meio, o que contribui para a manutenção da atividade enzimática após a adição da enzima na ração e evita contaminações. No entanto, os processos de FES ainda são pouco usuais em escala industrial, e a adição das enzimas não purificadas obtidas por fermentação submersa ainda é feita majoritariamente [25].

A microbiota dos animais ruminantes adultos expressa enzimas celulolíticas naturalmente, mas não de forma otimizada, pois muitos sítios de substratos não são ocupados durante a ação das enzimas endógenas. Assim, a adição de celulasas exógenas pode ser de valiosa contribuição para a taxa de degradação do material celulósico ingerido pelo animal. Para animais muito jovens, que possuem pequena ou baixa produção de celulasas endógenas por parte de sua ainda pouco diversificada microbiota, a adição de enzimas celulolíticas exógenas deve ser crucial para o aproveitamento não só do carboidrato, mas de outros nutrientes que a celulose torna indisponíveis [26].

No entanto, as celulasas não são as únicas fibras relevantes para o melhoramento da digestibilidade do alimento nos ruminantes. A parede celular das plantas é constituída, além de celulose, por hemiceluloses, que constituem cerca de 30-35% da massa seca de uma planta.

A xilana é o componente mais comumente encontrado na hemicelulose, podendo representar até 90% da fração hemicelulósica de uma planta, e é segundo carboidrato estrutural mais abundante no planeta, ficando atrás somente da celulose. As xilanas são polissacarídeos complexos formados por um esqueleto de resíduos de xilanopiranosil unidos entre si por ligações do tipo β -1,4 e estruturas laterais com resíduos de arabinose. A estrutura básica do esqueleto de uma molécula de xilana está representada na Figura 16.

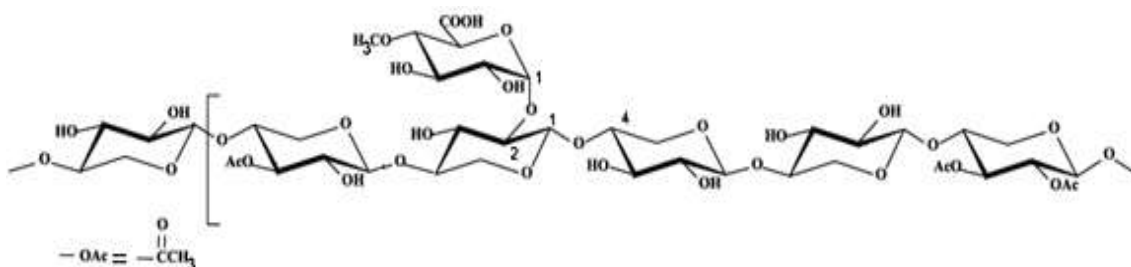


Figura 16. Representação esquemática da estrutura de uma xilana

Fonte: MAGATON et al. (2008)

A degradação enzimática das xilanas é feita por enzimas denominadas xilanases. Estas hidrolases, em geral, catalisam a hidrólise das ligações β -1,4 entre os resíduos de xilose da molécula de xilana. Como a xilana é uma estrutura heterogênea, possuindo metilações e acetilações ao longo de suas cadeias, a degradação completa da molécula depende da ação sinérgica de vários tipos de enzimas. Estas enzimas podem ser divididas em dois grupos principais: as que agem no esqueleto da molécula de xilana e as que agem clivando as cadeias laterais. As xilanases que atuam no interior da molécula de xilana, hidrolisando as ligações β -1,4 entre os resíduos de xilana, liberando xilobioses, são chamadas de endo-xilanases, Figura 17.

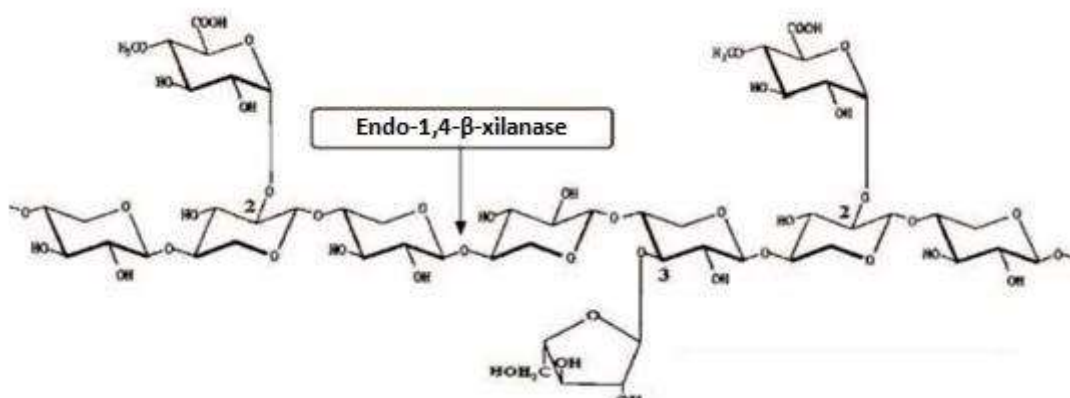


Figura 17. Região de ação das chamadas endoxilanases na estrutura da xilana.

Fonte: Adaptado de MAGATON et al. (2008)

As endoxilanases vem sendo classificadas como específicas ou não específicas. As xilanas que possuem apenas ligações do tipo β -1,4 são substratos para a ação de endoxilanases específicas. Por outro lado, as endoxilanases não específicas atuam tanto nas xilanas unidas com ligações do tipo β -1,4 quanto em outros polímeros unidos por ligações deste tipo, como carboxi-metil-celulose [24].

