

INSTITUTO DE QUÍMICA

Orientador: Prof. Dr. Nelson Eduardo Durán Caballero

*Este exemplar corresponde a redação
final da Tese defendida por
o Sr. Juan Luis Reyes Rodriguez e
Aprovada pela Comissão Julgadora.
29/11/88 Nelson Durán*

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DE APROVEI-
TAMENTO DE RESÍDUOS LIGNOCELULÓSI-
COS

Juan Luis Reyes Rodriguez

Tese de Doutorado

CAMPINAS

1988

Aos meus pais,
Neuza, Rodrigo,
Luciano e
Gustavo.

"... Em princípio, o homem
que exalta a si mesmo,
que eleva uma estátua
à sua própria virtude,
aniquila, só por esse
fato, todo o mérito
efetivo que possa
ter ..."

A. K.

AGRADECIMENTOS

- A Direção do Instituto de Química, pelas facilidades concedidas na realização deste trabalho.
- Ao CNPq, FAPESP, FINEP, PADCT, OAS, Vicerectoria de Investigaciones de la Universidad de Concepción e Dirección General de Investigaciones de la Universidad Católica de Valparaíso, pelos auxílios recebidos.
- Ao Prof. Dr. Jaime Amaya Farfán, pelas valiosas discussões e pelos cromatogramas de análise de aminoácidos.
- Ao Prof. Dr. Helion Vargas, pelos espectros de fotoacústica.
- Ao Prof. Dr. Nilso Barelli e à Profa. Dra. Débora de Queiróz Tavares, pelas maneiras solícitas com que colaboraram na microscopia eletrônica.
- Ao Prof. Dr. Gerd Wegener, pela análise de açúcares realizada.
- Aos funcionários que contribuíram para a realização desta tese.
- Aos meus professores.
- Aos meus amigos.
- Em especial, ao Prof. Dr. Nelson Durán, pela orientação e amizade demonstradas durante a realização deste trabalho.

INDICE

	<u>Página</u>
RESUMO	xv
SUMMARY	xvii
SÍMBOLOS E ABREVIACÕES	xix
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Composição e recursos disponíveis	2
1.2. Aproveitamento de resíduos celulósicos	6
2. PRÉ-TRATAMENTOS	9
3. HIDRÓLISE DE RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS	13
3.1. Hidrólise ácida	13
3.2. Hidrólise enzimática	14
3.2.1. Produção de celulasas	15
3.2.2. Interação enzima-substrato	16
4. PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS UNICELULARES - PUC	18
4.1. Hidrólise e fermentação consecutiva	18
4.2. Hidrólise e fermentação simultânea	19
5. OBJETIVOS DO TRABALHO	20
6. EXPERIMENTAL	21
6.1. Materiais	21
6.1.1. Reagentes e procedência	21
6.1.2. Instrumentação	22
6.1.3. Soluções especiais	23
6.2. Pré-extração da casca de arroz	24

Página

6.3. Irradiação	24
6.4. Extração de lignina-dioxano de amostras irradiadas e sem irradiar	25
6.5. Pré-tratamento da casca de arroz com água oxigenada em meio básico	26
6.6. Pré-tratamento da casca de arroz com ozônio ...	26
6.7. Pré-tratamento da casca de arroz com solução de clorito de sódio	26
6.8. Tratamento fúngico de lignina-dioxano e casca de arroz	27
6.9. Determinação da massa do micélio após o crescimento fúngico das cascas de arroz tratadas e não tratada	27
6.10. Análise química dos constituintes da casca de arroz	28
6.10.1. Determinação de celulose	28
6.10.2. Determinação de lignina	29
6.10.3. Determinação de cinza	30
6.10.4. Determinação de hemicelulose	30
6.11. Determinação de proteínas solúveis e proteínas miceliárias	30
6.12. Análise de aminoácidos na casca de arroz e na massa miceliar	31
6.13. Hidrólise em ácido trifluoracético e análise de açúcares na casca de arroz (sem pré-tratamento e tratada com clorito de sódio)	31
6.14. Sacarificação enzimática da casca de arroz uti-	

Página

lizando-se celulase	32
6.14.1. Atividade da celulase em papel de filtro Whatman nº 1	32
6.14.2. Sacarificação da casca de arroz	32
6.15. Quimiluminescência da casca de arroz	33
6.16. Espectros na região de infravermelho	33
6.17. Espectros de fluorescência	33
6.18. Análise termogravimétrica das ligninas-dioxano isoladas	34
6.19. Microscopia eletrônica	34
6.20. Espectros de fotoacústica	34
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
7.1. Pré-extração da casca de arroz	36
7.2. Os pré-tratamentos	36
7.3. Medida da massa seca no crescimento fúngico ...	41
7.3.1. Crescimento fúngico de lignina-dioxano de casca de arroz tratada fotoquimicamente	41
7.3.2. Crescimento fúngico de casca de arroz tratada fotoquimicamente	42
7.3.3. Crescimento fúngico de casca de arroz tratada fotoquimicamente e com água oxigenada em meio básico	43
7.3.4. Crescimento fúngico de casca de arroz tratada fotoquimicamente e com ozônio ..	44
7.3.5. Crescimento fúngico de casca de arroz tratada fotoquimicamente e com solução de clorito de sódio	45

7.4.	Determinação da massa do micélio após crescimento fúngico das cascas de arroz tratadas e não tratada	46
7.5.	Composição química da casca de arroz	48
7.6.	Análise de proteína solúvel e insolúvel nas amostras obtidas do crescimento fúngico	49
7.6.1.	Pré-tratamento fotoquímico	50
7.6.2.	Pré-tratamento fotoquímico e com água oxigenada	51
7.6.3.	Pré-tratamento fotoquímico e com ozônio .	52
7.6.4.	Pré-tratamento fotoquímico e com clorito de sódio	53
7.7.	Análise de aminoácidos na casca de arroz e na massa miceliar	54
7.8.	Hidrólise da casca de arroz (não tratada e tratada com clorito de sódio) em ácido trifluoracético e sua análise de açúcares	57
7.9.	Sacarificação enzimática da casca de arroz utilizando-se celulase	59
7.9.1.	Atividade da celulase em papel de filtro Whatman nº 1	59
7.9.2.	Sacarificação da casca de arroz	60
7.10.	Modificações estruturais da casca de arroz	61
7.10.1.	Quimiluminescência	61
7.10.2.	Espectros na região de infravermelho ...	68
7.10.3.	Fluorescência	74
7.10.4.	Análise termogravimétrica das ligninas-dioxano isoladas	78

	<u>Página</u>
7.10.4.1. Pirólise das ligninas obtidas	81
7.10.5. Microscopia eletrônica	84
7.10.6. Espectros de fotoacústica	88
8. CONCLUSÕES	91
APÊNDICE	94
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	108

INDICE DE TABELAS

	<u>Página</u>
Tabela 1. Composição de alguns resíduos celulósicos .	2
Tabela 2. Rendimento obtido na extração de lignina-di- oxano de casca de arroz irradiada	41
Tabela 3. Crescimento fúngico de lignina-dioxano de casca de arroz tratada fotoquimicamente ...	42
Tabela 4. Crescimento fúngico de casca de arroz trata- da fotoquimicamente	43
Tabela 5. Crescimento fúngico de casca de arroz trata- da fotoquimicamente e com água oxigenada em meio básico	44
Tabela 6. Crescimento fúngico de casca de arroz trata- da fotoquimicamente e com ozônio	45
Tabela 7. Crescimento fúngico de casca de arroz trata- da fotoquimicamente e com solução de clori- to de sódio	46

Tabela 8.	Massa miceliar obtida do tratamento fúngico de casca de arroz pré-tratada	47
Tabela 9.	Composição química da casca de arroz	48
Tabela 10.	Curva de calibração de absorbância a 540 nm X concentração de albumina para soluções analisadas com o reagente de Biureto	49
Tabela 11.	Determinação pelo método de Biureto de proteína solúvel e insolúvel de amostras pré-tratadas fotoquimicamente e obtidas após tratamento fúngico	50
Tabela 12.	Determinação pelo método de Biureto de proteína solúvel e insolúvel de amostras pré-tratadas fotoquimicamente e com água oxigenada e obtidas após tratamento fúngico	51
Tabela 13.	Determinação pelo método de Biureto de proteína solúvel e insolúvel de amostras pré-tratadas fotoquimicamente e com ozônio e obtidas após tratamento fúngico	52
Tabela 14.	Determinação pelo método de Biureto de proteína solúvel e insolúvel de amostras pré-tratadas fotoquimicamente e com clorito de sódio e obtidas após tratamento fúngico	53
Tabela 15.	Composição centesimal de aminoácidos das proteínas de casca de arroz tratada e não tratada	55
Tabela 16.	Composição centesimal de aminoácidos das pro-	

teínas provenientes do tratamento fúngico de casca de arroz tratada e não tratada	56
Tabela 17. Análise de açúcares provenientes da hidrólise em ácido trifluoracético de casca de arroz sem pré-tratamento e tratada com clorito de sódio	58
Tabela 18. Curva de calibração de absorbância a 550 nm X massa de glicose para soluções analisadas com ácido 3,5-dinitrossalicílico	59
Tabela 19. Massa de glicose obtida de soluções analisadas com ácido 3,5-dinitrossalicílico, após hidrólise enzimática com celulase comercial .	61
Tabela 20. Intensidade quimiluminescente obtida de casca de arroz irradiada a diferentes fluências em meio básico	62
Tabela 21. Intensidade quimiluminescente obtida de casca de arroz irradiada a diferentes fluências e tratada quimicamente	63
Tabela 22. Principais bandas de absorção na região de <u>infravermelho</u> de ligninas	69
Tabela 23. Comprimentos de onda de emissão máxima fluorescente ($\lambda_{exc} = 360$ nm) de ligninas-dioxano extraídas de casca de arroz irradiada	75
Tabela 24. Temperaturas correspondentes aos pontos de <u>inflexão</u> de termogramas obtidos de ligninas-dioxano obtidas de casca de arroz irradiada	80

Página

Tabela 25. Energia de ativação da reação de pirólise de ligninas-dioxano extraídas de casca de arroz irradiada a diferentes fluências	83
---	----

INDICE DE FIGURASPágina

Figura 1. Estrutura da molécula de celulose	3
Figura 2. Zona cristalina e amorfa nas fibrilas ou protofibrilas	3
Figura 3. Estrutura representativa de uma lignina de madeira dura	5
Figura 4. Aproveitamento de resíduos lignocelulósicos através de processos físico-químicos	6
Figura 5. Aproveitamento de resíduos lignocelulósicos através de processos bioquímicos	6
Figura 6. Principais vias para o aproveitamento de resíduos lignocelulósicos	8
Figura 7. Esquema de procedimento para a obtenção de celulose de baixa cristalinidade	11
Figura 8. Esquema de atuação das enzimas na hidrólise enzimática	14
Figura 9. Fotodegradação de lignina	37
Figura 10. Ação de peróxido de hidrogênio em estruturas quinoídas de lignina	38

Figura 11. Mecanismo de degradação de lignina por ozônio	39
Figura 12. Degradação oxidativa de lignina por dióxido de cloro	40
Figura 13. Intensidade quimiluminescente obtida da casca de arroz irradiada a diferentes fluências em meio básico	64
Figura 14. Intensidade quimiluminescente obtida da casca de arroz irradiada a $\lambda \gg 254$ nm e tratada quimicamente	66
Figura 15. Intensidade quimiluminescente obtida da casca de arroz irradiada a $\lambda \gg 300$ nm e tratada quimicamente	67
Figura 16. Espectro de absorção na região de infravermelho de lignina-dioxano extraída de casca de arroz irradiada	72
Figura 17. Espectro de absorção na região de infravermelho de lignina irradiada durante doze horas a $\lambda \gg 300$ nm, extraída de casca de arroz	73
Figura 18. Espectros de emissão fluorescente de ligninas dioxano extraídas de casca de arroz irradiada a $\lambda \gg 300$ nm ($\lambda_{exc} = 360$ nm)	76
Figura 19. Espectros de emissão fluorescente de ligninas dioxano extraídas de casca de arroz irradiada a $\lambda \gg 254$ nm ($\lambda_{exc} = 360$ nm)	77
Figura 20. Termograma obtido da análise termogravimétri-	

Página

ca de lignina-dioxano extraída de casca de ar roz	79
Figura 21. Estrutura do grão de arroz	87
Figura 22. Espectros de fotoacústica obtidos de casca de arroz pré-tratada fotoquimicamente ou quimica mente	90

RESUMO

Chrysonilia sitophila (TFB 27441) é um fungo que consegue transformar, em elevado rendimento e curto espaço de tempo, casca de arroz em proteína unicelular.

O rendimento e/ou a qualidade da proteína unicelular obtida puderam ser melhorados utilizando-se um pré-tratamento químico ou fotoquímico em separado.

Os pré-tratamentos fotoquímicos estudados foram irradiação a comprimentos de onda maiores que 254nm e 300 nm e os químicos foram água oxigenada em meio básico, ozônio e clorito de sódio.

Dos resultados obtidos, o pré-tratamento fotoquímico mostrou ser o mais eficiente, com significativo aumento na massa fúngica e no teor de proteínas totais.

A análise de aminoácidos nas cascas pré-tratadas não apresentou alterações significativas, mas com relação à análise da massa fúngica foram notadas modificações marcantes nos teores de aminoácidos tanto essenciais quanto não essenciais.

Dados de quimiluminescência sugerem que a casca de arroz quando em meio básico, provoca na lignina a perda de suas propriedades antioxidantes, possibilitando assim um ataque fúngico mais eficiente.

A hidrólise da casca de arroz em ácido trifluoracético mostrou que esta reação é viável, do ponto de vista químico, e que o pré-tratamento com clorito de sódio não altera significativamente o teor de glicose obtida.

A hidrólise enzimática das cascas de arroz, usando celulase comercial, mostrou que as cascas tratadas com luz e com clorito de sódio inibem parcialmente a enzima e aquelas tratadas com água oxigenada e ozônio são favorecidas.

Micrografias obtidas de casca de arroz mostram, do ponto de vista morfológico, que os pré-tratamentos atingem principalmente as camadas da epiderme inferior e o parênquima e que eles não chegam a atingir a organização celular da casca.

A emissão fluorescente de lignina-dioxano extraída de casca de arroz irradiada a comprimentos de onda maiores que 300 nm sugere que a fotólise da casca provoca na lignina o aparecimento de estruturas do tipo vanilina e ácido vanilpirúvico e que a irradiação a comprimentos de onda maiores que 254 nm provoca o aparecimento de estruturas estilbênicas.

A energia de ativação da reação de pirólise de lignina-dioxano foi calculada através de dados termogravimétricos.

SUMMARY

Chrysonilia sitophila (TFB 27441) is a fungus which is able to convert very efficiently rice hull in single cell protein.

The yield and/or the quality of the single cell protein were improved by chemical or photochemical pre-treatment alone.

The photochemical pre-treatments studied were irradiation at wavelengths higher than 254 nm and 300 nm and the chemical treatments were basic hydrogen peroxide, ozone and sodium chlorite.

The results have shown the photochemical pre-treatment to be the most efficient one, with significant increase in the fungal growth and in the total protein content.

The aminoacid analyses in the pre-treated rice hull have shown no significant changes but the fungal growth showed remarkable modifications in the aminoacid contents regarding both essential and no-essential aminoacids.

Chemiluminescence data suggest the loss of lignin antioxidant properties when rice hull is treated under alkaline conditions, making the fungal attack more efficient.

Rice hull hydrolysis with trifluoroacetic acid showed this reaction to be possible in the chemical sense and that pre-treatment with sodium chlorite did not change significantly the glucose content obtained.

Enzymatic hydrolysis of the rice hull with commercial cellulase showed that treatment with light and sodium chlorite inhibits the enzyme action while hydrogen peroxide and ozone treatments are favoured.

Photomicrographs obtained from the rice hull have shown that pre-treatments change mainly inner epidermis and parenchyma and that they do not change cellular organization of the hull.

Fluorescent emission of the lignin-dioxane extracted from irradiated ($\lambda > 300$ nm) rice hull suggest the formation of structures related to vanillin and vanilpyruvic acid while irradiation at wavelenghts longer than 254 nm leads to the appearance of stilbenic structures.

SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

PUC	= Proteína unicelular
λ	= Comprimento de onda
λ_{exc}	= Comprimento de onda de excitação
A_{λ}	= Absorbância da solução no comprimento de onda
$\Delta(\%)$	= Diferença percentual em relação ao controle
Σ	= Somatória
ue	= Unidade de enzima
T_1, T_2 e T_3	= Temperaturas correspondentes aos pontos de inflexão das curvas termogravimétricas
CA	= Casca de arroz
CAT	= Casca de arroz pré-tratada quimicamente
LD CA	= Lignina-dioxano extraída de casca de arroz
LD CA XXX YH	= Lignina-dioxano extraída de casca de arroz irradiada a comprimentos de onda superiores a XXX nm durante Y horas
CA XXX YH	= Casca de arroz irradiada a comprimentos de onda superiores a XXX nm durante Y horas
CAT XXX YH	= Casca de arroz irradiada a comprimentos de onda superiores a XXX nm durante Y horas e tratada quimicamente
CA H ₂ O ₂	= Casca de arroz pré-tratada com água oxigenada em meio básico
CA O ₃	= Casca de arroz pré-tratada com ozônio gasoso
CA ClO ₂ ⁻	= Casca de arroz pré-tratada com solução de clorito de sódio
CMCS	= Chelating Metal Caustic Swelling

1. INTRODUÇÃO

Nos dias de hoje, parece claro que a biomassa (primária e residual) será num futuro muito breve a principal fonte de recursos que contará a humanidade para obtenção de alimentos, produtos químicos orgânicos e combustíveis líquidos e gasosos, devido ao esgotamento e encarecimento crescente da biomassa fóssil (petróleo, carvão e gás natural)⁽¹⁻⁴⁾.

Neste sentido, os resíduos de caráter lignocelulósico constituem uma matéria prima renovável e abundante cujo aproveitamento é desejável e tem provocado um interêsse crescente pelos processos microbiológicos.

As vantagens destes processos podem ser resumidas em:

- O consumo de energia é reduzido e se aumenta a segurança, pois geralmente se opera a pressões e temperaturas próximas às do ambiente.

- Diminui-se a poluição ambiental, pois se utilizam resíduos que necessitam ser eliminados.

- Aumenta-se a produtividade e o aproveitamento da matéria prima, como se deduz ao comparar os tempos de duplicação dos microorganismos com os das plantas e animais superiores e a seletividade de uma reação enzimática com a de uma reação química não biológica.

A aplicação dos desenvolvimentos tecnológicos da indústria química e os recentes avanços da engenharia genética nos processos microbiológicos têm garantido que a biotecnologia se converta em uma das áreas do conhecimento mais dinâmicas e inovadoras dos anos oitenta.

1.1. Composição e recursos disponíveis

Os resíduos lignocelulósicos são formados basicamente de celulose, hemicelulose e lignina. A Tabela 1 mostra os valores dos componentes de alguns resíduos celulósicos⁽⁵⁾.

TABELA 1. Composição de alguns resíduos celulósicos.

Fonte	Celulose(%)	Hemicelulose(%)	Lignina(%)
Lixo Urbano	61	2	9
Madeiras moles	45-50	25-35	25-35
Madeiras duras	40-55	24-40	18-25
Forragens, palha de cereais, bagaço de cana, etc.	25-40	25-50	10-30

Do ponto de vista químico, a celulose é um polímero linear, de cadeia longa, formado de unidades de anidroglicopiranose, unidas por ligações β -1,4. Esta ligação é o resultado da eliminação de uma molécula de água das hidroxilas dos carbonos 1 e 4 de duas unidades de glicose adjacentes. A posição β da hidroxila do carbono 1, faz necessário que a unidade seguinte de glicose dê um giro de 180° em torno do eixo C1-C4 do anel piranosídico. Assim sendo, a unidade que realmente se repete no polímico é a celobiose. A estrutura da molécula de celulose é representada na Figura 1.

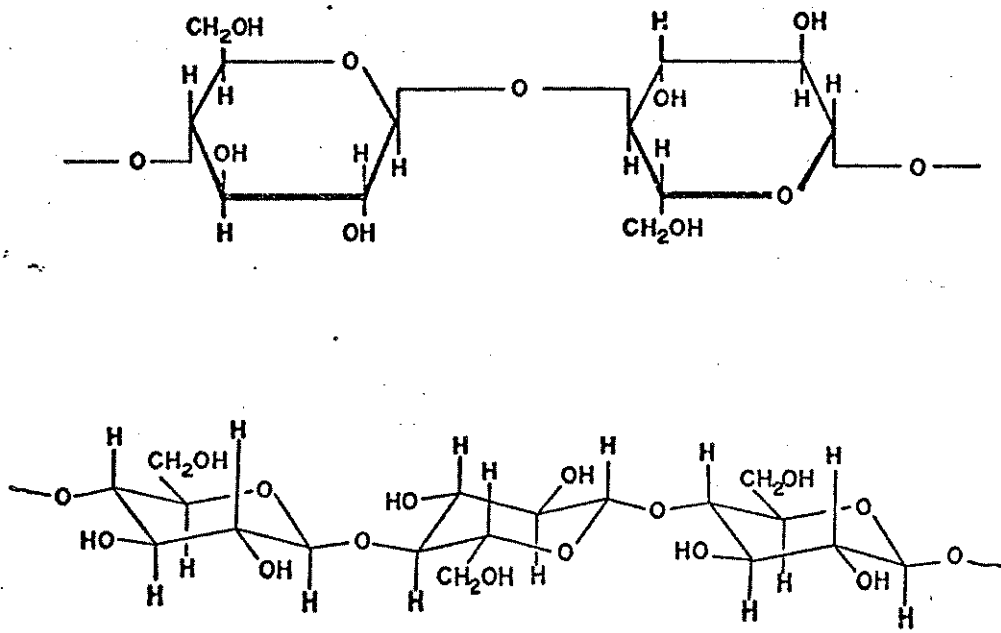


FIGURA 1. Estrutura da molécula de celulose.

A linearidade e as inúmeras hidroxilas presentes nas moléculas de celulose fazem com que elas se associem paralelamente através de ligações do tipo ponte de hidrogênio. Estas associações são chamadas de fibrilas ou protofibrilas e apresentam duas zonas de diferentes arranjos (Figura 2): uma zona cristalina caracterizada por uma grande quantidade de moléculas orientadas e uma zona amorfa onde se nota uma certa desorganização.

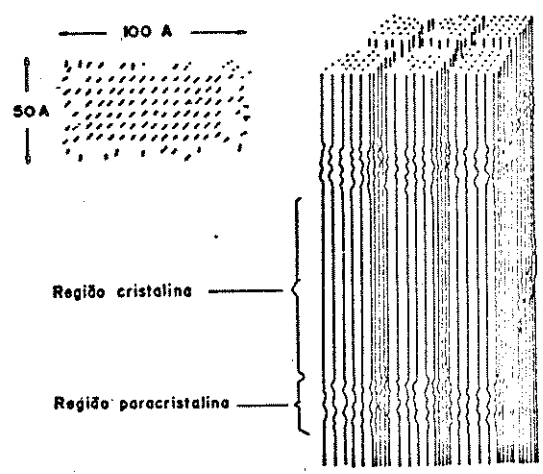
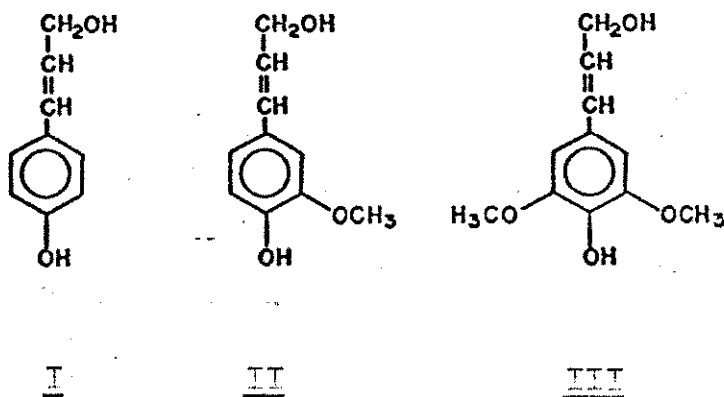


FIGURA 2. Zona cristalina e amorfa nas fibrilas ou protofibrilas.

A hemicelulose difere da celulose pela variedade de açúcares que a forma, pelo tamanho de suas moléculas que são menores e pelas ramificações apresentadas.

Os seus principais formadores são pentoses (xilose e arabinose), hexoses (glicose, galactose e manose) e alguns açúcares ácidos (ácidos hexurônicos).

A lignina é um polímero tridimensional formado por unidades de fenilpropano com hidroxilas fenólicas em posição para e derivadas dos álcoois p-cumarílico (I), coniferílico (II) e sinapílico (III).



As madeiras moles são aquelas formadas por ligninas provenientes principalmente do álcool coniferílico (II), as madeiras duras possuem ligninas derivadas dos álcoois coniferílico (II) e sinapílico (III) e as gramíneas possuem lignina dos três álcoois citados.

Devido à complexidade de sua molécula e à variedade de

tipos de ligações existentes, a estrutura da lignina é representada de forma esquemática. Kirk cita a estrutura da Figura 3 como sendo representativa de uma lignina de madeira dura⁽⁶⁾.

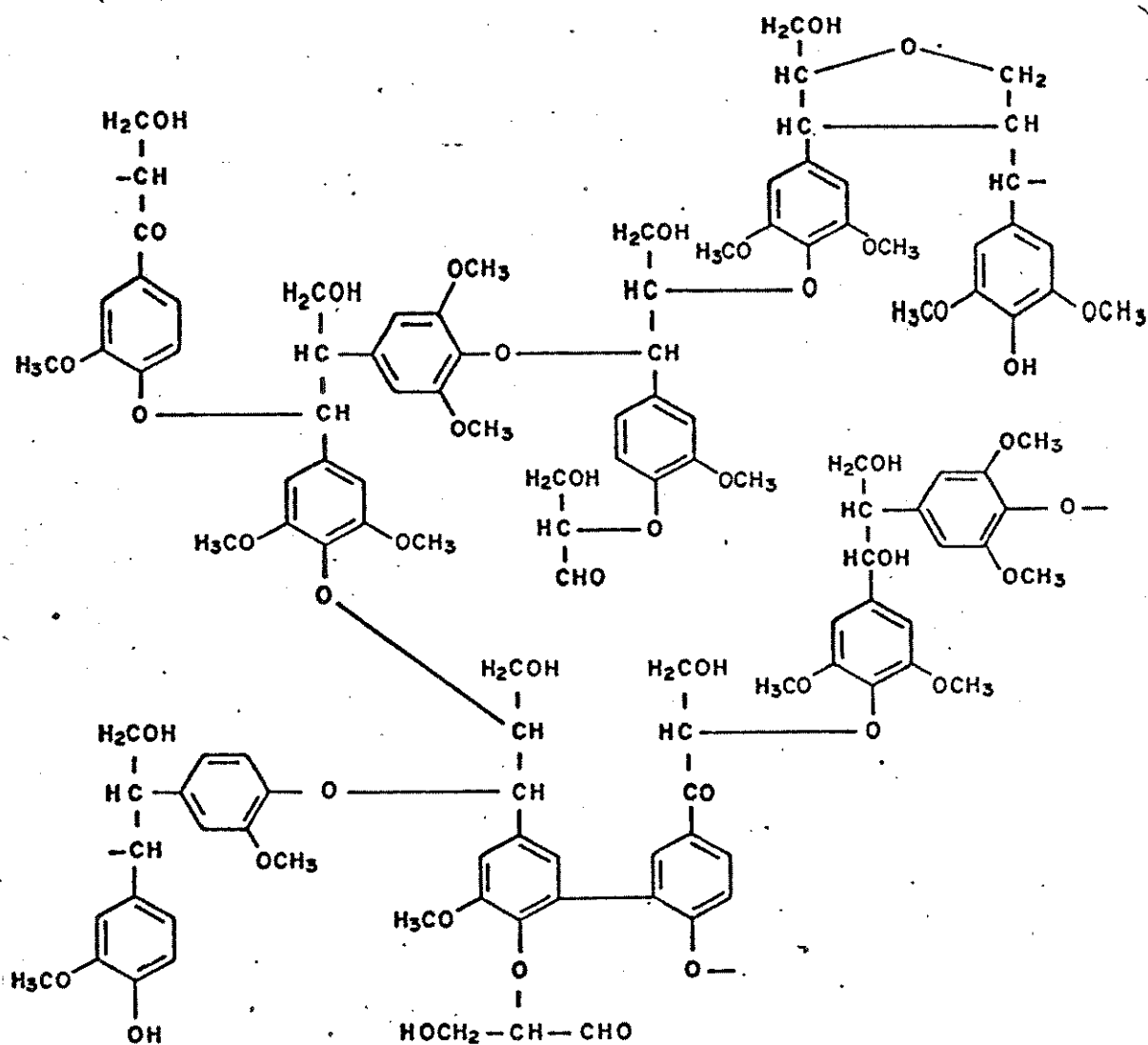


FIGURA 3. Estrutura representativa de uma lignina de madeira dura.

