

ARQUIVO TECNICO

5308  
G212b(RCET)  
019754



09089



019754

NEAMENTO AMBIENTAL



**CETESB**

**COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL**

DIRETORIA DE PESQUISA  
SUPERINTENDÊNCIA DE PESQUISAS COM AGUAS E RESÍDUOS

CETESB - CIA. DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL  
BIBLIOTECA  
AV. PROF. FREDERICO HERMANN JR., 345 CEP 05400 - PINHEIROS  
SÃO PAULO - BRASIL

BIODIGESTÃO ANAERÓBIA DE RESÍDUOS  
CELULÓSICOS II - METODOLOGIA  
ANALÍTICA

set/1987

CETESB

## FICHA TÉCNICA BIBLIOGRÁFICA

## DOCUMENTO

TIPO	DATA	ORIGEM	Nº PÁGINA/V.	Nº MAPAS
Relatório Parcial	set/1987	SPAR	49	03

## TÍTULO DO DOCUMENTO

Biodigestão anaeróbia de resíduos celulósicos II - Metodologia Analítica

## AUTOR RESPONSÁVEL

ASSINATURA / CARIMBO / DATA

*Tânia Mara Tavares Gasi*  
 Eng.ª TÂNIA MARA TAVARES GASI  
 Gerente do Setor de Pesquisa Tecnológica de  
 Sistemas de Tratamento de Efluentes Industriais  
 Reg. 01.3434-3 CREA 5808-D

## AUTORES/ENTIDADES OU UNIDADES A QUE PERTENCEM

Tânia Mara Tavares Gasi/ CETESB  
 Eloisa F. Ferreira de Araújo/CETESB  
 Marcelo C. Jahnel/CETESB  
 José da Conceição Neto/CETESB

## DOCUMENTO AUTORIZADO POR

ASSINATURA / CARIMBO / DATA

## DOCUMENTO REVISADO

ASSINATURA / CARIMBO / DATA

## CLASSIFICAÇÃO DE SEGURANÇA

EXTERNA       INTERNA  
 RESERVADA

## PALAVRAS CHAVES

digestão anaeróbia/ resíduos sólidos/ celulose/ lignina/ enzimas/  
 celulasas/ métodos analíticos

## CÓDIGO E TÍTULO DO PROJETO

"Biodigestão anaeróbia de resíduos lignocelulósicos"  
 OS = 140600

## DISTRIBUIÇÃO INTERNA

ÁREAS/Nº DE CÓPIAS

DTEI 01 cópia; Biblioteca 3/02 cópias

## USO DA BIBLIOTECA

CLASSIFICAÇÃO DE ASSUNTO

Nº DOCUMENTO

VISTO / CARIMBO / DATA

DIRETORIA DE PESQUISA  
SUPERINTENDÊNCIA DE PESQUISAS COM AGUAS E RESÍDUOS

CETESB - CIA. DE TÉCNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL  
**BIBLIOTECA**  
AV. PROF. FREDERICO HERMANN JR., 345 CEP 05489 PINHEIROS  
SÃO PAULO - BRA IL

BIODIGESTÃO ANAERÓBIA DE RESÍDUOS  
CELULÓSICOS II - METODOLOGIA  
ANALÍTICA

set/1987

DIRETORIA DE PESQUISA

Prof. Dr. Roque Monteleone Neto

ASSISTENTE TÉCNICO-CIENTÍFICO

Eng<sup>o</sup> José Roberto Costa

ASSISTENTE ADMINISTRATIVA

Eng.<sup>a</sup> Neusa Monteiro de Arruda Juliano

SUPERINTENDÊNCIA DE PESQUISAS COM ÁGUAS E RESÍDUOS

Eng<sup>o</sup> Roberto E.B. Centurión

GERÊNCIA DE PESQUISAS COM ÁGUAS

Eng.<sup>a</sup> Tânia M. Tavares Gasi

EQUIPE TÉCNICA

- Tânia M.T. Gasi (Eng<sup>o</sup>/Coordenação e Execução)
- Eloisa F. Ferreira de Araújo (Quím./Execução)
- Marcelo C. Jahnel (Est./Execução)
- José da Conceição Neto (Anal./Apoio)

ÍNDICE

CETESB - CIA. DE TECNOLOGIA E SANEAMENTO AMBIENTAL  
BIBLIOTECA

	Pág.
<u>INTRODUÇÃO</u> .....	01
1. <u>DETERMINAÇÃO DO COMPLEXO LIGNOCELULÓSICO</u> .....	03
1.1. MÉTODOS LEVANTADOS NA LITERATURA .....	03
1.1.1. Cromatografia em papel .....	03
1.1.2. Cromatografia gás-líquido .....	04
1.1.3. Método colorimétrico da antrona .....	04
1.1.4. Método gravimétrico .....	05
1.1.5. Celulose em solução cobre-II-tetramina...	05
1.1.6. Método de Van Soest .....	06
1.1.7. Celulose Cross & Bevan na madeira ....	06
1.1.8. Método de Waksman .....	06
1.1.9. Lignina na madeira .....	07
1.2. MÉTODOS SELECIONADOS PARA IMPLANTAÇÃO ..	08
1.2.1. Método gravimétrico (conforme EPA 6700-73-01) (5) .....	08
1.2.2. Método Cross& Bevan para celulose (conforme norma ABCP M 9/71 (1) ....	10
1.2.3. Método para lignina (conforme norma ABCP M 10/71 (2) .....	14
1.3. IMPLANTAÇÃO DAS METODOLOGIAS ANALÍTICAS	17
1.3.1. Substituição do benzeno por tolueno..	18
1.3.2. Aplicabilidade do método gravimético para lixo fresco e reprodutibilidade..	21
2. <u>DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE CELULASES</u> .....	25
2.1. MÉTODOS LEVANTADOS NA LITERATURA .....	26
2.2. MÉTODO SELECIONADO PARA IMPLANTAÇÃO ....	29

2.2.1. Preparação do tampão de citrato 0,05 M pH 4,8 .....	29
2.2.2. Método de Miller (DNS) para açúcares redutores .....	31
2.2.3. Preparação dos padrões de glucose .....	31
2.2.4. Preparação da curva .....	32
2.2.5. Método de Mandels para atividade de celula ses. Método do papel de filtro .....	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	40
ANEXO - MÉTODO DE SU .....	43

## APRESENTAÇÃO

O presente relatório refere-se ao desenvolvimento da metodologia analítica requerida dentro de projeto patrocinado pelo DAEE: OS. 140600 "Biodigestão anaeróbia de resíduos lignocelulósicos". Ressalte-se que este relatório complementa o denominado "Biodigestão Anaeróbia de resíduos celulósicos, I - Fundamentos sobre a hidrólise do complexo lignocelulósico", de dezembro de 1986.

CETESB - CIA. DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL  
BIBLIOTECA  
AV. PROF. FREDERICO HERMANN JR., 345 CEP 05489 - PINHEIROS  
SÃO PAULO - BRASIL

INTRODUÇÃO

O objetivo do projeto sobre a biodigestão de resíduos lignocelulósicos é o de desenvolver processos de hidrólise enzimática seguida de digestão anaeróbia, para o reaproveitamento desses resíduos, com geração de metano e fertilizante orgânico.

Evidentemente, o desenvolvimento de processos irá requerer não só a caracterização das matérias-primas, mas também o acompanhamento das unidades de tratamento. Nestas, será necessário verificar a variação do substrato e, em especial, de sua parcela mais refratária, que é o complexo lignocelulósico. Em outras palavras, serão requeridas análises de celuloses, hemiceluloses e lignina. Também é importante verificar a atividade enzimática de celulasas, para o acompanhamento da reação de hidrólise, do processo de produção de celulasas e de eventuais procedimentos de recuperação das enzimas.

Era importante, para a escolha dos métodos analíticos a serem utilizados, que se soubesse "a priori" quais seriam os substratos a serem analisados. Existe, entretanto, uma grande variedade de resíduos lignocelulósicos: "quebras" de colheitas, plantas aquáticas, estrume, resíduos da agroindústria (fábricas de papel, açúcar e álcool, indústrias alimentícias e outras), lixo urbano, etc. Decidiu-se, portanto, considerando os objetivos sociais da CETESB, dar prioridade ao lixo urbano. Por outro lado, resolveu-se também que deveriam haver condições de se analisar resíduos de origem vegetal, na eventualidade de se desejar trabalhar com estes materiais.

Cogitou-se em realizar as análises de celulose e lignina fora da CETESB, mas a hipótese teve que ser descartada pelos seguintes motivos:

- o elevado preço das mesmas, conforme consulta feita ao IPT Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo, inviabilizava o projeto;

- os elevados prazos para o conhecimento dos resultados não permitiam o uso dos mesmos em controle de processos.

Por outro lado, a determinação de atividade de celulases, para os sistemas pretendidos, teria que ser feita na CETESB.

Dessa forma, decidiu-se implantar metodologias analíticas para celulosas, hemicelulosas, lignina e atividade de celulases, passíveis de aplicação no desenvolvimento de sistemas enzimáticos e anaeróbios de resíduos sólidos urbanos e de origem vegetal.