As moléculas de xilobiose liberadas pela ação das endoxilanases na molécula de xilana são substrato para outra enzima hidrolítica, que é a β -xilosidase. Essa enzima atua no terminal não redutor das moléculas de xilobiose, liberando β -D-xilose, como mostra a Figura 18. A β -xilosidase também atua na hidrólise de pequenas cadeias de xilo-oligossarídeos, com sua atividade diminuindo à medida em que o grau de polimerização das cadeiras aumenta [24].

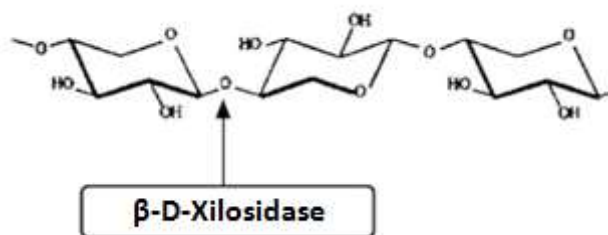


Figura 18. Ação da β -xilosidase em xilo-oligossarídeo de baixo grau de polimerização.

Fonte: Adaptado de MAGATON et al. (2008)

A Figura 19 ilustra a ação sinérgica de endoxilanases, β -xilosidases, já citadas anteriormente, e outras enzimas cruciais para a completa degradação da xilana. Essas enzimas atuam na hidrólise das cadeias laterais da estrutura da xilana. Entre elas, pode-se citar a α -glucuronosidase, que catalisa a hidrólise das ligações α -1,2 entre resíduos de ácido galacturônico e resíduos de xilose em glucuronoxilanas. Pode-se citar, também, a α -D-arabinosidase, que atua na hidrólise a partir de resíduos terminais de arabinose nas cadeias laterais da xilana. Também é preciso destacar a ação de enzimas que hidrolisam porções acetiladas e esterificadas da estrutura da xilana, sendo a enzima acetil-xilano-esterase a responsável pela hidrólise desses grupos. A ação desta última enzima é importante, pois os grupos acetil podem impedir a ação das endoxilanases [24].

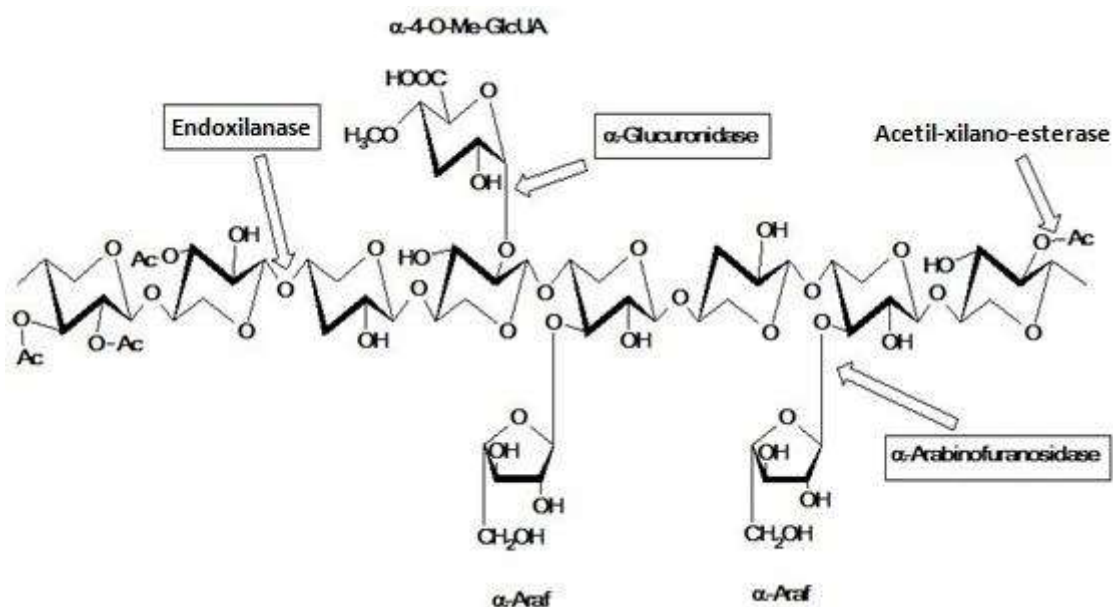


Figura 19. Sinergismo enzimático para degradação completa da xilana.

Fonte: Adaptado de MOTTA & ANDRADE (2013)

As xilanases podem ser produzidas por bactérias, leveduras e fungos filamentosos, sendo estes últimos os mais utilizados na produção industrial dessas enzimas, especialmente de cepas de *Aspergillus niger* [24] [27].

O grau de degradação da xilana no organismo dos animais ruminantes está intimamente relacionado aos níveis de digestibilidade da estrutura vegetal ingerida por eles, uma vez que em dietas muito viscosas, a quantidade de fibras de xilana presente na digesta se torna um fator antinutricional, assim como acontece com a celulose. Desta forma, a adição de alguns tipos de xilanases à formulação da ração pode aumentar o grau de degradação da xilana presente na dieta, uma vez que os níveis de degradação da mesma por enzimas endógenas não é otimizado [3].