1.2. Aproveitamento de resíduos celulósicos

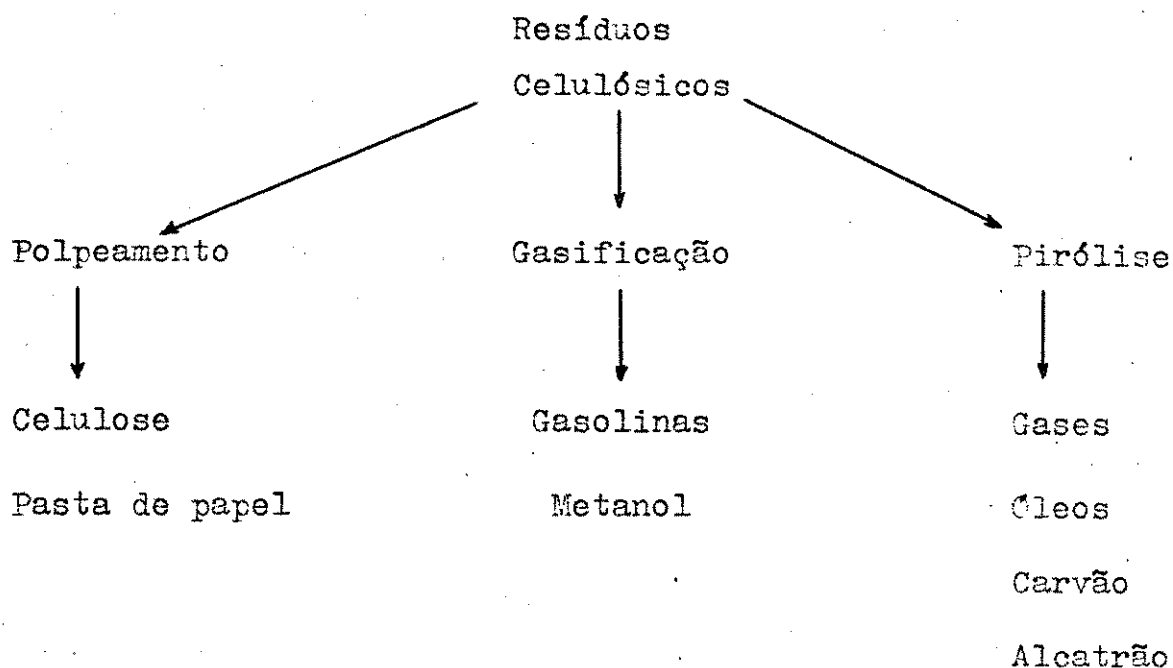


FIGURA 4. Aproveitamento de resíduos lignocelulósicos através de processos físico-químicos.

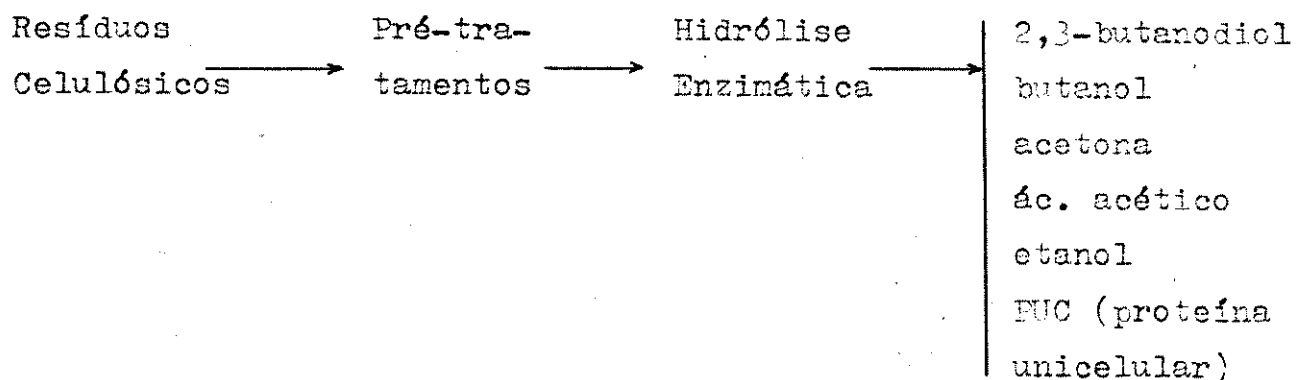


FIGURA 5. Aproveitamento de resíduos lignocelulósicos através de processos bioquímicos.

Nos esquemas das Figuras 4 e 5, indica-se as principais vias para o aproveitamento dos resíduos lignocelulósicos. Apesar da pirólise e gasificação estarem recebendo alguma atenção (7-12), as vias mais promissoras parecem ser aquelas baseadas em processos bioquímicos e principalmente as que conduzem a obtenção de etanol e a produção de biomassa (PUC).

A via do etanol é importante devido a sua utilização como matéria prima básica na indústria química e como combustível em motores de explosão (13-14).

Por outro lado, os resíduos celulósicos se caracterizam pelo seu baixo conteúdo em proteínas e digestibilidade, o que dificulta a sua utilização como alimentação animal no seu estado original. Porém, quando são submetidos a tratamentos simples como maceração com soluções de NaOH, sua digestibilidade pode ser aumentada consideravelmente.

Se após o pré-tratamento, se emprega o material lignocelulósico como substrato para o crescimento de microorganismos, pode-se aumentar o conteúdo de proteínas fazendo com que a biomassa obtida substitua satisfatoriamente a ração animal.

No esquema da Figura 6 se mostram as etapas necessárias para a produção de etanol e PUC. São realizados pré-tratamentos seguidos de hidrólise enzimática; em seguida se submete o resíduo sólido a uma fermentação aeróbica, para a obtenção de PUC ou anaeróbica para produzir etanol (15).

Resíduos Celulósicos

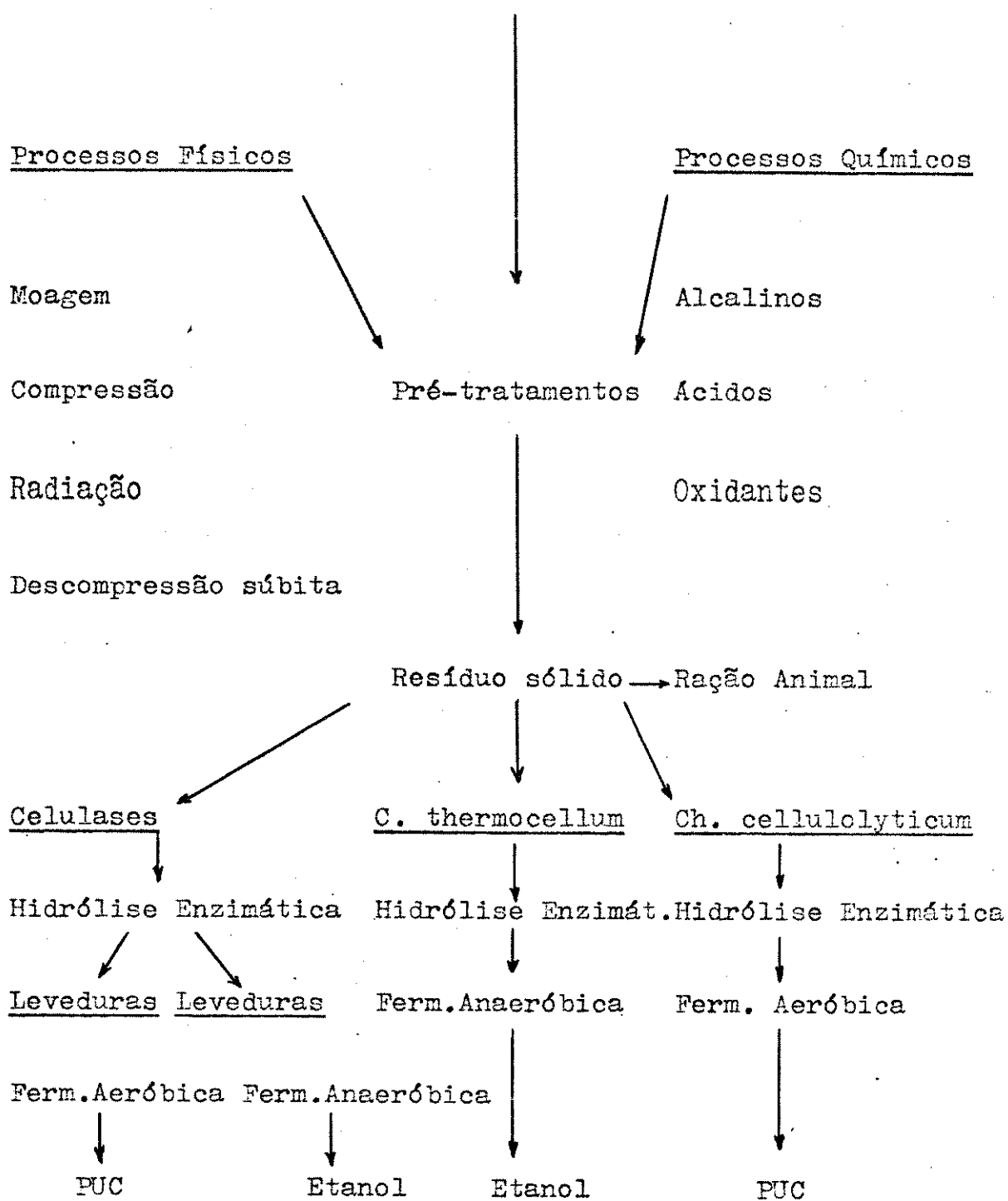


FIGURA 6. Principais vias para o aproveitamento de resíduos lignocelulósicos.

2. PRÉ-TRATAMENTOS

A maior dificuldade para o aproveitamento dos resíduos lignocelulósicos, na obtenção de etanol ou PUC, vem a ser a quebra das ligações glicosídicas β -1,4 para liberar as moléculas de glicose e celobiose que posteriormente serão fermentadas a etanol ou PUC⁽¹⁶⁾.

A reação de hidrólise propriamente dita não é limitante na velocidade do processo, pois a dificuldade consiste na possibilidade do ácido ou enzima alcançar os lugares de reação.

Como a celulose nativa está protegida por uma barreira física formada por lignina e sua própria estrutura cristalina, é interessante então realizar pré-tratamentos que possibilitem diminuir ou mesmo alterar o polímero lignina, reduzir a cristalinidade da celulose e aumentar a sua área superficial.

O pré-tratamento ideal, que pode ser diferente para uma ou outra matéria prima, deve ser econômico, ou seja, deve requerer pouco investimento em equipamento, consumir quantidade razoável de energia, utilizar reagentes baratos e facilmente recuperáveis, ser aplicável a várias matérias primas, etc.

Os pré-tratamentos se classificam em físicos, químicos e biológicos e alguns processos são combinações de dois ou mais pré-tratamentos aplicados simultaneamente ou em sequência.

Os pré-tratamentos físicos podem ser divididos em mecânicos e não mecânicos. Os primeiros utilizam forças de impacto ou cisalhamento que conseguem dividir o material lignocelulósico em partículas menores. A relação superfície/volume torna-se maior, fazendo a celulose menos cristalina e mais suscetível à hidrólise.

Os moinhos de bolas, rolos, martelos, etc, são exemplos típicos⁽¹⁷⁻¹⁸⁾.

Os pré-tratamentos físicos não mecânicos causam decomposição e solubilização de uma fração da lignina. Entre estes pode-se citar tratamentos com radiações⁽¹⁹⁻²⁰⁾ e a utilização de vapor a altas pressões seguida de descompressão rápida⁽²¹⁻²²⁾.

Os pré-tratamentos químicos são utilizados para remover a lignina que rodeia a celulose e destruir sua estrutura cristalina; são utilizados principalmente na indústria de papel.

Mesmo levando-se em conta que os pré-tratamentos químicos são bastante eficientes, eles possuem algumas desvantagens que não podem ser ignoradas, ou seja, eles são caros para serem utilizados em material lignocelulósico e requerem equipamento especial resistente a corrosão.

Os pré-tratamentos químicos mais usados são aqueles que utilizam soluções diluídas de NaOH ou NH_4OH ⁽²³⁻²⁷⁾ e através de les consegue-se aumentar a área superficial através do inchaço das fibras de celulose.

Os pré-tratamentos ácidos⁽²⁸⁻²⁹⁾ utilizam geralmente ácido sulfúrico diluído e eliminam a maior parte da hemicelulose presente.

Além destes tratamentos mencionados, existem outros que se baseiam na oxidação da lignina e sua posterior solubilização.

Os agentes oxidantes mais utilizados são oxigênio⁽³⁰⁻³²⁾, ozônio⁽³³⁻³⁵⁾ e água oxigenada em meio básico⁽³⁶⁾.

Geralmente, os pré-tratamentos químicos são mais eficientes que os físicos⁽³⁷⁻³⁸⁾ e Fan e colaboradores⁽³⁹⁾ mencionam que para a palha de arroz, o tratamento físico mais eficiente é o moí

inho de bolas e entre os químicos, a ação de NaOH a quente.

Este último tratamento apresenta a vantagem de aumentar consideravelmente a digestibilidade dos resíduos lignocelulósicos⁽⁴⁰⁾.

Um enfoque diferente do problema consiste na separação dos três componentes (hemicelulose, celulose e lignina) utilizando solventes específicos para hemicelulose e celulose, ficando a lignina como resíduo sólido⁽⁴⁰⁾. O procedimento é esquematizado na Figura 7.

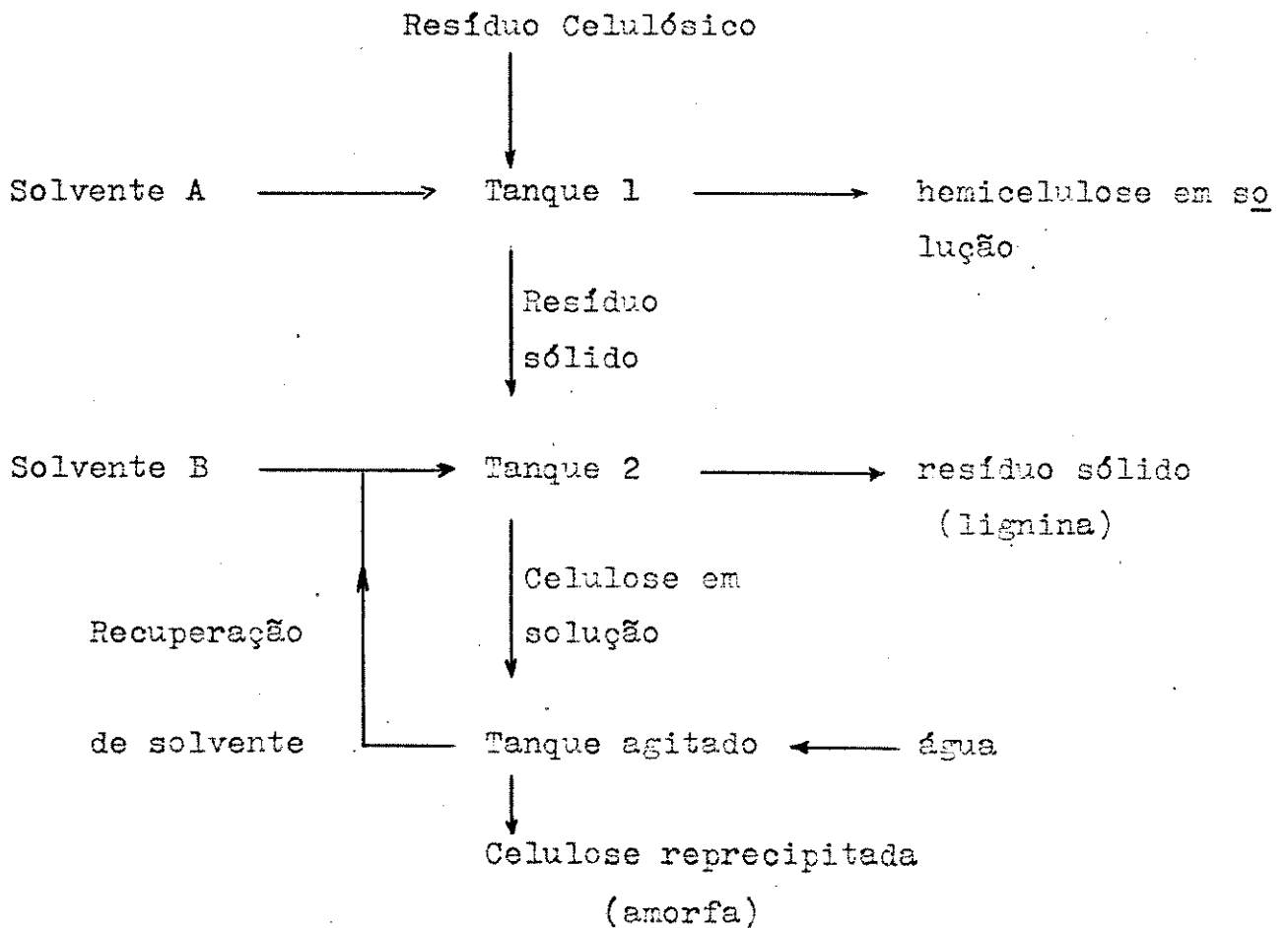


FIGURA 7. Esquema de procedimento para a obtenção de celulose de baixa cristalinidade

O solvente para hemicelulose (solvente A), pode ser tanto um ácido como uma base diluído e a quente; os solventes de celulose (solvente B) são agentes de inchaço que provocam a separação e ruptura das fibras da celulose nativa.

Os solventes de celulose mais conhecidos são o Cadoxen e o CMCS que são respectivamente complexos de cádmio e ferro.

Os pré-tratamentos biológicos utilizam microorganismos que atacam a madeira e conseguem degradar lignina e/ou celulose.

São classificados em bactérias, fungos de putrefação branca, fungos de putrefação marrom e fungos de putrefação amarela.

Desses microorganismos citados, o fungo de putrefação branca parece ser o mais eficiente para o pré-tratamento de lignocelulósicos; possui cerca de mil espécies, das quais poucas delas foram examinadas⁽⁴¹⁾ com relação a decomposição de ligninas.

A degradação da lignina ocorre pelo ataque de ligninase aos resíduos fenólicos com desmetilação e quebra de anel.

Estudos feitos com palha de trigo mostram que 45% da lignina pode ser degradada quando se usa o microorganismo Cia-
thus stercoreus⁽⁴²⁾.

A deslignificação biológica parece ser uma técnica bastante promissora, mas tem sido evitada em escala industrial devido a sua baixa velocidade. Existe porém a possibilidade de acelerar o processo através de modificações genéticas do microorganismo e/ou do uso de um tratamento físico ou químico do substrato antes do tratamento biológico.

3. HIDRÓLISE DE RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS

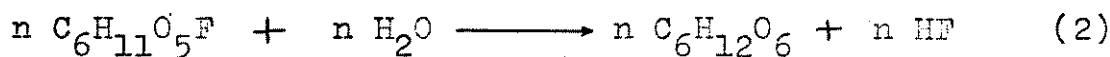
Depois de realizados os pré-tratamentos adequados, o passo seguinte para produzir etanol ou PUC é hidrolisar a celulose de tal modo que ela possa ser aproveitada por microorganismos. Esta hidrólise pode ser ácida ou enzimática.

3.1. Hidrólise Ácida

Quando se usa ácidos fortes, concentrados e a quente na hidrólise de lignocelulósicos, os pré-tratamentos são desnecessários; mas devido às altas temperaturas utilizadas ($\sim 200^\circ\text{C}$), além de se obterem produtos de degradação indesejáveis, o problema de corrosão do reator e o alto custo de recuperação do reagente devem ser levados em conta.

Apesar das considerações acima, tem sido usado HF líquido ou gasoso na hidrólise de resíduos celulósicos⁽⁴³⁻⁴⁴⁾.

As reações envolvidas são representadas abaixo:



As vantagens que este procedimento apresenta são seu alto rendimento em glicose, da ordem de 90 %, tempos curtos de reação (30 min) e baixas temperaturas ($0-25^\circ\text{C}$); por outro lado, as desvantagens são alto custo e toxicidade do HF, sendo necessário a sua recuperação.

Apesar das desvantagens, este processo parece ser economicamente viável mesmo quando comparado com processos enzimáticos⁽⁴⁴⁾.

3.2. Hidrólise Enzimática

Dentre os fungos que produzem enzimas extracelulares capazes de hidrolisar celulose destaca-se Trichoderma reesei que é reconhecidamente a melhor fonte de produção industrial de celulases⁽⁴⁵⁾.

Estas enzimas são usadas para descrever o modelo para a hidrólise de celulose e Eveleigh e colaboradores⁽⁴⁶⁾ sugerem que o "complexo celulase" envolve no mínimo três delas que são caracterizadas pelo seu modo de ação:

1. β -1,4-glicano-glicanoidrolase (EC3.2.1.4, C_x , endoglicanase)
2. β -1,4-glicano-celobioidrolase (EC3.2.1.91, C_1 , celobioidrolase)
3. β -1,4-glicosidase (EC3.2.1.21, celobiase)

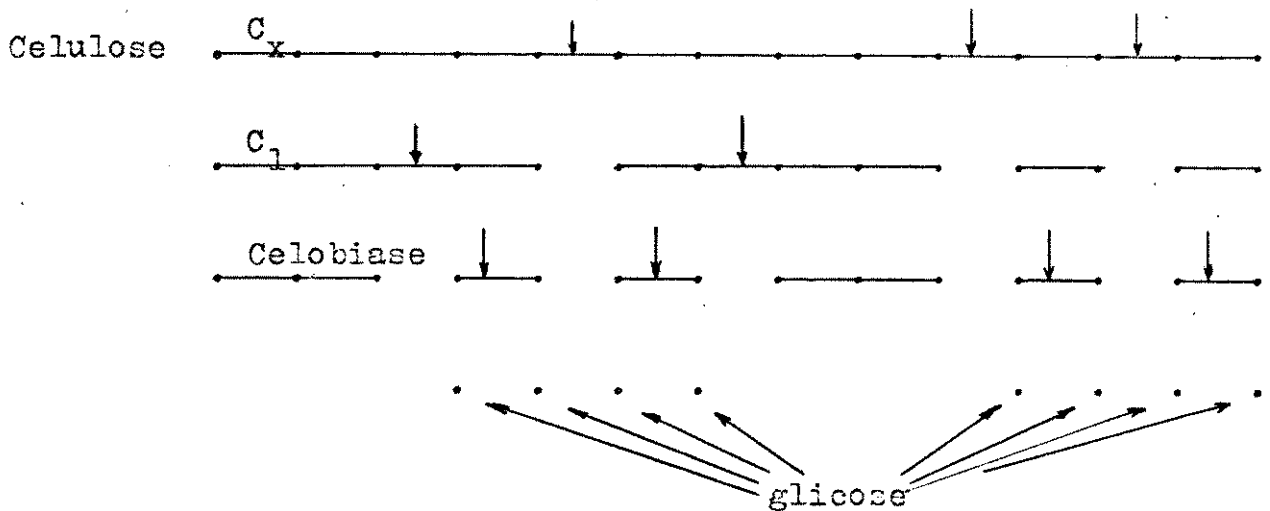


FIGURA 8. Esquema de atuação das enzimas na hidrólise enzimática

Como mostrado na Figura 8, as endoglicanases clivam a celulose nativa ao acaso, possibilitando a formação de cadeias menores, de celobiose e de glicose.

As exoglicanases atuam nas extremidades não redutoras das cadeias, separando moléculas de celobiose e finalmente as glicosidases hidrolisam a celobiose a glicose.

Como o substrato é insolúvel em solução aquosa, as enzimas terão que dirigir-se à sua superfície onde serão adsorvidas para poderem reagir.

Dois fatores devem ser considerados na hidrólise enzimática:

- a. A natureza e produção de celulases.
- b. A natureza do substrato e as interações enzima-substrato.

3.2.1. Produção de Celulases

As celulases mais ativas são aquelas provenientes do Trichoderma reesei, Pleurotus sajor-caju e Aspergillus wentii ⁽⁴⁷⁾.

Todos os microorganismos citados sofrem inibição de catabólitos, principalmente glicose; por isso, a produção de celulases é geralmente realizada fora dos processos de hidrólise propriamente ditos ⁽⁴⁸⁾.

Dos microorganismos acima, o Trichoderma reesei é o mais utilizado por produzir celulases relativamente equilibradas e em alto rendimento. Entretanto é frequente que as celulases sejam deficientes em β -1,4-glicosidase, o que tem motivado estudos no sentido de melhorar as fontes de celulases.

Assim sendo, na literatura aparecem trabalhos que se utilizam de mutantes ou outros fungos celulolíticos tais como Trichoderma reesei QM 6a⁽⁴⁹⁾ e Schizophyllum commune⁽⁵⁰⁾, cujos resultados obtidos indicam que as celulases provenientes desses microorganismos possuem alto conteúdo em β -glicosidase mas são deficientes em exoglicanases.

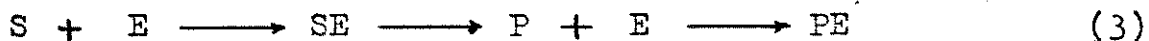
Por outro lado, a produção de celulases a partir de Thermonospora sp., tem o inconveniente de originar endo e exoglicanases que são inibidas pela celobiose, além do que suas β -glicosidases são termicamente instáveis⁽⁵¹⁾.

