

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ - UNIOESTE
CENTRO DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO “STRICTO SENSU” EM
ENGENHARIA QUÍMICA – NÍVEL DE MESTRADO**

**HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS
UTILIZANDO CELULASES PRODUZIDAS PELO FUNGO
*Aspergillus niger***

CAROLINE MARIANA DE AGUIAR

**TOLEDO – PR
2010**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

CAROLINE MARIANA DE AGUIAR

**HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS
UTILIZANDO CELULASES PRODUZIDAS PELO FUNGO
*Aspergillus niger***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química, área de concentração em **Desenvolvimento de Processos**.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Luiz de Lucena

**TOLEDO – PR
2010**

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter iluminado meu caminho sempre.

À minha família pelo amor, apoio e confiança durante essa caminhada.

Ao meu namorado Davi Penno, pelo carinho e apoio em todos os momentos desta caminhada.

Ao Professor Doutor Sérgio Luiz de Lucena pela orientação, confiança, dedicação e conhecimentos compartilhados durante a realização deste trabalho.

Ao Professor Doutor Salah Din Mahmud Hasan pela colaboração e conhecimentos compartilhados durante a realização deste trabalho.

À Universidade Estadual do Oeste do Paraná pela oportunidade.

À Capes pela concessão da bolsa.

Aos Professores e colegas pela confiança, apoio e colaboração.

À Cooperativa Agrícola Regional de Produtores de Cana – COOPCANA, por ter cedido o bagaço da cana-de-açúcar.

Ao Engenheiro Químico Marcelo Henrique Luzia Margonar, às alunas de graduação em Engenharia Química Daisy Catharina Rodrigues e Patrícia de Almeida, às mestrandas Neivair Sponchiado Pastore e Adriana da Silva Tronco Johann e ao Mestre em Engenharia Química Leandro Daniel de Paris pela amizade e pela importante contribuição à parte experimental do trabalho.

Ao Grupo de Pesquisas em Recursos Pesqueiros e Limnologia – GERPEL e ao Grupo de Estudos de Manejo na Aqüicultura - GEMAQ por nos ter possibilitado a utilização de equipamentos necessários à realização dos experimentos.

Ao Laboratório de Nutrição Animal da Universidade Federal do Paraná – UFPR, *campus* de Palotina pela contribuição à parte experimental do trabalho.

À Professora Márcia Terezinha Veit, ao mestrando Luiz Gustavo de Lima Vaz e à Márcia Luzia Ferrarezi Maluf pelo conhecimento e auxílio durante a realização dos experimentos.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento desta pesquisa.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Objetivo Geral	4
1.2. Objetivos específicos	4
2. REVISÃO DA LITERATURA	5
2.1. Resíduos Lignocelulósicos	5
2.1.1. Bagaço de cana-de-açúcar	7
2.1.2. Palha de trigo	10
2.1.3. Palha de milho	12
2.2. Celulose	14
2.3. Hemicelulose	18
2.4. Lignina	21
2.5. Enzimas	22
2.5.1. Enzimas Celulases	24
2.5.2. Micro-organismos produtores de celulases	25
2.5.3. <i>Aspergillus niger</i>	28
2.6. Hidrólise química e hidrólise enzimática	30
2.6.1. Fatores que afetam a hidrólise enzimática dos resíduos lignocelulósicos	34
2.7. Tratamento de resíduos lignocelulósicos	39
3. MATERIAIS E MÉTODOS	45
3.1. Materiais	45
3.1.1. Micro-organismo	45

3.1.2. Resíduos lignocelulósicos	45
3.1.3. Reagentes e materiais	45
3.1.4. Equipamentos	47
3.2. Metodologia	47
3.2.1. Preparo do inóculo	47
3.2.2. Tratamento dos resíduos lignocelulósicos	48
3.2.2.1 Tratamento alcalino	48
3.2.2.2 Tratamento alcalino oxidativo	49
3.2.2.3 Secagem dos resíduos pré-tratados.....	49
3.2.3. Fermentação	49
3.2.4. Hidrólise enzimática dos resíduos lignocelulósicos.....	50
3.2.5. Determinação da atividade enzimática total em papel filtro	51
3.2.6. Determinação da atividade endoglucanásica.....	51
3.2.7. Quantificação de açúcares redutores totais (ART).....	52
3.2.8. Determinação da atividade enzimática.....	54
3.2.9. Cinética da fermentação	54
3.2.10. Cinética de desativação enzimática.....	55
3.2.11. Fermentação e hidrólise enzimática utilizando os três resíduos lignocelulósicos pré-tratados	55
3.2.12. Testes dos fatores que afetam a hidrólise enzimática	55
3.2.12.1. Efeito da temperatura	56
3.2.12.2. Efeito do pH.....	56
3.2.12.3. Efeito do tempo.....	56
3.2.12.4. Efeito da quantidade de substrato	57
3.2.12.5. Efeito da diluição do caldo	58
3.2.12.6. Efeito do tipo de tratamento dos resíduos	58
3.2.12.7. Efeito de hidrólises enzimáticas sucessivas dos resíduos	58

3.2.13.Comparação entre atividades enzimáticas	59
3.3. Métodos analíticos.....	59
3.3.1. Determinação de lignina e celulose.....	59
3.3.1.1. Determinação de lignina	60
3.3.1.2 Determinação de celulose	61
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	62
4.1. Secagem dos resíduos após os pré-tratamentos	62
4.2. Cinética da fermentação.....	63
4.3. Cinética de desativação enzimática.....	67
4.4. Fermentação e hidrólise enzimática utilizando os três resíduos lignocelulósicos pré-tratados.....	68
4.5. Efeito da temperatura na atividade enzimática.....	70
4.6. Efeito do pH na atividade enzimática.....	71
4.7. Efeito do tempo de hidrólise na atividade enzimática.....	72
4.8. Efeito da quantidade de substrato na atividade enzimática.....	74
4.9. Efeito da diluição do caldo na atividade enzimática	76
4.10.Efeito do tipo de tratamento dos resíduos na atividade enzimática	77
4.11.Efeito de hidrólises enzimáticas sucessivas dos resíduos na atividade enzimática.....	83
4.12.Comparação entre atividades enzimáticas	84
5. CONCLUSÕES.....	86
6. SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS	87
7. REFERÊNCIAS	88
8. ANEXOS.....	100

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Complexo lignocelulósico	2
Figura 2. Bagaço de cana-de-açúcar excedente da usina COOPCANA	8
Figura 3. Representação da cadeia linear de celulose	15
Figura 4. Representação das cadeias de celulose	15
Figura 5. Associação dos componentes da parede celular de materiais lignocelulósicos	17
Figura 6. Esquema da parede celular vegetal	17
Figura 7. Estruturas químicas de algumas hemiceluloses.....	19
Figura 8. Representação simplificada de hemiceluloses ligadas entre si e à celulose	20
Figura 9. Estrutura de um tipo de lignina	21
Figura 10. Micrografia eletrônica do fungo <i>Aspergillus niger</i>	30
Figura 11. Esquema da hidrólise enzimática da celulose.....	33
Figura 12. Representação do complexo lignocelulósico antes e depois de um pré-tratamento	39
Figura 13. Microscopia Eletrônica de Varredura da fibra do bagaço de cana-de-açúcar antes e depois de um pré-tratamento	40
Figura 14. Massa dos resíduos pré-tratados com NaOH 4% em função do tempo de secagem.....	62
Figura 15. Massa dos resíduos pré-tratados com H ₂ O ₂ 1% em função do tempo de secagem.....	63
Figura 16. Atividade enzimática em função do tempo de fermentação para três diferentes quantidades de bagaço de cana-de-açúcar utilizadas.....	64
Figura 17. Variação do pH dos caldos em função do tempo de fermentação para três diferentes quantidades de bagaço de cana-de-açúcar utilizadas.....	65

Figura 18. Variação dos ART dos caldos em função do tempo de fermentação para três diferentes quantidades de bagaço de cana-de-açúcar utilizadas.....	66
Figura 19. Variação da atividade enzimática ao longo do tempo para amostras de caldo enzimático armazenadas a temperatura de -18°C	67
Figura 20. Variação da atividade enzimática ao longo do tempo para amostras de caldo enzimático armazenadas a temperatura de 4°C..	68
Figura 21. Atividade enzimática utilizando os três resíduos pré-tratados em ambos os processos de fermentação e hidrólise enzimática.....	69
Figura 22. Efeito da temperatura na atividade enzimática para os três substratos de hidrólise a pH 4,8 e tempo de 50 min.....	70
Figura 23. Efeito do pH na atividade enzimática para os três substratos de hidrólise a temperatura de 50°C e tempo de 50 min.	71
Figura 24. Efeito do tempo de hidrólise na atividade enzimática para os três substratos de hidrólise a pH 4,8 e temperatura de 50°C.....	72
Figura 25. Variação dos ART do caldo enzimático em função do tempo a temperatura de 50°C e pH 4,8.....	74
Figura 26. Efeito da quantidade de substrato na atividade enzimática para os três substratos de hidrólise a pH 4,8, temperatura de 50°C e tempo de 50 min.	75
Figura 27. Efeito da diluição do caldo na atividade enzimática para os três substratos de hidrólise a temperatura de 50°C e tempo de 50 min.....	76
Figura 28. Efeito do tipo de tratamento dos resíduos na atividade enzimática.....	77
Figura 29. Efeito de hidrólises sucessivas dos resíduos tratados com H ₂ O ₂ na atividade enzimática a pH 4,8, temperatura de 50°C e tempo de 50 min.....	83
Figura 30. Atividade enzimática com papel filtro e resíduos lignocelulósicos tratados com NaOH como substratos de hidrólise	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição química parcial dos principais resíduos lignocelulósicos.....	6
Tabela 2. Composição do bagaço de cana <i>in natura</i>	10
Tabela 3. Composição da palha de trigo	12
Tabela 4. Composição da palha de milho.....	14
Tabela 5. Principais diferenças entre celulose e hemicelulose	20
Tabela 6. Micro-organismos produtores de celulasas e substratos utilizados	277
Tabela 7. Comparação entre hidrólise enzimática e hidrólise ácida	31
Tabela 8. Métodos de pré-tratamentos em materiais lignocelulósicos.....	40
Tabela 9. Relação de reagentes e materiais.....	46
Tabela 10. Relação de equipamentos	47
Tabela 11. Composição do meio de cultura.....	50
Tabela 13. Função dos reagentes no método DNS	52
Tabela 12. Relação entre os volumes de caldo enzimático e de tampão acetato.....	58
Tabela 14. Capacidade de absorção dos resíduos.....	75
Tabela 15. Teores de lignina e celulose dos resíduos	78

AGUIAR, Caroline M. **Hidrólise enzimática de resíduos lignocelulósicos utilizando celulasas produzidas pelo fungo *Aspergillus niger***. 2010. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

RESUMO

Os resíduos lignocelulósicos são os mais abundantes no mundo e atualmente há uma preocupação mundial em aproveitá-los como matéria-prima na produção de bioetanol. Isto é possível visto que tais resíduos são ricos em celulose. A celulose é um biopolímero composto por moléculas de glicose unidas por ligações glicosídicas β -1-4. A glicose pode ser transformada em etanol por via fermentativa e pode ser obtida da celulose via hidrólise enzimática utilizando as enzimas celulasas. As celulasas podem ser produzidas por diversos micro-organismos sob condições adequadas. Dentre esses micro-organismos, destaca-se o fungo *Aspergillus niger*. Neste trabalho, celulasas foram obtidas cultivando-se *A. niger* em meio de cultura com os resíduos lignocelulósicos bagaço de cana-de-açúcar, palha de milho e palha de trigo pré-tratados com NaOH 4% como única fonte de carbono. Observou-se a cinética da fermentação com bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com NaOH 4% como fonte de carbono. Foram analisadas diversas variáveis que afetam a hidrólise enzimática utilizando os três resíduos lignocelulósicos pré-tratados com NaOH 4% como substrato. As variáveis analisadas foram: pH, temperatura, tempo de hidrólise enzimática, fração mássica de substrato e diluição do caldo enzimático. Avaliou-se a eficiência dos pré-tratamentos dos resíduos com NaOH 4% e com H₂O₂ 1%. Avaliou-se o comportamento da atividade enzimática submetendo os resíduos lignocelulósicos a hidrólises enzimáticas sucessivas. A desativação enzimática foi avaliada nas condições de resfriamento e congelamento do caldo enzimático. Nas condições estudadas, foi concluído que o *Aspergillus niger* produz celulasas quando cultivado em meio com resíduos lignocelulósicos pré-tratados como fonte de carbono. O tempo ideal para coleta do caldo enzimático, com produtividade máxima, foi de aproximadamente 7 dias. O complexo celulásico não sofre desativação se armazenado a temperatura de -18°C (freezer) por 43 dias, mas perde sua atividade em 43% após 48 h se armazenado a 4°C (geladeira). A palha de milho apresentou melhores resultados como fonte de carbono na fermentação e como substrato na hidrólise, comparada com os outros resíduos, com atividade enzimática de 0,895 U/mL. O pH ideal para se conduzir a hidrólise foi 4,8 na temperatura de 50°C por 50 minutos. A fração de substrato e a concentração das enzimas afetam linearmente a atividade enzimática. Os resíduos pré-tratados proporcionaram melhores resultados de atividade enzimática do que os resíduos não tratados. Os melhores resultados de atividade foram obtidos com os resíduos tratados com solução de H₂O₂ 1%, com atividade de 0,655 U/mL para o bagaço de cana, 0,892 U/mL para a palha de milho e 0,801 U/mL para a palha de trigo. Além disso, os resíduos tratados com H₂O₂ podem sofrer quatro processos de hidrólise sucessivos, com o segundo processo rendendo a maior atividade enzimática para todos os resíduos pré-tratados.

Palavras-chave: Resíduos lignocelulósicos, fermentação, enzimas celulasas, *Aspergillus niger*.

AGUIAR, Caroline M. **Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials using cellulases produced by the fungus *Aspergillus niger***. 2010. Dissertation (Master's Degree in Chemical Engineering) – Univ. Estadual do Oeste do Paraná.

ABSTRACT

Lignocellulosic materials are the most abundant residues in the world and there is a worldwide concern to use them as raw material for bioethanol production. This is possible because these materials are rich in cellulose. Cellulose is a biopolymer composed of glucose molecules linked by β -1-4 glycosidic bonds. Glucose can be converted into ethanol by fermentation and can be obtained from cellulose by enzymatic hydrolysis using cellulases. The cellulases can be produced by several microorganisms under appropriate environmental conditions. Amongst these microorganisms is the fungus *Aspergillus niger*. In this work, cellulases were obtained by fermentation cultivating *A. niger* in broth containing pretreated lignocellulosic materials such as sugarcane bagasse, corn straw or wheat straw as the only carbon source. The fermentation kinetic was observed when the pretreated sugarcane bagasse was used as the carbon source. Several variables that affect the enzymatic hydrolysis were analyzed using the three pretreated lignocellulosic materials as hydrolysis substrate. The variables analyzed were: pH, temperature, time of the hydrolysis, mass fraction of the substrate and dilution of the enzymatic broth. The pretreatment of the lignocellulosic materials is paramount for exposing the cellulose chain. Pretreatment consisted of using 4%w/w NaOH solution or 1%w/w H₂O₂ and their efficiency for removing the lignin from the residues were evaluated. The enzymatic activity also was evaluated by submitting the lignocellulosic materials to successive enzymatic hydrolysis. The enzyme deactivation was evaluated by cooling or freezing the enzymatic broth. It was concluded that *Aspergillus niger* produces cellulases when grown on medium with pretreated lignocellulosic materials as carbon source. Considering the fermentation kinetic, the ideal time to collect the enzymatic broth with maximum productivity was about 7 days. The cellulase complex does not suffer considerable deactivation when stored at -18°C (freezer) for 43 days, however, the broth activity drops by 43% after 48 hours when stored at 4°C (fridge). The corn straw showed better results as carbon source in fermentation and as substrate hydrolysis, compared with the other materials, with enzymatic activity of 0.895 U/ml. The ideal pH to conduct the enzymatic hydrolysis was 4.8 at 50°C for 50 minutes. The mass fraction of the substrate and enzyme concentration affects the enzymatic activity by a linear dependence. The pretreated materials provided higher enzymatic activity results than the untreated materials. The highest activity enzymatic results were obtained with H₂O₂ treated substrates, with enzymatic activity of 0.655 U/ml for the sugarcane bagasse, 0.892 U/ml for the corn straw and 0.801 U/ml for the wheat straw. Also, the results show that the H₂O₂ pretreated materials can be submitted up to, at least, four successive hydrolysis with the second one yielding the highest enzymatic activity for all pretreated residues.

Key-words: Lignocellulosic materials, fermentation, cellulase enzymes, *A. niger*.

1. INTRODUÇÃO

Os resíduos lignocelulósicos são os mais abundantes no mundo e tal biomassa apresenta um potencial enorme para a obtenção de produtos de interesse industrial como bioetanol, glicose e biomassa protéica. Esses resíduos são abundantes fontes de carboidratos e sua bioconversão tem recebido grande atenção nos últimos anos. Processos utilizando esse tipo de resíduo como matéria-prima podem minimizar a falta de alimentos, resolver problemas de desperdício e diminuir a dependência do homem por combustíveis fósseis através do fornecimento de uma conveniente e renovável fonte de energia na forma de glicose (OJUMU, 2003).

Diante da celeuma trazida pelas mudanças climáticas e do patamar dos preços do barril de petróleo, o etanol está se tornando realidade mundial. Nos últimos anos o interesse pelo uso do etanol como combustível tem motivado muitas pesquisas que objetivam a produção de etanol da celulose presente em materiais lignocelulósicos (IDEANEWS, 2007).

Atualmente o Brasil se defronta com um aumento significativo da demanda de etanol combustível. Esse aumento se deve a fatores tais como: o aumento do consumo interno de álcool devido ao aumento das vendas de carros bicombustíveis e a expansão das exportações brasileiras de etanol em função do interesse pela mistura do álcool à gasolina. Para suprir essa demanda, muitos pesquisadores têm estudado o aproveitamento de materiais lignocelulósicos para a produção de etanol.

Graças à vasta biodiversidade encontrada em seu território, o Brasil dispõe de uma grande variedade de resíduos agrícolas e agroindustriais cujo bioprocessamento seria de grande interesse econômico e social. Dentre estes exemplos figuram os resíduos derivados de atividades tais como as indústrias de papel e celulose (sepilho, maravalhas e cavacos desclassificados de eucalipto e pinus), serrarias (serragem), usinas de açúcar e álcool (bagaço de cana-de-açúcar) e, de um modo geral, unidades de produção agrícola geradoras de resíduos de culturas como a palha de cereais, de milho, de trigo, sabugo de milho, cascas de arroz e de aveia, dentre outros (RAMOS, 2000).

No Brasil, a quantidade de resíduos lignocelulósicos gerada anualmente é de aproximadamente 350 milhões de toneladas. Com tal quantidade de resíduo têm-se a capacidade de produção de 147 milhões de toneladas de açúcares (sacarose e

glicose), gerando um potencial de produção de etanol de 92 bilhões de litros. Essa produção corresponde a 2,6 vezes a produção do Brasil e dos Estados Unidos juntas. Se considerarmos as eficiências de hidrólise e fermentação, a capacidade de produção de etanol é de aproximadamente 60 bilhões de litros (PEREIRA Jr., 2007).

Os resíduos lignocelulósicos são compostos basicamente de celulose, hemicelulose e lignina conforme apresenta a Figura 1.

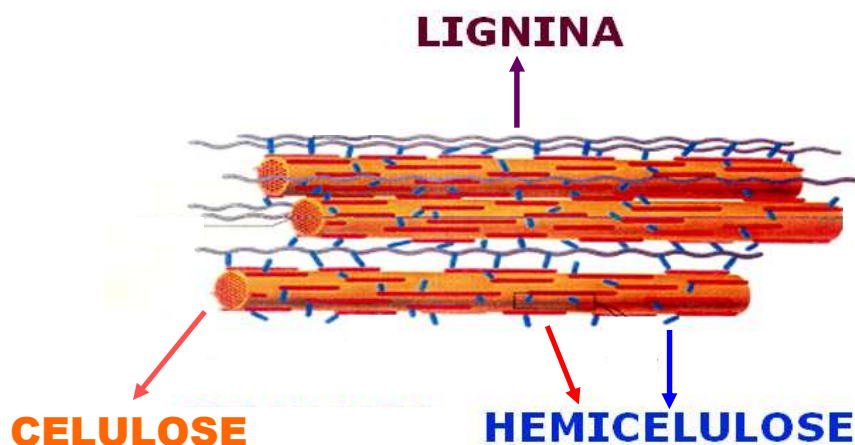


Figura 1. Complexo lignocelulósico: cadeias de celulose envolvidas por hemicelulose e lignina.

Fonte: Pereira Jr., 2007.

Em geral, tais resíduos são resistentes à bioconversão e requerem um pré-tratamento para aumentar sua digestibilidade e tornar a celulose mais acessível à etapa de hidrólise (RABELO, 2007). Isto implica na ruptura do complexo celulose-hemicelulose-lignina tornando, assim, a celulose mais acessível. Estes processos podem ser térmicos, químicos, físicos, biológicos ou uma combinação desses, o que dependerá do grau de separação requerido e do fim a que se destina o processo (RAMOS, 2000).

Por várias décadas a hidrólise eficiente de materiais lignocelulósicos e a fermentação posterior dos açúcares resultantes têm sido um grande desafio. As rotas de hidrólise mais estudadas são: hidrólise ácida e hidrólise enzimática (RABELO, 2007).

Embora a hidrólise ácida de biomassa seja eficiente e relativamente barata, gera resíduos poluentes e produtos que inibem a fermentação posterior. Por isso, a

sacarificação enzimática tem sido objeto da maior parte dos estudos. O processo enzimático oferece potencial de redução de custos em longo prazo, pois é possível se atingir rendimentos próximos dos estequiométricos e em condições menos críticas de temperatura, pressão e agressividade química, além do processo ser menos poluente. No entanto, no estágio de desenvolvimento atual, o processo ainda é economicamente inviável, o que justifica o interesse pelo estudo das variáveis que afetam o processo (RABELO, 2007). O alto custo está relacionado, principalmente, às enzimas utilizadas no processo de hidrólise e ao processo de pré-tratamento dos resíduos (IDEANEWS, 2007).

Na natureza, a degradação da celulose é realizada por fungos e bactérias. Estes produzem enzimas, como as celulasas, que degradam especificamente a cadeia polimérica, originando polímeros com cadeias mais curtas. As espécies de fungos filamentosos mais estudadas são: *Trichoderma reesei*, *Penicillium pinophilum*, *Humicola insolens*, *Trichoderma koningii*, *Penicillium funiculosum*, *Fusarium solani*, *Myrothecium verrucaria*, *Sporotrichum pulverulentum* e *Aspergillus niger*. Tais fungos excretam celulasas de alta atividade no meio de cultura (RABELO, 2007).

O complexo celulásico secretado por fungos filamentosos é formado por três componentes enzimáticos majoritários, as endoglucanases, as celobiohidrolases (exoglucanases) e as β -glucosidases. As endoglucanases atuam randomicamente ao longo da molécula de celulose. Por sua vez, as celobiohidrolases atuam nas regiões terminais das moléculas de celulose, promovendo a sua despolimerização gradativa através da remoção de unidades de celobiose terminais. Finalmente, as β -glucosidases hidrolisam celobiose a glicose, reduzindo assim o seu efeito inibidor sobre as endo e exoglucanases. Estas três classes de enzimas, individualmente, acarretam alterações bastante diferenciadas na estrutura supramolecular da celulose, mas por apresentarem propriedades complementares, descrevem um alto grau de sinergismo (ou ação cooperativa) durante a hidrólise ou sacarificação da celulose (RAMOS, 2000).

O rendimento da hidrólise enzimática depende de muitos fatores, tais como: tipo de pré-tratamento do substrato, o qual visa expor as cadeias de celulose, inibição da atividade enzimática pelos produtos finais, termoestabilidade das enzimas, concentração e adsorção do substrato, tempo de duração da hidrólise, pH

do meio, temperatura, concentração de substrato e de enzima no meio e taxa de agitação (RABELO, 2007).

Por outro lado, de acordo com Shuler (1992) e Ramos (2000), os principais fatores que afetam a atividade enzimática são: Porosidade e área superficial disponível do substrato, grau de polimerização e cristalinidade da celulose e a ação catalítica das enzimas (efeito inibitório pelo produto final, inativação ou desnaturação pelo efeito do tempo, temperatura e agitação, sinergismo entre as três enzimas envolvidas e efeito das concentrações de enzima e substrato).

1.1. Objetivo Geral

O objetivo geral do trabalho foi avaliar a hidrólise enzimática dos resíduos lignocelulósicos bagaço de cana-de-açúcar, palha de milho e palha de trigo utilizando as enzimas celulasas produzidas pelo fungo *Aspergillus niger*.

1.2. Objetivos específicos

1. Pré-tratamento alcalino e alcalino oxidativo dos resíduos utilizados nos processo de fermentação e hidrólise enzimática;
2. Produção de celulasas e hidrólise enzimática utilizando os três resíduos pré-tratados;
3. Avaliação da cinética da fermentação utilizando bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado;
4. Análise do efeito das variáveis pH, temperatura, tempo, fração mássica de substrato e diluição do caldo enzimático sobre a atividade enzimática;
5. Avaliação da eficiência dos tratamentos dos resíduos através da determinação da atividade enzimática e da determinação de lignina e celulose dos resíduos antes e após os tratamentos;
6. Avaliação do processo de hidrólises enzimáticas sucessivas dos resíduos pré-tratados;
7. Avaliação da cinética de desativação enzimática das celulasas através dos processos de resfriamento e congelamento;

2. REVISÃO DA LITERATURA

Este capítulo apresenta os aspectos importantes referentes à utilização de resíduos lignocelulósicos em processos de hidrólise enzimática utilizando enzimas celulases, bem como a composição e estrutura de tais resíduos. São apresentados também, os principais micro-organismos produtores de celulases, o mecanismo de hidrólise enzimática e os fatores que afetam a hidrólise enzimática de resíduos lignocelulósicos.

2.1. Resíduos Lignocelulósicos

As tendências mundiais para o avanço científico e tecnológico na área de novos combustíveis destacam a importância da utilização de resíduos agroindustriais como matéria-prima nos processos de produção. A reutilização e reciclagem destes resíduos podem minimizar os problemas ambientais ligados ao seu acúmulo e diminuir o uso de combustíveis fósseis, além de resultar em uma melhora no aproveitamento da matéria-prima, que é de grande interesse na atualidade (RABELO, 2007). Tais resíduos são denominados também de biomassa lignocelulósica.

O termo biomassa se refere, em sua definição mais ampla, a qualquer tipo de matéria orgânica oriunda de fontes vegetais ou animais, ou de seus processos de transformação naturais ou artificiais. Estes materiais têm em comum a origem direta ou indireta do processo de fotossíntese. Por esta razão, são formados periodicamente e sua produção não está limitada no tempo, em outras palavras, são renováveis. Dentre a matéria orgânica de origem vegetal, ou seja, a biomassa vegetal podemos citar (PEREIRA Jr., 2007):

- Biomassa Natural;
- Biomassa Alimentícia;
- Biomassa Residual;
- Biomassa de Cultivos Energéticos.

Dentre as biomassas residuais podemos destacar as de composição lignocelulósica (resíduos lignocelulósicos).

Segundo Tamanini (2004), a utilização de resíduos provenientes da exploração da biomassa lignocelulósica para obtenção de bioprodutos é uma

alternativa para a produção de energia e de alimentos, pois a madeira e os resíduos da agroindústria constituem reservas naturais renováveis disponíveis em grandes quantidades. Os materiais lignocelulósicos incluem vários resíduos agrícolas (palhas, cascas, cavacos), madeiras duras provenientes de árvores de folhas decíduas (dicotiledôneas), madeiras moles provenientes de coníferas e resíduos das indústrias de papel.

A composição destes materiais é bastante variável, pois os constituintes possuem características químicas semelhantes às da madeira e são identificados em diferentes quantidades percentuais, dependendo da espécie e condições de crescimento. A biomassa lignocelulósica é composta de celulose (~35-50%), hemicelulose (~20-35%), lignina (~10-25%), além de pequenas quantidades de outros componentes (extrativos) (~5-20%) (TAMANINI, 2004; RABELO, 2007). A tabela 1 apresenta a composição química parcial dos principais resíduos lignocelulósicos.

Tabela 1. Composição química parcial dos principais resíduos lignocelulósicos

Resíduos lignocelulósicos	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Referências
Farelo de cevada	23	32,7	24,4	Cruz et al., 2000
Sabugo de milho	31,7	34,7	20,3	Cruz et al., 2000
Bagaço de cana	47	27,5	20,3 - 26,3	Rabelo, 2007; Canilha et al., 2007; Rodrigues, 2007
Palha de arroz	43,5	22	17,2	Mussato; Roberto, 2002
Palha de trigo	33 - 42	25 - 32	16 - 23	Kerstetter & Lyons, 2001
Casca de aveia	30,5	28,6	23,1	Felipe et al., 2003
Palha de sorgo	34	44	20	Herrera et al., 2004
Palha de milho	25 - 41,2	34,5	14,1	Salazar, 2005; Tamanini, 2004
Semente de algodão	20	13,1	17,6	Lee, 1997
Jornal	64,4	21,7	21	Lee, 1997
Resíduos Urbanos	40	26	20	Lee, 1997
Casca de soja	40 - 53	14 - 33	1 - 3	Soya Handbook, 2003

Fontes: Kerstetter & Lyons, 2001; Tamanini, 2004; Salazar, 2005; Canilha et al., 2007; Pereira Jr., 2007; Rabelo, 2007; Rodrigues, 2007; Paris, 2008.

Mundialmente, a quantidade de resíduos lignocelulósicos produzidos é estimada em 1,55 bilhões de toneladas/ano incluindo sabugo de milho, palha de cevada, de trigo, de arroz e de sorgo e bagaço de cana (EPOBIO, 2007).

No Brasil, a quantidade de resíduos lignocelulósicos gerada anualmente é de aproximadamente 350 milhões de toneladas. Com tal quantidade de resíduo tem-se a capacidade de produção de 147 milhões de toneladas de açúcares (sacarose e glicose). Essa produção corresponde a 2,6 vezes a produção do Brasil e dos Estados Unidos juntas (PEREIRA Jr., 2007).

Segundo Pereira Jr. (2007), a safra de 1990/1991 gerou cerca de 154,8 milhões de toneladas de resíduos lignocelulósicos como: resíduos da cana, algodão, aveia, milho, trigo, arroz, soja, feijão, sorgo e cevada, subindo para 345,4 milhões de toneladas na safra de 2005/2006.

Os principais benefícios de tecnologias de conversão de biomassas residuais ou, resíduos lignocelulósicos, através de rotas biotecnológicas e/ou químicas para o Brasil, de acordo com Pereira Jr. (2007), são:

- Fontes abundantes e baratas de recursos renováveis;
- Oportunidade para o desenvolvimento industrial com base no conceito de Biorrefinaria;
- Redução nas emissões gasosas que causam o “efeito estufa”;
- São tecnologias mais limpas;
- Promovem benefícios macroeconômicos para as comunidades rurais e para a Sociedade como um todo;
- Estão inseridas no contexto de Desenvolvimento Sustentável

2.1.1. Bagaço de cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar, *Saccharum officinarum*, é uma gramínea originária da Índia e introduzida no Brasil na época colonial, sendo hoje muito cultivada em regiões tropicais e subtropicais do país. As gramíneas constituem uma grande família de plantas da classe das monocotiledôneas, de folhas envoltentes e caule em geral oco. Desde a sua origem até os dias atuais ela vem passando por modificações, o que resultou em várias espécies, as quais diferem entre si principalmente quanto ao conteúdo de fibras e açúcares. Hoje, a maior parte da cana-de-açúcar cultivada é

um híbrido de planta original com outras espécies da mesma família (RABELO, 2007).

A cana-de-açúcar é uma planta de suma importância para a economia brasileira, tornando-se grande geradora de empregos e de energia via industrialização desta em açúcar e álcool (MANZANO, 2000).

No processamento da cana-de-açúcar, após a separação da garapa, da qual são produzidos o açúcar e o etanol, o resíduo mais abundante é o bagaço que é em parte queimado para a geração de calor e energia para a própria usina e atualmente vem sendo comercializado para reduzir os problemas da crise no fornecimento de energia elétrica (RABELO, 2007). Para cada tonelada de cana-de-açúcar processada são gerados cerca de 250 kg de bagaço. Desses 250 kg de bagaço, são consumidos aproximadamente 60% pela própria usina, dependendo do número de caldeiras e do tamanho das mesmas, na geração de vapor para a produção de energia elétrica e acionamento de turbinas.