3.4.4. Amilases

O amido é o carboidrato de reserva mais abundante na natureza, podendo ser encontrado em grandes concentrações no milho, arroz, na batata, na mandioca, etc. Trata-se de um polissacarídeo formado por subunidades de glicose, possuindo origem vegetal e atuando fisiologicamente como reserva energética, analogamente ao glicogênio nos mamíferos e fungos. Desta forma, está presente em grandes quantidades na dieta vegetal de animais ruminantes, especialmente para os que têm sua alimentação à base de produtos que possuem altas reservas de amido, que neste caso, é a principal fonte de carboidratos da dieta, ao lado da celulose. O ‘grão’ de amido se divide em duas porções com características distintas: a amilose e a amilopectina [1] [3].

A amilose, Figura 20, é a porção linear da molécula de amido, uma vez que é formada por ligações do tipo α -1,4 entre os monômeros de glicose. Esse tipo de ligação entre as subunidades gera pouca ramificação na molécula do polímero, mas confere aspecto helicoidal à estrutura da amilose [1].

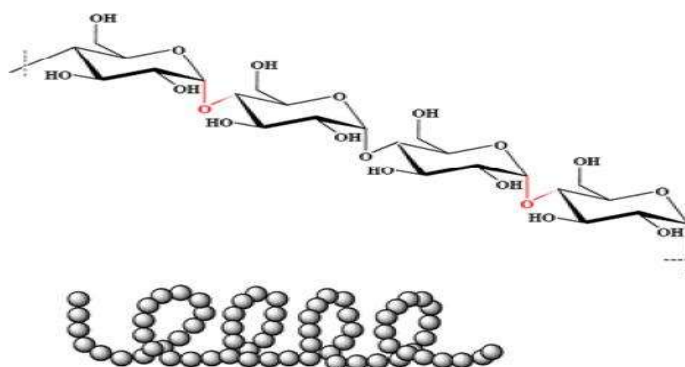


Figura 20. Estrutura molecular e tridimensional da amilose.

Fonte: Adaptado de LEHNINGER, Princípios de Bioquímica (2000)

A porção do amido referente à amilopectina (Figura 21), no entanto, possui ligações do tipo α -1,6 entre os monômeros de glicose, embora também possuam ligações do tipo α -1,4. Estas ligações α -1,6 conferem ramificações à estrutura da amilopectina, o que dá a essa porção do amido um aspecto menos hidrossolúvel em relação à amilose.

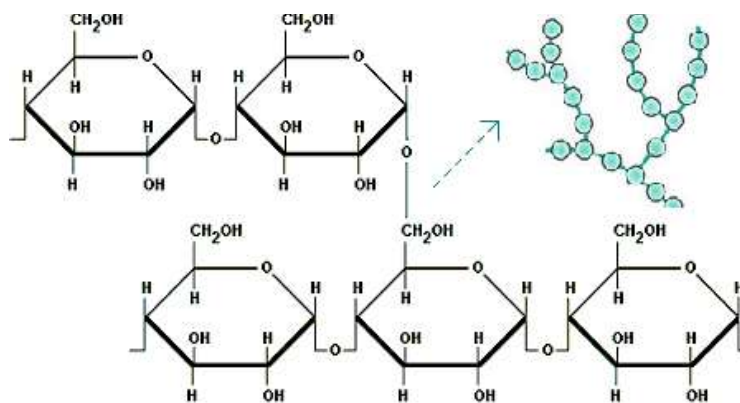


Figura 21. Estrutura molecular e tridimensional da amilopectina.

Fonte: Adaptado de LEHNINGER, Princípios de Bioquímica (2000)

A Figura 22 a seguir mostra um comparativo entre a estrutura molecular da amilose e da amilopectina, que são determinantes para o caráter linear, porém helicoidal da amilose, e para o caráter ramificado da amilopectina.

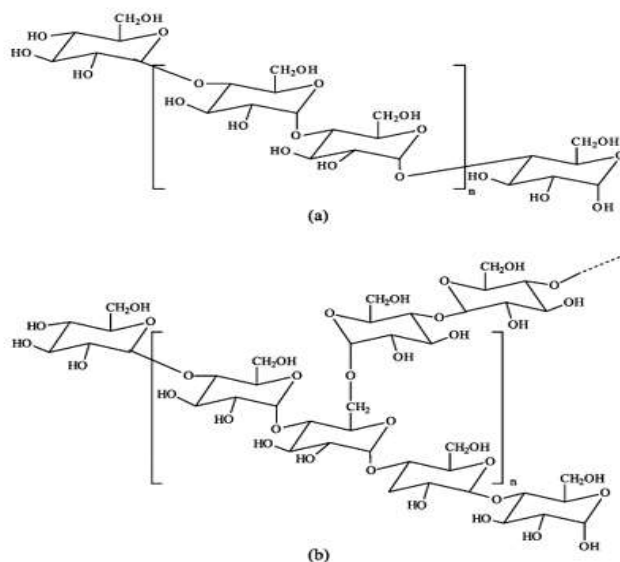


Figura 22. Comparativo entre as estruturas de amilose e amilopectina.

Fonte: CORRADINI et al. (2005)

Assim como na degradação da celulose e da xilana, existe um conjunto de enzimas que degrada o amido. As amilases são hidrolases que catalisam a hidrólise de ligações

glicosídicas entre os monômeros da molécula de amido, que é o seu substrato. A hidrólise do amido normalmente é iniciada pela ação da enzima α -amilase, que catalisa a hidrólise das ligações α -1,4-glicosídicas no interior da molécula de amido, causando rápida diminuição do grau de polimerização do amido e a diminuição da viscosidade do substrato. Assim como as endoglucanases, atua de forma aleatória no interior da molécula do polímero. Os produtos da reação de hidrólise do amido catalisada pela α -amilase são oligossarídeos de glicose, chamados dextrinas [24], [28].