Atualmente as pesquisas são dirigidas no sentido de se encontrar microorganismos celulolíticos, termofílicos, aeróbicos ou anaeróbicos capazes de produzir celulases em quantidade suficiente e equilibrada na sua composição, para realizar a hidrólise e fermentação simultaneamente. Neste sentido, os resultados obtidos com Chaetomium cellulolyticum⁽⁵²⁾ na obtenção de FUC e com Bacillus stearothermophilus⁽⁵³⁾ na produção de etanol, parecem ser prometedores.

3.2.2. Interações Enzima-Substrato

Para avaliar a influência da natureza do substrato e da enzima na velocidade de hidrólise, são propostos diferentes modelos cinéticos. São classificados em dois grandes grupos, dependendo se se considera o complexo enzimático e o substrato como substâncias únicas ou formadas por vários componentes.

No primeiro caso, considera-se uma cinética enzimática simples, com inibição competitiva de produto; admite-se que a reação ocorra segundo o mecanismo:



onde S e E são as concentrações de substrato e enzima, SE um complexo intermediário, P os produtos de reação e PE um complexo responsável pela inibição da enzima.

Os resultados apresentados por Koichiro e colaboradores são explicados por este mecanismo⁽⁵⁴⁾.

Henrissat e colaboradores⁽⁵⁵⁾ consideram que a enzima seja formada por três componentes e que o substrato, durante a hidrólise, origina cadeia de celulose de tamanhos variados. As três enzimas atuam simultaneamente; deste modo, as endoglicanases formam um complexo enzima-substrato com as moléculas de celulose rompendo-as ao acaso e dando cadeias mais curtas, celobiose e glicose. As celobioidrolases formam um complexo com as extremidades não redutoras formando celobiose que é hidrolisada pela celobiase a glicose. As três enzimas podem apresentar inibição por parte da celobiose e glicose.

A equação cinética para a degradação de celulose obtida segundo as hipóteses anteriores resulta extremamente complexa devido ao número de parâmetros e de concentrações de produtos intermediários, chegando a ser inviável do ponto de vista prático.

Uma solução intermediária entre o primeiro e o segundo modelo é a proposta por Saddler e colaboradores⁽⁵⁶⁾. Eles consideram o substrato formado por uma fração amorfa e outra cristalina e não diferenciam as ações de endoglicanase e celobioidrolase ou seja, admitem que a ação dessas enzimas libera celobiose que se hidrolisa em fase homogênea a glicose pela ação da celobiase.

4. PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS UNICELULARES - PUC

A utilização direta de resíduos agrícolas para alimentação animal é pouco recomendável pela sua baixa digestibilidade e baixo teor de proteínas (inferior a 8 %).

Com relação à digestibilidade, ela pode ser aumentada utilizando-se um pré-tratamento adequado e quanto ao teor de proteínas, o uso de microorganismos capazes de aproveitar estes substratos para sua nutrição e crescimento faz com que haja um enriquecimento.

A obtenção de PUC, a partir de resíduos lignocelulósicos pode seguir dois caminhos diferentes: hidrólise e fermentação consecutivas ou hidrólise e fermentação simultâneas.

4.1. Hidrólise e Fermentação Consecutiva

As etapas deste processo são: pré-tratamento, hidrólise enzimática com celulasas e finalmente uma fermentação aeróbica com levedura.

Humphrey⁽⁵⁷⁾ propôs um processo para o aproveitamento de lixo urbano, cujas vantagens se baseiam na utilização de leveduras cujo crescimento é rápido e no pH 4,5-5,5 que minimiza a competição de bactérias, melhorando as condições de assepsia.

As desvantagens deste procedimento residem em ser um processo mais lento e mais caro que a hidrólise enzimática ou ácida.

4.2. Hidrólise e Fermentação Simultânea

Uma outra alternativa é a utilização de microorganismos celulolíticos de rápido crescimento tais como Chaetomium cellulolyticum para a hidrólise e fermentação aeróbica simultânea, que foi proposto por Moo-Young e colaboradores e desenvolvido na Universidade de Waterloo⁽⁵⁸⁾.

Mediante este processo que utiliza resíduos agrícolas térmica e quimicamente pré-tratados e fermentação semi-sólida, consegue-se um produto que contém 35 % de proteína e se destina a ração animal.

5. OBJETIVOS DO TRABALHO

Como na maior parte dos processos, vistos anteriormente, a etapa determinante na produção de etanol ou PUC é a hidrólise enzimática, é conveniente a realização de estudos que conduzam a um melhor conhecimento deste fenômeno.

Os seguintes pontos merecem então destaque:

- a. Estudar um microorganismo capaz de produzir celulases e fermentar os açúcares produzidos a PUC.
- b. Propor novos pré-tratamentos, mais baratos e eficientes que os atuais, capazes de eliminar ou diminuir a barreira física da lignina e a cristalinidade da celulose.
- c. Estudar a possibilidade de efeito sinérgico nos pré-tratamentos com relação ao tratamento fúngico.

Com relação aos itens acima, nosso trabalho procurou dar ênfase ao estudo de alguns pré-tratamentos aplicados à casca de arroz com objetivo de se obter PUC, através do tratamento fúngico do substrato com o microorganismo Chrysonilia sitophila que foi recentemente isolado por nosso grupo⁽⁵⁹⁾ de um inseto xilófago, o Tribolium ferrugineum encontrado em amostras de casca de arroz procedente do estado de Goiás.

6. EXPERIMENTAL

6.1. Materiais

6.1.1. Reagentes e Procedência

Acido Acético p.a.	Merck
Acido Bórico p.a.	Merck
Acido Clorídrico p.a.	Merck
Acido Cítrico p.a.	QEEL
Acido 3,5-dinitrossalicílico p.a.	Merck
Acido Nítrico p.a.	Merck
Acido Sulfúrico p.a.	Merck
Agar U.S.P.	Biobras
Água Oxigenada p.a.	Merck
Albumina Bovina	Sigma
Alcool Etilico	Merck
Antrona p.a.	Merck
Benzeno	Merck
Bicarbonato de Sódio p.a.	Merck
Cloreto de Cálcio anidro	Ecibra
Cloreto de Potássio p.a.	Qeel
Clorito de Sódio - solução 30 % (p/v)	Hoechst
Dioxano	Carlo Erba
Fenol	Fisher
Fosfato dibásico de Potássio	Carlo Erba
Glicose	Quimis

Hidróxido de Sódio p.a.	Carlo Erba
Iodeto de Potássio p.a.	Merck
Metabissulfito de Sódio p.a.	Carlo Erba
Nitrato de Sódio p.a.	Carlo Erba
Papel de Filtro nº 1	Whatman
Pentóxido de Fósforo	Merck
Sulfato de Cobre II p.a.	Carlo Erba
Sulfato de Ferro II p.a.	Ecibra
Sulfato de Sódio p.a.	Merck
Tartarato Duplo de Sódio e Potássio p.a.	Carlo Erba

6.1.2. Instrumentação

A casca de arroz foi irradiada utilizando-se uma lâmpada de mercúrio HQL-Osram, e as velocidades de fluência foram determinadas através de um radiômetro YSI-Wettering, modelo 65A da Yellow Springs Instrument Co.

As determinações espectrofotométricas foram feitas em Espectrofotômetro Baush Lomb, Spectronic 2000.

A análise de açúcares da casca de arroz hidrolisada com ácido trifluoracético foi feita em um analisador de açúcares LC 2000 Biotronik.

A quimiluminescência da casca de arroz foi registrada num contador de cintilação Beckman LS-7000.

Espectros de fluorescência de soluções de lignina-dioxana foram obtidos através de espectrofluorímetro Perkin-Elmer MPF 44B.

As análises calorimétricas foram feitas através de um analisador termogravimétrico (951) da Du Pont Instruments.

Micrografias de amostras de casca de arroz foram obtidas utilizando-se microscópio eletrônico de reflexão JEOL JSM-P15.

Espectros de fotoacústica de casca de arroz foram obtidos num espectrofotômetro fotoacústico CAS 400 da EDT Research.

Espectros na região infravermelho foram obtidos através de espectrofotômetro infravermelho A-202 da Jasco.

A determinação de aminoácidos na casca de arroz foi feita utilizando-se um analisador de aminoácidos Beckman 119 CL.

6.1.3. Soluções Especiais

Solução de Czapek - Usada como meio de crescimento do fungo Chrysonilia sitophila.

Dissolução de 3,0 g de nitrato de sódio, 1,0 g de fosfato dibásico de potássio, 0,5 g de cloreto de potássio e 0,01 g de sulfato de ferro II, em água. Completa-se o volume a um litro.

Solução de Biureto - Usada para a determinação de proteínas solúveis e proteínas micelíares.

O reagente de Biureto é preparado dissolvendo-se 2,6 g de sulfato de cobre II e 9,0 g de tartarato duplo de sódio e potássio em 500 ml de solução de hidróxido de sódio 0,2 N contendo 5,0 g de iodeto de potássio. Eleva-se o volume a 1 l com solução 0,2 N de hidróxido de sódio.

Solução de ácido 3,5-dinitrossalicílico - Usada na de
terminação de açúcares redutores.

A solução de ácido 3,5-dinitrossalicílico foi preparada dissolvendo-se 19,8 g de hidróxido de sódio e 10,6 g de ácido 3,5-dinitrossalicílico em 1,4 l de água destilada. A essa so
lução acrescentou-se 306 g de tartarato duplo de sódio e potássio, 7,6 ml de fenol e 8,3 g de metabissulfito de sódio.

6.2. Pré-extração da casca de arroz

A casca, antes de qualquer tratamento, foi lavada com á
gua, seca em estufa, moída e peneirada.

A fração da casca que passou pela peneira de malha 0,3 mm (48 mesh), foi colocada em Soxhlet e feita extração com benzene
no-etanol 1:1 (v/v) durante 48 horas.

O produto insolúvel obtido foi seco a massa constante e mantido em dessecador.

Recuperou-se 98 % da massa original.

6.3. Irradiação

A casca de arroz foi irradiada utilizando-se uma lâmpa-de vapor de mercúrio, colocada a 17 cm de altura de uma placa de vidro 20X20 cm que continha uma monocamada de amostra.

As velocidades de fluência foram determinadas através

de um radiômetro, obtendo-se os valores de $68,4 \text{ w/m}^2$ para $\lambda \gg 300$ nm e $108,0 \text{ w/m}^2$ para $\lambda \gg 254$ nm.

Nas irradiações a $\lambda \gg 300$ nm, utilizou-se um filtro de Pyrex refrigerado a água.

Os tempos de irradiação das amostras foram 1, 3, 6 e 12 horas.

6.4. Extração de lignina-dioxano de amostras irradiadas e som irradiar

Esta extração⁽⁶⁰⁾ foi feita com a ajuda de um balão de fundo redondo de três bocas, adaptado a uma manta de aquecimento. Na boca central do balão conectou-se um condensador de refluxo e nas laterais, um funil de adição com equalizador de pressão e um tubo capilar.

Este tubo capilar foi ligado a uma torneira de três saídas, possibilitando ou a evacuação dos gases do sistema ou o borbulhamento de nitrogênio, conforme a necessidade.

No balão colocou-se 25 g de casca de arroz e no funil de adição 500 ml de solução dioxano-água 9:1 (v/v) 0,2 N em HCl.

Fechando-se o condensador de refluxo com uma tampa esmerilhada adequada, evacuou-se o sistema durante 30 minutos.

Acrescentou-se lentamente a solução do funil ao balão e borbulhou-se nitrogênio, equilibrando-se a pressão.

Retirou-se a tampa esmerilhada do condensador e aqueceu-se a solução sob refluxo durante 30 minutos.

Deixou-se esfriar a temperatura ambiente mantendo-se o fluxo de nitrogênio e filtrou-se.

O resíduo obtido foi lavado com solução de dioxano-água 9:1 (v/v) e o filtrado assim obtido foi neutralizado com bicarbonato de sódio sólido, concentrado em evaporador rotativo até 30-40 ml e adicionado lentamente a 1 l de solução de sulfato de sódio 1 % (p/v).

A lignina assim obtida foi centrifugada, lavada com água destilada, seca a massa constante e mantida em dessecador.

6.5. Pré-tratamento da casca de arroz com água oxigenada em meio básico ⁽⁶¹⁾

1,00 g de casca de arroz foi suspensa em 50 ml de água oxigenada 1 % (p/v). O pH foi ajustado a 11,5 com solução de hidróxido de sódio e deixou-se em agitação durante 24 horas.

Lavou-se a casca com água destilada até pH neutro, filtrou-se, secou-se a massa constante e mantida em dessecador.

Recuperou-se 73 % da massa de partida.

6.6. Pré-tratamento da casca de arroz com ozônio ⁽⁶²⁾

Colocou-se casca de arroz numa coluna cromatográfica (80X1 cm) e passou-se ozônio, de baixo para cima (~100 bolhas/min), durante 48 horas.

6.7. Pré-tratamento da casca de arroz com solução de clorito

de sódio (63)

Casca de arroz foi suspensa e agitada em solução (1:20, casca:solução) 2 % (p/v) de clorito de sódio e 0,4 % (v/v) de ácido acético glacial a 80-90°C durante duas horas.

Filtrou-se o sólido, lavou-se com água destilada, secou-se a massa constante e manteve-se em dessecador.

Recuperou-se 70 % da massa de partida.

6.8. Tratamento fúngico de lignina-dioxano e casca de arroz

A amostra foi suspensa em 20 ml de solução de Czapek e inoculada com 0,5 ml de suspensão do fungo Chrysosporium sitochi-
la (TEB 27441).

A mistura foi deixada em estufa a 30°C, com agitação pe-
riódica, durante 10 dias, autoclavada, filtrada e o produto inse-
lúvel seco a massa constante.

A massa deste resíduo foi chamada "massa seca".

Ensaio semelhante foram feitos deixando-se a mistura
durante 20 dias e outros foram feitos borbulhando-se oxigênio no
lugar de agitação periódica.

6.9. Determinação da massa do micélio após crescimento fúngi- co das cascas de arroz tratadas e não tratada

A determinação foi feita conforme procedimento já descrito no tópico anterior.

Utilizou-se 120 mg de amostra de partida e deixou-se na estufa a 30° C a suspensão de casca em Czapek durante 10 e 20 dias respectivamente.

O produto obtido foi autoclavado, filtrado e o sólido lavado com água destilada até que não se notasse mais a presença de casca de arroz.

Deixou-se então o micélio em estufa a 50° C durante 48 horas e determinou-se sua massa.

6.10. Análise química dos constituintes da casca de arroz

6.10.1. Determinação de celulose⁽⁶⁴⁾

O método usado se baseia no tratamento da amostra com o reagente de Crampton e Maynard (ácido acético/ácido nítrico), para obter celulose livre de lignina, hemicelulose e cinza.

A análise é feita após a hidrólise da celulose em ácido sulfúrico 67 % (v/v), diluição adequada e adição de solução de antrona.

A leitura de absorbância é feita a 620 nm e as concentrações de celulose são obtidas a partir de uma curva padrão.

A solução padrão de celulose foi obtida "dissolvendo-se" 50,00 mg de papel Whatman nº 1 em 10 ml de ácido sulfúrico 67 %.

Esta solução foi diluída a 500 ml, obtendo-se então solução que continha 100 μg de celulose/ml.

6.10.2. Determinação de lignina

O teor de lignina na amostra analisada foi obtido a partir da soma dos resultados de análise de lignina Klason⁽⁶⁵⁾ e lignina solúvel em ácido⁽⁶³⁾.

Lignina Klason foi determinada através do método ácido sulfúrico 72 % (v/v) e o teor de lignina solúvel foi obtido a partir da absorbância a 205 nm do filtrado Klason, usando-se absorptividade de 105 $\text{l.g}^{-1}.\text{cm}^{-1}$.

Assim sendo, 0,1000 g de casca de arroz foram tratadas com 15 ml de ácido sulfúrico 72 % (v/v) durante duas horas sob a gitação, a temperatura ambiente.

Transferiu-se a mistura para um balão de 1 l, adaptou-se um condensador de refluxo e acrescentou-se 560 ml de água destilada.

Refluxou-se durante quatro horas, deixou-se esfriar e filtrou-se. O sólido obtido foi lavado com água destilada e seco em estufa a massa constante.

Com o filtrado, obteve-se a absorbância a 205 nm contra branco de solução de ácido sulfúrico 3 % (v/v).

6.10.3. Determinação de cinza ⁽⁶⁶⁾

Obtida após aquecimento da amostra em mufla a 600°C, durante duas horas, resfriamento em dessecador e medida de massa.

6.10.4. Determinação de hemicelulose

Hemicelulose foi determinada, subtraindo-se a soma das massas dos três componentes (celulose, lignina total e cinza) da massa da amostra nativa ou tratada.

6.11. Determinação de proteínas solúveis e proteínas miceliales

Após o tratamento fúngico da casca de arroz, dosou-se proteínas solúveis no filtrado e também na massa micelilar, usando-se o método de Biureto ⁽⁶⁷⁾.

Para a análise de proteínas solúveis, adicionou-se 1,5 ml de reagente de Biureto a 1,0 ml da solução investigada, aqueceu-se a 37°C durante 10 minutos, esfriou-se a temperatura ambiente e determinou-se a absorvância a 540 nm.

No caso da massa micelilar, inicialmente se efetuou uma extração ⁽⁶⁸⁾ com solução de hidróxido de sódio 0,2 N (3X3 ml para 100 mg de amostra) a 100°C durante dez minutos. Dos 9 ml obtidos da extração, utilizou-se 1 ml para a análise.

A concentração de proteínas foi determinada através de uma curva de calibração de absorbância a 540 nm X concentração de albumina.

6.12. Análise de aminoácidos na casca de arroz e na massa miceliar

A determinação de aminoácidos foi feita hidrolisando-se a amostra em ácido clorídrico 6 N durante 48 horas e utilizando-se um analisador de aminoácidos.

As áreas dos picos dos gráficos obtidos das amostras foram comparadas com as áreas dos picos do gráfico obtido de uma mistura padrão de aminoácidos de concentração conhecida.

6.13. Hidrólise em ácido trifluoroacético e análise de açúcares na casca de arroz (sem pré-tratamento e tratada com clorito de sódico)⁽⁶²⁾

50 mg de amostra são suspensas em 6 g de ácido trifluoroacético (100 %). A mistura é deixada durante uma noite a temperatura ambiente e em seguida refluxada por uma hora. A solução é diluída a 80 % em ácido e refluxada por quinze minutos. Nova diluição a 30 % em ácido e novamente refluxo por duas horas. Após filtração em porcelana porosa, a solução de ácido trifluoroacético é evaporada. O material seco obtido é dissolvido em água e evaporado, no mínimo duas vezes e finalmente feita a análise de açúcares.

O hidrolisado é separado numa coluna de troca iônica (resina DIONEX DA-K4-20) utilizando-se tampão borato pH 9,1.

A solução é eluída e misturada com a solução complexante (reagente Cu-2,2-cinchoninato), numa coluna espiral de teflon de 30 metros de comprimento, à temperatura de ebulição da água.

Os complexos coloridos resultantes são detectados a 420 nm.

6.14. Sacarificação enzimática da casca de arroz utilizando-se celulase

6.14.1. Atividade da celulase em papel de filtro Whatman nº1 (70)

Uma tira de papel de filtro Whatman nº1 (1X6 cm, 50 mg) foi colocada em um tubo de ensaio de 18 cm com tampa de rosca.

Juntou-se 0,5 ml de solução de enzima (1,5 g/l) e 1,0 ml de tampão citrato 0,05 M, pH 4,8. Agitou-se e deixou-se em banho-maria a 50°C durante uma hora. Acrescentou-se 3 ml de solução de ácido 3,5-dinitrossalicílico, ferveu-se a mistura durante 5 minutos, acrescentou-se 16 ml de água destilada e leu-se a absorvância da solução colorida a 550 nm contra branco.

A massa de glicose foi determinada através de uma curva de calibração de absorvância a 550 nm X massa de glicose.

A concentração da solução padrão utilizada foi de 2,024 g/l em tampão citrato 0,05 M e pH 4,8.

6.14.2. Sacarificação das cascas de arroz

Utilizando-se o procedimento anteriormente descrito, analisou-se o teor de açúcares redutores através da hidrólise enzimática de amostras de casca de arroz sem pré-tratamento e tratada.

6.15. Quimiluminescência da casca de arroz (71)

A 50 mg de amostra juntou-se 1 ml de solução de hidróxi-
do de sódio 5 M, agitou-se a mistura e registrou-se a emissão da
suspensão a cada dez segundos num contador de cintilação.

6.16. Espectros na região de infravermelho (72)

Espectros na região de infravermelho foram obtidos uti-
lizando-se o método de pastilha de KBr, de ligninas-dioxano ex-
traídas de casca de arroz, irradiadas e não irradiada.

6.17. Espectros de fluorescência (73)

Espectros de fluorescência foram obtidos das soluções
(150 mg/l) em dioxano-água (1:1) das ligninas-dioxano isoladas
das cascas de arroz irradiadas.

Usou-se comprimento de onda de excitação igual a 360 nm.

6.18. Análise termogravimétrica das ligninas-dioxano isoladas (74-78)

As análises foram feitas em atmosfera de nitrogênio, com fluxo de 60 ml/min, utilizando-se em torno de 10 mg de amostra e velocidade de aquecimento de 10°C/min, na faixa de 0 a 600°C.

As temperaturas correspondentes aos pontos de inflexão das curvas obtidas foram chamadas de T_1 , T_2 e T_3 respectivamente.

6.19. Microscopia eletrônica⁽⁷⁹⁾

Amostras de casca de arroz tratada e não tratada foram micrografadas em microscópio eletrônico de reflexão.

Pequena porção de amostra foi colocada em suporte adequado, recoberta com uma fina camada de ouro e introduzida no microscópio. Foram tiradas trinta micrografias das seis amostras estudadas.

6.20. Espectros de fotoacústica⁽⁸⁰⁾

Espectros de fotoacústica foram obtidos num espectrômetro fotoacústico, na faixa de 200 a 600 nm, de cascas de arroz tratadas e não tratada.

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A sensibilidade da celulose à luz ultravioleta foi estudada recentemente por Gómez⁽⁸¹⁾ e os seus resultados mostram que o comprimento de onda de irradiação tem um papel importantíssimo no teor de glicose produzida na hidrólise enzimática. Assim sendo, foi possível obter um aumento no teor de glicose da ordem de 150 % para celulose irradiada a $\lambda > 300$ nm, quando comparado com a amostra sem irradiar.

Por outro lado, Mansilla⁽⁸²⁾ estudou as modificações estruturais que ligninas sofrem quando são irradiadas por luz ultravioleta e concluiu que as alterações mais significativas ocorrem quando lignina é irradiada a $\lambda > 254$ nm.

Baseado nos resultados acima citados e pensando em modificar a estrutura cristalina da celulose e quebrar o complexo lignina-celulose, irradiou-se casca de arroz nestes dois comprimentos de onda durante intervalos de tempo de 1, 3, 6 e 12 horas.

Os pré-tratamentos químicos de casca de arroz foram realizados levando-se em conta a utilização de reagentes pouco corrosivos e razoavelmente baratos. Assim sendo, utilizou-se água oxigenada em meio básico, solução de clorito de sódio e ozônio gasoso como tais reagentes.

Outro estudo que nos pareceu interessante foi o de se haveria ou não efeito sinérgico nos pré-tratamentos com relação ao tratamento fúngico. Amostras irradiadas e tratadas quimicamente foram utilizadas no crescimento de fungos.

7.1. Pré-extração da casca de arroz

A casca de arroz recebida para estudo foi lavada com água para se eliminar possíveis substâncias estranhas, como por exemplo areia ou mesmo pedaços de arroz.

Depois de lavada, a casca foi seca em estufa a 60°C durante 48 horas, moída em moinho e peneirada.

Não existe regra geral que determine o tamanho da partícula de madeira a ser analisada, mas via de regra se utiliza frações de 40-80 mesh (0,05-0,4 mm). No nosso caso utilizamos a casca que passou pela peneira de 48 mesh (0,3 mm).

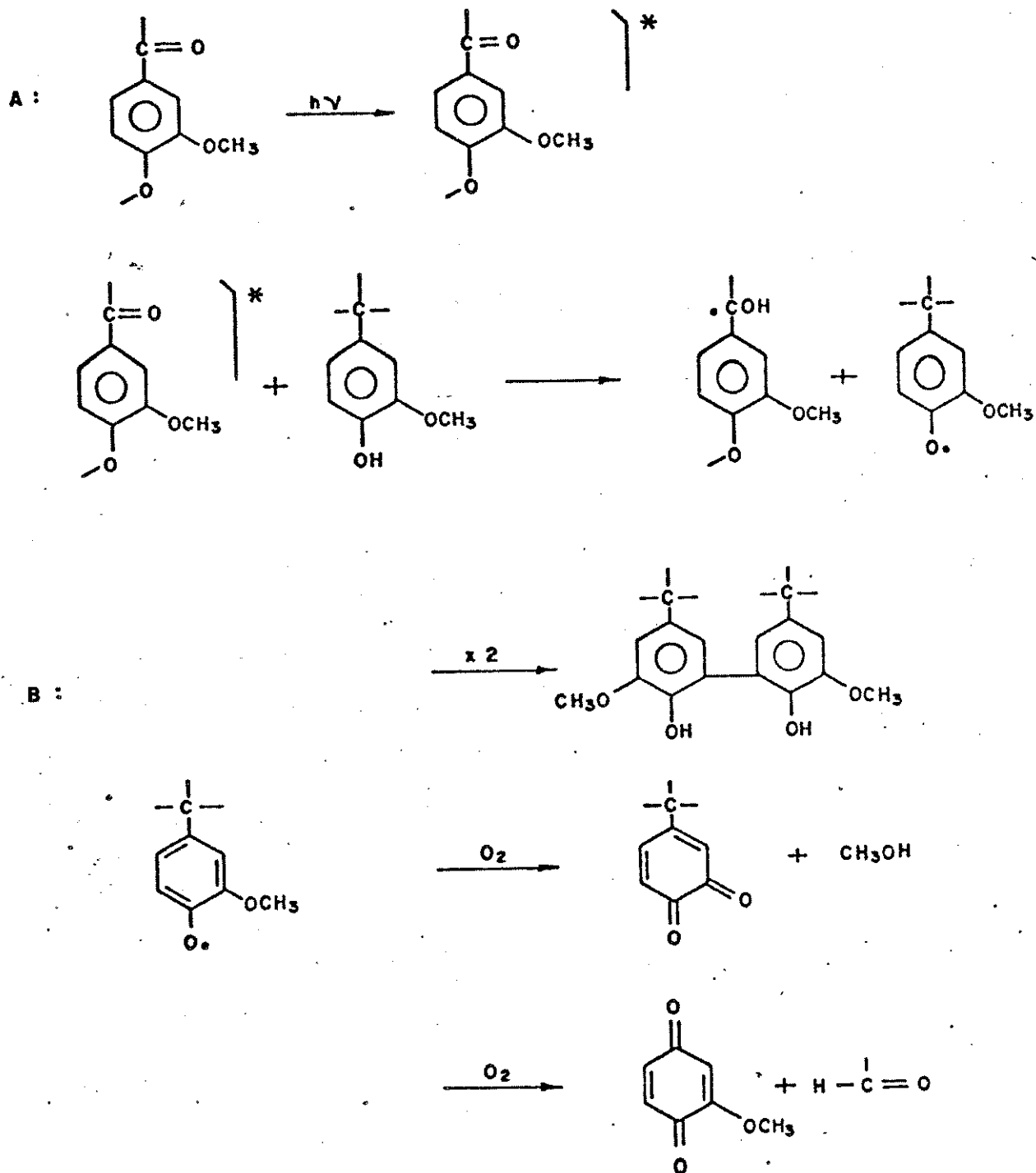
A extração feita com benzeno-etanol 1:1 (v/v) visou a eliminação de substâncias que não fazem parte da parede celular, como exemplo: ácidos graxos, resinas, ceras, corantes, etc, e constituem aproximadamente 2 % da massa inicial.

