

## HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS: PRODUÇÃO DE CELULASES POR *Aspergillus niger* E EFEITOS DO PRÉ-TRATAMENTO

Caroline Mariana De Aguiar<sup>1</sup>, Daisy Catharina Rodrigues<sup>2</sup>,  
Sérgio Luiz De Lucena<sup>3</sup>

4

**RESUMO** Celulases foram produzidas cultivando-se o fungo *Aspergillus niger* em meio de cultura com bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com NaOH. Avaliou-se o efeito do tipo de pré-tratamento através da hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar, da palha de milho e da palha de trigo não tratados e pré-tratados com NaOH 4%(m/v) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1%(v/v). Os teores de lignina e celulose foram também quantificados. Avaliou-se a atividade enzimática submetendo os resíduos pré-tratados com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1%(v/v) a sucessivas hidrólises enzimáticas. Concluiu-se que os resíduos pré-tratados proporcionaram melhores resultados de atividade enzimática comparados com os não tratados. Os melhores resultados de atividade enzimática foram obtidos utilizando-se tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1%(v/v), (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). As amostras dos resíduos submetidos aos dois pré-tratamentos tiveram seu teor porcentual de celulose aumentado e seu teor de lignina reduzido (exceto a palha de milho tratada com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a qual apresentou leve aumento no teor de lignina). Os resíduos tratados com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> podem ser submetidos a pelo menos quatro processos de hidrólise sucessivos, com o segundo processo rendendo a maior atividade enzimática para todos os resíduos pré-tratados.

**PALAVRAS-CHAVE** resíduos lignocelulósicos, pré-tratamento, celulases.

## ENZYMATIC HYDROLYSIS OF LIGNOCELLULOSIC MATERIALS: CELLULASES PRODUCTION BY *Aspergillus niger* AND PRETREATMENT EFFECTS

**SUMMARY** Cellulases were obtained by fermentation using the fungus *Aspergillus niger* in a medium containing pretreated with NaOH sugarcane bagasse. The pretreatment effect was evaluated by enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse, corn straw and wheat straw untreated, and pretreated with NaOH (4%w/w) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(1%v/v). Lignin and cellulose content also were quantified. The enzymatic activity also was evaluated by submitting the 1%v/v H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pretreated lignocellulosic materials to successive enzymatic hydrolysis. It was concluded that the pretreated materials rendered higher enzymatic activity results than those untreated. The highest activity results were obtained using lignocellulosic materials treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1%v/v), (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). Pretreated materials had their percentual cellulose content increased and their lignin content decreased (except H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pretreated corn straw, which had its lignin content slightly increased). The results show that the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pretreated materials can be submitted up to, at least, four successive hydrolysis with the second one yielding the highest enzymatic activity.

---

<sup>1</sup>Trabalho original e inédito.

Mestre, Tecnólogo em Controle de Processos Químicos, Técnico de laboratório, UTFPR, Campus de Medianeira, Medianeira-PR, [caroline\\_de\\_aguiar@yahoo.com.br](mailto:caroline_de_aguiar@yahoo.com.br).

<sup>2</sup> Acadêmica do curso de Engenharia Química, Campus de Toledo, Unioeste, Toledo-PR.

<sup>3</sup> Doutor, Engenheiro Químico, CECE, Campus de Toledo, Unioeste, Toledo-PR, [lucenasergio@yahoo.com.br](mailto:lucenasergio@yahoo.com.br).

4

**KEYWORDS:** lignocellulosic materials, pretreatment, cellulases.

## INTRODUÇÃO

Os resíduos lignocelulósicos 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 et al., 2003). 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 como as indústrias de papel e celulose, serrarias, usinas de açúcar e álcool e 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).

O bagaço de cana-de-açúcar, a palha de trigo e a palha de milho são três importantes resíduos gerados em grande quantidade no Brasil, principalmente no estado do Paraná. O bagaço de cana é o resíduo mais abundante no processamento da cana-de-açúcar, sendo em parte queimado para a geração de calor e energia para a própria usina (~ 60%) e atualmente vem sendo comercializado para reduzir problemas da crise no fornecimento de energia elétrica (RABELO, 2007). O bagaço reúne bons 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 (PELLEGRINI, 2002; RABELO, 2007). A palha de trigo, após a colheita do cereal, pode ser queimada, removida ou deixada no campo. Se removida, 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). No Brasil, é utilizada, para recompor os solos e atualmente existem pesquisas voltadas ao seu uso em peças de veículos, no processo de produção de cogumelos comestíveis e em produtos artesanais (PORTAL DO AGRONEGÓCIO, 2009). A palha de milho pode ser queimada nas áreas rurais, descartada ou utilizada como cobertura em solo após a colheita mecanizada do milho, o que, em excesso, tem causado sérios problemas de pragas que proliferam em ambientes úmidos e protegidos (WANG, 2005; ERENO, 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 sejam estratégicas (MARCONCINI, 2008).

