



MODELAGEM CINÉTICA DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA  
DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR PRÉ-TRATADA HIDROTERMICAMENTE

Javier David Angarita Martínez

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientadores: Argimiro Resende Secchi  
Evaristo Chalbaud Biscaia Jr.

Rio de Janeiro  
Abril de 2014

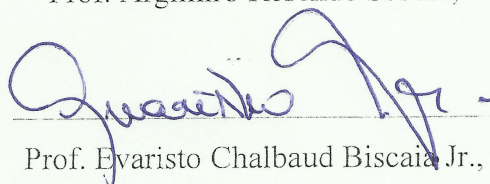
MODELAGEM CINÉTICA DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA  
DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR PRÉ-TRATADA HIDROTERMICAMENTE

Javier David Angarita Martínez

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO  
LUIZ COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA  
(COPPE) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE  
DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE  
EM CIÊNCIAS EM ENGENHARIA QUÍMICA.

Examinada por:

  
Prof. Argimiro Resende Secchi, D.Sc.

  
Prof. Evaristo Chalbaud Biscaia Jr., D.Sc.

  
Prof. Maria Alice Zarur Coelho, D.Sc.

  
Dra. Ariane Leites Larentis, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

ABRIL DE 2014

Angarita Martínez, Javier David

Modelagem Cinética da Hidrólise Enzimática da Palha de  
Cana-de-Açúcar Pré-tratada Hidrotermicamente/ Javier David

Angarita Martínez. -Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2014.

XI, 96 p.: il.; 29,7 cm.

Orientadores: Argimiro Resende Secchi

Evaristo Chalbaud Biscaia Jr.

Dissertação (mestrado) - UFRJ/COPPE/Programa de  
Engenharia Química, 2014.

Referências Bibliográficas: p. 75-90.

1. Modelagem Matemática, 2. Hidrólise Enzimática, 3. Palha de  
Cana-de-Açúcar. I. Secchi, Argimiro Resende *et al.* II.  
Universidade Federal de Rio de Janeiro, COPPE, Programa de  
Engenharia Química. III. Título.

AD MAIOREM DEI GLORIAM

SANCTUS, SANCTUS, SANCTUS,  
DOMINUS DEUS, SABAOth.  
PLENI SUNT COELI ET TERRA GLORIA TUA.  
HOSANNA IN EXCELSIS.  
BENEDICTUS QUI VENIT IN NOMINE DOMINI  
HOSANNA IN EXCELSIS.

*A Isabel minha esposa,  
e à pequena Sara,  
...nossa princesa.*

Gostaria de expressar minha gratidão:

Aos meus orientadores, professores Argimiro e Evaristo, pela confiança, apoio e orientação permanente. Ao professor Antonio J. G. Cruz do DEQ da UFSCar, à querida Renata B. A. Souza e aos colegas do LaDABio DEQ-UFSCar, pela sua amabilidade, parceria, disponibilidade e sugestões.

Aos colegas da G130 pela convivência diária, ajuda e discussões tanto técnicas como mundanas. Muito obrigado! Às queridas Amanda e Gilliani, aos grandes Cauê e Bruno, o caro Guilherme, os caríssimos Rafa, Maurício e Tiago, à querida Kese, e aqueles que estão longe, Bruno, Tafarel e Daniel. Gratidão especial a minha querida amiga gaúcha, a muito nobre e bondosa Mirella Santos e a minha querida "prima" Marcela.

Aos colegas do LADES, Lizandro, Diego e Simone. Aos companheiros da turma de mestrado 2012. Aos professores do programa, Príamo, José Carlos, Frederico e Victor. Às secretárias, Sra. Vera, Sra. Rosana e Luciana, e em geral, a todo o pessoal administrativo do PEQ.

Aos meus amigos no Brasil, a Sra. Fátima e seu esposo o Sr. Teixeira, ao Sr. Williams e sua esposa a Sra. Manuela, ao professor Silvio, ao Padre Geraldo, às irmãs Maria Antonia e Maria de Jesus, a Marinete e sua generosa família em Amorim, ao pessoal da Igreja Nossa Senhora do Bonsucesso de Inhaúma. Obrigado pela amizade!

A meus pais Esperanza e Carlos, pelo exemplo, o amor e as orações. A meus irmãos por cuidar deles, obrigado Carol, Dani e Copi-copi! Gratidão perene aos meus sogros Ana e Jaime, sem sua ajuda e orações não tivesse sido possível; os meus cunhados Leidy e Alfonso, vocês todos são demais! Muito obrigado ainda aos meus amigos de sempre pelo contínuo alento, ao Omar Guerra, Ariel Uribe, Sandra Montagut, ao grande Iván Ordoñez, a Laurita, Carito, Nelson, Henderson, Nataly, Chucho, Fabián, Milena, Carolina, e todos meus amigos e colegas que desde diferentes universidades do mundo são minha motivação. A meu querido amigo Jorge D. Taitte e ao compadre Oscar.

A CAPES e à FAPERJ pelo suporte financeiro.

A todos que, direta ou indiretamente colaboraram na realização deste trabalho.

Ao povo do Brasil pela acolhida.

A minha esposa por seu amor, suporte espiritual e companhia neste caminhar juntos. Realmente temos crescido mais um pouquinho *mor!*

**A Deus por fazer tudo.**

*Não fazemos coisa alguma. É Deus quem faz tudo. Toda a glória deve voltar para Ele. Deus não me convocou para ser bem sucedida. Ele me convocou para ser fiel.*

**Madre Teresa de Calcutá**

Resumo da Dissertação apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências (M.Sc.)

MODELAGEM CINÉTICA DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA  
DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR PRÉ-TRATADA HIDROTERMICAMENTE

Javier David Angarita Martínez

Abril/2014

Orientadores: Argimiro Resende Secchi  
Evaristo Chalbaud Biscaia Jr.

Programa: Engenharia Química

Um modelo cinético semimecanístico multireacional foi proposto para descrever a hidrólise enzimática da palha de cana-de-açúcar pré-tratada hidrotermicamente. Este modelo considera uma reação homogênea de conversão de celobiose em glicose e duas reações heterogêneas para a conversão de celulose à glicose e celulose à celobiose. A isoterma de Langmuir foi usada para modelar a adsorção da enzima no substrato. A inibição competitiva da enzima pelos produtos e a conversão da hemicelulose em xilose foram ainda incorporadas no modelo. O *software* EMSO foi utilizado para estimar os parâmetros cinéticos do modelo a partir de dados experimentais para uma condição de referência (carregando 15% m/v de sólidos e 10FPU/g-celulose de enzima). O modelo mostrou ter capacidade de prever a concentração dos produtos da hidrólise ( $R^2 \geq 0,93$ ), mas apresentou alta correlação paramétrica. Uma simplificação do modelo, baseada nos fundamentos da cinética enzimática, reduziu notavelmente a correlação entre os parâmetros sem comprometer a capacidade de predição. O modelo simplificado predisse com boa acurácia o comportamento da hidrólise para a condição de referência e o efeito tanto da carga de sólidos como da inibição pela carga inicial de açúcares. Entretanto, algumas limitações para descrever o comportamento da hidrólise para altas cargas enzimáticas (próximas de 60FPU/g-celulose) foram observadas.

Abstract of Dissertation presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M.Sc.)

KINETIC MODELING OF ENZYMATIC HYDROLYSIS  
OF HYDROTHERMALLY PRETREATED SUGARCANE STRAW

Javier David Angarita Martínez

April/2014

Advisors: Argimiro Resende Secchi  
Evaristo Chalbaud Biscaia Jr.

Department: Chemical Engineering

A semimechanistic multi-reactional kinetics model was proposed to describe the enzymatic hydrolysis of hydrothermal pretreatment sugarcane straw. This model considers one homogeneous reaction of cellobiose to glucose and two heterogeneous reactions of cellulose to cellobiose and cellulose to glucose. The Langmuir isotherm was used to model the enzyme adsorption on the substrate. The competitive enzyme inhibition by the products and the conversion of hemicellulose to xylose were also incorporated in the model. The EMSO software was used to estimate the model kinetics parameters from experimental data for one reference condition (loading 15% w/v of solids and 10 FPU/g-cellulose of enzyme). The model was found to have the ability to predict the concentration of hydrolysis products ( $R^2 \geq 0.93$ ), but presented high parametric correlation. A simplified model, based on the fundamentals of enzyme kinetics, reduced significantly the correlation between parameters without compromising the prediction ability. The simplified model predicted with good accuracy the behavior of hydrolysis for the reference condition and the effect of both solids loading and inhibition by the initial load of sugars. However, some limitations to describe the enzymatic hydrolysis behavior for enzymatic loadings as high as 60 FPU/g-cellulose, were observed.



# SUMÁRIO

<b>NOMENCLATURA .....</b>	<b>XI</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>5</b>
2.1 COMPOSIÇÃO DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA.....	5
2.1.1 Celulose.....	6
2.1.2 Hemicelulose.....	7
2.1.3 Lignina.....	8
2.2A PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR .....	9
2.3 PRÉ-TRATAMENTO DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA .....	10
2.3.1 Pré-tratamento hidrotérmico.....	13
2.4 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA.....	15
2.5 MODELAGEM MATEMÁTICA DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA .....	17
2.5.1 Modelos semimecanísticos .....	21
2.5.2 Modelo cinético de Kadam et al. (2004) .....	23
2.6 CONFIGURAÇÕES DE PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL .....	27
2.7 HIDRÓLISE EM ALTA CONCENTRAÇÃO DE SÓLIDOS.....	29
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>33</b>
3.1 ENZIMA E SUBSTRATO .....	33
3.2 CARACTERIZAÇÃO DO MATERIAL LIGNOCELULÓSICO .....	33
3.3 ATIVIDADES E TEOR DE PROTEÍNA DA ENZIMA.....	34
3.3.1 Atividade da celulase (FPA) .....	34
3.3.2 Atividade da celobiase .....	35
3.3.1 Determinação de proteínas.....	35
3.4 PRÉ-TRATAMENTO HIDROTÉRMICO .....	35
3.5 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA.....	36
3.6 DESENVOLVIMENTO DO MODELO.....	37
3.7 METODOLOGIA COMPUTACIONAL.....	41

3.7.1	Estimação dos parâmetros cinéticos .....	42
3.7.2	Validação do modelo .....	42
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>43</b>
4.1	CARACTERIZAÇÃO E PRÉ-TRATAMENTO .....	43
4.2	ATIVIDADES E TEOR DE PROTEÍNA DA ENZIMA .....	45
4.3	HIDRÓLISE ENZIMÁTICA .....	46
4.3.1	Efeito da carga de sólidos.....	46
4.3.2	Efeito da carga de enzima .....	49
4.3.3	Efeito da inibição pela carga inicial de açúcar .....	52
4.3.4	Adsorção .....	55
4.4	MODELAGEM MATEMÁTICA .....	59
4.4.1	Estimação dos parâmetros cinéticos .....	59
4.4.2	Verificação do modelo .....	66
<b>5.</b>	<b>CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....</b>	<b>72</b>
	<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>75</b>
	<b>ANEXO 1 .....</b>	<b>91</b>
A1.	SIMPLIFICAÇÃO DO MODELO CINÉTICO DE HIDRÓLISE .....	91
	<b>ANEXO 2 .....</b>	<b>94</b>
A2.	EFEITO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS SOBRE OS PARÂMETROS.....	94

# NOMENCLATURA

$C$	$g/l$	Concentração de celulose
$C_0$	$g/l$	Concentração inicial de celulose
$E_B$	$g/l$	Concentração da enzima adsorvida no substrato
$E_{BC}$	$g/l$	Concentração de enzima adsorvida na celulose
$E_{BH}$	$g/l$	Concentração da enzima adsorvida na hemicelulose
$E_F$	$g/l$	Concentração de enzima livre
$E_{max}$	$g/kg$	Capacidade máxima de adsorção da enzima no substrato
$E_T$	$g/l$	Concentração total de enzima
$F_{OBJ}$		Função objetivo
$G$	$g/l$	Concentração de glicose
$G_2$	$g/l$	Concentração de celobiose
$H$	$g/l$	Concentração de hemicelulose
$H_0$	$g/l$	Concentração inicial de hemicelulose
$K_{3M}$	$g/l$	Constante de saturação do substrato (celobiose)
$k_{3r}$	$l/h$	Constante da taxa de reação
$K_{ad}$	$l/g$	Constante de dissociação da adsorção/desorção da enzima
$K_{iIG}$	$g/l$	Constante de inibição para glicose ( $i=1, \dots, 4$ )
$K_{iIG2}$	$g/l$	Constante de inibição para celobiose ( $i=1, 2, 4$ )
$K_{iIX}$	$g/l$	Constante de inibição para xilose ( $i=1, \dots, 4$ )
$k_{ir}$	$l/g/h$	Constante da taxa de reação ( $i=1, 2, 4$ )
$L$	$g/l$	Concentração de lignina
$r_i$	$l/g/h$	Taxa de reação ( $i=1, \dots, 4$ )
$R_s$	<i>adimensional</i>	Reatividade do substrato
$S$	$g/l$	Concentração de sólidos insolúveis
$S_0$	$g/l$	Concentração inicial de sólidos insolúveis
$\bar{S}_i$		Média do desvio padrão dos dados
$X$	$g/l$	Concentração de xilose
$X_C$	(%)	Conversão teórica da celulose
$X_H$	(%)	Conversão teórica da hemicelulose
$y_i^e$		Variável dependente experimental
$y_i^m$		Variável dependente predita pelo modelo
<i>Letras gregas</i>		
$\alpha$	<i>adimensional</i>	Constante da reatividade do substrato com o grau da hidrólise

# 1. INTRODUÇÃO

Os bicomustíveis não são um tema novo. Durante a segunda metade do século XIX - os primeiros anos da indústria automobilística - os bicomustíveis representavam a principal fonte de energia nos motores de combustão interna, com o uso do etanol por Henry Ford e do óleo de amendoim por Rudolf Diesel. Porém, estes produtos foram substituídos pela gasolina e o diesel à medida que os combustíveis fósseis se tornaram abundantes e baratos no início do século XX (NOGUEIRA, 2008). Na última década, o interesse mundial pelos biocomustíveis tem crescido baseado na preocupação pelo desenvolvimento de fontes de energia limpas que, além de mitigar os efeitos do aquecimento global causado pelos gases de efeito estufa, afirmado como uns dos maiores desafios de nosso tempo (UN, 2012), contribuam à segurança energética dos países, garantindo assim até sua independência política, a liberdade e a paz.

No ano de 2012 o mundo consumiu em torno de 90 milhões de barris de petróleo por dia (Mb/d), liberando aproximadamente 39,7 milhões de toneladas de CO<sub>2</sub> à atmosfera. Ainda assim, é projetado que o consumo aumentará em 20% nos próximos 15 anos (BP, 2014). Especialmente os setores industrial e de transporte ainda dependem fortemente dos combustíveis fósseis. Segundo a IEA<sup>1</sup>, o consumo de petróleo (40,8%), gás (15,5%) e carvão (10,1%) constituíram 66,4% do consumo mundial de combustíveis no ano de 2011, enquanto os biocomustíveis tiveram uma participação de 12,5% durante o mesmo ano (IEA, 2013). No Brasil, já em 2008, o consumo de petróleo e derivados tinha descido até 37%, enquanto que mais de 16% da energia consumida provinha dos derivados da cana-de-açúcar, ultrapassando a energia hidráulica em importância na matriz e assumindo o segundo lugar (UNICA, 2009).

A produção de etanol no Brasil representou 27% da produção mundial no ano 2013, tornando o país como o segundo maior produtor de etanol depois dos Estados Unidos, com 57% segundo a RFA<sup>2</sup> (2014). Dados recentes estimam que a produção de etanol chegue a 25,77 bilhões de litros durante a safra 2013/2014; desses, 11,37 bilhões de

---

<sup>1</sup> IEA: *International Energy Agency*

<sup>2</sup> RFA: *Renewable Fuels Association*

litros correspondem a etanol anidro e 14,40 bilhões de litros a etanol hidratado, o que representa um acréscimo na produção de 15,35% e 4,45%, respectivamente, para cada tipo de etanol, quando comparados com a produção de etanol da safra anterior (CONAB<sup>3</sup>, 2013).

No Brasil, misturas etanol-gasolina são utilizadas desde 1938. Com a implantação do programa Proálcool de substituição em larga escala dos derivados do petróleo em 1975, a produção de etanol se estimulada, ampliando o uso de etanol anidro misturado à gasolina. Em 1979, os altos preços do petróleo viabilizaram a entrada dos veículos movidos a etanol hidratado, que chegaram a representar 95% dos veículos leves produzidos. Durante a década de 90, a gasolina recuperou rapidamente espaço com a queda dos preços do petróleo e, neste mesmo período, os incentivos ao Gás Natural Veicular (GNV) levaram à migração de uma significativa parcela da frota de carros das capitais para o uso desse combustível. O Proálcool surgiu de novo em 2005 potencializado pela introdução em 2003 dos veículos bicompostíveis (*Flex*), que representam mais de 90% dos veículos comercializados no país (UNICA, 2009).

Quase 40 anos de pesquisa e desenvolvimento de tecnologias para a produção de etanol de cana-de-açúcar têm tornado o Brasil o país com os menores custos de produção, o maior exportador e o segundo maior produtor de etanol de primeira geração<sup>4</sup> (NYKO *et al.*, 2010). Apesar dessas vantagens, os biocombustíveis de primeira geração têm recebido críticas relacionadas ao esgotamento da produtividade das rotas de conversão tradicionais<sup>5</sup>, e aos potenciais conflitos pela utilização da terra, o que implicaria maior pressão sobre a reserva das coberturas florestais nativas e inflação no preço de alimentos. Estes fatores, somados à crescente demanda mundial de energia e à dependência da matriz energética mundial do petróleo, que é um recurso finito e poluente que se concentra em regiões cuja instabilidade política é transferida aos preços do produto, fazem com que os biocombustíveis de segunda geração<sup>6</sup> constituam uma alternativa mais sustentável.

---

<sup>3</sup> CONAB: Companhia Nacional de Abastecimento

<sup>4</sup> Os biocombustíveis de primeira geração (ou convencionais) são aqueles produzidos a partir de fontes agrícolas primárias como biodiesel de oleaginosas e etanol de milho ou de cana-de-açúcar (NYKO *et al.*, 2010).

<sup>5</sup> Nogueira (2008) afirma que a eficiência da rota tecnológica empregada atualmente no setor sucro-energético está esgotada. E mesmo que consiga avançar, o aumento de produtividade está limitado ao máximo de 4%, enquanto as estimativas de ganho de produtividade das novas rotas de conversão são no mínimo de 50%.

<sup>6</sup> Para fins deste trabalho, considera-se biocombustíveis de segunda geração aqueles obtidos a partir de biomassa lignocelulósica.

A conversão da biomassa lignocelulósica para a produção do etanol de segunda geração envolve quatro etapas básicas: (1) pré-tratamento; (2) hidrólise dos polissacarídeos presentes no substrato; (3) fermentação dos açúcares a etanol; e (4) recuperação do etanol por destilação. A produção de açúcar a partir da celulose é a etapa mais desafiante deste processo de conversão. Muitos modelos cinéticos têm sido desenvolvidos para a hidrólise enzimática da celulose e da biomassa lignocelulósica à glicose e celobiose (GAN *et al.*, 2003; ZHANG e LYND, 2004; BANSAL *et al.*, 2009). Um dos objetivos destes modelos é compreender melhor o complexo processo bioquímico através de uma estrutura matemática que ajuste adequadamente os dados experimentais (HODGE *et al.*, 2009). A hidrólise enzimática oferece vantagens sobre outras rotas de conversão química de alto rendimento (e.g. hidrólise ácida), incluindo: formação mínima de subprodutos, menores requerimentos de energia e condições de operação brandas (pH: 4.8 e T: 45-50°C) (WALD *et al.*, 1984, SUN e CHENG, 2002, 2005; SARKAR *et al.*, 2012). Porém, o alto custo das enzimas (KADAM *et al.*, 2004; ZHENG, 2007), a baixa taxa de reação (HAHN-HÄGERDAL *et al.*, 2006) e a dificuldade de operar em alta concentração de sólidos (>12%) (HODGE *et al.*, 2009) são as principais barreiras para a comercialização do bioetanol de segunda geração (ZHENG, 2007). Contudo, hoje a capacidade instalada para a produção de etanol celulósico via hidrólise enzimática, supera os 40 e 400 milhões de galões/ano, na União Europeia e nos Estados Unidos, respectivamente (NYKO *et al.*, 2010; AEC<sup>7</sup>, 2013), sem contabilizar as unidades de demonstração asiáticas, canadenses e brasileiras (MONOT e POROT, 2013).

No Brasil existem importantes instituições trabalhando no desenvolvimento e avaliação de novas tecnologias para a produção do etanol de segunda geração (NYKO *et al.*, 2010); como por exemplo, o Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), o Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE), a Novozymes e a PETROBRAS, entre outros; que trabalham em parceria com importantes universidades do país. Nesse contexto, este trabalho faz parte desses esforços conjuntos por compreender e avaliar a cinética da hidrólise enzimática de substratos lignocelulósicos de interesse nacional como a palha de cana-de-açúcar (PCA), visando desenvolver um modelo que descreva o comportamento da hidrólise em alta concentração de sólidos e

---

<sup>7</sup> AEC: *Advanced Ethanol Council*

permita realizar avaliações técnicas e econômicas do processo de produção de etanol de segunda geração, através do uso das ferramentas disponíveis de simulação e otimização de processos.