7.2. Os Pré-tratamentos

A luz ultravioleta consegue penetrar em algumas madeiras não mais do que 75 μm , a luz visível 200 μm e a infravermelha de 1 a 1,5 mm. Apesar da luz ultravioleta conseguir penetrar muito pouco em material celulósico, é sabido que ele é degradado principalmente pela presença de lignina que se oxida⁽⁸³⁾.

Na verdade, a presença de grupos como hidroxila fenólica, duplas ligações, grupos carbonilas, etc, é que possibilita a oxidação da lignina. Destes, as carbonilas conjugadas ao anel aromático apresentam-se como os cromóforos mais efetivos para dar início à fotodegradação.

A fotodegradação da lignina é representada na Figura 9.



O pré-tratamento que utiliza água oxigenada em meio básico, sugerido por Gould e colaboradores⁽⁶¹⁾, faz uso do radical altamente reativo HO[•] como agente oxidante da lignina.

Este radical é formado durante a reação entre a água oxigenada e o ânion hidroperoxido (HOO⁻):



A reação acima é dependente do pH do meio; esse pH será ótimo a 11,5 que é o pK_a da reação de dissociação da água oxigenada:



Dois exemplos da ação de água oxigenada em meio básico são dados na Figura 10. Na primeira reação (6), a estrutura quinóida é degradada a ácido dicarboxílico via intermediários peróxido e dioxetano e na segunda reação (7) mostra-se a formação de produtos de degradação com estruturas oxirano⁽⁸⁴⁾.

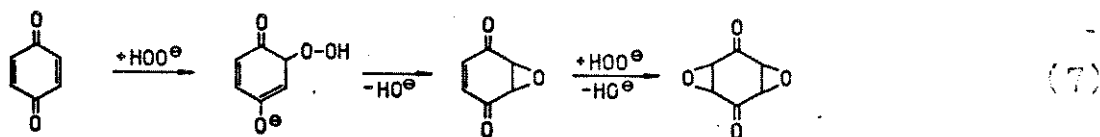
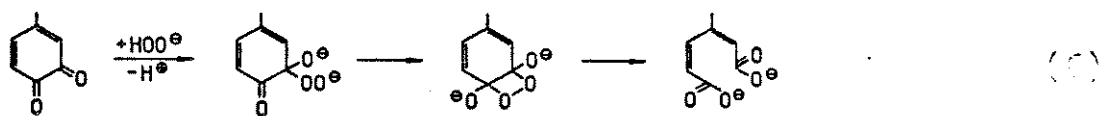


FIGURA 10. Ação de peróxido de hidrogênio em estruturas quinóidas de lignina.

O pré-tratamento com ozônio foi escolhido por se saber que ele é um agente branqueador, não poluente, utilizado na indústria de polpcamento de papel.

O mecanismo da degradação de lignina por ozônio ainda não está totalmente esclarecido. Sabe-se atualmente ⁽⁸⁵⁾ que através do estudo de reações de compostos modelo com ozônio podem ser obtidos produtos de reação com o anel hidroxilado (8), quebra oxidativa de grupos metoxila (9) e abertura do anel (10), conforme é mostrado na Figura 11.

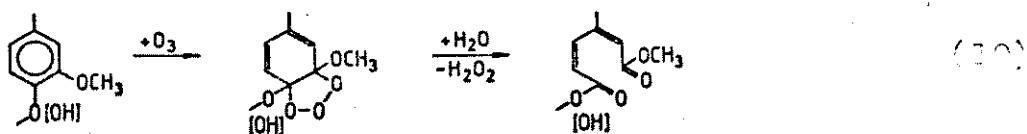
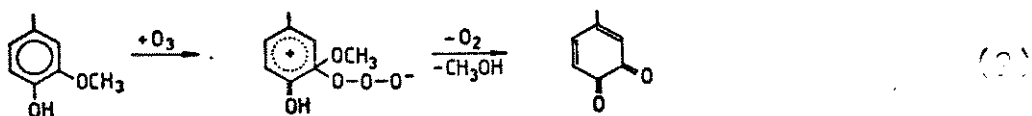
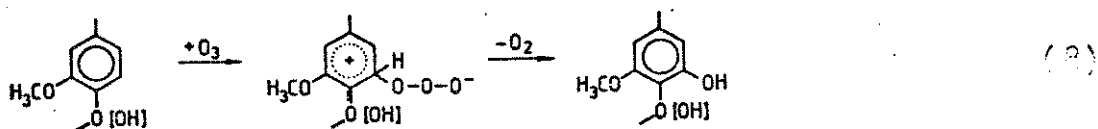
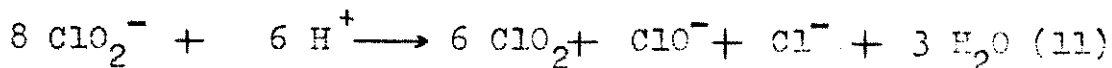


FIGURA 11. Mecanismo de degradação de lignina por ozônio.

A deslignificação com clorito de sódio está baseada na reação entre ClO_2 , ClO^- e lignina; já que em meio ácido ClO_2^- se reduz a ClO^- e Cl^- ao mesmo tempo que se oxida a ClO_2 (86).



ClO_2 é um gás altamente reativo e explosivo quando em misturas com o ar; portanto é sempre gerado no meio de reação e em pequena escala.

As reações de ClO_2 com lignina são exclusivamente oxidativas e os produtos finais de oxidação são derivados do ácido muônico e da quinona (87) (Figura 12).

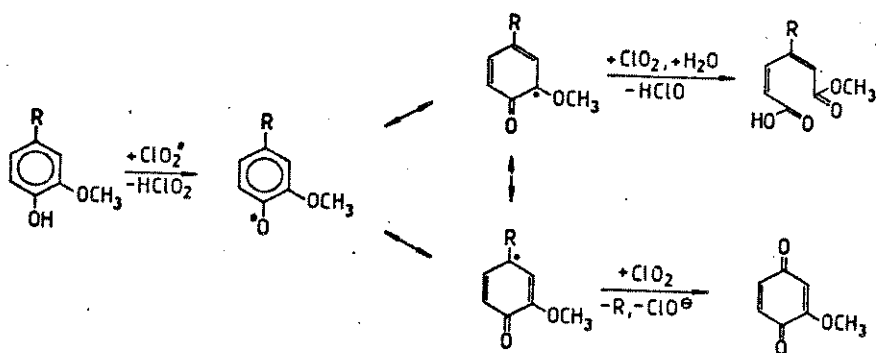


FIGURA 12. Degradação oxidativa de lignina por dióxido de cloro.

7.3. Medida da massa seca no crescimento fúngico

7.3.1. Crescimento fúngico de ligninas-dioxano de casca de arroz tratadas fotoquimicamente

Amostras de casca de arroz foram irradiadas a $\lambda > 254$ nm e $\lambda > 300$ nm durante 1, 3, 6 e 12 horas, extraíndo-se logo após su a lignina-dioxano. Os rendimentos obtidos nesta extração estão na Tabela 2.

TABELA 2. Rendimento obtido na extração de lignina-dioxano de casca de arroz irradiada.

tempo de irradiação(h)	R _{$\lambda > 254$nm} (%)	R _{$\lambda > 300$nm} (%)
1	7,4	5,4
3	5,3	5,4
6	6,0	7,3
12	5,8	5,2

Com relação ao tratamento fúngico de ligninas-dioxano de cascas de arroz irradiadas e não irradiada, a massa de parti da foi de 200 mg e os resultados obtidos foram expressos em mg e tabelados a seguir (Tabela 3.).

TABELA 3. Crescimento fúngico de ligninas-dioxano de casca de arroz tratadas fotoquimicamente.

	Sólido (mg)	Filtrado (mg)	Total (mg)	$\Delta(\%)$
LD CA	138	106	244	0,0
LD CA 300 1H	176	118	294	20,5
LD CA 300 3H	177	112	289	18,4
LD CA 254 1H	182	109	291	19,3
LD CA 254 3H	172	117	289	18,4

Os resultados acima mostram que Chrysosilia sitophila (TFB 27441) consegue degradar lignina-dioxano, usando este material como única fonte de carbono e que todos os pré-tratamentos fotoquímicos realizados na casca de arroz levam a um aumento no rendimento do tratamento fúngico da ordem de 20 %.

Dentre os pré-tratamentos fotoquímicos realizados, o mais eficiente para se obter PUC de lignina-dioxano foi o de irradiação durante uma hora a comprimentos de onda maiores que 300 nm.

7.3.2. Crescimento fúngico de casca de arroz tratada fotoquimicamente

A massa de partida foi de 600 mg e os resultados obtidos estão na Tabela 4.

TABELA 4. Crescimento fúngico da casca de arroz tratada fotoquimicamente

	Sólido (mg)	Filtrado (mg)	Total (mg)	Δ (%)
CA	487	115	602	0,0
CA 300 1H	575	130	705	17,1
CA 300 3H	573	114	687	14,1
CA 254 1H	581	120	701	16,4
CA. 254 3H	575	110	685	13,8

Nesta experiência constatamos que Chrysonilia sitophila (TEB 27441) também consegue degradar casca de arroz usada como única fonte de carbono. Apesar dos rendimentos serem menores que os anteriores, a irradiação a 300 nm durante uma hora continua sendo o processo mais eficiente para se obter PUC.

7.3.3. Crescimento fúngico de casca de arroz tratada fotoquimicamente e com água oxigenada em meio básico.

A massa de partida foi de 600 mg e os resultados obtidos estão na Tabela 5.

Pelos resultados apresentados, pode-se notar que o tratamento com água oxigenada em meio básico aumenta o crescimento fúngico da casca de arroz em 8,3 % e que apesar do tratamento fotoquímico simultâneo melhorar o rendimento, os valores obtidos

não são superiores aos da tabela anterior (tratamento fotoquímico isolado).

A conclusão que se chega é que não se observa efeito si nérgico dos tratamentos com relação ao crescimento fúngico da cas ca de arroz.

TABELA 5. Crescimento fúngico de casca de arroz trata- da fotoquimicamente e com água oxigenada em meio básico.

	Sólido (mg)	Filtrado (mg)	Total (mg)	$\Delta(\%)$
CA	508	91	599	0,0
CAT	568	81	649	8,3
CAT 300 1H	587	98	685	14,4
CAT 300 3H	574	95	669	11,7
CAT 254 1H	577	101	678	13,2
CAT 254 3H	588	92	680	13,5

7.3.4. Crescimento fúngico de casca de arroz tratada fotoqui- micamente e com ozônio.

A massa de partida foi de 600 mg e os resultados obti- dos estão na Tabela 6.

TABELA 6. Crescimento fúngico de casca de arroz trata-
da fotoquimicamente e com ozônio.

	Sólido (mg)	Filtrado (mg)	Total (mg)	Δ (%)
CA	482	123	605	0,0
CAT	375	77	452	-25,2
CAT 300 1H	552	111	663	9,6
CAT 300 3H	544	100	644	6,4
CAT 254 1H	541	98	639	5,6
CAT 254 3H	543	90	633	4,6

Os resultados acima mostram uma surpreendente perda de massa (25,2 %), quando a casca de arroz é tratada com ozônio gasoso. A explicação para esta diminuição pode ser sugerida como sendo devida aos inúmeros sub-produtos formados durante a oxidação da lignina pelo ozônio gasoso.

Com relação aos pré-tratamentos simultâneos, novamente podemos notar que eles não suplantam o rendimento do pré-tratamento fotoquímico isolado.

7.3.5. Crescimento fúngico de casca de arroz tratada fotoquimicamente e com solução de clorito de sódio.

A massa de partida foi de 600 mg e os resultados obtidos estão na Tabela 7.

TABELA 7. Crescimento fúngico de casca de arroz trata-
da fotoquimicamente e com solução de clorito
de sódio.

	Sólido (mg)	Filtrado (mg)	Total (mg)	Δ (%)
CA	479	135	614	0,0
CAT	379	156	535	-12,9
CAT 300 1H	458	139	597	- 2,8
CAT 300 3H	438	179	617	0,0
CAT 254 1H	444	135	579	- 5,7
CAT 254 3H	441	108	549	-10,6

Novamente encontramos nestes dados, valores menores do que aqueles obtidos da casca de arroz sem pré-tratamento. A oxidação de lignina por ClO_2^- em meio ácido é realmente complexa e com possibilidade de formação de produtos que não são detectados após filtração e evaporação.

Os valores obtidos do tratamento da casca de arroz por luz ultravioleta continuam sendo maiores.

7.4. Determinação da massa do micélio após crescimento fúngico das cascas de arroz tratadas e não tratada.

As experiências relacionadas no item 7.3. foram realiza

das num período de dez dias. A dúvida que nos apareceu foi se esse tempo de tratamento seria suficiente para se ter um rendimento máximo de micélio. Outra questão importante levantada foi com relação à agitação periódica; ou seja, a agitação seria suficiente para oxigenar o meio e dar as condições necessárias para o crescimento do fungo?

Tentando esclarecer essas dúvidas fez-se o tratamento fúngico de cascas de arroz pré-tratadas e não tratada, com agitação e borbulhando-se oxigênio. Da massa seca obtida, separou-se a casca de arroz remanescente obtendo-se a massa do micélio.

A massa de partida foi de 120 mg e os resultados obtidos estão na Tabela 8.

TABELA 8. Massa micelilar obtida do tratamento fúngico de casca de arroz pré-tratada.

	10 dias (mg)	20 dias (mg)
CA	79	81
CA H ₂ O ₂	84	86
CA O ₃	73	74
CA ClO ₂ ⁻	62	50
CA 300 1H	103	95

Os resultados acima tabelados mostram que o período de 20 dias para o tratamento fúngico é desnecessário e que mesmo com 10 dias se obtém uma alta taxa de transformação.

de casca de arroz em micélio.

Os resultados obtidos no tratamento fúngico de casca de arroz borbulhando-se oxigênio no meio de crescimento foram praticamente os mesmos. Achou-se desnecessário apresentá-los.

7.5. Composição química da casca de arroz

A casca de arroz é formada basicamente de celulose, hemicelulose, lignina e cinzas.

Análises foram feitas para cada um dos constituintes (exceto hemicelulose).

Os resultados percentuais são mostrados na Tabela 9.

TABELA 9. Composição química da casca de arroz

	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Cinza (%)
CA	38,4	23,7	29,4	8,5
CA 300 LH	33,9	24,2	31,8	10,1
CA H ₂ O ₂	53,2	8,2	28,0	10,6
CA O ₃	41,6	18,8	28,9	10,7
CA ClO ₂ ⁻	39,6	33,1	16,1	11,2

Os resultados obtidos mostram que o pré-tratamento mais eficiente para se deslignificar a casca de arroz é o clorito de sódio (consegue-se eliminar 45,2 % de lignina). Por outro lado,

se o objetivo do trabalho for um enriquecimento da amostra em ce lulose, deve-se usar o tratamento com água oxigenada que aumenta o seu teor em 38,5 %.

7.6. Análise de proteína solúvel e insolúvel nas amostras ob- tidas do crescimento fúngico

A análise de proteína é feita colorimetricamente e sua concentração é determinada através de uma curva de calibração de absorvância a 540 nm X concentração de albumina.

Os valores experimentais utilizados para a construção da curva de calibração são apresentados na Tabela 10.

TABELA 10. Curva de calibração de absorvância a 540 nm X concentração de albumina para soluções analisadas com reagente de Biureto.

Concentração (%)	A ₅₄₀
0,500	0,480
0,400	0,388
0,300	0,287
0,200	0,192
0,100	0,100

Os resultados obtidos e tabelados a seguir foram expres-
sos em porcentagem (p/p).

7.6.1. Pré-tratamento fotoquímico

TABELA 11. Determinação pelo método de Biureto de proteína solúvel e insolúvel de amostras pré-tratadas fotoquimicamente e obtidas após tratamento fúngico

	Insolúvel (%)	Solúvel (%)	Total (%)	Δ (%)
CA	6,1	5,3	11,4	0,0
CA 300 1H	5,0	8,0	13,0	14,0
CA 300 3H	4,7	---	----	----
CA 254 1H	5,4	8,7	14,1	23,7
CA 254 3H	4,5	---	----	----

Os dados apresentados mostram que a casca de arroz irradiada a 300 nm durante uma hora, após o crescimento fúngico, é enriquecida quanto ao seu teor de proteína total quando comparada com a casca sem tratamento fotoquímico.

Um resultado interessante foi aquele relacionado com a irradiação a 254 nm durante uma hora; apesar do crescimento fúngico ter sido da mesma ordem de grandeza daquele da casca irradiada a 300 nm durante uma hora, o seu teor de proteína total foi significativamente maior.

7.6.2. Pré-tratamento fotoquímico e com água oxigenada

TABELA 12. Determinação pelo método de Biureto de proteína solúvel e insolúvel de amostras pré-tratadas fotoquimicamente e com água oxigenada e obtidas após tratamento fúngico.

	Insolúvel (%)	Solúvel (%)	Total (%)	Δ (%)
CA	5,8	5,3	11,1	0,0
CAT	4,3	6,2	10,5	- 5,4
CAT 300 1H	4,0	2,7	6,7	-39,6
CAT 300 3H	3,9	4,0	7,9	-28,8
CAT 254 1H	4,1	2,2	6,3	-43,2
CAT 254 3H	4,0	1,8	5,8	-47,7

Através desta experiência podemos concluir que com relação ao teor de proteína total, o pré-tratamento com água oxigenada em meio básico é inoperante pois ele não consegue aumentar o valor alcançado pela casca de arroz sem pré-tratamento, após o crescimento fúngico.

Com relação aos pré-tratamentos simultâneos (fotoquímico e químico), os resultados mostram que existe uma queda bastante acentuada nos valores obtidos, chegando ao limite de 47,7 % na diminuição do teor de proteína total para a casca irradiada a 254 nm durante três horas e tratada com água oxigenada em meio básico.

7.6.3. Pré-tratamento fotoquímico e com ozônio

TABELA 13. Determinação pelo método de Biureto de proteína solúvel e insolúvel de amostras pré-tratadas fotoquimicamente e com ozônio.

	Insolúvel (%)	Solúvel (%)	Total (%)	Δ (%)
CA	5,0	4,3	9,3	0,0
CAT	4,1	6,8	10,9	17,2
CAT 300 1H	2,3	3,0	5,3	-43,0
CAT 300 3H	2,3	2,6	4,9	-47,2
CAT 254 1H	2,7	2,0	4,7	-49,5
CAT 254 3H	2,8	2,5	5,3	-43,0

Estes resultados revelam que o pré-tratamento químico favorece o teor de proteína total da casca de arroz após o crescimento fúngico; ao passo que os tratamentos simultâneos, como no caso anterior, desfavorecem-no numa porcentagem máxima de 49,5 %.

7.6.4. Pré-tratamento fotoquímico e com clorito de sódio

TABELA 14. Determinação pelo método de Biureto de proteína solúvel e insolúvel de amostras pré-tratadas fotoquimicamente e com clorito de sódio.

	Insolúvel (%)	Solúvel (%)	Total (%)	Δ (%)
CA	6,7	3,2	9,9	0,0
CAT	4,0	10,8	14,8	49,5
CAT 300 1H	2,7	10,2	12,9	30,3
CAT 300 3H	2,8	10,1	12,9	30,3
CAT 254 1H	3,3	8,9	12,2	23,2
CAT 254 3H	3,7	10,0	13,7	38,4

Neste caso, o pré-tratamento químico aumenta o conteúdo de proteína total da casca após crescimento fúngico em 49,5% comparado com a casca sem pré-tratamento.

Os valores obtidos dos pré-tratamentos simultâneos, apesar de não suplantarem o valor obtido do pré-tratamento químico isolado, são muito bons e a maioria deles são superiores aos do tratamento fotoquímico isolado (ver tópico 7.6.1.).

7.7. Análise de aminoácidos na casca de arroz e na massa miceliar

A composição centesimal de aminoácidos das proteínas da casca de arroz e da massa miceliar (fungo), está mostrada na Tabela 15 e 16 respectivamente.

Os resultados tabelados mostram que o pré-tratamento não altera significativamente as proteínas da casca de arroz.

Nota-se que na maioria dos aminoácidos, exceto lisina, a sua concentração varia muito pouco com o tratamento. Por outro lado, os pré-tratamentos utilizados alteram a qualidade da proteína unicelular produzida.

Dentre os aminoácidos não essenciais, alanina é aumentada no pré-tratamento com água oxigenada (2,1 vezes) e na irradiação com luz (1,9 vezes). A glicina é aumentada na casca não tratada 1,4 vezes, na casca tratada com água oxigenada 1,9 vezes, na casca tratada com clorito 1,6 vezes e na casca tratada com luz 2,3 vezes.

Para os aminoácidos essenciais, deve-se destacar o aumento de treonina de 4,5 vezes para a casca não tratada e de 4,2 vezes para a casca tratada com ozônio. A metionina, cuja concentração era menor que 0,1 % na casca nativa, passa a 10,3 % na casca tratada com luz e a 6,2 % na casca tratada com água oxigenada.

Estes resultados mostram que esta proteína unicelular obtida poderia ser utilizada para o enriquecimento de rações com deficiência em determinados aminoácidos.

TABELA 15. Composição centesimal de aminoácidos das proteínas de casca de arroz tratada e não tratada.

	CA	CA H_2O_2	CA O_3	CA ClO_2^-	CA 300
Ácido Aspártico	11,7	11,2	13,4	14,0	12,3
Treonina	4,4	4,4	4,2	4,9	5,1
Serina	5,0	5,2	5,5	4,8	5,0
Ácido Glutâmico	15,9	16,9	16,8	17,6	13,7
Prolina	7,5	9,1	6,8	10,8	8,5
Glicina	6,8	7,3	6,3	7,5	7,8
Alanina	7,4	7,5	6,8	8,4	8,3
Cistina	0,4	---	0,5	---	---
Valina	6,8	8,0	6,6	6,2	7,7
Metionina	---	---	0,8	---	---
Isoleucina	4,6	4,7	5,3	4,3	4,7
Leucina	9,4	8,6	9,1	9,4	8,6
Tirosina	2,0	1,9	1,7	---	2,2
Fenilalanina	5,0	5,2	5,7	5,8	5,4
Histidina	2,0	2,1	1,9	0,9	1,7
Lisina	6,0	2,6	3,0	1,1	4,3
Arginina	5,1	5,5	5,4	3,6	3,7

TABELA 16. Composição centesimal de aminoácidos das proteínas provenientes do tratamento fúngico de casca de arroz tratada e não tratada.

	CA	fungo	fungo H ₂ O ₂	fungo O ₃	fungo ClO ₂	fungo 300
Ácido Aspártico	11,7	11,0	13,3	11,1	12,1	13,1
Treonina	4,4	19,4	8,1	18,2	6,5	6,8
Serina	5,0	6,1	7,6	5,8	6,2	2,1
Ácido Glutâmico	15,9	12,4	15,7	12,1	11,8	15,2
Prolina	7,5	8,2	---	7,3	6,0	---
Glicina	6,8	9,8	13,0	9,0	10,5	15,9
Alanina	7,4	12,7	15,6	11,7	12,5	13,9
Cistina	0,4	---	---	---	---	---
Valina	6,8	---	---	---	8,1	---
Metionina	---	---	6,2	---	---	10,3
Isoleucina	4,6	4,0	---	4,3	4,1	---
Leucina	9,4	10,7	10,0	9,8	8,4	10,5
Tirosina	2,0	---	---	---	2,7	---
Fenilalanina	5,0	---	---	4,0	3,5	---
Histidina	2,0	---	---	---	0,7	---
Lisina	6,0	3,7	3,7	3,3	3,4	5,5
Arginina	5,1	2,0	5,9	3,5	4,1	---

7.8. Hidrólise da casca de arroz (não tratada e tratada com clorito de sódio) em ácido trifluoracético e sua análise de açúcares

É comum o uso de ácido sulfúrico para se hidrolisar polissacarídeos. Não haveria problema algum nesta reação, se ela terminasse exatamente após a quebra das ligações glicosídicas; mas é sabido que os monossacarídeos também reagem com ácidos diminuindo assim seu rendimento.

A hidrólise com ácido trifluoracético tem duas vantagens principais sobre o ácido sulfúrico: o tempo de reação é menor e não é necessário sua neutralização pois ele é volátil e pode ser removido do meio reacional por evaporação.

Os dados apresentados na Tabela 17 são percentuais e mostram que o pré-tratamento com clorito de sódio praticamente não altera a constituição de açúcares (exceto xilose).

Um dado que nós já tínhamos e que foi confirmado por esta análise foi o teor de lignina (resíduo não hidrolisável) da casca pré-tratada com clorito de sódio, o que justifica o uso desta solução como agente deslignificante.

TABELA 17. Análise de açúcares provenientes da hidrólise em ácido trifluoracético de casca de arroz sem pré-tratamento e tratada com clorito de sódio.

	CA	CA ClO ₂ ⁻
Celobiose	---	0,1
Raminose	0,3	0,4
Manose	0,3	0,2
Arabinose	1,7	2,6
Galactose	0,9	0,9
Xilose	9,9	21,0
Glicose	41,2	39,6
Σ açúcares	54,3	64,8
Resíduo não hidro- lisável	27,2	17,1
Cinzas	10,3	10,6
Total	91,8	92,5

7.9. Sacarificação enzimática da casca de arroz utilizando celulase

Os açúcares redutores obtidos da sacarificação enzimática foram determinados colorimetricamente através de uma curva de calibração de absorbância a 550 nm X massa de glicose.

Os valores experimentais utilizados para a construção da curva de calibração são apresentados na Tabela 18.

TABELA 18. Curva de calibração de absorbância a 550 nm X massa de glicose para soluções analisadas com o ácido 3,5-dinitrossalicílico.

Massa (mg)	A ₅₅₀
0,40	0,213
0,80	0,423
1,20	0,773
1,60	1,038
2,00	1,308

7.9.1. Atividade da celulase em papel de filtro Whatman nº 1

No sentido de disciplinar as inúmeras unidades que microbiólogos e bioquímicos vinham dando à sacarificação de substratos, a União Internacional de Bioquímica resolveu que a atividade da enzima seria medida frente a um substrato padrão, o papel de fil-

tro Whatman nº 1, da seguinte maneira:

Uma unidade de enzima é igual a um micromol de substrato hidrolisado por minuto. Para a celulose, baseia-se nas ligações hidrolisadas, isto é, micromoles de glicose por minuto, ou seja:

$$1 \text{ unidade de enzima (ue)} = 0,180 \text{ mg/min}$$

Em 60 minutos, 1 unidade de enzima produz

$$0,180 \times 60 = 10,8 \text{ mg} \quad \text{ou seja:}$$

$$1 \text{ unidade de enzima (ue)} = 10,8 \text{ mg de glicose}$$

ou $1 \text{ mg de glicose} = 1 / 10,8 \text{ ue}$

ou $1 \text{ mg de glicose} = 0,0926 \text{ ue}$

Na hidrólise de papel de filtro obtivemos 1,36 mg de glicose e esta massa corresponde a $0,0926 \times 1,36 = 0,1259 \text{ ue}$

Como na análise feita usou-se 0,5 ml de solução de enzima 1,5 mg/ml, temos então 0,75 mg de enzima.