Segundo Pereira Jr. (2007), uma tonelada de cana-de-açúcar no campo gera 153 kg de açúcares, 276 kg de bagaço (50% umidade) e 165 kg de palha (15% umidade). Considerando que a palha é totalmente queimada no campo e que aproximadamente 60% do bagaço é utilizado para a geração de energia pelas próprias usinas, estima-se que cerca de 40% do conteúdo energético da cana não têm adequado aproveitamento.

A Figura 2 apresenta a foto do bagaço excedente de uma usina de álcool e açúcar.

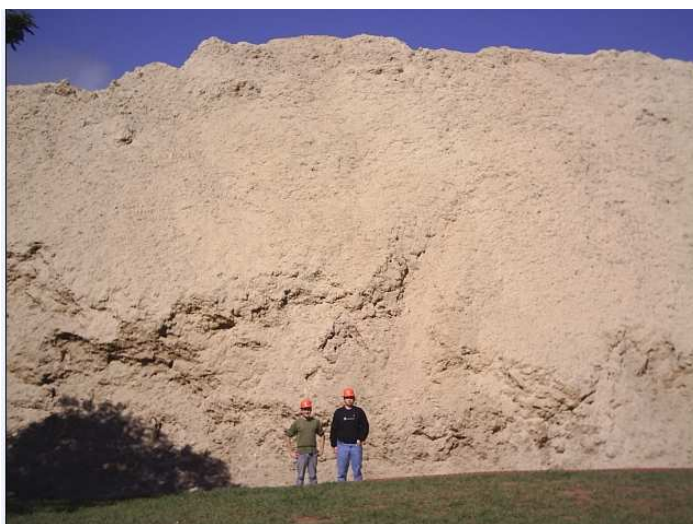


Figura 2. Bagaço de cana-de-açúcar excedente da usina COOPCANA.
Fonte: Arquivo Pessoal.

Segundo Rabelo (2007), devido ao excedente, foi estimado que as usinas de açúcar e álcool podem liberar de 30 a 50% do bagaço produzido para usos alternativos. Dessa forma, o uso do bagaço de cana como matéria-prima para a produção de celulose e outros produtos de maior valor agregado tem aumentado consideravelmente nas últimas décadas, particularmente em países onde há pouca ou quase nenhuma disponibilidade de madeira, como Cuba, Índia e China.

A utilização do bagaço de cana-de-açúcar pode ser tanto para fins energéticos como não energéticos. Por exemplo, este pode ser empregado como matéria-prima na produção de papel, celulose aglomerada e compensado ou como volumoso, na alimentação animal. É também fonte de matéria-prima para a indústria química, podendo produzir xilose, xilitol, furfurool e derivados. Sua principal utilização é como combustível para geração de energia elétrica, mas, como se trata de um produto rico em açúcares fermentescíveis (porém não disponíveis), este vem despertando interesse de pesquisadores no uso como insumo na produção de etanol por meio da hidrólise enzimática ou ácida.

Dentre as biomassas, o bagaço de cana é aquele que reúne os melhores atributos econômicos para ser industrializado e competir comercialmente com o óleo combustível em virtude das várias vantagens, como: a produção em grande quantidade, seu poder calorífico superior ser de 3.700 kcal/kg, já se apresenta processado das moendas, tem custo mínimo e está pronto para uso no local, evitando aumento de custo devido ao transporte (PELLEGRINI, 2002; RABELO, 2007).

Assim como outros materiais lignocelulósicos, o bagaço de cana-de-açúcar é constituído principalmente por celulose (aproximadamente 47%), hemicelulose (aproximadamente 27,5%) e lignina (aproximadamente de 20,3 a 26,27%) (CANILHA et al., 2007; RABELO, 2007; RODRIGUES, 2007).

A composição do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* está apresentada pela Tabela 2.

Tabela 2. Composição do bagaço de cana *in natura*

Componentes	Composição (%)
Celobiose	3,34
Glicose	46,20
Hidroximetilfurfural	0,30
Ácido Fórmico	0,56
Xilose	24,21
Arabinose	1,70
Furfural	1,25
Ácido glucurônico	1,09
Ácido acético	2,64
Lignina solúvel	2,61
Lignina Insolúvel	23,66
Cinzas	1,61
Extrativos	-

Fonte: Canilha et al., 2007.

2.1.2. Palha de trigo

O trigo é uma gramínea do gênero *Triticum*, que contém 30 tipos geneticamente diferenciados, entre os quais apenas três são produzidos comercialmente, o *Aestivum Vulgaris*, o *Turgidum Durum* e o *Compactum*. O *Durum* é utilizado na produção de macarrão e outras massas, o *Compactum* é um trigo de baixo teor de glúten, produzido em pequena proporção, utilizado para fabricar biscoitos suaves, enquanto que o *Aestivum* é responsável por mais de quatro quintos da produção mundial, por ser o adequado à panificação (ABITRIGO, 2009).

O trigo plantado no Brasil é o *Triticum aestivum*. É uma planta originária do Oriente Médio (Ásia), cultivada há mais que 500 anos na Síria e de grande importância para povos babilônicos e egípcios. É um dos principais alimentos da humanidade, ocupa 20% da área cultivada no mundo (SEAGRI, 2009). As principais

áreas produtoras são a China, União Européia, EUA, Índia e Rússia. O total mundial chega a 600 milhões de toneladas (ABITRIGO, 2009).

No Brasil, sua produção concentra-se no Sul e Centro-Sul do país tendo como principais produtores os estados do Rio Grande do Sul, Paraná e São Paulo. A região Sul é responsável por 90% da produção nacional brasileira (SEAGRI, 2009).

Além do grão de trigo, o resto da planta é constituído de caules e folhas (palha). A palha é uma capa protetora ao longo do grão e os subterrâneos do sistema radicular. Após a colheita dos grãos, a palha pode ser queimada, removida ou deixada no campo. O destino da palha dependerá de diversos fatores, incluindo a quantidade de material, a próxima cultura a ser plantada, as condições atmosféricas, as necessidades nutricionais do solo, o declive do terreno, bem como quaisquer mercados que podem estar disponíveis para a palha (KERSTETTER & LYONS, 2001).

No Brasil, a palha de trigo é utilizada, principalmente, para recompor os solos após a colheita do cereal. Atualmente existem pesquisas voltadas ao uso da palha em peças de veículos, no processo de produção de cogumelos comestíveis e também na valorização deste resíduo em produtos artesanais (PORTAL DO AGRONEGÓCIO, 2009).

A palha de trigo pode ser utilizada como matéria-prima para papel e produção de bioenergia através da combustão e, atualmente, apresenta-se como uma alternativa interessante para a bioconversão em etanol (KERSTETTER & LYONS, 2001), já que encontra-se entre os principais materiais lignocelulósicos, composta basicamente por celulose, hemicelulose e lignina. A composição química da palha de trigo é de, basicamente, 33 a 42% de celulose, 25 a 32% de hemicelulose, 16 a 23% de lignina e menos de 1% de extrativos (KERSTETTER & LYONS, 2001). A Tabela 3 apresenta a composição da palha de trigo.

Tabela 3. Composição da palha de trigo

Componentes	% massa em base seca
Glicose	29,60
Xilose	17,50
Arabinose	2,10
Galactose	1,00
Manose	0,30
Lignina solúvel	3,80
Lignina Insolúvel	23,80
Cinzas	9,00
Extrativos	19,10

Fonte: Ruiz, 2009.

Pesquisas com a palha de trigo têm sido extensivamente realizadas. Chahal (1985) utilizou palha de trigo deslignificada para produção de enzimas celulases em fermentação em estado sólido. Singh (2009) realizou estudos para produção de celulases com palha de trigo através de fermentação submersa. Curreli et al. (2002), Tabka et al. (2006), Ballesteros et al. (2006) e Thomsen et al. (2006), citados por KERSTETTER & LYONS (2001), utilizaram a palha em estudos de sacarificação. Akhtar (2001) realizou sacarificação de palha de trigo por celulases de *B. subtilis*.

2.1.3. Palha de milho

Consumido pelos povos americanos desde o ano 5 mil a.C., o milho (*Zea mays*) foi a alimentação básica de várias civilizações importantes ao longo dos séculos. Com a descoberta da América e as grandes navegações do século XVI, a cultura do milho se expandiu para outras partes do mundo. Hoje é cultivado e consumido em todos os continentes e sua produção só perde para a do trigo e do arroz. No Brasil, o cultivo do milho vem desde antes do descobrimento. Os índios, principalmente os guaranis, tinham o cereal como o principal ingrediente de sua dieta. Com a chegada dos portugueses, o consumo aumentou e novos produtos à

base de milho foram incorporados aos hábitos alimentares dos brasileiros (ABIMILHO, 2008).

No Brasil, esta é uma cultura que ocupa extensas áreas. Entre as principais regiões produtoras estão o Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. O estado do Paraná é o maior produtor do país, produzindo, na safra 06/07, cerca de 11,2 milhões de toneladas, seguido de Minas Gerais com 5,3 milhões de toneladas (ABIMILHO, 2008). Segundo estimativa da Companhia Nacional de Abastecimento (Conab) o Estado deve produzir 24,84 milhões de toneladas em 2009 (PORTAL DO AGRONEGÓCIO, 2009).

Após a colheita do milho no campo, os principais resíduos são caule, palha, casca e sabugo, os quais podem ser utilizados triturados na alimentação de animais, porém com pouco valor nutritivo (EMBRAPA, 2009). A palha pode ser também queimada nas áreas rurais, descartada ou utilizada como cobertura em solo após a colheita mecanizada, o que, em excesso, tem causado sérios problemas de pragas que proliferam em ambientes úmidos e protegidos (WANG, 2005; FAPESP, 2007; PORTAL DO AGRONEGÓCIO, 2009).

A palha de milho, atualmente, é destinada apenas para a produção de cigarros, embalagens de doces, artesanato de cestaria e de bonecas, muito embora a cultura do milho tenha grande importância no agronegócio brasileiro, com produção anual de cerca de 35 milhões de toneladas, e as possibilidades de melhoria na qualidade deste material, especialmente para o artesanato sejam estratégicas (MARCONCINI, 2008).

É crescente o número de pesquisas com o objetivo de reaproveitar este material, agregando-lhe valor e renda. Países como o México estão interessados em adquirir o material proveniente de colheita manual do Brasil (Paraná), já que lá a palha é muito utilizada para embalar alimentos. A produção de produtos artesanais também está colaborando na valorização deste abundante resíduo (PORTAL DO AGRONEGÓCIO, 2009). A palha tem sido extensamente utilizada em estudos de produção de enzimas através de fermentação em estado sólido, tanto como suporte como fonte de nutrientes para os micro-organismos (PANDEY, 1999; BORZANI, 2001).

Resíduos como a palha de milho são uma alternativa interessante em pesquisas objetivando a produção de bioetanol a partir de resíduos lignocelulósicos (PORTAL DO AGRONEGÓCIO, 2009). A palha possui aproximadamente 25 a 41,2% de celulose (SALAZAR, 2005), cerca de 34,5% de hemicelulose (TAMANINI, 2004) e 14,1% de lignina (SALAZAR, 2005). A Tabela 4 apresenta a composição da palha de milho.

Tabela 4. Composição da palha de milho

Componentes	% massa em base seca
Glicose	36,80
Xilose	22,20
Arabinose	5,50
Galactose	2,90
Manose	-
Lignina	23,10
Outros	9,50

Fonte: Olsson & Ahring, 2007.

2.2. Celulose

A celulose, respondendo isoladamente por aproximadamente 40% de toda reserva de carbono disponível na biosfera, é a fonte mais abundante deste elemento base dos componentes orgânicos. Está presente em todas as plantas, desde árvores altamente desenvolvidas até em organismos mais primitivos e seu conteúdo nestas espécies varia de 20 a 99% (RABELO, 2007).

É um homopolissacarídeo, constituído por unidades de anidroglicopiranosose (β -D-glicopiranosose) ligadas entre si por ligações glicosídicas do tipo β -(1 \rightarrow 4) formando uma cadeia linear. Duas unidades adjacentes formam uma ligação glicosídica através da eliminação de uma molécula de água, que envolve os grupos hidroxílicos dos carbonos 1 e 4. Esta estrutura dissacarídica recebe o nome de celobiose. A celobiose é definida como unidade conformacional mínima da celulose, enquanto a glicose representa tão somente a unidade fundamental das cadeias do

homopolímero (PITARELO, 2007). A Figura 3 representa a estrutura linear da celulose com indicação do tipo de ligação e da unidade estrutural.

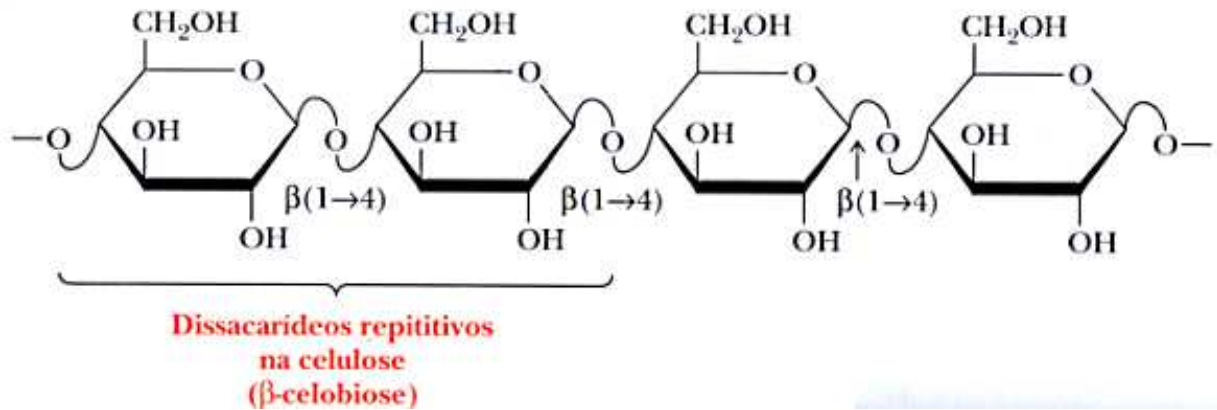


Figura 3. Representação da cadeia linear de celulose.

Fonte: Campbell, 2000.

As ligações do tipo β -(1 \rightarrow 4) presentes na molécula de celulose são de difícil hidrólise, apenas alguns seres, como fungos e bactérias, são capazes de tal função. Além destas ligações, são encontradas forças de van der Waal's (ZHANG & LYND, 2004) e pontes de hidrogênio intra e intercadeia, as quais permitem a combinação de cadeias de celulose para formar os cristalitos (SHULER, 1992). A Figura 4 representa as cadeias de celulose e suas ligações intra e intercadeia.

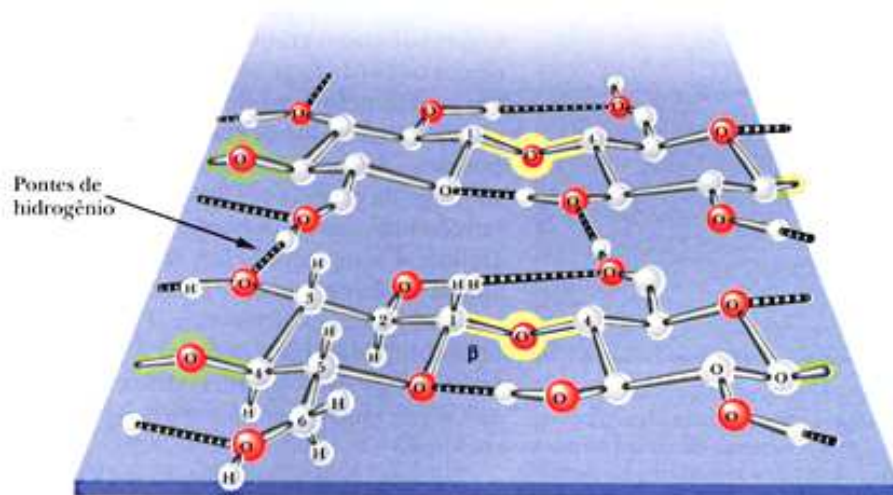


Figura 4. Representação das cadeias de celulose ligadas por pontes de hidrogênio.

Fonte: Campbell, 2000.

O tamanho ou extensão da cadeia de celulose é medido através de seu grau de polimerização (GP), que representa o número de unidades de anidroglicose que formam a cadeia polimérica. Este valor varia de acordo com a fonte, o grau de maturação da parede celular, o processamento a que as fibras foram submetidas e o seu tempo de envelhecimento (PITARELO, 2007). O GP de substratos celulósicos pode variar de <100 a >15000 e a solubilidade da celulose é reduzida drasticamente com o aumento do GP devido à presença das pontes de hidrogênio intermoleculares (ZHANG & LYND, 2004).

A celulose apresenta regiões altamente ordenadas (regiões cristalinas), estabilizadas por numerosas pontes de hidrogênio intra e intermoleculares, e áreas menos ordenadas ou amorfas, onde as cadeias apresentam orientação randomizada. A proporção da parte cristalina é normalmente expressa em porcentagem (índice de cristalinidade ou CrI) e depende da origem e processo de obtenção da celulose (PITARELO, 2007).

Vários autores têm sugerido que a celulose amorfa, devido a sua maior área superficial, é mais suscetível à hidrólise enzimática do que a forma ordenada ou cristalina (PITARELO, 2007). Segundo Coughlan (1985), citado por MARTINS (2005), estudos de modelagem demonstraram que sítios de menor organização molecular, localizados na superfície da estrutura cristalina, são mais suscetíveis ao ataque enzimático.

Devido à linearidade do esqueleto celulósico, cadeias adjacentes formam um conjunto de agregados insolúveis em água de vários comprimentos e larguras, denominadas fibrilas elementares. Diversas fibrilas, com espessura média de 3,5 nm, se associam umas com as outras formando cristalitos de celulose. Posteriormente quatro desses agregados cristalinos se unem através de uma monocamada de hemicelulose e lignina. O composto natural que resulta dessa associação é chamado de microfibrila de celulose (PITARELO, 2007). A Figura 5 representa a associação dos componentes da parede celular de materiais lignocelulósicos para a formação da microfibrila.

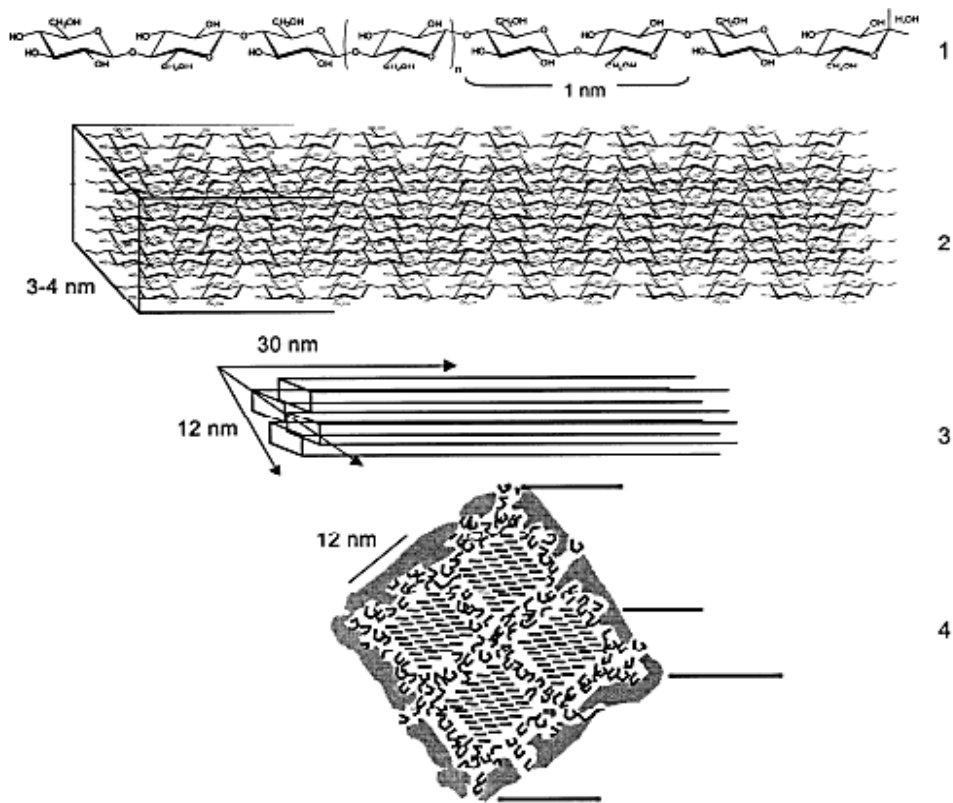


Figura 5. Associação dos componentes da parede celular de materiais lignocelulósicos. 1) cadeia linear de celulose; 2) arranjo das cadeias na fibrila elementar; 3) cristalito; 4) seção transversal da microfibrila.

Fonte: Pitarelo, 2007.

A Figura 6 representa um esquema da parede celular vegetal, indicando as microfibrilas e o envolvimento das mesmas pela hemicelulose.

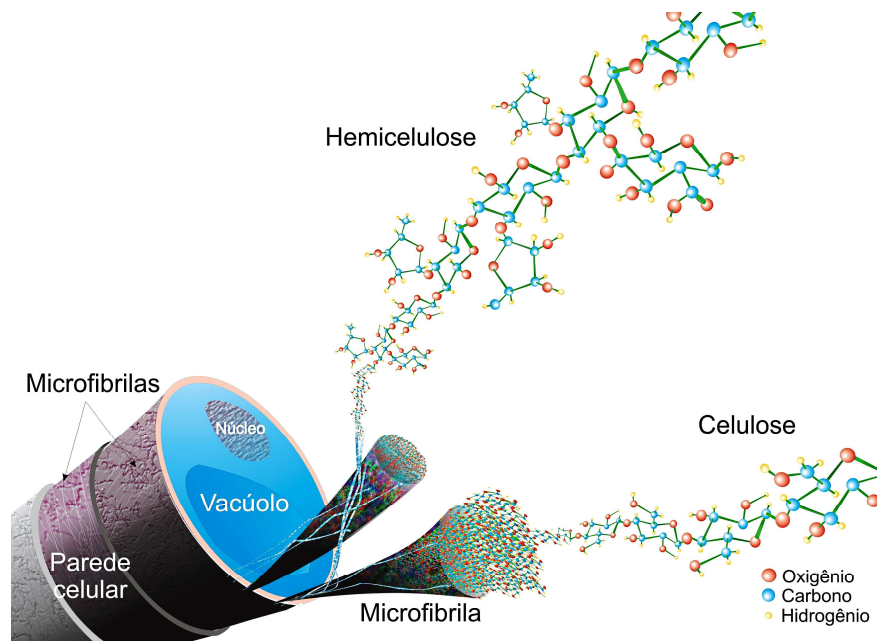


Figura 6. Esquema da parede celular vegetal.

Fonte: Buckeridge, 2008.

Segundo Ojumu (2003) e Lima (2007), com o resultado da associação dos diferentes tipos de polímeros que compõem a matéria vegetal (celulose, hemicelulose e lignina), o grau de cristalinidade e o empacotamento provocado pela estrutura complexa da lignina, obtém-se um material de estrutura rígida e muito resistente ao ataque enzimático, dessa forma a degradação da celulose na natureza ocorre lentamente a partir das extremidades susceptíveis.

No entanto, complexos enzimáticos produzidos por vários micro-organismos têm se demonstrado capazes de catalisar a hidrólise da celulose, tanto cristalina quanto amorfa, em açúcares de baixa massa molecular como a glicose e celobiose (MARTINS, 2005).

2.3. Hemicelulose

As hemiceluloses são genericamente caracterizadas como uma família de polissacarídeos presentes na parede celular vegetal, sendo definidas atualmente como polissacarídeos não-amiláceos e não-celulósicos que podem ser extraídos da parede celular dos vegetais superiores (MARTINS, 2005). O teor de hemicelulose em diferentes tipos de vegetais é bastante variável, com um valor médio de 20% (RABELO, 2007).

Hemiceluloses se referem a uma mistura de polímeros de hexoses, pentoses e ácidos urônicos, que podem ser lineares ou ramificados, amorfos, e possuem peso molecular relativamente baixo. Podem receber diferentes denominações, como por exemplo, xilanas, mananas, arabinanas, entre outras, conforme a composição e predominância de monossacarídeos (PEREIRA JR., 2007; MARTINS, 2005).

Segundo Pitarelo (2007), o grau de polimerização das hemiceluloses não ultrapassa o valor médio de 200 unidades de anidroaçúcar, portanto, bastante inferior ao da celulose nativa. A Figura 7 apresenta as estruturas químicas das principais hemiceluloses presentes na parede vegetal de plantas.

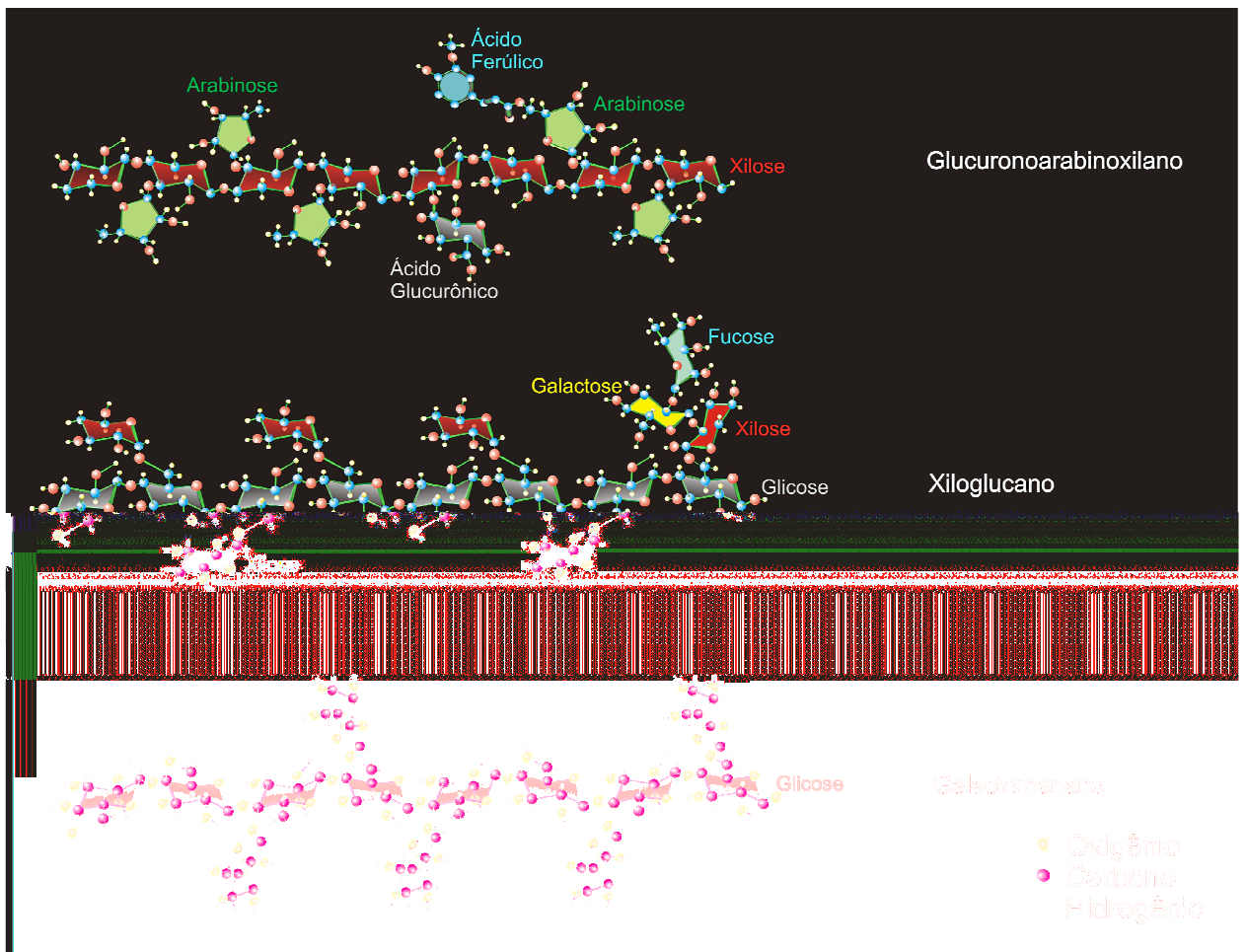


Figura 7. Estruturas químicas de algumas hemiceluloses.
 Fonte: Buckeridge, 2008.

As hemiceluloses são depositadas de forma intercalada nas microfibrilas de celulose em um estágio anterior à lignificação, dando elasticidade e flexibilidade ao agregado e impedindo que as microfibrilas de celulose se toquem (MARTINS, 2005). Além de se ligarem às superfícies das microfibrilas de celulose, as hemiceluloses também se ligam firmemente entre si, mantendo ligações cruzadas através de pontes de hidrogênio, em uma rede complexa (FASANELLA, 2008). A Figura 8 representa de forma simplificada as microfibrilas de celulose ligadas pelas hemiceluloses (polioses) e as mesmas ligadas entre si.

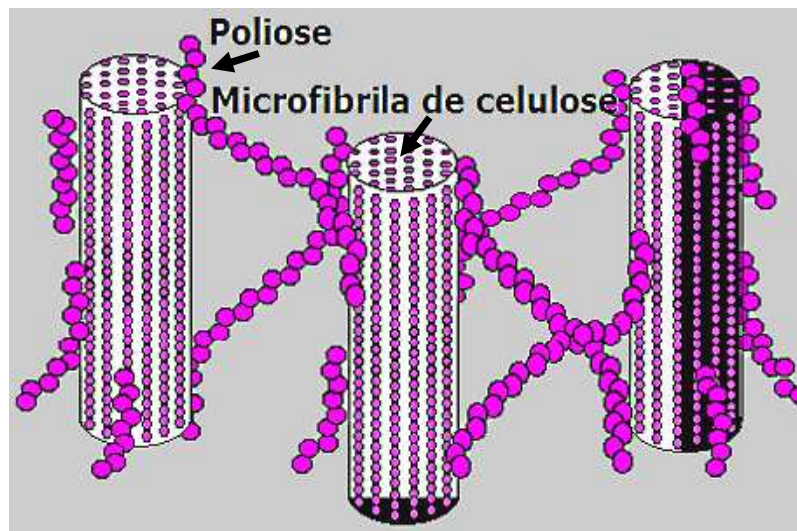


Figura 8. Representação simplificada de hemiceluloses ligadas entre si e à celulose.
 Fonte: <http://www.webinbox.com.br/upload/deprctufesbr/MMPQI%20Aula%208%20-%20Quimica%20da%20madeira.ppt> acessado em 30/07/2009.

As principais diferenças entre celulose e hemiceluloses, citadas por Zhang & Lynd (2004) e Pereira Jr. (2007) estão apresentadas pela Tabela 5.

Tabela 5. Principais diferenças entre celulose e hemicelulose

Celulose	Hemicelulose
Consistem em unidades de glicose ligadas entre si (Natureza Homopolissacarídica)	Consistem em várias unidades de pentoses e hexoses ligadas entre si (Natureza Heteropolissacarídica)
Alto grau de polimerização (100 a 15.000)	Baixo grau de polimerização (50 a 300)
Forma arranjo fibroso	Não formam arranjo fibroso
Apresenta regiões cristalinas e amorfas	Apresentam somente regiões amorfas
É atacada lentamente por ácido inorgânico diluído a quente	São atacadas rapidamente por ácido inorgânico diluído a quente
É insolúvel em álcalis	São solúveis em álcalis

Fontes: Zhang & Lynd, 2004; Pereira Jr., 2007.

2.4. Lignina

A lignina, depois da celulose, é a macromolécula orgânica mais abundante dentre os materiais lignocelulósicos. É uma substância que vai sendo incorporada durante o crescimento do vegetal, sendo composta basicamente de unidades fenilpropano que formam uma macromolécula tridimensional e amorfa. A lignina representa de 20 a 30% da massa total do material lignocelulósico (RABELO, 2007) e apresenta-se como um composto heterogêneo, de alto peso molecular, de estrutura irregular, altamente insolúvel e recalcitrante (FASANELLA, 2008).

A biossíntese da lignina se processa por via radicalar a partir da reação de três diferentes álcoois cinâmílicos precursores: álcool p-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico, que geram unidades p-hidroxibenzílicas, guaiacílicas e siringílicas, respectivamente (RABELO, 2007). A Figura 9 representa a estrutura de um tipo de lignina, indicando os três tipos de álcoois precursores.