A α -amilase apresenta alta variação estrutural dependendo de sua origem, fato este que resulta alta diversidade na atividade da enzima em relação à sua estabilidade, condições para catalisar e especificidade pelo substrato. Esta enzima também é altamente dependente de íons cálcio (Ca^{2+}) para manter a integridade do seu sítio catalítico [24].

Outro tipo de enzima que atua na hidrólise do amido é a β -amilase, que também atua hidrolisando α -1,4 glicosídicas, porém, diferentemente da α -amilase, age a partir do terminal não redutor da molécula de amido, de modo semelhante à ação das exoglucanases na degradação da celulose. A Figura 24 a seguir mostra a diferença de ação das enzimas α -amilase e β -amilase [24], [28].

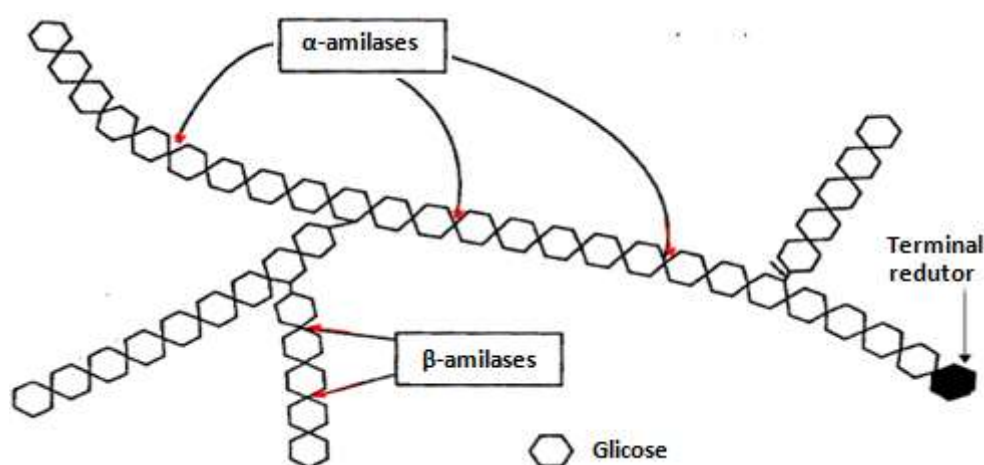


Figura 24. Comparativo entre as regiões de ação das enzimas α -amilase e β -amilase.

Fonte: Adaptado de Tormo (2004)

Por fim, existe um terceiro tipo principal de enzimas amilolíticas, que são as chamadas glucoamilases (ou amiloglucosidases), que atuam nos terminais não redutores da estrutura da molécula de amido, liberando monômeros de glicose [24], [28].

As amilases são muito utilizadas como aditivos em ração para animais ruminantes cuja dieta é baseada em milho, por exemplo, e podendo ser aplicadas em rações de animais cujas dietas se baseiam em outros produtos ricos em amido. Apesar de os ruminantes adultos apresentarem boas taxas de degradação para o amido, é esperado que a adição de amilases exógenas otimize essas taxas. Além disso, a adição de amilases pode contribuir muito para animais jovens que não apresentam níveis relevantes de enzimas capazes de hidrolisar carboidratos que não sejam a lactose em seu trato digestivo [3], [4].

As enzimas amilolíticas podem ser produzidas por uma grande variedade de micro-organismos, ou seja, por vários gêneros de bactérias e fungos. Normalmente são obtidas por fermentação submersa do amido. As enzimas fúngicas obtidas por fermentação submersa em geral são extracelulares, o que diminui o custo para sua adição na ração, visto que não se faz necessário um processo de extração de material intracelular, o que seria uma etapa a mais no processo e elevaria o custo da ração enriquecida com enzimas [28].

3.4.5. Pectinases

As pectinases constituem um grupo de enzimas que degradam ou agem sobre substâncias pécticas, que são o seu substrato. Essas enzimas podem atuar como despolimerizantes ou desesterificantes, podendo ser sintetizadas por fungos filamentosos, bactérias, leveduras e plantas, sendo o *Aspergillus niger* o micro-organismo que sintetiza a maior variedade de enzimas pectinolíticas em fermentação submersa na presença de substâncias pécticas. A importância da aplicação destas enzimas em ração para animais ruminantes está no fato de que além de gerarem dificuldades para o processo digestivo, as substâncias pécticas podem ser fontes de carboidratos [3], [29].

As substâncias pécticas são, primariamente, polímeros de ácido galacturônico (carboidrato ácido). Possuem elevado peso molecular e constituem a maior porcentagem da lamela média das células de vegetais superiores, que é uma camada de material adesivo extracelular entre as paredes de células primárias desses vegetais, conferindo textura e resistência mecânica à estrutura da planta [29].

As substâncias pécticas são classificadas em protopectina, ácido péctico, ácido pectínico e pectina.

- **Protopectina:** é insolúvel em água; está associada a outros componentes da parede celular vegetal (celulose e hemicelulose), dando textura e dureza à planta; ao ser hidrolisada, gera ácidos pectínicos e pectina, diminuindo a rigidez e a resistência mecânica do vegetal [29].
- **Ácido péctico:** polímero formado por subunidades de ácido galacturônico sem metoxilação nos grupos carboxilílicos, ou seja, essencialmente livres de grupos metil-éster. As subunidades são conectadas por ligações do tipo α -1,4-galacturônicas (Figura 25), [29].