Este trabalho encontra-se dividido em cinco capítulos, começando por esta introdução no Capítulo 1. No Capítulo 2, é apresentada uma revisão bibliográfica relacionada com a biomassa lignocelulósica, a palha da cana-de-açúcar, os tipos de pré-tratamento, discutindo principalmente sobre o pré-tratamento hidrotermico; a hidrólise enzimática, seus desafios e os tipos de modelos existentes na literatura, assim como uma discussão das vantagens e limitações da hidrólise em alta concentração de sólidos. No Capítulo 3 são descritos brevemente os materiais e métodos empregados no desenvolvimento experimental do trabalho, a formulação proposta para a modelagem e a metodologia computacional empregada para a estimação dos parâmetros do modelo. O Capítulo 4 apresenta uma discussão e análise dos dados da hidrólise obtidos em laboratório. Os resultados e discussão, tanto da estimação dos parâmetros, como da avaliação das predições do modelo usando simulação, também são incluídos neste capítulo. Por fim, no Capítulo 5, são expostas as principais conclusões e sugestões do trabalho.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 COMPOSIÇÃO DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

Os materiais lignocelulósicos são os mais abundantes do mundo (50% da biomassa terrestre aproximadamente) e estão compostos por polissacarídeos, celulose (40%-60%) e hemicelulose (20%-40%), associadas a uma estrutura macromolecular que contém substâncias aromáticas chamada lignina (15%-25%) (PEREIRA Jr. *et al.*, 2008). Nas plantas, as cadeias lineares de celulose promovem a rigidez, a lignina atua como barreira física contra o ataque dos microrganismos e água, e a hemicelulose proporciona a ligação entre a celulose e a lignina formando uma complexa rede fibrosa. Assim, os dois maiores obstáculos à hidrólise da celulose dos materiais lignocelulósicos são a recalcitrância da celulose cristalina (proveniente da estrutura linear das cadeias de celulose compactadas em microfibrilas) e a alta proteção que a lignina oferece à estrutura celulósica, servindo de defesa ao ataque das enzimas hidrolíticas. A Figura 2.1 apresenta um esquema dos principais constituintes dos materiais lignocelulósicos.

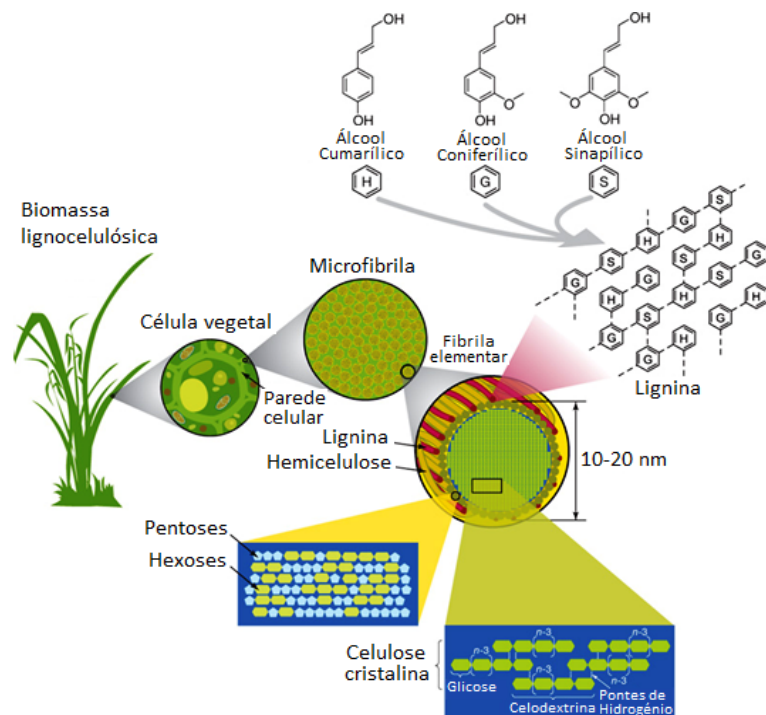


Figura 2.1. Esquema da celulose, hemicelulose e lignina na parede celular das plantas  
(Adaptado de RUBIN, 2008)



### 2.1.1 Celulose

A celulose é o principal componente da biomassa lignocelulósica. A celulose é um polissacarídeo, um polímero de D-glicopirranose (glicose) que forma cadeias com ligações do tipo  $\beta$ -D (1,4) glicosídicas de fórmula geral  $(C_6H_{10}O_5)_n$ . Este polímero natural mantém uma estrutura plana e linear cuja unidade repetitiva é a celobiose (Figura 2.2). Na celulose as cadeias de glicose estão alinhadas formando fibrilas elementares. Conjuntos destas fibrilas formam microfibrilas. As regiões altamente ordenadas dentro das microfibrilas são chamadas "cristalinas", as regiões menos ordenadas são chamadas "amorfas". As ligações de hidrogênio que unem as fibrilas elementares proporcionam coletivamente uma grande força de ligação que incrementa a resistência da glicose ao ataque da hidrólise. A Figura 2.3 apresenta diferentes visões da distribuição da celulose cristalina e amorfa nas microfibrilas.

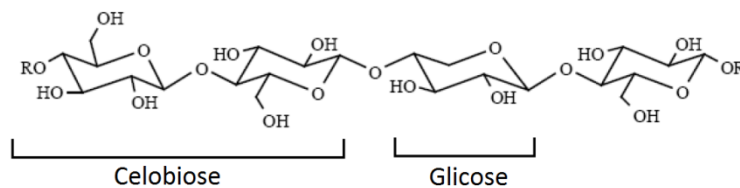


Figura 2.2. Estrutura química da celulose

(Adaptado de FENGEL e WEGENER, 1989 apud RABELO, 2010)

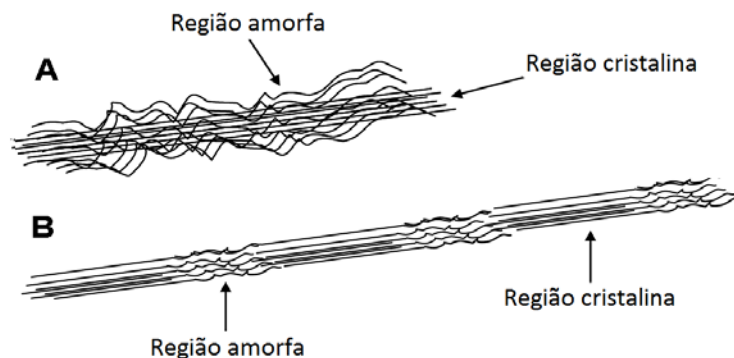


Figura 2.3. Dos diferentes distribuições sugeridas da celulose amorfa e cristalina nas microfibrilas. **A:** Celulose cristalina está no centro da microfibrila e é envolta pela região amorfa. **B:** As regiões cristalinas e amorfas são repetidas ao longo da dimensão horizontal (Adaptado de ANDERSEN, 2007)

## 2.1.2 Hemicelulose

Hemicelulose é o segundo material orgânico renovável mais abundante na terra depois da celulose. As hemiceluloses (também chamadas polioses) são polímeros heterogêneos ramificados e, portanto, não apresentam regiões cristalinas, assim, são mais solúveis e mais suscetíveis à hidrólise química (PEREIRA Jr. *et al.*, 2008).

As unidades de açúcar que formam as hemiceluloses podem ser divididas em grupos, tais como pentoses, hexoses, ácidos hexourônicos e desoxi-hexoses (Figura 2.4). As hemiceluloses apresentam-se na forma de homopolímeros como a xilana formada por xiloses; ou heteropolímeros como a glico-manana, formada por glicose e manose. As madeiras moles (coníferas) apresentam maior proporção de galactoglico-mananas (16-27%) do que de xilanas, enquanto as madeiras duras (folhosas) são ricas em xilanas (20%-37%) (McMILLAN, 1994).

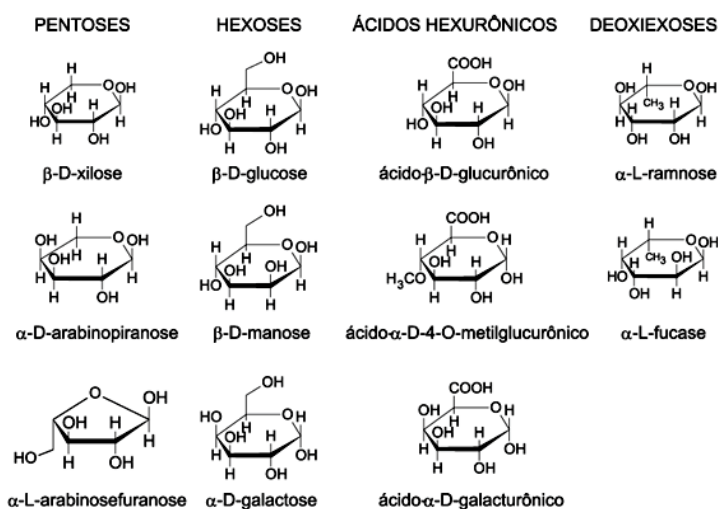


Figura 2.4. Estrutura química dos monossacarídeos que formam hemiceluloses  
(Adaptado de FENGEL e WEGENER, 1989 apud RABELO, 2010)

A Tabela 2.1 a seguir, resume as principais diferenças entre celulose e hemicelulose. O entendimento destas características é fundamental na definição de estratégias para o aproveitamento dos materiais lignocelulósicos como matéria-prima na produção de etanol e outros químicos.

Tabela 2.1. Principais diferenças entre celulose e hemicelulose

(Adaptado de PEREIRA Jr. *et al.*, 2008)

Celulose	Hemicelulose
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Formada por unidades de glicose ligadas</li> <li>▪ Alto grau de polimerização (2000-18000)</li> <li>▪ Forma arranjo fibroso</li> <li>▪ Apresenta regiões cristalinas e amorfas</li> <li>▪ É atacada lentamente por ácido inorgânico diluído a quente</li> <li>▪ É insolúvel em álcalis</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Formada por várias unidades de pentoses e hexoses</li> <li>▪ Baixo grau de polimerização (50-300)</li> <li>▪ Não forma arranjo fibroso</li> <li>▪ Apresenta só regiões amorfas</li> <li>▪ É atacada rapidamente por ácido inorgânico diluído a quente</li> <li>▪ É solúvel em álcalis</li> </ul>

### 2.1.3 Lignina

A lignina é a macromolécula orgânica mais complexa e menos caracterizada na biomassa lignocelulósica. A lignina confere rigidez à parede celular das plantas. Além disso, protege a planta de infecções patogênicas e serve no transporte interno de água, nutrientes e metabólitos. A lignina é composta por unidades de *p*-propilfenol com substituintes metoxi no anel aromático entre estas unidades existe principalmente ligações tipo éter. A lignina apresenta uma estrutura complexa formada por polimerização de três diferentes monômeros: (i) álcool *p*-cumarílico; (ii) álcool coniferílico; (iii) álcool sinapílico (Figura 2.5). A lignina representa de 20%-30% da massa total do material lignocelulósico e retém 50% mais carbono do que a celulose (PEREIRA Jr. *et al.*, 2008).

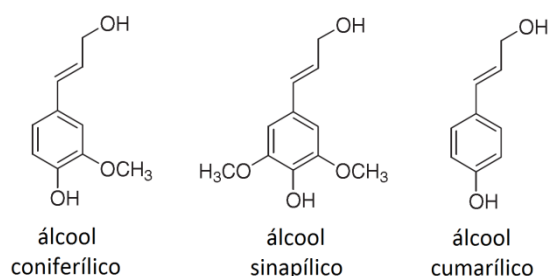


Figura 2.5. Precursores primários na formação da lignina

(Adaptado de FENGEL e WEGENER, 1989 apud RABELO, 2010)

Na hidrólise dos materiais lignocelulósicos, a lignina é um composto indesejável que deve ser eliminado usando tratamentos químicos. Além de ser uma barreira física para as enzimas, as celulasas podem ser irreversivelmente ligadas à lignina, aumentando a

quantidade de enzima necessária para a hidrólise, e dificultando também a recuperação das enzimas após da hidrólise (ZHENG, 2007).

Além da celulose, hemicelulose e lignina, os materiais lignocelulósicos contêm outros componentes em menor grau, tais como resinas, taninos, ácidos graxos, etc. Compostos de nitrogênio na forma de proteínas também são encontrados em pequenas quantidades. Alguns sais de cálcio, potássio e magnésio são os mais frequentes (PEREIRA Jr. *et al.*, 2008).

## 2.2 A PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR

A palha de cana-de-açúcar (PCA) é um resíduo agroindustrial gerado a partir do desfolhamento da cana durante a colheita sem contar os colmos industrializáveis. Como toda biomassa vegetal, é constituída principalmente por celulose, hemicelulose e lignina nas proporções apresentadas na Tabela 2.2. Sua composição é semelhante à composição referida na literatura para o bagaço de cana (CANILHA *et al.*, 2011), o que situa a palha entre as matérias-primas renováveis com o maior potencial para a produção de etanol lignocelulósico.

Tabela 2.2 Composição (%m/m, base seca) da PCA *in natura* referida na literatura

Componente	Moriya (2007)	Silva (2009)	Moutta (2009)	Oliveira (2010)	Bayona (2012)	Souza e Cruz* (2013)
Celulose	36,10	38,10	40,84	39,80	34,43	38,80
Hemicelulose	28,30	29,20	30,79	28,60	23,61	31,60
Lignina total	26,20	24,20	25,80	22,50	24,09	20,20
Cinzas	2,10	2,40	2,56	2,40	9,61	2,50
Extrativos	5,20	5,90	n.d	6,20	7,67	6,20
Total (%)	97,90	99,80	100,00	99,50	99,41	99,30

\* Usada neste estudo; n.d: Não determinado

Até há poucos anos, a palha era queimada para ser removida do colmo facilitando a colheita manual e diminuindo o risco de cortes pelas folhas afiadas e picaduras de animais. No entanto, essa prática causa sérios problemas ambientais, prejudica a reincorporação dos nutrientes ao solo, reduz os açúcares redutores totais (ART) presentes na cana e pode causar até acidentes rodoviários (OLIVEIRA, 2010). A

eliminação gradativa da queima de cana-de-açúcar em 20 anos tem sido estabelecida com o Decreto Federal 2.661/98 o que representa uma maior disponibilidade de PCA para a produção de etanol de segunda geração (SANTOS *et al.*, 2012).

Segundo cifras recentes, na safra 2013/2014 a produtividade média da cana no Brasil foi de 73,5 t/ha (CONAB<sup>8</sup>, 2013). Cada tonelada de cana moída pode gerar até 140 kg de palha em base seca (SAAD *et al.*, 2008), o que equivale a 10,2 toneladas de PCA por hectare. Considera-se que só a metade da palha está disponível para a produção de etanol, seja porque uma parte dela é usada para gerar energia ou é deixada no canavial para não comprometer as características do solo. Considerando também um rendimento de 50% no pré-tratamento para obter uma palha pré-tratada com 60% de celulose, e rendimentos de 50% nas etapas subsequentes tanto de hidrólise quanto de fermentação, é possível produzir 554 l/ha de etanol a partir só da PCA, representando um aumento na produção de etanol próximo de 20% em relação à produção atual<sup>9</sup> de 2898 l/ha. Se o bagaço também fosse considerado, este valor poderia ser duplicado sem necessidade de expansão da área cultivada.

### 2.3 PRÉ-TRATAMENTO DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

Basicamente, como é apresentado na Figura 2.6, o pré-tratamento visa remover a lignina e a hemicelulose da biomassa, reduzir a cristalinidade da celulose e aumentar a porosidade do material para melhorar o acesso das enzimas à celulose e assim aumentar a conversão dos polissacarídeos em açúcares fermentáveis (MOSIER *et al.*, 2005). Além disso, o pré-tratamento deve garantir a formação de açúcares diretamente ou na seguinte etapa de hidrólise; evitar a perda e/ou degradação dos açúcares formados; limitar a formação de co-produtos inibidores; reduzir a demanda de energia e minimizar os custos (SUN e CHENG, 2002; AGBOR *et al.*, 2011).

---

<sup>8</sup>CONAB: Companhia Nacional de Abastecimento.

<sup>9</sup>Segundo a CONAB (2013) a produção estimada de etanol para a safra 2013/2014 é de 25,77 bilhões de litros e a área cultivada, colhida e destinada à atividade sucroalcooleira no mesmo período está estimada em 8893 mil ha.

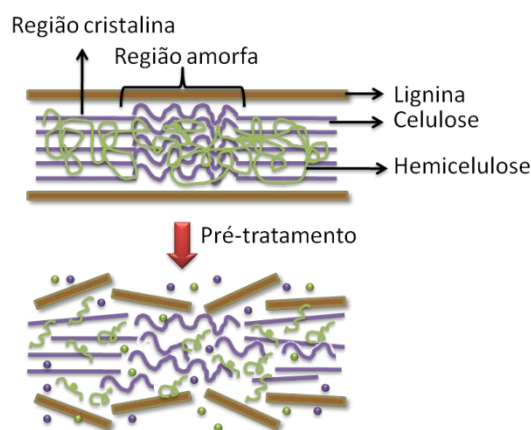


Figura 2.6. Esquema do objetivo do pré-tratamento em materiais lignocelulósicos  
(Adaptado de MOSIER *et al.*, 2005)

O pré-tratamento (também chamado de pré-hidrólise ou auto-hidrólise) geralmente é classificado como pré-tratamento físico, químico, biológico ou uma combinação destes. Várias revisões têm sido publicadas descrevendo e comparando os melhores pré-tratamentos para diferentes materiais lignocelulósicos (FAN *et al.*, 1982; McMILLAN, 1994; SUN e CHENG, 2002; MOSIER *et al.*, 2005; SANCHEZ e CARDONA, 2008; ALVIRA *et al.*, 2009, AGBOR *et al.*, 2011). A Tabela 2.3 apresenta um resumo dos principais tipos de pré-tratamento utilizados.

Vários tipos de pré-tratamento têm sido testados para o bagaço de cana-de-açúcar (CARDONA *et al.*, 2010). Recentemente no Brasil têm sido avaliados pré-tratamentos alcalinos, utilizando peróxido de hidrogênio (GARCIA, 2009; RAVELO, 2007) e hidróxido de cálcio (GARZÓN, 2009; RAVELO, 2010); pré-tratamentos ácidos utilizando ácido sulfúrico e ácido fosfórico diluído (GOMEZ, 2010; CANILHA *et al.*, 2011) e combinação destes pré-tratamentos, ácido diluído e alcalino, com explosão a vapor incluindo uma etapa de deslignificação alcalina com soda (CARVALHO, 2011) ou amônia (CARLY, 2011). Pré-tratamentos alcalinos (BAYONA, 2012), combinados (OLIVEIRA, 2010) e hidrotérmicos (SOUZA e CRUZ, 2013) têm sido avaliados também para a palha da cana-de-açúcar.

Tabela 2.3. Técnicas utilizadas no pré-tratamento da biomassa lignocelulósica  
(Adaptado de ANDERSEN, 2007)

Pré-tratamentos Físicos	Pré-tratamentos Químicos
Cominuição Mecânica	Ácido (Concentrado ou Diluído)
Moagem de bola	Ácido sulfúrico
Moagem de rolo duplo	Ácido clorídrico
Moagem de martelo	Ácido fosfórico
Moagem de colóide	Alcalino
Moagem por vibração ( <i>Vibro energy milling</i> )	Hidróxido de sódio (potássio, cálcio, amônia)
	Amônia
	Sulfito de amônio
Alta Temperatura	Agentes Oxidantes
Pirólise	Ozonólise
Explosão de vapor	Peróxido de hidrogênio
Termohidrólise ( <i>LHW: Liquid Hot Water</i> )	Gás
	Dióxido de cloro
	Dióxido de nitrogênio
	Dióxido de enxofre
Radiação de Alta Energia	Solventes da Celulose
Raios de elétrons	Cadoxen (etilenodiamina e água)
Raios Gamma ( $\gamma$ )	CMCS
Micro-ondas	Solventes de Extração da Lignina
Extrusão	Extração etanol-água
Expansão	Extração benzeno-etanol
	Extração etileno-glicol
	Extração butanol-água
	Deslignificação Oxidativa
	Processo Organosolv
	Líquidos Iônicos (ILs)
Pré-tratamentos Físico-Químicos	Pré-tratamentos Biológicos
Explosão de Vapor Catalisada	Fungos Filamentosos
AFEX ( <i>Ammonia Fibre Explosion</i> )	Fungo marrom (ataca a celulose)
Explosão de CO <sub>2</sub>	<i>Piptoprus betulinus</i>
Extração com Fluidos Supercríticos (SCF)	<i>Laetiporus sulphureus</i>
	<i>Trametes quercina</i>
	<i>Fomitopsis pinicola</i>
	<i>Gloephyllum saepiarium</i>
	Fungo branco (ataca a lignina e a celulose)
	<i>Formes fomentarius</i>
	<i>Phellinus igniarius</i>
	<i>Ganoderma appalanatum</i>
	<i>Amillaria mellea</i>
	<i>Pleurotus ostreatus</i>
	Fungo vermelho (ataca a lignina e a celulose)
	<i>Formitopsis annos</i>
	Bactérias

Nenhum pré-tratamento é totalmente melhor que outro, e sua implementação depende da natureza do material lignocelulósico e da aplicação do material hidrolisado. As vantagens e desvantagens comparativas entre os pré-tratamentos envolvem vários fatores como: rendimento, consumo de energia, formação de inibidores tóxicos, corrosão de equipamentos, custo e dificuldade de recuperação do solvente, preços de

reagentes ou enzimas, desenvolvimento comercial, necessidade de processos adicionais de desintoxicação, etc. E sua escolha é baseada em critérios tanto técnicos quanto econômicos já que o pré-tratamento é uma das etapas mais custosas na produção de etanol celulósico (LYND, 1996a; EGGEMAN e ELANDER, 2005; TAO *et al.*, 2011; KUMAR e MURTHY, 2011).