A atividade da enzima em papel de filtro será:

$$0,1259 / 0,75 = 0,1679 \text{ ue/ mg e}$$

7.9.2. Sacarificação da casca de arroz

Os resultados obtidos da hidrólise enzimática de casca de arroz usando-se celulase comercial são apresentados na Tabela 19 e eles nos mostram que os pré-tratamentos com luz e com clorito são prejudiciais à hidrólise, pois houve uma diminuição de 31,4 % e 11,8 % respectivamente, na obtenção de glicose quando se comparou com o valor obtido da casca sem tratamento.

Por outro lado, o tratamento com água oxigenada melhora o rendimento de glicose em 5,9 % e o tratamento com ozônio em 54,9 %.

A conclusão a que se chega é que os substratos obtidos do tratamento com luz e com clorito de sódio inibem parcialmente a celulase.

TABRUA 19. Massa de glicose obtida de solução analisada com ácido 2,5-dinitrossalicílico, após hidrólise enzimática com celulase comercial.

	Massa (mg)	A ₅₅₀
CA	0,51	0,290
CA 300 1H	0,35	0,191
CA H ₂ O ₂	0,54	0,312
CA O ₃	0,79	0,484
CA ClO ₂ ⁻	0,45	0,251

7.10. Modificações estruturais da cadeia de erro

7.10.1. Quimiluminescência

A quimiluminescência é uma técnica que vem sendo desenvolvida por nosso grupo de trabalho (83,88), no sentido de estabelecer modificações estruturais em biomacromoléculas.

A lignina quando em solução neutra não é quimiluminescente, mas apresenta emissão quando em meio básico.

As espécies responsáveis pela quimiluminescência do sistema foram sugeridas⁽⁸⁸⁾ como sendo oxigênio singlete e carbonilas excitadas que foram detectadas mediante espectros de emissão de compostos modelo de lignina como: vanilina, ácido vanílico, ácido vanilpirúvico e ácido ferúlico. (Ver apêndice I)

Este trabalho procurou estudar o comportamento quimiluminescente das cascas de arroz, tratadas e não tratada, e tentar relacionar os resultados obtidos com a degradação fúngica.

Os dados obtidos das cascas irradiadas a $\lambda \gg 254$ nm e $\lambda \gg 300$ nm são apresentados na Tabela 20 e aqueles obtidos das cascas irradiadas e tratadas quimicamente estão na Tabela 21.

TABELA 20. Intensidade quimiluminescente obtida da casca de arroz irradiada a diferentes fluências em meio básico.

Tempo de irradiação (h)	CA 254 (pulsos)	CA 300 (pulsos)
0	12613	12613
1	11036	5365
3	10120	6135
6	5050	5960
12	9385	6143
24	9950	----

TABELA 21. Intensidade quimiluminescente obtida da casca de arroz irradiada a diferentes fluências e tratada quimicamente.

λ (nm)	Tempo de ir- radiação (h)	CA (pulsos)	CA ClO_2^- (pulsos)	CA H_2O_2 (pulsos)	CA O_3 (pulsos)
---	-	12613	40307	7137	1176
254	1	11036	40801	13936	2674
254	3	10120	25152	15412	1733
300	1	5365	29372	7152	753
300	3	6135	19401	8229	1441

O que se observa na Figura 13 é que para a casca irradiada a $\lambda \gg 300$ nm ocorre um decréscimo de emissão bastante acentuado até se atingir o fluxo de $2,5 \times 10^2 \text{ KJ/m}^2$ e depois ela se mantém praticamente constante.

Com relação a casca irradiada a $\lambda \gg 254$ nm, o decréscimo de emissão é bem menos acentuado e quando ela atinge aproximadamente $20 \times 10^2 \text{ KJ/m}^2$, possui a mesma emissão que a casca irradiada a 300 nm, recuperando sua emissão a fluências mais altas.

É interessante destacar que neste mesmo fluxo, lignina é rapidamente alterada por peroxidase/ $\text{H}_2\text{O}_2/\text{O}_2$ ⁽⁸⁸⁾ e que coincidentemente, a sua degradação fúngica e da casca de arroz são mais eficientes.

Mansilla sugere⁽⁸⁸⁾ que entre 2000 e 4000 KJ/m^2 , a lignina perde suas propriedades antioxidantes possibilitando assim um ataque fúngico mais eficiente.

○ CA PRÉ-TRATADA A $\lambda \geq 254$ nm
□ CA PRÉ-TRATADA A $\lambda \geq 300$ nm

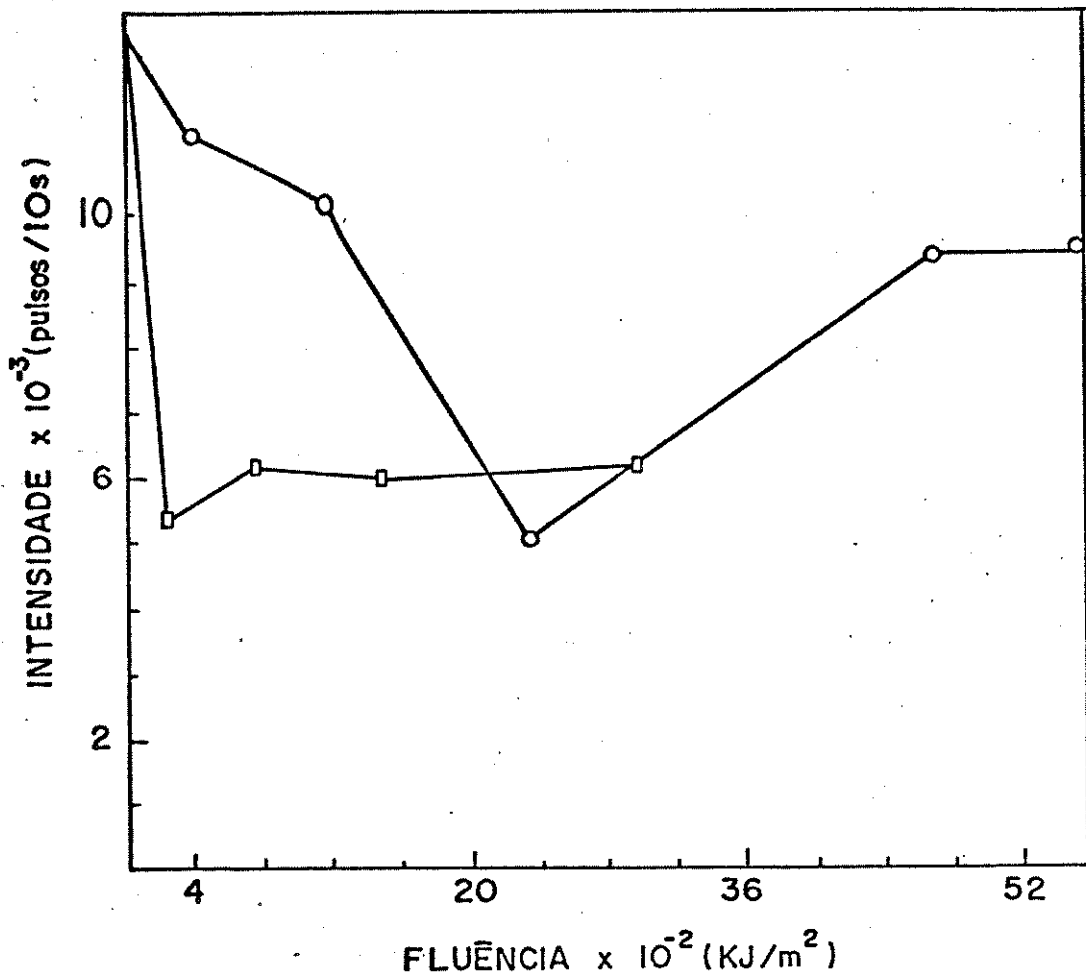


FIGURA 13. Intensidade quimiluminescente obtida da excitação de antraceno irradiado a diferentes fluências em meio básico.

Quando se analisa os resultados obtidos para as cascas tratadas por luz e quimicamente (Figuras 14 e 15), não se nota nenhum efeito de destaque nos tratamentos com água oxigenada e com ozônio. Por outro lado, a casca tratada com clorito possui emissão superior às outras, nos dois comprimentos de onda estudados. O que se pode sugerir, é que a modificação da lignina neste pré-tratamento é maior, tornando-a facilmente oxidada em meio básico.

- C.A SEM TRATAMENTO QUÍMICO
 △ C.A PRÉ-TRATADA C/ ClO_2^-
 □ C.A PRÉ-TRATADA C/ $\text{H}_2\text{O}_2/\text{OH}^-$
 ● C.A PRÉ-TRATADA C/ O_3

FLUÊNCIA	INTENSIDADE			
	C.A	ClO_2^-	H_2O_2	O_3
0	12613	40307	7137	1176
388,8	11036	40801	13936	2674
1166,6	10120	25152	15412	1783

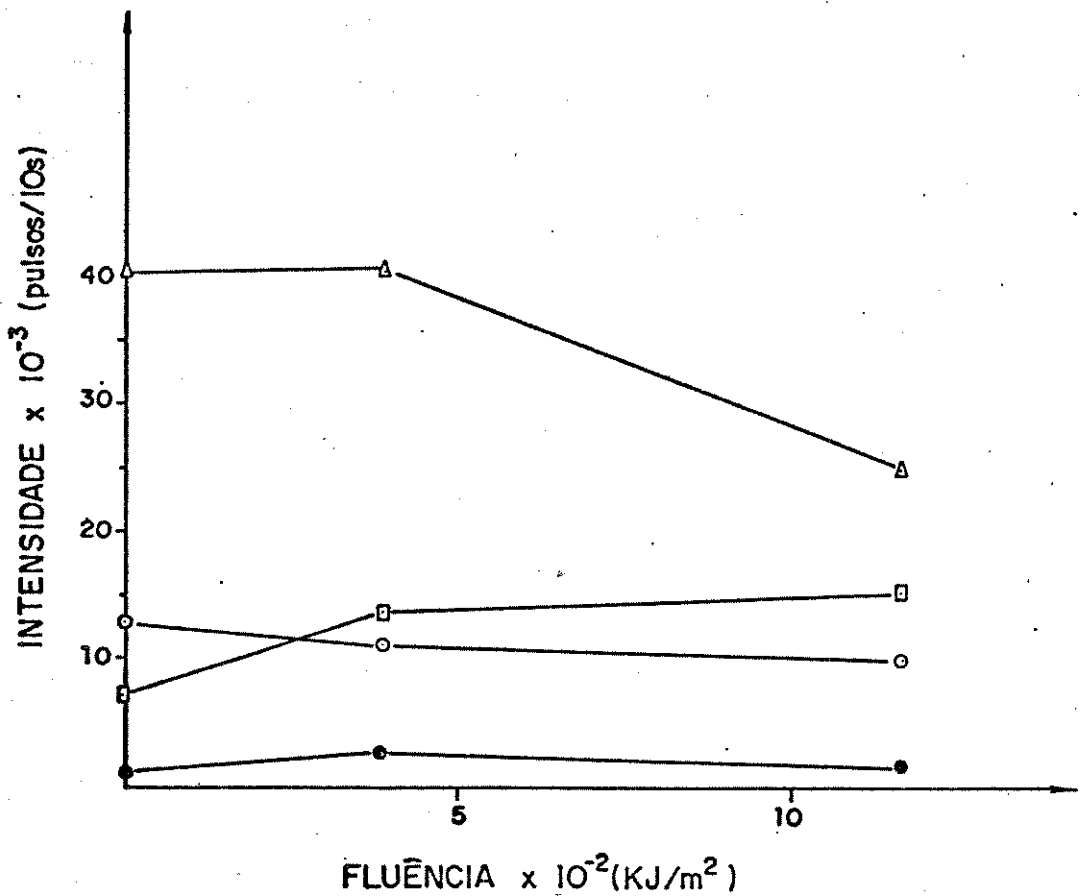


FIGURA 14. Intensidade quimiluminoscente obtida da casca de arroz irradiada a $\lambda \gg 254$ nm e tratada quimicamente.

- \circ C.A SEM TRATAMENTO QUÍMICO
 Δ C.A PRÉ-TRATADA C/ ClO_2^-
 \square C.A PRÉ-TRATADA C/ $\text{H}_2\text{O}_2/\text{OH}^-$
 \bullet C.A PRÉ-TRATADA C/ O_3

λ 300 nm

INTENSIDADE

FLUÊNCIA	C.A	ClO_2^-	H_2O_2	O_3
0	12613	40307	7137	1176
246,2	5365	29372	7152	759
738,7	6135	19401	8229	1441

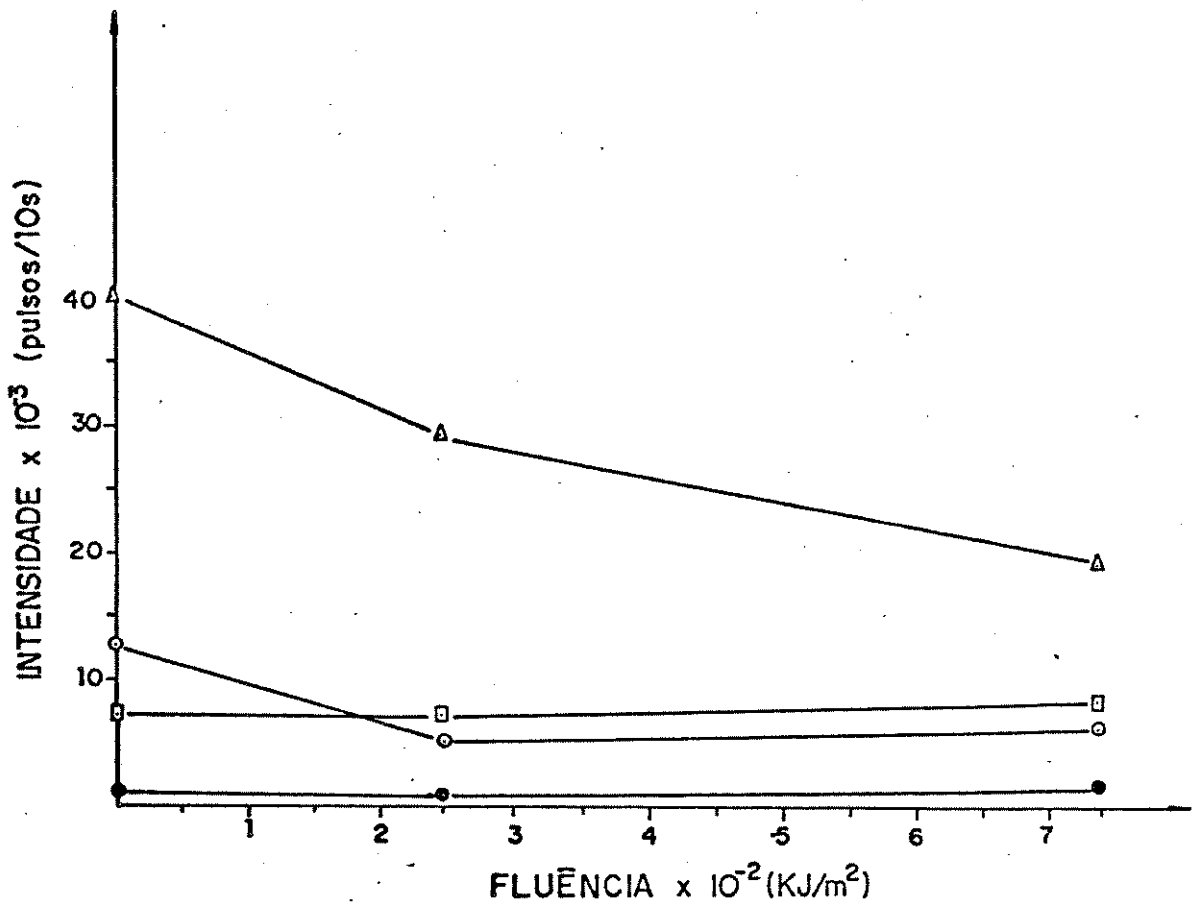


FIGURA 15. Intensidade quimiluminescente obtida da casca de arroz irradiada a $\lambda \geq 300$ nm e tratada quimicamente.

7.10.2. Espectros na região de infravermelho

As bandas de absorção na região de infravermelho são atribuídas empiricamente e são baseadas em resultados obtidos de compostos modelo.

As bandas mais características de lignina são aquelas encontradas na faixa de 1510 e 1600 cm^{-1} (vibrações C-C no anel aromático) e entre 1470 e 1460 cm^{-1} (deformação C-H e vibrações C-C no anel aromático). A primeira região mencionada não apresenta outras bandas adicionais, prestando-se portanto para provar a existência de lignina em preparações desconhecidas. As intensidades dessas bandas entretanto são influenciadas pelos grupos substituintes ligados ao anel aromático.

As diferentes relações entre as intensidades das bandas a 1510 e 1600 cm^{-1} podem ser usadas para diferenciar ligninas de madeiras moles de ligninas de madeiras duras. Assim sendo, em compostos modelo que representam a lignina de madeira dura, as intensidades dessas duas bandas são praticamente as mesmas enquanto que em compostos que representam lignina de madeira mole, a intensidade da banda em 1510 cm^{-1} é consideravelmente maior.

As bandas intensas correspondentes à absorção de grupos carbonila aparecem entre 1660 e 1725 cm^{-1} e a sua exata posição pode informar se ela está conjugada com o anel aromático (posição abaixo de 1700 cm^{-1}) ou não (posição acima de 1700 cm^{-1}).

Estiramento hidroxila aparece como uma banda larga na região de 3400 cm^{-1} e a banda de estiramento C-H aparece por volta de 2800-3000 cm^{-1} . Estas duas bandas não podem ser usadas para elucidar estruturas complexas do tipo lignina.

A posição e intensidade de bandas entre 1000 e 1100 cm^{-1}

podem sugerir a presença de açúcares, enquanto que a ausência de absorção acima de 3000 cm^{-1} (estiramento OH) indica a ausência de componentes polissacarídeos.

As bandas de absorção mais importantes são apresentadas na Tabela 22.

TABELA 22. Principais bandas de absorção na região de infravermelho de ligninas

Posição (cm^{-1})	Atribuição
3450-3400	Estiramento OH
2940-2820	Estiramento CH em grupo metila
1715-1710	C=O não conjugado ao anel aromát.
1675-1660	C=O conjugado ao anel aromático
1605-1600	Vibração no anel aromático
1515-1505	Vibração no anel aromático
1470-1460	Deformação C-H (assimétrica)
1430-1425	Vibração no anel aromático
1370-1365	Deformação C-H (simétrica)
1330-1325	Presença de anel siringila
1270-1275	Presença de anel guaiacila
1085-1030	Deformações C-H, C-O

Em nosso trabalho extraímos lignina-dioxano de casca de arroz irradiada a comprimentos de onda maiores que 254 e 300 nm durante 1, 3, 6 e 12 horas de irradiação e obtivemos os espectros de absorção na região de infravermelho, usando o método de parti-

lha em KBr.

Os oito espectros obtidos são exatamente iguais e um deles é mostrado na Figura 16.

As principais absorções observadas foram: 3400 cm^{-1} , pico largo de intensidade forte, correspondendo a estiramento OH; 2930 cm^{-1} , pico fino de intensidade forte, atribuído a estiramento CH em grupo metila ou metileno; 1690 cm^{-1} , pico largo de intensidade forte e atribuído⁽⁸⁹⁾ a estiramento C=O conjugado a anel aromático; 1595 e 1505 cm^{-1} , picos finos de intensidades fortes, correspondendo a vibrações no anel aromático.

Como se pode observar na Figura 16, as intensidades dos picos em 1595 e 1505 cm^{-1} são praticamente as mesmas sugerindo-nos que a lignina-dioxano obtida de casca de arroz se comporta nessa faixa de absorção do mesmo modo que ligninas provenientes de madeiras duras.

Um fato que nos chamou atenção foi a não alteração dos espectros de absorção das ligninas-dioxano, principalmente na região de absorção de carbonilas. Sabe-se⁽⁸²⁾ que a fotólise de ligninas origina ácidos carboxílicos e derivados quinônicos, portanto espectros de absorção na região de infravermelho de ligninas irradiadas, deveriam apresentar absorções características das carbonilas.

Obteve-se então o espectro de absorção no infravermelho de lignina-dioxano irradiada a $\lambda > 300\text{ nm}$ durante duas horas⁽⁹⁰⁾, que é mostrado na Figura 17.

Pode-se observar que a única modificação significativa que se nota é o deslocamento da banda de absorção de carbonila para 1710 cm^{-1} que pode ser atribuída⁽⁸⁹⁾ como sendo uma carbonila de ácido, comprovando assim a presença de ácidos nos produtos de

fotólise de ligninas-dioxano

O não aparecimento desta banda de absorção nas ligninas-dioxano de casca de arroz irradiada pode ser atribuído a complexidade do sistema biológico em questão.

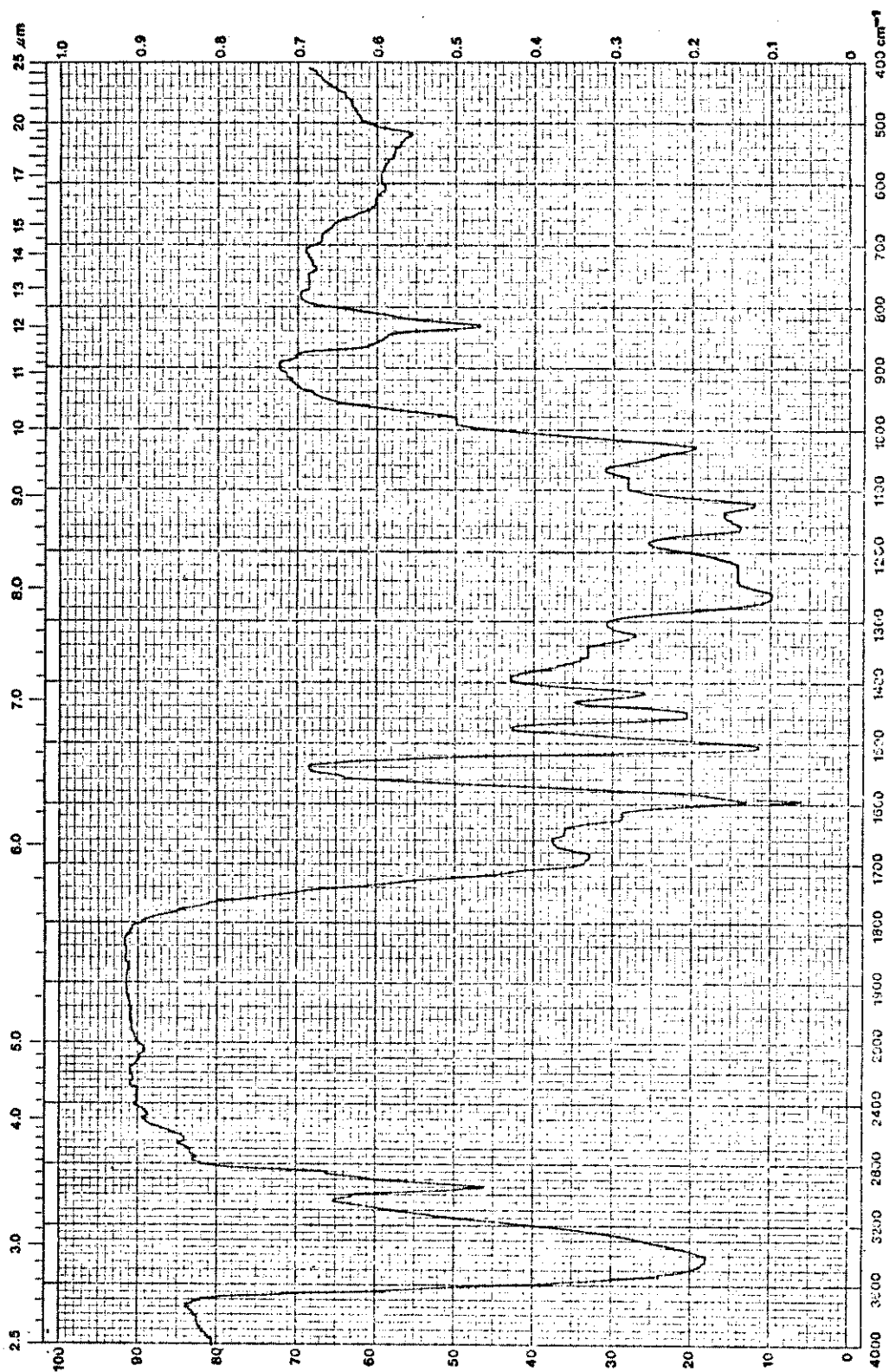


FIGURA 16. Espectro de absorção na região do infravermelho de lignina-dioxano extraída de casca de arroz irradiada.