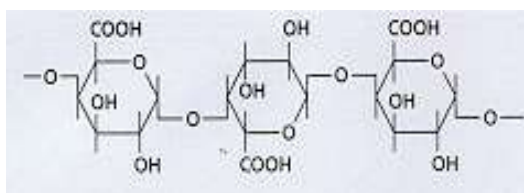


Figura 25. Estrutura molecular do ácido péctico (sem metilação)

Fonte: Fungal Biology (2006)

- **Ácido pectínico:** polímero formado por subunidades de ácido galacturônico com baixo grau de metoxilação, sendo assim, possuindo uns poucos grupos carboxílicos metilados (Figura 26), que é sua única diferença para a estrutura do ácido péctico [29].

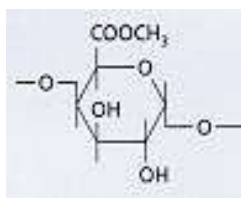


Figura 26. Subunidade de ácido galacturônico metilada.

Fonte: Fungal Biology (2006)

- **Pectina:** são ácidos pectínicos solúveis em água e com grau variável de metoxilação (as de alta metoxilação são as pectinas ATM e as de baixa metoxilação são as pectinas BTM). A estrutura molecular da pectina é composta por polímero de ácido α -1,4-D-galacturônico (estrutura primária, Figura 27) e cadeias laterais contendo monômeros de L-ramnose, arabinose, galactose e xilose [29].

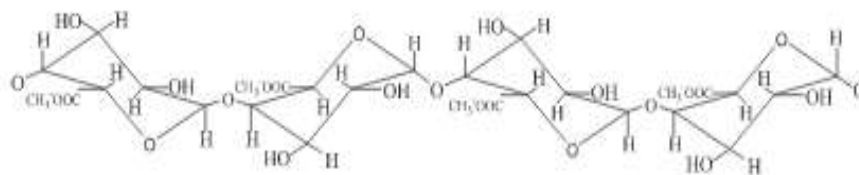


Figura 27. Estrutura primária da pectina (sem os resíduos laterais de ramnose, arabinose, galactose e xilose).

Fonte: UENOJO e PASTORE (2007)

Existem basicamente três tipos de enzimas pectinolíticas: as despolimerizantes, as esterases (ou desesterificantes) e as protopectinases. As pectinases despolimerizantes hidrolisam as ligações entre os resíduos de ácido galacturônico (metilados ou não metilados) da estrutura primária das substâncias pécicas. As pectina-esterases atuam removendo os grupos metil-éster das substâncias pécicas, diminuindo o grau de metoxilação do substrato. Já as protopectinases atuam sobre a protopectina, a partir da solubilização desta, que é insolúvel em água [24], [29].

Devido às características das substâncias pécicas, que além de tudo conferem textura à estrutura das plantas, ruminantes que possuem dieta à base de material lignocelulósico precisam lidar com as dificuldades digestivas impostas por essas substâncias. A adição de pectinases à ração animal pode, a partir da hidrólise das substâncias pécicas, diminuir os obstáculos digestivos impostos pelas substâncias pécicas e, conseqüentemente, diminuir a viscosidade da digesta, permitindo maior digestibilidade do material lignocelulósico e aproveitando nutricionalmente os monômeros de carboidratos liberados por essa hidrólise [3], [29].

3.5. Estudos de casos e trabalhos futuros

A literatura disponibiliza resultados de estudos sobre os efeitos da adição de determinadas enzimas em ração animal para ruminantes que mostram que, embora promissora, a tecnologia do uso de enzimas em ração animal ainda precisa percorrer um longo caminho de evolução.

Beauchemin et al. [30] obtiveram um aumento de 11% na conversão alimentar dos bovinos em terminação (período antecedente ao abate), fornecendo a eles uma dieta de alto grão suplementada com enzimas fibrolíticas, resultando num aumento da taxa de ganho de peso de 6% e diminuindo 5% a ingestão de alimento. Pritchard et al. [31] observaram um aumento no consumo de massa seca, no ganho de peso e na eficiência

alimentar em resposta a níveis crescentes de fornecimento de celulasas e xilanases na ração destinada a novilhos. McAllister et al. [32], também avaliando desempenho de novilhos em confinamento, observou aumentos de 5,99 kg/dia para 6,72kg/dia na ingestão de massa seca, e de 0,94 kg/dia para 1,16 kg/dia no ganho médio diário com suplementação de celulasas e xilanases na ração.

Deve-se ressaltar, no entanto, o elevado número de estudos publicados em que a adição de enzimas consideradas importantes para a indústria de ração animal não surtiram efeitos relevantes sobre as taxas de crescimento, ganho de peso e digestibilidade de animais ruminantes adultos, especialmente bovinos. Rosa et al. [33], por exemplo, não obtiveram resultados relevantes em termos de ganhos nutricionais de bovinos tratados com rações suplementadas com coquetéis de enzimas digestivas (amilases, celulasas, pectinases, etc). Como estes resultados negativos são numerosos na literatura, torna-se evidente que a tecnologia de inclusão de enzimas em ração animal para ruminantes ainda não é plenamente compreendida.

Beauchemin et al. [30], no entanto, também levantou a possibilidade de que enzimas adicionadas em alimentos úmidos, como as silagens, podem ser bem mais eficientes no aumento da conversão alimentar no rúmen do que em rações secas, considerando os resultados previamente observados com suplementação enzimática nos dois casos. Baseou-se também em princípios bioquímicos básicos, pois além de solubilizarem açúcares solúveis, as moléculas de água são utilizadas pelas enzimas para as reações de hidrólise.