### **2.3.1 Pré-tratamento hidrotérmico**

O pré-tratamento hidrotérmico, termohidrólise ou LHW (*Liquid Hot Water*) usa água entre 150°C - 230°C, como líquido ou como vapor, para provocar alterações na estrutura da biomassa e hidrolisar seletivamente as hemiceluloses (GÍRIO *et al.*, 2010).

Com relação ao pré-tratamento ácido, o pré-tratamento hidrotérmico reduz a necessidade de produtos químicos para neutralização de resíduos no hidrolisado, apresenta baixa corrosão do reator, e reduz a necessidade de diminuição de tamanho da biomassa uma vez que as partículas lignocelulósicas se quebram na água. Além disso, o pré-tratamento hidrotérmico favorece a digestibilidade da celulose, apresenta alto rendimento em açúcar a partir da hemicelulose e seu hidrolisado é fermentável a etanol (LYND *et al.*, 1996b; VAN WALSUM *et al.*, 1996).

No pré-tratamento hidrotérmico, a alta temperatura produz a auto-ionização da água, gerando íons hidrônio que atuam como catalisadores na quebra das ligações éter heterocíclico da hemicelulose, provocando tanto a geração de oligossacarídeos quanto a separação de grupos acetila. Logo, íons hidrônio gerados pela auto-ionização do ácido acético e de outros ácidos como o ácido urônico, também atuam como catalisadores na degradação dos polissacarídeos (GARROTE *et al.*, 1999; MOSIER *et al.*, 2005). A formação destes íons é mais importante que aqueles da água que estão limitados às etapas iniciais da reação (GARROTE *et al.*, 1999).

Dependendo das condições de operação, os polissacarídeos (principalmente hemiceluloses) são despolimerizados a oligômeros e monômeros, e os açúcares correspondentes (pentoses e hexoses) podem ser desidratados, respectivamente, para furfural e hidroximetilfurfural. Estes aldeídos são inibidores da fermentação (MOSIER



*et al.*, 2005). Frações de celulose e lignina também podem ser parcialmente hidrolisadas na presença de água (GARROTE *et al.*, 1999).

O pré-tratamento hidrotérmico tem sido avaliado para diferentes materiais lignocelulósicos como fibra de milho (ALLEN *et al.*, 2001), resíduos da extração do óleo (BALLESTEROS *et al.*, 2002) e da poda das oliveiras (CARA *et al.*, 2007), resíduos da palha de trigo (RUIZ *et al.*, 2010), palha de colza (DÍAZ *et al.*, 2010) e para diferentes aplicações do bagaço de cana-de-açúcar, como: alimento para gado (FONTANA *et al.*, 1995), produção de xarope de xilose (SASKA e OZER, 1995), produção de xilitol após a purificação e hidrogenação da xilose (BOUSSARSAR *et al.*, 2009), produção de produtos de polpa e papel (ALLEN *et al.*, 1996) e etanol (ALLEN *et al.*, 1996; VAN WALSUM *et al.*, 1996; LASER *et al.*, 2002).

Van Walsum *et al.* (1996) usaram LHW (220°C, 5MPa, 2 min) para pré-tratar bagaço de cana-de-açúcar sem cominuição, atingindo conversões de etanol de 90% usando sacarificação e fermentação simultâneas (SSF) e carga de enzimas entre 15-30 FPU/g. Os hidrolisados do pré-tratamento mostraram uma ligeira inibição do crescimento da levedura *S. cerevisiae*.

Allen *et al.* (1996) também pré-trataram o bagaço e as folhas da cana-de-açúcar sem redução do tamanho usando água líquida comprimida a altas temperaturas (190-230°C) e imersões rápidas (45 s a 4 min). Mais de 50% da biomassa foi solubilizada (toda a hemicelulose e mais de 60% da lignina insolúvel em ácido), recuperando mais de 80% da hemicelulose como açúcar monomérico com menos de 5% de formação de furfural. O rendimento do resíduo lignocelulósico não foi afetado pelas diferenças no material (bagaço ou folhas), nem pelo teor de umidade (8-50%).

Laser *et al.* (2002) comparam o pré-tratamento LHW com pré-tratamentos de vapor em uma faixa de temperatura entre 170°C-230°C, carga de sólidos entre 1%-8% (m/m) e tempo entre 1min e 46min, encontrando uma maior recuperação de xilanas ( $\geq 80\%$ ), conversões  $\geq 80\%$  usando SSF e mínima inibição da glicose durante a fermentação para o pré-tratamento hidrotérmico.

Recentemente, Souza e Cruz (2013) pré-trataram a palha da cana-de-açúcar a 195°C por 10 min, alcançando uma remoção de hemicelulose de 87% e uma conversão de etanol de 84% com uma carga enzimática de 10 FPU/g e tempo de hidrólise de 72 h.

## 2.4 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

Após o pré-tratamento, a biomassa é sacarificada pela ação de enzimas (celulases) altamente específicas que reduzem os complexos carboidratos em açúcares evitando a degradação da glicose (BALAT, 2011). A hidrólise enzimática é preferida à hidrólise ácida, porque requer menos energia, não apresenta problemas de corrosão e é conduzida em condições brandas (pH: 4,8 e T: 45-50°C) (SUN e CHENG, 2002; SARKAR *et al.*, 2012).

As celulases são produzidas por fungos ou bactérias que podem ser aeróbicos ou anaeróbicos, mesófilos ou termófilos<sup>10</sup>. As bactérias pertencentes às espécies *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Bacillus*, *Thermomonospora*, *Ruminococcus*, *Bacteriodes*, *Erwinia*, *Acetovibrio*, *Microbispora* e *Streptomyces*, produzem celulases (SUN e CHENG, 2002). Embora várias bactérias celulolíticas, especialmente anaeróbias (*Clostridium thermocellum* e *Bacteroides cellulosolvens*), produzem celulases de alta atividade específica, elas não produzem muitas enzimas. Além disso, as bactérias anaeróbias têm crescimento muito baixo e necessitam de condições anaeróbias para seu crescimento assim, as pesquisas para a produção industrial de enzimas têm-se focado sobre os fungos *Sclerotium rolfisii*, *P. chrysosporium* e as espécies *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Schizophyllum* e *Penicillium* (SUN e CHENG, 2002). Entre elas, a mais estudada é a *Trichoderma*, que produz pelo menos duas celobiohidrolases, cinco endoglucanases e três endoxilanases. Porém, a *Trichoderma* carece de  $\beta$ -glicosidase, pelo que é complementada com a *Aspergillus* (SARKAR, *et al.*, 2012). Lynd *et al.* (2002) oferecem uma descrição completa dos fundamentos biológicos e técnicos da aplicação das celulases na hidrólise da biomassa celulósica.

---

<sup>10</sup> Os microrganismos podem ser agrupados, de acordo com a faixa de temperatura para seu crescimento: Psicrófilos (0-25 °C), Mesófilos (20-45 °C), Termófilos (20-70 °C), Hipertermófilos (82-110 °C). Fonte: Escola de biologia da Universidade de Edimburgo <<http://www.biology.ed.ac.uk/archive/jdeacon/microbes/thermo.htm>>. Acesso em: 28 de novembro de 2013.

As celulases são uma mistura de enzimas, onde pelo menos três grupos principais estão envolvidos na hidrólise: (1) **Endoglicanases** (EG, *endo*-1,4- $\beta$ -D-glicanases, ou EC 3.2.1.4), que quebram aleatoriamente sítios internos e amorfos (ou de baixa cristalinidade) da cadeia polissacarídica da celulose, gerando oligossacarídeos de vários comprimentos e, portanto, novos extremos de cadeia. (2) **Exoglicanases** ou **celobiohidrolases** (CBHI, *exo*-1,4- $\beta$ -D-glicosidase, EC. 3.2.1.74 conhecidas como celudextrinases e as CBHII, *exo*-1,4- $\beta$ -D-glicanases, EC. 3.2.1.91), que atuam sobre as extremidades redutoras e não redutoras, da cadeia de polissacarídeos de celulose, liberando tanto glicose (CBHI) quanto celobiose (CBHII) como produtos principais. Estas enzimas sofrem inibição pelo seu produto de hidrólise (glicose e celobiose). (3)  **$\beta$ -glicosidases** (BG, celobiasas ou EC. 3.2.1.21), que hidrolisam as celudextrinas solúveis e a celobiose em glicose (LYND *et al.*, 2002), e também sofrem inibição pelo produto da hidrólise (FAN e LEE, 1983). A Figura 2.7 apresenta um esquema da hidrólise da celulose pela ação das celulases.

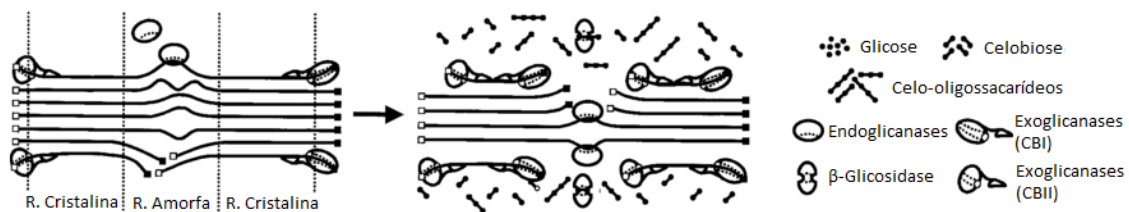


Figura 2.7. Representação esquemática da hidrólise da celulose pela ação das celulases. Os quadradinhos preenchidos representam os terminais redutores e os não preenchidos os terminais não redutores (Adaptado de LYND *et al.*, 2002)

É reportado que quando as celulases atuam coletivamente apresentam um rendimento maior que a soma de seus rendimentos individuais, este fenômeno é chamado sinergia (LYND *et al.*, 2002). Pelo menos três tipos de sinergia atuam durante a hidrólise: (1) **Sinergia endo-exo** entre as endoglicanases e exoglicanases. É a sinergia mais estudada e a mais importante na hidrólise da celulose cristalina (ZHANG e LYND, 2004). Aqui as endoglicanases atuam sobre a região amorfa para prover terminais redutores e não redutores para a ação das CBHI e CBHII, respectivamente (PEREIRA Jr. *et al.*, 2008). (2) **Sinergia exo-exo**. Onde as exoglicanases (CBHI e CBHII) atuam simultaneamente na hidrólise dos terminais redutores e não redutores liberados pelas endoglicanases. (3)

**Sinergia exo-BG.** Onde as  $\beta$ -glicosidases convertem a celobiose (e celodextrinas) liberada pelas exoglicanases em glicose (LYND *et al.*, 2002).

A hidrólise da celulose pelas celulasas é uma reação heterogênea que envolve mais etapas que uma cinética enzimática clássica (WALKER e WILSON, 1991; BANSAL *et al.*, 2009): (1) difusão das enzimas desde o seio do fluido à superfície do substrato sólido; (2) adsorção das celulasas e formação do complexo enzima-substrato; (3) hidrólise das ligações  $\beta$ -glicosídicas com deslizamento da enzima ao longo da cadeia celulósica; (4) transferência das celodextrinas, glicose e celobiose da superfície do substrato até o seio da fase aquosa; (5) hidrólise da celobiose à glicose pelas  $\beta$ -glicosidases. Estas etapas são influenciadas pelas características estruturais do substrato (que podem mudar ao longo da hidrólise), a natureza das celulasas utilizadas e a suscetibilidade das enzimas à inibição pelo produto (FAN e LEE, 1983; GAN *et al.*, 2003; BEZERRA e DIAS, 2004, 2005).

## 2.5 MODELAGEM MATEMÁTICA DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

A modelagem matemática da hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos é um tema desafiante na engenharia e este fato é refletido no grande número de modelos propostos (BANSAL *et al.*, 2009). Na hidrólise enzimática ocorrem reações de múltiplos estágios em um sistema heterogêneo onde a celulose insolúvel é inicialmente degradada na interface sólido-líquido pela ação sinérgica do conjunto de enzimas endoglicanases (EG) e exo-glicanases/celobiohidrolases (CBH's). A degradação inicial é acompanhada da hidrólise na fase líquida dos produtos intermediários solúveis (celobiose e cadeias curtas de oligossacarídeos) que são convertidos em glicose pelas  $\beta$ -glicosidases (BG) (ZHANG e LYND, 2004).

Em geral, a hidrólise depende das características das enzimas como: (1) adsorção da enzima no substrato, (2) inibição competitiva ou não competitiva pelo produto final, (3) sinergismo e (4) limitações da transferência de massa que afetam o transporte da enzima para o substrato. A hidrólise é também afetada pelas características do substrato como: (1) composição e distribuição dos componentes do substrato (lignina, hemicelulose, proteínas e gorduras), (2) tamanho de partícula e (3) a cristalinidade (BROWN *et al.*,

2010). Na Tabela 2.4 são resumidas as consequências de cada um dos fatores que afetam a hidrólise enzimática.

Tabela 2.4. Principais fatores que influenciam a hidrólise enzimática da celulose e suas consequências na hidrólise e na modelagem do processo  
(Adaptado de ANDERSEN, 2007)

Fatores que influenciam a hidrólise enzimática	Consequências				
	1	2	3	4	5
<i>Fatores relacionados ao substrato</i>					
Cristalinidade da celulose	X			X	
Grau de polimerização (GP)		X			
Disponibilidade/acessibilidade da área superficial	X	X	X	X	X
Organização estrutural (macro ou micro estrutura)			X	X	
Tamanho de partícula			X	X	
Porosidade			X	X	X
Presença de lignina e hemicelulose	X			X	X
<i>Fatores relacionados à enzima</i>					
Natureza do sistema enzimático empregado (EG, CBH's, BG)	X	X	X	X	X
Tamanho relativo da enzima				X	
Concentração da enzima	X	X	X	X	
Adsorção	X	X	X	X	X
Sinergismo	X	X		X	
Inibição do produto final				X	X
Desativação mecânica					X
Inativação térmica					X
Irreversibilidade da ligação à lignina				X	X

[1] Aumento aparente da cristalinidade do substrato durante toda a hidrólise.

[2] Diminuição do GP.

[3] Mudanças contínuas na acessibilidade de superfície, e topologia de superfície (corrosão de superfície).

[4] Mudanças contínuas na digestibilidade do substrato.

[5] Diminuição da concentração de enzima ativa.

EG: Endoglicanase; CBH's: Celobiohidrolase; BG:  $\beta$ -glicosidase.

A descrição dos mecanismos cinéticos da ação sinérgica de múltiplas enzimas sobre substratos lignocelulósicos heterogêneos é de fato um objetivo de pesquisa *per se*, onde um grande número de modelos cinéticos para hidrólise catalisada por enzimas têm sido reportados na literatura (GAN *et al.*, 2003; ZHANG e LYND, 2004; BANSAL *et al.*, 2009; SOUZA *et al.*, 2011). Apesar da complexidade destes modelos dinâmicos, a base fundamental é que: (1) a enzima deve estar em contato com o substrato para que a reação ocorra e (2) um intermediário enzima-substrato deve ser formado antes que o produto final seja liberado (ANDRÍC *et al.*, 2010).

Baseado no grau de detalhamento da descrição tanto das variáveis de estado do substrato, como das atividades das enzimas que atuam sobre ele, Zhang e Lynd (2004) classificaram os modelos como:

- **Modelos Não Mecanísticos:** Úteis na correlação de dados experimentais, mas pouco confiáveis em condições diferentes daquelas para as quais foram desenvolvidos, portanto apresentam uma utilidade limitada na avaliação e compreensão dos mecanismos da hidrólise.
  
- **Modelos Semimecanísticos:** Levam em consideração a adsorção da enzima no substrato. Podem ser semimecanísticos em relação ao substrato (a concentração é a única variável de estado do substrato) ou em relação à enzima (apenas uma atividade enzimática global é considerada). Estes modelos são usados no projeto de sistemas industriais, no entanto são limitados na compreensão dos efeitos das características estruturais do substrato (e.g., área superficial, cristalinidade, grau de polimerização, etc.) e múltiplas atividades das enzimas sobre a hidrólise.
  
- **Modelos Funcionais:** Incluem também um modelo de adsorção, utilizam variáveis adicionais à concentração para descrever o estado do substrato e podem considerar múltiplas atividades das enzimas. São úteis na compreensão dos fatores (associados às propriedades do substrato e às múltiplas atividades enzimáticas) que limitam a taxa de hidrólise. Estes modelos podem ser utilizados no projeto de biorreatores, mas fornecem pouca informação em relação ao projeto de celulasas no nível molecular.
  
- **Modelos Estruturais:** Baseados nas características estruturais dos componentes das celulasas e suas interações com os diferentes substratos. Estes modelos são úteis tanto para a modelagem molecular como para avaliar e desenvolver a compreensão da relação entre estrutura e função das celulasas. O desenvolvimento de modelos cinéticos significativos baseados em informações estruturais é ainda um grande desafio que espera por avanços para inferir a função da proteína a partir de sua estrutura (ZHANG e LYND, 2004).

As características e limitações principais de cada tipo de modelo são resumidas na Tabela 2.5.

Tabela 2.5. Classificação dos modelos matemáticos de hidrólise enzimática  
(Adaptado de ZHANG e LYND, 2004)

Tipo de modelo	Definição e características básicas	Utilidade	Limitações
Não mecanísticos	Não baseado em um modelo de adsorção	<ul style="list-style-type: none"> <li>Correlação de dados experimentais.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Pouca confiabilidade em condições diferentes das utilizadas para desenvolver a correlação.</li> <li>Não melhora a compreensão dos mecanismos da hidrólise.</li> </ul>
Semimecanísticos	Baseados em um modelo de adsorção. A concentração é a única variável de estado do substrato.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Correlação de dados experimentais.</li> <li>Projeto do biorreator.</li> <li>Identificação das características essenciais da hidrólise.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Entendimento ao nível das características do substrato e das múltiplas atividades enzimáticas.</li> </ul>
a) Em relação ao substrato b) Em relação à enzima	Uma atividade enzimática global.		
Funcionais	Inclui um modelo de adsorção, variáveis de estado adicionais à concentração para descrição do substrato e múltiplas atividades enzimáticas.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Avaliação e desenvolvimento da compreensão ao nível das características do substrato e das múltiplas atividades enzimáticas.</li> <li>Identificação dos fatores limitantes da taxa da hidrólise.</li> <li>Projeto do biorreator (potencialmente).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Modelagem em nível molecular.</li> <li>O estado do desenvolvimento dos modelos e os dados disponíveis limitam a aplicação ao projeto de reatores.</li> </ul>
Estruturais	Baseados na informação estrutural relativa aos componentes da celulose.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Modelagem em nível molecular.</li> <li>Avaliação e desenvolvimento da compreensão da relação estrutura/função.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Desafios no desenvolvimento de modelos cinéticos significativos baseados nas informações estruturais das enzimas.</li> </ul>

Além dos poucos modelos funcionais e estruturais referidos por Zhang e Lynd (2004) na sua revisão (SUGA *et al.*, 1975; OKAZAKI e MOO-YOUNG, 1978; CONVERSE e OPTEKAR, 1993; FENSKE *et al.*, 1999), recentemente um grupo de modelos estruturais e funcionais tem sido proposto para descrever a hidrólise enzimática da celulose incorporando múltiplas atividades enzimáticas e parâmetros mensuráveis e interpretáveis fisicamente como o grau de polimerização (GP) e a fração de enlaces

beta-glicosídicos acessíveis às celulases (Fa) (ZHANG e LYND, 2006). Alguns destes modelos utilizaram o balanço populacional para descrever a transformação de uma distribuição contínua de cadeias de celulose (GRIGGS *et al.*, 2011a; 2011b; HOSSEINI e SHAH, 2011a; 2011b); outros modelos incluíram as características superficiais da celulose e o comportamento individual das enzimas celulases descrevendo os polímeros da celulose como espécies individuais discretas, rastreando a concentração para cada comprimento de cadeia (LEVINE *et al.*, 2010) e modelando as mudanças da morfologia do substrato com o tempo, baseados em uma construção geométrica que considera o substrato como unidades estruturais (i.e. pequenos compartimentos acessíveis) que mudam durante a hidrólise (ZHOU *et al.*, 2009a; 2009b; 2010). Uma abordagem baseada na modelagem molecular estocástica foi também testada (KUMAR e MURTHY, 2013).