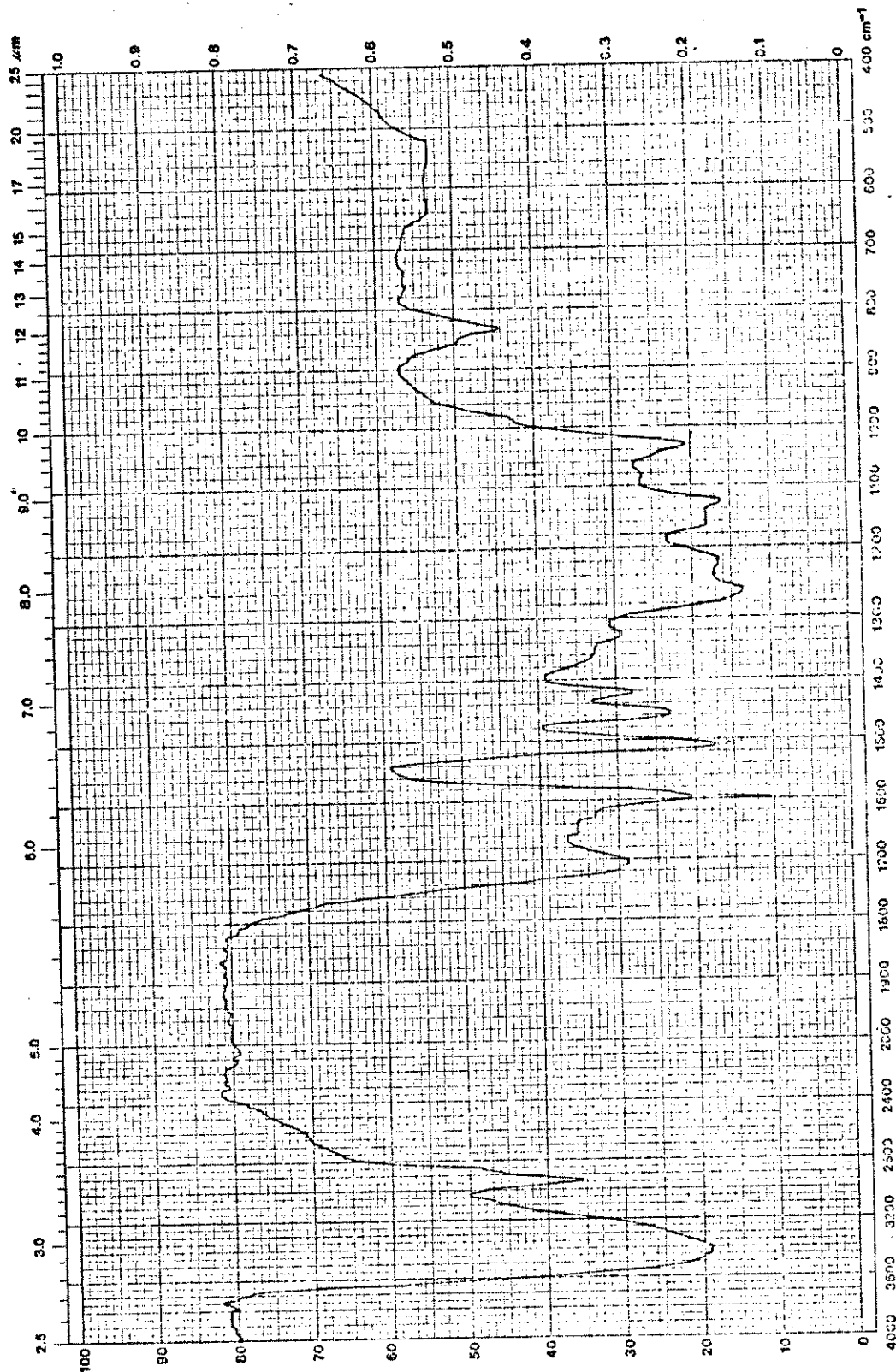


FIGURA 17. Espectro de absorção na região do infravermelho de lignina irradiada durante 30 horas a $\lambda \gg 300 \text{ nm}$.

7.10.3. Fluorescência (73)

A fluorescência é uma técnica que pode ser empregada para o acompanhamento de fotólise de lignina e já foi utilizada por nosso grupo⁽⁸²⁾ no estudo de lignina-dioxano de casca de arroz, lignina de eucalipto irradiadas em sólido e compostos modelo tais como (ver estruturas no Apêndice I): 4,4'-difenil-3,3'-dimetoxiestilbene, 3,5-dimetoxiquinona, vanilina, ácido vanílico, ácido vanilpirúvico e ácido ferúlico.

No nosso caso fizemos irradiações na casca de arroz e em traços lignina-dioxano. Obtivemos quatro amostras provenientes de irradiação a $\lambda \gg 300$ nm (correspondentes a 1, 3, 6 e 12 horas) e duas amostras de irradiação a $\lambda \gg 254$ nm (correspondentes a 1 e 3 horas).

Os espectros de emissão fluorescente, por excitação a $\lambda = 360$ nm se encontram nas Figuras 18 e 19 e mostram deslocamentos no comprimento de onda de emissão máxima quando comparados com o da lignina sem irradiar. Os dados obtidos se encontram na Tabela 23.

Baseado nos resultados obtidos por Vassillo⁽⁸³⁾ em seu estudo de lignina-dioxano extraída de casca de arroz e compostos modelo, podemos sugerir que a irradiação da casca a $\lambda \gg 300$ nm provoca na lignina o aparecimento de estruturas do tipo da vanilina e do ácido vanilpirúvico e que a irradiação da casca a $\lambda \gg 254$ nm provoca na lignina o aparecimento de estruturas estilbênicas.

TABELA 23. Comprimentos de onda de emissão máxima fluorescente ($\lambda_{exc}=360$ nm) de ligninas-dioxano extraídas de casca de arroz irradiada.

Tempo de irradiação (h)	CA 254 (nm)	CA 300 (nm)
0	410	410
1	400	410
3	395	425
6	---	415
12	---	420

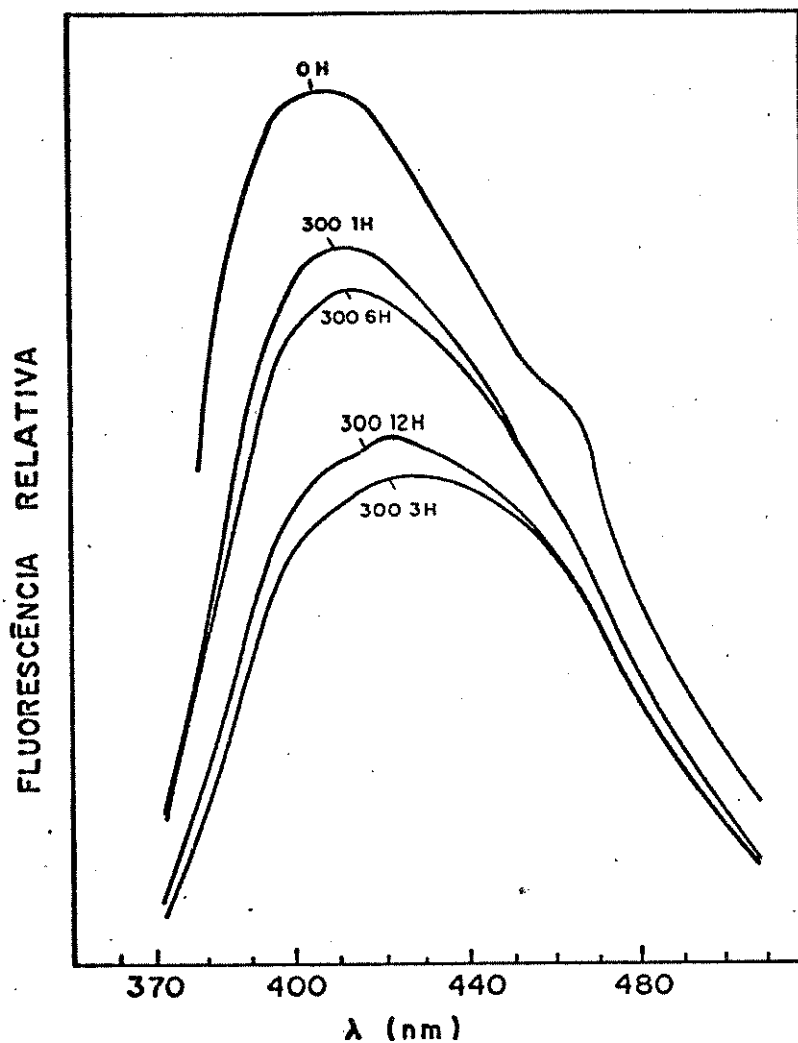


FIGURA 18. Espectros de emissão fluorescente de ligninas-dioxano extraídas de cascas de arvore irradiada a $\lambda \gg 300$ nm ($\lambda_{exc} = 360$ nm).

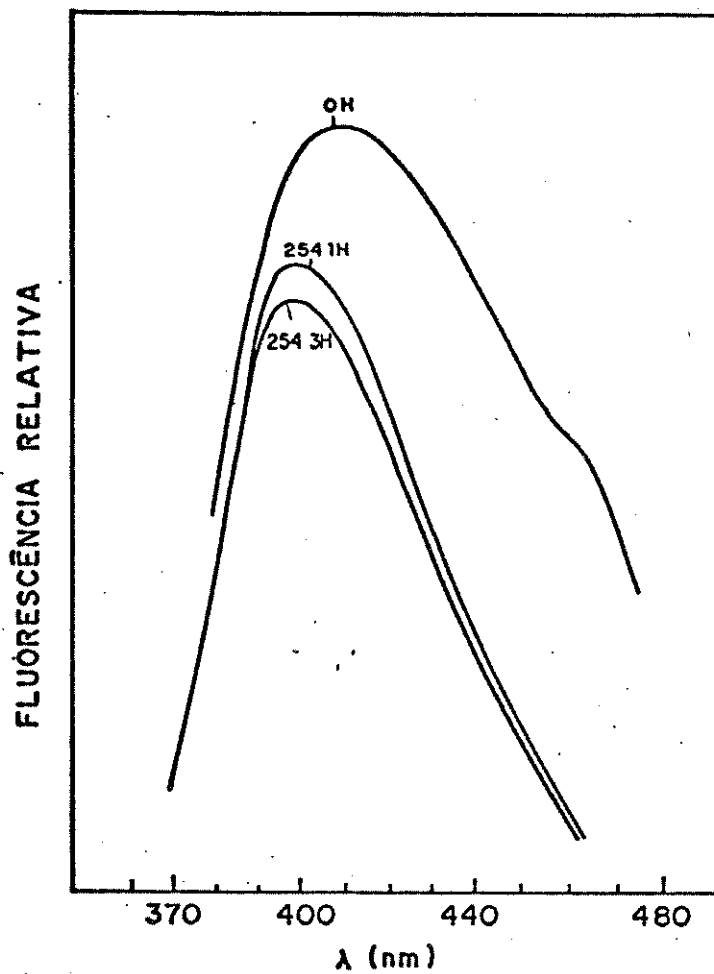


FIGURA 19. Espectros de emissão fluorescente de ligninas-dioxano extraídas de casca de eucalipto irradiada a $\lambda \geq 254$ nm ($\lambda_{exc} = 360$ nm).

7.10.4. Análise termogravimétrica das ligninas-dioxano isoladas

Os termogramas obtidos referentes às ligninas-dioxano i soladas são muito semelhantes ao apresentado na Figura 27.

Nele podemos destacar três regiões distintas com perda de massa sensível: A primeira delas se situa entre a temperatura ambiente e T_1 ($\sim 70^\circ\text{C}$) e a variação de massa pode ser atribuída a perda de água da amostra. A segunda região ocorre na faixa compreendida entre T_2 e T_3 ($230-465^\circ\text{C}$), onde ocorre a pirólise da substância com eliminação de vapores, gases e formação de carvão. A terceira região possui temperaturas superiores a T_3 onde ocorrem reações de degradação e condensação com acúmulo de produtos aromáticos.

É interessante frisar que em todas as amostras analisadas, à temperatura de 400°C , 50 % da lignina estava ainda não utilizada, o que pode ser justificado pela complexidade do polímero tridimensional.

Os termogramas analisados correspondem às amostras de ligninas-dioxano extraídas de casca de arroz irradiada a $\lambda \gg 254$ e $\lambda \gg 300$ nm durante 1, 3, 6 e 12 horas e também sem irradiar.

Os valores de temperaturas obtidos dos termogramas se encontram na Tabela 24 e podemos notar que para as amostras irradiadas a $\lambda \gg 254$ nm, a faixa de temperatura $T_3 - T_2$ aumenta com o aumento da fluência de irradiação até 2333 KJ/m^2 (dois horas de irradiação). Esta correlação não existe para as amostras irradiadas a $\lambda \gg 300$ nm.

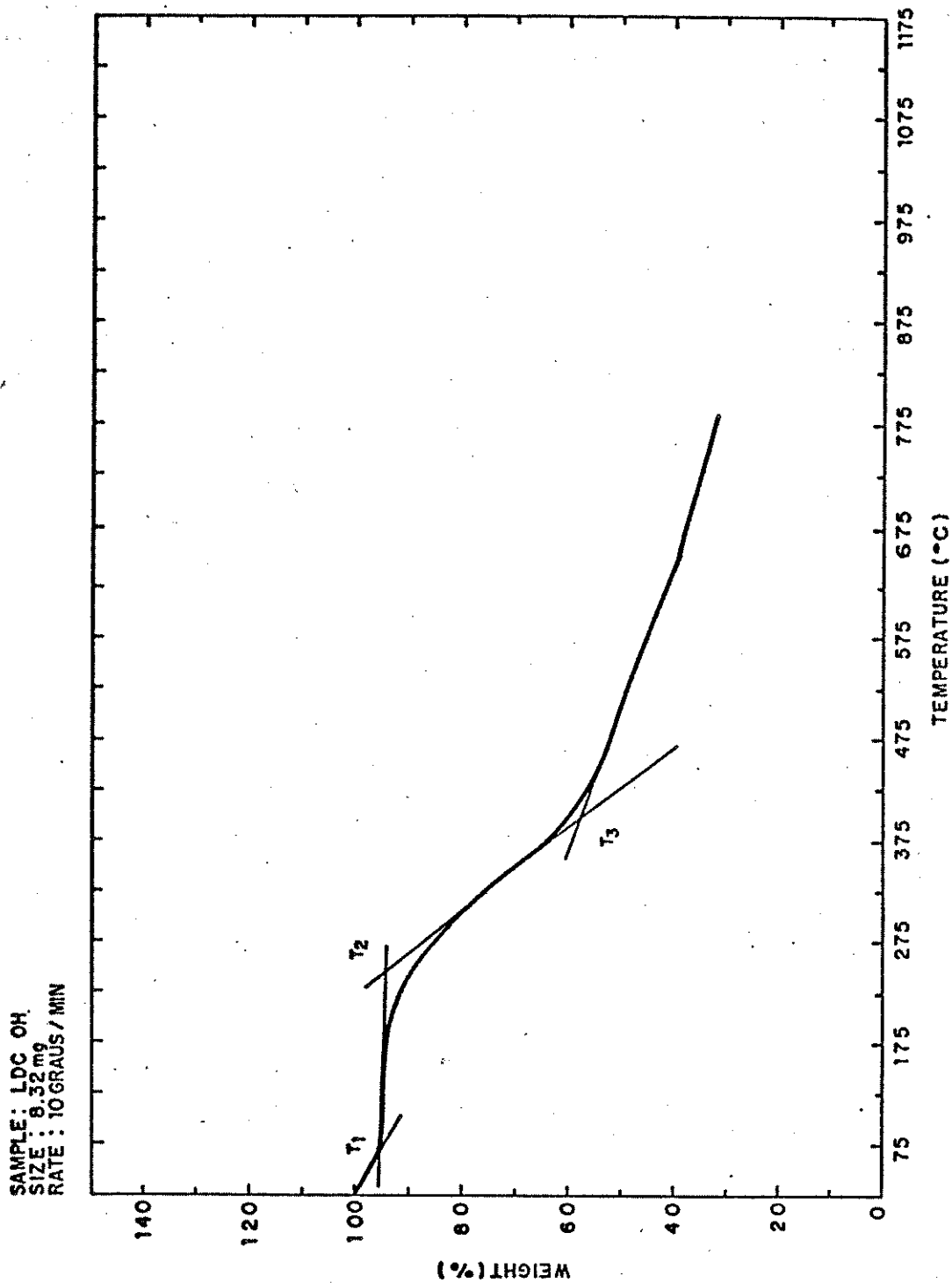


FIGURA 20. Termograma obtido da análise termogravimétrica de lignina-dioxano extraída de casca de arroz.

TABELA 24. Temperaturas correspondentes aos pontos de inflexão de termogramas obtidos de ligninas-dioxano obtidas de casca de arroz irradiada.

FLUÊNCIA (KJ/m ²)	T ₁ (°C)	T ₂ (°C)	T ₃ (°C)	T ₃ -T ₂ (°C)
sem irradiar	67	247	400	153
λ >> 254 nm				
389	70	257	465	208
1166	65	237	455	218
2333	65	237	460	223
4666	65	247	425	178
λ >> 300 nm				
246	62	242	417	175
739	67	277	467	190
1477	75	230	395	165
2955	70	240	447	207

7.10.4.1. Pirólise das ligninas obtidas

A energia de ativação (E) da reação de pirólise de ligninas pode ser determinada através de termogramas, utilizando o método desenvolvido por Freeman e Carroll⁽⁹¹⁾ que considera a reação em questão como sendo de cinética de primeira ordem:

$$- \frac{dw}{dt} = kw \quad (12)$$

onde w é a massa no tempo t, e k é a constante de velocidade.

A constante k pode ser descrita pela equação de Arrhenius:

$$k = Z e^{-E/RT} \quad (13)$$

onde E é a energia de ativação, R é a constante dos gases, T é a temperatura absoluta e Z é o fator pré-exponencial. Se T for expresso como $T = T_0 + bt$, onde T_0 é a temperatura inicial e b é a velocidade linear de aquecimento, então:

$$- \frac{dw}{dT} = \frac{Z}{b} e^{-E/RT} w \quad (14)$$

ou

$$\ln \left(- \frac{d \ln w}{dT} \right) = \ln \frac{Z}{b} - \frac{E}{RT} \quad (15)$$

O coeficiente angular da reta obtida de $\ln \left(- \frac{d \ln w}{dT} \right)$ contra o inverso da temperatura absoluta dará o valor da energia de ativação sobre a constante dos gases.

Com relação à cinética de degradação, a Tabela 25 mostra os valores calculados de energia de ativação do processo de pirólise das amostras.

Estes resultados indicam que a energia de ativação para as ligninas-dioxano analisadas varia entre 9,43 e 12,42 KJ/mol; e o que se pode notar é que estas variações encontradas são pouco significativas.

Determinações de energia de ativação de pirólise de lignina Klason foram publicadas por El-Kalyoubi e colaboradores⁽⁷⁶⁾ e os seus resultados variam de 7,63 KJ/mol, para a lignina Klason de palha de arroz a 8,09 KJ/mol, para a lignina de bagaço de cana.

TABELA 25. Energia de ativação da reação de pirólise de ligninas-dioxano extraídas de casca de arroz irradiada a diferentes fluências.

Fluência (KJ/m ²)	Intervalo temperatura (°C)	Porcentagem decomposição	Coefficiente correlação	Energia ativação (KJ/mol)
s/irradiar	190-260	93,5-87,5	0,989	11,04
$\lambda \gg 254$ nm				
389	190-260	93,5-88,0	0,998	12,10
1166	180-290	94,3-82,0	0,974	9,96
2333	200-250	93,3-88,3	0,989	11,08
4666	160-250	94,0-88,2	0,990	9,43
$\lambda \gg 300$ nm				
246	190-250	92,8-88,3	0,993	10,84
739	210-270	95,5-91,2	0,992	12,42
1477	160-250	93,8-87,7	0,999	10,58
2955	160-240	95,0-90,2	0,995	10,83

7.10.5. Microscopia Eletrônica

Micrografias da casca de arroz foram obtidas com o intuito de se tentar visualizar os efeitos causados pelos pré-tratamentos efetuados.

A estrutura do grão de arroz é mostrada na Figura 21.

A casca de arroz propriamente dita é formada⁽²²⁾ por duas partes levemente embricadas nas bordas que se fecham. A parte maior é chamada de lema e a menor de pálea. As duas possuem a mesma estrutura formada por quatro camadas:

a. Epiderme externa. É o revestimento da casca, é formada por uma espessa cutícula sob a qual se dispõem células de paredes silicificadas.

b. Esclerênquima. É a camada situada abaixo da epiderme externa e é formada por células de paredes lignificadas e silicificadas.

c. Células parenquimatosas. É a camada formada de células de paredes finas e esponjosas.

d. Epiderme interna. É a camada interna, caracterizada por células de mesmo diâmetro.

7.10.5.1. Micrografias com destiques (ver apêndice III)

Casca de arroz sem pré-tratamento

As fotos 1, 2 e 3 apresentam a epiderme externa consor-

vada, as estruturas celulares são revestidas de sílica. Esta sílica garante a permanência da estrutura da casca mesmo após reduzida a cinzas.

As fotos 4 e 5 mostram a epiderme interna da casca desorganizada e também as células parenquimatosas. Estas camadas internas são de paredes não silicificadas e se quebram facilmente.

Casca de arroz irradiada $\lambda 300$ nm

As fotos 6 e 7 mostram o esclerênquima da casca bem organizado e a foto 8 mostra a epiderme externa levemente atingida.

Casca de arroz pré-tratada com ozônio

A foto 9 apresenta a epiderme externa bem organizada mas com fissuras entre as filas celulares.

A epiderme externa, em fratura lateral, é mostrada na foto 10; todas as outras camadas estão conservadas.

Detalhe do esclerênquima bem conservado é visto nas fotos 11 e 12.

A foto 13 mostra esclerênquima em corte transversal, apresenta a estrutura da parede celular conservada mas com pequenos espaços entre as células. Este possível dano à lamela média pode ser sugerido como sendo devido ao tratamento com ozônio.

Casca de arroz tratada com água oxigenada

A foto 14 apresenta a epiderme externa organizada mas

com fissuras ao longo das faixas celulares. O pré-tratamento po de ter atacado a lamela média.

A foto 15 apresenta uma vista da epiderme externa fissurada e a foto 16 mostra a epiderme interna fragmentada.

A foto 17 mostra a mesma epiderme interna fortemente fragmentada e a 18 mostra o esclerênquima não atacado.

Na foto 19 podemos notar a epiderme atacada e o esclerênquima organizado.

De um modo geral podemos sugerir que do ponto de vista morfológico, todos os tratamentos parecem afetar igualmente e de maneira branda a casca de arroz.

O tratamento não chega a atingir a organização celular, principalmente as camadas que possuem células reforçadas por sílica. As camadas mais suscetíveis são a epiderme inferior e o parênquima.

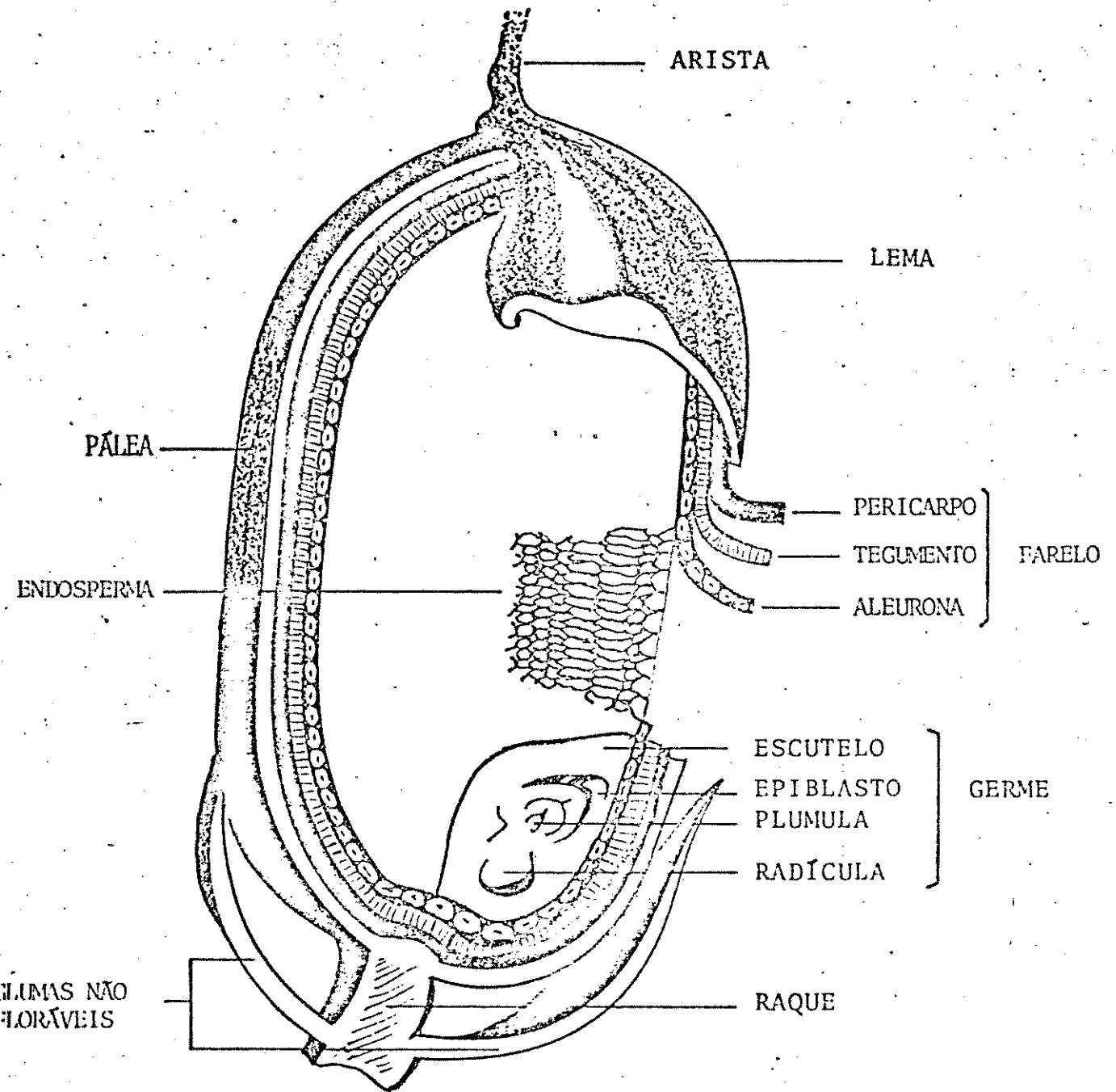


FIGURA 21. Estrutura do grão de milho.

7.10.6. Espectros de fotoacústica

É sabido que qualquer método utilizado para extrair lignina faz com que ela se degrade, pelo menos em parte. Conseqüentemente toda informação química e espectroscópica obtida corresponde a dados relativos a fragmentos de lignina isolados do material lignocelulósico.

Deste modo, para se ter uma idéia de suas propriedades e funções na parede celular, estudos de lignina devem ser feitos in situ. A fotoacústica seria uma técnica ideal pois fornece espectros de absorção na região do ultravioleta, visível e infravermelho de sólidos.

Basicamente o método consiste em se irradiar a amostra com luz monocromática modulada. Há absorção da luz pela amostra e subsequente desexcitação térmica dos estados eletrônicos, resultando em trocas periódicas microtérmicas na amostra. Isto leva a um fluxo periódico de calor, da amostra para o gás que a cerca.

As variações moduladas de pressão do gás são detectadas por um microfone, como ondas de pressão acústica e a amplitude deste sinal é proporcional à quantidade de calor transferida da amostra e portanto à quantidade de luz absorvida. O espectro fotoacústico é então uma representação do espectro de absorção ótica do material.

Dados da literatura⁽⁹³⁾ mostram que as absorções de luz ultravioleta em material lignocelulósico ocorrem na faixa de 300 a 350 nm e são devidas a cromóforos de estrutura aromática, per-

tanto relacionados com o conteúdo de lignina da amostra.

O nosso objetivo foi o de através dos espectros de casca de arroz pré-tratada, comparados com o da casca não tratada, pudessem nos fornecer informações a respeito do pré-tratamento.

Os espectros analisados (Figura 22), mostram absorções na faixa de 300 a 350 nm, mas são extremamente semelhantes nas várias amostras.

Uma hipótese levantada seria a de que os produtos provenientes da degradação da lignina também absorveriam nesta região ou ainda, que as modificações na lignina seriam tão pequenas que não seriam detectáveis na banda larga de absorção.