Os resíduos lignocelulósicos são compostos de celulose, hemicelulose, lignina, além de pequenas quantidades de extrativos (TAMANINI, 2004; RABELO, 2007). A celulose apresenta regiões altamente ordenadas (regiões cristalinas), estabilizadas por pontes de hidrogênio intra e intermoleculares, e áreas menos ordenadas ou amorfas, onde as cadeias apresentam orientação randomizada. Cadeias adjacentes de celulose formam um conjunto de agregados denominados fibrilas elementares. Diversas fibrilas 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). 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.

Existem vários tipos de pré-tratamento (físicos, químicos/físico-químicos e microbiológicos) que podem ser aplicados a esses materiais, os quais aumentam a suscetibilidade da celulose à hidrólise, pois promovem a solubilização da lignina, possibilitam a abertura da estrutura da celulose e a remoção das interações secundárias entre as cadeias de glicose (OJUMU et al., 2003). Dentre os pré-tratamentos químicos, estão os tratamentos alcalinos, os quais são realizados com soluções de NaOH,  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  ou amônia, removendo a lignina e parte da hemicelulose e aumentando a acessibilidade das enzimas. Comparado com o tratamento ácido, o tratamento alcalino apresenta-se mais efetivo na quebra das ligações entre celulose, hemicelulose e lignina, além de promover a fragmentação dos polímeros de hemicelulose (TAHERZADEH & KARIMI, 2008). Em vários estudos o tratamento alcalino tem sido empregado utilizando-se solução de NaOH (CHAHAL, 1985; AGUIAR & MENEZES, 2000; OJUMU et al., 2003; MUTHUVELAYUDHAM & VIRUTHAGIRI, 2006; JA'AFARU & FAGADE, 2007). Os pré-tratamentos alcalinos oxidativos, como os que utilizam  $\text{H}_2\text{O}_2$ , têm sido utilizados em vários estudos de hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos. KRISHNA et al. (1997) em estudos de hidrólise de *Antigonum leptopus* utilizou solução de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . KRISHNA et al. (2000) utilizou substratos tratados com solução de  $\text{H}_2\text{O}_2$  1% a pH 11,5, chegando à índices de sacarificação próximos de 100%. Segundo TAHERZADEH & KARIMI (2008), CURRELI et al. (1997), SAHA & COTTA (2006), MISHIMA et al. (2006) e SAHA & COTTA (2007) também utilizaram  $\text{H}_2\text{O}_2$  em estudos de hidrólise enzimática.

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). 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 é dividido em três grupos de acordo com seu local de atuação no substrato celulósico:

1) Endoglucanases: enzimas que 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, embora raras, são capazes de liberar glicose diretamente do polímero. Já as CBHs são responsáveis pela liberação de celobiose a partir de extremidades da celulose;

3.  $\beta$ -glicosidases: enzimas que têm a propriedade de hidrolisar celobiose e oligossacarídeos solúveis (com menos de sete unidades monoméricas) em glicose.

*Aspergillus niger* é um fungo comum do solo, observado como um bolor negro em frutas e outros alimentos. A ingestão oral de *A. niger* foi considerada como inofensiva pela Organização Mundial de Saúde, a qual abriu a oportunidade para sua utilização na produção industrial de ácidos, produtos farmacêuticos e de enzimas (KAAIJ, 2007). O *Aspergillus niger* é fonte de celulases 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* (AGUIAR & MENEZES, 2000).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do tipo de pré-tratamento do substrato na hidrólise enzimática dos resíduos lignocelulósicos (substratos) bagaço de cana-de-açúcar, palha de milho e palha de trigo utilizando as enzimas celulases produzidas por *Aspergillus niger* e também avaliar a atividade celulásica quando o resíduo lignocelulósico é submetido a hidrólises sucessivas.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### MATERIAIS

*Aspergillus niger* foi cedido pelo laboratório de Bioquímica do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, UNIOESTE – Cascavel, Brasil. A manutenção do fungo foi realizada em meio de cultura Ágar Sabouraud - Dextrose a 4°C com repicagens periódicas. O bagaço de cana-de-açúcar foi cedido pela Cooperativa Agrícola Regional de Produtores de Cana – COOPCANA - Paraíso do Norte, Brasil. As palhas de milho e de trigo foram coletadas no interior do município de Toledo, Brasil.