Embora os modelos funcionais e estruturais possam ajudar no profundo entendimento da hidrólise ao nível das características estruturais do substrato e as múltiplas atividades das enzimas, estes tipos de modelos fornecem pouca informação para aplicações práticas como o projeto e otimização de processos (ZHENG, 2007). Uma das revisões mais abrangente sobre os diferentes tipos modelos propostos, após da revisão de Zhang e Lynd (2004), foi publicada por Bansal *et al.* (2009).

### **2.5.1 Modelos semimecanísticos**

Um dos primeiros modelos para materiais lignocelulósicos, usando palha de arroz, foi proposto por Wald *et al.* (1984). O modelo considerou dois sistemas de substrato, incluindo uma esfera de celulose reduzível com uma cobertura amorfa (celulose facilmente degradável) e um núcleo cristalino (mais resistente à hidrólise), e múltipla atividade enzimática descrita pelas atividades em papel filtro (*Filter Paper Activity* - FPA<sup>11</sup>) das celulases e da atividade de celobiase (*Cellobiose Activity* - CBA). A desativação térmica e mecânica da enzima foi desprezada, enquanto a inibição competitiva tanto das celulases pela celobiase quanto da  $\beta$ -glicosidase pela glicose, e a adsorção das enzimas seguindo a isoterma de Langmuir, foram consideradas. Em

---

<sup>11</sup> As atividades FPA das celulases e CBA da  $\beta$ -glicosidase fornecem uma medida da capacidade das enzimas para hidrolisar substratos de origem celulósica como papel filtro por parte das celulases e soluções de cellobiose para a  $\beta$ -glicosidase. Os procedimentos para medir estas atividades encontram-se descritos na seção 3.3.



muitos dos primeiros trabalhos disponíveis na literatura, a adsorção não foi considerada dentro dos modelos e geralmente um modelo tipo Michaelis-Menten era usado para descrever a hidrólise da celulose. Porém esta abordagem só é aplicável quando a concentração do substrato não está perto da carga máxima (ZHENG, 2007).

Baseado em experimentos em reatores batelada e tubular, Gusakov *et al.* (1985a, 1985b) propuseram um modelo que leva em consideração a composição do complexo enzimático, a estrutura da celulose e a inibição pelos produtos da hidrólise segundo considerações muito parecidas às expostas acima por Wald *et al.* (1984). Neste modelo a hidrólise enzimática foi descrita usando o modelo de Michaelis-Menten e a inativação térmica e mecânica das enzimas foi desprezada, porém, a inativação das enzimas pela adsorção improdutiva sobre a superfície da celulose foi observada e apresentou um efeito pronunciado sobre a taxa da hidrólise. O modelo proposto conseguiu prever a acumulação de celobiose e glicose em um reator batelada até 70-80% da conversão da celulose em uma faixa de concentração entre 5-100 g/l de substrato e 5-60 g/l da enzima.

Usando celulose pura, Philippidis *et al.* (1993) desenvolveram um modelo cinético para simulação da hidrólise enzimática. Este modelo usou dados experimentais para estimar os parâmetros da enzima e conseguiu prever a cinética da hidrólise satisfatoriamente. Porém, a complexidade do substrato, a adsorção e inativação da enzima não foram consideradas no modelo. A concentração de glicose foi predita com boa acurácia, mas as concentrações de celobiose e celulose foram superestimadas e subestimadas, respectivamente, após de 24h de reação. Philippidis *et al.* (1993) destacaram que informações adicionais sobre as propriedades físico-químicas do substrato e a interação enzima-substrato eram necessárias antes de desenvolver expressões matemáticas mais acuradas e confiáveis para descrever a hidrólise enzimática da biomassa celulósica.

Recentemente, Kadam *et al.* (2004) desenvolveram e validaram um modelo cinético de hidrólise enzimática de palha de milho pré-tratada com ácido diluído que incorporou a adsorção de múltiplas enzimas através da isoterma de Langmuir, a inibição competitiva pelo produto final, a reatividade do substrato e os efeitos da temperatura, desprezando a inativação enzimática. Este modelo foi o primeiro a considerar a inibição das enzimas pela xilose, o principal açúcar da hidrólise das hemiceluloses. Além disso, Kadam *et al.*

(2004) consideraram a conversão direta da celulose para glicose e estudaram separadamente a atividade do complexo enzimático, dividindo as enzimas em celulasas (EG/CBH) e  $\beta$ -glicosidasases. No entanto, não foi feita a distinção entre celulose amorfa e cristalina no substrato. Embora o efeito da temperatura não esteja suficientemente bem representado, o modelo é útil para prever o comportamento da hidrólise em uma ampla faixa de condições experimentais, incluindo várias concentrações iniciais de açúcar, temperaturas e regimes de mistura, usadas para estimar os parâmetros do modelo; e tem o potencial de ser usado na otimização da hidrólise no processo de obtenção de etanol.

### 2.5.2 Modelo cinético de Kadam et al. (2004)

O modelo cinético utilizado neste trabalho para a modelagem matemática da hidrólise enzimática (ver Seção 3.6) é uma modificação do modelo de Kadam *et al.* (2004), que é suficientemente sofisticado para descrever a complexidade da hidrólise de materiais lignocelulósicos. O modelo de Kadam *et al.* (2004) tem sido verificado experimentalmente (ZHENG *et al.*, 2009a; HODGE *et al.*, 2009), analisado estatisticamente (SIN *et al.*, 2010), avaliado em aplicações de otimização, controle e configurações de processo (HODGE *et al.*, 2009; MORALES-RODRÍGUES *et al.*, 2010, 2011a, 2011b; MUTTURI e LIDÉN, 2013), usado no planejamento de experimentos (FLORES-SÁNCHEZ *et al.*, 2013), avaliado em escala de demonstração (PRUNESCU e SIN, 2013), usado na análise dos mecanismos de inibição pelo produto (TSAI *et al.*, 2014), e usado na modelagem da hidrólise enzimática do bagaço de cana (SAAD, 2010; CÂMARA, 2012). Este modelo está baseado na bioquímica da hidrólise enzimática e considera a adsorção da enzima, a inibição pelos produtos, a reatividade do substrato e a hidrólise das hemiceluloses a xilose; enquanto despreza os efeitos da inativação mecânica e térmica das enzimas. Alguns dos aspectos mais importantes deste modelo serão discutidos a seguir.

- **Adsorção da enzima:** A adsorção das enzimas sobre a superfície do substrato na hidrólise tem sido modelada usando expressões cinéticas (GUSAKOV *et al.*, 1985a, 1985b; GAN *et al.*, 2003; AL-ZUHAIR, 2008) ou isotermas de adsorção (WALD *et al.*, 1984; KADAM *et al.*, 2004; ZHENG *et al.*, 2009a). A maioria dos primeiros modelos cinéticos desenvolvidos era baseada no modelo de Michaelis-Menten.

Porém, este modelo é válido em um número limitado de casos onde o substrato está em excesso em relação à enzima (LYND *et al.*, 2002). Dado que só uma pequena fração de ligações  $\beta$ -glicosídicas é acessível ao ataque das enzimas, esta condição é particularmente limitante para substratos lignocelulósicos e pode ser obtida em trabalhos orientados (e.g. na caracterização da atividade específica nas condições do laboratório), mas raramente é atingida em aplicações relacionadas com a hidrólise da celulose (ZHANG e LYND, 2004). Embora outros modelos de adsorção diferentes do modelo de Langmuir têm sido propostos, poucos têm sido incorporados em modelos cinéticos para prever a taxa da hidrólise (ZHENG, 2007). Peitersen *et al.* (1977) foram os primeiros a sugerir que a relação entre proteína livre e adsorvida pode ser descrita pela isoterma de Langmuir. O modelo de Langmuir tem sido usado para descrever com sucesso a adsorção de sistemas heterogêneos, no entanto, as suposições do modelo de distribuição uniforme de sítios ativos de ligação na superfície do substrato e nenhuma interação entre as moléculas adsorventes podem não ser necessariamente válidas para a adsorção das celulasas na celulose (ZHANG e LYND, 2004). A isoterma de Langmuir assume que o equilíbrio da adsorção é atingido, ignorando que durante a hidrólise acontecem mudanças na estrutura e composição do substrato, conferindo características dinâmicas ao processo (LIAO *et al.*, 2008). Porém, a formulação de Langmuir permanece útil para descrever matematicamente o fenômeno da adsorção da enzima e por isso foi usada neste trabalho para descrever a adsorção das enzimas.

- **Inibição pelo produto:** A ação hidrolítica das enzimas é fortemente inibida pelos produtos solúveis, principalmente glicose e celobiose (ANDRIĆ *et al.*, 2010b). A celobiose tem sido observada ser o mais forte inibidor da hidrólise, enquanto a glicose apresenta um efeito inibitório significativo (GHOSE e DAS, 1971; FAN e LEE, 1983). Na maioria das vezes a inibição da xilose foi desprezível dada as pequenas concentrações achadas nos hidrolisados (ZHENG, 2007). Apesar disso, Kadam *et al.* (2004) consideraram a inibição da xilose sobre as celulasas e as  $\beta$ -glicosidases no desenvolvimento do seu modelo. Quing *et al.* (2010) e Ask *et al.* (2012) avaliaram recentemente o efeito da inibição da xilose e os xilo-oligômeros sobre a taxa da hidrólise. Os padrões de inibição pela glicose e celobiose tem sido objeto de pesquisa há muito tempo. Holtzaple *et al.* (1990), Zhang e Lynd (2004)

e Andrić *et al.* (2010b), apresentaram amplas revisões sobre a inibição das celulases de diferentes microrganismos pelos dois açúcares. Alguns trabalhos têm sugerido que a inibição competitiva é dominante (GHOSE e DAS, 1971; GREGG e SADDLER, 1996), outros concluíram que inibição não competitiva foi observada (HOLTZAPPLE *et al.*, 1984), enquanto uma combinação das duas inibições também já foi reportada (GUSAKOV e SINITSYN, 1992). A inibição da taxa de hidrólise pela glicose e celobiose tem sido considerada em muitos dos modelos propostos, sendo o mecanismo de inibição competitiva mais comum na literatura. Muitos estudos de inibição têm utilizado diferentes substratos celulósicos puros (e.g. Solca-Floc, Avicel, CMC e  $\alpha$ -celulose); logo, existem poucos dados sobre a inibição das celulases em substratos lignocelulósicos pré-tratados (KADAM *et al.*, 2004; O'DWYER *et al.*, 2007; ZHENG *et al.*, 2009a; ANDRIĆ *et al.*, 2010a) e ainda menos em condições de alta concentração de sólidos (KRISTENSEN *et al.*, 2009). Neste trabalho, a inibição competitiva foi adotada para representar a inibição da glicose, celobiose e xilose sobre as celulases e  $\beta$ -glicosidases.

- **Reatividade do substrato:** A reatividade do substrato é um conceito utilizado para representar as características estruturais do substrato como cristalinidade, grau de polimerização, acessibilidade, etc. Tem sido descrito na literatura que a taxa de hidrólise da região amorfa da celulose é 3-30 vezes maior do que a taxa de hidrólise da região cristalina (KLYOSOV, 1990; WEIMER *et al.*, 1991; GAMA *et al.*, 1994; LYND *et al.*, 2002). Desta forma foi proposto que as altas taxas iniciais da hidrólise são explicadas pela hidrólise preferencial das regiões amorfas facilmente degradáveis e que esta taxa decresce enquanto as regiões cristalinas mais recalcitrantes do substrato são atingidas (JACKSON *et al.*, 1993). Não entanto, diversos pesquisadores não observaram mudanças significativas na cristalinidade do substrato com o avanço da hidrólise ou obtiveram resultados ambíguos (OHMINE *et al.*, 1983; LENZ *et al.*, 1990; PULS e WOOD, 1991). A hipótese do substrato bifásico chegou a ser pouco confiável porque, na realidade, o substrato facilmente hidrolisável não está coberto ou bloqueado pelo substrato recalcitrante (WALD *et al.*, 1984; DESAI e CONVERSE, 1997). Assim, considerar mudanças na reatividade intrínseca do substrato pode ser mais prático do que assumir uma dicotomia entre regiões cristalinas e amorfas (KADAM *et al.*, 2004). Segundo o Zhang e Lynd (2004), não é fácil medir as características estruturais de substratos

lignocelulósicos baseados no conhecimento atual. Embora a celulose tenha duas diferentes morfologias, neste trabalho a celulose é assumida ser um substrato homogêneo cujas transformações são representadas em um parâmetro de digestibilidade relativa (LEE e FAN, 2003; KADAM, *et al.*, 2004), chamado reatividade do substrato ( $R_s$ ), utilizado pelo Kadam *et al.* (2004) no seu modelo e apresentado na Equação (2.1).

$$R_s = \alpha \frac{S}{S_0} \quad (2.1)$$

Nesta equação,  $R_s$  é a reatividade do substrato (adimensional),  $S$  é a concentração do substrato em qualquer tempo (g/kg),  $S_0$  é concentração inicial do substrato (g/kg) e  $\alpha$  é uma constante adimensional obtida experimentalmente. Kadam *et al.* (2004) determinaram a reatividade da palha de milho pré-tratada com ácido, enquanto Zheng *et al.* (2009a) determinaram a reatividade de uma espécie de centeio silvestre (*Leymus triticoides*); os valores obtidos para o parâmetro  $\alpha$  foram 0,97 e 1,007, respectivamente. Khodaverdi *et al.* (2012) prescindiram de usar a reatividade do substrato no ajuste do modelo de hidrólise de algodão pré-tratado. Recentemente, usando um modelo modificado de Kadam *et al.* (2004), Saad (2010) e Câmara (2012) modelaram a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor e peróxido de hidrogênio alcalino, respectivamente, e conseguiram descrever adequadamente os dados experimentais da hidrólise adotando o valor da unidade para o parâmetro  $\alpha$ ; este mesmo valor é adotado neste trabalho.

- **Inativação térmica e mecânica das enzimas:** A perda da atividade das enzimas durante a hidrólise pode ser explicada pelos efeitos da inativação térmica e mecânica e a adsorção não produtiva das enzimas no substrato (restos de celulose não hidrolisada e presença de lignina). As enzimas celulasas são suscetíveis à inativação quando são expostas à temperatura e tensões de cisalhamento do fluido na zona de reação. O grau de inativação pode variar de baixo a mais significativo com a exposição das enzimas a uma interface ar-líquido (KIM *et al.*, 1982). Mukataka *et al.* (1983) observaram que a inativação foi maior em sistemas com substrato comparado com aqueles livres de substrato. Ohlson *et al.* (1984) reportou

8% e 10% de perda da atividade da endoglicanase e glicosidase, respectivamente, trabalhando com celulase de *T. reesei* após uma semana de exposição das enzimas a esforços de cisalhamento em um meio agitado livre de substrato. Ganesh *et al.* (2000) observaram que a inatividade aumentou com o aumento na velocidade de agitação. Eriksson *et al.* (2002), Kristensen *et al.* (2007) e Zheng (2007) verificaram que a atividade da enzima diminuiu menos de 10% sob condições térmicas e de agitação mecânica após quatro dias. Baseado nestes dados, a inativação do complexo enzimático por efeitos térmicos e mecânicos foi desprezada neste trabalho

## 2.6 CONFIGURAÇÕES DE PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL

Na transformação da biomassa lignocelulósica em combustíveis ou produtos químicos, acontecem quatro eventos biologicamente assistidos nos processos que utilizam hidrólise enzimática, incluindo: (i) produção de celulases; (ii) hidrólise da celulose e outros polissacarídeos insolúveis; (iii) fermentação de produtos solúveis da hidrólise da celulose e (iv) fermentação de produtos solúveis da hidrólise da hemicelulose. Assim, quatro configurações de processo que consolidam estes eventos são concebidas (LYND *et al.*, 2002) e apresentadas na Figura 2.8.

- **Hidrólise e fermentação separada** (*Separate Hydrolysis and Fermentation - SHF*): É a mais antiga das configurações. A biomassa lignocelulósica é pré-tratada para a solubilização da hemicelulose e hidrólise, a celulose é hidrolisada enzimaticamente e fermentada em etapas separadas. Esta configuração apresenta baixa eficiência da hidrólise da celulose quando é separada da fermentação da glicose (PEREIRA Jr. *et al.*, 2008).
- **Sacarificação e fermentação simultânea** (*Simultaneous Saccharification and Fermentation - SSF*): Aqui a hidrólise enzimática e a fermentação são realizadas em uma única etapa. A hidrólise e fermentação da hemicelulose e a produção de celulases são realizadas em etapas separadas. A fermentação simultânea da glicose na etapa de hidrólise remove glicose do meio, impedindo a inibição pelo produto das enzimas hidrolíticas e incrementando a eficiência do processo. A maior

desvantagem desta configuração é que as condições ótimas de operação para a hidrólise e fermentação são geralmente diferentes, portanto os esforços estão centrados na produção de enzimas que consigam trabalhar perto das condições ótimas de operação (T e pH) da fermentação. A linha verde pontilhada na Figura 2.8 mostra a configuração SSF.

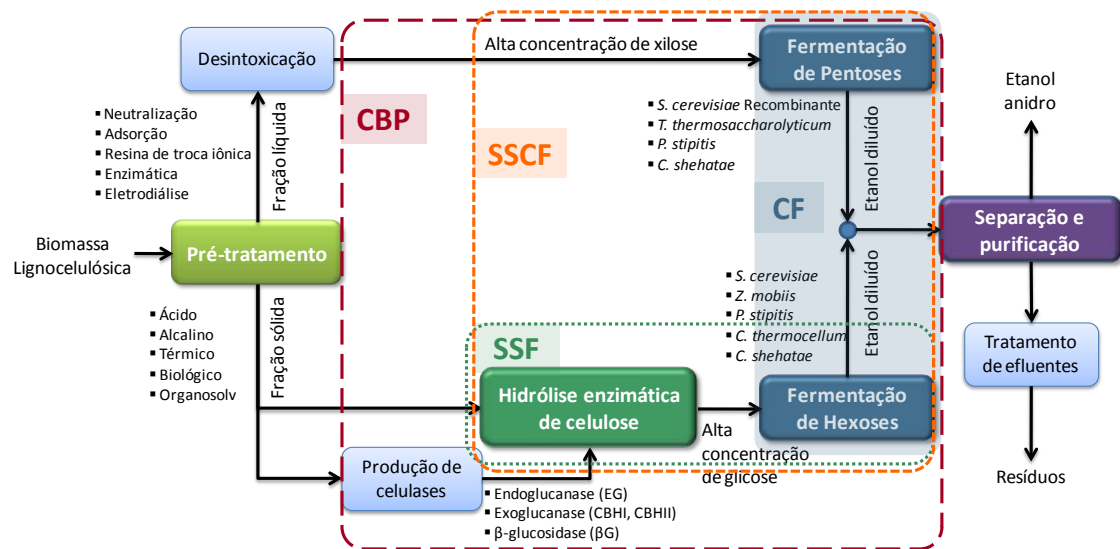


Figura 2.8. Esquema das configurações de processo para a produção de etanol. CF: Co-fermentação; SSF: Sacarificação e fermentação simultânea; SSCF: Sacarificação e co-fermentação simultânea; CBP: Bioprocesso consolidado

(Adaptado de CARDONA *et al.*, 2010)

- **Sacarificação e co-fermentação simultânea** (*Simultaneous Sacarification and Co-Fermentation* - SSCF): Esta configuração envolve três etapas. A hidrólise da hemicelulose no pré-tratamento e a produção das celulases ocorrem em etapas separadas. As pentoses obtidas da hidrólise da hemicelulose (principalmente xilose) são fermentadas junto com as hexoses (principalmente glicose) no mesmo reator, utilizando linhagens recombinantes de bactérias capazes de fermentar pentoses e hexoses. A maior vantagem desta configuração é o uso de um único reator para a produção de etanol. A linha tracejada (traço curto) de cor laranja na Figura 2.8 mostra a configuração SSCF.
- **Bioprocesso consolidado** (*Consolidated Bioprocessing* - CBP): O termo CBP foi proposto por Lynd em 1996, e é sinônimo do termo conversão microbiana direta (DMC) (LYND *et al.*, 2002). No CBP, a fermentação de pentoses e hexoses, a

hidrólise da celulose e a produção de celulasas ocorrem em um mesmo equipamento. A biologia molecular permite pensar hoje em um microorganismo tanto para a produção de enzimas hidrolíticas, quanto para a fermentação de pentoses e hexoses. Estudos mostram que a configuração SSF tem vantagens econômicas sobre a SHF, portanto a conclusão lógica desta tendência é a configuração CBP (LYND *et al.*, 2002). A linha tracejada (traço longo) vermelha na Figura 2.8, apresenta a configuração CBP.

## 2.7 HIDRÓLISE EM ALTA CONCENTRAÇÃO DE SÓLIDOS

Embora a hidrólise enzimática tenha vantagens sobre a conversão química de alto rendimento de açúcar, como o baixo consumo de energia, condições de operação brandas (pressão e temperaturas baixas), biorreatores de baixo custo e formação mínima de subprodutos (WALD *et al.*, 1984; SUN e CHENG, 2005), atualmente a principal limitação para a produção de etanol celulósico é o custo das enzimas (ZHENG, 2007). Para reduzir o custo do bioetanol, muitos esforços têm sido feitos em diferentes aspectos como: (1) melhoramento nas tecnologias de pré-tratamento, (2) modificação genética da parede celular das plantas, (3) melhoramento genético da atividade e produtividade das enzimas, (4) otimização das condições de operação da hidrólise e (5) aplicação de diferentes esquemas de produção como hidrólise e fermentação separadas (SHF), hidrólise e fermentação simultâneas (SSF), etc. Independente dos esforços, um dos custos chaves do processo global de bioconversão é dado pela hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica, cujo custo é uma das principais barreiras da comercialização do bioetanol (ZHENG, 2007).