## 1. DETERMINAÇÃO DO COMPLEXO LIGNOCELULÓSICO

A grande interação física e química existente entre a celulose, a hemicelulose e a lignina, torna a separação quantitativa das mesmas extremamente difícil. Dessa forma, a maioria dos métodos resulta em análise de um dos constituintes mais um segundo (por exemplo, análise de celulose em que se tem uma parcela de hemicelulose respondendo ao método, ou análise de lignina, em que o resultado contém alguma hemicelulose), ou implica na degradação parcial da substância que se pretendia analisar(6).

No caso da celulose, o isolamento pode ser simples em alguns vegetais, quando a mesma já se encontra razoavelmente pura, como no caso do algodão. Por outro lado, a análise de madeira, ou bagaço de cana, que já conteriam teores apreciáveis de lignina, seria relativamente complicada. Materiais como lixo urbano devem, além das dificuldades já mencionadas, conter uma série de interferentes.

Normalmente os métodos de laboratório para análise de celulose envolvem: redução da granulometria, extração com solventes adequados para remoção dos extrativos, deslignificação do material e extração das hemiceluloses com álcali(6). Alguns métodos incluem uma etapa de hidrólise, ou providenciam uma digestão da matéria orgânica eventualmente presente.

Descrevem-se a seguir, alguns dos métodos que foram obtidos da literatura.

### 1.1. MÉTODOS LEVANTADOS NA LITERATURA

#### 1.1.1. Cromatografia em papel

Este é o método TAPPI T250 pm-75(19), indicado para determinações rápidas e rotineiras de carboidratos contidos em polpa de papel purificada. Baseia-se na determinação química dos açúca

res separados cromatograficamente e envolve uma sequência de procedimentos: hidrólise total, neutralização, concentração, separação cromatográfica, análise dos açúcares separados, calibração e cálculo. Este método permite a separação das celulosas e hemicelulosas, mas não se aplica aos substratos que se pretende analisar.

#### 1.1.2. Cromatografia gás-líquido

O método TAPPI T 249 pm-75(18) é usado para determinar os cinco principais monossacarídeos que definem a composição de carboidratos da madeira e polpa de madeira. Os constituintes determinados quantitativamente e com segurança são: glicose, manose, arabinose, xilose e galactose, podendo-se precisar concentrações individuais de cada um dos açúcares abaixo de 0,1%.

As amostras são hidrolizadas com ácido sulfúrico; a porção hidrolizada é neutralizada e os açúcares são reduzidos com borohidrato de sódio. Após redução, realiza-se uma acetilação, com anidrido acético e ácido sulfúrico, e precipitação dos acetatos em banho de gelo. Em seguida, faz-se uma extração com cloreto de metileno para injeção no cromatógrafo a gás.

Além de ser muito específico para madeira e polpa de madeira, este método requer uma coluna especial com modificações no canal injetor.

#### 1.1.3. Método colorimétrico da antrona

Este método é preconizado por BENDER e colaboradores (15), da USEPA, e é indicado para análise de celulose em composto de lixo.

O método da antrona é colorimétrico e engloba as seguintes etapas: (a) extração da matéria gordurosa do composto com benzeno;

(b) extração da parte solúvel com água; (c) hidrólise com ácido sulfúrico; (d) determinação dos açúcares redutores formados pela adição dos reagentes de antrona e leitura da cor desenvolvida em espectrofotômetro, a 630 nm.

#### 1.1.4. Método gravimétrico

O método gravimétrico também é indicado no manual da EPA para análise de composto de lixo, por BENDER e colaboradores (5).

O processo analítico baseia-se numa oxidação da amostra com ácido nítrico, extração de interferentes orgânicos com solventes orgânicos e calcinação do resíduo em mufla a 625 °C. A perda após ignição significa a porcentagem de celulose presente. A análise deve ser feita em duplicata.

Pode-se combinar o método gravimétrico com o da antrona. Após as extrações com solventes, pode-se dissolver a amostra em ácido sulfúrico e determinar os açúcares formados na hidrólise colorimetricamente.

Por outro lado, o método gravimétrico é recomendado, por ser mais rápido e fácil de realizar que o da antrona (5).

#### 1.1.5. Celulose em solução cobre-II-tetramina

Este método é recomendado pelo WHO International Reference Centre for Wastes Disposal (21), para análise de lodos de esgotos, resíduos sólidos e composto.

A celulose contida no material é definida como a soma de celulose e hemicelulose que são dissolvidas em solução de cobre-II-tetramina. Inicialmente, a lignina, corantes e outros produtos orgânicos são lixiviados com hipoclorito de sódio; a seguir, a celulose é dissolvida na solução preconizada e medida pela perda de peso da amostra durante este processo. A seda também se dissolve na solução de cobre-II-tetramina, o que não significa uma interferência séria no método.

#### 1.1.6. Método de Van Soest

O método de Van Soest, indicado por SILVA (16) para forrageiras determina, em sequência, fibra em detergente ácido, lignina, celulose, cinzas e sílica.

Inicialmente faz-se uma digestão da amostra em solução de detergente ácido, para remoção de proteína, gordura e carboidrato solúvel; o resíduo após lavagens e secagem é a quantidade de fibra. Esta é, em seguida, tratada com solução de permanganato de potássio mais tampão de nitrato férrico não hidratado, nitrato de prata, ácido acético glacial e álcool butil terciário, e solução de desmineralização (ácido oxálico diidratado e ácido clorídrico concentrado). Com isto, dissolve-se a lignina, que é determinada pela diferença de peso na fibra. O resíduo é incinerado durante 3 horas a 500 °C, sendo a diferença de peso, antes e após a incineração, a porcentagem de celulose.

#### 1.1.7. Celulose Cross & Bevan na madeira

No método Cross & Bevan(1), a amostra a ser analisada sofre sucessivas extrações com solventes (para remover os extrativos) e clorações (para dissolver a lignina), tendo-se como resultado celulose mais hemicelulose. O método é indicado para madeira, mas também pode ser utilizado em outros materiais, como plantas aquáticas, bagaço de cana e outros de origem vegetal.

#### 1.1.8. Método de Waksman

Existe também o procedimento de WAKSMAN, indicado por ALVSAKER (13), que é recomendado para análise de solos (humus), mas que também pode ser empregado em compostos de lixo, por exemplo. Neste método, faz-se um fracionamento de humus através de hidrólise ácida. Após a remoção de substâncias graxas, resinas e solúveis em solvente próprio, os carboidratos (hemicelulose e celulose) são dissolvidos em ácidos de crescente concentração; o resíduo insolúvel em ácido é composto principalmente por lignina.

As proteínas e outras substâncias contendo nitrogênio são parcialmente dissolvidas no tratamento ácido, e parcialmente encontradas junto com a lignina, como um resíduo insolúvel em ácido. O procedimento de Waksman é resumido da seguinte maneira: (a) determinação de umidade, cinzas, N total e C total; (b) fração solúvel em éter; (c) fração solúvel em água quente; (d) fração solúvel em álcool; (e) tratamento com HCl a 2%; (f) tratamento a frio com  $H_2SO_4$  a 80%, seguido de fervura com ácido fraco. Nos filtrados de (e) e (f) determina-se açúcares redutores e, estes multiplicados por 0,9, correspondem à "hemicelulose" e "celulose" respectivamente; (g) resíduo insolúvel em ácido. Determinar lignina neste resíduo após análise de N e cinzas; (h) proteína total. Multiplicar o valor de N total por 6,25.

Como pode ser visto, o procedimento é complexo, demorado e sofre interferências de elevados teores de proteínas.

#### 1.1.9. Lignina na madeira

O método está baseado na hidrólise de carboidratos por ácidos fortes restando como resíduo a lignina (2). Entretanto, como alguns dos extrativos da madeira podem permanecer insolúveis junto com a mesma, procede-se a uma série de extrações com solventes apropriados. O método da determinação da lignina por meio do ácido sulfúrico a 72% envolve três extrações preliminares: (a) com álcool etílico para remover os taninos catecóis; (b) com solução de álcool-benzeno, para remover resinas, óleos, graxas e ceras; (c) com água quente para remover os materiais solúveis restantes.

Pode-se aplicar este método para substratos de origem vegetal, tais como bagaço de cana, plantas aquáticas etc. Entretanto, não pode ser usado na análise de lixo urbano e composto, pois todos os materiais insolúveis em  $H_2SO_4$  a 72% e nos solventes acima mencionados, irão ser quantificados como lignina.

Em consulta feita ao IPT-Instituto de Pesquisas Tecnológicas, verificou-se que não existe metodologia disponível para análise de lignina em lixo urbano (para composto, pode-se adaptar os métodos indicados para humus de solo, como o de Waksman). O desenvolvimento de metodologia para lignina em lixo parece complexo. Seria possível avaliar a mesma através de sua redução a compostos fenólicos e análise de fenóis; entretanto, é possível que a eventual presença de resinas fenólicas no substrato possa interferir na análise.