## MÉTODOS

### PREPARO DO INÓCULO

O desenvolvimento do *Aspergillus niger* foi realizado em meio de cultura ASD com incubação por sete dias a 30°C. Para obter o inóculo foram adicionados 10mL de água esterilizada no tubo contendo o fungo. 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). A determinação de esporos em suspensão na solução foi realizada com o auxílio de câmara de Neubauer.

### PRÉ-TRATAMENTO DOS RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS

As palhas de milho e de trigo foram moídas em moinho do tipo martelo com peneira de 4 Mesh 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.

O tratamento alcalino foi realizado de acordo com procedimento descrito por AGUIAR & MENEZES (2000) e MUTHUVELAYUDHAM & VIRUTHAGIRI (2006), utilizando solução de NaOH 4%(m/v). O material foi levado à autoclave a temperatura de 121°C por 30min., lavado com água corrente, neutralizado com ácido fosfórico concentrado e seco em estufa a 65°C. O tratamento alcalino oxidativo foi adaptado da metodologia descrita por KRISHNA et al. (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, o material foi pesado e transferido para erlenmayer com solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1%(v/v) (1g por 50mL). O pH da solução foi ajustado para 11,5 com NaOH. A suspensão foi agitada a temperatura ambiente por 16h a 200rpm. As frações insolúveis foram filtradas, lavadas sucessivamente até que o filtrado apresentasse pH neutro e secas em estufa a 50°C.

### FERMENTAÇÃO

Utilizou-se bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com NaOH como fonte de carbono (AGUIAR & MENEZES, 2000) em meio de cultura adaptado de MANDELS & WEBER (1969). Adicionou-se 1mL de Tween 80 por litro de meio de cultura 100g/L de bagaço pré-tratado. O material foi esterilizado a 120°C por 20 min. Em seguida, adicionou-se suspensão de esporos com concentração de, aproximadamente, 1x10<sup>6</sup> esporos/mL e fez-se a incubação a 30°C por sete dias com agitação periódica. Após o tempo de fermentação, realizou-se filtração em papel filtro qualitativo, obtendo-se o caldo enzimático.

### HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DOS RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS E DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A hidrólise enzimática foi realizada adaptando-se o método proposto por GHOSE (1987), substituindo-se o papel filtro Whatman n° 1 pelos resíduos lignocelulósicos não tratados e tratados com NaOH 4%(m/v) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1%(v/v) e diminuindo-se o tempo de incubação para 50 minutos. As concentrações de açúcares redutores foram determinadas pelo método do DNS descrito por MILLER (1959). Segundo GHOSE (1987), uma unidade de atividade enzimática libera 1µmol de açúcar redutor por mL de caldo por minuto ( $U = \mu\text{mol mL}^{-1} \text{min}^{-1}$ ). Os resultados de atividade enzimática foram expressos em U/mL.