A hidrólise enzimática em alta concentração de sólidos, definida por Hodge *et al.* (2009)<sup>12</sup> como uma reação onde não há distinção entre uma fase líquida e uma fase sólida, apresenta vantagens econômicas com respeito ao processo convencional em baixa concentração de sólidos, como: (1) menor custo de capital devido à redução do volume; (2) menor custo de operação devido à menor quantidade de energia para

---

<sup>12</sup> Hodge *et al.* (2009) determinaram experimentalmente que cargas de sólidos entre 12-15% representam o limite em que a palha de milho pré-tratada pode ser misturada efetivamente em tanques agitados. Porém, este limite deve ser estimado para cada substrato uma vez que pode variar dependendo das propriedades estruturais como grau de polimerização.



aquecer e resfriar; (3) menor custo na etapa de separação do produto devido às altas concentrações de produto, e (4) redução dos custos de eliminação e tratamento de resíduos devido ao baixo consumo de água (MOHAGHEGHI *et al.*, 1992).

O potencial econômico desse tipo de processo tem sido avaliado. Wingren *et al.* (2003) estimaram que aumentando a concentração de sólidos de 5% para 8% (m/m) em um processo SSF para a conversão de madeira de coníferas em etanol, os custos de operação foram reduzidos em 19%. Em um estudo de projeto e modelagem do *National Renewable Energy Laboratory* (NREL), considerando uma planta de produção de etanol com uma alimentação de 2 ton/dia de resíduos de milho pré-tratados com ácido diluído (30% sólidos) e hidrólise enzimática com 20% de sólidos totais (10-12% de sólidos insolúveis com 8-10% de sólidos solúveis), com subsequente fermentação de pentoses e hexoses (ADEN *et al.*, 2002), foi estimado que devido à redução nos custos de capital e energia, o preço mínimo de venda do etanol diminuiria em \$0,10/gal (\$0,03/l) quando a concentração total de sólidos na hidrólise enzimática aumentou de 20% para 30%.

Contudo, as suspensões com alto conteúdo de sólidos apresentam problemas de mistura (transferência de massa) e controle da temperatura (transferência de calor), associados ao aumento da viscosidade e as propriedades reológicas não newtonianas (PIMENOVA e HANLEY, 2003). Vários tipos de reatores têm sido propostos para tratar este problema, incluindo frascos agitados de fermentação (SPINDLER *et al.*, 1988; BALLESTEROS *et al.*, 2002; VARGA *et al.*, 2004), reator vertical de impulsor de pá (TENGBORG *et al.*, 2001) e um reator horizontal rotativo desenvolvido a partir de um moinho de bolas de laboratório (MOHAGHEGHI *et al.*, 1992). A sacarificação em alta concentração de sólidos insolúveis também introduz problemas relacionados com a efetividade da enzima, incluindo a inibição pelo açúcar (XIAO *et al.*, 2004) e a temperatura de reação (BOER e KOIVULA, 2003). Quando os níveis de sólidos aumentam, a inibição das enzimas pelos açúcares se torna mais importante devido à maior dificuldade da difusão dos açúcares desde o sítio catalítico, enquanto a capacidade da enzima para atingir os sítios da reação também é comprometida. O controle da temperatura é outra questão importante, porque a reação enzimática é altamente sensível à temperatura e os pontos quentes no interior do reator, como as superfícies de transferência de calor, podem alterar significativamente a reatividade das

enzimas (BOER e KOIVULA, 2003). A operação em batelada alimentada tem mostrado ser útil para superar esses problemas (HODGE *et al.*, 2009).

As motivações para operar em batelada alimentada podem ser agrupadas em três categorias principais: (1) o reuso da enzima (PRISTAVKA *et al.*, 2000); (2) a redução da inibição dos microrganismos da fermentação (e.g. *S. cerevisiae*) por alguns compostos presentes no hidrolisado (e.g. hidroximetilfurfural -HMF-, furfural, ácido acético) quando se usa SSF (SÖDERSTRÖM *et al.*, 2004; WINGREN *et al.*, 2004); e (3) a redução dos problemas de mistura no reator quando o nível de sólidos insolúveis é aumentado (MOHAGHEGHI *et al.*, 1992; BALLESTEROS *et al.*, 2002; VARGA *et al.*, 2004).

Embora alguns estudos de sacarificação em batelada têm sido conduzidos em altas concentrações de sólidos, iguais ou maiores do que 15% (MOHAGHEGHI *et al.*, 1992; DE BARI *et al.*, 2002; JØRGENSEN *et al.*, 2007), existem muitos estudos que provam as vantagens da adição gradual de substrato tanto para manter uma viscosidade baixa evitando os problemas associados com a operação em alta concentração de sólidos, como para aumentar a concentração e rendimento de glicose e etanol no processo usando diferentes esquemas de operação, incluindo: SHF (CHEN *et al.*, 2007; ZHENG *et al.*, 2009b; YANG *et al.*, 2010; GUPTA *et al.*, 2012; KUHAD *et al.*, 2012; YAN *et al.*, 2012; WANDERLEY *et al.*, 2013), SSF (FAN *et al.*, 2003; SÖDERSTRÖM *et al.*, 2004; VARGA *et al.*, 2004; TOMÁS-PEJÓ *et al.*, 2009; ZHAO *et al.*, 2013) e sacarificação e co-fermentação simultânea (SSCF) (ZHANG *et al.*, 2009). No entanto, outros autores não têm observado diferenças significativas sobre o rendimento do etanol em SSF usando batelada alimentada quando comparada com a tradicional operação em batelada (BALLESTEROS *et al.*, 2002; RUDOLF *et al.*, 2005; ROSGAARD *et al.*, 2007; HOYER *et al.*, 2010); isso tem sido explicado em parte, pela presença de inibidores das leveduras (RUDOLF *et al.*, 2005). A hidrólise em alta concentração de sólidos, além de melhorar a mistura no reator, aumenta a concentração de produto enquanto reduz o consumo de energia e água. Entretanto a operação com alta concentração de sólidos tem limites e para alguns substratos o rendimento do etanol diminui com o aumento na carga de sólidos, devido à inibição da adsorção das celulasas ao substrato. Porém, o mecanismo exato desta inibição ainda é desconhecido (KRISTENSEN *et al.*, 2009).

Várias estratégias têm sido descritas para a hidrólise enzimática de celulose em batelada alimentada, embora todas elas sejam mais baseadas em um enfoque *ad hoc* do que na aplicação de uma metodologia rigorosa para determinar a estratégia de alimentação (HODGE *et al.*, 2009). Baseados no modelo de Kadam *et al.* (2004), Hodge *et al.* (2009) desenvolveram um perfil de alimentação para manter constante a concentração de sólidos insolúveis em um reator de tanque agitado (STR) com concentrações de sólidos maiores do que 15% (m/m); usando um enfoque de malha aberta sem a necessidade de medições *on-line* de sólidos insolúveis e apenas usando as previsões do modelo, atingiram uma conversão de celulose de 80% e uma concentração de glicose maior que 130 g/l com uma carga de sólidos acumulados igual a 25% de sólidos iniciais equivalentes. Morales-Rodríguez *et al.* (2010), usando o modelo reajustado de Hodge *et al.* (2009), avaliaram três estratégias de controle *feedback*, conseguindo reduzir a quantidade de enzima usada em 107%, controlando tanto os sólidos insolúveis presentes no reator (15%) como a adição de enzima. Recentemente, Cavalcanti-Montañó *et al.* (2013), usando um modelo cinético não mecanístico tipo Michaelis-Menten, avaliaram três estratégias de alimentação de bagaço de cana ao reator aplicando a teoria clássica do controle ótimo para hidrólise enzimática. Concentrações finais de glicose próximas a 200 g/l foram atingidas operando em bateladas sucessivas com a adição simultânea de substrato e enzima (três adições de 2,2g de substrato e 0,39g de enzima) durante o tempo da reação.

O desenvolvimento de um modelo sofisticado para descrever a hidrólise enzimática de biomassa lignocelulósica em alta concentração de sólidos, com as vantagens e problemas que apresenta esta condição especial de operação, é uma etapa chave tanto para o projeto do biorreator quanto para a simulação, otimização e controle da operação. Além disso, os modelos podem contribuir na compreensão do processo de produção de etanol lignocelulósico e permitem desenvolver ferramentas para avaliações técnicas e econômicas que viabilizem a utilização da PCA na produção de etanol de segunda geração no Brasil.

## 3. MATERIAIS E MÉTODOS

O seguinte capítulo apresenta uma descrição dos materiais e métodos utilizados no desenvolvimento deste trabalho. Os experimentos foram realizados por colegas do Departamento de Engenharia Química (DEQ) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), no Laboratório de Desenvolvimento e Automação de Processos (LaDABio) sob a direção do professor Antonio J. G. Cruz. O complexo enzimático utilizado, as condições tanto do pré-tratamento hidrotérmico quanto das hidrólises enzimáticas, a metodologia de caracterização do material lignocelulósico e a determinação da atividade enzimática são descritas brevemente. Por fim, o modelo proposto e a metodologia computacional utilizada para a estimação dos parâmetros do modelo cinético são apresentados.

### 3.1 ENZIMA E SUBSTRATO

Nos experimentos de hidrólise foi utilizado o complexo enzimático Cellic<sup>®</sup> CTec2 da empresa Novozymes para América Latina (Araucária, PR). Segundo o fabricante, este complexo contém uma mistura de celulasas agressivas, alto nível de  $\beta$ -glicosidases e hemicelulasas. As condições ótimas de operação abrangem temperaturas entre 45-50°C e pH: 5,0 (NOVOZYME, 2010). A palha da cana-de-açúcar (PCA) utilizada neste trabalho foi fornecida pela usina Itapira (Catanduva, SP).

### 3.2 CARACTERIZAÇÃO DO MATERIAL LIGNOCELULÓSICO

Amostras de PCA, tanto *in natura* quanto pré-tratada hidrotermicamente, foram caracterizadas seguindo a metodologia analítica para determinação da composição química de bagaço, desenvolvida por Rocha *et al.* (1997) e validada por Gouveia *et al.* (2009). Os teores de celulose e hemicelulose são calculados a partir da determinação de carboidratos, ácidos orgânicos, furfural e HMF (hidroximetilfurfural) (GOUVEIA *et al.*, 2009). A Figura 3.1 apresenta o fluxograma desta metodologia.

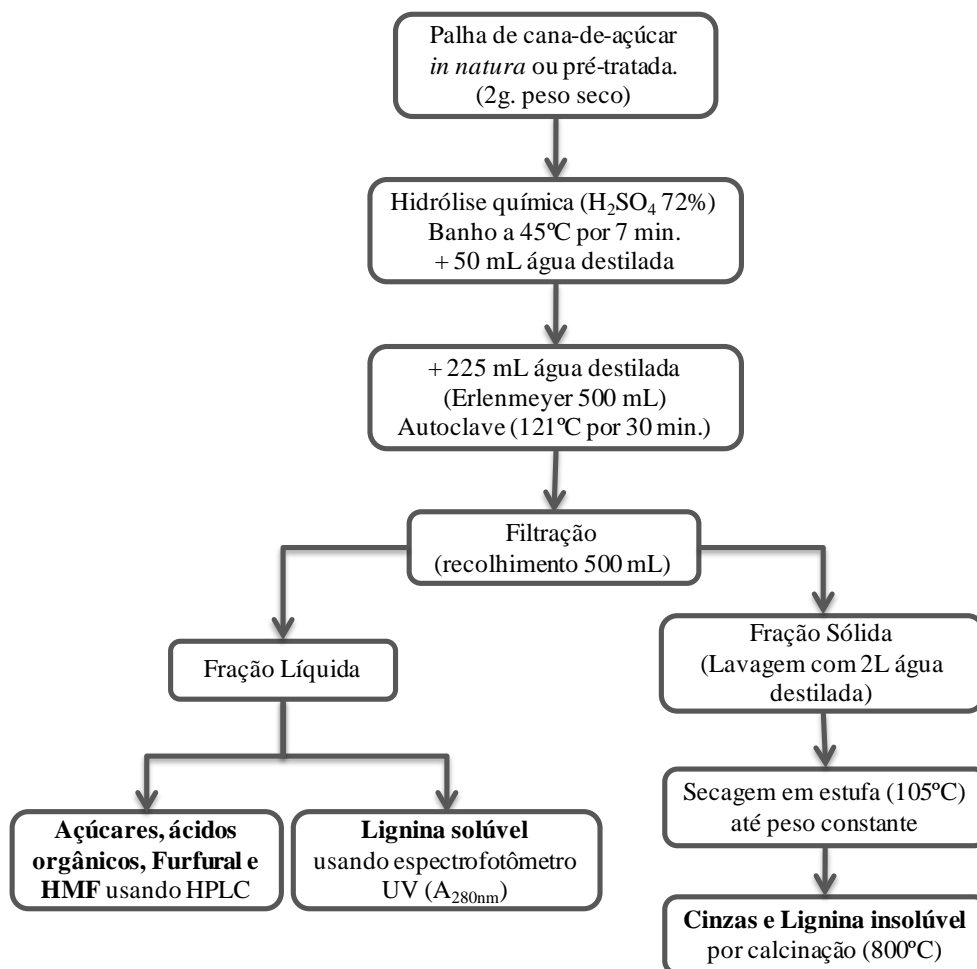


Figura 3.1. Fluxograma da metodologia de caracterização química da PCA, tanto *in natura* como pré-tratada

### 3.3 ATIVIDADES E TEOR DE PROTEÍNA DA ENZIMA

Antes dos experimentos de hidrólise, as atividades enzimáticas do complexo Cellic® CTec2 foram determinadas, incluindo a atividade em papel de filtro (FPA), a atividade em solução de celobiose. O teor de proteína presente na enzima também foi medido no laboratório, de acordo com as metodologias descritas a seguir.

#### 3.3.1 Atividade da celulase (FPA)

A atividade enzimática da celulase em papel filtro FPA (*Filter Paper Activity*) foi determinada pelo procedimento do NREL<sup>13</sup> (ADNEY e BAKER, 2008). Este ensaio é

<sup>13</sup> O NREL (*National Renewable Energy Laboratory*) é um laboratório nacional do departamento de energia dos EUA, pertencente ao escritório de eficiência energética e energias renováveis. <www.nrel.gov>.

baseado em um grau fixo de conversão do substrato, ou seja, uma quantidade fixa (2 mg) de glicose (medida pelo método dos açúcares redutores que utiliza ácido dinitro-3,5-salicílico, DNS) liberada a partir de 50 mg de papel filtro Whatman No 1 (i.e. as frações tanto cristalinas quanto amorfas do substrato são hidrolisadas) durante um tempo fixo (60 min). A atividade total da celulase é descrita em termos de "Unidades de Papel de Filtro" (FPU) por mililitro de solução original (sem diluição) de enzimas (ZHANG *et al.*, 2009b).

### **3.3.2 Atividade da celobiase**

A atividade da celobiase foi determinada segundo o procedimento recomendado pela IUPAC (GHOSE, 1987) a 50°C e pH de 4,8 (tampão citrato). O procedimento mede a atividade de enzimas celobiase em uma solução de celobiose 15 mmol/l, expressando tal atividade como CBU (*Cellobiose Units*) por volume de enzima. A glicose liberada após hidrólise da celobiose foi quantificada pelo método enzimático GOD-POP (TIETZ, 1976).

### **3.3.1 Determinação de proteínas**

A quantidade de proteína tanto na enzima como em solução, foi determinada pelo método colorimétrico de Bradford (1976). A análise consiste em misturar o corante Brilhante de Coomassie (*Coomassie Brilliant Blue G-250*) sob condições ácidas e medir a absorvância desta solução no comprimento de onda 595 nm em espectrofotômetro. Como padrão foi utilizado o padrão pronto de albumina de soro bovino fornecido pelo fabricante do *kit* (Thermo Scientific).

## **3.4 PRÉ-TRATAMENTO HIDROTÉRMICO**

A palha de cana *in natura* foi moída em um micro moinho de facas tipo Willye (SP Labor, SP-30 N° Série: 0033). Após a moenda, o material foi pré-tratado em um reator Parr (*Series 4532, Parr Instruments Company, Moline, IL, EUA*), seguindo as melhores condições de pré-tratamento descritas por Souza e Cruz (2013) para remover a maior quantidade de hemicelulose e lignina com menor perda de glicose. Assim, foi utilizada

uma relação palha seca e água de 1:10 (m/v) e temperatura de 195 °C por 10 minutos. Após o pré-tratamento, a fração sólida foi separada por filtração e lavada com água para a remoção dos componentes solúveis até atingir um pH de 7,0. A palha pré-tratada foi armazenada a -10°C.

### 3.5 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

A hidrólise enzimática de PCA pré-tratada foi conduzida em Erlenmeyer de 250 mL a temperatura de 50°C, pH de 4,8, agitação de 250 rpm e tempo de hidrólise de 72 horas. Foi utilizada uma condição de referência de carga de sólidos e enzima, para estimar os parâmetros do modelo cinético e condições de validação para avaliar as predições do modelo. As condições de carga utilizadas em cada caso são resumidas na Tabela 3.1.

Tabela 3.1. Condições experimentais para o desenvolvimento e validação do modelo cinético

Condições Experimentais	Experimentos					
	Condição de Referência*	Condições de validação				
		Carga de Enzima	Carga de Sólidos	Glicose inicial	Celobiose inicial	Xilose Inicial
Carga de enzima (FPU/g-celulose)	10	5, 15, 20, 25, 30, 60	10	10	10	10
Carga de sólidos (%m/v)	15	15	10, 20	15	15	15
Glicose inicial (g/l)	0	0	0	30, 60	0	0
Celobiose inicial (g/l)	0	0	0	0	10	0
Xilose inicial (g/l)	0	0	0	0	0	10

Temperatura, pH, velocidade de agitação e tempo de hidrólise em 50°C, 4,8, 250 rpm e 72 h. respectivamente.  
Tempo de amostragem= 0, 1, 2, 6, 12, 24, 48 e 72 horas.(Amostras adicionais no tempo 4, 8 e 96 h. foram consideradas na condição de referência)  
\* Usada para a estimação dos parâmetros cinéticos

A mistura da palha e o tampão citrato (50 mM, pH 4,8) foram incubados a 50°C no *shaker* por 30 min, até atingir o equilíbrio térmico antes da adição de enzima. Os experimentos foram feitos em duplicata. Controles para a enzima (sem substrato) e o substrato (sem enzima) foram considerados para quantificar as possíveis interferências pela presença de açúcares e proteínas na enzima e no substrato.

Durante a hidrólise amostras de 1 mL de cada frasco foram coletadas em tubos *Eppendorf* de 1,5 mL, nos tempos 1, 2, 6, 12, 24, 48 e 72 horas. Amostras adicionais (4,

8 e 96 h) foram coletadas para a condição de referência. Cada tubo foi centrifugado a 12000 rpm por 5 min e a enzima desativada pela adição de 1 mL de NaOH 3M. O sobrenadante foi armazenado a -4°C para subseqüentes medições de açúcares (glicose, celobiose e xilose) pela técnica de HPLC (coluna Biorad Aminex HPX-87H, T: 65°C, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5,0 mM como fase móvel e vazão de 0,6 ml/min). O teor de proteína em solução foi quantificado usando o método colorimétrico de Bradford (1976).

Os resultados dos ensaios de hidrólise foram analisados estatisticamente usando a Análise de Variância (ANOVA) de um fator, com um nível de significância de 95%, para determinar a significância das diferenças observadas no comportamento da hidrólise com as variações da carga de sólidos, de enzima e a concentração inicial de açúcar.

A conversão teórica de celulose ( $X_C$ ) e hemicelulose ( $X_H$ ) foi calculada a partir da concentração dos açúcares em solução através das Equações (3.1) e (3.2), em que  $G$ ,  $G_2$  e  $X$  são as concentrações dos açúcares em solução ( $G$ : glicose,  $G_2$ : celobiose e  $X$ : xilose). Os fatores 1,111 e 1,056 na Eq. (3.1) correspondem às constantes de conversão de uma unidade de glucano na celulose em glicose e celobiose respectivamente. Do mesmo modo na Eq.(3.2), o fator 1,136 é a constante de conversão de uma unidade de xilana na hemicelulose em xilose (CÂMARA, 2012).

$$X_C(\%) = \frac{\text{Celulose hidrolisada}}{\text{Celulose inicial}} \cdot 100 = \frac{G}{1,111} + \frac{G_2}{1,056} \cdot 100 \quad (3.1)$$

$$X_H(\%) = \frac{\text{Hemicelulose hidrolisada}}{\text{Hemicelulose inicial}} \cdot 100 = \frac{X}{1,136} \cdot 100 \quad (3.2)$$

### 3.6 DESENVOLVIMENTO DO MODELO

A Figura 3.2 apresenta um esquema simplificado da hidrólise enzimática de celulose em glicose baseado em três reações ( $r_1$ ,  $r_2$ ,  $r_3$ ). Baseados nos açúcares detectados nas



amostras do hidrolisado, uma reação a mais ( $r_4$ ) foi considerada para modelar a hidrólise da hemicelulose à xilose (CÂMARA, 2012; FLORES-SÁNCHEZ *et al.*, 2013; PRUNESCU e SIN, 2013). A proposta de Câmara (2012) foi adotada neste trabalho. Cada reação enzimática é potencialmente inibida pelos produtos da hidrólise (glicose, celobiose e xilose).