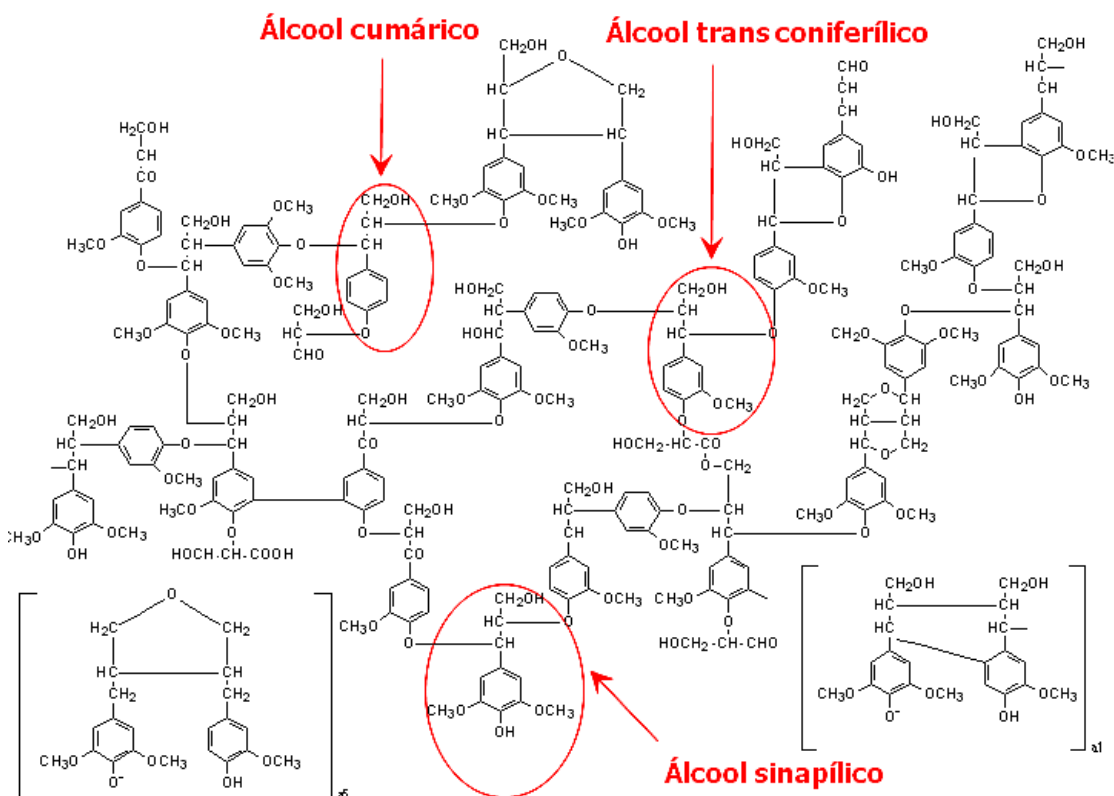


Figura 9. Estrutura de um tipo de lignina.

Fonte: Pereira Jr., 2007.

Segundo Fasanella (2008), as funções biológicas da lignina são:

1. Fornecer suporte estrutural à parede secundária de plantas vasculares. A parede celular lignificada pode ser vista como um complexo, com microfibrilas de celulose e hemicelulose, e a lignina como uma “matriz plástica” conferindo resistência ao material lignocelulósico;
2. Tornar a parede celular vegetal hidrofóbica, permitindo o desenvolvimento eficiente dos tecidos para transporte de água em plantas vasculares;
3. Conferir resistência contra ataques microbianos.

Além de fundamental para o equilíbrio das cadeias tróficas, a degradação da lignina apresenta grande importância econômica, tornando disponíveis substâncias de interesse na indústria, pecuária e na agricultura.

A extração da lignina pode fornecer uma série de compostos fenólicos de interesse comercial, como o siringaldeído e o p-hidroxibenzaldeído, assim como a vanilina (essência de baunilha), que é produzida por oxidação dos produtos de sua hidrólise alcalina. De um modo geral, fenóis derivados da lignina podem se convertidos em éteres de arila e usados como aditivos para gasolina, enquanto que solventes e ácidos orgânicos pode ser dela produzidos por craqueamento e dealquilação. De forma análoga, a lignina pode ser igualmente utilizada como matéria-prima para produção de resinas fenólicas e poliuretanas. Dependendo da reatividade da lignina obtida pelo pré-tratamento, este material insolúvel pode ser transformado em um polímero orgânico com boas propriedades em solução aquosa (FASANELLA, 2008).

2.5. Enzimas

As enzimas são moléculas protéicas de alta massa molecular que atuam como catalisadores biológicos. São capazes de diminuir a energia de ativação (ordem de 10^{14}) requerida para formar um complexo de transição ativado que dará origem a um produto, aumentando a velocidade da reação sem alterar a constante de equilíbrio ou a variação de energia livre (SHULER, 1992; CAMPBELL, 2000; LEMOS, 2006).

Grande parte das proteínas sintetizadas na célula são enzimas, referidas como *enzimas intracelulares*, citoplasmáticas, que somente podem ser obtidas e

avaliadas por rompimento da célula. Há micro-organismos (células) que também têm a capacidade de sintetizar enzimas que são excretadas para fora da célula, podendo ser encontradas no meio de cultivo ou de propagação celular, lá sendo mais facilmente isoladas e avaliadas e são chamadas de enzimas extracelulares. Quase todas as enzimas preparadas em escala industrial até hoje são extracelulares, pois seu isolamento dos meios ou caldos de cultivo é geralmente mais simples, embora elas se encontrem sob forma muito diluída nestes meios, o que pode tornar seu isolamento muito dispendioso (KIELING, 2002).

O processo de obtenção das enzimas se dá pela extração de tecidos animais e vegetais ou por fermentação. Contudo, a maioria das enzimas empregadas nos processos industriais é de origem microbiana.

Segundo Mudgett (1986), citado por LEMOS (2006), para a produção de enzimas microbianas, são utilizados basicamente dois tipos de processos, classificados conforme a quantidade de água do meio: fermentação submersa (FSM) e fermentação em estado sólido (FES) ou semi-sólido (FMSS).

A maioria das enzimas comerciais é obtida por fermentação submersa, uma vez que os métodos modernos de controle de fermentação são mais facilmente adaptados, os rendimentos são maiores e os custos e riscos de contaminação menores (AGUIAR & MENEZES, 2000).

Segundo a Comissão de Enzimas (EC) da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB), as enzimas estão classificadas em seis grandes grupos de acordo com o tipo de reação em que atuam. Estes grupos são: Oxirredutases; Transferases; Hidrolases; Liases; Isomerases e Ligases (SHULER, 1992).

As enzimas hidrolases são extensivamente utilizadas por vários segmentos industriais. Dentre as hidrolases podemos citar as enzimas celulases, as quais são obtidas, principalmente, a partir de fungos dos gêneros *Trichoderma* e *Aspergillus*. Seu uso industrial inclui: hidrólise enzimática: produção de glicose; tratamento de resíduos; indústria têxtil: remoção manchas, clarificação, desengomagem; indústria de alimentos: extração de chá verde, proteína de soja, óleos essenciais, aromatizantes e produção de agar (KIELING, 2002; CHAPLIN, 2004; CIB, 2004; RUEGGER & TAUKE-TORNISIELO, 2004; UFSC, 2004).

2.5.1. Enzimas Celulases

O conjunto de enzimas envolvidas na degradação da celulose é denominado complexo celulase. Segundo Lynd & Zhang (2002) e Peixoto (2006), citado por PARIS (2008), tal complexo, oriundo de micro-organismos, animais e plantas, é dividido em três grupos de acordo com seu local de atuação no substrato celulósico:

1. Endoglucanases (EC 3.2.1.4): enzimas responsáveis por iniciar a hidrólise e pela rápida solubilização do polímero celulósico (redução do grau de polimerização), devido à sua fragmentação em moléculas menores. Tais enzimas hidrolisam randomicamente as regiões internas da estrutura amorfa da fibra celulósica, liberando oligossacarídeos e, conseqüentemente, novos terminais, sendo um redutor e um não redutor;
2. Exoglucanases: enzimas divididas em celobiohidrolases (CBHs) e glucanohidrolases (GHs). As GHs (EC 3.2.1.91), embora raras, possuem estratégia de hidrólise da fibra celulósica de elevada importância, pois são capazes de liberar glicose diretamente do polímero. Já as CBHs (EC 3.2.1.91) são responsáveis pela liberação de celobiose (dímero de glicose) a partir de extremidades da celulose. As exoglucanases participam da hidrólise primária da fibra e são responsáveis pela amorfogênese, que é um fenômeno que envolve uma ruptura física do substrato, acarretando na desestratificação das fibras, pelo aumento das regiões intersticiais. A amorfogênese promove aumentos na taxa de hidrólise da celulose, por tornar as regiões cristalinas mais expostas às celulases;
3. β -glicosidases (EC 3.2.1.21): enzimas que têm a propriedade de hidrolisar celobiose e oligossacarídeos solúveis (com menos de sete unidades monoméricas) em glicose.

Em muitos estudos são utilizados substratos modelos para a determinação de celulose total e/ou para facilitar a diferenciação entre as atividades enzimáticas dos três tipos de enzimas como: algodão, papel de filtro, avicel, solka floc, celulose de algas, celulose bacteriana e celulose microcristalina (MARTINS, 2005).

As celulasas podem ser utilizadas em vários processos na indústria como: extração de chá verde, proteína de soja, óleos essenciais, aromatizantes, utilização na indústria têxtil, no mercado de detergentes, na indústria de alimentos, na indústria de polpa, de papel, no tratamento de resíduos, fermentação e na produção de bioetanol em usinas com destilaria em anexo (KIELING, 2002; RUEGGER & TAUK-TORNISIELO, 2004; ZHANG, 2006).

Segundo Zhang (2006), o mercado de celulasas está expandindo drasticamente, devido às pesquisas envolvendo hidrólise enzimática de materiais celulósicos pré-tratados, os quais são fermentados para produzir *commodities*, como bioetanol, em larga escala.

Enzimas celulasas são relativamente caras e uma significativa redução do custo seria importante para seu uso comercial de biorefinarias. Algumas estratégias estão sendo estudadas para diminuir este custo (ZHANG, 2006; IDEANEWS, 2007):

1. Produção de enzimas utilizando substratos/biomassa de baixo custo;
2. Produção de enzimas com melhor estabilidade para processos específicos;
3. Produção de enzimas eficientes e no local do uso;
4. Utilização de pré-tratamentos dos substratos eficientes e de menor custo.

2.5.2. Micro-organismos produtores de celulasas

Na natureza, existe uma grande variedade de micro-organismos que produzem celulasas, mas apenas alguns são conhecidos como verdadeiros celulolíticos, isto é, são capazes de degradar a celulose natural (ROBSON & CHAMBLISS, 1989). A degradação da celulose é realizada por fungos e bactérias. Estes produzem enzimas celulasas que degradam especificamente a cadeia polimérica, originando polímeros com cadeias mais curtas (RABELO, 2007).

Os fungos secretam uma grande diversidade de eficientes enzimas no ambiente que são utilizadas para auxiliar sua nutrição, desta maneira são responsáveis pela deterioração de vários materiais naturais, refinados ou processados. Os organismos mais eficientes na biodegradação de materiais lignocelulósicos na natureza são os fungos de decomposição branca (white-rot-fungi

– degradam todos os componentes da madeira) e os de decomposição parda (brown-rot-fungi – degradam principalmente polissacarídeos). A grande maioria desses organismos pertence à classe Basidiomycota, sendo que os ascomicetos e fungos mitospóricos normalmente são classificados como fungos de decomposição branda (soft-rot-fungi), que também possuem a capacidade de degradar a lignina e polissacarídeos, porém em baixa velocidade (FASANELLA, 2008).

As espécies de fungos produtores de celulasas mais estudadas são *Trichoderma reesei*, *Penicillium pinophilum*, *Humicola insolens*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma lignorum*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium iriense*, *Fusarium solani*, *Myrothecium verrucaria*, *Sporotrichum pulverulentum*, *Aspergillus niger* e também gêneros como *Schizophyllum* sp, *Chaetomium* sp. e *Humicola* sp. Tais fungos excretam celulasas de alta atividade no meio de cultura (RABELO, 2007; AGUIAR & MENEZES, 2000). Entre as bactérias produtoras de celulase temos a *Cellulomonas fimi*, *Clostridium thermocellum* (RABELO, 2007) e *Bacillus subtilis* (AKHTAR, 2001). Algumas leveduras como as do gênero *Trichosporium* sp também são produtoras de celulasas (AGUIAR & MENEZES, 2000).

A Tabela 6 apresenta alguns exemplos de micro-organismos produtores de celulasas e os respectivos substratos utilizados nos processos de produção das enzimas e/ou processos de hidrólise enzimática de tais resíduos.

Tabela 6. Micro-organismos produtores de celulases e substratos utilizados

Micro-organismo	Substrato	Referência
<i>Aspergillus niger</i>	Bagaço de cana-de-açúcar	Aguiar & Menezes (2000)
<i>Aspergillus ellipticus</i> e <i>Aspergillus fumigatus</i>	Bagaço de cana-de-açúcar	Gupta & Madamwar (1997), citados por AGUIAR & MENEZES (2000)
<i>Chaetomium globosum</i>	Fibras de palma	Umikalson et al. (1997), citados por AGUIAR & MENEZES (2000)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Resíduos de grama	Latif et al. (1995), citados por AGUIAR & MENEZES (2000)
<i>Cellulomonas biazotea</i>	Fibras de grama	Rajoka & Malik (1997), citados por AGUIAR & MENEZES (2000)
<i>Trichoderma reesei</i>	Bagaço de cana-de-açúcar e palha de arroz	Muthuvelayudham & Viruthagiri (2006)
<i>Aspergillus flavus</i>	Bagaço de cana-de-açúcar, serragem e sabugo de milho	Ojumu et al. (2003)
<i>Trichoderma reesei</i> e <i>Aspergillus niger</i>	Sabugo de milho	Chen et al. (2007)
<i>Aspergillus niger</i>	Bagaço de cana-de-açúcar	Aguiar (2001)
<i>Aspergillus niger</i>	Espiga de milho e serragem	Ja'afaru (2007)
<i>Trichoderma reesei</i>	Palha de trigo	Chahal (1985)
<i>Trichoderma reesei</i>	<i>Antigonum leptopus</i> , folhas de bananeira e palha de cana-de-açúcar	Krishna (2000)
<i>Trichoderma lignorum</i>	Resíduos de banana	Baig (2004)
<i>Trichoderma reesei</i>	Palha de trigo	Wang (2005)
<i>Bacillus subtilis</i>	Palha de arroz, palha de trigo e Bagaço de cana-de-açúcar	Akhtar (2001)

2.5.3. *Aspergillus niger*

O gênero *Aspergillus* é considerado ascomiceto degradante primário da celulose e lignina (FASANELLA, 2008) com cerca de 274 diferentes espécies descritas (KAAIJ, 2007).

O gênero foi catalogado pela primeira vez em 1729, pelo biólogo e padre italiano Pietro Antonio Micheli (1679-1753) (KAAIJ, 2007). O gênero *Aspergillus* caracteriza-se pela produção de esporos assexuais que se dá em uma estrutura chamada aspergillum (designação que se dá à parte superior da estrutura) que é especializada e característica do gênero. Eles possuem uma estrutura denominada conidióforo que é constituído pelo aspergillum e pelo estipe (FASANELLA, 2008).

Este grupo de fungos filamentosos com um grande número de espécies possui características que os fazem micro-organismos ideais para aplicações industriais como: boa capacidade de fermentação e altos níveis de secreção de enzimas (JA'AFARU, 2007).

Embora a maioria das espécies de *Aspergillus* seja saprófita, algumas espécies são parasitas de insetos, plantas e animais, incluindo o homem. Algumas espécies produzem potentes toxinas, enquanto outras são igualmente significantes como agentes de biodeterioração, economicamente importantes para fabricação de alimentos fermentados, como fontes de enzimas ou em produção química (FASANELLA, 2008).

Algumas espécies, tais como *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus flavus* são patógenos oportunistas para humanos e animais. A maioria das infecções sistêmicas em humanos é encontrada em pacientes imunodeprimidos. Outras espécies, como *Aspergillus niger*, são bem conhecidas por sua utilização na produção de alimentos e na biotecnologia moderna (KAAIJ, 2007).

Aspergillus niger é um fungo comum do solo, observado como um bolor negro em frutas e outros alimentos. Embora esta espécie seja geralmente não-patogênica, inalação de grande quantidade de esporos pode levar à doença pulmonar (aspergilose). Ingestão oral de *A. niger* foi considerada como inofensiva pela Organização Mundial de Saúde, o qual abriu a oportunidade para sua utilização na produção industrial de ácidos, produtos farmacêuticos e de enzimas (KAAIJ, 2007).

Várias cepas de *A. niger* são aplicadas em grande escala na produção industrial de ácido cítrico (também conhecido como aditivo alimentar E330) e ácido glucônico (E574), que servem como ingredientes para a produção de diversos alimentos e bebidas (KAAIJ, 2007). O ácido cítrico é quase que exclusivamente obtido através de processos de biossíntese utilizando como agente biológico o fungo *Aspergillus niger* (LEONEL, 1995).

Muitas enzimas úteis industrialmente são produzidas utilizando a fermentação de *A. niger*. Segundo o Regulamento técnico sobre o uso de enzimas e preparações enzimáticas na produção de alimentos destinados ao consumo humano (ANVISA - D.O.U de 22/12/2005), muitas enzimas são produzidas pelo fungo, como: α -galactosidase, amiloglicosidase, β -amilase, β -glucosidase, carbohidrase, celulasas, fitase, frutossiltransferase, glicose-oxidase, hemicelulase, inulinase, invertase, lipase, naringinase, pectina liase, pectinase, protease, transglucosidase.

Aspergillus niger é fonte de celulasas destinadas ao uso alimentício e não alimentício e pode ser considerado, algumas vezes, superior aos outros fungos, reconhecidamente bons produtores dos complexos celulolíticos e hemicelulolíticos, como *Trichoderma reesei*. Diversas espécies de *Aspergillus* produzem altos níveis de β -glucosidase (AGUIAR & MENEZES, 2000), o que é considerado muito importante em processos de sacarificação, pois o acúmulo de celobiose (degradada por β -glucosidases) no meio pode causar severa inibição das exo e endoglucanases, prejudicando o sinergismo entre tais enzimas e resultando em uma diminuição no rendimento do processo de sacarificação (CHEN et al., 2007; RABELO, 2007).

Em muitos estudos de sacarificação utilizando o fungo *Trichoderma reesei* faz-se a adição de enzimas β -glucosidases produzidas por *Aspergillus niger*, já que o complexo celulásico produzido por *T. reesei* é pobre em β -glicosidase. Chen et al. (2007), em estudos de hidrólise enzimática de sabugo de milho, utilizou-se deste artifício, adicionando às enzimas exo e endoglucanases de *Trichoderma reesei*, β -glucosidases de *Aspergillus niger*.

Uma imagem do fungo *Aspergillus niger* é apresentada na Figura 10.



Figura 10. Micrografia eletrônica do fungo *Aspergillus niger*.

Fonte: <http://genome.jgi-psf.org/Aspni5/Aspni5.home.html> acessado em 15/08/2009.

2.6. Hidrólise química e hidrólise enzimática

Existem basicamente três técnicas para a obtenção de açúcares fermentescíveis provenientes de materiais lignocelulósicos: hidrólise com ácido concentrado, hidrólise com ácidos diluídos e hidrólise enzimática.

Na hidrólise com ácido concentrado, a hemicelulose e celulose presentes na biomassa são quebradas usando soluções aquosas de ácidos minerais fortes, tais como ácido sulfúrico, clorídrico ou fosfórico, em baixas temperaturas (<100°C). A principal desvantagem dessa técnica é que requer equipamentos altamente resistentes à corrosão, aumentando assim o custo do produto. Tipicamente, a fração de hemicelulose é hidrolisada mais rapidamente que a fração de celulose, e os monossacarídeos liberados da hemicelulose são expostos no meio reacional por muito tempo, o que leva a degradação e perda desses açúcares. A recuperação do ácido usado no processo é essencial por razões econômicas e devido a problemas ambientais (RABELO, 2007).

No processo com ácido diluído, parte da hemicelulose e da celulose são hidrolisadas separadamente. A hemicelulose hidrolisada pode ser removida após o primeiro passo da hidrólise. Desta forma, as condições de hidrólise tanto para a hemicelulose quanto para a celulose podem ser otimizadas. Porém, devido às altas temperaturas aplicadas no segundo passo (aproximadamente 200°C), uma

quantidade considerável de açúcares e lignina solúvel são degradados levando a uma inibição durante o processo de fermentação (RABELO, 2007).

No processo enzimático, a biomassa lignocelulósica é primeiramente pré-tratada para aumentar a acessibilidade ao ataque enzimático. Durante o pré-tratamento, a hemicelulose é hidrolisada em um processo similar ao primeiro passo da hidrólise com ácido diluído ou base. No segundo passo, a hidrólise propriamente dita, a celulose é quebrada através das enzimas celulasas. Devido a condições mais suaves aplicadas durante o processo, uma menor quantidade de subprodutos é liberada, resultando em um alto rendimento de açúcares fermentescíveis. Porém, para atingir uma alta conversão da celulose é necessário altas concentrações das enzimas, o que aumenta o custo de produção (RABELO, 2007).

Segundo Krishna (2000) a hidrólise enzimática é superior à hidrólise ácida, em vários aspectos, como mostra a Tabela 7.

Tabela 7. Comparação entre hidrólise enzimática e hidrólise ácida

Parâmetro	Hidrólise ácida	Hidrólise enzimática
Pré-tratamento	Pode ser necessário	Necessário
Taxa de hidrólise	Rápida (min.)	Lenta (h)
Temperatura	Alta (200°C)	Baixa (45°C)
Pressão	Alta	Atmosférica
Rendimento	Depende do material e dos detalhes do processo	Depende do material e dos detalhes do processo
Formação de subprodutos	Provável formação	Não há formação

Fonte: Krishna, 2000.

Duff & Murray (1996), citados por RABELO (2007), afirmam que o custo da hidrólise enzimática é muitas vezes baixo se comparado com a hidrólise ácida porque a hidrólise é usualmente conduzida em condições suaves (pH 4,8; e temperatura 45-50°C), além de não apresentar problemas de corrosão nos equipamentos.

Embora os processos de hidrólise ácida estejam mais desenvolvidos tecnologicamente e tenham maiores chances de se tornarem economicamente viáveis em um futuro próximo, espera-se que os processos enzimáticos tenham seus custos bastante reduzidos com o avanço da tecnologia envolvida e venham a ser a melhor opção no futuro (RABELO, 2007).

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

Durante o processo, as endoglucanases hidrolisam preferencialmente as ligações internas no polímero da celulose, produzindo oligossacarídeos de menor peso molecular, chamados de celodextrinas, além de celobiose. A região catalítica da enzima é dada pela forma que permite a ligação da enzima e a hidrólise na parte média da fibra da celulose. Assim, as endoglucanases atacam de forma mais ou menos aleatória as ligações β -(1-4)-glicosídicas em regiões amorfas da celulose ou na superfície das microfibrilas. As exoglucanases (CBHs) iniciam a hidrólise nas extremidades da cadeia, e não produzem uma quantidade significativa de novas cadeias terminais na superfície da celulose. CBH I e CBH II quebram as unidades de celobiose das extremidades redutora e não redutora do polímero, respectivamente. Logo, as exoglucanases liberam a celobiose rompendo as ligações β -(1-4)-glicosídicas. As β -glucosidades completam a hidrólise catalisando a hidrólise da celobiose à glicose. Portanto, as celobiasas hidrolisam a celobiose e as celodextrinas solúveis em água à glicose (RABELO, 2007).

Ao longo dos anos, vários mecanismos diferentes foram propostos para a representação da conversão de celulose à glicose. Segundo Zhang (2006), a hidrólise da celulose pode ser representada conforme a Figura 11.

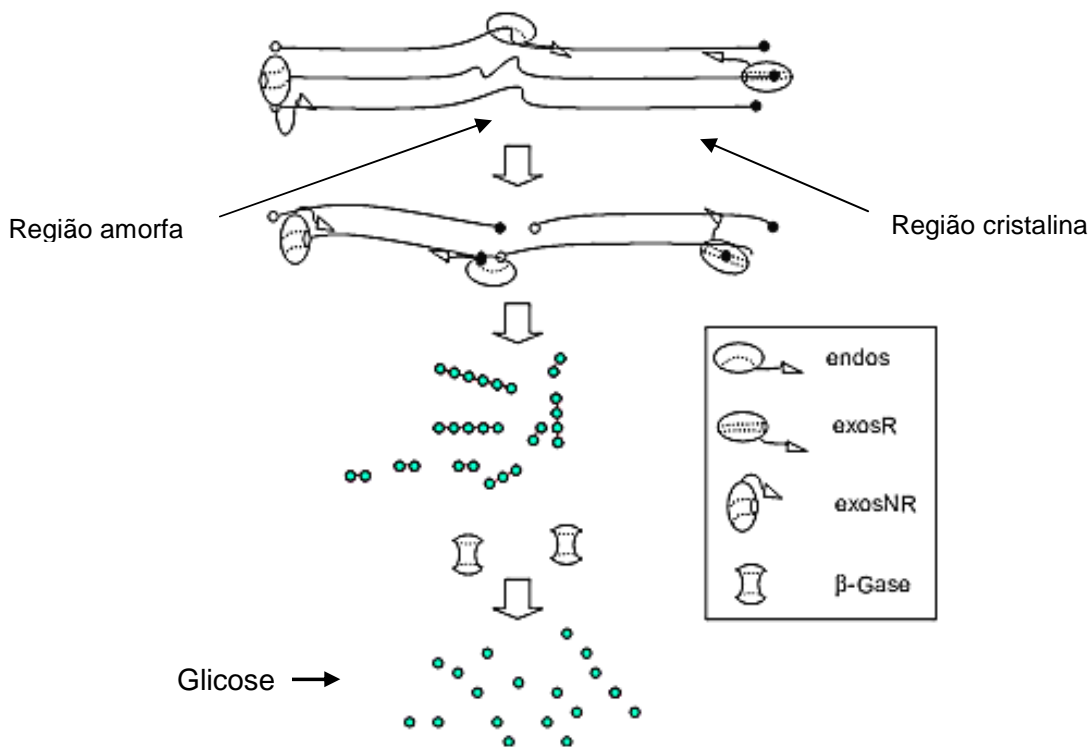


Figura 11. Esquema da hidrólise enzimática da celulose (R representa os grupos terminais redutores e NR os grupos terminais não redutores).

Fonte: Zhang, 2006.

Nos últimos anos vem aumentando o número de pesquisas envolvendo hidrólise enzimática de materiais celulósicos. Krishna (2000) realizou estudos visando otimizar as condições de hidrólise enzimática de *Antigonum leptopus*, folhas de bananeira e palha de cana-de-açúcar; Ja'afaru (2007) produziu enzimas celulases de *Aspergillus niger* e posteriormente as utilizou na hidrólise enzimática de espiga de milho e serragem; Öhgren (2007) testou o efeito da remoção da hemicelulose e lignina na hidrólise enzimática de resíduos de milho; Aguiar (2001) utilizou celulases para hidrolisar bagaço de cana-de-açúcar; Chen et al. (2007) realizaram hidrólise enzimática e produção de etanol utilizando espiga de milho; Baig (2004) utilizou resíduos de banana (pseudo-haste e folhas) em estudos de sacarificação por *Trichoderma lignorum*; Akhtar (2001) estudou a utilização de celulases produzidas por *Bacillus subtilis* na sacarificação de palha de trigo, de arroz e bagaço de cana-de-açúcar; Rabelo (2007) avaliou o desempenho do pré-tratamento alcalino para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar.

2.6.1. Fatores que afetam a hidrólise enzimática dos resíduos lignocelulósicos

A hidrólise enzimática dos resíduos lignocelulósicos se processa inicialmente em um sistema heterogêneo (substrato insolúvel e enzimas solúveis) e vários fatores têm sido relacionados como limitantes à hidrólise e podem ser divididos em dois grandes grupos: os associados às mudanças na estrutura do substrato e os relativos ao comportamento das enzimas durante o processo hidrolítico (RAMOS, 2000). Conseqüentemente é necessário otimizar as condições de hidrólise para conseguir o funcionamento satisfatório dos processos de sacarificação (RABELO, 2007).

Os fatores associados ao substrato dizem respeito ao aumento gradativo da resistência da celulose à ação enzimática, decorrente do ataque preferencial das enzimas às regiões mais acessíveis da estrutura supramolecular da celulose (RAMOS, 2000). O sistema de hidrólise enzimática é impactado, além da concentração (RABELO, 2007), pelas propriedades do substrato como: grau de polimerização, cristalinidade, área acessível e a presença de lignina, a qual depende do tipo de substrato utilizado (ZHANG & LYND, 2004). O grau de polimerização e a cristalinidade do substrato dizem respeito à “reatividade” da celulose e têm relação com suas características moleculares e organização estrutural. A área acessível ou área superficial disponível do substrato e a porosidade definem com maior precisão o conceito de “acessibilidade” das enzimas ao substrato e têm relação direta com fenômenos associados à difusibilidade das enzimas durante o processo hidrolítico (RAMOS, 2000).

A heterogeneidade dos substratos celulósicos em função da presença de quantidades variadas de hemicelulose e lignina podem acarretar efeitos adicionais sobre a ação das enzimas (RAMOS, 2000). O teor de lignina está negativamente correlacionado com a eficiência da hidrólise, pois a lignina protege a estrutura e age como uma barreira. A lignina não precisa ser completamente removida para aumentar a digestibilidade da celulose, já que apresenta maior efeito negativo quando está “blindando” as microfibrilas da mesma (EPOBIO, 2006), portando o tipo de pré-tratamento é um fator importante no rendimento da hidrólise (RABELO, 2007).

A cristalinidade tem sido considerada como uma forma de fornecer uma indicação da reatividade do substrato. Taxas de hidrólise enzimática da celulose são

tipicamente de 3 a 30 vezes mais rápidas para celulose amorfa comparadas com as taxas de hidrólise de celulose cristalina (ZHANG & LYND, 2004).

Muitos tratamentos que causam redução da cristalinidade dos substratos também causam o aumento da área superficial e esta tem sido apontada como causa do aumento em taxas de hidrólise em diversas pesquisas (ZHANG & LYND, 2004). Fierobe et al. (2002), citados por ZHANG & LYND (2004), concluíram que a acessibilidade da celulose é o fator mais importante do que o índice de cristalinidade na determinação de taxas de hidrólise. Algumas pesquisas afirmam que a velocidade de hidrólise depende da cristalinidade mais do que da superfície de contato da celulose com a enzima (GOMEZ, 1985). Portanto, considerando tanto a incerteza de metodologias para determinar o índice de cristalinidade (Crl), bem como resultados conflitantes sobre a alteração deste índice durante a hidrólise, não é possível concluir que o Crl é um fator determinante da taxa de hidrólise enzimática (ZHANG & LYND, 2004).

O grau de polimerização (GP) de substratos celulósicos determina a quantidade de ligações β -glicosídicas terminais e interiores e a quantidade de substratos para a ação das enzimas exo e endoglucanases, respectivamente. A solubilidade da celulose reduz drasticamente com o aumento do grau de polimerização devido à presença de pontes de hidrogênio intermoleculares na estrutura de celulose. A mudança do grau de polimerização durante a hidrólise é determinada pela relativa proporção das atividades de exo e endoglucanases e das propriedades da celulose. Exoglucanases atuam nas extremidades da cadeia, ocorrendo então apenas um incremento na redução do GP, enquanto que as endoglucanases hidrolisam preferencialmente as ligações internas no polímero, causando uma redução drástica do mesmo (ZHANG & LYND, 2004).

Enzimas celulases podem ligar-se à superfície do substrato antes da hidrólise de partículas insolúveis de celulose. A estrutura tridimensional de tais partículas (incluindo microestrutura), em combinação com o tamanho da forma das enzimas irão determinar se as ligações glicosídicas serão ou não acessíveis ao ataque enzimático (ZHANG & LYND, 2004). Se uma determinada amostra é desagregada em partículas, teoricamente, frações com pequenas partículas teriam maior área superficial. Assim, enzimas hidrolíticas poderiam interagir mais com o substrato, o que levaria a uma taxa de sacarificação maior. No entanto, resultados conflitantes

têm sido relatados sobre a influência da granulometria sobre a eficiência da sacarificação. Em estudos com resíduos de madeira pré-tratados concluiu-se que, com a diminuição do tamanho das partículas, ocorreu o aumento na taxa de hidrólise, mas deve-se considerar que o pré-tratamento, além de diminuir o tamanho das partículas, também acarretou em mudanças de outras características do substrato (EPOBIO, 2006). Estudos relacionados ao tamanho de partículas, indicaram que o mesmo não afeta a velocidade da reação de forma significativa, já que as partículas grandes formam agregados soltos de partículas menores (GOMEZ, 1985). Na avaliação de pré-tratamentos e modelagem da hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para produção de etanol por Rabelo (2007), observou-se que não há grande influência do tamanho da partícula na liberação dos açúcares fermentescíveis após hidrólise, nas condições estudadas.