## MÉTODOS ANALÍTICOS

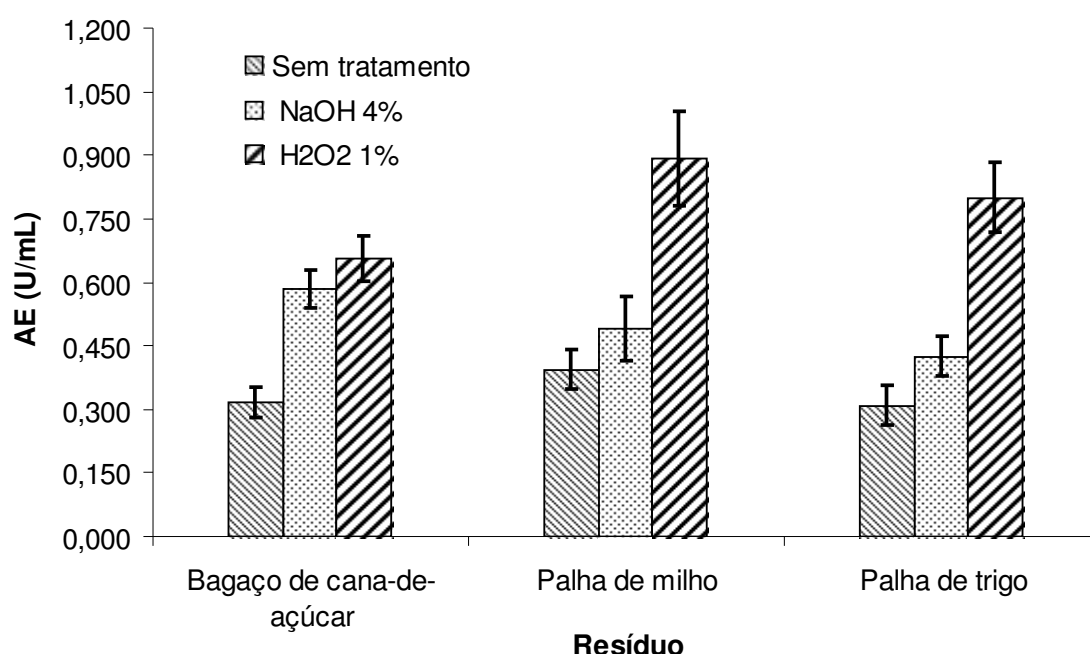
### DETERMINAÇÃO DE LIGNINA E CELULOSE

Amostras não tratadas e tratadas com NaOH e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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.

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

### EFEITO DO TIPO DE TRATAMENTO DOS RESÍDUOS NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Os resultados de atividade enzimática dos resíduos não tratados e tratados com NaOH 4%(m/v) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1%(v/v) estão apresentados pela figura 1.



**Figura 1.** Efeito do tipo de tratamento dos resíduos na atividade enzimática a pH 4,8, 50°C e 50 min.

Observa-se (figura 1) maior atividade enzimática com a utilização dos resíduos submetidos aos dois tratamentos em relação aos resíduos não tratados. Segundo KUMAR (2009), os pré-tratamentos visam a remoção da lignina e da hemicelulose, a redução da cristalinidade da celulose e o aumento da porosidade do material. Os melhores resultados foram obtidos com os resíduos tratados com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, têm sido usados para dissolver os componentes da matriz lignocelulósica e acelerar 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 1 apresenta os teores de lignina e celulose dos resíduos.

**Tabela 1.** Teores de lignina e celulose dos resíduos antes e após os pré-tratamentos

<b>Resíduo</b>	<b>Tipo de tratamento</b>	<b>Celulose (% de massa em base seca)</b>	<b>Lignina (% de massa em base seca)</b>
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 <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 1%	70,48±0,8	3,91±0,01

Através da tabela 1 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Esta mudança na composição da maioria dos substratos ocorreu devido ao processo de tratamento, o qual promove a redução das frações hemicelulose e lignina, 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Porém, os resultados de atividade enzimática (figura 1) mostram que o tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 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.

Quanto ao tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, como: redução do índice de cristalinidade e da área superficial da celulose e redução do grau de polimerização. 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi ajustada a pH 11,5, pode ter atuado eficientemente sobre a cristalinidade da celulose.

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. 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 (GUPTA, 2008). Desta forma tais compostos podem ter permanecido em pequena quantidade após a lavagem dos resíduos.