Novos estudos precisam ser feitos no sentido de se compreender melhor quais são as variáveis, além das já conhecidas, que interferem na eficiência da ação de enzimas exógenas no rúmen dos animais, o que pode variar desde a fonte microbiana de obtenção destas enzimas até o processo de sua inclusão na formulação da ração e a interação destas enzimas não só com o organismo do ruminante, mas com a microbiota presente no rúmen. Um alento para a funcionalidade da utilização de enzimas em ração para ruminantes, especialmente os animais jovens, pode ser o alto índice de experimentos bem sucedidos de rações suplementadas com enzimas para monogástricos como suínos, aves e até mesmo peixes.

4. Conclusão

A utilização de enzimas em ração animal para ruminantes com intuito de melhorar taxas de digestibilidade, crescimento e ganho de peso, além de reduzir impactos ambientais, mostra-se muito promissora do ponto de vista teórico, devido a propriedades particulares das enzimas, como o fato de não serem consumidas nas reações que catalisam, e o fato de ser possível a produção de biocatalisadores que resistam às condições de meio encontradas no rúmen e tenham atividade catalítica eficiente para seus respectivos substratos. No entanto, o alto índice de experimentos mal sucedidos visando à otimização da degradação do alimento ingerido pelos ruminantes por meio da adição de enzimas à ração, sugere que muito ainda precisa ser compreendido para que o uso desta biotecnologia seja efetivo, e que rações para animais ruminantes suplementadas com enzimas tenha maiores índices de influência positiva no processo digestivo dos animais.

5. Referências bibliográficas

- [1] NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger - Princípios de Bioquímica**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.
- [2] DEWAN, S. S. **Enzymes in Industrial Applications: Global Markets**. Disponível em <<http://www.bccresearch.com/market-research/biotechnology/enzymes-industrial-applications-bio030f.html>>. Acesso em: 03 mar. 2015.
- [3] BEDFORD, M. R.; PARTRIDGE, G. G. **Enzymes in Farm Animal Nutrition**. 2. ed. Wallingford: CABI, 2001.
- [4] CAMPESTRINI, E.; SILVA, V. T. M. da; APPELT, M. D. Utilização de Enzimas na Nutrição Animal. **Revista Eletrônica Nutritime**, Viçosa, v. 2, n. 6, p. 259-272, nov./dez. 2005. Disponível em <http://nutritime.com.br/arquivos_internos/artigos/027V2N6P259_272_NOV2005.pdf> . Acesso em: 08 mar. 2015.
- [5] BRASIL. Ministério da Agricultura. **Legislação específica do setor de alimentação**

animal. Brasília, 1974. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br/animal/alimentacao/legislacao>>. Acesso em: 08 mar. 2015.

[6] BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicação e Mercado**. 1. ed. Grajaú: Engenho Novo: Interciência, 2008.

[7] ENZIMAS: Natureza e Ação nos Alimentos. **Food Ingredients Brasil**. n. 16, 2011. Disponível em <<http://www.revista-fi.com/materias/166.pdf>>. Acesso em: 13 mar. 2015.

[8] DECONTO, J. G. Aquecimento global e a nova geografia da produção agrícola no Brasil. **Repositório Alice – Acesso livre à informação científica da Embrapa**. Brasil, 2008. Disponível em <<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/859047>>. Acesso em: 12 mar. 2015.

[9] BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. **Estatística da Produção Agrícola**. Set. 2013. Disponível em <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/estProdAgr_201309.pdf>. Acesso em: 15 mar. 2015.

[10] OLIVEIRA, R.; NOVAES, A. S.; SOUZA, A. C. B.; SALLES, M. A. M.; SANTO, G. F. E.; JUNIOR, D. M. P. Processo de produção de ração: um estudo de caso nas rações São Gotardo. In: IX Convibra Administração – Congresso Virtual Brasileiro de Administração. Disponível em <http://www.convibra.com.br/upload/paper/2012/36/2012_36_4384.pdf>. Acesso em: 15 mar. 2015.

[11] GARCIA, A. G.; PEIXOTO, M. S. Bovinocultura de corte: uma avaliação dos recursos exigidos pelos diferentes sistemas de produção através de modelagem matemática fuzzy. **Biomatemática** 21, Sorocaba, p. 141-152. Disponível em <http://www.ime.unicamp.br/~biomat/bio21_art11.pdf>. Acesso em: 16 mar. 2015.

[12] SILVA, M. R.; SILVA, M. A. A. P.; Fatores Antinutricionais: Inibidores de Proteases e Lectinas. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 13, n. 1, p. 3-9, jan./abr. 2000. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1590/S1415-52732000000100001>>. Acesso em: 16 mar. 2015.

[13] Uso de enzimas em nutrição animal. **Revista Alimentação Animal**, Sindicato Nacional da Indústria de Alimentação Animal- SINDIRAÇÕES, ano 5, n. 19, jul./set. 2000 - Adaptado pelo Departamento Técnico Nuvital. Disponível em <http://sindiracoes.org.br/wp-content/uploads/2015/03/revista_ano5_n19.pdf>. Acesso em: 14 mar. 2015.

[14] COUSINS, B. Enzimas na Nutrição de Aves. In: I Simpósio Internacional ACAV Embrapa sobre Nutrição de Aves 17 e 18 de novembro de 1999. Concórdia, SC. Disponível em <http://www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc_publicacoes/anais56_cousins.pdf>. Acesso em: 16 mar. 2015.