De acordo com Ramos (2000), Pitarelo (2007) e Rabelo (2007), quanto ao comportamento das enzimas durante o processo hidrolítico, pode-se ressaltar os seguintes fatores:

1. Inibição retroativa das celulases, devida ao acúmulo do produto final de hidrólise no meio de reação (glicose e celobiose);
2. Inativação das enzimas pelo efeito prolongado da temperatura e agitação;
3. Adsorção inespecífica e/ou não produtiva de um ou mais componentes enzimáticos sobre complexos lignina-carboidrato (hemicelulose e lignina);
4. Concentração de enzima;
5. Tempo de duração da hidrólise;
6. pH do meio.

A celulose cristalina é altamente resistente ao ataque enzimático. A maioria das ligações glicosídicas na microfibrila é inacessível às enzimas, e todas as ligações clivadas pela ação das endoglucanases podem prontamente ser reformadas devido à orientação estável das ligações glicosídicas. Conseqüentemente, a degradação da celulose cristalina requer a ação sinérgica da endoglucanase e exoglucanase. O máximo sinergismo é obtido com uma elevada quantidade de exoglucanases na mistura e depende do tipo de substrato usado (RABELO, 2007).

As exoglucanases removem rapidamente as unidades de celobiose das extremidades recentemente criadas pela ação das endoglucanases, impedindo assim a reformação das ligações glicosídicas. As duas enzimas podem agir

consecutivamente ou em harmonia. As exo e endoglucanases são inibidas pela celobiose, e a ação da β -glucosidade é freqüentemente a etapa limitante na degradação da celulose (RABELO, 2007).

O efeito do complexo da enzima celulase é expresso pela ação sinérgica destas três enzimas diferentes na celulose e este sistema complexo de enzimas necessita ser mantido estável para a atividade celulolítica elevada. Em consequência da ação dos primeiros dois grupos de enzimas (endo e exoglucanases) na celulose, a celobiose e a glicose são obtidas, e enquanto sua concentração no meio reacional aumenta gradualmente, as atividades das celulases respectivas são inibidas por estes produtos, tendo por resultado uma diminuição final na taxa e no rendimento do processo de sacarificação. A celobiose apresenta um poder de inibição maior no complexo celulolítico sendo mais expressivo que a inibição por glicose (RABELO, 2007).

A atividade catalítica das enzimas é altamente dependente da temperatura, como no caso dos catalisadores convencionais, porém, à medida que se eleva a temperatura dois efeitos ocorrem simultaneamente: (a) a taxa de reação aumenta, como se observa na maioria das reações químicas; e (b) a estabilidade da proteína decresce devido à desativação térmica (FURIGO Jr., 2001). O aumento da atividade é chamado de *ativação* pela temperatura e a redução é chamada de *inativação* pela temperatura ou *desnaturação térmica* (SHULER, 1992).

Bailey & Ollis (1986) descrevem o mecanismo físico para o efeito da temperatura da seguinte forma: com o aumento da temperatura, os átomos na molécula de enzima adquirem muita energia e grande tendência a se moverem. Essa energia é suficiente para romper as fracas interações que mantém unida a estrutura globular da proteína e, como consequência, ocorre a desativação.

A influência da temperatura sobre a atividade da enzima é geralmente, representada em termos de atividade ou velocidade de reação em função da temperatura, ou seja, a maioria das reações químicas se processa a uma velocidade maior à medida que a temperatura aumenta. O efeito da temperatura de uma enzima depende de um número de fatores que incluem o pH e a força iônica do meio e a presença ou ausência de ligantes. Os substratos freqüentemente protegem a enzima da desnaturação pelo calor. No processo de desnaturação térmica ocorre a perda da atividade biológica da enzima. Toda enzima tem uma temperatura ótima para que

atinga sua atividade máxima, ou seja, é a temperatura máxima na qual a enzima possui uma atividade constante por um período de tempo (FURIGO Jr., 2001).

Sob determinadas condições, a velocidade de transferência do substrato em produto é proporcional à quantidade de enzima (FURIGO Jr., 2001). Krishna (2000) e colaboradores, em estudos de sacarificação de *Antigonum leptopus* e folha de banana, verificaram que o índice de sacarificação se manteve constante, após certa concentração de enzimas, mesmo após o aumento da mesma. Em baixas concentrações de enzima a velocidade da reação enzimática é diretamente proporcional à concentração, mas em altas concentrações, a velocidade é máxima e seu valor independe da concentração enzimática.

Como o custo das enzimas celulases contribui significativamente no custo total dos processos de conversão de biomassa, a dosagem de enzima deve ser minimizada (CHEN et al., 2007), desde que não interfira no rendimento. Desvios da linearidade podem ocorrer devido à: presença de inibidores na solução de enzima; presença de substâncias tóxicas; presença de um ativador que dissocia a enzima; e limitações impostas pelo método de análise. (FURIGO Jr., 2001).

O tempo de hidrólise enzimática tem efeito na temperatura de trabalho, então rápidas reações conduzem a uma maior temperatura de trabalho (AGUIAR, 2001). Segundo Bailey & Ollis (1986) a desativação enzimática pode ocorrer devido à fatores como temperatura e ausência de substrato. Portanto, pode-se concluir que a hidrólise enzimática conduzida por tempos prolongados pode acarretar na diminuição da atividade enzimática devido à desnaturação da enzima pela temperatura e/ou devido à ausência de substrato. De acordo com Zhang (2006), tempos muito curtos de reação não serão suficientes para a degradação tanto da fração amorfa como a fração cristalina da celulose. Desta forma, o tempo de hidrólise deve ser suficiente para garantir a degradação total da celulose sem que ocorra desativação enzimática.

As enzimas possuem grupos básicos, neutros e ácidos em sua estrutura. Conseqüentemente, as mesmas podem conter os grupos carregados negativamente ou positivamente em um determinado pH. Como os grupos ionizáveis fazem geralmente parte do sítio ativo, para que uma catálise ácida ou básica seja possível os grupos ionizáveis no sítio ativo devem possuir uma carga em particular, isto é, a

enzima cataliticamente ativa existe somente em um estado de ionização definido (BAILEY & OLLIS, 1986).

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

2.7. Tratamento de resíduos lignocelulósicos

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

As Figuras 12 e 13 apresentam, respectivamente, um esquema que representa o complexo lignocelulósico e uma imagem de microscopia eletrônica de varredura da fibra do bagaço de cana antes e depois de um pré-tratamento.

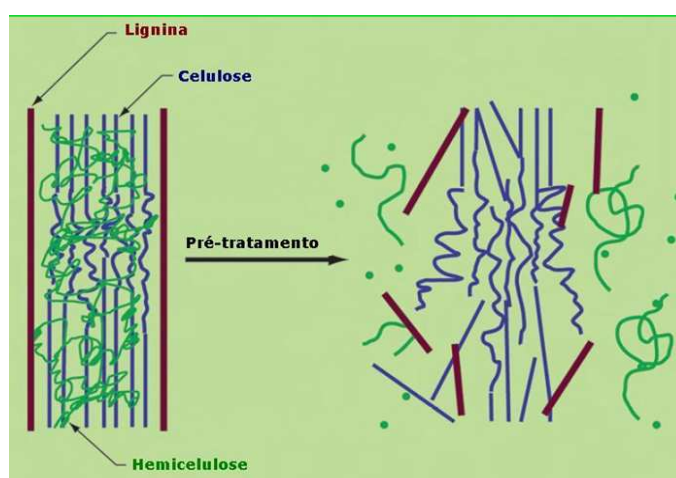


Figura 12. Representação do complexo lignocelulósico antes e depois de um pré-tratamento.

Fonte: Pereira Jr., 2007.

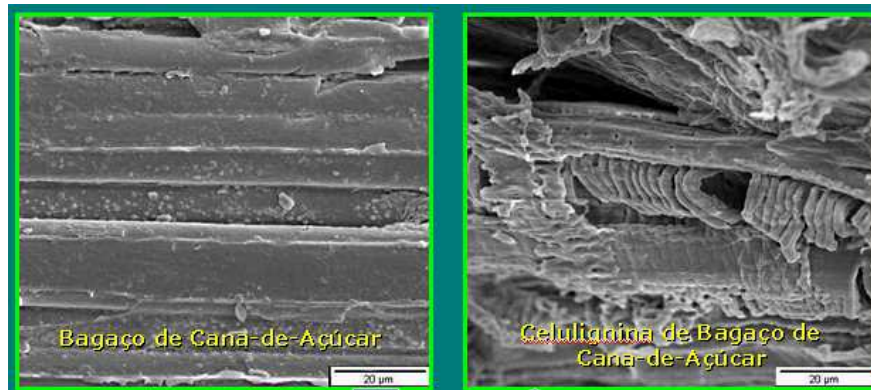


Figura 13. Microscopia Eletrônica de Varredura da fibra do bagaço de cana-de-açúcar antes e depois de um pré-tratamento.

Fonte: Pereira Jr., 2007.

Existem vários tipos de pré-tratamento que podem ser utilizados para aumentar a susceptibilidade da associação celulose-lignina e assim melhorar a hidrólise enzimática. Tais pré-tratamentos podem ser agrupados em quatro categorias: físico, químico, biológico ou uma combinação de todos esses, o que dependerá do grau de separação requerido e do fim proposto (RABELO, 2007). Na Tabela 8 estão relacionados os principais tipos de pré-tratamentos, bem como as mudanças ocasionadas no material lignocelulósico.

Tabela 8. Métodos de pré-tratamentos em materiais lignocelulósicos

Métodos	Fatores que causam mudança na estrutura do material	Tipo de mudança
Físico	Moagem e trituração (bolas, energia vibratória, rolo duplo, pressão, martelo); radiação (raios de elétrons, raios γ , micro-ondas); altas temperaturas (pirólises, explosão a vapor)	Aumento da área superficial e tamanho dos poros da partícula; diminuição do grau de polimerização
Químico	Bases; ácidos; gases; agentes oxidantes e redutores; solventes orgânicos	Deslignificação; diminuição do grau de polimerização e cristalinidade da celulose associadas ao inchaço da amostra; aumento da porosidade
Biológico	Bolor branco (<i>Pleurotus</i> , <i>Pycnoporus</i> , <i>Ischnoderma</i> , <i>Phlebia</i> , etc.)	Deslignificação e redução do grau de polimerização da celulose e hemicelulose
Combinado	Tratamento alcalino associado com explosão a vapor; moagem acompanhada de tratamento alcalino ou tratamento ácido	Degradação da hemicelulose; deslignificação; aumento da área superficial e tamanho dos poros

Fonte: Rabelo, 2007.

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

Segundo Baudel (2007), os métodos físicos convertem a biomassa em pó fino, incrementando a superfície específica da celulose, de modo que a hidrólise da mesma ocorre com relativa facilidade. A maior desvantagem associada a este método consiste no elevado consumo energético. A pirólise da biomassa lignocelulósica apresenta reduzida eficiência global, em função de elevadas perdas sacarídicas, reduzida seletividade em glicose, além da formação de compostos inibidores de fermentação. Os processos físico-químicos utilizando ácido diluído, vapor com alta pressão ou água quente possibilitam a remoção seletiva das hemiceluloses, produzindo soluções sacarídicas (pré-hidrolisados) com elevado teor de pentoses e reduzido teor de lignina.

De acordo com Gupta (2008) não se pode afirmar que os benefícios derivados da moagem são devidos à redução na cristalinidade ou um aumento da área superficial e, normalmente, estas operações mecânicas demandam alta quantidade de energia, são caras e demoradas. Segundo o mesmo autor, os métodos de radiação são muito lentos, ineficientes e muito caros.

Em relação ao método de explosão a vapor o autor afirma que é um dos mais amplamente utilizados. Neste método, a biomassa é tratada com vapor a alta pressão (200-450 psi) e então a pressão é liberada imediatamente. A faixa de temperaturas varia de 150° C a 270° C e o tempo de tratamento é de alguns minutos. Os resultados da explosão de vapor são afetados pela temperatura, tempo de residência, granulometria e teor de umidade. Este método é considerado físico-químico, pois a descompressão causa perturbações físicas na biomassa e os ácidos orgânicos liberados durante o processo causam a auto-hidrólise da hemicelulose/lignina. Este método provoca degradação considerável da hemicelulose com pouca remoção de lignina. A hidrólise enzimática da biomassa é melhorada, mas o rendimento de açúcares é baixo devido à degradação da hemicelulose. Outra limitação deste tipo de tratamento é a geração de compostos inibidores para as etapas posteriores.

Em processos de pré-tratamento ácidos, diferentes ácidos podem ser utilizados tais como: ácido sulfúrico diluído, ácido nítrico diluído, ácido clorídrico diluído, ácido fosfórico diluído e ácido peracético. É um dos métodos mais comumente utilizados para melhorar a hidrólise da celulose. Uma das principais vantagens desse tipo de tratamento é a eficácia com a maioria das matérias-primas lignocelulósicas. O custo é superior aos tratamentos físico-químicos. Devido à natureza corrosiva do reagente, manutenção do reator é de alto custo. Outra desvantagem deste método é a neutralização do pH após o tratamento para a etapa de hidrólise enzimática (GUPTA, 2008).

Os processos alcalinos tendem a promover maior dissolução da lignina e menor solubilização/fragmentação das hemiceluloses. Tais processos geralmente utilizam condições moderadas de operação, em termos de temperaturas e pressões, em comparação aos sistemas ácidos. O principal efeito desse tipo de pré-tratamento consiste na remoção da lignina da biomassa, promovendo maior reatividade da fibra. O álcali tende a causar um “inchamento” (“swelling”) da biomassa, de modo que a cristalinidade da celulose decresce, enquanto ocorre um incremento da superfície específica de contato e da porosidade da mesma. Evidencia-se uma cisão das ligações lignina-carboidrato, além da fragmentação da estrutura da lignina. (BAUDEL, 2006). Segundo Gupta (2008) os principais reagentes utilizados para pré-tratamentos alcalinos são: hidróxido de sódio, hidróxido de amônia, etileno diamina e hidróxido de cálcio.

Em muitas pesquisas emprega-se tratamento alcalino de substratos. Muitos autores utilizam hidróxido de sódio atingindo bons rendimentos na hidrólise enzimática utilizando tais substratos tratados.

Chahal (1985) em estudos de fermentação em estado sólido com *Trichoderma reesei* para produção de celulasas, utilizou palha de trigo tratada com hidróxido de sódio 4% a 121°C, com rendimentos de 78 a 90% na hidrólise enzimática em 96 horas de reação. Muthuvelayudham & Viruthagiri (2006) realizaram o mesmo tratamento em bagaço de cana-de-açúcar e palha de arroz para produção de celulasas. Ojumu et al. (2003) realizaram tratamento de serragem, bagaço de cana e sabugo de milho associando a moagem e tratamento químico com NaOH 1% a 121°C por 1 hora. Ja'afaru (2007) utilizou NaOH 0,25M a 121°C por 1 hora no tratamento de sabugo de milho e serragem. Aguiar & Menezes (2000)

utilizaram tratamento com NaOH 4% a 121 por 30 minutos em bagaço de cana-de-açúcar.

Outro importante método de pré-tratamento de materiais lignocelulósicos é a deslignificação oxidativa, citada por Rabelo (2007) e Gupta (2008). Os pré-tratamentos oxidativos têm sido usados para dissolver os componentes da matriz lignocelulósica e acelerar a hidrólise enzimática e a biodegradação. Esse processo utiliza peróxido de hidrogênio (H_2O_2) alcalino.

O peróxido de hidrogênio reage com a lignina sob certas condições, e tem sido largamente usado por vários anos como alvejante em polpas de madeira altamente lignificadas para a produção de papel. A adição da base hidróxido de sódio ao peróxido de hidrogênio faz com que a solução se torne um agente efetivo na deslignificação e solubilização da hemicelulose (RABELO, 2007).

A lignina é provavelmente o principal alvo do ataque químico na reação alcalina do peróxido de hidrogênio. As mudanças observadas nas propriedades físicas e morfológicas das fibras de celulose sugerem que pelo menos uma parcela das unidades de glicose pode também ser liberada durante o tratamento. Se isso for verdade, a porcentagem de glicose total liberada deve ser pequena (< 5%) sendo que aproximadamente 95% ou mais da celulose presente no resíduo insolúvel após o tratamento alcalino com peróxido é liberado durante o processo de hidrólise com a enzima celulase. A liberação de uma pequena porcentagem de unidades de glicose da celulose deve ser suficiente para romper as ligações de hidrogênio proporcionando uma estrutura altamente aberta que não poderia se transformar em regiões cristalinas mesmo após a secagem a altas temperaturas, facilitando assim ainda mais o processo de hidrólise (RABELO, 2007).

O pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino em resíduos lignocelulósicos aumenta enormemente a susceptibilidade para a hidrólise enzimática e, conseqüentemente, a produção de etanol. Várias condições do processo têm sido estudadas para otimizar a efetividade enzimática.

Segundo Gould & Freer (1984), citados por RABELO (2007), palha de trigo, casca de sementes e outros materiais lignocelulósicos podem ser utilizados para obtenção de açúcares. Amostras moídas foram tratadas com solução contendo 1% de H_2O_2 pH 11,5, a temperatura de 25°C por 16h. Ao final do pré-tratamento, pouco mais da metade da lignina foi solubilizada. Ainda segundo os autores, aumentado a

concentração de peróxido de hidrogênio para mais que 1%, com pH alcalino, não há grandes alterações na solubilidade da lignina.

Gould (1984), citado por RABELO (2007), afirmou que aproximadamente metade da lignina e grande parte da hemicelulose presentes em resíduos agrícolas como palha de trigo e resíduos da colheita de milho foram solubilizados quando tratados a 25°C com uma solução alcalina de 1% (w/v) de peróxido de hidrogênio, com o pH ajustado para 11,5, por 18 a 24 horas. A hidrólise da fração insolúvel com celulase de *Trichoderma reesei* apresentou um rendimento de glicose de quase 100%, baseado no conteúdo de celulose contida no resíduo antes do pré-tratamento. Ainda segundo o autor, o início da deslignificação dos resíduos pelo peróxido de hidrogênio depende do valor do pH da solução de pré-tratamento estar acima de 10,5 com a máxima deslignificação ocorrendo a pH 11,5 ou mais.

O pré-tratamento dos resíduos com uma solução de peróxido de hidrogênio com pH menor que 10 apresentou baixa digestibilidade da biomassa, sendo que 10-15% da lignina foi solubilizada a pH 6,8. Quando tratados com peróxido a um pH 10 ou mais, a hemicelulose contida na fração insolúvel diminuiu drasticamente. A eficiência da hidrólise enzimática na conversão da celulose à glicose também depende do pH durante o pré-tratamento. Amostras tratadas com pHs maiores que 10 mostraram uma maior eficiência na conversão, sendo o máximo de aproximadamente 100% de conversão no pH 11 (RABELO, 2007).

Segundo Azzam (1989) aproximadamente 50% da lignina e a maior parte da hemicelulose contida no bagaço de cana foram solubilizadas utilizando uma concentração de 2% de peróxido de hidrogênio alcalino a 30°C em 8 horas. O conteúdo de celulose foi conseqüentemente aumentado de 42% do bagaço não tratado para 75% após o processo de oxidação. A sacarificação da polpa pré-tratada com celulase de *Trichoderma viride* a 45°C por 24 horas, apresentou um rendimento de glicose de 95%.

Kim et al. (2001), citados por GUPTA (2008), utilizaram H₂O₂ com ácido sulfúrico, amônia e água para o tratamento de carvalho por processos de percolação, o que melhorou consideravelmente a hidrólise enzimática.

Krishna (2000) realizou sacarificação de *Antigonum leptopus* e folhas de bananeira tratadas com solução de peróxido de hidrogênio 1% ajustada a pH 11,5 com NaOH, chegando à índices de sacarificação próximos de 100%.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Este capítulo apresenta os materiais, procedimentos e métodos analíticos utilizados na obtenção dos dados experimentais.

3.1. Materiais

3.1.1. Micro-organismo

O micro-organismo utilizado neste trabalho foi o fungo *Aspergillus niger*, cedido pelo laboratório de Bioquímica do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, UNIOESTE – Cascavel. O fungo foi repicado sobre o meio de cultura Ágar Sabouraud – Dextrose com incubação em estufa microbiológica a 30°C±1°C. A manutenção do fungo foi realizada em geladeira a temperatura de 4°C com repicagens periódicas.

3.1.2. Resíduos lignocelulósicos

O bagaço de cana-de-açúcar foi cedido pela Cooperativa Agrícola Regional de Produtores de Cana – COOPCANA do município de Paraíso do Norte - PR. As palhas de milho e de trigo foram coletadas, após a colheita dos grãos, no interior do município de Toledo – PR.

3.1.3. Reagentes e materiais

A Tabela 9 apresenta os reagentes e materiais utilizados durante os ensaios.

Tabela 9. Relação de reagentes e materiais

Reagentes e materiais	Fabricante
Fosfato monobásico de potássio - KH_2PO_4	Nuclear
Sulfato de amônio - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Synth
Sulfato de magnésio heptahidratado - $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Dinâmica
Cloreto de cálcio - CaCl_2	Synth
Sulfato de ferro heptahidratado - $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Synth
Sulfato de manganês monohidratado - $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Nuclear
Sulfato de zinco heptahidratado - $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Synth
Cloreto de cobalto - CoCl_2	Biotec
Peptona de carne	Nuclear
Tween 80	CAAL
Glicose - $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	Nuclear
Peptona bacteriológica	Isofar
Ágar-ágar	Merck
Ácido 3,5 dinitrosalicílico - $\text{C}_7\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_7$	Aldrich
Hidróxido de sódio p.a. - NaOH	Vetec
Hidróxido de sódio comercial - NaOH	Quimitol
Fenol - $\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$	Merck
Metabissulfito de sódio - $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$	Vetec
Tartarato de sódio e potássio tetra hidratado - $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Synth
Peróxido de Hidrogênio 30% - H_2O_2	Vetec
Acetato de sódio trihidratado - $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	Merck
Ácido acético - CH_3COOH	Vetec
Fosfato monossódico monohidratado - $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Synth
Fosfato dissódico heptahidratado - $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Nuclear
Carboximetilcelulose - CMC	Biotec
Papel filtro qualitativo	Whatman e J. Prolab
Pipeta automática regulável	Digipet
Algodão hidrofílico	Cremer

3.1.4. Equipamentos

A Tabela 10 apresenta os equipamentos utilizados durante os ensaios.

Tabela 10. Relação de equipamentos

Equipamentos	Fabricante
Estufa microbiológica	Quimis
Estufa para secagem	Quimis
Banho-maria Ultratermostático	Nova Técnica
Banho-maria redondo comum	Fisaton
Moinho tipo martelo	TRF – 400
Espectrofotômetro UV/VIS	Shimadzu
Autoclave vertical	Phoenix
Mesa agitadora orbital	Marconi
Potenciômetro	Nova Orgânica
Balança analítica	Bioprecisa
Câmara de Neubauer	-
Microscópio Óptico	Bioval

3.2. Metodologia

3.2.1. Preparo do inóculo

O desenvolvimento do *Aspergillus niger* foi realizado em meio de cultura Ágar Sabouraud – Dextrose (ASD) [glicose (40g/L); peptona bacteriológica (10g/L); agar-ágar (15g/L)] inclinado em tubo de ensaio com incubação por sete dias a 30°C±1°C em estufa microbiológica.

Para obter o inóculo foram adicionados 10mL de água esterilizada no tubo contendo o fungo *A. niger*. Em seguida, realizou-se a raspagem dos esporos assepticamente com um bastão de vidro utilizando-se, assim, esta suspensão de esporos para o ensaio de fermentação (adaptado de AGUIAR & MENEZES, 2000). Porém, antes, filtrou-se uma pequena amostra da solução em funil de vidro com algodão, previamente esterilizados, para a realização da contagem de esporos.

A determinação de esporos em suspensão na solução filtrada foi realizada com o auxílio de câmara de Neubauer e microscópio óptico segundo Raimbault & Alazard (1980), citados por PARIS (2008). Transferiu-se assepticamente para a superfície da câmara uma gota da solução de esporos. Após, foram contadas as células nos quatro campos de um lado da câmara, realizando posteriormente a média. O cálculo da concentração de esporos (C_{esp}) foi realizado conforme a equação abaixo:

$$C_{esp} \text{ (esp/mL)} = \frac{\text{número médio esporos contados} \times \text{fator diluição}}{4 \cdot 10^{-4} \text{ mL}}$$

Contaram-se quatro campos em diagonal para cada retículo da câmara, sendo adotada a média aritmética para 3 repetições. O volume de cada campo de contagem da câmara é de 10^{-4} mL.

3.2.2. Tratamento dos resíduos lignocelulósicos

Antes dos tratamentos químicos, as palhas secas de milho e de trigo foram moídas em moinho do tipo martelo com peneira de 4 Mesh (4,75mm) e, após, armazenadas em sacos plásticos. O bagaço de cana moído proveniente da Usina foi submetido apenas à secagem ao ar livre em local coberto e, após, armazenamento em sacos plásticos.

3.2.2.1 Tratamento alcalino

O tratamento alcalino foi realizado de acordo com procedimento descrito por Aguiar & Menezes (2000) e Muthuvelayudham & Viruthagiri (2006).

Os resíduos foram pesados e lavados para a retirada de possível conteúdo solúvel. Após, cada resíduo foi colocado em erlenmayer e adicionou-se solução de hidróxido de sódio comercial a 4% (20mL de solução por grama de resíduo). O material foi levado à autoclave a temperatura de 121°C por 30min.

O material recuperado foi então lavado com água corrente, neutralizado com ácido fosfórico concentrado e seco em estufa, conforme descrito no item 3.2.2.3.

3.2.2.2 Tratamento alcalino oxidativo

O tratamento alcalino oxidativo foi adaptado da metodologia descrita por Krishna (2000).

Os resíduos foram imersos em água destilada por 4h e lavados para a retirada de possível conteúdo solúvel. Após, foram secos em estufa a 50°C. Em seguida cada resíduo foi pesado e transferido para erlenmayer juntamente com solução de peróxido de hidrogênio a 1% (50mL de solução por grama de resíduo). O pH da solução foi ajustado para 11,5 com hidróxido de sódio. A suspensão foi agitada a temperatura ambiente por 16h em mesa agitadora orbital a 200rpm.

Após o tempo de tratamento, as frações insolúveis foram filtradas e lavadas sucessivamente até que o filtrado apresentasse pH neutro. Após, as frações foram secas em estufa, conforme descrito no item 3.2.2.3.

3.2.2.3 Secagem dos resíduos pré-tratados

Os resíduos tratados foram dispostos em bandejas de metal e levados à estufa para secagem. Cada camada de resíduo apresentou-se com, aproximadamente, 1,00cm de espessura.

Para o tratamento com NaOH 4% a temperatura da estufa foi de 65°C. Foram realizadas pesagens com 0, 18, 30 e 42h de secagem.

Para o tratamento com H₂O₂ 1% a temperatura foi de 50°C. Foram realizadas pesagens nos tempos 0, 16, 18, 30 e 42h de secagem.

3.2.3. Fermentação

O objetivo da fermentação foi a indução da produção das enzimas celulases por *Aspergillus niger* utilizando resíduos lignocelulósicos como fonte de carbono para o fungo. Para a realização dos experimentos utilizou-se resíduos pré-tratados com hidróxido de sódio como fonte de carbono (AGUIAR & MENEZES, 2000) em meio de cultura adaptado de Mandels e Weber, 1969. A Tabela 11 apresenta a composição do meio de cultura.

Tabela 11. Composição do meio de cultura

Nutriente	Quantidade
KH ₂ PO ₄	2,000 g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,400g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,300 g/L
CaCl ₂	0,300 g/L
FeSO ₄ .7H ₂ O	5,000 mg/L
MnSO ₄ .H ₂ O	1,560 mg/L
ZnSO ₄ .7H ₂ O	1,400 mg/L
CoCl ₂	2,000 mg/L
Peptona de carne	1,000 g/L

Os ensaios foram conduzidos em Erlenmeyer de 2000mL contendo 1000mL do meio de cultura, 1,000mL de Tween 80 e resíduo pré-tratado dependendo do objetivo do teste posterior (10, 50 ou 100g/L). Não foi necessário ajustar o pH do meio, pois o mesmo apresentou-se próximo de 5,0 (ideal para o fungo). O material foi esterilizado em autoclave a 120°C por 20 minutos. Em seguida, adicionou-se suspensão de esporos com concentração de, aproximadamente, 10⁶ esporos/mL e fez-se a incubação a 30°C±1°C em estufa microbiológica com agitação periódica. Após o tempo de fermentação, o qual variou de 7 a 21 dias, retirou-se o material da estufa e realizou-se a filtração em papel filtro, obtendo-se o caldo enzimático para posterior determinação da atividade enzimática.

3.2.4. Hidrólise enzimática dos resíduos lignocelulósicos

Os ensaios de hidrólise enzimática foram realizados com o objetivo de determinar a atividade enzimática das celulasas utilizando os resíduos lignocelulósicos como substrato. O procedimento foi adaptado do método proposto por Ghose (1987).

Colocou-se 300 mg do resíduo pré-tratado em tubos de ensaio. Após, adicionou-se 4mL de tampão acetato de sódio pH 4,8. Os tubos foram deixados em banho-maria ultratermostático à temperatura de 50°C por alguns minutos. Em seguida, foram adicionados 2mL do caldo enzimático filtrado em cada tubo de ensaio, e estes foram deixados no banho-maria por 50 minutos, sendo agitados em

intervalos de 10 minutos. Os ensaios foram realizados em triplicata. Em paralelo realizou-se ensaios em branco substituindo-se o caldo enzimático por tampão acetato de sódio pH 4,8.

Após o término do tempo de incubação, procedeu-se determinação dos açúcares redutores totais (ART) (item 3.2.7) e calculou-se a atividade enzimática (item 3.2.8).

3.2.5. Determinação da atividade enzimática total em papel filtro

Os ensaios foram realizados com o objetivo de comparar os resultados de atividade enzimática em papel filtro (padrão) com os resultados de atividade utilizando os resíduos lignocelulósicos. O procedimento foi adaptado do método proposto por Ghose (1987).

Foram colocadas 4 tiras de papel (6cm² cada) em tubos de ensaio. Após, adicionou-se 4mL de tampão acetato de sódio pH 4,8. Os tubos foram deixados em banho-maria ultratermostático à temperatura de 50°C por alguns minutos. Em seguida, foram adicionados 2mL do caldo enzimático filtrado em cada tubo, e estes foram deixados no banho-maria por 60 minutos, sendo agitados em intervalos de 10 minutos. Os ensaios foram realizados em triplicata. Em paralelo realizou-se ensaios em branco substituindo-se o caldo enzimático por tampão acetato de sódio pH 4,8.

Após o término do tempo de incubação, procedeu-se determinação dos ART (item 3.2.7) e calculou-se a atividade enzimática (item 3.2.8).

3.2.6. Determinação da atividade endoglucanásica

A realização destes ensaios teve como objetivo a determinação da atividade das enzimas endoglucanases utilizando como substrato a carboximetilcelulose (CMC). O procedimento de hidrólise foi adaptado do método proposto por Ghose (1987).

Foram adicionados 0,5mL de solução de CMC 2% e 0,5mL de tampão acetato de sódio pH 4,8 em tubos de ensaio. Os tubos foram deixados em banho-maria ultratermostático a temperatura de 50°C por alguns minutos. Em seguida, foram adicionados 0,5mL do caldo enzimático filtrado em cada tubo, e estes foram deixados no banho-maria por 30 minutos, sendo agitados em intervalos de 10

minutos. Os ensaios foram realizados em triplicata. Em paralelo realizou-se ensaios em branco substituindo-se o caldo enzimático por tampão acetato de sódio pH 4,8.

Após o término do tempo de incubação, procedeu-se determinação dos ART (item 3.2.7) e calculou-se a atividade enzimática (item 3.2.8).