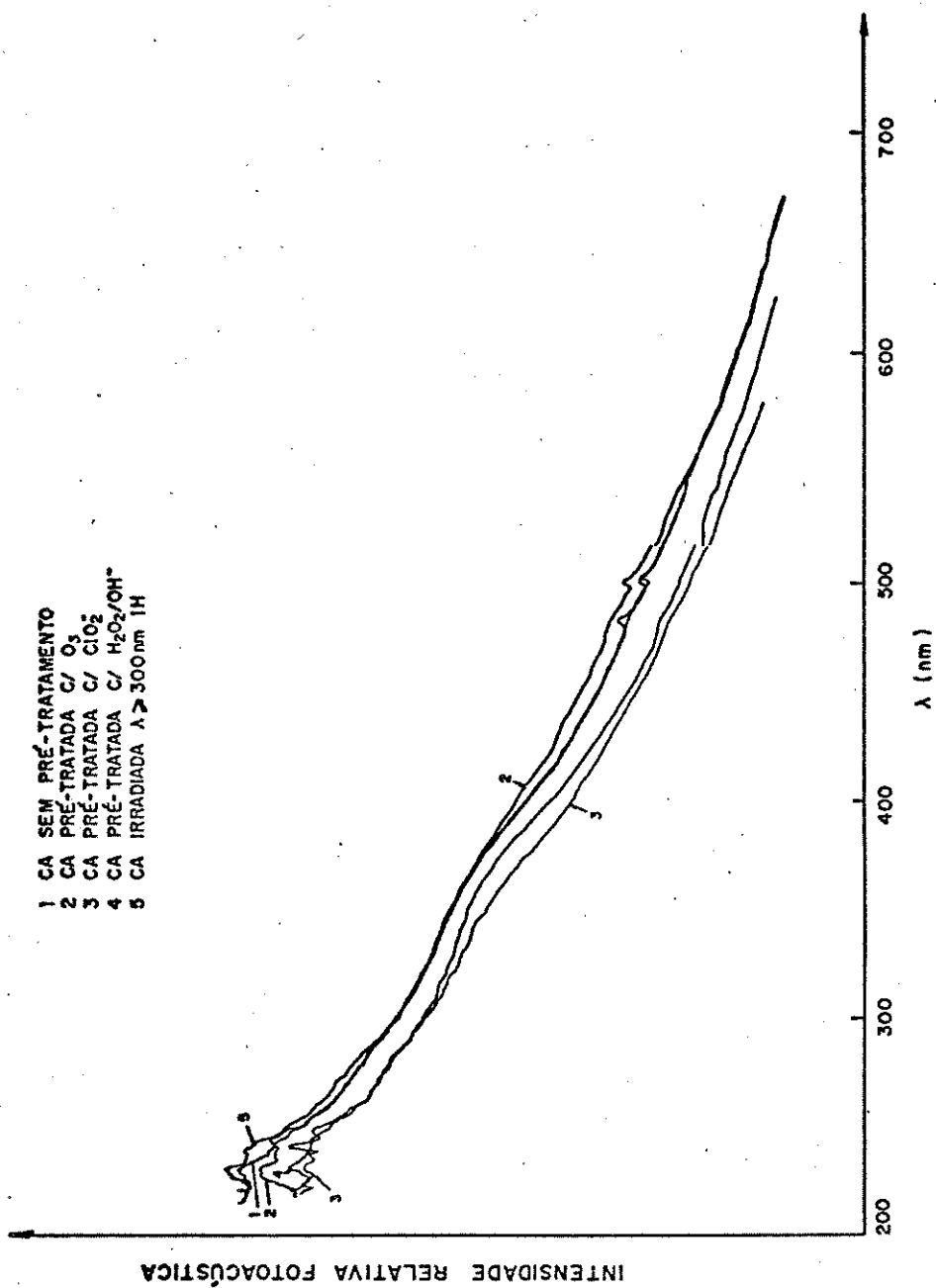


FIGURA 22. Espectros de fotoacústica obtidos de amo-
 ca de nanos pré-tratada fotoquimicamente
 ou fotoquimicamente.

8. CONCLUSÕES

Nos capítulos anteriores, pudemos verificar que Chrysonilia sitophila (TFB 27441) é um fungo com atividades lignolítica e celulolítica acentuadas, podendo ser utilizado na produção de proteínas unicelulares de substratos lignocelulósicos como casca de arroz.

Este fungo consegue transformar casca de arroz em micélio com 66,7 % de rendimento num prazo de dez dias.

O rendimento e/ou a qualidade da proteína unicelular obtida puderam ser melhorados utilizando-se um pré-tratamento químico ou fotoquímico separado.

O pré-tratamento mais eficiente para deslignificar a casca de arroz foi o clorito de sódio (consegue eliminar 45,2 % da lignina da amostra) e o tratamento com água oxigenada em meio básico conseguiu enriquecer o teor de celulose em 38,5 %.

Com relação a proteína unicelular, dos pré-tratamentos estudados, o fotoquímico foi o mais eficiente. Houve um aumento da massa fúngica e do teor de proteínas totais de 17 e 14 % respectivamente quando comparados com os valores obtidos da massa fúngica da casca de arroz nativa. Neste caso, a taxa de transformação de casca de arroz em micélio foi de 82,5 %.

A análise de aminoácidos nas cascas pré-tratadas não apresentou alterações significativas (exceto lisina), mas com relação a análise da massa fúngica foram notadas modificações marcantes nos teores de aminoácidos tanto essenciais quanto não essenciais.

A principal alteração observada foi no teor de metioni-

na, que na casca nativa era inferior a 0,1 % e passou a 10,3 % na massa micelial da casca de arroz irradiada a 300 nm durante 1 hora.

Estas proteínas unicelulares contém todos os aminoácidos essenciais e em alguns casos ultrapassam os valores recomendados pela NAS 1980⁽⁹⁴⁾.

Dados de quimiluminescência sugerem que a casca de arroz irradiada, quando em meio básico, provoca na lignina o perda de suas propriedades antioxidantes, possibilitando assim um ataque fúngico mais eficiente.

A hidrólise da casca de arroz em ácido trifluoroacético mostrou que esta reação é viável do ponto de vista químico, apesar dos inconvenientes de corrosão e altas temperaturas. A reação da casca pré-tratada com clorito de sódio deu uma mistura de açúcares onde prevalecem a glicose com 39,6 % e a xilose com 21,0 % em massa.

A hidrólise enzimática das cascas de arroz usando celulase comercial mostrou que as cascas tratadas com clorito de sódio e com luz inibem parcialmente a enzima e aquelas tratadas com água oxigenada e ozônio (principalmente), são favorecidas.

As micrografias obtidas de casca de arroz mostram que do ponto de vista morfológico, os pré-tratamentos afetam igualmente, de forma branda e não chegam a atingir a organização celular, principalmente as camadas que possuem células reforçadas por sílica. As camadas mais atingidas são a epidermo inferior e o perênquima.

Estudos de emissão fluorescente de lignina-dioxano extraída de casca de arroz irradiada a 300 nm sugerem que a fotólise da casca provoca na lignina o aparecimento de estruturas de

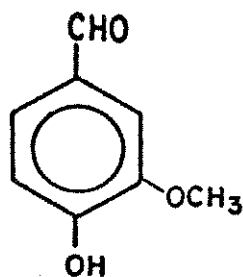
tipo vanilina e ácido vanilpirúvico e que a irradiação da casca a 254 nm provoca o aparecimento de estruturas estilbênicas.

Espectro de absorção na região de infravermelho de lignina-dioxano, irradiada em sólido, durante doze horas a 300 nm, mostrou pico característico de carbonila em 1710 cm^{-1} , atribuído a carbonila de ácido na forma associada. Este dado reforça a sugestão de formação de ácidos carboxílicos na fotólise de ligninas.

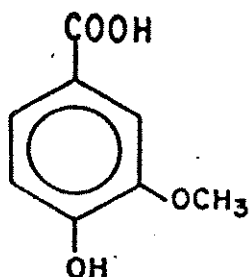
A energia de ativação da reação de pirólise de lignina-dioxano foi calculada através de dados termogravimétricos. Os valores obtidos variam de 9,43 a 12,42 KJ/mol.

APÊNDICE I

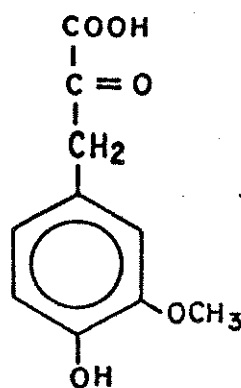
Estruturas de compostos modelo de lignina usados⁽⁸²⁾ em análises de emissão fluorescente.



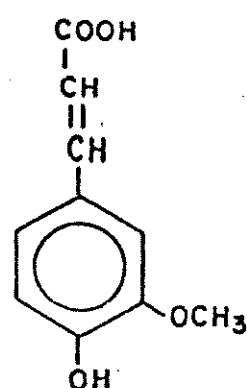
VANILINA



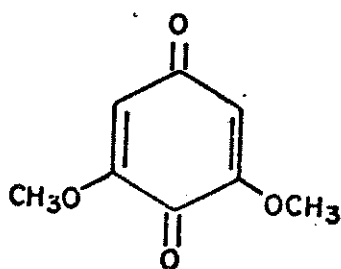
Ác. VANÍLICO



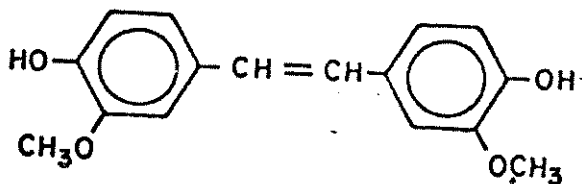
Ác. VANILÍDRICO



Ác. VANÍLICO

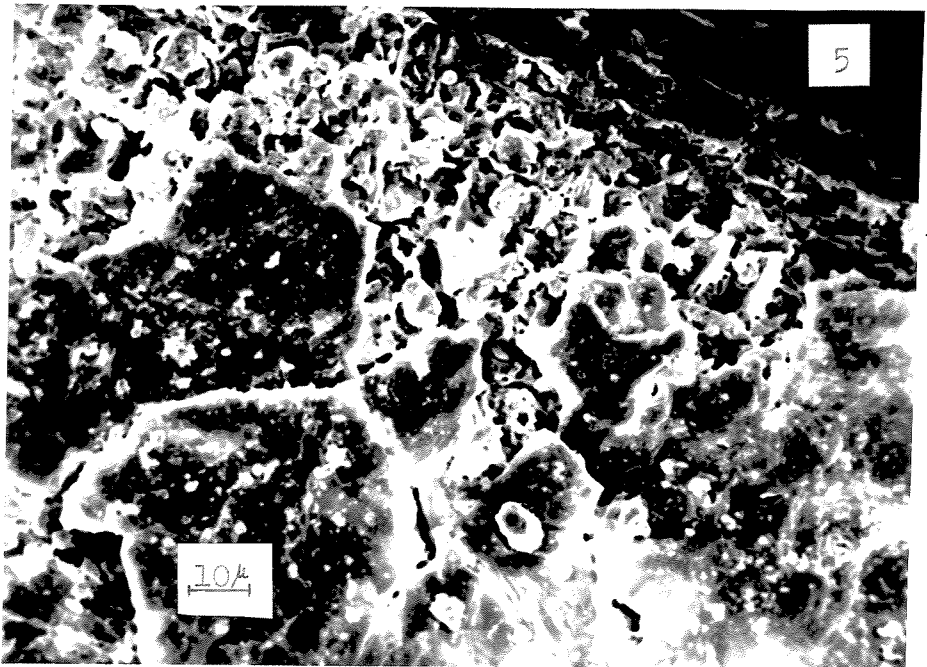
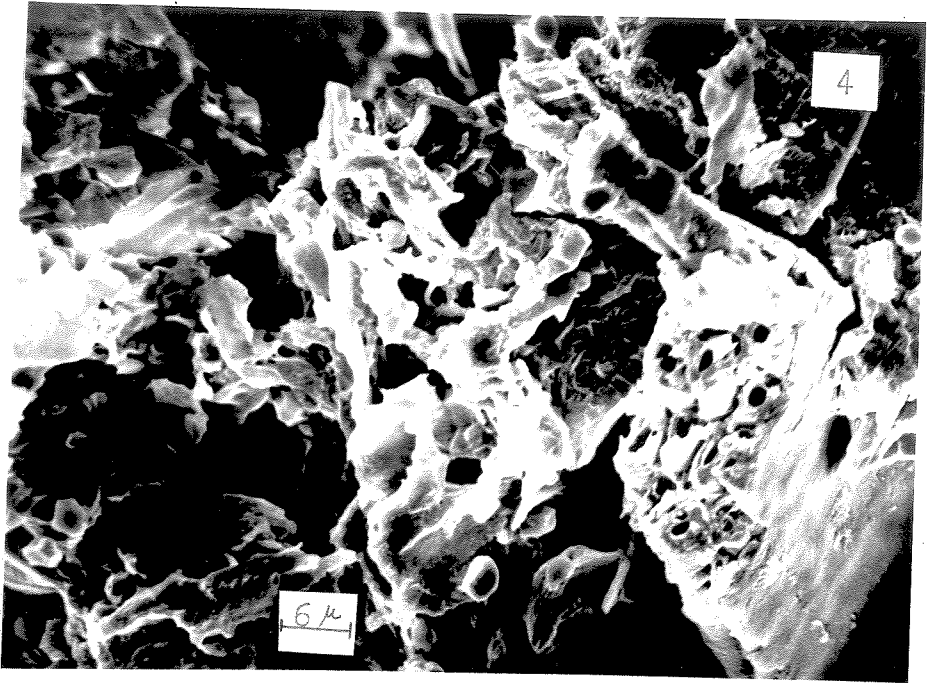


3,5-DIMETOXIQUINONA

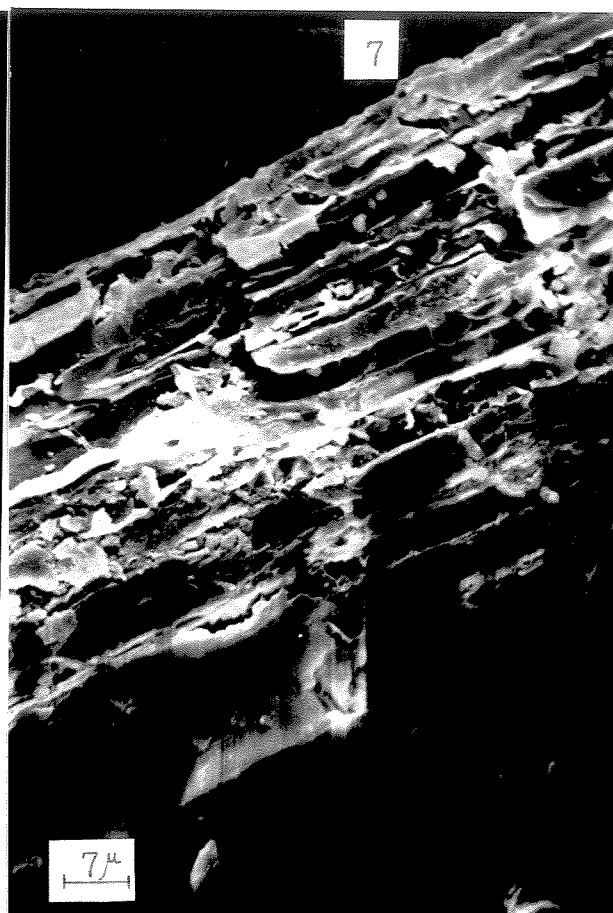
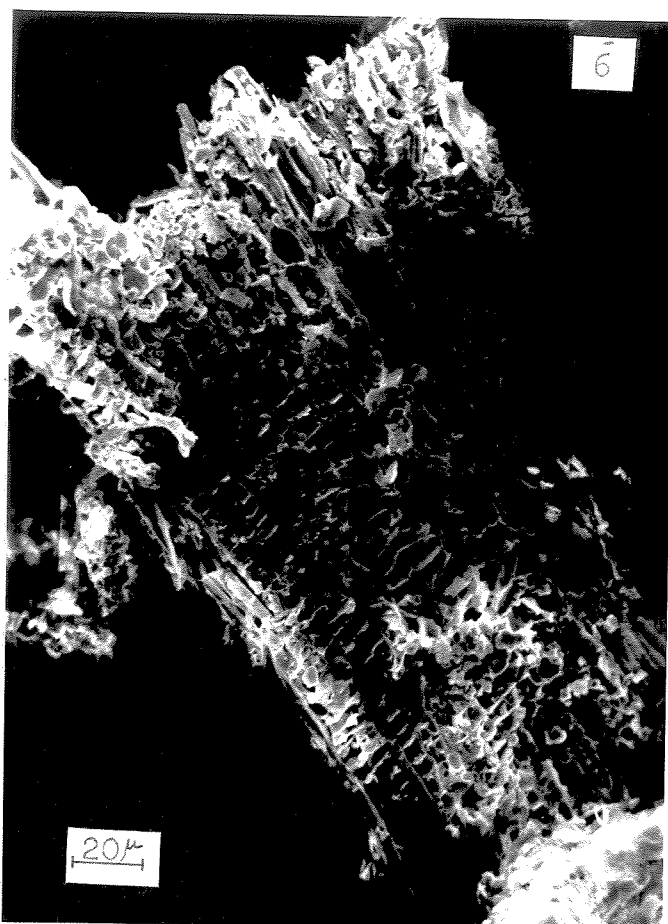


4,4'-DIHIDROXI-3,3'-DIMETOXI-ESCHILENO

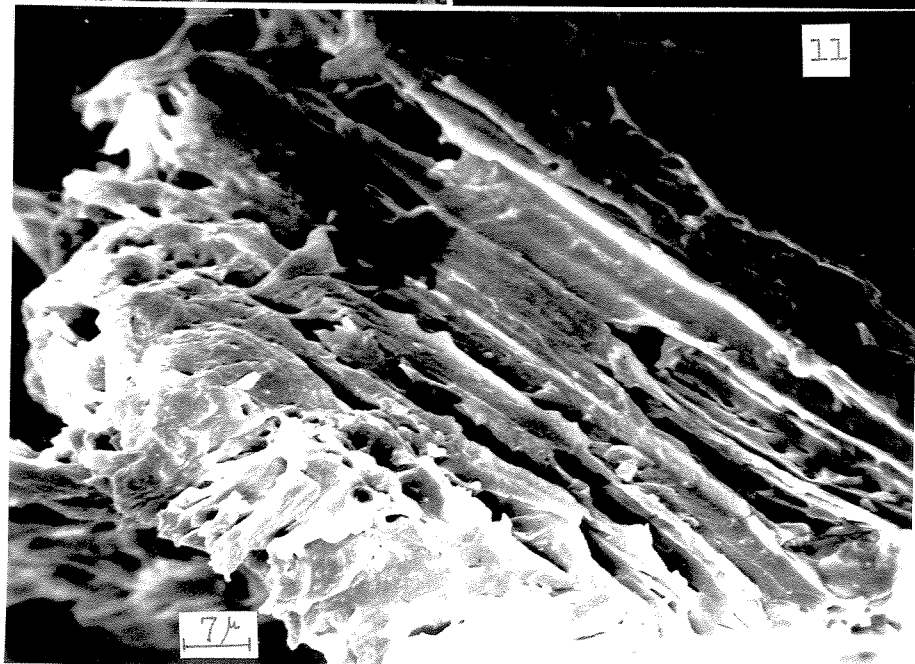
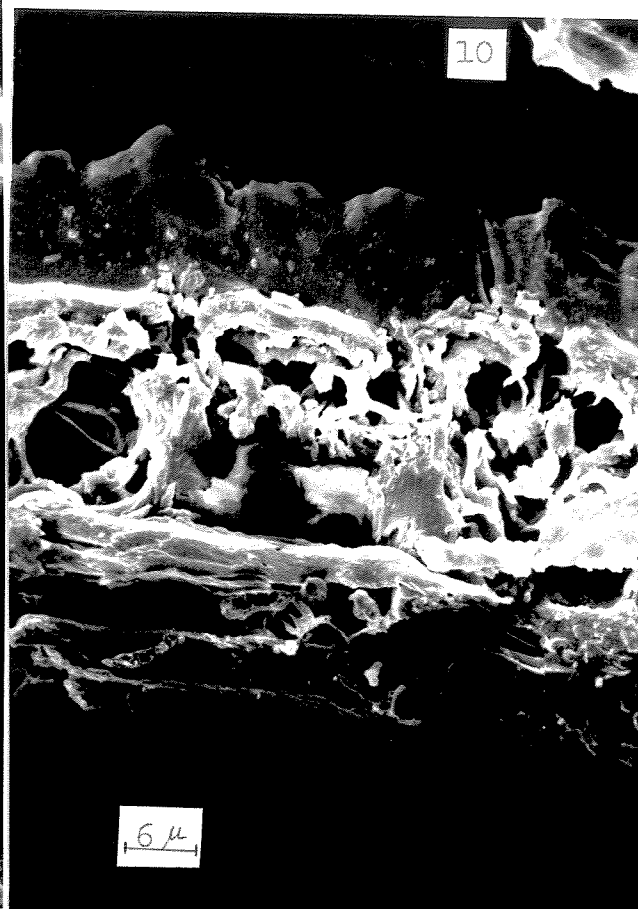
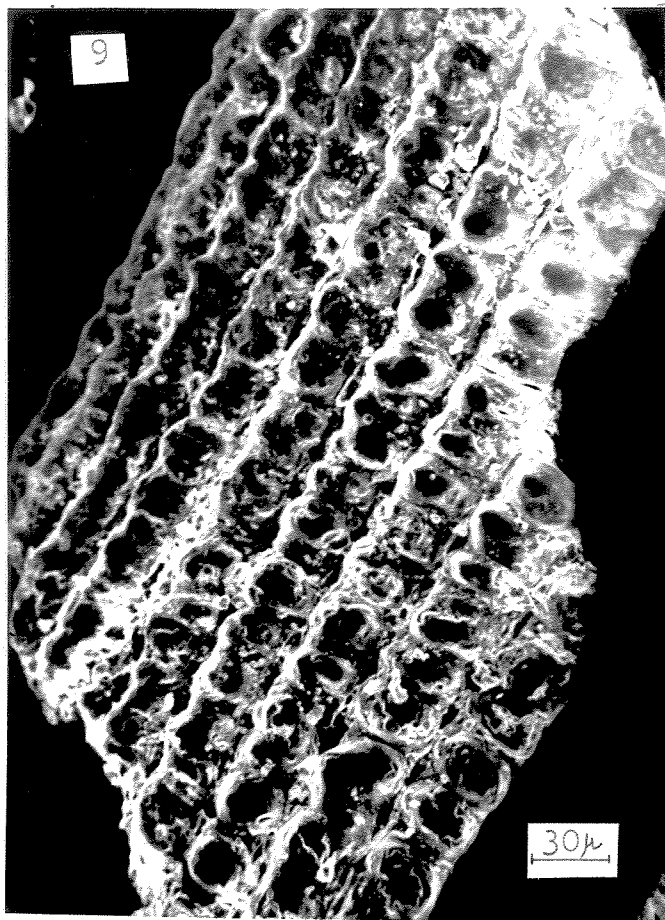
Micrografias de casca de arroz sem pré-tratamento



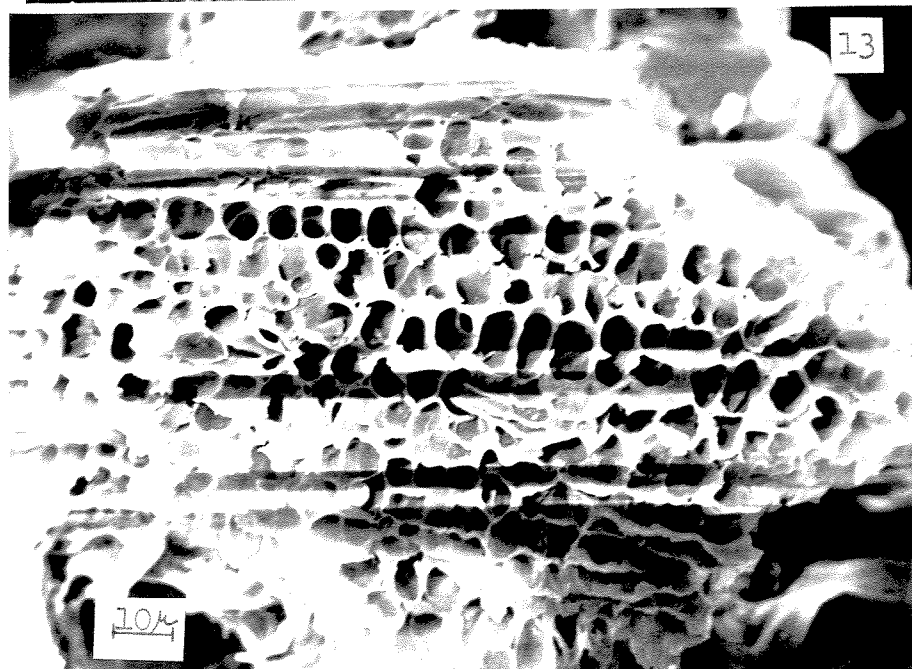
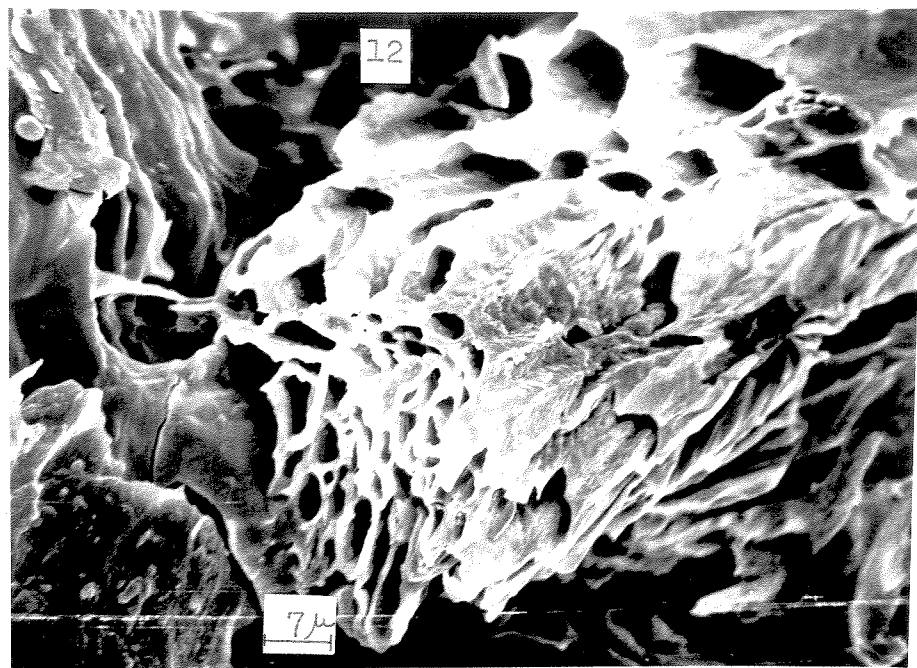
Micrografias de casca de arroz irradiada a $\lambda \gg 300$ nm