## 1.2. MÉTODOS SELECIONADOS PARA IMPLANTAÇÃO

Dentre os métodos apresentados, optou-se pela implantação dos seguintes: (a) método gravimétrico para celulose em composto, recomendado no manual da USEPA e pelo IPT, em consulta feita àquela entidade; (b) celulose CROSS e BEVAN; (c) lignina na madeira.

Apresentam-se, a seguir, as metodologias de cada um dos três métodos.

### 1.2.1. Método gravimétrico (conforme EPA-6700-73-01) (5)

Indicado para análise de celulose em composto de lixo.

Reagentes:

- . ácido nítrico concentrado
- . ácido acético glacial
- . benzeno
- . éter
- . metanol
- . acetona

Procedimento:

Pese 1 g de composto finamente triturado, com aproximação de miligrama, coloque em um Erlenmeyer de 125 ml, e adicione 6 ml de água, 24 ml de ácido glacial e 2 ml de ácido nítri

co concentrado. Aqueça suavemente numa placa de aquecimento por 20 min.; resfrie até aproximadamente 80°C, adicione 50 ml de benzeno e agite vigorosamente por cerca de 2 min. para extrair o material solúvel em benzeno.

Coloque um cadinho de Gooch com um filtro de amianto em equipamento de sucção; transfira, tanto quanto possível, a camada de benzeno para dentro do filtro (com sucção), tomando cuidado para não passar a parte inferior do líquido. Adicione então, ao Erlenmeyer, outros 50 ml de benzeno, agite vigorosamente, deixe decantar e transfira todo o líquido para o cadinho. Lave todo o material sólido para dentro do cadinho com acetona, tendo o cuidado de não deixar nada no Erlenmeyer. Lave o material sólido no filtro completamente com sucessivas porções de 100 ml de benzeno quente, metanol quente e éter. Após lavagem, limpe a parte externa do cadinho, coloque em uma estufa a 105°C para secar, resfrie em dissecador, pese com a aproximação de miligrama; em seguida, coloque em uma mufla a 625°C por uma hora, esfrie, pese e anote a perda de peso após ignição.

Cálculos:

$$\frac{\text{perda após ignição} \times 100}{\text{peso inicial da amostra}} = \text{porcentagem de celulose}$$

Observação: - a análise deve ser feita em duplicata

Provavelmente o  $\text{HNO}_3$  será responsável, neste método, por qualquer tipo de reação de óxido-redução e o ácido acético deverá ser um meio contínuo, ou em outras palavras, deverá representar o papel de solvente.

As extrações com benzeno, éter, metanol e acetona servem para eliminar qualquer outra matéria orgânica diferente da celulose. Cabe aqui um aparte - para este tipo de análise, a amos-

tra deve ser selecionada, ou seja, deve conter na sua maioria: celulose, lignina, substâncias inorgânicas, aminoácidos e proteínas. Borrachas, plásticos, e outros tipos de polímeros, que seriam resistentes à oxidação com  $\text{HNO}_3$  e insolúveis nos solventes acima citados, devem ter sido postos de lado. No final do procedimento deve-se ter celulose e material inorgânico e, após a queima na mufla, deve-se ter apenas material inorgânico.

#### 1.2.2. Método Cross & Bevan para celulose (conforme norma ABCP M 9/71 (1))

Para análise de celulose em madeira e em resíduos de origem vegetal. Convém esclarecer que, no caso de substratos que contenham clorofila, pode ser necessário adaptar o método para garantir a remoção total da substância.

#### Objetivo e aplicação:

Este método tem por objetivo a determinação da celulose Cross e Bevan na madeira.

Os resultados obtidos por este método são de 1% a 2% mais altos do que o preconizado pela norma TAPPI T 17 m-55. Isto é atribuído à menor degradação sofrida pela celulose neste processo, onde os reagentes são lavados rapidamente. Como este processo é empírico, a sequência de operação deve ser seguida rigorosamente.

#### Aparelhagem:

Balança analítica com precisão de 0,1 mg

Estufa a  $105^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$

Banho-maria

Bloco de filtração construído em metal resistente com orifícios cujos diâmetros se ajustem aos cadinhos por um anel de borra-cha.

Cadinho de vidro sinterizado de 30 ml de capacidade e porosidade média.

Pesa-filtros

Bequers de 50 ml.

CETESB - CIA. DE TECNOLOGIA E SANEAMENTO AMBIENTAL  
BIBLIOTECA

Reagentes:

- Água de cloro, aproximadamente 0,16 N e recém preparada.
- Solução de ácido sulfuroso, aproximadamente 0,16 N.

a) solução de ácido clorídrico 0,16 N;

b) solução sulfeto de sódio a 20 g/l.

Preparar uma solução 1:1 do ácido clorídrico e sulfeto de sódio.

Solução de sulfeto de sódio a 20 g/l. Dissolver 20 g de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  anidro em água destilada.

Álcool-tolueno 1:2-misturar um volume de álcool etílico a 95% e dois volumes de tolueno e homogeneizar.

Álcool etílico 95%

Éter etílico.

Amostragem:

Retirar e preparar as amostras de acordo com ABCP M1. A serra-gem utilizada será aquela que atravessar uma peneira de nº 16 internacional (mesh 40 ASTM).

Determinar a umidade da amostra de acordo com a norma ABCP M2/71.

A quantidade de amostra necessária deve ser suficiente à determinação em triplicata.

Procedimento:

Pesar 0,4 g a 0,5 g da amostra seca ao ar diretamente no cadinho de tara conhecida.

Colocar o cadinho com a amostra dentro de um bequer de 100 ml e adicionar água destilada em banho-maria durante 30 minutos. Lavar com álcool e então adicionar álcool-tolueno no cadinho e no bequer até atingir a metade do cadinho. Colocar o conjunto em banho-maria durante 30 minutos. Usando sucção, lavar duas vezes com 20 ml de álcool e duas vezes com água destilada fria.

Encher parcialmente o cadinho com água de cloro. O tempo de cloração é de 15 minutos. Durante este período, cerca de 50 ml de água de cloro deverão ser adicionados ao cadinho e atravessar a amostra por drenagem natural ou aplicação de sucção.

Após 15 minutos, adicionar 10 a 15 ml da solução de ácido sulfuroso, drenar por sucção, lavar duas vezes com porções de 20 ml de água destilada.

Colocar o cadinho no bequer de 100 ml e adicionar a solução de sulfeto de sódio 20 g/l no cadinho e no bequer até atingir a metade do cadinho. Cobrir o bequer com vidro de relógio e aquecer em banho-maria durante 30 minutos.

Transferir o cadinho para o bloco de filtração e lavar duas vezes com água destilada quente e duas vezes com água destilada fria.

Repetir o ciclo de cloração, sendo agora o tratamento com água de cloro por 10 minutos, adicionando-se em seguida a solução de ácido sulfuroso.

Lavar como anteriormente e levar ao banho-maria por 30 minutos com a solução de sulfito de sódio 20 g/l.

Continuar a cloração reduzindo os ciclos para 5 e 3 minutos respectivamente em cada tratamento sucessivo, seguindo as lavagens usuais.

Se apenas uma pálida coloração rosada resulta da adição de sulfeto de sódio, depois do tratamento com água de cloro por 5 minutos, reduzir o ciclo seguinte para 1 minuto. Se persistir uma coloração fortemente avermelhada após o tratamento com água de cloro por 3 minutos, repetir até quando se fizer necessário esse ciclo de 3 minutos.

O tratamento deve prosseguir até não aparecer mais coloração rosada com a adição da solução de sulfito de sódio à amostra clorada. Quando se fizer a cloração por 3 minutos ou menos, o tempo de tratamento com sulfito de sódio deverá ser reduzido para 20 minutos. Quando a adição de sulfito não produzir mais coloração rosada, filtrar e lavar drenando o excesso de água por sucção.

Transferir o cadinho para o bequer de 100 ml e adicionar água destilada no cadinho e no bequer até atingir a metade do cadinho e aquecer em banho-maria por 30 minutos.

Filtrar por sucção, lavando sucessivamente com 30 ml de água destilada quente, 20 ml de água destilada fria, 20 ml de álcool e 20 ml de éter.

Secar em estufa a  $105^{\circ} \pm 3^{\circ}\text{C}$  por 2 horas e meia, passar para pisa filtro previamente tarado, esfriar em dessecador e pesar.

Resultados:

A porcentagem de celulose Cross e Bevan é dada pela expressão:

$$\% \text{ celulose} = \frac{P_1}{P} \times 100$$

onde,  $P_1$  = peso do resíduo em g

$P$  = peso da amostra em g

Reprodutibilidade:

As determinações em triplicata normalmente obtidas por este método possuem um desvio de 2% ao redor da média dos 3 valores.

Observações:

O bloco de filtração citado em aparelhagem não é essencial para a análise, podendo ser utilizados 3 frascos de filtração munidos de bocal de borracha de adaptação ao cadinho filtrante. A vantagem do bloco de filtração é a possibilidade de executar três determinações em triplicata simultaneamente.