3.2.7. Quantificação de açúcares redutores totais (ART)

O complexo celulase é composto por três enzimas que atuam sinergicamente sobre a molécula de celulose. Durante a ação das enzimas, são formados produtos intermediários (oligossacarídeos e celobiose), sendo o produto final da hidrólise, a glicose (LYND & ZHANG, 2002). Portanto os resultados, após a hidrólise enzimática dos resíduos lignocelulósicos, devem ser expressos em ART (açúcares redutores totais), visto que, além de glicose, serão quantificados também açúcares redutores como oligossacarídeos e celobiose.

As concentrações de açúcares redutores foram determinadas pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) descrito por Miller (1959), com algumas adaptações. O método possui sensibilidade na faixa de 0,1 a 1,0g/L de açúcar redutor expresso em glicose. Os reagentes utilizados foram: ácido 3,5-dinitrosalicílico, hidróxido de sódio, fenol, metabissulfito de sódio, tartarato duplo de sódio e potássio e água destilada. A Tabela 13 apresenta a função de cada reagente durante a reação.

Tabela 13. Função dos reagentes no método DNS

Reagente	Finalidade
Fenol	Aumentar a quantidade de cor produzida
Metabissulfito de Sódio	Estabilizante da cor obtida na presença do Fenol
Hidróxido de Sódio	Redutor da ação da glicose sobre o ácido 3,5-dinitrosalicílico

Fonte: Lobato, 2003.

Rabelo (2007) afirma que a solução DNS preparada conforme metodologia de Miller (1959) sofre degradação se estocada por algum período, mesmo armazenada em frasco âmbar. Portanto a solução foi preparada de acordo com Bazán (1993), citado pelo mesmo autor, utilizando ácido 3,5-dinitrosalicílico (10,6g), hidróxido de sódio (19,8g), fenol fundido a 50°C (7,6mL) e metabissulfito de sódio (8,3g) em

1416mL de água destilada. Em paralelo, foi preparada solução de tartarato duplo de sódio e potássio, o qual foi adicionado após a reação para que a cor formada permanecesse estável até o momento da leitura espectrofotométrica.

Segundo Silva et al. (2003), citados por RABELO (2007), açúcares redutores são compostos que possuem grupos carbonílico e cetônico livres, capazes de se oxidarem na presença de agentes oxidantes em soluções alcalinas. O método DNS baseia-se na redução do ácido 3,5-dinitrosalicílico à ácido 3,5-aminonitrossalicílico ao mesmo tempo em que o grupo aldeído do açúcar é oxidado a grupo carboxílico, com o desenvolvimento da coloração avermelhada.

Os ensaios foram realizados pipetando-se 0,7mL da amostra (após hidrólise enzimática) em tubos de ensaio contendo 0,7mL de DNS. Em seguida, os tubos foram levados ao banho-maria a 100°C por 5 minutos. Após exatamente 5 minutos, os tubos foram colocados em banho de gelo. Posteriormente, o volume da solução foi completado para 12,5mL com solução de tartarato duplo de sódio e potássio. Então fez-se leitura das amostras a 540nm em espectrofotômetro UV/VIS.

Para determinar a concentração dos ART na amostras, construiu-se curva-padrão de glicose com concentrações de 0,1 a 1,0g/L, gerando um modelo de regressão linear e coeficiente de determinação da glicose em função da absorbância medida. Quando necessário, foram feitas diluições das amostras utilizando tampão acetato pH 4,8, para que as absorbâncias das mesmas estivessem dentro do intervalo linear de leitura.

Com o objetivo de quantificar apenas os ART provenientes da ação das enzimas celulasas sobre o substrato celulósico, os valores de absorbância dos brancos foram descontados dos valores de absorbância das amostras. Os brancos consistiram em branco da hidrólise, branco do caldo enzimático e branco reacional. Desta forma, os ART provenientes da fermentação, do substrato e valores de absorbância dos reagentes utilizados foram descontados dos ART das amostras.

O branco da hidrólise enzimática consistiu em proceder a etapa de hidrólise sem a adição do caldo enzimático (6mL de tampão acetato pH 4,8 e 300mg de resíduo) e refere-se aos ART presentes no substrato, os quais podem ser gerados durante a etapa de pré-tratamento, resultando da degradação da hemicelulose ou de extremidades da cadeia de celulose, dependendo da eficiência do processo de lavagem. O branco do caldo enzimático e o branco reacional foram realizados

misturando-se 0,7mL do caldo enzimático filtrado e 0,7mL de tampão acetato pH 4,8, respectivamente, com 0,7mL de solução DNS, seguindo-se o procedimento até leitura em espectrofotômetro.

3.2.8. Determinação da atividade enzimática

Segundo Ghose (1987), uma unidade de atividade enzimática libera 1 μ mol de açúcar redutor por mL de caldo por minuto, ou seja, **U = μ mol mL⁻¹ min⁻¹**. A partir da equação abaixo calculou-se a atividade enzimática, a qual foi expressa em U/mL.

$$U/mL = ART \times \frac{V_T}{0,18 \times V_C \times T_H}$$

Onde: ART são os açúcares redutores totais produzidos na etapa de hidrólise (mg/mL);

V_T é o volume total utilizado na hidrólise (volume do tampão + volume do caldo) (mL);

V_C é o volume do caldo utilizado na hidrólise (mL);

T_H é o tempo de hidrólise (min.);

0,18 é 1 μ mol de glicose (mg).

3.2.9. Cinética da fermentação

O objetivo da cinética da fermentação foi determinar o tempo ideal de fermentação, ou seja, o tempo de incubação no qual a produtividade enzimática é máxima e verificar como a quantidade da fonte de carbono influencia a atividade enzimática. A produtividade foi calculada dividindo-se o valor da atividade enzimática obtida (U/mL) pelo número de horas de fermentação (h).

Para os ensaios de fermentação utilizou-se bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com hidróxido de sódio como fonte de carbono (10, 50 e 100g/L), seguindo procedimento descrito no item 3.2.3 com incubação do material por 21 dias. Periodicamente, amostras foram coletadas assepticamente e filtradas em papel filtro para a determinação da atividade enzimática. Em paralelo foram realizadas medidas de pH, bem como a determinação de açúcares redutores totais (ART) do caldo, com o objetivo de acompanhar a variação de pH do meio e a produção de ART durante a fermentação.

A hidrólise enzimática foi realizada utilizando-se também o bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com hidróxido de sódio. O procedimento foi realizado como descrito no item 3.2.4.

3.2.10. Cinética de desativação enzimática

Os ensaios foram realizados com o objetivo de verificar a que temperatura e por quanto tempo o caldo enzimático pode ser armazenado sem que a atividade das enzimas celulasas seja afetada.

Após ensaios de fermentação (item 3.2.3) com bagaço de cana-de-açúcar a 100g/L por sete dias, porções de 20mL de caldos enzimáticos distintos foram armazenadas em geladeira (4°C) e em *freezer* (-18°C). Porções dos dois caldos foram retiradas em diferentes intervalos de tempo para a determinação da atividade enzimática. Utilizou-se como substrato da hidrólise bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com NaOH, conforme procedimento descrito no item 3.2.4. Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.2.11. Fermentação e hidrólise enzimática utilizando os três resíduos lignocelulósicos pré-tratados

O objetivo do teste foi verificar a produção das enzimas celulasas com fontes de carbono diferentes e avaliar a atividade enzimática na hidrólise dos três resíduos lignocelulósicos. Para os ensaios de fermentação utilizou-se bagaço de cana-de-açúcar, palha de milho e palha de trigo pré-tratados com hidróxido de sódio (100g/L) conforme descrito no item 3.2.3 com incubação do material por sete dias.

A atividade enzimática foi realizada utilizando-se também os três resíduos pré-tratados com hidróxido de sódio para cada caldo enzimático. O procedimento foi realizado como descrito no item 3.2.4.

3.2.12. Testes dos fatores que afetam a hidrólise enzimática

Estes testes foram realizados com o objetivo que acompanhar os principais fatores que afetam a atividade enzimática das enzimas celulasas, bem como determinar os pontos experimentais ideais. Procedeu-se ensaio de fermentação conforme descrito do item 3.2.3 com resíduos lignocelulósicos (100g/L) com incubação do material conforme resultados dos ensaios de cinética da fermentação

(7dias). Após o período de incubação, o caldo enzimático foi filtrado em papel filtro e utilizado nos testes de hidrólise enzimática. Tais ensaios foram realizados utilizando-se tanto os resíduos não tratados como os resíduos que sofreram os dois tipos de tratamento, dependendo do objetivo do teste. Os testes estão descritos a seguir.

3.2.12.1. Efeito da temperatura

Os ensaios foram realizados utilizando-se bagaço de cana, palha de milho e palha de trigo pré-tratados com hidróxido de sódio como substrato com o objetivo de acompanhar o efeito da temperatura sobre a atividade enzimática e determinar a temperatura ideal para ação das enzimas celulases.

O procedimento foi realizado conforme descrito no item 3.2.4, variando-se a temperatura durante a reação. Assim, o banho-maria foi ajustado para as seguintes temperaturas: 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80°C. Os ensaios foram realizados em triplicata para cada resíduo em todas as temperaturas estudadas.

3.2.12.2. Efeito do pH

Os ensaios foram realizados utilizando-se bagaço de cana, palha de milho e palha de trigo pré-tratados com hidróxido de sódio como substrato com o objetivo de acompanhar o efeito do pH sobre a atividade enzimática e determinar o pH ideal para ação das enzimas celulases.

O procedimento foi realizado conforme descrito no item 3.2.4, utilizando tampões com diferentes pHs. Os pHs estudados foram: 2,91; 3,78; 4,80; 5,89; 6,75; 7,82 e 8,82 sendo que, para os quatro primeiros utilizou-se tampão acetato de sódio 50 mM e para os últimos utilizou-se tampão fosfato de sódio 50 mM. Os ensaios foram realizados em triplicata para cada resíduo em todos os pHs estudados.

3.2.12.3. Efeito do tempo

Os ensaios foram realizados utilizando-se bagaço de cana, palha de milho e palha de trigo pré-tratados com hidróxido de sódio como substrato com o objetivo de verificar como o tempo afeta a atividade das enzimas celulases. Em paralelo, foram realizados testes para verificar a presença da enzima glicose oxidase (enzima

intracelular) no caldo enzimático. Tais enzimas podem ter sido liberadas durante a extração do caldo.

Para os ensaios de hidrólise dos resíduos, o procedimento foi realizado conforme descrito no item 3.2.4, variando-se o tempo de incubação da mistura reacional em banho-maria. Os tempos estudados foram: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80 minutos. Os ensaios foram realizados em triplicata para cada resíduo em todos os tempos estudados.

Para o teste da presença de glicose oxidase no caldo, utilizou-se 100mL do mesmo caldo enzimático e 200mL de tampão acetato de sódio pH 4,8 em erlenmayer de 600mL. Incubou-se a mistura em banho-maria a 50°C por 80 minutos, coletando-se amostras em triplicata nos tempos 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80 minutos para quantificação dos ART.

3.2.12.4. Efeito da quantidade de substrato

Os ensaios foram realizados utilizando-se bagaço de cana, palha de milho e palha de trigo pré-tratados com hidróxido de sódio como substrato com o objetivo de verificar o comportamento da atividade enzimática com a variação da quantidade de substrato.

O procedimento foi realizado conforme descrito no item 3.2.4, variando-se a quantidade de substrato da mistura reacional. As quantidades de substratos pesadas foram: 100, 200, 300, 400, 500 e 600mg, sendo os resultados expressos em fração mássica de substrato (0,016; 0,032; 0,047; 0,062; 0,077; 0,091), já que o mesmo não estava dissolvido no meio. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Em paralelo ao teste descrito acima, realizou-se teste de absorção de água pelos resíduos com o objetivo de avaliar a quantidade máxima de resíduo a ser utilizada nos ensaios de hidrólise enzimática. Este teste consistiu em pesar 1,000g de cada resíduo pré-tratado e seco em béquer de 250mL, onde foram encharcados com 100mL de água destilada e deixados em repouso durante 5 h. Em seguida, toda a solução (bagaço + água destilada) foi colocada em um funil (devidamente pesado) para que toda a água presente em excesso fosse eliminada. Assim que a água parou de gotejar, o bagaço juntamente com o funil foi pesado. Feito isso, a massa de água retida ou o poder de retenção do bagaço de cana foi calculado. Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.2.12.5. Efeito da diluição do caldo

Os ensaios foram realizados utilizando-se bagaço de cana, palha de milho e palha de trigo pré-tratados com hidróxido de sódio como substrato com o objetivo de verificar como a concentração das enzimas afeta a atividade enzimática.

O procedimento foi realizado conforme descrito no item 3.2.4, variando-se os volumes de tampão e de caldo enzimático, sempre obtendo-se o volume final do meio de 6mL. Para a realização destes ensaios o pH do caldo enzimático foi ajustado para 4,8 com o objetivo de evitar alterações bruscas do mesmo durante a hidrólise, devido às diluições. A Tabela 12 apresenta a relação entre os volumes de caldo enzimático e de tampão acetato de sódio utilizados. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Tabela 12. Relação entre os volumes de caldo enzimático e de tampão acetato

Volume de caldo (mL)	Volume do tampão (mL)	Diluição (em vezes)
1	5	6,0
2	4	3,0
3	3	2,0
4	2	1,5
5	1	1,2
6	0	0,0 (sem diluição)

3.2.12.6. Efeito do tipo de tratamento dos resíduos

Os ensaios foram realizados utilizando-se bagaço de cana, palha de milho e palha de trigo não tratados e tratados (hidróxido de sódio e peróxido de hidrogênio). O objetivo foi verificar, através da atividade enzimática, a disponibilidade de celulose nos resíduos após os pré-tratamentos. Os resultados obtidos nestes testes foram comparados com os resultados de lignina e celulose presentes nos resíduos antes e após os pré-tratamentos.

O procedimento de hidrólise foi realizado conforme descrito no item 3.2.4.

3.2.12.7. Efeito de hidrólises enzimáticas sucessivas dos resíduos

Os três resíduos pré-tratados com peróxido de hidrogênio utilizados nos testes do efeito do tipo de tratamento foram submetidos à sucessivas hidrólises com

o objetivo de avaliar o comportamento da atividade enzimática sobre os substratos após vários processos de hidrólise.

Após a primeira hidrólise os resíduos foram secos em estufa a 65°C. Em seguida, realizou-se nova hidrólise conforme procedimento descrito no item 3.2.4. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes, totalizando quatro processos de hidrólise enzimática. Em todos os processos utilizou-se o mesmo caldo enzimático.

3.2.13. Comparação entre atividades enzimáticas

O objetivo dos ensaios foi comparar a atividade enzimática em papel filtro (padrão) e a atividade enzimática utilizando os três resíduos lignocelulósicos como substrato da hidrólise enzimática.

Para os ensaios de fermentação utilizou-se palha de milho pré-tratada com hidróxido de sódio (10 e 100g/L) conforme descrito no item 3.2.3 com incubação do material por sete dias.

A atividade enzimática foi realizada utilizando-se papel filtro das marcas Whatman nº1 e J. Prolab, como descrito no item 3.2.5 e os três resíduos pré-tratados com hidróxido de sódio, como descrito no item 3.2.4. Em paralelo realizou-se determinação da atividade das enzimas endoglucanases, como descrito no item 3.2.6.

3.3. Métodos analíticos

3.3.1. Determinação de lignina e celulose

Amostras não tratadas e tratadas com NaOH e H₂O₂ dos três resíduos foram analisadas quanto ao teor de lignina e celulose, seguindo-se metodologia de Van Soest, segundo Silva & Queiroz (2002). Tais resultados foram analisados, juntamente com resultados de atividade enzimática, com objetivo de avaliar a eficiência dos tratamentos sobre a disponibilidade de celulose. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

3.3.1.1. Determinação de lignina

A determinação da lignina presente nos resíduos foi realizada a partir da determinação da fibra em detergente ácido, de acordo com o procedimento descrito abaixo:

- Pesou-se cerca de 1g de amostra seca, previamente moída em moinho com peneira de 1 mm;
- Colocou-se a amostra em béquer de 600mL. Adicionou-se 100mL de solução detergente ácida (20g brometo-cetil-trimetilamônio em 1L de ácido sulfúrico 1N padronizado) (temperatura ambiente). Colocou-se o béquer no aparelho digestor. Aqueceu-se até ebulição em 5 min.;
- Ajustou-se a temperatura para refluxo (baixo nível) da amostra após o início da ebulição e deixou-se por 60 min. Após 30 min. lavou-se os lados internos do béquer com pequena quantidade de solução em detergente ácida;
- Filtrou-se sob vácuo em cadinho filtrante (previamente seco a 105°C e pesado). Com o auxílio de uma ponteira, limpou-se e lavou-se o béquer com água quente, sobre o cadinho;
- Lavou-se o cadinho duas vezes com água quente (95 a 100°C). Encheu-se o cadinho a cada tempo, com o vácuo desligado, e esperou-se 2 min., permitindo a quebra da crosta formada. Após, filtrou-se sob vácuo;
- Lavou-se igualmente com acetona (30-40mL) e filtrou-se sob vácuo;
- Levou-se o cadinho à estufa a 100°C por 8h;
- Pesou-se o cadinho até massa constante.

O método utilizado para a determinação de lignina foi o método da lignina “Permanganato”, segundo procedimento descrito abaixo:

- Colocou-se o cadinho filtrante com o resíduo da fibra em detergente ácido em uma bandeja de vidro, com uma camada de água destilada de 2 a 3 cm de altura;
- Adicionou-se 30mL de solução combinada de permanganato no cadinho (50g KMnO_4 /L água destilada com solução tampão na razão de 2:1. Solução

tampão: 6g $[\text{Fe}(\text{NO})_3]_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,15g AgNO_3 em 100 mL de água, 500mL ácido acético glacial e 400mL álcool butil terciário);

- Mexeu-se a mistura com bastão de vidro;
- Manteve-se o nível do cadinho por 2h mexendo-se o conteúdo a cada 15 min., sempre observando-se a coloração púrpura;
- Filtrou-se sob vácuo até o esgotamento;
- Colocou-se o cadinho em uma bandeja limpa, com água, e adicionou-se 20 a 30mL de solução de desmineralização (50g $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em 700mL de etanol 95% com 50mL HCl concentrado (12N) em 250mL água destilada). Depois de 15 min. filtrou-se até o esgotamento;
- Lavou-se o cadinho com solução de desmineralização e repetiu-se a operação até que o resíduo ficasse claro (amarelado a branco);
- Lavou-se o cadinho com 30mL de solução de etanol a 80% (155mL água destilada e 845mL de álcool etílico a 95%). Filtrou-se sob vácuo e repetiu-se a operação por mais duas vezes;
- Lavou-se de maneira similar com 30mL de acetona e filtrou-se sob vácuo;
- Levou-se o cadinho à estufa a 100°C por 8h;
- Pesou-se o cadinho até massa constante.

3.3.1.2 Determinação de celulose

A partir da determinação da lignina foi possível determinar a celulose presente nos resíduos, segundo procedimento descrito abaixo:

- Queimou-se o cadinho contendo o resíduo da lignina “permanganato” por 3h a 500°C;
- Pesou-se o cadinho até massa constante;
- Calculou-se a porcentagem de celulose através da diferença na pesagem antes e depois da queima.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Este capítulo apresenta os resultados obtidos neste trabalho e suas respectivas discussões. Tais resultados referem-se ao processo de tratamento dos resíduos lignocelulósicos, ao processo de fermentação utilizando tais resíduos e aos fatores que afetam a hidrólise enzimática dos resíduos lignocelulósicos utilizados.

4.1. Secagem dos resíduos após os pré-tratamentos

Durante a secagem dos resíduos tratados com solução de hidróxido de sódio 4%, os mesmos foram pesados com 0, 18, 30 e 42h de secagem com o objetivo de determinar o tempo após o qual a massa permaneceu constante, indicando que todos os resíduos estão livres de umidade. A Figura 14 apresenta os valores das massas dos resíduos em função do tempo de secagem (Tabela apresentada no anexo 1).

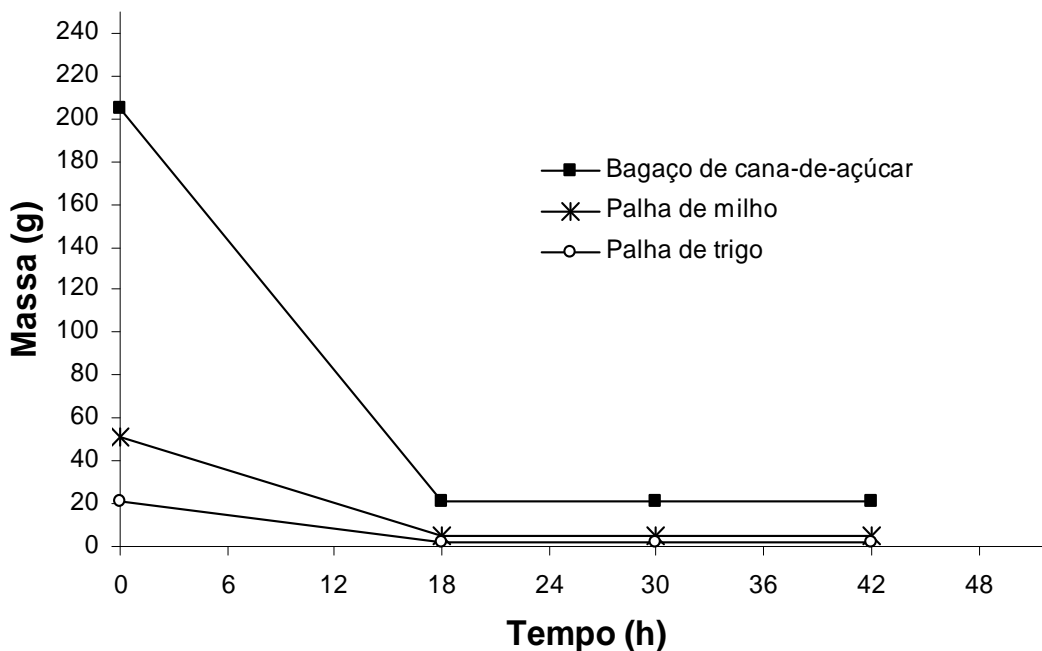


Figura 14. Massa dos resíduos pré-tratados com NaOH 4% em função do tempo de secagem.

Observa-se que, após 18h, a massa dos três resíduos reduziu aproximadamente 90%, permanecendo constante até o tempo de 42h.

Para os resíduos tratados com solução de peróxido de hidrogênio 1%, a pesagem foi realizada com 0, 16, 18, 30 e 42h de secagem. A Figura 15 apresenta os valores das massas dos resíduos em função do tempo de secagem (Tabela apresentada no anexo 2).

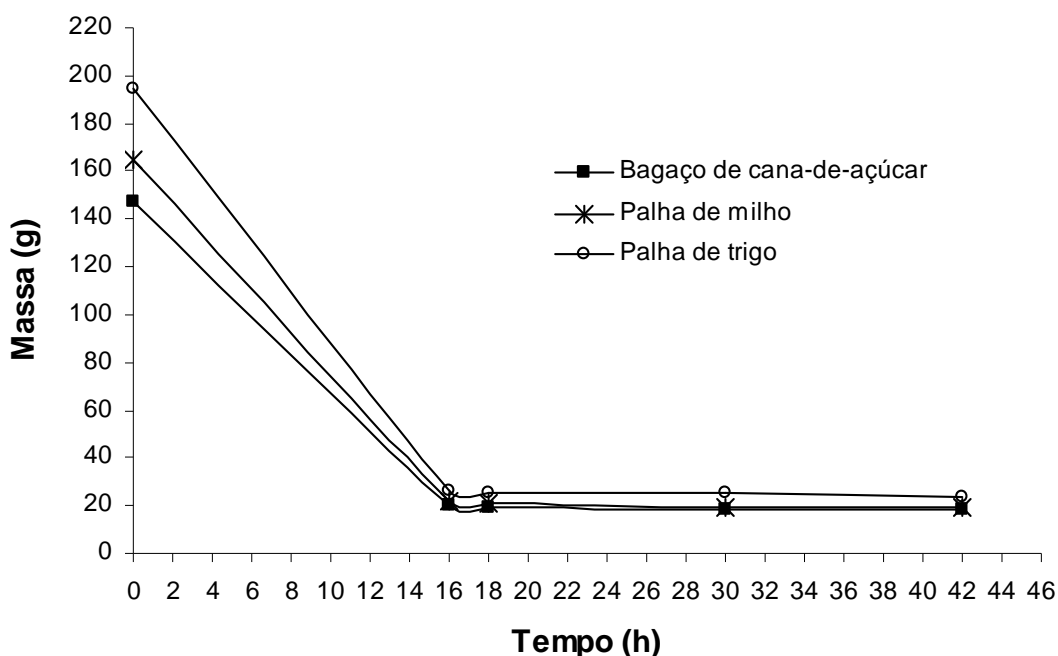


Figura 15. Massa dos resíduos pré-tratados com H₂O₂ 1% em função do tempo de secagem.

Observa-se que, após 16h, a massa dos três resíduos reduziu aproximadamente 87%, permanecendo constante até o tempo de 42h.

Considerando os resultados obtidos, padronizou-se o tempo de secagem em 18 h para ambos os pré-tratamentos.

4.2. Cinética da fermentação

O objetivo da cinética da fermentação foi determinar o tempo ideal de fermentação, ou seja, o tempo de incubação no qual se obtivesse produtividade enzimática máxima e verificar como a quantidade de fonte de carbono influencia a atividade enzimática. A Figura 16 mostra os resultados de atividade enzimática ao longo do tempo de fermentação para bateladas com 10g, 50g e 100g de bagaço de cana-de-açúcar por litro de caldo (Tabela apresentada no anexo 3).

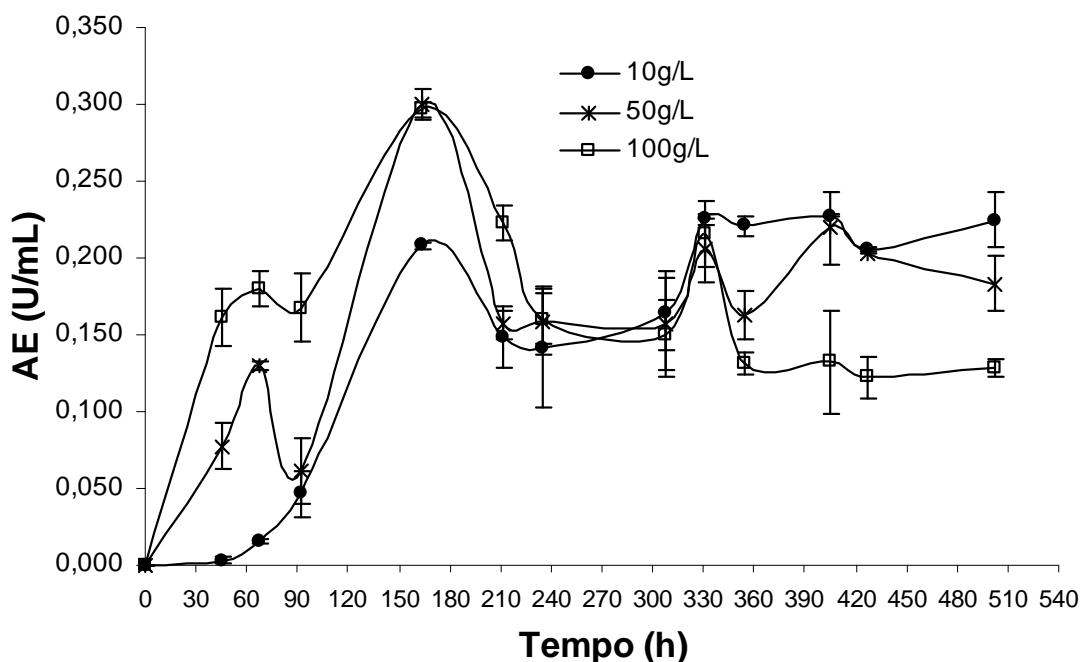


Figura 16. Atividade enzimática em função do tempo de fermentação para três diferentes quantidades de bagaço de cana-de-açúcar utilizadas.

Observa-se na Figura 16 que a produtividade máxima foi de 0,0013 U/mL·h para a batelada com 10g/L e 0,0018 U/mL·h para as bateladas com 50 e 100g/L, com atividades de 0,208 U/mL para a batelada com 10g/L, 0,300 U/mL para a batelada com 50g/L e 0,297 U/mL para a batelada com 100g/L, após 164h de fermentação. Portanto, o tempo ideal para a coleta do caldo da fermentação é de, aproximadamente, sete dias.

Para efeito de comparação, Aguiar & Menezes (2000) em estudo de produção de celulases de *Aspergillus niger* com bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com NaOH 4% como fonte de carbono, obtiveram valores de atividade enzimática de aproximadamente 0,25 U/mL para 10g/L de bagaço de cana. A atividade aqui obtida (0,208 U/mL), nas mesmas condições, encontra-se próxima da obtida pelos autores.

Os resultados de atividade enzimática apresentaram-se mais altos para os sistemas em batelada com 50g/L e 100g/L provavelmente devido à maior quantidade de fonte de carbono no meio. Maiores quantidades de celulose presente no meio acarretam uma elevação dos níveis de endoglucanases (OLSSON et al., 2003), as quais, de acordo com Peixoto (2006), citado por PARIS (2008), são responsáveis pela liberação de glicose, celobiose e celodextrinas direto da cadeia de celulose.

Assim, optou-se por utilizar a massa de substrato de 100g/L nos próximos ensaios de fermentação.

Observa-se também que, após 308 h de fermentação, ocorreu um aumento na atividade enzimática. Isto pode ter ocorrido devido ao crescimento críptico. De acordo com Haraguchi (2005), durante este processo ocorre a lise de células e o conteúdo celular é liberado ao meio, servindo como substrato para o metabolismo microbiano.

Em paralelo aos resultados de atividade enzimática, obteve-se medidas de pH e determinação dos ART dos três caldos enzimáticos. Os resultados de pH dos caldos em função do tempo de fermentação estão apresentados pela Figura 17 (Tabela apresentada no anexo 4).

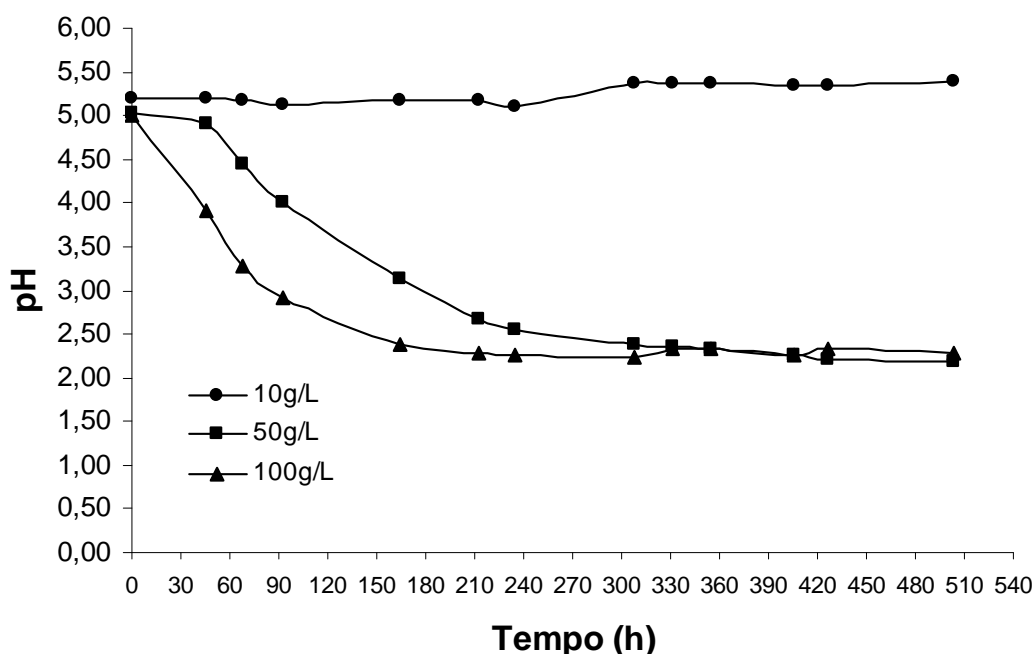


Figura 17. Variação do pH dos caldos em função do tempo de fermentação para três diferentes quantidades de bagaço de cana-de-açúcar utilizadas.

Observa-se na Figura 17 uma diminuição do pH do caldo para os sistemas em batelada com 50 e 100g/L, inicialmente de 5,03 e 5,00, caindo para 2,67 e 2,29, respectivamente após 212h de fermentação. Sabe-se que o *Aspergillus niger* é eficiente produtor de ácidos orgânicos como o cítrico e o glucônico (KAAIJ, 2007). Assim a redução do pH dos meios de fermentação pode ter ocorrido devido a produção de tais ácidos pelo fungo. Para a batelada com 10g/L, o pH manteve-se constante ao longo da fermentação, o que pode ter ocorrido devido à baixa

quantidade de fonte de carbono, acarretando em uma reduzida quantidade de açúcares liberados no meio. Segundo Prata & Santos (2005), baixas concentrações de açúcares no meio fermentativo provocam baixos rendimentos na produção de ácido cítrico.