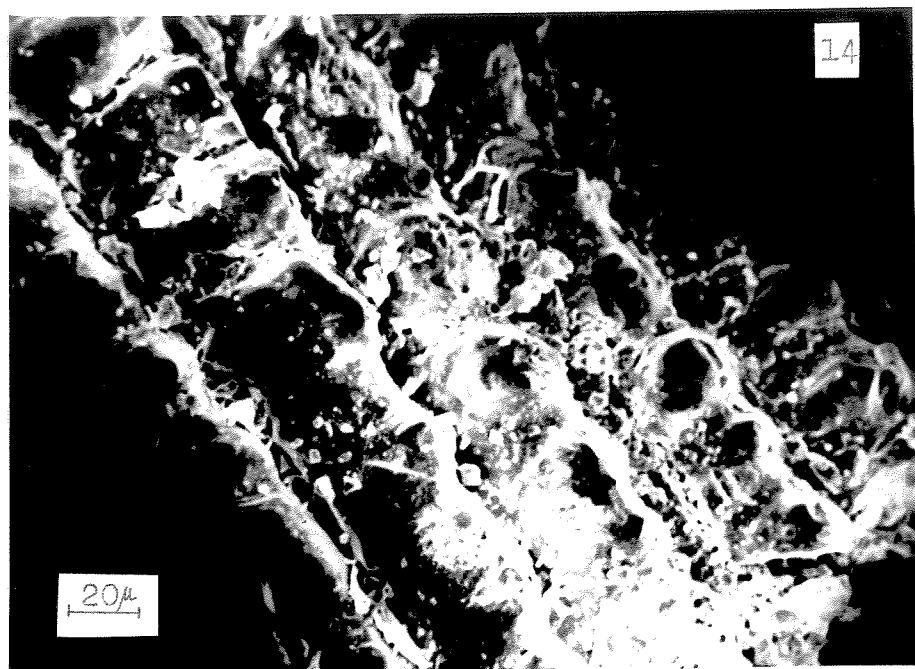
Micrografias de casca de arroz pré-tratada com ozônio



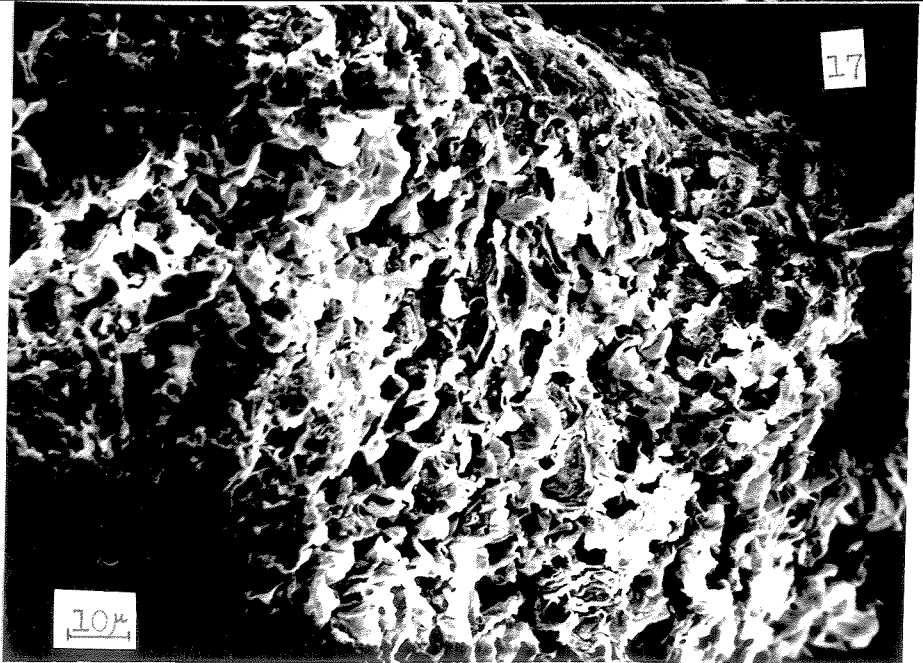
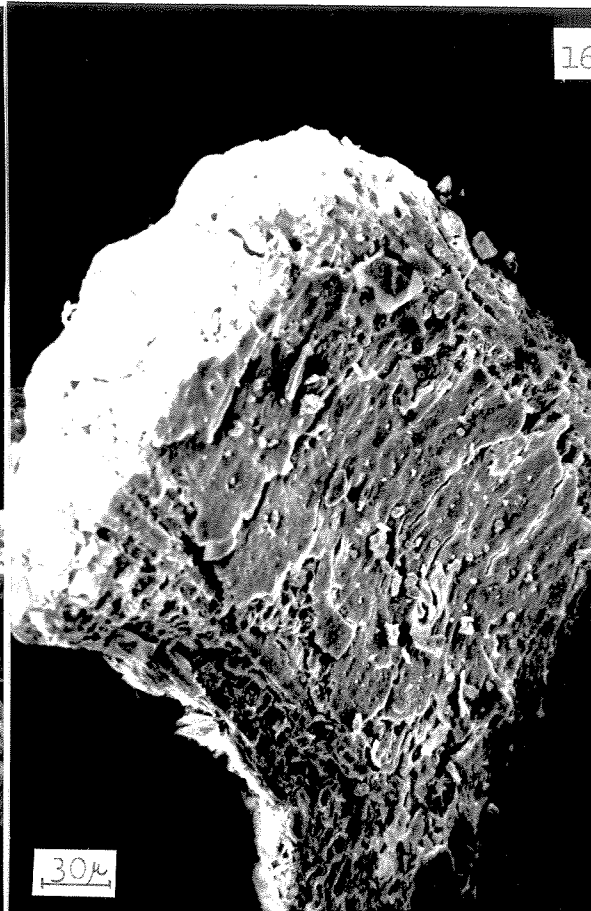
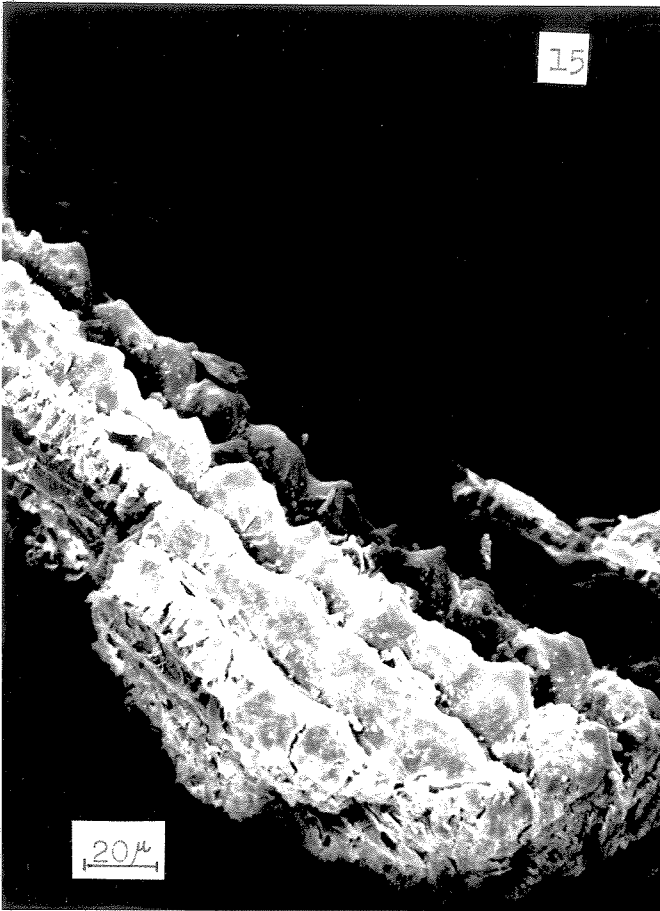
Micrografias de casca de arroz pré-tratada com ozônio



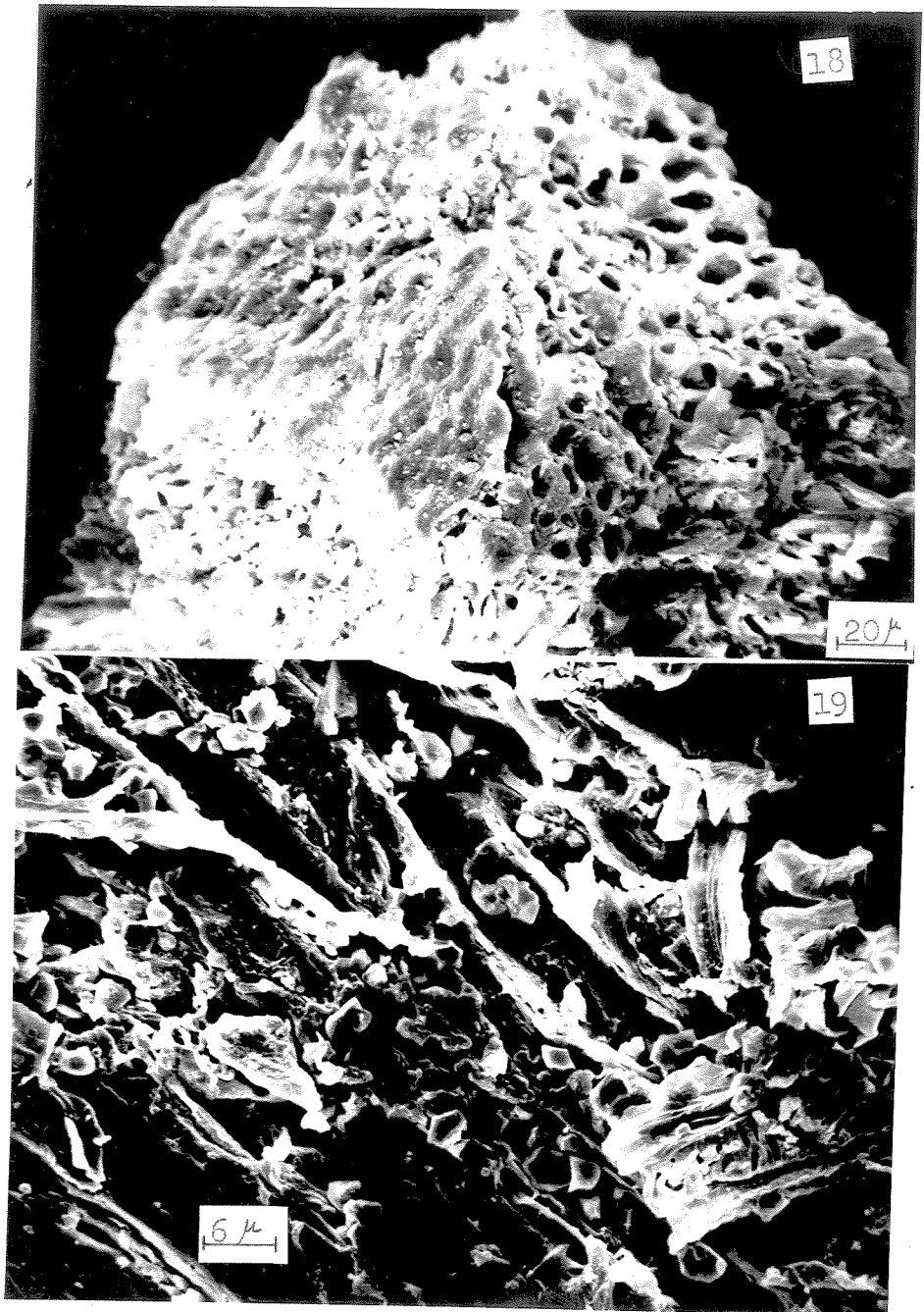
Micrografia de casca de arroz pré-tratada com água oxigenada em meio básico



Micrografias de casca de arroz pré-tratada com clorito de sódio



Micrografias de casca de arroz pré-tratada com clorito de sódio



APÊNDICE III

Dados obtidos de termogramas para o cálculo da energia de ativação da reação de pirólise de lignina-dicouano extraída de casca de arroz irradiada a diferentes fluências.

LDC OH

%	w (mg)	$-\ln(\Delta I_{\text{max}}/\Delta T)$	$1/T \cdot 10^3$ (K ⁻¹)
93,5	7,78	7,89	2,16
93,1	7,75	7,75	2,11
92,7	7,71	7,43	2,07
92,0	7,65	7,35	2,03
91,1	7,58	6,91	1,99
90,0	7,42	6,75	1,95
89,0	7,40	6,57	1,91
87,5	7,28	6,27	1,88

LDC 254 1H

%	w (mg)	$-\ln(\Delta \ln w / \Delta T)$	$1/T \cdot 10^3$ ($^{\circ}\text{K}^{-1}$)
93,5	10,08	8,04	2,16
93,2	10,05	7,89	2,11
92,8	10,00	7,53	2,07
92,2	9,94	7,26	2,03
91,5	9,86	6,98	1,99
90,5	9,76	6,81	1,95
89,5	9,65	6,57	1,91
88,0	9,49	6,27	1,88

LDC 254 3H

%	w (mg)	$-\ln(\Delta \ln w / \Delta T)$	$1/T \cdot 10^3$ ($^{\circ}\text{K}^{-1}$)
94,3	8,90	7,90	2,21
94,0	8,87	8,05	2,19
93,7	8,85	7,76	2,12
93,2	8,80	7,25	2,07
92,5	8,73	6,88	2,02
91,3	8,62	6,68	1,99
90,2	8,51	6,66	1,95
89,0	8,40	6,40	1,91
87,5	8,26	6,27	1,88
85,7	8,09	6,10	1,84
84,0	7,93	6,12	1,81
82,0	7,74	6,03	1,78

LDC 254 6H

%	w (mg)	$-\ln(\Delta \ln w / \Delta T)$	$1/T \cdot 10^3$ (K ⁻¹)
92,8	6,79	7,53	2,11
92,3	6,76	7,42	2,07
91,7	6,71	7,24	2,03
90,7	6,64	6,91	1,99
89,7	6,57	6,61	1,95
88,3	6,46	6,48	1,91

LDC 254 12H

%	w (mg)	$-\ln(\Delta \ln w / \Delta T)$	$1/T \cdot 10^3$ (K ⁻¹)
94,0	4,99	8,46	2,21
93,8	4,89	8,23	2,19
93,5	4,87	7,76	2,17
93,0	4,85	7,53	2,16
92,5	4,82	7,52	2,13
92,0	4,79	7,33	2,07
91,3	4,76	7,10	2,03
90,5	4,72	6,91	1,99
89,5	4,66	6,66	1,95
88,2	4,60	6,48	1,91

LDC 300 1H

%	w (mg)	$-\ln(\Delta \ln w / \Delta T)$	$1/7 \cdot 10^3$ (T^{-1})
92,8	7,25	7,88	2,17
92,5	7,22	7,63	2,11
91,9	7,18	7,22	2,07
91,3	7,13	7,04	2,03
90,3	7,05	6,91	1,99
89,5	6,99	6,70	1,95
88,3	6,90	6,48	1,91

LDC 300 3H

%	w (mg)	$-\ln(\Delta \ln w / \Delta T)$	$1/7 \cdot 10^3$ (T^{-1})
95,2	5,56	8,06	2,07
94,9	5,54	7,90	2,03
94,5	5,52	7,45	1,99
93,8	5,48	7,09	1,95
93,2	5,44	7,10	1,91
92,3	5,39	6,93	1,87
91,2	5,33	6,68	1,83

LDC 300 6H

%	w (mg)	$-\ln(\Delta \ln w / \Delta T)$	$1/T \cdot 10^3$ (K ⁻¹)
93,8	7,97	8,45	2,31
93,6	7,96	8,23	2,26
93,3	7,93	8,04	2,21
93,0	7,91	7,75	2,16
92,5	7,86	7,43	2,11
91,9	7,81	7,25	2,07
91,2	7,75	6,99	2,03
90,2	7,67	6,80	1,99
89,2	7,58	6,57	1,95
87,7	7,45	6,40	1,91

LDC 300 12 H

%	w (mg)	$-\ln(\Delta \ln w / \Delta T)$	$1/T \cdot 10^3$ (K ⁻¹)
95,0	7,72	8,47	2,31
94,8	7,71	8,04	2,25
94,5	7,68	8,06	2,21
94,2	7,66	7,76	2,16
93,7	7,62	7,54	2,11
93,2	7,58	7,19	2,07
92,3	7,50	6,82	2,03
91,3	7,42	6,77	1,99
90,2	7,33	6,62	1,95

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hacking, A.J., em "Economics Aspects of Biotechnology", Cambridge, University Press, 1986.
2. Brown, A., J. Appl. Biochem., 7, 371 (1985).
3. Linch, J.M., J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl., 718 (1987).
4. Ferrero, G.L. e L'Hermite, J., em "Composting of Agricultural and Other Wastes", ed. J.K.R. Casser, London: Elsevier, 1985.
5. Mc Cinnis, G.D.; Wilson, W.W. e Mullen, G.E., Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev., 22, 352 (1983).
6. Kirk, T.K., em "Degradation of Lignin", "Microbial Degradation of Organic Compounds", ed. D.F. Gibson, p. 399-437. New York: Dekker, 1984.
7. Rolz, C., Ann. Rev. Ferment. Process., 8, 213 (1984).
8. Mueller, H.W. e Troesch, W., Appl. Microbiol. Biotechnol., 24, 180 (1986).
9. Boyles, D.F., J. Chem. Tech. Biotechnol., 36, 495 (1986).
10. Pyle, D.L. e Zaron, C.A. Chem. Eng. Sci., 39, 147 (1984).
11. Antal, M.J.(Jr), Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev., 22, 326 (1983).
12. Eager, R.L. e Pepper, J.M., Can. J. Chem. Eng., 61, 180 (1983).
13. Mes-Hartree, M.; Yu, E.F.C.; Reid, I.D. e Saddler, J.N., Appl. Microbiol. Biotechnol., 26, 120 (1987).

14. Raeder, U.; Thompson, W. e Broda, P., Phil. Trans. R. Soc. Lond., A 321, 475 (1987).
15. O.T.A., 1984. "Commercial Biotechnology: An International Analysis", Washington D.C.: Office of Technology Assessment.
16. Knowles, J.; Lehtovaara, P.; Teeri, T.; Penttala, M.; Salovuori, I. e André, L., Phil. Trans. R. Soc. Lond., A 321, 449 (1987).
17. Tsang, L.J.; Reid, I.D. e Coxworth, E.C., Appl. Environ. Microbiol., 53, 1304 (1987).
18. Magan, N. e Lynch, J.M., J. Gen. Microbiol., 132, 1181 (1986).
19. Ragg, P.L. e Fields, P.R., Phil. Trans. R. Soc. Lond., A 321, 537 (1987).
20. David, C.; Fornasier, R. e Thiry, P., Env. Polyt. J., 22, 515 (1986).
21. Vallander, L. e Ericksson, K.-E., Enzyme Microb. Technol., 2, 714 (1987).
22. Heitz, M.; Carrasco, E.; Rubio, M.; Charvátka, C.; Chornet, E. e Overend, R.P., Can. J. Chem. Eng., 64, 617 (1986).
23. Overend, R.P. e Chornet, E., Phil. Trans. R. Soc. Lond., A 321, 523 (1987).
24. Weimer, P.J. e Chou, Y.-C.T., Appl. Environ. Microbiol., 52, 733 (1986).
25. Rola, C.; Arriola, M.C.; Valladares, J. e Cabrera, J., Process Biochemistry, 22, 17 (1987).
26. Rao, M.; Mishra, C.; Keskar, S. e Triniwasan, M.G., Enzyme Microb. Technol., 7, 625 (1985).

27. Lin, K.W.; Ladisch, M.R.; Voloch, M.; Patterson, J.A. e Noller, C.H., Biotechnol. Bioeng., 27, 1427 (1985).
28. Fran, A.V. e Chambers, R.P., Biotechnol. Bioeng., 28, 811 (1986).
29. Karlsson, O.; Lundquist, K.; Neuller, S. e Westlid, K., Acta Chem. Scand. Ser. B, 42, 48 (1988).
30. Araujo, A. e D'Souza, J., Biotechnol. Bioeng., 28, 1503 (1986).
31. Matte, J.-F. e Doucet, J., Cellul. Chem. Technol., 22, 71 (1988).
32. Dale, B.E., Ann. Rep. Ferment. Process., 8, 299 (1985).
33. Neely, W.C., Biotechnol. Bioeng., 26, 59 (1984).
34. Bono, J.-J.; Gas, G. e Boudet, A.M., Appl. Microbiol. Biotechnol., 22, 227 (1985).
35. Pan, G.Y.; Chen, C.L.; Chang, H.M.; Gratzl, J.S., J. Wood Chem. Technol., 4, 367 (1984).
36. Garcia, S.; Latge, J.P.; Brevost, M.C. e Leisola, M.; Appl. Environ. Microbiol., 53, 2384 (1987).
37. David, C. e Fornasier, R., Macromolecules, 19, 552 (1986).
38. Tanaka, M. e Matsuno, R., Enzyme Microb. Technol., 7, 197 (1985).
39. Fan, L.T., Biotechnol. Bioeng. Symp., 11, 29 (1981).
40. Tewari, H.K.; Sing, L.; Morwaha, S.S. e Kennedy, J.P., J. Chem. Tech. Biotechnol., 38, 153 (1987).
41. Kirk, T.V. e Farrell, R.L., Ann. Rev. Microbiol., 41, 465 (1987).

42. Anônimo, Gasohol USA, 2, 26 (1980).
43. Hardt, H. e Lamport, D.T.A., Biotechnol. Bioeng., 24, 903 (1982).
44. Selke, S.M.; Hawley, M.C.; Hardt, H.; Lamport, D.T.A.; Smith, G. e Smith, J., Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev., 21, 11 (1982).
45. Mclean, D.; Abear, K. e Podrzensky, M.F., Can. J. Chem. Eng., 64, 588 (1986).
46. Eveleigh, D.E., Phil. Trans. R. Soc. Lond., A 321, 435 (1987).
47. Rao, M.; Deshpanda, V.; Seeta, R. e Srinivasan, M.S., Biotechnol. Bioeng., 27, 1070 (1985).
48. Niku-Paavola, M.J.; Lappalainen, A.; Enari, T.M. e Nurmi, M., Biochem. J., 231, 75 (1985).
49. Murphy-Holland, K. e Eveleigh, D.E., em Proc. 85th An. Soc. Microbiol., Las Vegas, p. 193, Washington, D.C.: American Society of Microbiology, 1985.
50. Willick, G.E. e Seligy, V.L., Eur. J. Biochem., 151, 89 (1985).
51. Meyer, H.P. e Humphrey, A.E., Biotechnol. Bioeng., 24, 57 (1982).
52. Smith, J.E.; Anderson, J.G.; Senior, E. e Aidoo, K., Phil. Trans. R. Soc. Lond., A 321, 507 (1987).
53. Hartley, B.S.; F.R.S. e Shama, G., Phil. Trans. R. Soc. Lond. A 321, 555 (1987).
54. Koichiro, K.; Koes, K.A.; Fumihide, S.; Keiichi, K. e Noya-

- mi, K., Biotechnol. Bioeng., 24, 347 (1982).
55. Henrissat, B.; Duquez, H.; Viet, C. e Schulein, M., Bio/Technology, 3, 722 (1985).
56. Saddler, J.N., Microbiol. Sci., 3, 84 (1986).
57. Humphrey, A.E. em "Single Cell Protein", Tannenbaum, S.R. e Wang, C. Eds, Cambridge, M.A. 1975.
58. Moo-Young, M.; Daugulis, A.J.; Charlel, D.S. e Mc Donald, D. G., Process. Biochem., 14, 38 (1979).
59. Campos, V.; Salas, E.; Durán, N.; Rodríguez, J. e Baeza, J., Bol. Micol. (Chile) 2, 161 (1986).
60. Pepper, J.M.; Baylis, F.E. e Adler, E., Can. J. Chem., 37, 1241 (1959).
61. Gould, J.M., Biotechnol. Bioeng., 26, 46 (1984).
62. Shefet, G. e Ben-Ghedalia, D., Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 15, 47 (1982).
63. Taniguchi, M.; Tanaka, M.; Matsuno, R. e Kamikubo, T., Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 14, 35 (1982).
64. Updegraff, D.M., Anal. Biochem., 32, 420 (1969).
65. Padrão TAPPI T13m-54.
66. Método da A.O.A.C. nº 7009 de 1980.
67. Plummer, D.T. em "An Introduction to Practical Biochemistry", Mc Graw-Hill, London, p. 156, 1971.
68. Miller, T.F. e Srinivasan, V.R., Biotechnol. Bioeng., 25, 1509 (1983).
69. Análise feita nos laboratórios do Prof. Dr. Gerd Wegener do

Institute for Wood Research, University of Munich, Federal Republic of Germany.

70. Mandels, M.; Andreotti, R. e Roche, C., Biotechnol. Bioeng. Symp., 6, 21 (1976).
71. Mendelball, G.D. e Nathan, R. em "Applications of Polymer Spectroscopy", Brame, E.G. Ed., Academic Press, New York, p. 101, 1978.
72. Fengel, D. e Wegener, G. em "Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions", Walter de Gruyter Co., Berlin-New York, p. 160, 1984.
73. Lundquist, K.; Egyed, J.; Josefsson, B. e Nyquist, G., Cellul. Chem. Technol., 15, 699 (1981).
74. Hanna, S.B. e Farag, L.M., Thermochim. Acta, 87, 239 (1985).
75. Chakraverty, A.; Mishra, P. e Banerjee, H.D., Thermochim. Acta, 94, 267 (1985).
76. El-Kalyoubi, S.F. e El-Shinnawy, N.A., Thermochim. Acta, 94, 231 (1985).
77. Sefain, M.Z.; El-Kalyoubi, S.F. e Shukry, N., J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed., 23, 1569 (1985).
78. Chakraverty, A.; Banerjee, H.D. e Pandey, S.K., Thermochim. Acta, 120, 241 (1987).
79. Goldstein, J.I.; Newbury, D.E.; Echlin, B.; Joy, D.C.; Fiori, C. e Lifshin, E. em "Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis", Plenum Press, New York, 1984.
80. Rosenwaig, A. em "Photoacoustics and Photoacoustics Spectroscopy", John Wiley and Sons, New York, 1980.

- 114
81. Gómez P., Edgardo A. em "Contribuição à Fotoquímica de Celulose: Aplicação à Hidrólise Enzimática e Crescimento Fungal", Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1987.
 82. Mansilla G., Héctor D. em "Estudos de Degradação Fotoquímica e Enzimática de Ligninas", Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1986.
 83. Durán, N.; Mansilla, H. e Reyes, J., J. Photochem., 35, 209 (1986).
 84. Gratzl, J.S.; Nakano, N.; Singh, R.P., em "Chemistry of Delignification with Oxygen, Ozone and Hydroperoxides", Uni Publishers Co., Ltd., Tokyo, 1980.
 85. Gratzl, J.S., Jahrgang, 41, 121 (1987).
 86. Cotton, F.A. e Wilkinson, G. em "Advanced Inorganic Chemistry", Wiley Interscience, New York, 1966.
 87. Referência 72, p. 286.
 88. Durán, N. e Mansilla, H., J. Macromol. Sci. Chem., A21, 1467 (1984).
 89. Nakanishi, K. em "Infrared Absorption Spectroscopy", p. 42, Nankod Co. Ltd., Tokyo, 1962.
 90. Amostra cedida por Hector Mansilla.
 91. Freeman, E.S. e Carroll, B., J. Phys. Chem., 62, 394 (1958).
 92. Houston, D.F. em "Rice: Chemistry and Technology", D.F. Houston. Ed., AACCC, St. Paul, Minn., 1972.
 93. Harbour, J.R.; Hopper, M.A.; Marchessault, R.H.; Dobbin, C. J. e Anczureski, E., J. Pulp. Pap. Sc., 11, J42 (1985).
 94. Recommended Dietary Allowances. National Academy of Sciences: Washington D.C.