### 1.2.3. Método para lignina (conforme norma ABCP M10/71) (2)

Indicado para análise de lignina em madeira e em resíduo de origem vegetal.

Objetivo e campo de aplicação:

Este método tem por objetivo a determinação da lignina na madeira por meio de ácido sulfúrico 70%. Quando a madeira é tratada com ácidos fortes os carboidratos são hidrolisados, deixando um resíduo insolúvel que é determinado como lignina. Como alguns dos extrativos da madeira podem permanecer insolúveis com a lignina, eles devem ser removidos em primeiro lugar pelos solventes adequados. O método da determinação da lignina por meio

de ácido sulfúrico 70% envolve três extrações preliminares:

- a) com álcool etílico para remover os taninos catecóis;
- b) com solução álcool-etileno para remover resinas, óleos, graxas e ceras;
- c) com água quente para remover materiais solúveis restantes.

A conveniência da extração com álcool depende da finalidade da análise e da matéria prima.

Aparelhagem:

Cadinho de vidro sinterizado, porosidade fina (nº 3, 50 ml), cadinho de Gooch com uma camada de amianto lavada com ácido ou cartucho de papel de filtro. Cadinhos de vidro não podem ser usadas se a lignina tiver de ser queimada. Aparelho de extração tipo Soxhlet.

Reagentes:

Solução de álcool-tolueno - misturar 1 volume de álcool etílico 95% com 2 volumes de tolueno.

- . Álcool etílico 95%
- . Ácido sulfúrico 72% - juntar 665 ml de ácido sulfúrico 96% (d= 1,84) em 300 ml de água destilada, esfriar e diluir a 1 litro. A padronização do ácido pode ser feita por titulação ou por densidade. A densidade do ácido sulfúrico 72% a 20° C é 1,6338 g/ml.

Amostragem:

Retirar e preparar as amostras de acordo com a norma ABCP M1. Utilizar a fração que atravessa a peneira nº 16 internacional (malha 40 ASTM) e fica retido na peneira nº 24 (malha 60 ASTM).

Determinar a umidade conforme especifica a norma ABCP M2/71.

Serão necessárias pelo menos 2 g absolutamente secas para determinações em duplicata.

Procedimento:

Pesar o equivalente a 1 g de amostra seca (a.s.), transferir para um cartucho de papel de filtro e colocar no extrator SOXHLET. Extrair com álcool etílico 95% durante 4 horas e, em seguida, com solução de álcool-tolueno de acordo com a norma ABCP M6/68. Transferir quantitativamente a serragem do cartucho para um cadinho de vidro sinterizado de porosidade fina com álcool etílico 95% e terminar a lavagem com mais 50 ml a fim de remover o tolueno. Remover o excesso de álcool por sucção e colocar o cadinho em um bequer de 600 ml com 400 ml de água destilada, cobrir com um vidro de relógio e levar para um banho-maria em ebulição por 3 horas. Filtrar no próprio cadinho, lavar com 100 ml de água quente e finalmente com 50 ml de álcool etílico a 95% para facilitar a remoção da serragem do cadinho. Depois dessas extrações preliminares deixar a amostra secar ao ar.

Nota 1 - Nas extrações com álcool e álcool-tolueno pode ser usado cadinho de vidro sinterizado de porosidade média ao invés de cartucho de papel de filtro, porém tomando-se a precaução de cobrir o mesmo com papel de filtro ou tela de malha fina para evitar perda do material. Transferir a amostra seca ao ar para um pesa filtro ou bequer de 50 ml de capacidade e adicionar lentamente com agitação, 15 ml de ácido sulfúrico 72%, resfriado entre  $13^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , cobrir com vidro de relógio. A amostra deve ser homogeneizada por agitação contínua durante um minuto, no mínimo. Conservar a mistura durante 2 horas entre  $19^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , agitando frequentemente. Se necessário usar banho de água para manter a temperatura entre esses limites. Transferir o material para um bequer ou erlenmeyer de 1.000 ml e diluir a solução de ácido para 3% pela adição de 560 ml de água destilada. Ferver durante 4 horas usando-se condensadores de refluxo ou mantendo o volume constante por adição ocasional de água

quente ao frasco. Deixar em repouso para sedimentação do material insolúvel e transferir quantitativamente para cadinho filtrante, previamente seco em estufa e tarado.

Resultados:

Calcular a porcentagem de lignina através da seguinte fórmula:

$$\% L = \frac{P_1}{P} \times 100$$

onde:

L = porcentagem de lignina

P<sub>1</sub> = peso do resíduo em gramas

P = peso inicial da amostra a.s. em gramas

Expressar os resultados até a primeira casa decimal. Quando se fizer correção para cinzas indicar nos resultados.

### 1.3. IMPLANTAÇÃO DAS METODOLOGIAS ANALÍTICAS

Como parte da implantação das metodologias analíticas, providenciou-se o treinamento de um químico da CETESB no Centro Técnico em Celulose e Papel do IPT. O técnico em questão aprendeu as análises de celulose Cross e Bevan e lignina, que são rotineiramente feitas naquele Instituto. A seguir, foram analisados alguns substratos em que se conhecia o teor de celulose e lignina, verificando-se que a técnica analítica estava dominada.

Quanto ao método gravimétrico para celulose em lixo, desejava-se verificar três aspectos:

- a) a possibilidade de substituição do benzeno por tolueno. O objetivo desta substituição é preservar o analista, uma vez que o benzeno é altamente agressivo ao organismo humano, enquanto que a agressividade do tolueno, embora exista, é em menor grau;

- b) a possibilidade do uso do método, que é indicado para composto, para análise de lixo fresco, bem como a consistência dos resultados para composto de lixo;
- c) a verificação da reprodutividade do método para composto de lixo e lixo cru.

Os trabalhos realizados, para verificação dos aspectos acima mencionados, estão descritos a seguir.

### 1.3.1. Substituição do benzeno por tolueno

Para se estabelecer a viabilidade de troca do solvente, foram feitos testes de análise de variância de acordo com o método proposto por GOMES(10), e conhecido por teste de Fischer.

Realizaram-se análises de celulose em amostra de composto de lixo da Vila Leopoldina, seco e moído, com benzeno e tolueno, e em sextuplicatas. Os resultados estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1 - Resultados das análises de composto de lixo, para benzeno e tolueno como solventes.

com benzeno (% celulose)	com tolueno (% celulose)
34,18	38,73
37,87	36,50
38,73	34,93
33,79	37,41
35,01	38,37
34,90	37,80
$\bar{X} = 35,74$	$\bar{X} = 37,24$

Para a análise de variância foram observados os procedimentos a baixo delineados; os valores entre parênteses correspondem aos obtidos na análise dos resultados analíticos da tabela 1.

$n$  = nº de tratamento, ou experimentos ( = 2, com benzeno e com tolueno)

$r$  = nº de repetições ( = 6)

$N$  = nº total de parcelas, ou resultados =  $n.r.$  ( = 12)

GL = graus de liberdade = número - 1

- dos tratamentos ( =  $2-1 = 1$ )

- total ( =  $12 - 1 = 11$ )

- do resíduo GL total - GLT ( =  $11 - 1 = 10$ )

$X$  = valor de cada um dos experimentos

(34, 18; 37,87; 38,73 .....37,80)

$G = \Sigma X$  ( =  $34,18 + 37,87 + 38,73 + \dots + 37,80 = 438,22$ )

$\Sigma X^2$  ( =  $34,18^2 + 37,87^2 + 38,73^2 + \dots + 37,80^2 = 16040,86$ )

correção =  $C = \frac{G^2}{N} = \left( \frac{(438,22)^2}{12} \right) = 16003,06$

$SQ_{total}$  = soma dos quadrados total =  $\Sigma X^2 - C$   
( =  $16040,86 - 16003,06 = 37,8$ )

$SQT$  = soma dos quadrados dos tratamentos =

$$= \frac{T_1^2 + T_2^2 + \dots + T_n^2}{R} - C$$

onde  $T_1, T_2 \dots T_n$  é a soma das repetições de cada um dos tratamentos ( =  $\frac{(214,48)^2 + (223,74)^2}{6} - 16003,06 = 16010,21 - 16003,06 = 7,15$ )

$SQR$  = soma dos quadrados dos resíduos =

$SQ_{total} - SQT$  ( =  $37,80 - 7,15 = 30,65$ )

QMT = quadrado das médias dos tratamentos =

$$= \frac{SQT}{n-1} \left( = \frac{7,15}{1} = 7,15 \right)$$

QMR = quadrado das médias dos resíduos

$$= \frac{SQR}{N-n} \left( = \frac{30,65}{10} = 3,07 \right)$$

Pode-se montar o quadro para análise da variancia.