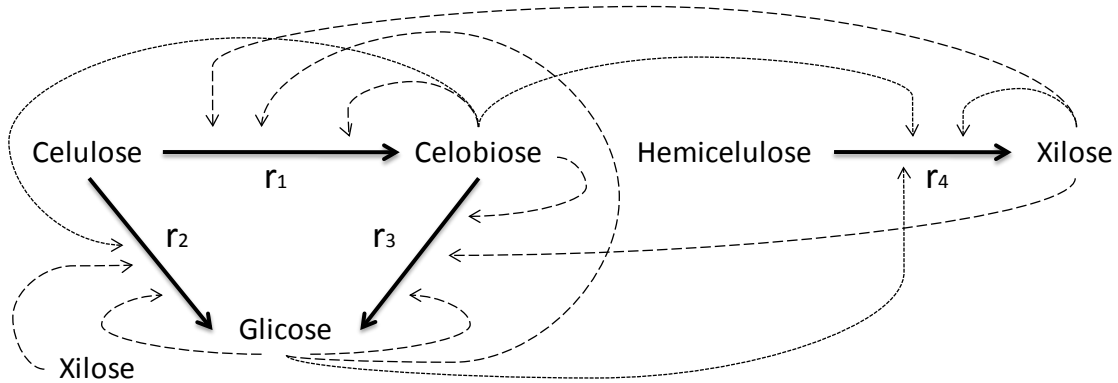


Figura 3.2. Mecanismo cinético para a modelagem da hidrólise da celulose.

$r_1$ : *endo*- $\beta$ -1,4-glucanase (EG) e *exo*- $\beta$ -1,4-celobiohidrolase (CBH);  $r_2$ : *exo*- $\beta$ -1,4-celobiohidrolase (CBH) e *exo*- $\beta$ -1,4-glicosidase;  $r_3$ :  $\beta$ -glicosidase ou celobiasas;  $r_4$ : *exo*- $\beta$ -1,4-xilanase. Tanto  $r_4$  como as inibições representadas pelas linhas pontilhadas correspondem às modificações propostas por Câmara (2012) (Adaptado de KADAM *et al.*, 2004)

As principais hipóteses assumidas para a formulação do modelo são listadas a seguir:

1. Embora existam diversas enzimas envolvidas na hidrólise da celulose e hemicelulose (*endo*- $\beta$ -glucanase, *exo*- $\beta$ -glucanase, *exo*- $\beta$ -glicosidase,  $\beta$ -glicosidase e *exo*- $\beta$ -xilanase), para efeitos práticos, o complexo enzimático utilizado foi modelado como uma pseudo-enzima possuindo diferentes atividades enzimáticas (i.e., as enzimas foram descritas por uma única variável).
2. A atividade enzimática total foi considerada proporcional à concentração de proteína na fase aquosa, i.e., a velocidade de reação pode ser correlacionada com a quantidade de enzima adsorvida (OOSHIMA *et al.*, 1990).
3. A adsorção da enzima segue a isoterma de Langmuir com as reações de primeira ordem ( $r_1$ ,  $r_2$  e  $r_4$ ) acontecendo na superfície do substrato.

4. A celulose é uniformemente suscetível ao ataque enzimático (i.e., nenhuma distinção é feita entre as frações amorfa e cristalina da celulose).
5. A estrutura do substrato é uniforme com relação à adsorção, i.e., celulose, hemicelulose e lignina estão igualmente distribuídas na fibra e variam pouco durante a hidrólise. Dado que a composição da superfície apresenta a mesma composição da biomassa, essa composição pode ser usada para calcular a concentração de enzimas adsorvidas na superfície do material (LIAO *et al.*, 2008).
6. A lignina influencia apenas na adsorção (i.e., quanto mais lignina houver no substrato, menos enzimas estarão adsorvidas na celulose) e a razão entre a lignina exposta às enzimas e a quantidade total de lignina contida no substrato é igual à unidade, ou seja, a celulose não bloqueia a adsorção das enzimas na lignina (OOSHIMA *et al.*, 1990).
7. A inativação térmica e mecânica da enzima é desprezível.
8. A conversão da celobiose em glicose ocorre por catálise homogênea em solução e segue a cinética de Michaelis-Menten.

Durante a hidrólise, primeiro as enzimas são adsorvidas sobre os componentes do substrato (celulose, hemicelulose e lignina) na superfície, a seguir as enzimas adsorvidas convertem celulose e hemicelulose em açúcares. A adsorção das enzimas é descrita pela isoterma de Langmuir e as taxas de reação por equações de velocidade baseadas no modo de inibição competitivo, considerando cada reação potencialmente inibida pelos produtos da hidrólise (glicose, celobiose e xilose) (KADAM *et al.*, 2004; LIAO *et al.*, 2008; ZHENG *et al.*, 2009a; CÂMARA, 2012). As equações que compõem o modelo são apresentadas na Tabela 3.2.

Tabela 3.2. Modelo cinético da hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica

Adsorção da enzima e equações de taxa	
Isoterma de Adsorção de Langmuir	$\frac{E_B}{S} = \frac{E_{\max} K_{ad} E_F}{1 + K_{ad} E_F} \quad (3.3)$
Enzima adsorvida na celulose (C)	$E_{BC} = E_B \frac{C}{S} \quad (3.4)$
Enzima adsorvida na hemicelulose (H)	$E_{BH} = E_B \frac{H}{S} \quad (3.5)$

Tabela 3.2. Modelo cinético da hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica  
(continuação)

Adsorção da enzima e equações de taxa (continuação)		
Conversão da celulose (C) em celobiose (G2) com inibição competitiva por glicose, celobiose e xilose	$r_1 = \frac{k_{1r} E_{BC} R_S S}{1 + \frac{G2}{K_{1G2}} + \frac{G}{K_{1IG}} + \frac{X}{K_{1IX}}}$	(3.6)
Conversão da celulose (C) em glicose (G) com inibição competitiva por glicose, celobiose e xilose	$r_2 = \frac{k_{2r} E_{BC} R_S S}{1 + \frac{G2}{K_{2IG2}} + \frac{G}{K_{2IG}} + \frac{X}{K_{2IX}}}$	(3.7)
Conversão da celobiose (G2) em glicose (G) com inibição competitiva por glicose e xilose	$r_3 = \frac{k_{3r} E_F G2}{K_{3M} \left( 1 + \frac{G}{K_{3IG}} + \frac{X}{K_{3IX}} \right) + G2}$	(3.8)
Conversão da hemicelulose (H) em xilose (X) com inibição competitiva por glicose, celobiose e xilose	$r_4 = \frac{k_{4r} E_{BH} R_S S}{1 + \frac{G2}{K_{4IG2}} + \frac{G}{K_{4IG}} + \frac{X}{K_{4IX}}}$	(3.9)
Balanços de massa		
Enzima total	$E_T = E_F + E_B$	(3.10)
Sólidos insolúveis (S)	$S = C + H + L$	(3.11)
Celulose	$\frac{dC}{dt} = -r_1 - r_2$	(3.12)
Celobiose*	$\frac{dG2}{dt} = 1,056r_1 - r_3$	(3.13)
Glicose*	$\frac{dG}{dt} = 1,111r_2 + 1,053r_3$	(3.14)
Hemicelulose	$\frac{dH}{dt} = -r_4$	(3.15)
Xilose*	$\frac{dX}{dt} = 1,136r_4$	(3.16)

\* 1,056 e 1,111 são às constantes de conversão de uma unidade de glucano na celulose em celobiose e glicose respectivamente. 1,053 é a constante de conversão de uma unidade de glucano na celobiose em glicose e 1,136 é a constante de conversão de uma unidade de xilana na hemicelulose em xilose.

Embora as unidades geralmente utilizadas para referir-se à carga de sólidos e à carga de enzima nos ensaios de hidrólise sejam respectivamente, %m/v e FPU/g-celulose, as concentrações de sólidos ( $S=C+H+L$ ) e de enzima ( $E_T, E_F, E_B, E_{BC}, E_{BH}$ ) são utilizadas no modelo em g/l. Partindo de uma carga de sólidos dada (em %m/v que é equivalente a g/100-ml), as concentrações de celulose e hemicelulose (em g/l) obtêm-se do produto entre a carga de sólidos e a fração de celulose ou hemicelulose presente na PCA em base seca (Equação 3.17). No caso da enzima, para converter a carga de enzima (FPU/g-celulose) em concentração de enzima (em g/l), multiplica-se a carga de enzima (em FPU/g-celulose) por a massa de celulose ou hemicelulose (em g) e pelo teor de proteína da enzima (em mg-proteína/ml-enzima) e se divide no produto entre a atividade FPA da enzima (em FPU/ml-enzima) e o volume total de reação (em ml), de acordo com a Equação 3.18.

$$C \text{ ou } H \text{ (g/l)} = \frac{\text{Carga sól. (g-PCA/ml)} * \text{Volume (ml)} * \text{Fração mássica de C ou H (g/g-PCA)}}{\text{Volume (l)}} \quad (3.17)$$

$$\text{Enzima (mg/ml=g/l)} = \frac{\text{Carga enz. (FPU/g-C)} * \text{Massa C (g)} * \text{Proteína enz. (mg-prot./ml-enz.)}}{\text{FPA (FPU/ml-enz.)} * \text{Volume total (ml)}} \quad (3.18)$$

### 3.7 METODOLOGIA COMPUTACIONAL

O *software* EMSO<sup>14</sup> (SOARES e SECCHI, 2003) foi utilizado para simular e estimar os parâmetros do modelo cinético. A função dos mínimos quadrados ponderados (*Weighted Least Squares*, WLS)<sup>15</sup>, foi minimizada usando o *solver* COMPLEX que usa o método de otimização dos poliedros flexíveis<sup>16</sup>. A Equação (3.19) descreve a métrica dos WLS como a soma do erro quadrático entre as variáveis dependentes experimentais ( $y_i^e$ ) e as predições do modelo ( $y_i^m$ ), ponderada pelo quadrado do inverso da média do desvio padrão ( $\bar{S}_i$ ) para cada variável ao longo de todos os experimentos ( $NE$ ).

$$F_{OBJ} = \sum_{i=1}^{NE} \frac{(y_i^e - y_i^m)^2}{\bar{S}_i^2} \quad (3.19)$$

<sup>14</sup> EMSO: *Environment for Modeling Simulation and Optimization*

<sup>15</sup> A regressão por WLS assume que os erros experimentais têm variância constante (i.e. homoscedasticidade do erro).

<sup>16</sup> <http://www.enq.ufrgs.br/enqlib/numeric/>

### **3.7.1 Estimação dos parâmetros cinéticos**

Os parâmetros da isoterma de Langmuir foram estimados separadamente com os dados dos experimentos da hidrólise de PCA pré-tratada para diferentes cargas de enzima, e foram utilizados no modelo cinético como dados de entrada. Os parâmetros cinéticos foram estimados para a condição de referência da Tabela 3.1.

### **3.7.2 Validação do modelo**

Os experimentos de validação foram conduzidos sob condições diferentes das condições de estimação dos parâmetros com diferentes cargas de sólidos (10% e 20%), diferentes cargas de enzima (5-60 FPU/g-celulose) e diferentes concentrações iniciais de açúcares, incluindo glicose (30 e 60 g/l), celobiose (10 g/l) e xilose (10 g/l), para avaliar a capacidade do modelo para descrever a inibição pelos produtos. Estes açúcares foram adicionados antes da adição da enzima nos experimentos. Os outros procedimentos e condições empregadas foram iguais aos descritos na Seção 3.5 e na Tabela 3.1.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da hidrólise enzimática da PCA em alta concentração de sólidos são apresentados neste capítulo. Inicialmente uma discussão dos resultados do pré-tratamento, dos efeitos avaliados (carga de sólidos, de enzima e da inibição pelos açúcares) e da adsorção da enzima, é apresentada. A seguir são apresentados os resultados e discussão da estimação dos parâmetros cinéticos e da validação do modelo cinético proposto.

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO E PRÉ-TRATAMENTO

A palha de cana foi caracterizada de acordo com a metodologia desenvolvida por Rocha *et al.* (1997), validada por Gouveia *et al.* (2009) e descrita na Seção 3.2. As condições do pré-tratamento utilizadas foram as do trabalho recente de Souza e Cruz (2013), em que os autores observaram a maior remoção de hemicelulose e lignina na palha usando temperatura de 195°C durante 10 minutos com uma relação sólido-líquido de 1:10 m/v. Os resultados da composição química da palha tanto *in natura* como depois do pré-tratamento são resumidos na Tabela 4.1.

Tabela 4.1. Caracterização da palha antes e depois do pré-tratamento hidrotérmico

Componente	Composição (% base seca)			Remoção (%)
	PCA <i>in natura</i>	PCA pré-tratada	PCA pré-tratada (corrigida*)	
Celulose	38,8	65,97	32,9	15,09
Hemicelulose	31,6	8,3	4,1	86,88
Lignina solúvel	2,6	0,03	0,01	99,42
Lignina insolúvel	17,6	25,2	12,6	28,50
Cinzas	2,5	1,8	0,9	64,04
Extrativos	6,2			
Rendimento		49,94%		

\* Composição corrigida = Composição após pré-tratamento (base 100%) x Rendimento.

A composição da palha *in natura* apresenta valores semelhantes aos referidos na literatura para palha e que foram apresentados na Tabela 2.2. A hemicelulose removida com o pré-tratamento hidrotérmico (86,9%) é comparável com o nível de remoção de hemicelulose reportado por Garrote *et al.* (1999), para palha de milho (87,3%) e por Laser *et al.* (2002), para bagaço de cana (89%) a 200°C por 10 min. A despolimerização da hemicelulose facilita a ação das enzimas celulases durante a subsequente etapa de hidrólise, uma vez que essa estrutura forma uma barreira física ao redor da celulose dificultando o acesso das enzimas. A remoção da celulose (15%) contrasta com os resultados para bagaço de cana de Laser *et al.* (2002), que observaram uma solubilização da celulose de 8%, e os resultados de Walsum *et al.* (1996), que reportaram 5% de remoção de celulose e remoção total de hemicelulose a 230°C por 2 min. Também Fontana *et al.* (1995) e Saska e Ozer (1995) estimaram a solubilização de celulose menor do que 5% trabalhando a 185°C e 170°C, respectivamente.

Em meio aquoso, a lignina pode sofrer tanto degradação como re-polimerização e a fração de lignina solubilizada depende das condições operacionais (GARROTE *et al.*, 1999). Biermann *et al.* (1994) conseguiram remover até 60% da lignina de uma mistura de madeiras duras (*hardwood*) usando explosão de vapor, porém uma fração significativa de celulose foi removida (até 20%). Usando pré-tratamento aquoso, Saska e Ozer (1995) trabalhando a 180°C, e Walsum *et al.* (1996) operando a 230°C por 2 min, removeram respectivamente 39,4% e 38% da lignina presente no bagaço de cana, resultados próximos à remoção de lignina total (37,6%) atingida por Souza e Cruz (2013). Rendimentos semelhantes ao observado na Tabela 4.1 para palha de cana foram referidos para bagaço de cana por Walsum *et al.* (1996), (59%) e Allen *et al.* (1996) (<50% operando a 195°C e 65 min), usando o mesmo pré-tratamento.

Outros pré-tratamentos têm sido aplicados recentemente à palha de cana-de-açúcar. Moriya (2007) com um pré-tratamento Acetosolv (catalisado por HCL 0,4%, 3h) obteve a solubilização de 20% da celulose, 77% da hemicelulose e 70% da lignina. Silva (2009) usando ácido diluído (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1% m/m, 120°C, 10 min), solubilizou 30% da celulose, 89% da hemicelulose e 78% da lignina presente no material. Oliveira (2010) usando explosão a vapor (200°C, 15 min) observou uma remoção de celulose e hemicelulose de 30% e 93% respectivamente, com um rendimento de 56%. Remoções acima de 22% para celulose, entre 78-95% para hemicelulose e de 46% para lignina,

foram reportadas neste mesmo trabalho usando ácido diluído ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 1% m/m, 180-195°C, 10min) com rendimentos entre 38-54%. Bayona (2012) otimizou as condições de dois tipos de pré-tratamento baseados na produção de glicose. O pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino nas condições ótimas ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , 6% v/v, 60°C, 1h) apresentou um rendimento de 46% e uma remoção de celulose, hemicelulose e lignina de 3,3%, 83% e 72%, respectivamente. Enquanto para o pré-tratamento com hidróxido de cálcio ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , 90°C, 53h), o rendimento foi de 74% com remoção de 39,3% de lignina e baixa remoção de celulose (2,9%) e hemicelulose (8,3%).

O pré-tratamento hidrotérmico nas condições referidas por Souza e Cruz (2013) destaca-se pela alta remoção de hemicelulose (87%), comparável com a remoção de pré-tratamentos químicos (e.g., ácido diluído), enquanto apresenta menores perdas de celulose (15%) com respeito a esses mesmos pré-tratamentos. A remoção de lignina (38%) é comparável à remoção reportada na literatura para bagaço de cana usando pré-tratamento hidrotérmico, que apresenta a vantagem de ser ambientalmente amigáveis, uma vez que não requerem químicos, reduzindo tanto a poluição quanto os custos de tratamento de efluentes (e.g., neutralização) em etapas adicionais do processo.

#### 4.2 ATIVIDADES E TEOR DE PROTEÍNA DA ENZIMA

As principais atividades do complexo enzimático, atividade em papel filtro (FPA) e atividade em celobiose, assim como a quantidade de proteína presente na enzima, foram determinadas usando os métodos descritos na Seção 3.3. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2. Principais atividades enzimáticas e quantidade de proteína do complexo enzimático Cellic<sup>®</sup> CTec2

Medição	Unidades	Valor
Atividade em papel filtro	FPU/ml-enzima	203
Atividade em celobiose	CBU/ml-enzima	6317
Teor de proteína	g-proteína/l-enzima	36



### 4.3 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

Os ensaios de hidrólise foram realizados pelos colegas do LaDABio seguindo a metodologia descrita na Seção 3.5 e o arranjo experimental da Tabela 3.1. O conjunto de experimentos permite avaliar o efeito da carga de sólidos, o efeito da carga de enzima e o efeito da inibição de açúcares sobre a hidrólise enzimática da PCA pré-tratada, além de fornecer os dados experimentais para a modelagem e validação do modelo cinético da hidrólise. As possíveis interferências pela presença de açúcares tanto no substrato como na enzima (ZHANG *et al.*, 2007) foram eliminadas, subtraindo as concentrações de açúcar (glicose, celobiose e xilose) medidas a partir das hidrólises de controle sem enzima (controle do substrato) e sem substrato (controle da enzima). A possível superestimação nos valores da glicose pela formação de ácido glucônico pelas enzimas oxidantes presentes na Cellic<sup>®</sup> CTec2 é reduzida na operação SHF a 50°C (CANELLA *et al.*, 2012).

#### 4.3.1 Efeito da carga de sólidos

Três diferentes cargas de PCA pré-tratada 10, 15 e 20% (m/v) foram avaliadas. Para todas as hidrólises, a carga de enzima foi de 10 FPU/g-celulose, e o tempo de reação foi de 72 h, com tempos de amostragem de 1, 2, 6, 12, 24, 48 e 72 h. O efeito da carga de sólidos sobre a produção de glicose, celobiose e xilose são apresentados nas Figuras 4.1-4.4.

As Figuras 4.1-4.3 mostram que quanto maior foi a carga de sólidos, maior foi a produção de açúcares (glicose, celobiose e xilose) no tempo final da hidrólise, o que era esperado, uma vez que quanto maior for a carga de substrato, maior é o potencial para obtenção de açúcares. Maior carga de sólidos também representou menores taxas de conversão iniciais para a carga de sólidos de 20%; esta tendência não foi mantida para a carga de 10%. No caso da produção de xilose, todas as cargas exibiram taxas de hidrólise inicial semelhantes.