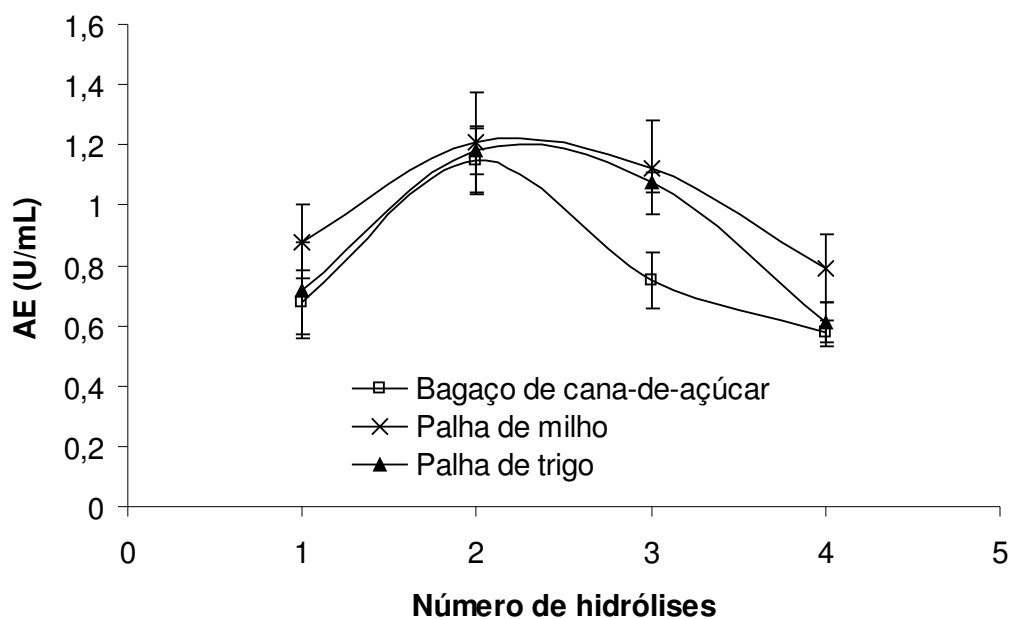
Para a palha de milho tratada com  $H_2O_2$ , apesar do aumento do teor de celulose, não houve redução do teor de lignina, o qual também aumentou em relação ao substrato não tratado, de 7,68% para 8,77%. Neste caso, além da solubilização de parte da lignina, a qual foi responsável pelo aumento do teor 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 resultados 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.

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%. 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  $H_2O_2$  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.

### **Efeito de hidrólises enzimáticas sucessivas dos resíduos na atividade enzimática**

Os resultados de atividade enzimática em função do número de hidrólises dos resíduos pré-tratados com  $H_2O_2$  estão apresentados pela figura 2.



**Figura 2.** Efeito de hidrólises sucessivas dos resíduos tratados com  $H_2O_2$  na atividade enzimática a pH 4,8, 50°C e 50 min.

Pode-se observar na figura 2 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, 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 o segundo processo rendeu maiores resultados de atividade para os três resíduos pré-tratados e que a disponibilidade da celulose aumenta após alguns processos de hidrólise.

## CONCLUSÕES

*Aspergillus niger* produz celulases quando cultivado em meio com bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com NaOH 4%(m/v) como fonte de carbono. Os pré-tratamentos foram eficientes pois proporcionaram melhores resultados de atividade enzimática para os três resíduos. As amostras pré-tratadas tiveram seu teor de celulose aumentado e seu teor de lignina reduzido, (exceto a palha de milho tratada com  $H_2O_2$ ). Os melhores resultados de atividade enzimática foram obtidos com o pré-tratamento com  $H_2O_2$  1%(v/v) para os três resíduos. Os resíduos tratados com  $H_2O_2$  podem sofrer quatro processos de hidrólise sucessivos, com o segundo processo rendendo a maior atividade enzimática.

## AGRADECIMENTOS

Cooperativa Agrícola Regional de Produtores de Cana, por ter cedido o bagaço da cana-de-açúcar. Ao Grupo de Pesquisas em Recursos Pesqueiros e Limnologia, ao Grupo de Estudos de Manejo na Aqüicultura da Universidade Estadual do Oeste do Paraná e ao Laboratório de Nutrição Animal da Universidade Federal do Paraná pela contribuição à parte experimental do trabalho.



## REFERÊNCIAS

AGUIAR, C. L.; MENEZES, T. J. B. Produção de celulases e xilanases por *Aspergillus niger* IZ-9 usando fermentação submersa sobre bagaço de cana-de-açúcar. **B. CEPPA**. v. 18, p. 57-70, 2000.

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**. v. 24, n. 4, p. 421–433, 1989.

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>. Acesso em: 16 jul. 2009.

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

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**. v. 59, p. 257-268, 1987.

GOMEZ, R. J. H. C. **Sacarificação da hemicelulose do bagaço de cana de açúcar e sua fermentação por *Pachysolen tannophilus***. 1985. 102 f. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. Disponível em: [http://www.fea.unicamp.br/alimentarium/ver\\_documento.php?did=675](http://www.fea.unicamp.br/alimentarium/ver_documento.php?did=675). Acesso em: 01 jun. 2009.

GUPTA, R. **Alkaline pretreatment of biomass for ethanol production and understanding the factors influencing the cellulose hydrolysis**. 2008. 206 f. Dissertação (Doutorado de Filosofia) - Auburn University, Alabama. Disponível em: <http://etd.auburn.edu/etd/handle/10415/1034>. Acesso em: 17 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**. v. 2, n. 1, p. 13-16, 2007.