Tabela 2 - Análise de variancia da substituição do benzeno por tolueno

Causa de variação	GL	SQ	QM	F
tratamento (T)	(1)	SQT(7,15)	QMT(7,15)	2,33
resíduo (R)	(10)	SQR(30,65)	QMR(3,07)	
total	(11)	SQ <sub>total</sub> (37,80)	-	

O quadrado médio do resíduo (QMR) mede o efeito do acaso, sendo na verdade uma estimativa da variancia ( $S^2$ ); sua raiz quadrada é uma estimativa do desvio padrão (S). Tem-se que, no caso da substituição do benzeno por tolueno na metodologia para análise de celulose em amostra de composto orgânico de lixo:

$$S^2 = QMR = 3,07$$

$$e \quad S = \sqrt{QMR} = 1,75$$

O quadrado médio de tratamentos (QMT) mede ao mesmo tempo as diferenças entre os tratamentos (no caso, uso do benzeno e do

tolueno) e o efeito do acaso. Se não houvesse qualquer diferença entre os tratamentos, restaria apenas o efeito do acaso, e QMT estimaria a variancia  $\sigma$  tanto quanto  $QMR = S^2(10)$ . Assim, o quociente

$$F = \frac{QMT}{QMR}$$

seria próximo de 1,0. Como sempre há alguma influência do tratamento, espera-se que F seja maior que 1,0, pois o numerador encerra a variação dos tratamentos mais a do acaso, enquanto que o denominador mostra apenas a variação do acaso.

Um julgamento objetivo do valor de F é retirado de tabelas que fornecem os limites unilaterais do fator F aos níveis de probabilidade de 1% e 5%.

No caso em estudo, para nível de probabilidade de 5% e para  $n_1 = 1$  e  $n_2 = 10$ , obtém-se valor de F igual a 4,96. Isto significa que, na hipótese de nulidade, ou seja, se não houvesse efeito nenhum dos tratamentos (que é o que se pretende verificar), em 95% dos casos o valor de F deveria ser inferior a 4,96. Como na verdade F resultou igual a 2,33, isto significa que a substituição do benzeno por tolueno não provoca alteração estatisticamente significativa nos resultados analíticos.

### 1.3.2. Aplicabilidade do método gravimétrico para lixo fresco e reprodutibilidade

Para garantir que o método realmente avaliava o teor de celulose em composto orgânico de lixo e em lixo urbano fresco, adicionou-se uma quantidade conhecida de celulose (na forma de papel de filtro Whatmann nº 1) em amostras previamente analisadas de composto e de lixo. Em seguida, fez-se uma análise de variancia entre os valores teóricos determinados pela soma das concentrações de celulose existentes no papel e no substrato e os valores obtidos da análise da mistura do papel mais substrato.

As tabelas 3 e 4 mostram os resultados obtidos para composto e lixo fresco, respectivamente. A coluna (a) mostra os teores de celulose no papel de filtro Whatman nº 1, analisado pelo método Cross e Bevan; a (b) apresenta as concentrações de celulose no substrato; a (c) aponta os valores teóricos obtidos pela soma de  $\frac{1}{2}$  (a) +  $\frac{1}{2}$  (b); a coluna (d) indica os teores obtidos através da análise de mistura de 1 parte de substrato mais 1 parte de papel de filtro, usando-se o método gravimétrico para celulose em lixo (EPA - 6700-73-01).

Tabela 3 - Resultados obtidos com composto de lixo

Valores em % celulose			
(a) papel de filtro Whatmann nº 1	(b) composto de lixo	(c) $\frac{1}{2}$ (a) + $\frac{1}{2}$ (b)	(d) papel de filtro + composto (proporção 1:1)
99,16	38,73	68,97	61,60
99,31	36,50	67,90	65,00
98,22	37,41	67,81	70,90
98,30	38,37	68,34	66,00
98,26	37,80	68,05	-

Tabela 4 - Resultados obtidos com lixo urbano fresco

Valores em % celulose			
(a) papel de filtro Whatmann nº 1	(b) lixo urbano fresco	(c) $\frac{1}{2}$ (a) + $\frac{1}{2}$ (b)	(d) papel de fil- tro + lixo ur- bano fresco (proporção 1:1)
99,16	20,56	59,86	63,06
99,31	23,12	61,21	66,54
98,22	22,00	60,11	66,51
98,30	21,71	60,01	62,99
98,26	21,11	59,69	58,72

As tabelas 5 e 6 apresentam o estudo de variancia feito para os resultados com composto e com lixo fresco, respectivamente. O procedimento utilizado foi o mesmo que se empregou para se verificar a possibilidade de substituição de benzeno por tolueno, descrito anteriormente.

Tabela 5 - Análise de variancia de resultados teóricos e analíticos da adição de celulose ao composto de lixo

Causa da variação	GL	SQ	QM	F
Tratamento	1	12,16	12,16	1,88
Resíduo	7	45,18	6,45	-
Total	8	57,34	-	-

Neste caso, o limite de F ao nível de 5% de probabilidade é 5,59. Uma vez que se obteve um valor inferior (1,88), pode-se dizer que não existe diferença estatística entre os valores teóricos e os valores analíticos obtidos da adição de celulose ao composto de lixo.

Tabela 6 - Análise de variância de resultados teóricos e analíticos da adição de celulose ao lixo urbano fresco

Causa da variação	GL	SQ	QM	F
Tratamento	1	28,70	28,70	5,34
Resíduo	8	43,02	5,38	-
Total	9	71,72	-	-

O limite de F ao nível de 5% de probabilidade, para os valores de GL da tabela 6 é 5,32. Uma vez que o resultado obtido é praticamente igual ao da tabela (5,34), pode-se afirmar que o método gravimétrico EPA-6700-73-01, para análise de celulose em composto de lixo, não apresenta preferência pela celulose do papel de filtro, nem tampouco pela existente no lixo urbano fresco, podendo ser utilizado na análise deste.

CETESB - CIA. DE TECNOLOGIA E SANEAMENTO AMBIENTAL  
BIBLIOTECA

## 2. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE CELULASES

Nos processos enzimáticos de conversão de materiais celulósicos, o custo das enzimas específicas é um dos fatores preponderantes. Ao se dosar a quantidade necessária de celulases a serem utilizadas é necessário ter um critério que permita comparar os diversos preparados enzimáticos. Este critério não poderá ser baseado apenas na porcentagem de enzimas em relação ao substrato que se quer hidrolisar - é necessário que se tenha uma idéia da habilidade das enzimas em degradar os materiais celulósicos.

O custo das enzimas não deverá ser referido ao volume das mesmas Cr\$/ml de enzima, por exemplo), mas sim à atividade, ou à capacidade das mesmas em sacarificar os substratos. No entanto, não são as celulases são misturas enzimáticas complexas, como também os substratos são extremamente variados.

As celulases contêm principalmente endo e exo  $\beta$  glucanases mais celobiase(11). A hidrólise completa da celulose insolúvel requer uma interação sinérgica entre os diversos compoentes. As preparações enzimáticas têm diferentes proporções dos componentes, dependendo do microrganismo usado, tipo do substrato, condições de crescimento, técnicas de purificação etc. A atividade das enzimas varia com o tempo e condições de estocagem, pH, temperatura etc. As exo  $\beta$  glucanases ( $C_1$ ) conseguem converter a celulose cristalina, enquanto as endo  $\beta$  glucanases ( $C_x$ ) atuam apenas sobre a celulose amorfa. Muitas preparações de celulose também contêm hemicelulases.

Os substratos celulósicos contêm celulosas com diferentes graus de polimerização, em diferentes formas cristalinas (quatro formas cristalinas mais uma amorfa) e associados com hemiceluloses e lignina (que por sua vez também são polímeros complexos) e com diversas outras substâncias que podem interferir na hidrólise.

O relatório "I Fundamentos sobre a Hidrólise do Complexo Ligno celulósico" (9) aborda as questões acima em maior profundidade.

Dessa forma, encontrar uma unidade de medida para a determinação da atividade de celulasas não é tarefa simples.

## 2.1. MÉTODOS LEVANTADOS NA LITERATURA

A maioria dos métodos descritos na literatura para a medida da atividade de celulasas baseia-se na avaliação da quantidade de açúcares formados durante a hidrólise de um substrato padrão, obtida com a enzima a ser avaliada, em condições determinadas de temperatura e pH. Uma exceção à regra é o método usado por BROWN, citado por REESE (14), que mede diretamente a enzima, tendo encontrado uma boa correlação entre o conteúdo de proteína e a atividade enzimática.

Os pesquisadores têm usado uma variedade de substratos, ações enzimáticas, unidades e atividades, desenvolvendo e modificando métodos próprios (11). Além de uma grande variedade de enzimas usadas, foram empregados substratos tais como: celulose, celodextrinas, carboximetil celulose, celulose cristalina Avicel, algodão, papel de filtro, celulose tingida etc. Os produtos medidos foram: glicose, perda em viscosidade, açúcares redutores, celobiose, perda em peso, redução em OD, consumo de álcali, liberação de corantes etc. MANDELS e colaboradores (11) apresentaram uma tabela que resume alguns tipos de ensaios realizados para determinação de atividade de celulasas (tabela 7).