Os resultados de ART dos caldos em função do tempo de fermentação estão apresentados pela Figura 18 (Tabela apresentada no anexo 5).

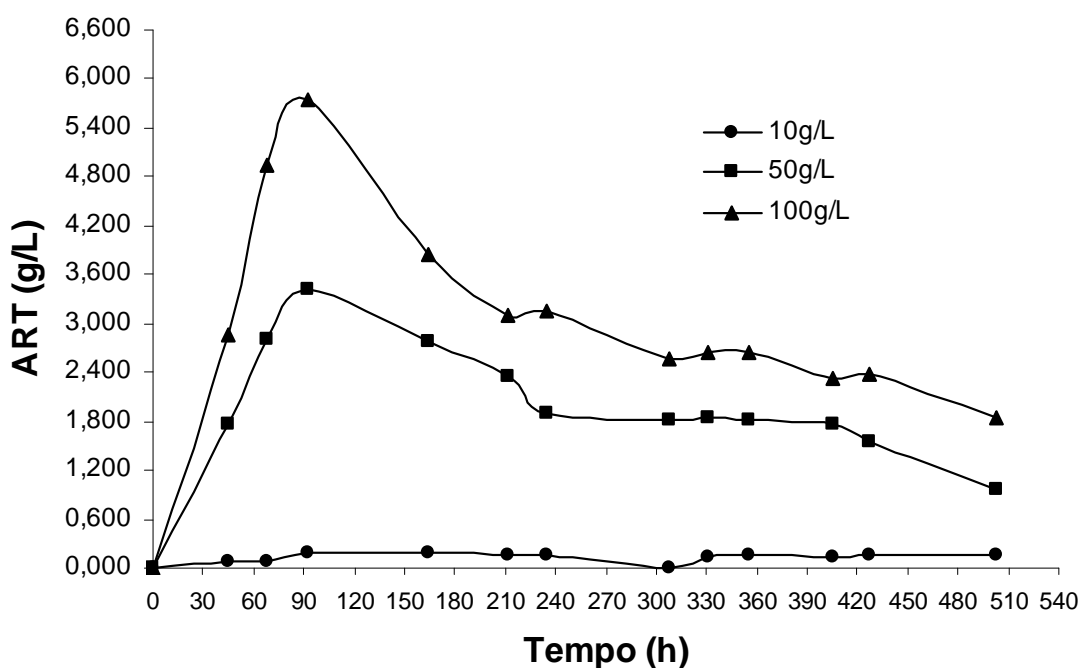


Figura 18. Variação dos ART dos caldos em função do tempo de fermentação para três diferentes quantidades de bagaço de cana-de-açúcar utilizadas.

De acordo com a Figura 18, observa-se um aumento dos ART até 3,412 g/L e 5,745 g/L para as bateladas com 50 e 100g/L, respectivamente, até 92ª hora de fermentação. Após este tempo, os ART diminuíram gradativamente. Este processo pode ser explicado devido à produção de enzimas celulasas pelo fungo, as quais são responsáveis pela degradação da celulose presente no substrato (única fonte de carbono) em açúcares como oligossacarídeos, celobiose e glicose (ZHANG, 2006; RABELO, 2007), os quais foram metabolizados pelo fungo após as 92 h de fermentação.

Portanto, os resultados de variação dos ART do caldo e os resultados de atividade enzimática mostram que o caldo deve ser coletado com, aproximadamente, sete dias de fermentação.

4.3. Cinética de desativação enzimática

A Figura 19 apresenta os resultados de atividade enzimática ao longo do tempo na temperatura de -18°C (Tabela apresentada no anexo 6).

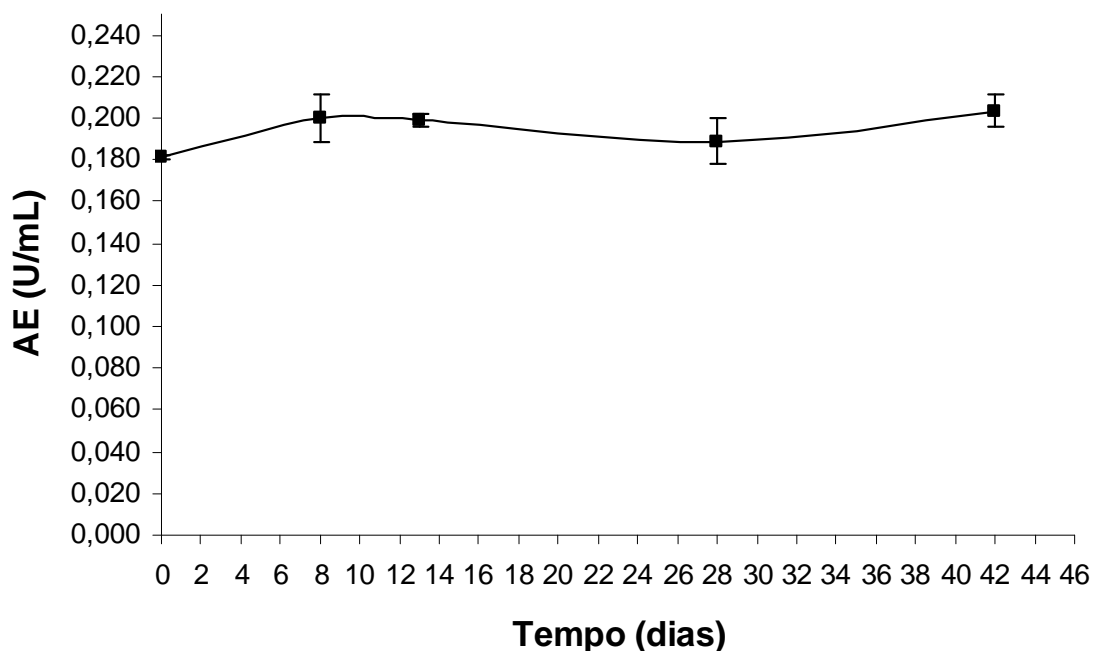


Figura 19. Variação da atividade enzimática ao longo do tempo para amostras de caldo enzimático armazenadas a temperatura de -18°C .

Observa-se na Figura 19 que a atividade enzimática manteve-se praticamente constante, sendo $0,181\text{ U/mL}$ no tempo zero (logo após a extração) e $0,203\text{ U/mL}$ após 43 dias de armazenamento a temperatura de -18°C . Assim, pode-se afirmar que o complexo celulásico permanece estável a esta temperatura por 43 dias, nas condições estudadas.

A Figura 20 apresenta os resultados de atividade enzimática ao longo do tempo na temperatura de 4°C (Tabela apresentada no anexo 7).

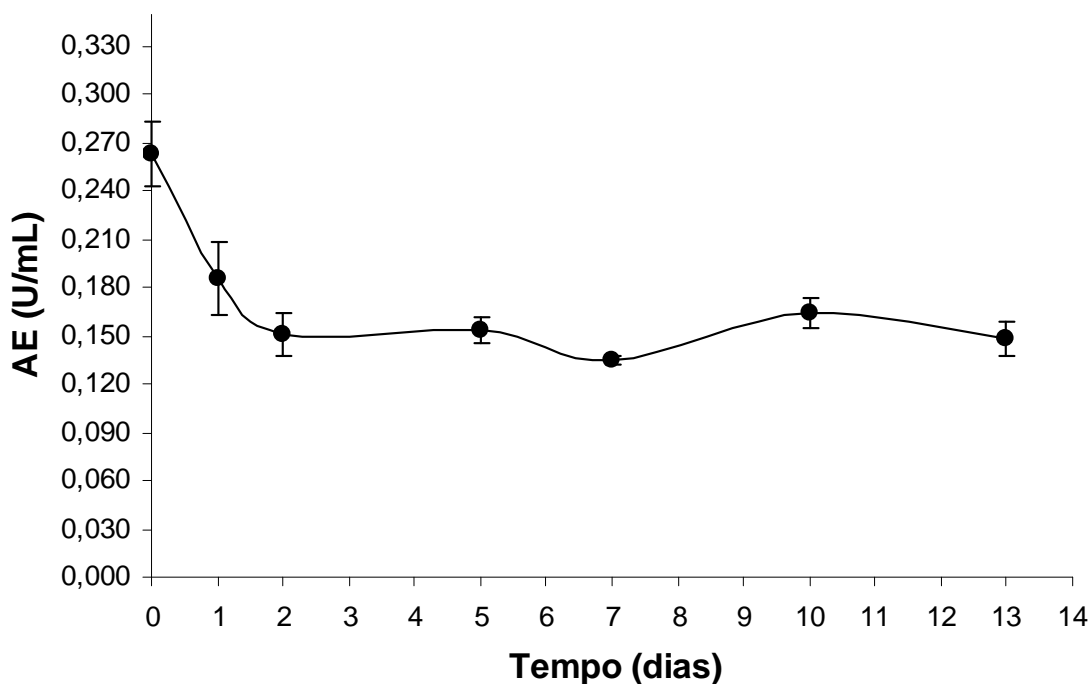


Figura 20. Variação da atividade enzimática ao longo do tempo para amostras de caldo enzimático armazenadas a temperatura de 4°C.

A atividade enzimática, conforme Figura 20, reduziu de 0,263 U/mL no tempo zero para 0,185 U/mL após 24h e para 0,151 U/mL após 48h de armazenamento, mantendo-se aproximadamente constante até o 13º dia (0,148 U/mL). Portanto, a redução da atividade enzimática foi de, aproximadamente, 30% após 24h e de, aproximadamente, 43% após 48h, sugerindo que o caldo enzimático deve ser utilizado logo após a extração, nas condições estudadas.

4.4. Fermentação e hidrólise enzimática utilizando os três resíduos lignocelulósicos pré-tratados

Utilizou-se os três resíduos pré-tratados com NaOH tanto para os ensaios de fermentação como para os ensaios de hidrólise enzimática. Os resultados de atividade enzimática estão apresentados pela Figura 21 (Tabela apresentada no anexo 8).

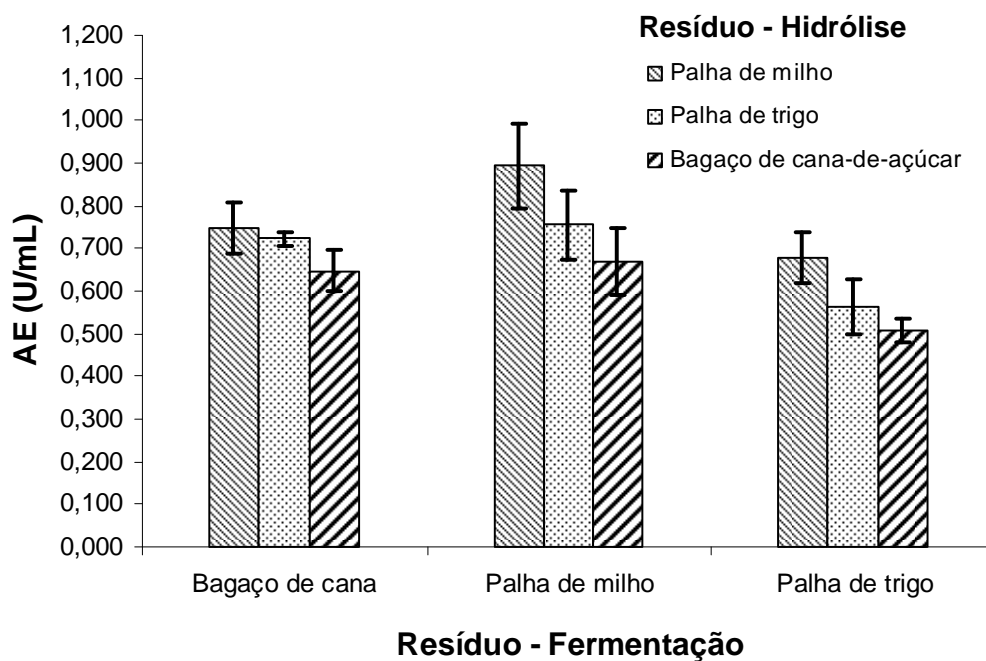


Figura 21. Atividade enzimática utilizando os três resíduos pré-tratados em ambos os processos de fermentação e hidrólise enzimática.

Observa-se na Figura 21 que os resultados mais altos de atividade enzimática foram obtidos utilizando-se a palha de milho como substrato de hidrólise, apresentando 0,748 U/mL para fermentação com bagaço de cana, 0,895 U/mL para fermentação com a palha de milho e 0,677 U/mL para fermentação com a palha de trigo. Para a palha de trigo como substrato da hidrólise, obteve-se 0,724 U/mL, 0,755U/mL e 0,562 U/mL para a fermentação com bagaço de cana, palha de milho e palha de trigo, respectivamente. Já para o bagaço de cana como substrato, os resultados de atividade foram de 0,647 U/mL, 0,670 U/mL e 0,509U/mL para a fermentação com bagaço de cana, palha de milho e palha de trigo, respectivamente. Observa-se também que os resultados de atividade enzimática apresentam-se ligeiramente mais altos quando se utiliza a palha de milho como fonte de carbono na fermentação para os três resíduos utilizados na hidrólise.

Observa-se que a palha de milho apresentou melhores resultados, tanto como fonte de carbono na fermentação como substrato na hidrólise enzimática, comparada aos outros resíduos. Este fato pode ter ocorrido devido ao tratamento alcalino realizado, o qual pode ter promovido maior disponibilidade de celulose neste resíduo. De acordo com Baudel (2006) e Rabelo (2007), os processos alcalinos tendem a promover maior dissolução da lignina e da hemicelulose, aumentando a

disponibilidade da celulose às enzimas. Pode ocorrer também a diminuição do grau de cristalinidade da celulose presente no material, enquanto ocorre um incremento da superfície específica de contato e da porosidade da mesma.

4.5. Efeito da temperatura na atividade enzimática

A Figura 22 apresenta o comportamento da atividade enzimática sob diferentes temperaturas durante a hidrólise enzimática (Tabela apresentada no anexo 9).

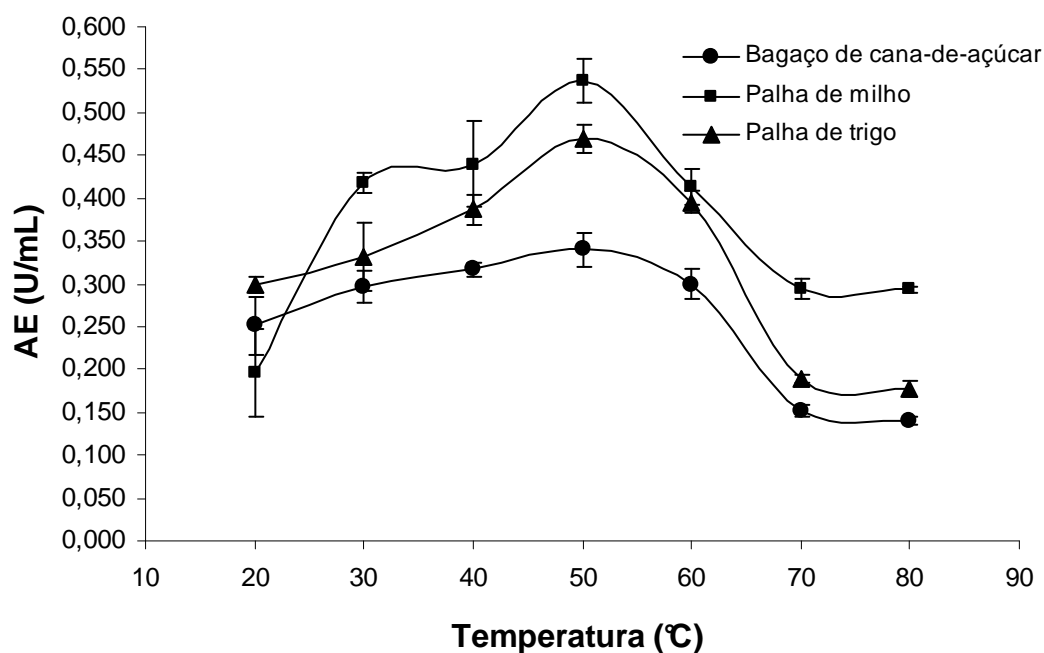


Figura 22. Efeito da temperatura na atividade enzimática para os três substratos de hidrólise a pH 4,8 e tempo de 50 min.

Observa-se com a Figura 22 um comportamento similar da atividade enzimática para os três resíduos, a qual aumenta gradativamente até a temperatura de 50°C, com 0,340 U/mL, 0,536 U/mL e 0,469 U/mL para bagaço de cana, palha de milho e palha de trigo, respectivamente, caindo drasticamente, nas temperaturas de 60 a 80°C. O aumento da atividade enzimática se deve a ativação pela temperatura (SHULER, 1992), na qual os átomos adquirem muita energia e grande tendência a se moverem. Após este período ocorre a desnaturação ou desativação térmica causada pelo rompimento das fracas interações que mantém unida a estrutura

globular da proteína (BAILEY & OLLIS, 1986). Portanto a temperatura ideal de trabalho do complexo celulásico é de 50°C, nas condições estudadas.

Krishna (2000), em estudos de produção e aplicação de celulases de *T. reesei* QM-9414, realizou sacarificação de resíduos lignocelulósicos e a temperatura ideal para a condução da hidrólise enzimática foi 50°C.

Pode-se observar também que os resultados de atividade enzimática foram superiores utilizando-se a palha de milho, seguidos dos resultados com a palha de trigo e com o bagaço de cana. O que pode ser justificado pelo tratamento alcalino realizado.

4.6. Efeito do pH na atividade enzimática

A Figura 23 apresenta o comportamento da atividade enzimática sob diferentes pHs de tampões utilizados na hidrólise enzimática (Tabela apresentada no anexo 10).

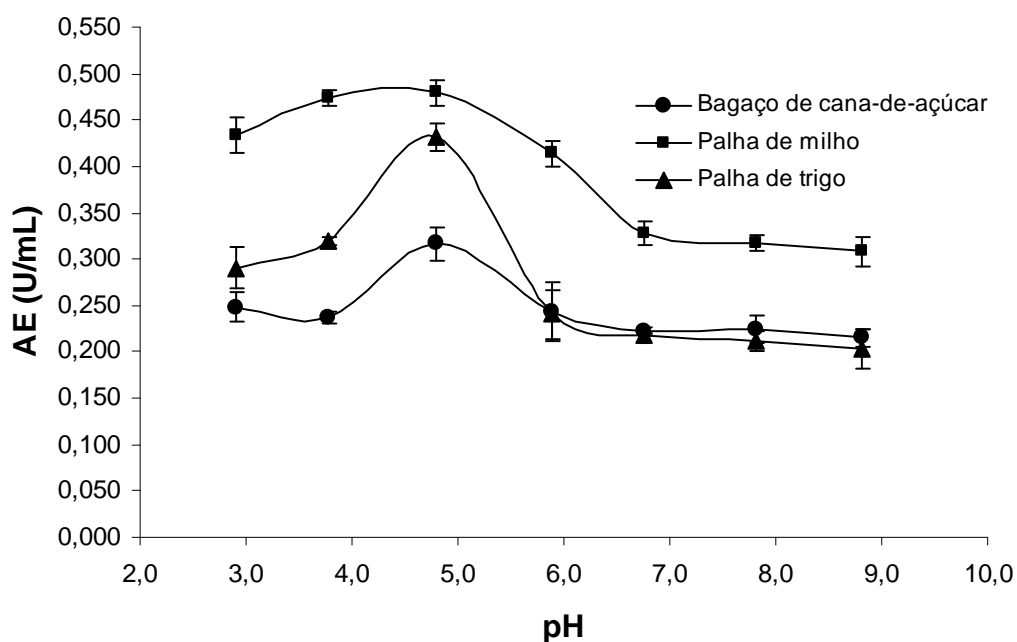


Figura 23. Efeito do pH na atividade enzimática para os três substratos de hidrólise a temperatura de 50°C e tempo de 50 min.

Observa-se na Figura 23 o mesmo comportamento da atividade enzimática para os três resíduos em diferentes pHs do meio. A atividade aumenta até o pH 4,8, com 0,317 U/mL, 0,480 U/mL e 0,432 U/mL para bagaço de cana, palha de milho e palha de trigo, respectivamente, caindo drasticamente, nos pHs 5,89 a 8,82.

Os grupos ionizáveis presentes na estrutura das enzimas fazem parte, geralmente, do sítio ativo. Assim, a enzima atua cataliticamente somente em um estado de ionização definido (BAILEY & OLLIS, 1986). Variações no pH do meio resultam em mudanças na forma iônica do sítio ativo e mudanças na atividade das enzimas. Mudanças no pH podem também alterar a forma tridimensional da enzima (SHULER, 1992). Portanto o pH ideal de trabalho do complexo celulásico é 4,8, nas condições estudadas.

Observa-se também que a palha de milho apresentou melhor resultado, seguida da palha de trigo e do bagaço de cana. O que pode ser justificado pelo tratamento alcalino realizado.

Singh (2009), em estudo de otimização das condições de sacarificação de palha de trigo com celulases produzidas por *Aspergillus heteromorphus*, obteve maiores resultados de ART a pH 5,0. Krishna (1997) realizou hidrólise de folhas de *Antigonum leptopus* e palha de cana-de-açúcar a pH 4.5. Chen et al. (2007) trabalhou com condições de pH 4,8 na hidrólise enzimática de sabugo de milho, obtendo 79% de rendimento.

4.7. Efeito do tempo de hidrólise na atividade enzimática

A Figura 24 apresenta o comportamento da atividade enzimática em diferentes tempos de hidrólise (Tabela apresentada no anexo 11).

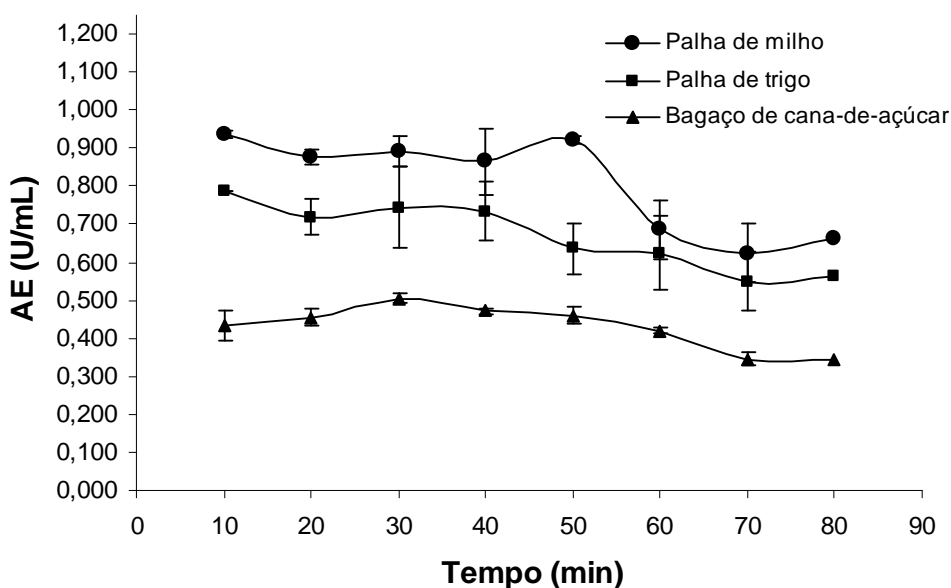


Figura 24. Efeito do tempo de hidrólise na atividade enzimática para os três substratos de hidrólise a pH 4,8 e temperatura de 50°C.

Conforme a Figura 24, os resultados de atividade para a palha de milho foram de 0,937 U/mL com 10 minutos, permanecendo constante até 50 minutos de hidrólise (0,923 U/mL). Com 60 minutos, a atividade caiu para 0,685 U/mL. Para a palha de trigo, os resultados foram de 0,788 U/mL com 10 minutos e 0,735 U/mL com 40 minutos, caindo ligeiramente para 0,636 U/mL após 50 minutos. Com 80 minutos de hidrólise a atividade foi de 0,561U/mL. Para o bagaço de cana, após 10 minutos, obteve-se 0,434 U/mL mantendo-se praticamente constante (0,420 U/mL) até 60 minutos de hidrólise. Já no tempo de 70 minutos, a atividade caiu para 0,346 U/mL.

Analisando-se os resultados obtidos, pode-se observar que os maiores valores de atividade enzimática não foram obtidos com o mesmo tempo de hidrólise para os três resíduos, havendo ligeira redução na atividade após 50 minutos para a palha de milho, após 40 minutos para a palha de trigo e após 60 minutos para o bagaço de cana. Este comportamento pode ter ocorrido devido ao complexo celulásico ser composto por três enzimas, as quais atuam de maneira sinérgica sobre o substrato. Este complexo deve-se apresentar estável durante a atividade celulolítica (RABELO, 2007). Portanto, qualquer alteração do meio reacional pode influenciar a atuação sinérgica do sistema, alterando a atividade de uma ou mais enzimas envolvidas.

A redução da atividade para a palha de trigo foi menos significativa no intervalo de tempo de 40 a 50 minutos (13,5%) do que para a palha de milho no intervalo de 50 a 60 minutos (26,9%) e, para o bagaço de cana, a atividade permaneceu praticamente constante no intervalo de 10 a 60 minutos. A redução após certo tempo de hidrólise pode ter ocorrido devido à desativação enzimática pelos fatores temperatura e/ou ausência de substrato no meio, como afirmam Bailey & Ollis (1986). Por outro lado, de acordo com Zhang (2006), tempos muito curtos de reação não são suficientes para a degradação tanto da fração amorfa como a fração cristalina da celulose. Desta forma, o tempo de hidrólise deve ser suficiente para garantir a degradação total da celulose sem que ocorra desativação enzimática. Portanto, baseando-se nos resultados obtidos, estipulou-se trabalhar com 50 minutos de hidrólise enzimática para os três resíduos.

O processo de hidrólise enzimática da celulose extrai do material celulósico açúcares redutores, incluindo a glicose (RABELO, 2007). A glicose oxidase

(E.C.1.1.3.4) é uma enzima intracelular que catalisa a oxidação da glicose. Assim, realizou-se determinações de ART do caldo utilizado no teste acima para verificar se a enzima glicose oxidase foi liberada durante o processo de extração do caldo enzimático.

Os resultados do teste da presença de glicose oxidase no caldo enzimático estão apresentados pela Figura 25 em termos de ART em função do tempo de hidrólise (Tabela apresentada no anexo 12).

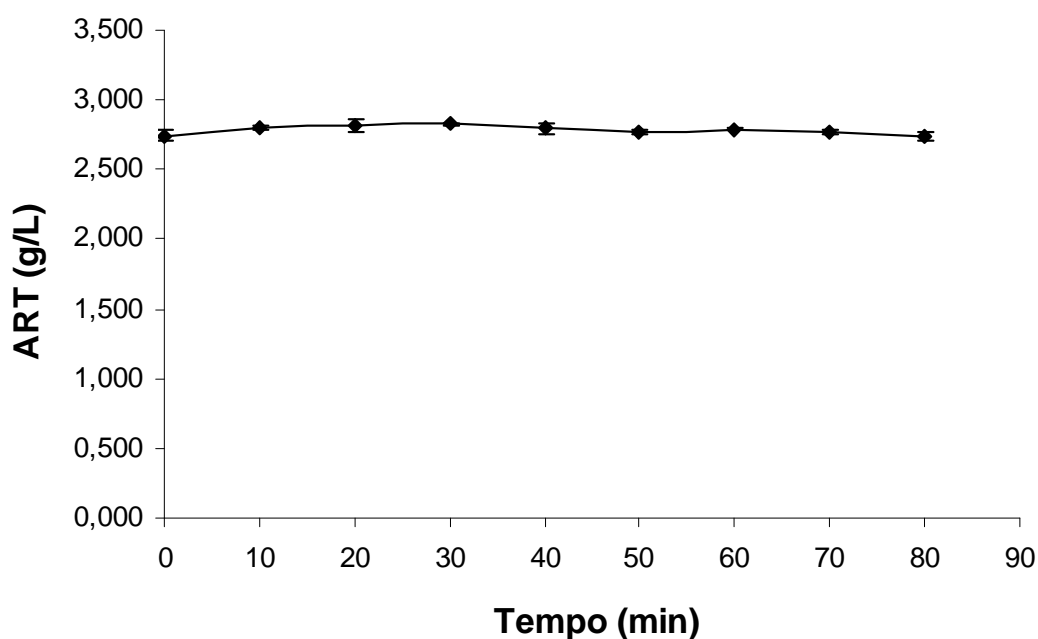


Figura 25. Variação dos ART do caldo enzimático em função do tempo a temperatura de 50°C e pH 4,8.

Pode-se observar, através da Figura 25, que os valores de ART do caldo mantiveram-se aproximadamente constantes ao longo do tempo, variando de 2,745 a 2,734 g/L. Isto sugere que a glicose presente no caldo não foi degradada pela enzima glicose oxidase, nas condições estudadas. Assim, pode-se afirmar que o rendimento da reação de hidrólise enzimática não será afetado pela degradação da glicose.

4.8. Efeito da quantidade de substrato na atividade enzimática

A Figura 26 apresenta o comportamento da atividade enzimática com a utilização de diferentes quantidades de substrato na hidrólise (Tabela apresentada no anexo 13). As quantidades de substrato estão expressas em fração mássica.

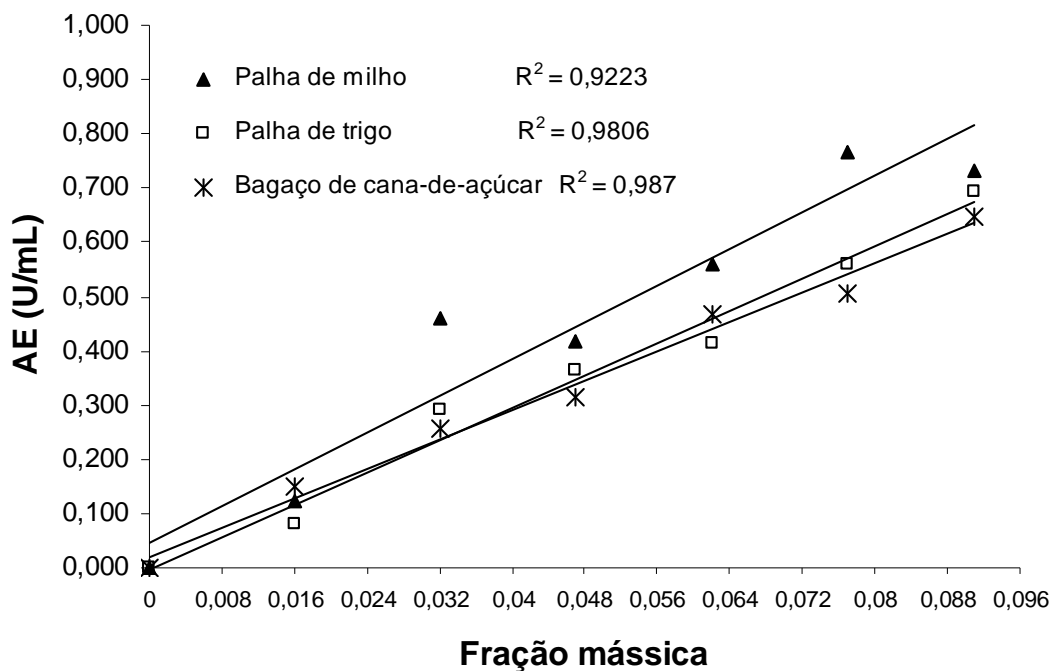


Figura 26. Efeito da quantidade de substrato na atividade enzimática para os três substratos de hidrólise a pH 4,8, temperatura de 50°C e tempo de 50 min.

Observa-se na Figura 26 que o comportamento da atividade enzimática é similar para os três substratos utilizados e que existe uma relação linear entre a atividade enzimática e a fração de substrato, na região estudada.

No entanto, através do teste de absorção realizado, verificou-se que os resíduos absorvem certa quantidade de líquido. Sendo assim, há uma limitação na quantidade de resíduo a ser utilizada na hidrólise. Os resultados da capacidade de absorção de água pelos resíduos estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 14. Capacidade de absorção dos resíduos

Substrato (tratados com NaOH 4%)	Capacidade de absorção de água pelos resíduos (vezes sua massa seca)
Bagaço de cana-de-açúcar	4,9
Palha de milho	5,5
Palha de trigo	7,0

Analisando-se os resultados obtidos, estipulou-se a utilização de 300mg de resíduo (fração mássica de 0,048), nas condições de hidrólise estudadas. Krishna (1997), em estudo de sacarificação de folhas de *Antigonum Leptopus* Linn e palha de cana tratadas com peróxido de hidrogênio, observou que um aumento de 5 para 25% na quantidade de substrato acarreta em uma redução no rendimento da hidrólise devido à dificuldades de agitação e inibição pelo produto final.