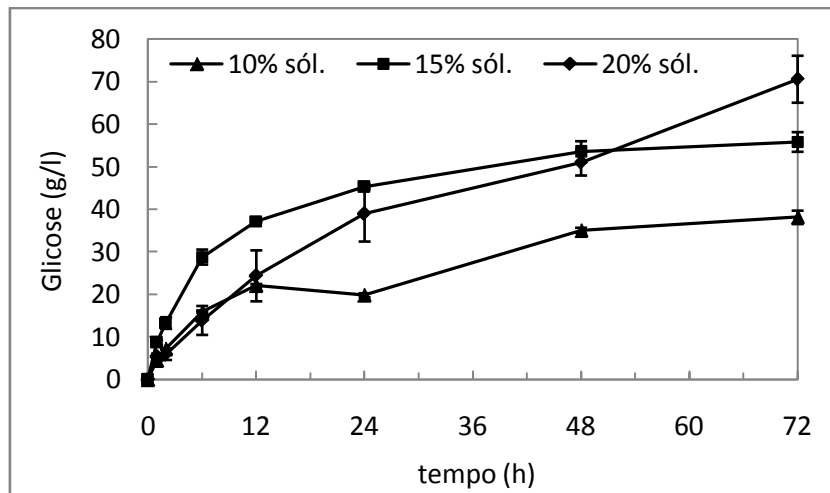


Figura 4.1. Efeito da carga de sólidos sobre a concentração de glicose

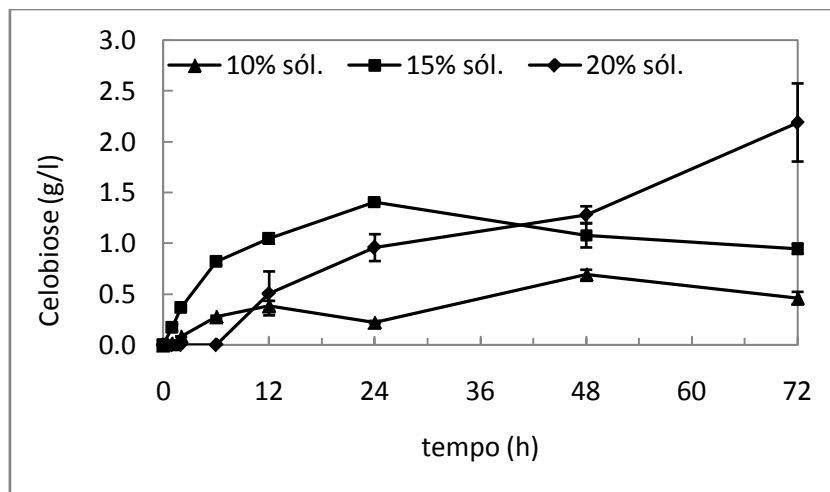


Figura 4.2. Efeito da carga de sólidos sobre a concentração de celbiose

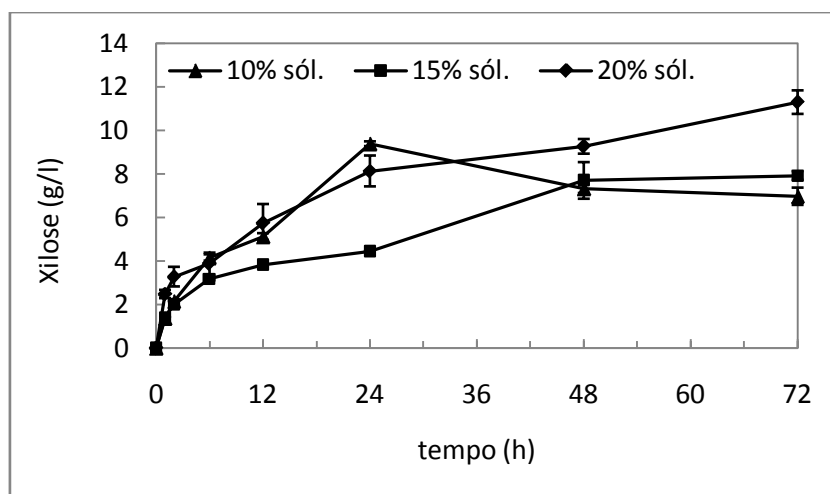


Figura 4.3. Efeito da carga de sólidos sobre a concentração de xilose

Uma análise de séries de dados por pares (Tabela 4.3) usando ANOVA mostrou que a diferença de carga de sólidos entre 10% e 15% explica as diferenças significativas na produção de glicose destas cargas. No entanto, para as cargas de 15% e 20%, diferenças não significativas na produção de glicose foram observadas a partir das 12 horas de hidrólise ( $F < F_{crítico}$ ). Estes resultados indicam que cargas maiores que 15% de sólidos não representam um aumento significativo na produção de glicose no caso da PCA nas condições avaliadas. Embora a hidrólise em alta carga de sólidos seja mais econômica e desejável que a operação em baixa carga de sólidos, essa apresenta uma série de problemas discutidos previamente na Seção 2.7.

Tabela 4.3. Valores da estatística  $F$  da ANOVA aplicada ao efeito da carga de sólidos sobre a produção de glicose

tempo (h)	Carga de sólidos	
	10% & 15%	15% & 20%
1	89,89	24,31
2	39,53	33,02
6	102,94	30,20
12	2680,51	9,16
24	2226,16	1,96
48	100,61	0,80
72	80,36	12,15
$F_{crítico}$	18,51	

A Figura 4.4 mostra o efeito da carga de sólidos sobre a conversão de celulose, também chamada de digestibilidade enzimática por Zheng (2007). Geralmente é esperado obter a maior conversão com a menor carga de sólidos para uma quantidade fixa de enzima. Neste caso, a Figura 4.4 mostra que o incremento na carga de sólidos de 10% para 15% e 20% não resultou em um decréscimo da digestibilidade (51,4%) no tempo final de reação, sugerindo que a carga de enzima utilizada de 10FPU/g-celulose é apropriada para a hidrólise de PCA em alta concentração de sólidos. Porém, as taxas iniciais foram significativamente menores para a carga de 20% de sólidos.

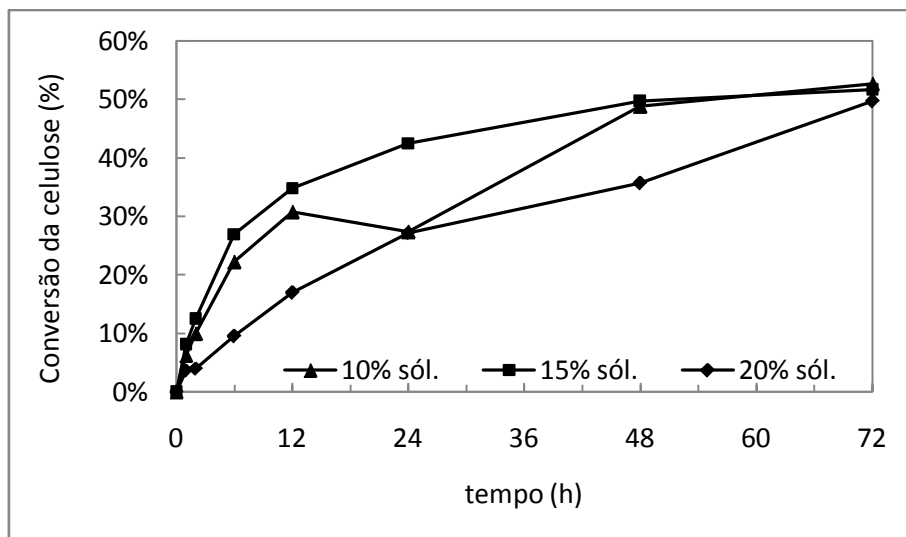


Figura 4.4. Efeito da carga de sólidos sobre a conversão de celulose

#### 4.3.2 Efeito da carga de enzima

Para avaliar o efeito da carga enzimática sobre a hidrólise da PCA, sete diferentes cargas da enzima Cellic<sup>®</sup> CTec2 (5, 10, 15, 20, 25, 30 e 60 FPU/g-celulose) foram avaliadas. A carga de substrato utilizada para os ensaios foi de 15% (m/v) e o tempo total de reação foi de 72 h, com tempos de amostragem de 1, 2, 6, 12, 24, 48 e 72 h. Os resultados com respeito à produção de açúcares são apresentados nas Figuras 4.5-4.8.

Em termos gerais, uma rápida taxa de hidrólise é observada para todas as cargas de enzima, durante as primeiras 24 horas, seguida por uma etapa de hidrólise mais lenta. A produção de glicose parece convergir no tempo final para uma média de 68 g/l com cargas de enzima maiores de 10 FPU/g-celulose. Os valores da estatística  $F$  da ANOVA apresentados na Tabela 4.4, revelam que no final da reação a produção de glicose não é influenciada pelas cargas de enzima entre 10-60 FPU/g-celulose ( $F=3,80 < F_{crítico}=4,39$ ). Para cargas maiores de 15 FPU/g-celulose, a produção de glicose deixa de ser afetada pela quantidade de enzima utilizada a partir das 24 h de hidrólise. Esta análise pode ser estendida para a conversão da celulose na Figura 4.8, toda vez que a conversão teórica de celulose é calculada a partir da concentração de glicose no hidrolisado, mostrando que a adição de enzima acima de 10 FPU/g-celulose não é efetiva para a hidrólise de celulose. Isso pode ser explicado pela saturação tanto específica como não específica dos sítios ativos de ligação (e.g. sítios na lignina) disponíveis no substrato para a enzima (ZHENG, 2007).

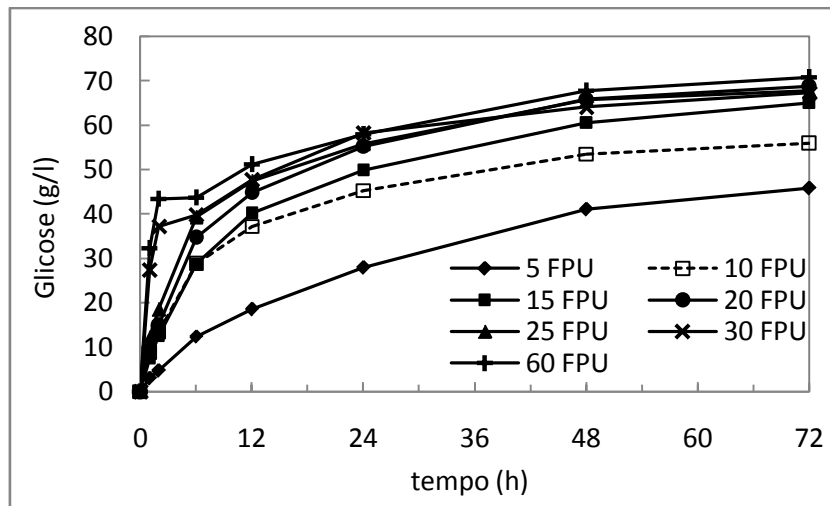


Figura 4.5. Efeito da carga enzimática sobre a concentração de glicose

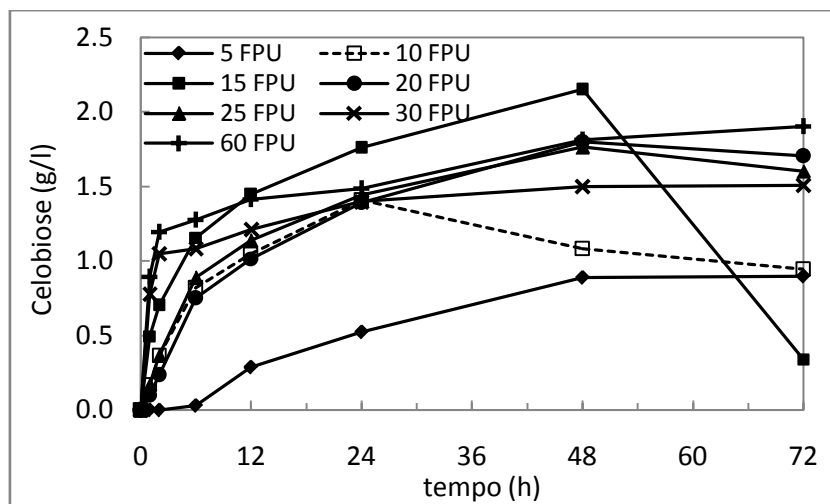


Figura 4.6. Efeito da carga enzimática sobre a concentração de celobiose

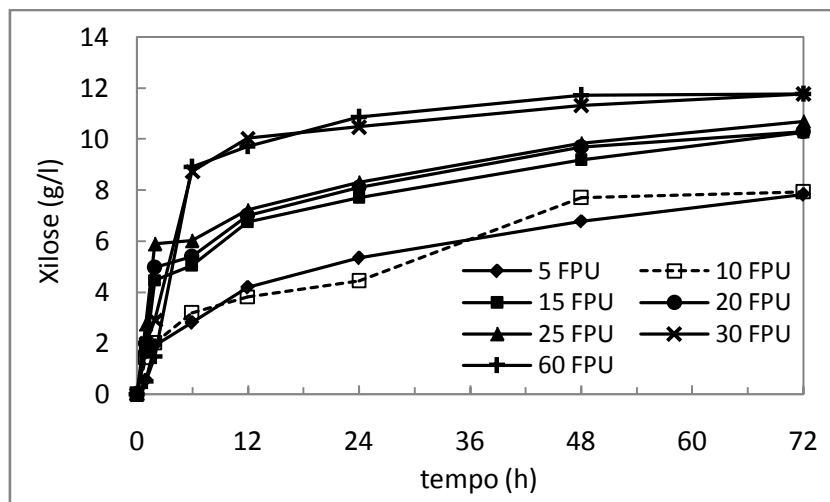


Figura 4.7. Efeito da carga enzimática sobre a concentração de xilose

Os resultados da Tabela 4.4 também sugerem que a glicose obtida com uma carga de 5FPU/g-celulose, é significativamente diferente do nível de glicose produzida pelas outras cargas de enzima durante o tempo de reação.

Tabela 4.4. Valores da estatística  $F$  da ANOVA para o efeito da carga de enzimas sobre a produção de glicose

tempo (h)	Carga de enzima		
	5-60 FPU	10-60 FPU	15-60 FPU
1	23,20	18,96	17,54
2	52,13	40,50	37,91
6	121,33	38,69	37,63
12	59,87	12,99	6,72
24	20,58	4,45	1,63
48	43,41	12,52	3,79
72	12,74	3,80	0,55
$F_{\text{crítico}}$	3,87	4,39	5,19

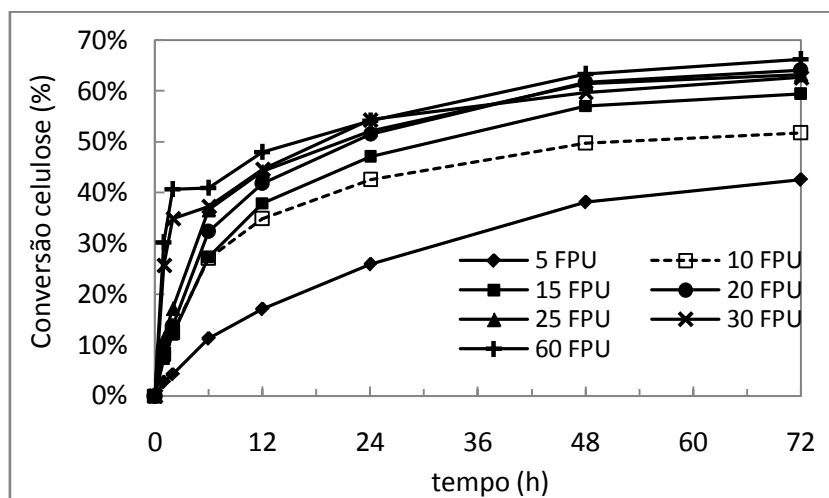


Figura 4.8. Efeito da carga de enzima sobre a conversão de celulose

O grau de hidrólise da celulose depende da razão das enzimas celulasas e  $\beta$ -glicosidase (ZHENG, 2007). Assim, uma complementação de  $\beta$ -glicosidase é usada na maioria dos experimentos de hidrólise para aumentar a atividade de celobiase tanto para garantir a conversão do substrato como para evitar a forte inibição pela celobiose (FAN e LEE, 1983). Para isso, relações entre 1FPU:1CBU (GARCIA, 2009; ZHENG, 2009) até 1FPU:2CBU (KHODAVERDI *et al.*, 2011; CÂMARA, 2012) têm sido usadas. Apesar da alta atividade estimada para a enzima (6317 CBU/ml), a presença de celobiose no

hidrolisado na Figura 4.6 revela uma baixa atividade de celobiase do complexo enzimático, que não foi complementado nos experimentos. No entanto, existe um limite na adição de  $\beta$ -glicosidase, acima do qual a concentração de glicose não é aumentada (ZHENG, 2007). A inibição pelos produtos da hidrólise como a glicose, a possível presença do ácido glucônico no caso da Cellic<sup>®</sup> CTec2 (CANELLA *et al.*, 2012), a adsorção improdutiva da  $\beta$ -glicosidase na lignina presente na PCA, somados a outros fatores como a desativação térmica e mecânica, poderiam explicar esta inibição.

Além da formação de glicose e celbiose, a Figura 4.7 mostra que houve formação de xilose durante a hidrólise da hemicelulose presente na palha. Trabalhos com bagaço de cana pré-tratada com peróxido de hidrogênio alcalino (GARCIA, 2009; CÂMARA, 2012) também têm observado a produção de xilose e isso ocorre porque as hemicelulases podem ser produzidas pelos mesmos microrganismos que produzem celulases (TENKANEN *et al.*, 1992), fazendo com que celulases ou complexos comerciais apresentem atividades xilanolíticas (JUHÁSZ *et al.*, 2005, CHEN *et al.*, 2008), como acontece com o complexo enzimático utilizado nestes ensaios (NOVOZYME, 2010).

#### **4.3.3 Efeito da inibição pela carga inicial de açúcar**

O efeito da inibição enzimática pelo açúcar sobre a hidrólise da PCA foi avaliado usando quatro diferentes cargas iniciais de açúcar (adicionados antes da enzima), incluindo: 30 e 60 g/l de glicose (30G e 60G), 10 g/l de celbiose (10G2) e 10 g/l de xilose (10X). A carga de substrato utilizada para os ensaios foi 15% (m/v) e uma carga de enzima de 10 FPU/g-celulose foi empregada. O tempo total de reação foi de 72h, com tempos de amostragem de 1, 2, 6, 12, 24, 48 e 72 h. Os resultados com respeito à produção de açúcares são apresentados nas Figuras 4.9-4.12. A adição de cada açúcar foi subtraída no seu gráfico respectivo para facilitar a comparação e a análise dos resultados.

A Figura 4.9 mostra que no ponto final a glicose média liberada nas hidrólises 10X, 10G2 e 30G, foi 56,4 g/l, exceto para a carga 60G (que foi de 43,3 g/l). A adição dos açúcares reduziu em diferentes graus a taxa inicial de formação de glicose, sendo a adição de glicose (30G e 60G) aquela que mais afetou a produção de glicose durante a

hidrólise. A glicose como produto primário tem um efeito inibitório importante sobre a celulase e a  $\beta$ -glicosidase (ZHENG, 2007), promovendo uma maior formação de celobiose, como se evidencia na Figura 4.10 para as curvas 30G e 60G nas primeiras 24 horas de hidrólise. Das 24h até o tempo final, a concentração de celobiose aumenta para a carga de 30G em relação à hidrólise de referência, enquanto para a carga de 60G atinge valores finais de celobiose semelhantes aos apresentados na hidrólise sem adição de açúcares. Também é observado que a carga inicial de celobiose (10G2) parece ter inibido pouco ou nada a formação de celobiose durante a hidrólise comparada com a hidrólise de referência.

Em termos gerais, a xilose na Figura 4.11 apresentou maior taxa inicial de formação para as adições de açúcar diferentes da xilose (10X) obedecendo a uma maior inibição pelo produto principal da reação. As concentrações de xilose que foram diferentes no começo da hidrólise para cada adição de açúcar, tornaram-se semelhante à concentração observada para a hidrólise de referência após das 48h de reação, mostrando um efeito inibitório baixo dos açúcares sobre a produção final de xilose. A curva de xilose para a carga de 60G apresentou conversões máximas de xilose a partir das 6h de reação em um comportamento que merece maior análise.