Tabela 7 - Ensaaios com celulases

Enzima	Substrato	Produto medido
Celobiase $\beta$ Glucosidase	Celobiose Celodextrinas Salicina $\rho$ Nitrofenil $\beta$ Glucosido	Glicose Saligenina $\rho$ Nitrofenol
Endo $\beta$ 1,4 Glucanase $C_x$ CMC'ase	Carboximetil celulose Celulose amorfa Walseth Sweco Celodextrinas	Perda em viscosidade Açúcares redutores
Exo $\beta$ 1,4 Glucanase A Glucocelulase B Celobiohidrolase CBH $C_1$	Celulose amorfa Walseth Celulose cristalina Avicel Celodextrinas	Glicose (A) Celcbiose (B)
Celulase $C_1 + C_x$ Avicelase Hidroxichelulase FP'ase	Celulose cristalina Avicel Hidrocélulose Papel de filtro Celodextrinas Algodão	Perda em peso Açúcares redutores Redução em OD
Miscelânea "Swelling factor" Celulase de papel de filtro	Algodão Papel de filtro Fio Celulose tingida	Consumo de álcali Maceração Perda da resistência à tensão Liberação de pigmento

Fonte: MANDELS; ANDREOTTI; ROCHE (11)

Como consequência, existe uma grande dificuldade em comparar resultados de estudos entre si, havendo muita polêmica entre os diversos autores. Apenas como ilustração, observe-se as discrepâncias encontradas quanto ao tampão de citrato que é utilizado para dissolver as enzimas, e que é apenas um detalhe do método: MANDELS(11) entre outros, indica tampão de citrato de sódio 0,05 M pH 4,8; SADDLER e KHAN(15) recomendam tampão de citrato-fosfato 0,2 M pH 5,0; SU(17) utiliza tampão de citrato 0,1 M pH 4,8; DETROY e outros (8) preferem tampão de fosfato de sódio - ácido cítrico pH 4,6.

Um aspecto fundamental da questão é o substrato a ser utilizado e o resultado deverá ser expresso em relação ao mesmo, tais como: FPA ("filter paper activity", quando se usa papel de filtro) ou CMC - atividade de celulase (no caso de se utilizar a carboximetilcelulose).

De acordo com DEKKER(7), os valores de atividade celulolítica obtidos com o uso de carboximetilcelulose são uma indicação das endo-celulases, especialmente quando ensaiadas viscosimetricamente. As atividades de exo-celulases, ou celobiohidrolase, podem ser medidas usando  $\rho$ -nitrofenil- $\beta$ -D-celobioside como substrato, medindo a quantidade de  $\rho$ -nitrofenol liberada. Da mesma forma, pode-se ensaiar as  $\beta$ -glucosidases usando  $\rho$ -nitrofenil- $\beta$ -D -glucosidase e medindo o  $\rho$ -nitrofenol liberado.

O método de SU(17), que é apresentado em anexo, utiliza a celulose microcristalina Avicel PH 105 e mede os açúcares formados pelo método da Antrona.

O procedimento proposto por MANDELS, ANDREOTTI e ROCHE (11) utiliza papel de filtro como substrato e o método do ácido dinetrosalicílico para leitura dos açúcares produzidos. A vantagem do uso do papel de filtro Whatman nº 1 é que o mesmo contém celulose amorfa e regiões cristalinas altamente ordenadas

(no método de SU por exemplo, tem-se apenas celulose cristalina). Dessa forma, a unidade de celulase de papel de filtro é uma medida representativa de complexos de celulases contendo as atividades exo-e endo-. Em outras palavras, o método de MANDELS fornece uma melhor avaliação das reações enzimáticas que acontecem na prática. Além do mais, o método do papel de filtro é simples, reproduzível e foi padronizado. Optou-se pelo mesmo, pelas razões acima expostas, e pelo fato de ter sido recomendado por DEKKER (7), THIEMANN (20) da BIOBRÁS e PEREZ(13) do IPT.

## 2.2. MÉTODO SELECIONADO PARA IMPLANTAÇÃO

O método de MANDELS pode ser visto esquematicamente na figura 1 (11), podendo ser encontrado com mais detalhes no trabalho de ANDREOTTI(4).

No entanto, não são o método de MANDELS mas também o de MILLER (12) (para a análise de açúcares redutores pelo ácido dinitrosalicílico) apresentam algumas dificuldades, de maneira que as diferentes instituições acabam por introduzir pequenas variações nas metodologias.

Uma vez que o Instituto de Pesquisas Tecnológicas é uma das principais instituições de pesquisas de São Paulo, optou-se por adotar a metodologia analítica com as modificações propostas pelo mesmo.

### 2.2.1. Preparação do tampão de citrato 0,05 M pH 4,8

- a) pesar 10,507 g de ácido cítrico monoidratado (previamente seco conforme procedimento recomendado) ( $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ ) e dissolver, em balão volumétrico, com cerca de 800 ml de água destilada. Completar o volume para 1.000 ml, tendo-se uma solução 0,05 M;

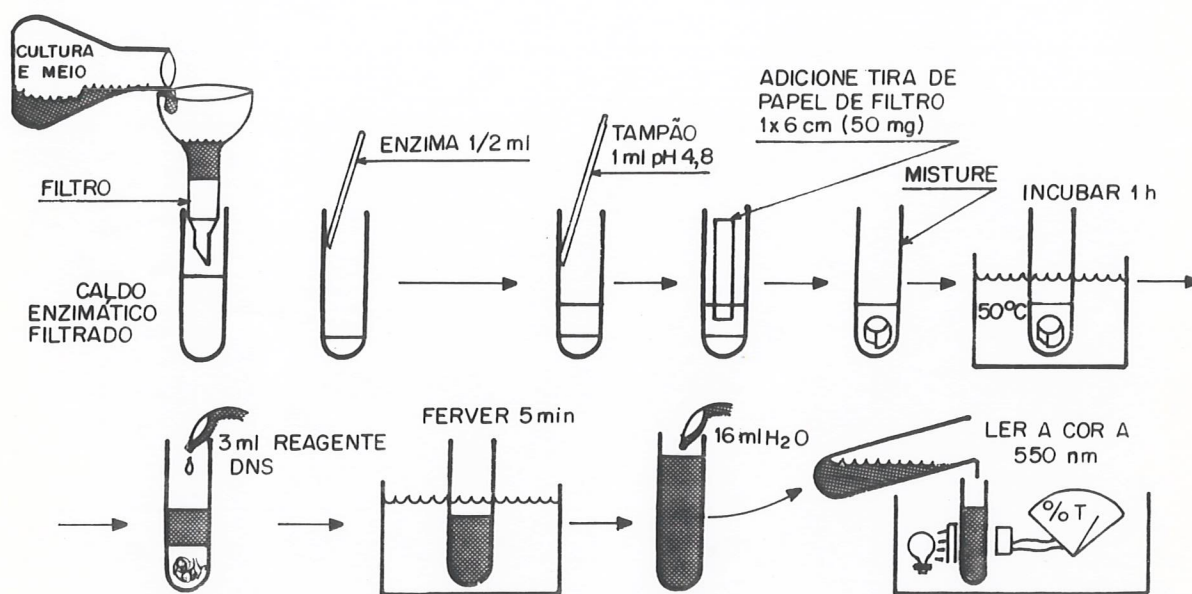


FIG. 1 ENSAIO COM PAPEL DE FILTRO.

OBSERVAÇÃO : As miligramas de glicose produzidas são a atividade de papel de filtro (FPA)

Fonte : MANDELS ; ANDREOTTI ; ROCHE<sup>(11)</sup>

- b) pesar 14,705 g de citrato de sódio bihidratado (previamente seco conforme procedimento recomendado) ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) e dissolver, em balão volumétrico, com cerca de 800 ml de água destilada. Completar o volume para 1.000 ml, tendo-se uma solução 0,05 M;
- c) com ajuda de pHmetro, adicionar a 500 ml da solução (a) um volume de solução (b) até atingir pH 4,8. À solução (c), adicionar 0,01% de mertiolato (para evitar crescimento de fungos) e guardar em geladeira.

### 2.2.2. Método de Miller (DNS) para açúcares redutores

#### a) preparação do reagente DNS

Misturar, com auxílio de agitador magnético, 1416 ml de água destilada com 10,6 g de ácido 3,5 dinitrosalisílico e 19,8 g de NaOH. Após dissolução, adicionar 306 g de sal de Rochelle (tartarato de Na e K), 7,6 ml de fenol (fundido a 50°C) e 8,3 g de metabissulfito de sódio.

#### titulação do reagente

Titular 3 ml do reagente preparado conforme indicação acima com HCl 0,1 N, até o ponto de viragem da fenolftaleína (ou em pHmetro até pH 8,2). Deve haver um consumo entre 5 e 6 ml de ácido. Se necessário, adicionar 2 g de NaOH para cada ml de HCl 0,1 N consumido a menos que o esperado.