[15] MOREIRA, V. S.; PITARELLO, A. S.; COALHO, M. R. **Interações fisiológicas e nutricionais no desenvolvimento do rúmen de bezerros**. Londrina. Disponível em <http://fio.edu.br/cic/anais/2010_ix_cic/pdf/09VET/30VET.pdf>. Acesso em: 03 abr. 2015.

[16] BATTESTIN, V.; MATSUDA, L. K.; MACEDO, G. A. Fontes e aplicações de taninos e tanases em alimentos. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 15, n. 1, p. 63-72, 2004. Disponível em <<http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/alimentos/article/viewFile/58/75>>. Acesso em: 15 abr. 2015.

[17] NAKAMURA, Y.; TSUJI, S.; TONOGAI, Y. Method for analysis of tannic acid and its metabolites in biological samples: Application to tannic acid metabolism in the rat. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 1, p. 331-339, dez. 2002. Disponível em <<http://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/jf020847%2B>>. Acesso em: 17 abr. 2015.

- [18] LEKHA, P. K.; LONSANE, B. K. Production and application of Tannic Acyl Hydrolase: State of the art. In: NEIDLEMAN, S. L.; LASKIN, A. I. **Advances in Applied Microbiology**. v. 44. Estados Unidos: Academic Press, 1997. Cap. 5, p. 215-260.
- [19] SILVA, M. R.; SILVA, M. A. A. P. Aspectos Nutricionais de Fitatos e Taninos. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 12, n. 1, p. 5-19, jan./abr. 1999. Disponível em <<http://www.scielo.br/pdf/rn/v12n1/v12n1a02.pdf>>. Acesso em: 14 abr. 2015.
- [20] SEBASTIAN, S.; TOUCHBURN, S.P.; CHAVEZ, E.R. *et AL* 1996. Efficacy of supplemental microbial phytases at different dietary calcium levels on growth performance and mineral utilization of broiler chickens. **Poultry Science**, Canada, n. 75, p. 1516-1523, ago. 1996. Disponível em <<http://ps.oxfordjournals.org/content/75/12/1516.full.pdf+html>>. Acesso em: 18 abr. 2015.
- [21] BRANDÃO, P. A.; COSTA, F. G. P.; BRANDÃO, J. S.; SILVA, J. H. V. Efeito da adição de fitase em rações de frangos de corte, durante as fases de crescimento e final. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 2, p. 492-498, mar./abr., 2007. Disponível em <<http://www.scielo.br/pdf/cagro/v31n2/a33v31n2.pdf>>. Acesso em: 03 mai. 2015.
- [22] OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise Enzimática de Biomassa. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 7, 2010. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422010000700023>. Acesso em: 03 mai. 2015.
- [23] QUIROZ-CASTAÑEDA, R. E.; FOLCH-MALLOL, J. L. Hydrolysis of biomass mediated by cellulases for the production of sugars. In: CHANDEL, A. K.; SILVA, S. S. da. **Sustainable degradation of lignocellulosic biomass – Techniques, applications and commercialization**. Cap. 6, p. 119-155, mai. 2013. Disponível em <<http://www.intechopen.com/books/sustainable-degradation-of-lignocellulosic-biomass-techniques-applications-and-commercialization/hydrolysis-of-biomass-mediated-by-cellulases-for-the-production-of-sugars>>. Acesso em: 10 mai. 2015.

[24] POLAINA J., MacCABE, A. **Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications**. Holanda: Ed. Springer, 2007.

[25] CASTRO, A. M.; JUNIOR, N. P. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 1, 2010. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422010000100031>. Acesso em: 17 mai. 2015.

[26] FAGUNDES, N. S.; CAIRES, C. M.; FAGUNDES, N. S.; BENEDETTI, E. Enzimas na alimentação de ruminantes. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 5, n. 1, p. 498-503, jan/fev 2008. Disponível em <http://www.nutritime.com.br/arquivos_internos/artigos/050V5N1P498_503_JAN2008.pdf>. Acesso em: 03 mai. 2015.

[27] MICHELIN, M. **Estudo de xilanases produzidas por fungos filamentosos com potencial para aplicação industrial**: seleção de linhagens, produção, caracterização bioquímica e relações filogenéticas. 2009. Tese de Doutorado em Ciências Biológicas – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009. Disponível em <<http://www.bv.fapesp.br/pt/bolsas/100031/estudo-de-xilanases-produzidas-por-fungos-filamentosos-com-potencial-para-aplicacao-industrial-sele/>>. Acesso em: 09 abr. 2015.

[28] SPIER, M. R. **Produção de enzimas amilolíticas fúngicas α -amilase e amiloglucosidase por fermentação no estado sólido**. 2005. 178 p. Dissertação de Mestrado em Tecnologia de Alimentos – Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Alimentos, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005. Disponível em <<http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/bitstream/handle/1884/4684/Disserta%E7%E3o%20de%20Mestrado%20-%20Michele%20Rigon%20Spier.pdf;jsessionid=A9106609DE4F3BDE7F3DBB1BD05BBB76?sequence=1>>. Acesso em: 10 mai. 2015.