4.9. Efeito da diluição do caldo na atividade enzimática

A Figura 27 apresenta o comportamento da atividade enzimática em função dos diferentes volumes de caldo enzimático utilizados na hidrólise (Tabela apresentada no anexo 14). Assim, concentrações de enzima foram testadas diluindo-se o caldo de 0 a 6x. Para a diluição de 0x, por exemplo, utilizou-se 6mL de caldo enzimático pH corrigido para 4,8 e para a diluição de 6x utilizou-se 1mL do caldo pH 4,8 diluído em 5mL de tampão acetato de sódio pH 4,8.

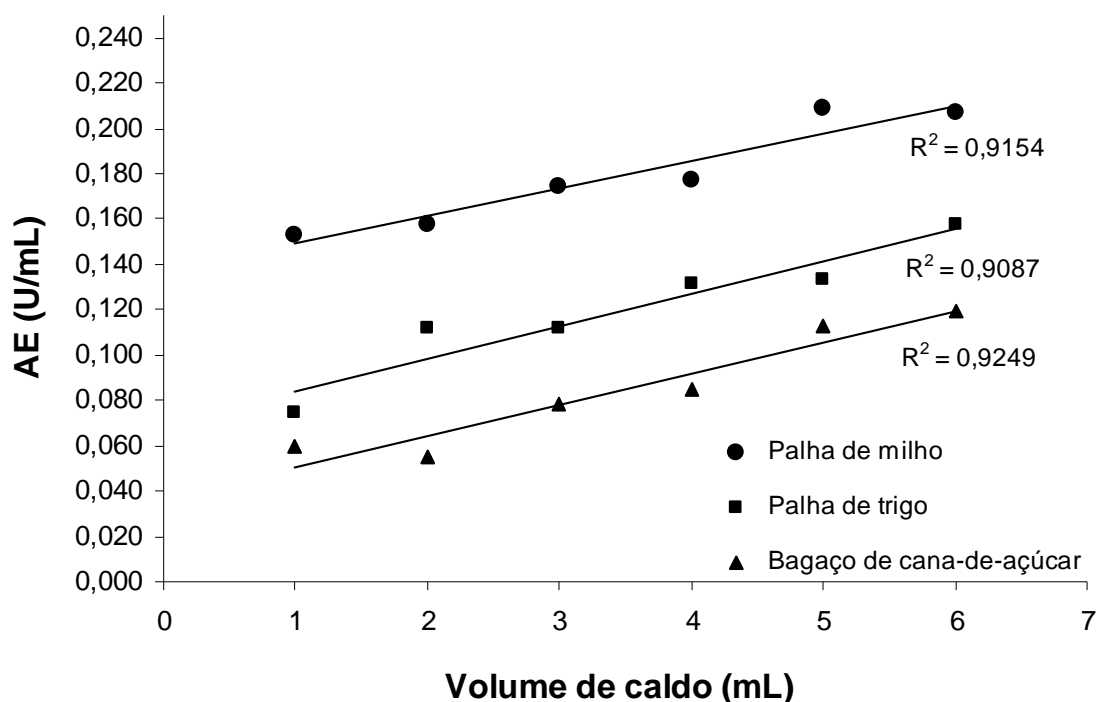


Figura 27. Efeito da diluição do caldo na atividade enzimática para os três substratos de hidrólise a temperatura de 50°C e tempo de 50 min.

Observa-se na Figura 27 que o comportamento da atividade enzimática é similar para os três substratos utilizados e que existe uma relação linear entre a atividade enzimática e a concentração de enzima, na região estudada. Os melhores

resultados foram obtidos com a utilização do caldo sem diluição com 0,207 U/mL para a palha de milho, 0,157 U/mL para a palha de trigo e 0,119 para o bagaço de cana.

4.10. Efeito do tipo de tratamento dos resíduos na atividade enzimática

A hidrólise enzimática foi realizada com resíduos não tratados e tratados com NaOH 4% e H₂O₂ 1%. Os resultados de atividade enzimática estão apresentados pela Figura 28 (Tabela apresentada no anexo 15).

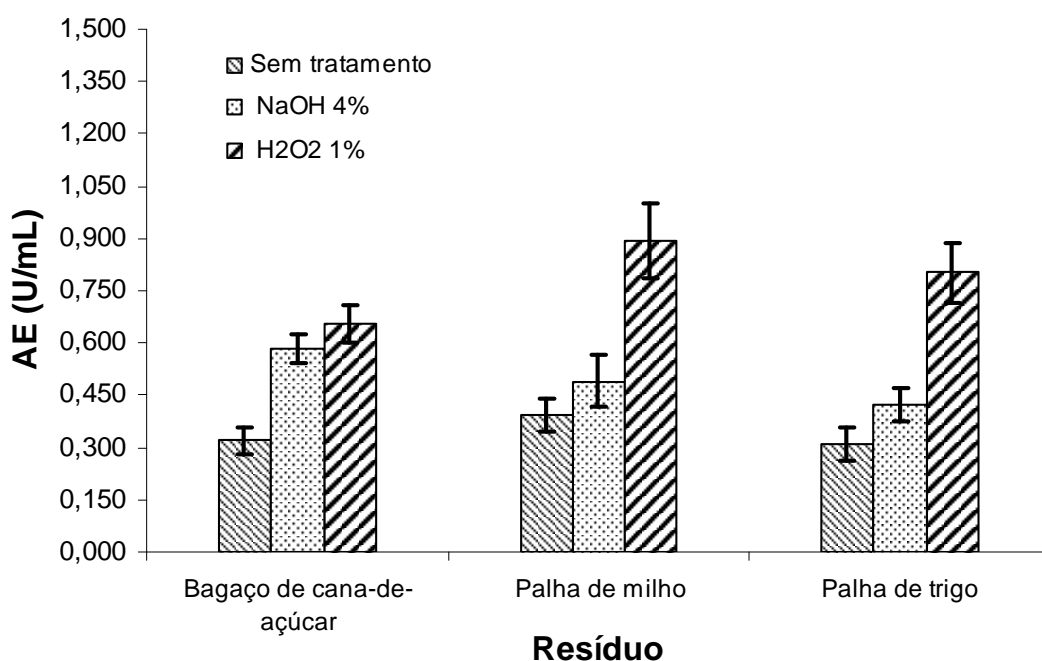


Figura 28. Efeito do tipo de tratamento dos resíduos na atividade enzimática.

Observa-se (Figura 28) maior atividade enzimática com a utilização dos resíduos submetidos aos dois tratamentos em relação aos resíduos não tratados. Triana et al. (1990), citados por FASANELLA (2008), afirmam que soluções alcalinas possuem a capacidade de extração de hemicelulose e lignina, provocando modificações na composição das fibras. Segundo Rabelo (2007), o pré-tratamento resulta na ampliação da área superficial interna das partículas do substrato, realizada através da solubilização e/ou pela degradação parcial da hemicelulose e da lignina. Isto conduz ao fracionamento dos três componentes e leva à abertura da estrutura da celulose. Portanto, um ou mais fatores citados podem ter sido responsáveis pelos melhores resultados de atividade após os pré-tratamentos.

Observa-se que os melhores resultados foram obtidos com os resíduos tratados com peróxido de hidrogênio 1%, obtendo-se 0,655 U/mL com o bagaço de cana, 0,892 U/mL com a palha de milho e 0,801 U/mL com a palha de trigo. Segundo Gupta (2008), os pré-tratamentos alcalinos oxidativos, como os que utilizam peróxido de hidrogênio, têm sido usados para dissolver os componentes da matriz lignocelulósica e acelerar a hidrólise enzimática. O peróxido de hidrogênio reage com a lignina sob certas condições.

Krishna (2000) realizou sacarificação de *Antigonum leptopus* e folhas de bananeira tratadas com solução de peróxido de hidrogênio 1% ajustada a pH 11,5 com NaOH, chegando à índices de sacarificação próximos de 100%.

Kim et al. (2001), citados por GUPTA (2008), utilizaram H₂O₂ com ácido sulfúrico, amônia e água para o tratamento de carvalho por processos de percolação, o que melhorou consideravelmente a hidrólise enzimática.

Os resultados de atividade enzimática foram analisados em conjunto com os resultados dos teores de lignina e celulose presentes nos resíduos antes e após os pré-tratamentos. A Tabela 15 apresenta os teores de lignina e celulose dos resíduos.

Tabela 15. Teores de lignina e celulose dos resíduos

Resíduo	Tipo de tratamento	Celulose (% de massa em base seca)	Lignina (% de massa em base seca)
Bagaço de cana	Sem tratamento	63,44±0,4	7,88±0,01
	Tratamento - NaOH 4%	71,22±0,5	4,46±0,01
	Tratamento - H ₂ O ₂ 1%	65,46±0,1	6,91±0,01
Palha de milho	Sem tratamento	40,26±0,3	7,68±0,02
	Tratamento - NaOH 4%	77,39±0,2	2,85±0,01
	Tratamento - H ₂ O ₂ 1%	66,70±1,7	8,77±0,02
Palha de trigo	Sem tratamento	44,88±2,4	10,28±0,04
	Tratamento - NaOH 4%	76,04±0,1	2,17±0,01
	Tratamento - H ₂ O ₂ 1%	70,48±0,8	3,91±0,01

Através da Tabela 15 verifica-se que os teores de celulose aumentaram e os teores de lignina foram reduzidos após os dois tratamentos, exceto para a palha de milho (tratamento com H_2O_2). Esta mudança na composição da maioria dos substratos ocorreu devido ao processo de tratamento, o qual promove a redução das frações hemicelulose e lignina (FASANELLA, 2008), aumentando o teor de celulose no substrato (AGUIAR & MENEZES, 2000).

Comparando-se os resultados dos teores de celulose e lignina para os dois tratamentos pode-se sugerir que o tratamento com NaOH foi mais afetivo na disponibilidade da celulose, já que o aumento do teor de celulose e a redução do teor de lignina foram mais significativos em todos os resíduos do que com o tratamento com H_2O_2 . Porém, os resultados de atividade enzimática (Figura 28) mostram que o tratamento com H_2O_2 foi mais eficiente para condução da hidrólise enzimática.

Sabe-se, segundo Rabelo (2007) e Gupta (2008), que o tratamento alcalino oxidativo atua, principalmente sobre a estrutura da lignina, solubilizando-a, acarretando na liberação da celulose para posterior ataque enzimático. O pH durante o pré-tratamento é um fator muito importante, sendo que maiores rendimentos na redução da lignina são obtidos com pHs maiores que 10. Observou-se no presente trabalho que os valores de pH das soluções durante os pré-tratamentos foram de 11,5 para solução com H_2O_2 , conforme procedimento, e de 12 a 12,5 para solução de NaOH. Considerando estes fatos pode-se afirmar que os teores mais baixos de lignina após o tratamento com NaOH podem ter ocorrido devido ao pH da solução.

Outro fator importante em relação ao tratamento com NaOH é o uso de vapor durante o tratamento. Conforme Fasanella (2008) a utilização do pré-tratamento com álcali em autoclave a $121^\circ C$ é realizado para simular o pré-tratamento a vapor, fazendo com que a modificação estruturas da fibra celulósica aumente e o álcali possa agir na fibra de lignina justificando, assim, os menores teores de lignina aqui obtidos.

Quanto ao tratamento com H_2O_2 pode ter ocorrido menor ação sobre a lignina e a hemicelulose da fibra e uma maior ação sobre a estrutura da celulose. Alguns fatores podem ser citados como responsáveis pelos melhores resultados de atividade enzimática para os resíduos tratados com H_2O_2 , como: redução do índice

de cristalinidade e do grau de polimerização e aumento da área superficial da celulose. Assim, um ou mais fatores juntamente com redução razoável do teor de lignina (exceto palha de milho) e a presença de hemicelulose no substrato podem ter proporcionado melhores resultados de atividade enzimática.

Apesar de resultados conflitantes em estudos relacionados ao índice de cristalinidade, citados por Zhang & Lynd (2004), alguns autores afirmam que o índice de cristalinidade é um fator importantíssimo na elevação do rendimento da hidrólise enzimática. Para Gómez (1985), os pré-tratamentos alcalinos rompem a estrutura cristalina da celulose, abrindo a estrutura para a ação das enzimas. Segundo Rabelo (2007), o pré-tratamento resulta na ampliação da área superficial interna das partículas do substrato, conduzindo fracionamento dos três componentes e levando à abertura da estrutura da celulose. Pitarelo (2007) afirma que o álcali tende a reduzir o índice de cristalinidade da cadeia de celulose. Como a solução de peróxido de hidrogênio foi ajustada a pH 11,5, pode ter atuado eficientemente sobre a cristalinidade da celulose.

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

Em relação ao aumento da área superficial dos resíduos tratados com H_2O_2 , Gupta (2008) afirma que o tratamento alcalino além da remoção da lignina e da hemicelulose, aumenta a área superficial da celulose. De acordo com Pitarelo (2007) a celulose amorfa, devido à sua maior área superficial, é mais suscetível à hidrólise enzimática, o que pode ter ocorrido neste caso, já que o índice de cristalinidade aparentemente diminuiu. Fasanella (2008) verificou que o bagaço de cana tratado com solução de NaOH 4% causou poucas mudanças na área superficial e na quebra das fibras.

O tratamento com H_2O_2 pode ter extraído uma fração menor de hemiceluloses do que o tratamento com NaOH. Gómez (1985) reporta melhores rendimentos de hidrólise em frações de bagaço de cana-de-açúcar com maiores teores de lignina, mas com altos teores de hemicelulose. Ferreira et al. (2006), citados por FASANELLA (2008), afirmam que o tratamento com hidróxido de sódio retira parcialmente a lignina e solubiliza a hemicelulose. Conforme Gupta (2008), durante

o pré-tratamento com NaOH, a degradação de carboidratos é um grande problema que afeta o rendimento da hidrólise enzimática.

Outro fator que pode ter contribuído com os resultados de atividade enzimática é presença de compostos fenólicos nos substratos tratados com NaOH. O tratamento pode ter solubilizado partes da estrutura da lignina, além de romper ligações lignina-carboidrato (FASANELLA, 2008; GUPTA, 2008). Desta forma tais compostos podem ter permanecido em pequena quantidade após a lavagem dos resíduos.

Para a palha de milho tratada com H_2O_2 , apesar do aumento do teor de celulose, não houve redução do teor de lignina, o qual também aumentou em relação ao substrato não tratado, de 7,68% para 8,77%. Neste caso, além da solubilização de parte da lignina, a qual foi responsável pelo aumento do teor de celulose, pode ter ocorrido apenas a cisão das ligações lignina-carboidrato de certa fração do substrato, aumentando o percentual de lignina (BAUDEL, 2006).

Pode-se observar que a palha de milho tratada com H_2O_2 apresentou os melhores de atividade enzimática, mesmo apresentando teores de celulose menores do que com o tratamento com NaOH e com o teor de lignina elevado com relação ao resíduo não tratado. Os valores de atividade foram de 0,394 U/mL para a palha não tratada, 0,490 U/mL para palha tratada com NaOH e 0,892 U/mL para a tratada com H_2O_2 . Isto pode ser justificado pelas prováveis modificações da estrutura da celulose citadas anteriormente. Pietrobon (2008), em estudo com bagaço de cana-de-açúcar tratado com álcali, afirma que apesar de não ter ocorrido redução no teor de lignina o pré-tratamento é necessário, pois, além de facilitar o acesso das enzimas às fibras de celulose, promove modificações na cristalinidade das mesmas. A lignina não precisa ser completamente removida para aumentar a digestibilidade da celulose, já que apresenta maior efeito negativo quando está “blindando” as microfibrilas da mesma (EPOBIO, 2006).

Para efeito de comparação, após tratamento de bagaço de cana com NaOH 4% a 121°C por 30 minutos, Aguiar & Menezes (2000) obtiveram resultados de lignina reduzidos de 24,5% para 10,7%. O teor de celulose aumentou de 37% para 60,5%. No presente trabalho, o bagaço teve seu teor de celulose aumentado de 63,44% para 71,22%. A lignina reduziu de 7,88% para 4,46%.

Fasanella (2008) realizou tratamento de bagaço de cana com NaOH 4% a temperatura de 121°C por 20 minutos com posterior incubação do material por 12 horas, obtendo-se redução do teor de lignina do bagaço de 10,44% para 8,26% e redução do teor de celulose de 54,55% para 48,57%.

Pietrobon (2008) utilizou o bagaço de cana tratado com Ca(OH)₂ 3% e obteve elevação do teor de celulose de 54,55% para 62,38% e redução não significativa no teor de lignina, o qual foi de 10,44% para 9,96%.

Segundo Azzam (1989), aproximadamente 50% da lignina e a maior parte da hemicelulose contida no bagaço de cana foram solubilizadas utilizando uma concentração de 2% de peróxido de hidrogênio alcalino a 30°C em 8 horas. O conteúdo de celulose foi conseqüentemente aumentado de 42% do bagaço não tratado para 75% após o processo de oxidação.

Rabelo (2007), em estudo de pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar, realizou tratamento de bagaço de cana peneirado com solução alcalina de H₂O₂ 7,35% a 25°C por 1 hora, obtendo aumento no teor de celulose de 39,6% para 77,6% e redução no teor de lignina de 25,8% para 7,0%. No presente trabalho o tratamento do bagaço de cana com H₂O₂ 1% a temperatura ambiente por 16 horas proporcionou aumento do teor de celulose de 63,44% para 65,46% e redução no teor de lignina de 7,88% a 6,91%.

Krishna et al. (1998), citados por RABELO (2007), analisaram três tipos de pré-tratamento para o bagaço de cana-de-açúcar: autoclavagem por 20 min a 15 psi, tratamento alcalino (NaOH 1%) e peróxido de hidrogênio alcalino (H₂O₂ + NaOH, 1%). A hidrólise enzimática do bagaço após pré-tratamento com o peróxido de hidrogênio alcalino mostrou-se superior em relação ao bagaço pré-tratado por autoclavagem e com o hidróxido de sódio.

Gould (1984), citado por RABELO (2007), afirmou que aproximadamente metade da lignina e grande parte da hemicelulose presentes em resíduos agrícolas como palha de trigo e resíduos da colheita de milho foram solubilizados quando tratados a 25°C com uma solução alcalina de 1% (w/v) de peróxido de hidrogênio, com o pH ajustado para 11,5, por 18 a 24 horas. Os teores de lignina no presente trabalho, para a palha de trigo, reduziram de 10,28% para 3,91% e, para a palha de milho, aumentaram de 7,68% para 8,77%. A redução do teor de lignina para a palha

de trigo encontra-se próxima à encontrada na literatura. Já para a palha de milho não ocorreu o mesmo devido aos possíveis fatores citados anteriormente.

4.11. Efeito de hidrólises enzimáticas sucessivas dos resíduos na atividade enzimática

Os resíduos tratados com H₂O₂ 1% utilizados no teste anterior foram submetidos a mais três processos de hidrólise enzimática, totalizando quatro processos. O objetivo foi verificar a disponibilidade da celulose nos substrato residual. Os resultados de atividade enzimática em função do número de hidrólises estão apresentados pela Figura 29 (Tabela apresentada no anexo 16).

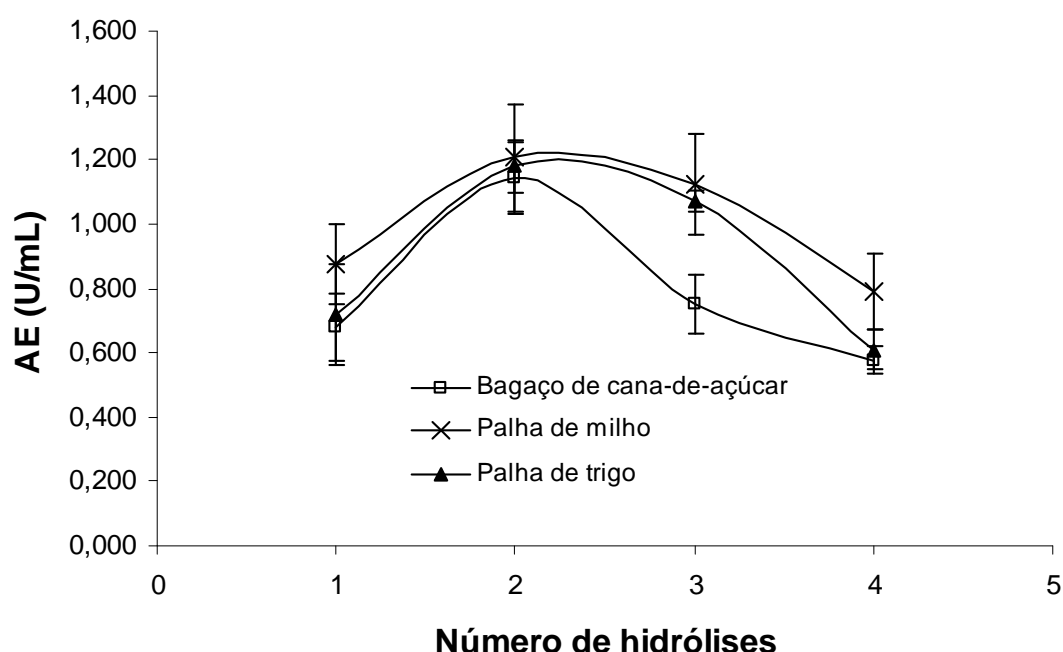


Figura 29. Efeito de hidrólises sucessivas dos resíduos tratados com H₂O₂ na atividade enzimática a pH 4,8, temperatura de 50°C e tempo de 50 min.

Pode-se observar na Figura 29 que os resultados de atividade enzimática aumentaram consideravelmente do primeiro processo de hidrólise para o segundo, indo de 0,680 U/mL para 1,145 U/mL para o bagaço de cana, de 0,877 U/mL para 1,207 para a palha de milho e de 0,717 U/mL para 1,181 U/mL para a palha de trigo. Observa-se também que a atividade reduziu no terceiro processo, mas manteve-se, ainda, ligeiramente mais alta do que no primeiro processo, com 0,750 U/mL para o bagaço de cana, 1,125 U/mL para a palha de milho e 1,073 U/mL para a palha de

trigo. No quarto processo as atividades foram de 0,576 U/mL para o bagaço, 0,790 U/mL para a palha de milho e 0,610 U/mL para a palha de trigo.

A partir dos resultados obtidos verifica-se que a disponibilidade da celulose nos resíduos aumenta após alguns processos de hidrólise. Portanto, pode-se afirmar que os resíduos tratados com H_2O_2 podem sofrer quatro processos de hidrólise sucessivos, nas condições estudadas, já que as atividades enzimáticas no quarto processo não reduziram drasticamente.

4.12. Comparação entre atividades enzimáticas

O objetivo dos ensaios foi comparar a atividade enzimática em papel filtro (padrão) e a atividade enzimática utilizando os três resíduos tratados com NaOH como substratos da hidrólise. Os resultados de atividade enzimática em função do tipo de substrato estudado estão apresentados pela Figura 30 (Tabela apresentada no anexo 17).

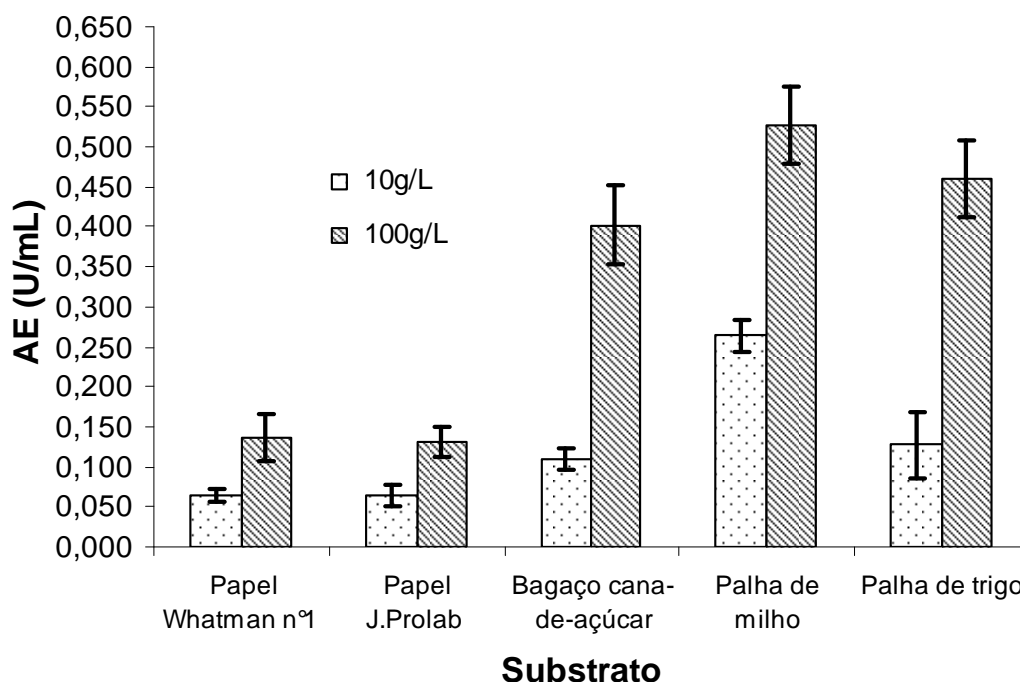


Figura 30. Atividade enzimática com papel filtro e resíduos lignocelulósicos tratados com NaOH como substratos de hidrólise. pH 4,8, temperatura de 50°C e tempo de 50 min. (resíduos lignocelulósicos) e 60 min. (papéis filtro).

Através da Figura 30 observa-se que os melhores resultados de atividade enzimática foram obtidos quando se utiliza na fermentação 100g de milho pré-

tratado com NaOH por litro de meio. Fato que também ocorreu com o bagaço de cana, nas mesmas condições, durante o estudo da cinética da fermentação. As atividades foram de 0,136 U/mL para o papel Whatman nº1, 0,131 U/mL para o papel J. Prolab, 0,403 U/mL para o bagaço de cana, 0,527 U/mL para a palha de milho e 0,460 U/mL para a palha de trigo.

Observa-se ainda melhores resultados de atividade enzimática quando utilizados resíduos lignocelulósicos pré-tratados do que os papéis filtro das marcas J. Prolab e Whatman. Fato citado por Ja'afaru (2007) em estudo de produção de celulases e hidrólise enzimática de resíduos lignocelulósicos utilizando *A. niger*, no qual resíduos lignocelulósicos como sabugo de milho, serragem e casca de amendoim pré-tratados com NaOH 0,25M a vapor, apresentaram melhores rendimentos na sacarificação do que o papel filtro.

Em paralelo obteve-se resultados de atividade das enzimas endoglucanases com 0,134 U_{CMC}/mL para 10g/L e 0,338 U_{CMC}/mL para 100g/L.

Aguiar & Menezes (2000) produziram enzimas celulases através de bagaço de cana tratado com NaOH 4%, obtendo atividade endoglucanásica de aproximadamente 0,26 U_{CMC}/mL. Dedavid e Silva & Brandelli (2007), em estudos de cultivo e seleção de fungos filamentosos para produção de celulases, obtiveram atividade endoglucanásica de aproximadamente 0,31 U_{CMC}/mL em papel filtro após 72 h de fermentação com *Aspergillus phoenics*.

5. CONCLUSÕES

- O *Aspergillus niger* produz celulases quando cultivado em meio com resíduos lignocelulósicos pré-tratados como bagaço de cana-de-açúcar, palha de milho e palha de trigo como principal fonte de carbono;
- O tempo ideal para coleta do caldo enzimático, com produtividade máxima, utilizando 100g/L de bagaço de cana pré-tratado (NaOH) como fonte de carbono foi de, aproximadamente, 7 dias;
- Foi possível avaliar a influência do pH, da temperatura, do tempo, da fração de substrato e da diluição do caldo na hidrólise enzimática. O pH ideal para se conduzir a hidrólise dos resíduos lignocelulósicos é 4,8 na temperatura de 50°C por 50 min. A fração de substrato e a concentração das enzimas afetam linearmente a atividade enzimática;
- Os pré-tratamentos foram eficientes proporcionando melhores resultados de atividade enzimática para os três resíduos. Os melhores resultados foram obtidos com os resíduos tratados com H₂O₂ 1%;
- Os resíduos tratados com H₂O₂ podem sofrer quatro processos de hidrólise sucessivos, nas condições estudadas;
- O complexo celulásico não sofre desativação se armazenado a temperatura de -18°C por 43 dias, mas perde sua atividade em 30% a pós 24 h e em 43% após 48 h se armazenado a 4°C, nas condições estudadas;
- A palha de milho apresentou melhores resultados, tanto como fonte de carbono na fermentação quanto como substrato na hidrólise enzimática;
- Os resultados de atividade enzimática foram melhores utilizando-se os resíduos lignocelulósicos pré-tratados com NaOH do que papéis filtro das marcas J. Prolab e Whatman, nas condições estudadas;
- Os resíduos lignocelulósicos estudados apresentam potencial para obtenção de bioprodutos.

6. SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS

Os itens abaixo são sugeridos para a complementação deste trabalho:

- Analisar a fermentação bem como a hidrólise enzimática utilizando outros tipos de pré-tratamentos dos resíduos;
- Realizar determinações de hemicelulose, grau de polimerização e índice de cristalinidade dos resíduos antes e após os pré-tratamentos;
- Estudar métodos de recuperação da lignina e da hemicelulose solubilizadas durante os pré-tratamentos;
- Analisar a produção de celulases em fermentação submersa utilizando diferentes fungos;
- Analisar diferentes meios (condições nutricionais) nos ensaios de fermentação;
- Analisar o efeito do pH inicial do meio de fermentação na produção de celulases;
- Analisar a hidrólise enzimática bem como a fermentação utilizando a palha da cana-de-açúcar como substrato;
- Utilizar planejamento experimental para avaliar estatisticamente como as diversas variáveis se inter-relacionam;
- Realizar determinações da atividade enzimática das endoglucanases, exoglucanases e das β -glucosidases, além da atividade total;
- Avaliar o efeito da força iônica do tampão utilizado durante o processo de hidrólise enzimática;
- Utilizar meio de cultura tamponado na produção das celulases;
- Comparar a atividade enzimática das celulases produzidas com a atividade de enzimas comerciais;
- Avaliar condições de hidrólise e fermentação simultâneas para produção de etanol.

7. REFERÊNCIAS

ABIMILHO - **Associação Brasileira das Indústrias do Milho**, 2006. Disponível em: <<http://www.abimilho.com.br/>>. Acessado em 12 ago. 2009.

ABITRIGO - **Associação Brasileira da Indústria do Trigo**, 2005. Disponível em: <<http://www.abitrigo.com.br/trigo.asp>>. Acessado em 12 ago. 2009.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Regulamento técnico sobre o uso de enzimas e preparações enzimáticas na produção de alimentos destinados ao consumo humano**. Consulta Pública nº 93, de 21 de dezembro de 2005. D.O.U de 22/12/2005. Disponível em: <<http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP%5B13128-1-0%5D.PDF>>. Acessado em 15 ago. 2009.

AGUIAR, C. L. **Biodegradation of the cellulose from sugarcane bagasse by fungal cellulase**. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, v. 3 (002), p. 117-121, 2001. Disponível em: <<http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf/724/72430107.pdf>>. Acessado em 11 jun. 2009.

AGUIAR, C. L.; MENEZES, T. J. B. **Produção de celulasas e xilanases por *Aspergillus niger* IZ-9 usando fermentação submersa sobre bagaço de cana-de-açúcar**. *B. CEPPA*, v. 18, n.1, p. 57-70, jan/jun 2000. Disponível em: <<http://ojs.c3sl.ufpr.br/ojs2/index.php/alimentos/article/view/1125>>. Acessado em 25 jun. 2009.

AKHTAR, M. S.; SALEEM, M.; AKHTAR, M. W. **Saccharification of Lignocellulosic Materials by the Cellulases of *Bacillus subtilis***. *International Journal of Agriculture & Biology*, v. 3 (2), 2001. Disponível em: <http://www.fspublishers.org/ijab/past-issues/IJABVOL_3_NO_2/14.pdf>. Acessado em 20 ago. 2009.