### 2.2.3. Preparação dos padrões de glucose

- a) secar a glicose anidra por 2 h, a 100°C (até se ter peso constante);
- b) preparar solução-mãe com 10 mg/ml com solução tampão de citrato 0,05 M, pH 4,8 (exemplo: 1000 mg = 1 g de glicose em 100 ml de tampão);

c) preparar diluições com concentrações de 0,2 a 3,0 mg glicose/ml (usar tampão).

#### 2.2.4. Preparação da curva

Pipetar 0,5 ml do padrão de glicose (a diluições de 0,2 a 3,0 mg glicose/ml tampão) + 1,0 ml de tampão + 3 ml do reagente DNS e homogeneizar (pode usar Roll tubes).

Tampar os tubos com rolha fendada e ferver em banho-maria durante 5 minutos.

Esfriar à temperatura ambiente.

Adicionar 20 ml de água destilada em cada tubo e homogeneizar (caso sejam usados Roll tubes, completar o volume com água destilada. Neste caso, como o Roll tube tem 25 ml de capacidade, são adicionados 0,5 + 1,0 + 3,0 + 20,5 (água) . Ler a transmissão (% T) em espectrofotômetro a 550 nm.

branco - O branco é preparado substituindo o padrão de glicose por 0,5 ml de solução tampão (fornecendo: 1,5 ml de tampão + 3,0 ml DNS etc.).

Preparar a curva em papel semilogarítmico ( $\log \% T$ ) em função da concentração. O resultado deve ser uma linha reta que intercepta a abcissa numa concentração de 0,04 mg de glucose. Esses 0,04 mg representam a glucose perdida por oxidação. Para medidas acuradas de pequenas concentrações de glucoses adicionar 0,1 mg de glucose a cada amostra. 3 ml de DNS vão reagir com cerca de 10 mg de glucose. Soluções concentradas de açúcar devem ser diluídas, de forma que as amostras para análise contenham no máximo 5 mg de açúcares redutores.

### Observações

- a cor se desenvolve apenas em condições alcalinas, de sorte que as amostras ácidas devem ser neutralizadas;
- o método é não específico e mede qualquer composto redutor. Se a glucose é usada como padrão, os valores de celobiose serão 15% mais baixos e os para xilose serão 15% mais elevados, em peso;
- as amostras fervidas podem esperar um tempo razoável antes da leitura da cor. Amostras não fervidas deterioram gradualmente.

#### 2.2.5. Método de Mandels para atividade de celulasas. Método do papel de filtro

- a) filtrar ou centrifugar as amostras de cultura para remover sólidos. Dissolver as enzimas em pó em tampão citrato 0,05 M pH 4,8 a 1-5 mg/ml. Diluir as soluções de enzimas (líquidas) em tampão citrato 0,05 M pH 4,8.
- b) brancos com enzima sem substrato e substrato sem enzima devem ser incluídos em todos os ensaios com enzimas, devendo os valores ser corrigidos para qualquer leitura do branco. Os ensaios devem ser acompanhados de um branco sem enzima e sem substrato, no caso papel, para zerar o espectrofotômetro. Além deste, devem ser feitos mais dois brancos:
  - com enzima, sem papel (neste caso usar a maior concentração de enzima que estiver sendo testada).
  - sem enzima, com papel.

Estes dois brancos não devem apresentar açúcares. No entanto, se isto ocorrer, preparar brancos para cada uma das concentrações e/ou enzimas ensaiadas)

c) para resultados quantitativos, as enzimas precisam ser diluídas (ou o tempo de reação reduzido) a fim de que se tenha o resultado na região de linearidade da curva. Quando se usa carboximetil celulose, salicina ou celobiose como substrato, o limite para a leitura dos açúcares produzidos é de cerca de 0,5 mg de glicose (ou menos). Quando se usa papel de filtro, algodão ou outro substrato insolúvel, o limite máximo é de 2,0 mg de glicose (ou menos). PEREZ (13) testa a enzima com diversas concentrações e adota a amostra que forneça um resultado próximo de 2,0 mg de glicose).

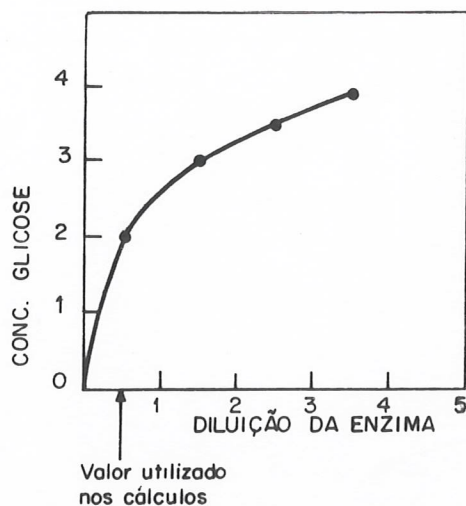


FIG. 2 - OBTENÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA ENZIMA  
P/CÁLCULO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

d) de acordo com a International Union of Biochemistry uma unidade de enzima é igual a um micromol de substrato hidrolizado por minuto. Para a celulose, baseia-se nas ligações hidrolizadas, ou seja, em micromoles de glicose liberadas por minuto. Um micromol de glicose ( $C_6H_{12}O_6$ ) é igual a 0,180 mg. Em um ensaio de 30 minutos, uma unidade de enzima produz  $0,18 \times 30 = 5,4$  mg de glicose.

$$1 \text{ mg de glicose} = \frac{1}{5,4} = 0,185 \text{ unidades}$$

Da mesma maneira:

- ensaio de 60 minutos:-  $0,18 \times 60 = 10,8$  mg de glicose e 1 mg de glicose =  $\frac{1}{10,8} = 0,0925$  unidades
- ensaio de 2 horas:-  $0,18 \times 60 \times 2 = 21,6$  mg de glicose e 1 mg de glicose =  $\frac{1}{21,6} = 0,0463$  unidades
- ensaio de 24 horas:-  $0,18 \times 60 \times 24 = 259,2$  mg de glicose e 1 mg de glicose =  $\frac{1}{259,2} = 0,00386$  unidades

Atividades específicas da celulase de Trichoderma dependem do substrato ensaiado e condições. Valores aproximados para os ensaios descritos no manual são 50 unidades/mg de proteína para carboximetilcelulases, 0,6 unidades/mg de proteína para celulase de papel de filtro, e 0,06 unidades/mg de proteína para celulases de algodão.

e) Reagentes

- papel de filtro Whatman nº 1 cortado em tiras de 1 x 6 cm (50 mg);
- tampão de citrato 0,05 M pH 4,8;
- padrões de glicose em tampão;
- reagente DNS para açúcares redutores.

f) Procedimento

Colocar em um tubo(\*) 0,5 ml de enzima a ser testada (ou suas diluições), 1,0 ml de tampão e uma tira de papel de filtro. Misture em agitador Vortex para enrolar o papel. Incubar à 50°C por 1 hora.

(\*) se na realização da curva com o DNS + glucose tiver sido usado Roll tubes, usar o mesmo tipo de tubo no ensaio de Mandels (volume igual).

(O tempo de incubação só deve ser começado a contar quando a temperatura dentro do tubo atingir  $50^{\circ}\text{C}$ . Na BIOBRÁS, costuma-se medir a temperatura dentro dos tubos. Pode-se também, deixar a enzima no banho-maria, aquecida a  $50^{\circ}\text{C}$ ; depois coloca-se no banho-maria os tubos com o tampão e o papel de filtro e deixa-se atingir a temperatura; em seguida, pipetar a enzima para os tubos com papel de filtro e começar a contar o tempo. Quando os tubos forem retirados do banho para adição do reagente DNS (que suspende a reação) deve-se usar a mesma sequência utilizada na colocação da(s) enzima(s), para que um tubo não fique nem mais nem menos que 1 hora em reação).

Adicionar 3 ml de reagente DNS (para suspender a reação). Colocar os tubos em água fervente por 5 minutos. Resfriar à temperatura ambiente, adicionar 20 ml de água destilada e ler açúcares redutores, % de transmitância em espectrofotômetro a 550 nm (ver método de Miller para açúcares redutores).

#### brancos

- (x) - fazer um branco sem papel e sem enzima, para zerar o espectrofotômetro.  
substituir o volume de enzima (0,5 ml) por tampão de citrato 0,05 M pH 4,8;
- (y) - fazer um branco sem papel e com enzima (na maior concentração em que a mesma estiver sendo testada);
- (z) - fazer um branco com papel e sem enzima.  
(os brancos (y) e (z) não devem fornecer leitura para açúcar. Se isto ocorrer, repetir o teste, com um branco para cada uma das concentrações da(s) enzima(s) sendo testadas, descontando os respectivos teores de açúcar).

## g) Atividade de papel de filtro

A "filter paper (FP) activity", ou atividade de papel de filtro é a concentração de glucose em mg produzida no teste.

A atividade de FP é aproximadamente quantitativa até valores de cerca de 3 mg de glucose e é adequada para o acompanhamento de fermentadores, seleção de mutantes etc. Deve ser expressa em relação à concentração como: "a 1 mg/ml o pō (de enzima) tem uma atividade de FP de 1,0", ou "o filtrado da cultura tem uma atividade de FP de 3,5".