- [29] UENOJO, M.; PASTORE, G.M. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 1, p. 388-394, jan 2007. Disponível em <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v30n2/27.pdf>> Acesso em: 14 mai. 2015
- [30] BEAUCHEMIN, K. A.; JONES, S. D. M.; RODE, L. M.; SEWALT, V. J. H. Effects of fibrolytic enzymes in corn or barley diets on performance and carcass characteristics of feedlot cattle. **Canadian Journal of Animal Science**, Canada, v. 77, p. 645–653, 1997. Disponível em <<http://pubs.aic.ca/doi/pdf/10.4141/A97-050>>. Acesso em: 25 mai. 2015.
- [31] PRITCHARD, G., HUNT, C., ALLEN, A.; TREACHER, R. Effect of direct-fed fibrolytic enzymes on digestion and growth performance in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v.77, 1996.
- [32] McALLISTER, T. A.; HRISTOV, A. N.; BEAUCHEMIN, K. A. et al. Enzymes in ruminant diets. In: BEDFORD, M. R., PARTRIDGE, G. G. **Enzymes in farm nutrition**. Oxon: Cab International, 2001. p.273-298; p.819-823, 1999.
- [33] ROSA, B. L.; ALVES, J. B.; BERGAMASCHINE, A. F.; MOTA, D. A.; CASTRO, C. S. de; MARSANGO, F. J.; VALÉRIO FILHO, W. V. Teores de concentrado e inclusão de probiótico para bovinos da raça Guzerá em confinamento. **Revista brasileira de saúde e produção animal**, v. 11, n. 2, p. 440-451, abr/jun 2010. Disponível em <<http://www.rbspa.ufba.br/index.php/rbspa/article/view/1538/980>>. Acesso em: 28 mai. 2015.
- [34] MAGATON, A. S; VELOSO, D. P; COLODETTE, J. L. Caracterização das O-acetil-(4-O-metilglicurono)xilanas isoladas da madeira de *Eucalyptus urograndis*. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 5, 2008. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422008000500027>. Acesso em: 16 mai. 2015.
- [35] PRESCOTT, S; GILBERT, R.G. **Key Centre of Polymer and Colloids**. Disponível em: <<http://discovery.kcpc.usyd.edu.au>> Acesso em 16 mai. 2015.

[36] FERNÁNDEZ, S. R. **Uso de enzimas termoestables en la alimentación animal**. 2007. Disponível em <<http://www.engormix.com/MA-avicultura/nutricion/articulos/uso-enzimas-termoestables-alimentacion-t1489/141-p0.htm>>. Acesso em: 19 abr. 2015.

[37] MITTAL, A.; SINGH, G.; GOYAL, V.; YADAV, A.; ANEJA, K. R.; GAUTAM, S. K.; AGGARWAL, N. K. Isolation and biochemical characterization of acidothermophilic extracellular phytase producing bacterial strain for potential application in poultry feed. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 4, n. 4, 2011. Disponível em <<http://jjmicrobiol.com/2348.fulltext>>. Acesso em: 10 mai. 2015.

[38] MOTTA, F. L.; ANDRADE, C. C. P.; SANTANA, M. H. A. A Review of Xylanase Production by the Fermentation of Xylan: Classification, Characterization and Applications. In: CHANDEL, A. K.; SILVA, S. S. da. **Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass – Techniques, Applications and Commercialization**. 2013. Cap. 10. Disponível em <<http://www.intechopen.com/books/sustainable-degradation-of-lignocellulosic-biomass-techniques-applications-and-commercialization/a-review-of-xylanase-production-by-the-fermentation-of-xylan-classification-characterization-and-app>>. Acesso em: 07 mar. 2015.

[39] CORRADINI, E.; LOTTI, C.; MEDEIROS, E. S. de; CARVALHO, A. J. F.; CURVELO, A. A. S.; MATTOSO, L. H. C. Estudo comparativo de amidos termoplásticos derivados do milho com diferentes teores de amilose. **Polímeros**, São Carlos, v. 15, n. 4, Out./Nov. 2005. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-14282005000400011>. Acesso em: 21 mai. 2015.

[40] TORMO, M. A.; GIL-EXOJO, I.; ROMERO, T. A.; CAMPILLO, J. E. Hypoglycaemic and anorexigenic activities of an alpha-amylase inhibitor from white kidney beans (*Phaseolus vulgaris*) in Wistar rats. **PubMed**, v. 92, n. 5, p. 785-790, nov. 2004. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15533267>>. Acesso em: 03 abr. 2015.

- [41] WEAVER, C.M.; KANNAN, S. Phytate and mineral bioavailability. In: REDDY, N.R.; SATHE, S.K. **Food Phytates**. CRC Press: Boca Raton, FL, p. 211–223. Disponível em <<https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=ifUkaCTmqpMC&oi=fnd&pg=PA211&dq=Phytate+and+mineral+bioavailability&ots=xfEsAV0t8B&sig=fcuRjE2vB6eLn13qPYpPTu6k8DY#v=onepage&q=Phytate%20and%20mineral%20bioavailability&f=false>>. Acesso em: 13 mar. 2015.
- [42] KEROVUO, J.; ROUVINEN, J.; HATZACK, F. Analysis of *myo*-inositol hexakisphosphate hydrolysis by *Bacillus* phytase: Indication of a novel reaction mechanism. **Biochemical Journal**, v. 352, n. 3, p. 623–628, 2000. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1221497/pdf/11104666.pdf>>. Acesso em: 04 mai. 2015.
- [43] KUMAR, R.; SING, S.; SINGH, O. V. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 35, p. 377–391, 2008. Disponível em <<http://link.springer.com/article/10.1007/s10295-008-0327-8#page-1>>. Acesso em: 07 abr. 2015.
- [44] WATANABE, H.; TOKUDA, G. Cellulolytic systems in insects. **Annu. Rev. Entomol**, v. 55, p. 609–632, 2010. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19754245>>. Acesso em: 25 mai. 2015.
- [45] DEACON, J. W. **Fungal Biology**. 4. ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2006.