- AZZAM, A. M. **Pretreatment of cane bagasse with alkaline hydrogen peroxide for enzymatic hydrolysis of cellulose and ethanol fermentation.** Journal of Environmental Science and Health. B. 24 (4), p. 421–433, 1989.
- BAIG, M. M. V.; BAIG, M. L. B.; BAIG, M. I. A.; YASMEEN, M. **Saccharification of banana agro-waste by cellulolytic enzymes.** African Journal of Biotechnology, v. 3 (9), p. 447-450, 2004. Disponível em: <<http://www.academicjournals.org/AJB/PDF/Pdf2004/Sep/Baig%20et%20al.pdf>>. Acessado em 05 jul. 2009.
- BAILEY, J. M.; OLLIS, D. F. **Biochemical Engineering Fundamentals.** Mc Graw-Hill Intl Editions, 2 Ed., 1986, 928 p.
- BAUDEL, H. M. **III Workshop Tecnológico sobre: Hidrólise para Produção de Etanol (Pré-Tratamento e Hidrólise).** 2006. Disponível em: <<http://www.inovacao.unicamp.br/etanol/report/Hidrolise%20Baudel%20Pr%E9%20Tratamento%20e%20Hidr%F3lise.pdf>>. Acessado em 16 jul. 2009.
- BORZANI, W., SCHIMIDELL W., LIMA U. A., AQUARONE E.; **Biotechnologia Industrial – Engenharia Bioquímica.** São Paulo: v. 2, Ed. Edgard Blucher, 2001.
- BUCKERIDGE, M. S.; SANTOS, W. D.; SOUZA, A. P. **As rotas para o etanol celulósico no Brasil.** Departamento de Botânica – IBUSP, 2008. Disponível em: <<http://www.apta.sp.gov.br/cana/coletanea/Buckeridge%5B1%5D.doc>>. Acessado em 16 ago. 2009.
- CAMPBELL, M. K. **Bioquímica.** Porto Alegre: 3 ed., Artmed Editora, 2000. 751 p.
- CANILHA, L.; CARVALHO, W.; ROCHA, G. J. M.; ALMEIDA E SILVA, J. B.; GIULIETTI, M. **Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar *in natura*, extraído com etanol ou ciclohexano/etanol.** In: 47º Congresso Brasileiro de Química - CBQ, 2007. Disponível em:

<<http://www.abq.org.br/cbq/2007/trabalhos/11/11-570-713.htm>>. Acessado em 20 jul. 2009.

CHAHAL, D. S. **Solid-State Fermentation with Trichoderma reesei for Cellulase Production.** Applied and Environmental Microbiology, p. 205-210, 1985. Disponível em: <<http://aem.asm.org/cgi/reprint/49/1/205>>. Acessado em 20 maio 2009.

CHAPLIN, M. **Sources of enzymes**, 2004. Faculty of Engineering, Science and the Built Environment. Disponível em: <<http://www1.lsbu.ac.uk/biology/enztech/sources.html>>. Acessado em 10 ago. 2009.

CHEN, M.; XIA, L.; XUE, P. **Enzymatic hydrolysis of corncob and ethanol production from cellulosic hydrolysate.** International Biodeterioration & Biodegradation, 59, p. 85–89, 2007. Disponível em: <<http://www.sc.mahidol.ac.th/scbt/seminar/2007seminar691/article53.pdf>>. Acessado em 15 jul. 2009.

CIB - Conselho de Informações sobre Biotecnologia. **Enzimas: ferramentas indispensáveis num mundo vivo.** Disponível em: <<http://www.cib.org.br/pdf/fbci12port.pdf>>. Acessado em 10 ago. 2009.

DEDAVID E SILVA, L. A.; BRANDELLI, A. **Cultivo e Seleção de Fungos Filamentosos para a Produção de Celulases.** In: XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos – SINAFERM, 2007, Curitiba-PR. Anais do XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos. Curitiba, 2007.

EMBRAPA - **Milho e sorgo**, 2009. Disponível em: <<http://www.cnpms.embrapa.br/unidade/unidade.html>>. Acessado em 19 ago. 2009.

EPOBIO, Wageningen International Conference Centre. **1st EPOBIO Workshop: Products from Plants - the Biorefinery Future**. 2006. Disponível em: <http://epobio.net/workshop0605/0605ws_finalreport_v3.pdf>. Acessado em 15 jun. 2009.

FASANELLA, C. C. **Ação das enzimas ligninolíticas produzidas por *Aspergillus niger* e *Penicillium sp.* em bagaço de cana-de-açúcar tratado quimicamente**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), Universidade de São Paulo, 2008. Dissertação (Mestrado). Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11138/tde-10022009-082433/>>. Acessado em 20 ago. 2009.

FURIGO Jr., A. **Enzimas e suas aplicações: Cinética enzimática**. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2001. Disponível em: <http://www.enq.ufsc.br/labs/probio/disc_eng_bioq/lista_exerc/cinetica_enzimatic_a.pdf>. Acessado em 19 jun. 2009.

GHOSE, T. K. **Measurement of cellulase activities**. In: Pure and Applied Chemistry, v. 59, p. 257-268, 1987. Disponível em: <<http://www.scribd.com/doc/16574469/Measure-of-Cellulase-Activity>>. Acessado em 20 ago. 2009.

GOMEZ, R. J. H. C. **Sacarificação da hemicelulose do bagaço de cana de açúcar e sua fermentação por *Pachysolen tannophilus***. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola, Universidade Estadual de Campinas, 1985. Tese (doutorado). Disponível em: <http://www.fea.unicamp.br/alimentarium/ver_documento.php?did=675>. Acessado em 01 jun. 2009.

GUPTA, R. **Alkaline pretreatment of biomass for ethanol production and understanding the factors influencing the cellulose hydrolysis**. Alabama: Auburn University, 2008. Dissertação (Doutorado). Disponível em: <<http://etd.auburn.edu/etd/handle/10415/1034>>. Acessado em 17 ago. 2009.

HARAGUCHI, L. H. **Aplicação das reações hidrotérmicas na produção de fonte de carbono biodegradável para remoção biológica de fosfato**. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas. Dissertação (mestrado). Disponível em: <<http://libdigi.unicamp.br/document/?code=vtls000349744>>. Acessado em 20 ago. 2009.

JA'AFARU, M. I.; FAGADE, O. E. **Cellulase Production and Enzymatic Hydrolysis of Some Selected Local Lignocellulosic Substrates by a Strain of *Aspergillus niger***. Research Journal of Biological Sciences, 2(1), p.13-16, 2007. Disponível em: <<http://medwelljournals.com/fulltext/rjbs/2007/13-16.pdf>>. Acessado em 06 ago. 2009.

KAAIJ, R. M. V. D. **Alpha-glucan acting enzymes in *Aspergillus niger*: Diversity in enzymatic activities and functions**. University of Groningen, 2007. Dissertação (mestrado). Disponível em: <<http://dissertations.ub.rug.nl/faculties/science/2007/r.v.d.kaaij/>>. Acessado em 15 ago. 2009.

KERSTETTER, J. D.; LYONS, J. K. **Wheat Straw for Ethanol Production in Washington: A Resource, Technical, and Economic Assessment**. Washington State University Cooperative, 2001. Disponível em: <<http://www.energy.wsu.edu/documents/renewables/WheatstrawForEthanol.pdf>>. Acessado em 16 jun. 2009.

KIELING, D. D. **Enzimas: Aspectos gerais**. Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos. Florianópolis, 2002. Disponível em: <http://www.enq.ufsc.br/labs/probio/disc_eng_bioq/lista_exerc/enzimas_aspectos_gerais.pdf>. Acessado em 08 jun. 2009.

KRISHNA S. H.; PRABHAKAR, Y.; RAO, R. J. **Saccharification studies of lignocellulosic biomass from *Antigonium leptopus* Linn.** Indian Journal of Pharmaceutical Sciences, 59 (1), p. 39-42, 1997.

- KRISHNA S. H.; RAO, K. C. S.; BABU, J. S.; REDDY, D. S. **Studies on the production and application of cellulose from *Trichoderma reesei* QM-9414.** Bioprocess Engineering, 22, p. 467-470, 2000.
- LEMOS, J. L. S. **Seleção de microrganismo para produção de xilanases em bagaço de cana-de-açúcar.** In: Série Tecnologia Ambiental - CETEM/MCT. Rio de Janeiro, 2006. Disponível em: <http://www.cetem.gov.br/publicacao/cetem_sta_35.pdf>. Acessado em 15 ago. 2009.
- LEONEL, M.; CEREDA, M. P. **Manipueira como substrato na biossíntese de ácido cítrico por *Aspergillus niger*.** Scientia Agricola, 52(2), p. 299-304, 1995. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/sa/v52n2/16.pdf>>. Acessado em 03 ago. 2009.
- LIMA, A. O. S.; RODRIGUES, A. L. **Sacarificação de resíduos celulósicos com bactérias recombinantes como estratégia para redução do efeito estufa.** Revista de ciências ambientais, v.1 (2), p. 5-18, 2007. Disponível em: <http://www.cca.ufscar.br/lamam/disciplinas_arquivos/res/etanol_celulose_bacterias_recombinantes.pdf>. Acessado em 11 jun. 2009.
- LOBATO, A. K. C. L.; ARAÚJO, M. M. S., MACEDO, G. R. **Acompanhamento do crescimento da biomassa e síntese de biossurfactantes por microrganismos isolados de poços de petróleo.** In: 2º Congresso Nacional de P&D em Petróleo e Gás, 2003, Rio de Janeiro - RJ. Disponível em: <<http://www.portalabpg.org.br/PDPetro/2/6075.pdf>>. Acessado em 10 jul. 2009.
- LYND L. R.; ZHANG Y. H. **Quantitative determination of cellulase concentration as distinct from cell concentration in studies of microbial cellulose utilization: Analytical framework and methodological approach.** Biotechnology and Bioengineering 77: p. 467-475, 2002.

- MANDELS, M., WEBER, J. **The production of cellulases**. Advances in Chemistry Series, v. 95, p. 391-414, 1969.
- MANZANO, R. P.; FUKUSHIMA, R. S.; GOMES, J. D. F.; GARIPPO, G. **Digestibilidade do Bagaço de Cana-de-açúcar Tratado com Reagentes Químicos e Pressão de Vapor**. Revista Brasileira de Zootecnia, v. 29(4), p.1196-1204, 2000. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbz/v29n4/5637.pdf>>. Acessado em 03 jul. 2009.
- MARCONCINI, J. M.; ITO, E. N.; PAES, M. C. D.; TEIXEIRA, F. F.; MATTOSO, L. H. C. **Metodologia de Caracterização Morfológica de Palha de Milho Baseada em Microscopia Ótica e Eletrônica**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária: Embrapa Instrumentação Agropecuária. São Carlos, 2008. Disponível em: <http://www.cnpdia.embrapa.br/publicacoes/download.php?file=DOC39_2008.pdf>. Acessado em 21 ago. 2009.
- MARTINS, L. F. **Caracterização do complexo celulásico de *Penicillium echinulatum***. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2005. Dissertação (Mestrado). Disponível em: <<http://hdl.handle.net/1884/8807>>. Acessado em 15 ago. 2009.
- MENOSSE, M. **Álcool de celulose**. Revista FAPESP, Edição Impressa 133, 2007. Disponível em: <<http://www.biotechbrasil.bio.br/2007/04/03/alcool-de-celulose/>>. Acessado em 11 jul. 2009.
- MILLER, G. L. **Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar**. In: Analytical Chemistry. v. 31, n.3, p. 426-428, 1959.
- MÖLLER, R.; TOONEN, M.; BEILEN, J.; SALENTIJN, E.; CLAYTON, D. **Crop platforms for cell wall biorefining: Lignocellulose feedstocks**, 2007. Disponível em: <<http://epobio.net/pdfs/0704LignocelluloseFeedstocksReport.pdf>>. Acessado em 10 jul. 2009.

- MUTHUVELAYUDHAM, R.; VIRUTHAGIRI, T. **Fermentative production and kinetics of cellulase protein on *Trichoderma reesei* using sugarcane bagasse and rice straw**. African Journal of Biotechnology, v. 5 (20), p.1873-1881, 2006.
- ÖHGREN, K.; BURA, R.; SADDLER, J.; ZACCHI, G. **Effect of hemicellulose and lignin removal on enzymatic hydrolysis of steam pretreated corn stover**. Bioresource Technology, 98, p. 2503–2510, 2007.
- OJUMU, T. V.; SOLOMON, B. O.; BETIKU, E.; LAYOKUN, S. K.; AMIGUN, B. **Cellulase Production by *Aspergillus flavus* Linn Isolate NSPR 101 fermented in sawdust, bagasse and corncob**. African Journal of Biotechnology, v. 2 (6), p. 150–152, 2003. Disponível em: <<http://www.academicjournals.org/AJB/PDF/Pdf2003/JunePDFs2003/Ojumu%20et%20al.pdf>>. Acessado em 23 jul. 2009.
- OLSSON, L.; AHRING, B. K. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology: Biofuels**. Ed. Springer, 2007. Disponível em: <<http://books.google.com.br/books?id=MEUBsx1heHAC&printsec=frontcover#v=onepage&q=&f=false>>. Acessado em 04 ago. 2009.
- OLSSON, L.; CHRISTENSEN, T. M. I. E.; HANSEN, K. P.; PALMQVIST, E. A. **Influence of the carbon source on production of cellulases, hemicellulases and pectinases by *Trichoderma reesei* Rut C–30**. Enzyme and Microbial Technology, v.33: p. 612 – 619, 2003.
- PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P. **Solid state fermentation for the production of industrial enzymes**. Current Science, v. 77, p. 149-161, 1999. Disponível em: <<http://www.ias.ac.in/currsci/jul10/articles23.htm>>. Acessado em 21 jul. 2009.

PARIS, L. D. **Produção de enzimas fúngicas por fermentação em estado sólido das sojas orgânica, transgênica e convencional.** Toledo: Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 2008. Dissertação (Mestrado).

PELLEGRINI, M. C. **Inserção de centrais cogedoras a bagaço de cana no parque energético do Estado de São Paulo: exemplo de aplicação de metodologia para análise dos aspectos locacionais e de integração energética.** São Paulo: Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, 2002. 167 p. Dissertação (Mestrado). Disponível em: <http://www.iee.usp.br/biblioteca/producao/2002/Teses/Disserta_MCP.pdf>. Acessado em 13 maio 2009.

PEREIRA Jr., N. **Biomassas residuais de composição lignocelulósica para a produção de etanol e o contexto de refinaria.** 2007 (Comunicação particular).

PIETROBON, V. C. **Hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com ácido e álcali utilizando enzimas microbianas comerciais.** Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), Universidade de São Paulo, 2008. Dissertação (Mestrado). Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11138/tde-18112008-154538/>>. Acessado em 20 ago. 2009.

PITARELO, A. P. **Avaliação da susceptibilidade do bagaço e da palha de cana-de-açúcar à bioconversão via pré-tratamento a vapor e hidrólise enzimática.** Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2007. Dissertação (Mestrado). Disponível em: <http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/bitstream/1884/15870/1/Disserta%C3%A7%C3%A3o_Ana%20Paula%20Pitarelo_UFPR%202007.pdf>. Acessado em 22 ago. 2009.

PORTAL DO AGRONEGÓCIO, 2009. Disponível em: <<http://www.portaldoagronegocio.com.br>>. Acessado em 14 ago. 2009.

- PRATA, A. M. R.; SANTOS, R. S. **Estudo da Obtenção de Ácido Cítrico por *Aspergillus niger* a partir de Hidrolisado Hemicelulósico de Eucalipto.** Faculdade de Engenharia Química de Lorena – Depto. de Biotecnologia – DEBIQ, 2005. Disponível em: <http://www.enq.ufsc.br/eventos/sinaferm/trabalhos_completos/t325.doc>. Acessado em 10 jul. 2009.
- RABELO, S. C. **Avaliação de desempenho do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar.** Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2007. Dissertação (Mestrado). Disponível em: <<http://libdigi.unicamp.br/document/?code=vtls000418358>>. Acessado em 18 ago. 2009.
- RAMOS, L. P. **Aproveitamento integral de resíduos agrícolas e agro-industriais.** In: Seminário Nacional sobre Reuso/Reciclagem de Resíduos Sólidos Industriais. São Paulo, 2000. Disponível em: <http://www.cca.ufscar.br/lamam/disciplinas_arquivos/res/artigo_pretratamento.pdf>. Acessado em 18 jul. 2009.
- ROBERTO, C. **Etanol celulósico: utopia ou realidade?**. Revista IDEA News. n°83, Set, 2007. p. 10-17.
- ROBSON, L. M.; CHAMBLISS, G. H. **Cellulases of bacterial origin.** Enzyme and Microbial Technology 11: p. 626-644, 1989.
- RODRIGUES, F. A. **Avaliação da tecnologia de hidrólise ácida de bagaço de cana.** Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2007. Dissertação (Mestrado). Disponível em: <<http://libdigi.unicamp.br/document/?code=vtls000418936>>. Acessado em 15 jun. 2009.

- RUEGGER, M. J. S.; TAUK-TORNISIELO, S. M. **Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil.** Revista Brasileira de Botânica, vol.27, n.2. São Paulo, 2004. Disponível em: <http://200.189.113.123/diaadia/diadia/arquivos/File/conteudo/veiculos_de_comunicacao/RBB/VOL27N2/V27N2A01.PDF> . Acessado em 21 ago. 2009.
- RUIZ, F.; BOLADO, S.; GONZÁLEZ-BENITO, G.; GARCÍA-CUBERO, M.T. **Influence of process parameters on the enzymatic hydrolysis of steam-exploded wheat straw.** Chemical Engineering and Environmental Technology Department, University of Valladolid, 2009. Disponível em: <<http://www.aidic.it/icheap9/webpapers/209Ruiz.pdf>>. Acessado em 12 jul. 2009.
- SALAZAR, R. F. S.; SILVA, G. L. P.; SILVA, M. L. C. P. **Estudo da composição da palha de milho para posterior utilização como suporte na preparação de compósitos.** In: VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica. Unicamp, 2005. Disponível em: <<http://www.feq.unicamp.br/~cobeqic/top15.pdf>>. Acessado em 19 jun. 2009.
- SEAGRI - Secretaria de Agricultura, Irrigação e Reforma Agrária. **Cultura – Trigo.** 2009. Disponível em: <<http://www.seagri.ba.gov.br/Trigo.htm>>. Acessado em 12 ago. 2009.
- SHULER, M. L.; KARGI, F. **Bioprocess Engineering – Basic Concepts.** Prentice Hall Int. Series in the Physical and Chemical Engineering Sciences. New Jersey, 1992.
- SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. **O método Van Soest na determinação da qualidade de forrageiras.** In: Análise de Alimentos: Métodos Químicos e Biológicos. Viçosa: 3 ed., Editora UFV, 2002. p. 97-127.

SINGH, A.; SINGH, N.; BISHNOI, N. R. **Production of Cellulases by *Aspergillus Heteromorphus* from Wheat Straw under Submerged Fermentation.** International Journal of Environmental Science and Engineering, 1:1, 2009. Disponível em: <<http://www.waset.org/journals/ijese/v1/v1-1-4.pdf>>. Acessado em 13 jul. 2009.

TAMANINI, C.; HAULY, M. C. O. **Resíduos agroindustriais para produção biotecnológica de xilitol.** Semina: Ciências Agrárias, v. 25 (4), p. 315-330, 2004. Disponível em: <http://www.uel.br/proppg/portal/pages/arquivos/pesquisa/semina/pdf/semina_25_4_19_6.pdf>. Acessado em 12 ago. 2009.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA. **Aplicações de enzimas na indústria têxtil.** Disponível em: <http://www.enq.ufsc.br/labs/probio/disc_eng_bioq/trabalhos_pos2004/textil/aplicacoes.htm>. Acessado em 10 ago. 2009.

WANG, J. S.; WANG, J.; GULFRAZ, M. **Efficient Cellulase Production from Corn Straw by *Trichoderma Reesei* LW1 through Solid State Fermentation Process,** 2005. Disponível em: <<http://www.ethnoleaflets.com//leaflets/wang.htm>>. Acessado em 22 jun. 2009.

ZHANG, P.; HIMMEL, M. E.; MIELENZ, J. R. **Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies.** Biotechnology Advances. v. 24, p. 452-481, 2006.

ZHANG, P.; LYND, R. L. **Toward an Aggregated Understanding of Enzymatic Hydrolysis of Cellulose: Noncomplexed Cellulase Systems.** Wiley Periodicals, Inc., 2004.

8. ANEXOS

ANEXO 1 - Tabela 16. Massa dos resíduos pré-tratados com NaOH 4% ao longo do tempo de secagem

RESÍDUO	TEMPO (h)			
	0	18	30	42
Bagaço de cana-de-açúcar	205,103	21,580	21,041	21,056
Palha de milho	51,180	5,085	4,953	4,982
Palha de trigo	20,671	1,803	1,745	1,814

ANEXO 2 - Tabela 17. Massa dos resíduos pré-tratados com H₂O₂ 1% ao longo do tempo de secagem

RESÍDUO	TEMPO (h)				
	0	16	18	30	42
Bagaço de cana-de-açúcar	147,103	20,130	19,122	18,671	18,690
Palha de milho	165,180	21,621	21,026	19,204	19,313
Palha de trigo	195,000	25,903	25,205	25,782	23,481

ANEXO 3 – Tabela 18. Média das atividades enzimáticas ao longo do tempo de fermentação para as três diferentes quantidades de bagaço de cana-de-açúcar

TEMPO (h)	10 g/L		50 g/L		100 g/L	
	Média da atividade enzimática (U/mL)	Desvio padrão da atividade enzimática	Média da atividade enzimática (U/mL)	Desvio padrão da atividade enzimática	Média da atividade enzimática (U/mL)	Desvio padrão da atividade enzimática
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
45	0,003	0,002	0,077	0,015	0,161	0,019
68	0,016	0,001	0,130	0,003	0,180	0,012
92	0,047	0,015	0,061	0,021	0,168	0,022
164	0,208	0,002	0,300	0,010	0,297	0,005
212	0,148	0,020	0,157	0,009	0,223	0,012
235	0,142	0,040	0,159	0,022	0,160	0,016
308	0,164	0,023	0,157	0,034	0,150	0,023
331	0,225	0,004	0,205	0,021	0,216	0,021
355	0,221	0,006	0,163	0,016	0,131	0,007
405	0,227	0,000	0,219	0,024	0,132	0,033
427	0,206	0,001	0,203	0,001	0,123	0,014
503	0,225	0,018	0,183	0,018	0,129	0,005

ANEXO 4 - Tabela 19. Valores de pH dos caldos em função do tempo de fermentação para as três diferentes quantidades de bagaço de cana-de-açúcar

TEMPO (h)	pH		
	10 g/L	50 g/L	100 g/L
0	5,21	5,03	5,00
45	5,21	4,91	3,92
68	5,17	4,44	3,27
92	5,13	4,02	2,92
164	5,17	3,13	2,38
212	5,17	2,67	2,29
235	5,11	2,54	2,27
308	5,36	2,37	2,24
331	5,36	2,35	2,34
355	5,38	2,34	2,32
405	5,34	2,27	2,27
427	5,34	2,2	2,33
503	5,39	2,19	2,28

ANEXO 5 – Tabela 20. Valores de ART dos caldos em função do tempo de fermentação para as três diferentes quantidades de bagaço de cana-de-açúcar

TEMPO (h)	ART (g/L)		
	10 g/L	50 g/L	100 g/L
0	0	0	0
45	0,074	1,751	2,867
68	0,093	2,812	4,939
92	0,178	3,412	5,745
164	0,185	2,784	3,847
212	0,170	2,348	3,098
235	0,168	1,896	3,155
308	0,011	1,826	2,552
331	0,130	1,841	2,646
355	0,168	1,812	2,651
405	0,136	1,776	2,321
427	0,157	1,561	2,388
503	0,153	0,949	1,838

ANEXO 6 – Tabela 21. Média das atividades enzimáticas ao longo do tempo para amostras de caldo enzimático armazenadas a temperatura de -18°C

TEMPO (dias)	Média da atividade enzimática (U/mL)	Desvio padrão da atividade enzimática
0	0,181	0,001
8	0,200	0,011
13	0,199	0,003
28	0,189	0,011
43	0,203	0,008

ANEXO 7 – Tabela 22. Média das atividades enzimáticas ao longo do tempo para amostras de caldo enzimático armazenadas a temperatura de 4°C

TEMPO (dias)	Média da atividade enzimática (U/mL)	Desvio padrão da atividade enzimática
0	0,263	0,020
1	0,185	0,023
2	0,151	0,013
5	0,154	0,008
7	0,135	0,003
10	0,164	0,009
13	0,148	0,010

ANEXO 8 – Tabela 23. Média das atividades enzimáticas ao longo do tempo para amostras de caldo enzimático armazenadas a temperatura de 4°C

RESÍDUO FERMENTAÇÃO						
RESÍDUO HIDRÓLISE	Bagaço de cana-de-açúcar		Palha de milho		Palha de trigo	
	Média da atividade enzimática (U/mL)	Desvio padrão da atividade enzimática	Média da atividade enzimática (U/mL)	Desvio padrão da atividade enzimática	Média da atividade enzimática (U/mL)	Desvio padrão da atividade enzimática
Bagaço de cana-de-açúcar	0,647	0,049	0,670	0,078	0,509	0,028
Palha de milho	0,748	0,059	0,895	0,099	0,677	0,061
Palha de trigo	0,724	0,016	0,755	0,082	0,562	0,065

ANEXO 9 – Tabela 24. Média das atividades enzimáticas em diferentes temperaturas de hidrólise para os três substratos a pH 4,8 e tempo de 50 min.

RESÍDUO	TEMPERATURA (°C)													
	20		30		40		50		60		70		80	
	Média (U/mL)	DP	Média (U/mL)	DP	Média (U/mL)	DP	Média (U/mL)	DP	Média (U/mL)	DP	Média (U/mL)	DP	Média (U/mL)	DP
Bagaço de cana	0,251	0,033	0,296	0,019	0,317	0,008	0,340	0,020	0,300	0,017	0,152	0,007	0,140	0,004
Palha de milho	0,197	0,051	0,418	0,012	0,439	0,050	0,536	0,026	0,413	0,021	0,295	0,012	0,293	0,004
Palha de trigo	0,299	0,010	0,333	0,040	0,387	0,018	0,469	0,017	0,395	0,013	0,190	0,005	0,176	0,009

ANEXO 10 – Tabela 25. Média das atividades enzimáticas em diferentes pHs de hidrólise para os três substratos a temperatura de 50°C e tempo de 50 min.

RESÍDUO	pH													
	2,91		3,78		4,80		5,89		6,75		7,82		8,82	
	Média (U/mL)	DP	Média (U/mL)	DP	Média (U/mL)	DP	Média (U/mL)	DP	Média (U/mL)	DP	Média (U/mL)	DP	Média (U/mL)	DP
Bagaço de cana	0,249	0,016	0,238	0,007	0,317	0,018	0,243	0,032	0,222	0,005	0,224	0,015	0,215	0,010
Palha de milho	0,433	0,019	0,474	0,008	0,480	0,014	0,414	0,014	0,329	0,013	0,317	0,009	0,308	0,016
Palha de trigo	0,291	0,022	0,319	0,005	0,432	0,015	0,240	0,027	0,218	0,001	0,211	0,010	0,203	0,021

ANEXO 11 – Tabela 26. Média das atividades enzimáticas em diferentes tempos de hidrólise para os três substratos a pH 4,8 e temperatura de 50°C

TEMPO (min.)	Bagaço de cana-de-açúcar		Palha de milho		Palha de trigo	
	Média (U/mL)	DP	Média (U/mL)	DP	Média (U/mL)	DP
10	0,434	0,018	0,937	0,058	0,788	0,014
20	0,454	0,039	0,875	0,010	0,719	0,000
30	0,504	0,023	0,893	0,019	0,743	0,049
40	0,471	0,013	0,864	0,039	0,735	0,107
50	0,459	0,008	0,923	0,088	0,636	0,078
60	0,420	0,023	0,685	0,010	0,623	0,068
70	0,346	0,006	0,625	0,078	0,549	0,097
80	0,345	0,018	0,664	0,078	0,561	0,078

ANEXO 12 – Tabela 27. Média dos ART do caldo enzimático em função do tempo a temperatura de 50°C e pH 4,8 (indicativo da presença de glicose oxidase)

TEMPO (min.)	ART (g/L)	D. PADRÃO ART
0	2,745	0,039
10	2,801	0,009
20	2,815	0,042
30	2,824	0,009
40	2,793	0,033
50	2,771	0,015
60	2,788	0,010
70	2,769	0,011
80	2,734	0,031

ANEXO 13 – Tabela 28. Média das atividades enzimáticas para diferentes quantidades dos três substratos utilizados na hidrólise a pH 4,8, temperatura de 50°C e tempo de 50 min.

FRAÇÃO MÁSSICA	Bagaço de cana-de-açúcar		Palha de milho		Palha de trigo	
	Média da atividade enzimática (U/mL)	Desvio padrão da atividade enzimática	Média da atividade enzimática (U/mL)	Desvio padrão da atividade enzimática	Média da atividade enzimática (U/mL)	Desvio padrão da atividade enzimática
0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
0,016	0,148	0,015	0,124	0,063	0,082	0,014
0,032	0,257	0,036	0,461	0,009	0,289	0,055
0,047	0,314	0,021	0,416	0,012	0,365	0,033
0,062	0,466	0,081	0,559	0,007	0,413	0,050
0,077	0,506	0,013	0,768	0,009	0,560	0,049
0,091	0,649	0,057	0,733	0,061	0,695	0,084

ANEXO 14 – Tabela 29. Média das atividades enzimáticas para diferentes quantidades de caldo enzimático utilizadas na hidrólise para os três substratos a temperatura de 50°C e tempo de 50 min.

VOLUME CALDO (mL)	Bagaço de cana-de-açúcar		Palha de milho		Palha de trigo	
	Média da atividade enzimática (U/mL)	Desvio padrão da atividade enzimática	Média da atividade enzimática (U/mL)	Desvio padrão da atividade enzimática	Média da atividade enzimática (U/mL)	Desvio padrão da atividade enzimática
1	0,059	0,003	0,153	0,014	0,074	0,006
2	0,055	0,002	0,157	0,000	0,112	0,020
3	0,078	0,012	0,174	0,015	0,112	0,005
4	0,085	0,009	0,177	0,011	0,132	0,011
5	0,113	0,013	0,209	0,001	0,134	0,015
6	0,119	0,008	0,207	0,006	0,157	0,012

ANEXO 15 – Tabela 30. Média das atividades enzimáticas para o efeito do tipo de tratamento dos resíduos na atividade enzimática

RESÍDUO	TIPO DE TRATAMENTO					
	Sem tratamento		Tratamento com NaOH 4%		Tratamento com H ₂ O ₂ 1%	
	Média da atividade enzimática (U/mL)	Desvio padrão da atividade enzimática	Média da atividade enzimática (U/mL)	Desvio padrão da atividade enzimática	Média da atividade enzimática (U/mL)	Desvio padrão da atividade enzimática
Bagaço de cana	0,319	0,036	0,585	0,043	0,655	0,055
Palha de milho	0,394	0,048	0,490	0,075	0,892	0,109
Palha de trigo	0,310	0,048	0,425	0,048	0,801	0,084

ANEXO 16 – Tabela 31. Média das atividades enzimáticas para o efeito de hidrólises sucessivas dos resíduos tratados com H₂O₂ na atividade enzimática a pH 4,8, temperatura de 50°C e tempo de 50 min.

RESÍDUO	NÚMERO DE HIDRÓLISES							
	1		2		3		4	
	Média (U/mL)	Desvio padrão	Média (U/mL)	Desvio padrão	Média (U/mL)	Desvio padrão	Média (U/mL)	Desvio padrão
Bagaço de cana	0,680	0,106	1,145	0,112	0,750	0,093	0,576	0,042
Palha de milho	0,877	0,123	1,207	0,168	1,125	0,157	0,790	0,115
Palha de trigo	0,717	0,156	1,181	0,082	1,073	0,034	0,610	0,065

ANEXO 17 – Tabela 32. Média das atividades enzimáticas para comparação entre papel filtro e resíduos lignocelulósicos tratados com NaOH como substratos de hidrólise

SUBSTRATO HIDRÓLISE	BATELADAS FERMENTAÇÃO			
	10g/L		100g/L	
	Média (U/mL)	Desvio padrão	Média (U/mL)	Desvio padrão
Papel Whatman nº1	0,064	0,008	0,136	0,030
Papel J.Prolab	0,063	0,014	0,131	0,019
Bagaço de cana-de-açúcar	0,111	0,021	0,403	0,047
Palha de milho	0,264	0,041	0,527	0,049
Palha de trigo	0,128	0,021	0,460	0,031

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)