KAAIJ, R. M. V. D. **Alpha-glucan acting enzymes in *Aspergillus niger*: Diversity in enzymatic activities end functions**. 2007. 157 f. Dissertação (Mestrado) - University of Groningen, Groningen. Disponível em: <http://irs.ub.rug.nl/ppn/304666742>. Acesso 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://cru84.cahe.wsu.edu/ItemDetail.aspx?ProductID=15319>. Acesso em: 16 jun. 2009.

KRISHNA, S. H.; PRABHAKAR, Y.; RAO, R. J. Saccharification studies of lignocellulosic biomass from *Antigonium leptopus* Linn. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 59, n. 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**. v. 22, p. 467-470, 2000.

KUMAR, P.; BARRET, D. M.; DELWICHE, M. J.; STROEVE, P. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. **Industrial & Engineering Chemistry Research**. v. 48, n. 8, p. 3713-3729, 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, n. 2, p. 5-18, 2007. Disponível em: [http://www.cca.ufscar.br/lamam/disciplinas\\_arquivos/res/etanol\\_celulose\\_bacteriasrecombinantes.pdf](http://www.cca.ufscar.br/lamam/disciplinas_arquivos/res/etanol_celulose_bacteriasrecombinantes.pdf). Acesso em: 11 jun. 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**. v. 77, p. 467-475, 2002.

MANDELS, M.; WEBER, J. The production of cellulases. **Advances in Chemistry Series**. v. 95, p. 391-414, 1969.

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](http://www.cnpdia.embrapa.br/publicacoes/download.php?file=DOC39_2008.pdf). Acesso em: 21 ago. 2009.

MARTINS, L. F. **Caracterização do complexo celulásico de *Penicillium echinulatum***. 2005. 111f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba. Disponível em: <http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/handle/1884/8807>. Acesso em: 15 ago. 2009.

ERENO, D. Álcool de celulose. **Revista FAPESP**, Edição Impressa 133, 2007. Disponível em: <http://www.revistapesquisa.fapesp.br/?art=3169&bd=1&pg=3&lg=>. Acesso em: 11 jul. 2009.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**. v. 31, n.3, p. 426-428, 1959.

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, n. 20, p.1873-1881, 2006.

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, n. 6, p. 150–152, 2003. Disponível em: <http://www.academicjournals.org/AJB/PDF/Pdf2003/JunePDFs2003/Ojumu%20et%20al.pdf>. Acesso em: 23 jul. 2009.

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

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.** 2002. 187 f. Dissertação (Mestrado em Energia) - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo. Disponível em: <http://www.iee.usp.br/biblioteca/producao/2002/teses02.htm>. Acesso em: 13 maio 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.** 2007. 109 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba. Disponível em: [http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/bitstream/1884/15870/1/Disserta%C3%A7%C3%A3o\\_Ana%20Paula%20Pitarelo\\_UFPR%202007.pdf](http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/bitstream/1884/15870/1/Disserta%C3%A7%C3%A3o_Ana%20Paula%20Pitarelo_UFPR%202007.pdf). Acesso em: 22 ago. 2009.

PORTAL DO AGRONEGÓCIO, 2009. Disponível em: <http://www.portaldoagronegocio.com.br>. Acesso em: 14 ago. 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.** 2007. 136 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. Disponível em: <http://libdigi.unicamp.br/document/?code=vtls000418358>. Acesso 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](http://www.cca.ufscar.br/lamam/disciplinas_arquivos/res/artigo_pretratamento.pdf). Acesso em: 18 jul. 2009.

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, Editora UFV, 2002. p. 97-127.

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review. **International Journal of Molecular Sciences.** v. 9, 1621-1651, 2008.

TAMANINI, C.; HAULY, M. C. O. Resíduos agroindustriais para produção biotecnológica de xilitol. **Semina: Ciências Agrárias.** v. 25, n. 4, p. 315-330, 2004. Disponível em: [http://www.uel.br/proppg/portal/pages/arquivos/pesquisa/semina/pdf/semina\\_25\\_4\\_19\\_6.pdf](http://www.uel.br/proppg/portal/pages/arquivos/pesquisa/semina/pdf/semina_25_4_19_6.pdf). Acesso em: 12 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>. Acesso em: 22 jun. 2009.

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