Em trabalho quantitativo, se a atividade é maior que 2,0, o ensaio deve ser repetido usando enzima diluída e os ml de enzima necessários para fornecer 2,0 mg de glicose são estimados.

Em um ensaio de 60 minutos, 2 mg de glicose =  $0,0925 \times 2 = 0,185$  unidades. Uma vez que esta glicose foi produzida à partir de 0,5 ml de enzima, a solução tem:  $\frac{0,185}{0,5} = 0,37$  unidades/ml.

$$\text{Unidades por ml} = \frac{\text{mg glicose} \times 0,0925}{\text{ml enzima}}$$

$$\text{ou } \frac{0,185}{\text{ml enzima p/fornecer } 2,0 \text{ mg de glucose}}$$

## 3.8. EXEMPLO

Enzima em pó (ver figura 3 na página 39)

(a) Concentração de enzima	(b) mg enzima	(c) mg glucose
10 mg/ml	5	4,52
8 mg/ml	4	3,99
6 mg/ml	3	3,90
4 mg/ml	2	3,71
2 mg/ml	1	3,00
1 mg/ml	0,5	2,00

0,5 mg de enzima em pó fornecem 2,0 mg de glucose

$$\frac{0,185}{0,5} = 0,37 \text{ FPU por mg de pó}$$

ou 1,0 mg de enzima em pó fornecem 4,0 mg de glucose

$$\frac{4}{10,8} = 0,37 \text{ FPU/mg}$$

FPU = unidades de FP ou Filter Paper Units

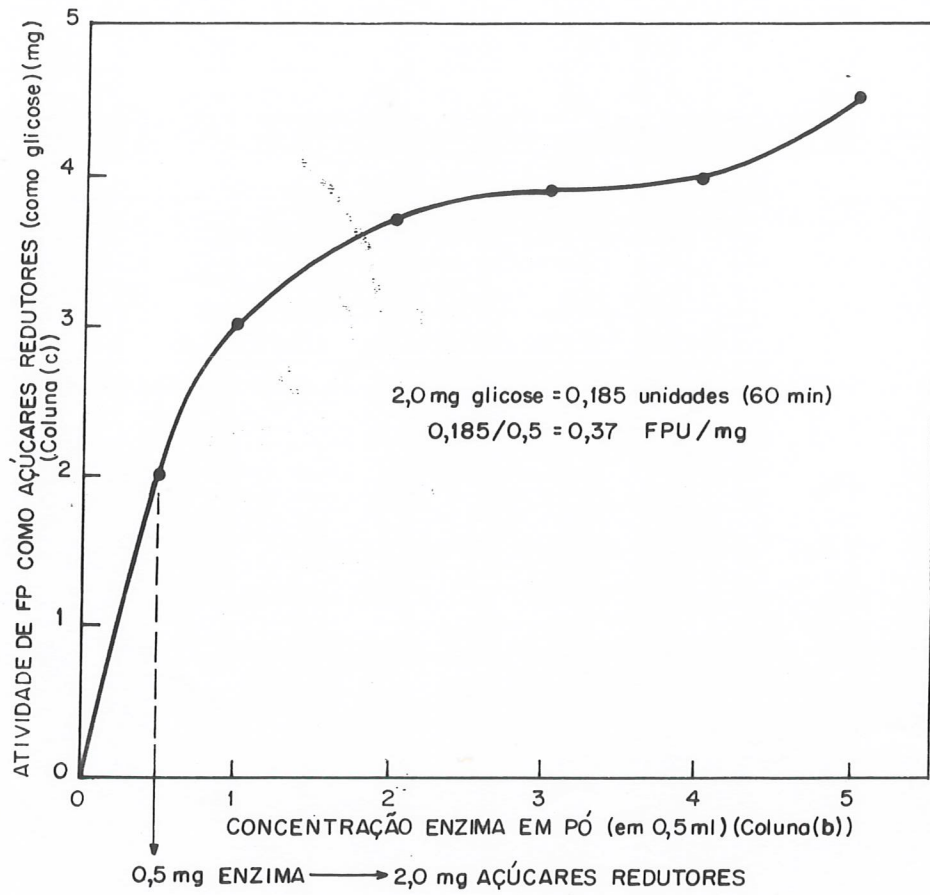


FIG. 3 - EXEMPLO DE CÁLCULO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABCP. Celulose Cross & Bevan na madeira. s.l., ABCP (M 9/71).
2. ABCP. Lignina na madeira. s.l., ABCP (M10/71).
3. ALVSAKER, E. A modified Waksman procedure and its application to soil samples from Western Norway. Bergen, Bergensis Universitas, 1948.
4. ANDREOTTI, R.E. Laboratory experiment for high yield cellulase fermentation. Natick, U.S. Army Natick Research and Development Command. 17 p. (Trabalho apresentado no International Course and Symposium on Bioconversion and Biochemical Engineering, 2. New Delhi, 1980).
5. BENDER, D.F.; PETERSON, M.L.; STIERLI, H. Physical, chemical and microbiological methods of solid waste testing. Cincinnati, Environmental Protection Agency, 1973.
6. D'ALMEIDA, M.L.O. Composição química dos materiais. In: D'ALMEIDA, M.L.O. et alii. Celulose e papel. Tecnologia de fabricação da pasta celulósica. São Paulo, IPT/SENAI, 1972. v. 1, cap. III.
7. DEKKER, R. F. H. Developments on enzymatic hydrolysis of cellulosic materials and aspects of the fermentation of produced sugars. Australia, s.d. (Notas do Curso na Universidade Estadual de Maringá. Maringá, dez. 1985).
8. DETROY, R.W. et alii. Saccharification of wheat-straw cellulose by enzymatic hydrolysis following fermentative and chemical pretreatment. Biotechnology and Bioengineering Symp, (10):135-48, 1980.

9. GASI, T.M.T. et alii. Biodigestão anaeróbia de resíduos celulósicos I - Fundamentos sobre a hidrólise do complexo lignocelulósico. São Paulo, CETESB, dez. 1986. (Relatório parcial do Projeto 140600/DAEE).
10. GOMES, F.P. A estatística moderna na pesquisa agropecuária. Piracicaba, Assoc. Bras. Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1984.
11. MANDELS, M.; ANDREOTTI, R.; ROCHE, C. Measurement of saccharifying cellulase. In: GADEN Jr., E.L. et alii, ed. Enzymatic conversion of cellulosic materials: technology and applications. New York, Interscience, 1976. p. 21-33. (Biotechnology and Bioengineering Symposium, 6).
12. MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. Anal. Chem., 31. 426-28, 1959.
13. PEREZ, C.S. Instituto de Pesquisa Tecnológicas do Estado de São Paulo. Comunicação pessoal.
14. REESE, E.T. Cellulase production: summary. In: GADEN Jr., E.L. et alii, ed. Enzymatic conversion of cellulosic materials: technology and applications. New York, Interscience, 1976. p. 91-3. (Biotechnology and Bioengineering Symposium, 6).
15. SADDLER, J.N. & KHAN, A.W. Cellulase production by Acetivibrio cellulolyticus. Can. J. Microbiol., 26: 760-5, 1980.

16. SILVA, D.J. Novo método de determinação da qualidade das forrageiras (Van Soest). Goiânia, 1983. Anexo III (Trabalho apresentado no Encontro de Técnicos em Biodigestores do Sistema Embrapa, 2).
17. SU, T.M. Comments on the papers presented at the cellulase production session. In: GADEN Jr., E.L. et alii, ed. Enzymatic conversion of cellulosic materials: technology and applications. New York, Intercience, 1976. p. 83-9. (Biotechnology and Bioengineering Symposium, 6).
18. TAPPI, Atlanta. Carbohydrate composition of extractive-free wood and wood pulp by gas - liquid chromatography. Atlanta, TAPPI, 1975 (Método T 249 pm-75).
19. TAPPI, Atlanta. Chromatographic analysis of purified pulp. Atlanta, TAPPI, 1975 (Método T 250 pm-75).
20. THIEMANN, J.E. Biobrás/Bioferm. Comunicação pessoal.
21. WHO-INTERNATIONAL REFERENCE CENTRE FOR WASTES DISPOSAL, Dübendorf. Methods of analysis of swage sludge, solid wastes and compost. Dübendorf Suíça, WHO, 1978.

ANEXO - MÉTODO DE SU

De acordo com SU (17), a medida da atividade de celulases obedece ao seguinte procedimento: (a) colocar em um tubo de cultura de 16 x 125 mm 1 ml de tampão de citrato 0,1 M pH 4,8 (contendo 0,01% de mertiolate) e 20% peso/volume de celulose microcristalina Avicel PH 105; (b) adicionar 1 ml de enzima e misturar; (c) incubar o tubo a 50°C com agitação contínua pelo tempo desejado; (d) parar a reação adicionando 8 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1 N (para enzimas menos ativas, use um volume menor de ácido diluído); (e) centrifugar para remover todas as partículas; (f) analisar os açúcares solúveis produzidos pelo método da antrona.