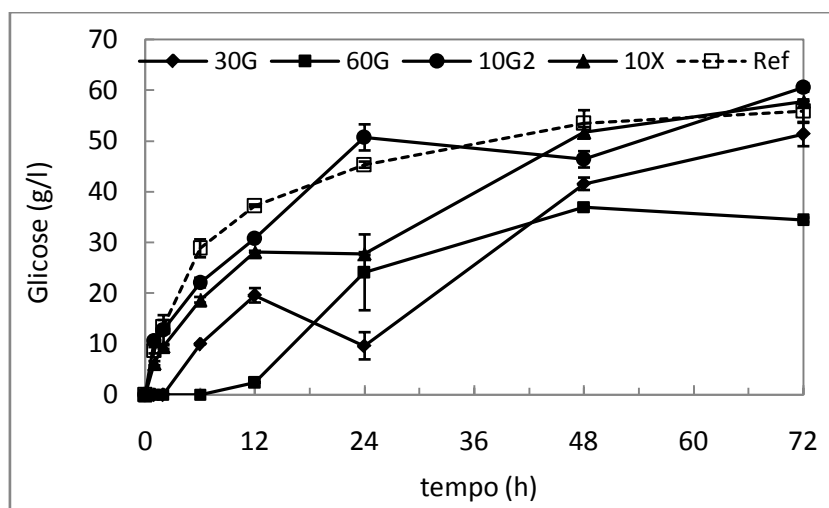


Figura 4.9. Efeito da inibição pelo açúcar sobre a concentração de glicose



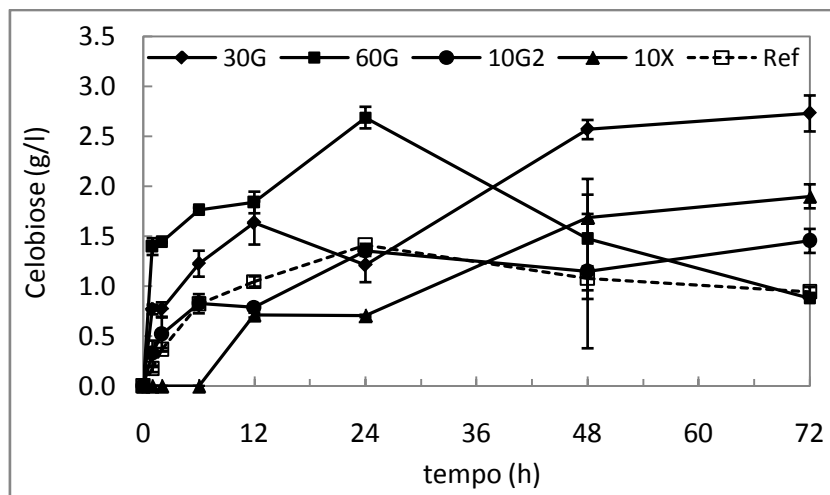


Figura 4.10. Efeito da inibição pelo açúcar sobre a concentração de celobiose

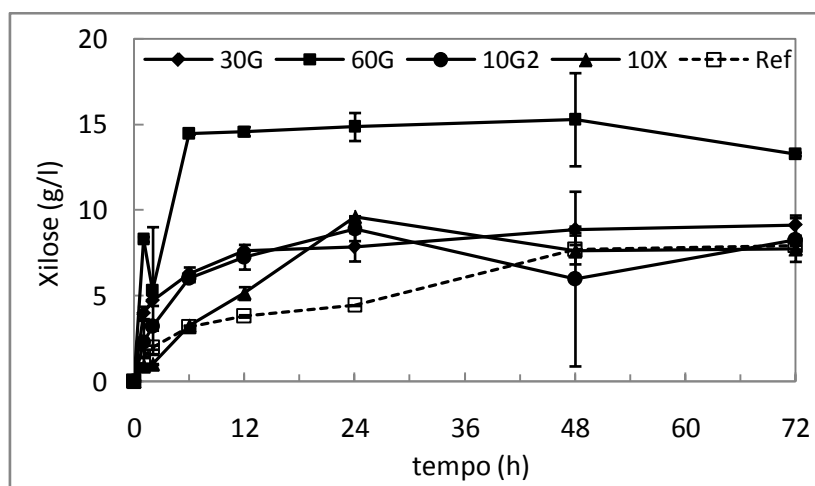


Figura 4.11. Efeito da inibição pelo açúcar sobre a concentração de xilose

A análise da estatística  $F$  de ANOVA apresentada na Tabela 4.5 revela que a adição inicial de 10 g/l de celobiose e xilose (10G2 e 10X, respectivamente), não afetou significativamente a produção de glicose comparada com a hidrólise de referência (sem adição de açúcar). Este resultado concorda com o nível de celobiose formado para 10G2 e 10X que é próximo ao nível de celobiose da referência como se observa na Figura 4.10. Os resultados da Tabela 4.5 também permitem confirmar que só a adição de glicose influenciou significativamente sobre a formação de glicose durante toda a hidrólise, exceto no ponto final da adição 30G, onde o nível de glicose foi próximo da glicose liberada na condição de referência. Esta análise pode ser estendida à Figura 4.12 onde a conversão média da celulose com a adição de açúcar foi de 53% exceto para 60G que foi significativamente menor (32%).

Tabela 4.5. Valores da estatística  $F$  da ANOVA para o efeito da inibição da carga inicial de açúcar sobre a produção de glicose

tempo (h)	Carga de açúcar inibidor			
	Ref. & 10G2	Ref. & 10X	Ref. & 30G	Ref. & 60G
1	8,97	23,71	394,93	394,93
2	0,08	14,03	190,11	190,11
6	22,73	60,08	228,08	533,19
12	328,75	1850,20	301,97	42052,36
24	8,26	1378,45	337,82	16,02
48	0,12	0,92	36,44	85,58
72	7,20	1,41	3,71	166,51
$F_{\text{crítico}}$	18,51	18,51	18,51	18,51

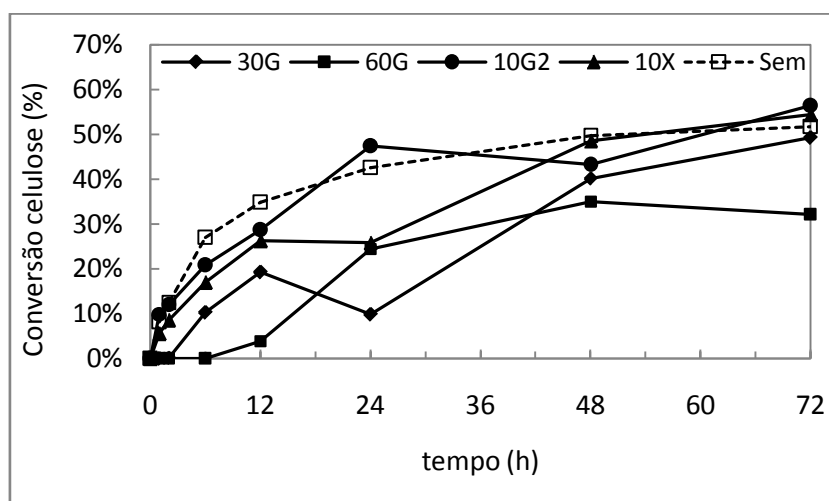


Figura 4.12. Efeito da inibição pelo açúcar sobre a conversão da celulose

#### 4.3.4 Adsorção

A adsorção de enzima sobre substratos heterogêneos insolúveis é o aspecto central dos modelos mecanísticos de hidrólise de celulose e tem sido positivamente correlacionado em vários estudos (uma lista completa destes estudos é apresentada por Zheng, 2007), uma vez que a taxa de hidrólise inicial é proporcional à quantidade de enzima inicial adsorvida (LEE *et al.*, 1982; LEE e FAN, 1982, RYU e LEE, 1986) e que a informação das interações enzima-substrato são necessárias para desenvolver um modelo que prediga com precisão a concentração dos produtos (PHILIPPIDIS *et al.*, 1993).

A cinética de adsorção do complexo enzimático na PCA foi avaliada medindo a concentração de proteína livre no hidrolisado pelo método colorimétrico de Bradford

(1976), para as sete diferentes cargas de enzima avaliadas (5, 10, 15, 20, 25, 30 e 60FPU/g-celulose). Os ensaios foram realizados a 50°C em duplicata, segundo a Seção 3.5 da metodologia, com tempos de amostragem de 1, 2, 6, 12, 24, 48 e 72 h. A possível interferência da proteína presente no substrato foi eliminada subtraindo a proteína medida da hidrólise de controle sem enzima.

Muitos trabalhos de adsorção têm sido conduzidos em celulose pura e temperaturas baixas (0-10°C) para evitar tanto o efeito da hidrólise sobre a isoterma de adsorção, como o retorno das enzimas ao hidrolisado por causa da solubilização da celulose, o que impediria a obtenção do equilíbrio de adsorção (STEINER *et al.*, 1988). Neste trabalho os ensaios foram realizados à temperatura de experimentos de hidrólise (50 °C), uma vez que quando a biomassa lignocelulósica é usada como substrato, a enzima não retorna à solução após a hidrólise, pois é adsorvida pela lignina presente no substrato, reduzindo o efeito da hidrólise da celulose sobre a adsorção da enzima (ZHENG, 2007).

Quando as temperaturas são baixas, a adsorção de celulase atinge um valor constante em menos de 30 a 90 min (LYND *et al.*, 2002). Não obstante, para substratos lignocelulósicos, um tempo entre 1-8 h é necessário para atingir o equilíbrio de adsorção (OOSHIMA *et al.*, 1990; KADAM *et al.*, 2004; ZHENG, 2007), concordando com os resultados da Figura 4.13, onde valores constantes de proteína no hidrolisado foram observados após de 6h de hidrólise.

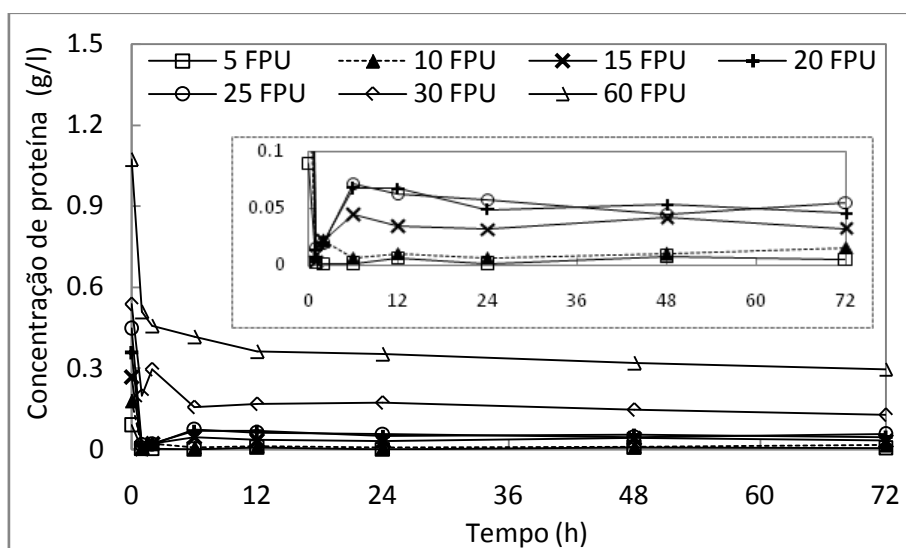


Figura 4.13. Cinética da adsorção da enzima sobre a PCA pré-tratada para diferentes cargas de enzima

A adsorção da enzima é muito mais rápida que a sacarificação e tanto o substrato quanto o pré-tratamento influenciam a dessorção das enzimas, acessibilidade ao substrato e afinidade das enzimas à lignina (KUMAR e WYMAN, 2009). Na Figura 4.13, um rápido decréscimo na concentração de enzima livre é observado para todas as cargas de enzima durante as primeiras horas de hidrólise. A enzima não é liberada na solução durante a hidrólise pela presença de lignina no substrato (GALBE *et al.*, 1990), uma vez que a celulase liberada da hidrólise da celulose pode ser re-adsorvida de maneira irreversível pela lignina cada vez mais acessível (MES-HASTREE *et al.*, 1987). Isso concorda com o observado na Figura 4.8, onde o decréscimo na conversão da glicose no final da hidrólise não foi acompanhado da liberação da enzima no meio como se mostra na Figura 4.13. O efeito da adsorção de celulase e/ou  $\beta$ -glicosidase sobre a lignina não foi estudado neste trabalho e na literatura uma comparação das características de adsorção de enzima sobre celulósicos e lignocelulósicos é apresentada unicamente por Zheng (2007). No entanto, a presença de lignina na PCA pode ter um efeito positivo no aumento da conversão da celulose pelas enzimas oxidativas (e.g. GH61) presentes na Cellic<sup>®</sup> CTec2 (CANELLA *et al.*, 2012).

Zheng (2007) adotou o mecanismo de hidrólise proposto por Kadam *et al.*(2004), que dividiu a enzima em dois grupos, EC/CBH convertendo celulose em glicose e celobiose e  $\beta$ -glicosidase, convertendo celobiose à glicose. Neste trabalho o complexo enzimático Cellic<sup>®</sup> CTec2 foi considerado uma pseudo-enzima, simplificando o modelo de Kadam *et al.*(2004). Esta simplificação pode ser razoável, uma vez que, segundo observado por Zheng (2007), a  $\beta$ -glicosidase não afeta a adsorção da celulase na celulose porque não compete com os sítios ativos no substrato, concordando com a natureza hidrolítica da  $\beta$ -glicosidase, que hidrolisa celobiose à glicose em meio aquoso.

Os parâmetros da isoterma de Langmuir, descrita pela Equação (3.3), foram estimados com os dados de equilíbrio de adsorção obtidos no tempo de hidrólise de 6 h. A minimização da soma dos erros quadráticos (i.e. mínimos quadrados), foi usada como função objetivo. A forma não linear da isoterma de Langmuir foi utilizada para a estimação dos parâmetros, uma vez que os desvios inerentes às transformações lineares das isotermas conduzem a erros na estimação e distorções no ajuste (FOO e HAMEED, 2010). Os resultados obtidos são apresentados na Figura 4.14 e na Tabela 4.6.

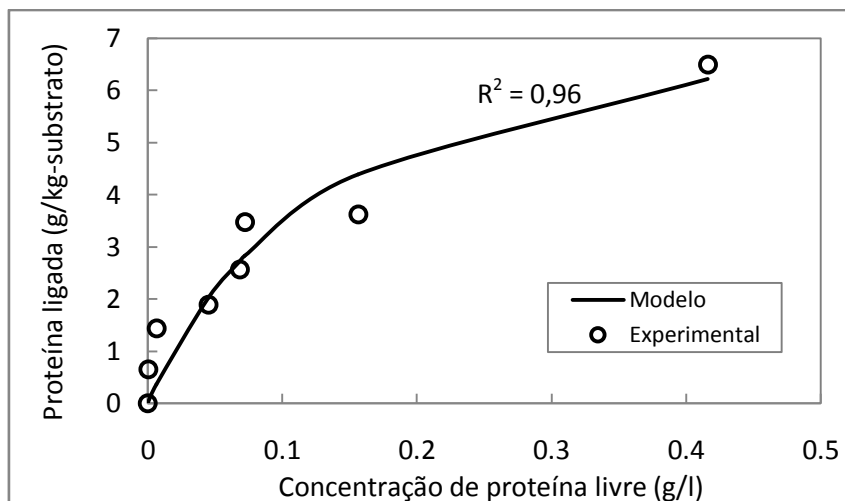


Figura 4.14. Isoterma de Langmuir para a adsorção de enzima sobre PCA pré-tratada

Tabela 4.6. Resultados da estimação dos parâmetros de adsorção

Função objetivo	2,685	
Graus de Liberdade* (GL)	6	
Parâmetros	$E_{max}$ (g/kg-substrato)	$K_{ad}$ (l/g)
Valor	8,32	7,16
Desvio Padrão	2,3	4,4
Matriz de correlação		
	1	-0,916
	-0,916	1

\*GL=Número experimentos\* Número de variáveis - Número de parâmetros

A Tabela 4.6 fornece informação adicional sobre os resultados da estimação. A significância dos parâmetros sugere que o parâmetro  $E_{max}$  é significativo, enquanto  $K_{ad}$  está muito próximo de ser significativo, segundo o nível de confiança considerado na estimação (95%). A correlação dos parâmetros observada ( $\sim 0,92$ ) pode ser reduzida para 0,81 usando uma reparametrização da isoterma de Langmuir (dados não mostrados) sem afetar a predição do modelo. Contudo preferiu-se utilizar os parâmetros de Langmuir por ter um evidente significado físico.

Os parâmetros da isoterma de Langmuir oferecem uma medida da capacidade de adsorção ( $E_{max}$ ) e da afinidade da enzima pelo substrato ( $K_{ad}$ ). Câmara (2012) estimou  $E_{max}$  em 26 g/kg e  $K_{ad}$  de 8,58 kg/g para bagaço de cana pré-tratado com peróxido de hidrogênio. Zheng (2007) reportou  $E_{max}$  e  $K_{ad}$  de 173,50 g/kg e 0,5 l/g

respectivamente, para a adsorção de  $\beta$ -glicosidase em lignina; valores que passaram para 161,50 g/kg (*E<sub>max</sub>*) e 0,65 l/g (*K<sub>ad</sub>*), quando mudou o substrato para um tipo de grama pré-tratada com ácido diluído. Neste mesmo trabalho, foram estimados *E<sub>max</sub>* de 22,86 g/kg e *K<sub>ad</sub>* de 0,60 l/g para celulase em Avicel. Kadam *et al.* (2004) estimaram *E<sub>max</sub>* de 60 g/kg e 10 g/kg para a adsorção de celulase e  $\beta$ -glicosidase sobre palha de milho pré-tratada. Khodaverdi *et al.* (2011) calcularam *K<sub>ad</sub>* de 5,0 e 5,7 l/g, para algodão com e sem pré-tratamento. Embora o tipo de substrato e pré-tratamento influenciam a adsorção da enzima, os resultados da Tabela 4.6 sugerem uma concordância entre a ordem dos parâmetros estimados e os parâmetros de adsorção referidos na literatura para outros substratos lignocelulósicos.

#### 4.4 MODELAGEM MATEMÁTICA

A metodologia seguida neste trabalho para modelar a hidrólise enzimática da PCA pré-tratada, incluiu: (1) a obtenção dos dados experimentais; (2) a estimação dos parâmetros cinéticos utilizando estes mesmos dados; e (3) a simulação do modelo com os parâmetros estimados sob condições diferentes de carga de sólidos, carga de enzimas e concentrações iniciais de açúcar. Os resultados destas simulações foram comparados com os dados experimentais para validar a capacidade de predição do modelo numa faixa de condições experimentais diferentes daquelas usadas para a estimação.

##### 4.4.1 Estimação dos parâmetros cinéticos

Os parâmetros da isoterma de Langmuir estimados separadamente foram usados como dados de entrada durante a estimação dos parâmetros cinéticos. Estes parâmetros foram estimados usando o software EMSO (SOARES e SECCHI, 2003), e os valores experimentais de glicose, celobiose e xilose estão na condição de referência (ver Tabela 3.1). Os resultados obtidos são listados na Tabela 4.7.

Alguns autores incluíram a concentração de celulose no conjunto de dados para a estimação dos parâmetros cinéticos do modelo, no entanto, neste trabalho a concentração do substrato não foi medida durante a hidrólise, e somente foram calculadas para estimar a conversão teórica da celulose e hemicelulose. Dados não

apresentados mostraram que incluir esta informação nos dados da estimação (quando não têm sido medidos experimentalmente, senão inferidos a partir das concentrações de glicose e celobiose), não representa ganho algum no ajuste das variáveis, porém, aumenta a correlação entre os parâmetros, uma vez que parte dos dados usados para a estimação procede de uma transformação linear das variáveis medidas.

Tabela 4.7. Parâmetros cinéticos estimados do modelo de hidrólise enzimática da PCA pré-tratada na condição de referência

Parâmetros Cinéticos	Unidades	Este trabalho	Câmara (2012)*	Zheng (2007)	Kadam <i>et al.</i> (2004)*	Flores-Sánchez <i>et al.</i> (2013)*	Khodaverdi <i>et al.</i> (2011)	Prunescu <i>et al.</i> (2013)*
$k_{1r}$	l/g/h	0,028	0,65	16,5	22,3	94,72	5,64	1,224
$k_{2r}$	l/g/h	4,78	3,17	7,1	7,18	958,3	10,98	19,08
$k_{3r}$	1/h	187,8	254,5	267,6	285,5	432,16	102,86	252
$k_{4r}$	l/g/h	15,66	57,79	-	-	167,27	-	9,72
$K_{1IG2}$	l/g	0,545	9,83	0,04	0,015	$1,00 \times 10^{-5}$	1,58	0,0014
$K_{1IG}$	l/g	2,93	0,176	0,1	0,1	7,33	0,01	0,0073
$K_{1IX}$	l/g	5,07	9,54	-	0,1	8,92	-	0,1007
$K_{2IG2}$	l/g	117,2	-	132,5	132	7,33	211,74	132
$K_{2IG}$	l/g	0,329	0,15	0,01	0,04	0,00115	0,28	0,34
$K_{2IX}$	l/g	0,325	8,79	-	0,2	6,13	-	0,029
$K_{3M}$	l/g	25,50	24,5	25,5	24,3	0,022	184,82	24,3
$K_{3IG}$	l/g	0,216	41,75	2,1	3,9	$1,45 \times 10^{-5}$	1,92	3,9
$K_{3IX}$	l/g	59,07	-	-	201,0	39,19	-	201
$K_{4IG2}$	l/g	20,68	-	-	-	-	-	24,3
$K_{4IG}$	l/g	0,728	0,023	-	-	0,0747	-	2,39
$K_{4IX}$	l/g	196,4	9,81	-	-	23,12	-	201
Relações entre as constantes de inibição								
$K_{1IG2}/K_{1IG}$		0,2	55,85	0,40	0,15	$1,36 \times 10^{-6}$	158	0,19
$K_{2IG2}/K_{2IG}$		356,0		13250	3300	6374	756	388
$K_{3M}/K_{3IG}$		118,2	0,59	12,14	6,23	1517	96,26	6,23
$K_{4IG2}/K_{4IG}$		28,4						10,17
$K_{1IX}/K_{1IG}$		1,7	54,20		1	1,22		13,79
$K_{2IX}/K_{2IG}$		1,0	58,6		5	5330,43		0,09
$K_{3IX}/K_{3IG}$		273,9			51,54	$2,70 \times 10^6$		51,54
$K_{4IX}/K_{4IG}$		269,9	426			309		84,10

\*  $k_{ir}$ ,  $i=1,2,4$ ; em kg/g/h.  $k_{3r}$ , em 1/h.  $K_{iIG2}$ ,  $K_{iIG}$ ,  $K_{iIX}$ ,  $i=1,\dots,4$  e  $K_{3M}$  em g/kg

Os parâmetros cinéticos reportados em outros trabalhos baseados no modelo de Kadam *et al.* (2004) também foram listados na Tabela 4.7. A comparação direta entre os parâmetros dos diferentes modelos é muito difícil, uma vez que o mecanismo da hidrólise enzimática de celulose pelos complexos sistemas enzimáticos é incerto (ZHENG, 2007). Além disso, cada um dos trabalhos da Tabela 4.7 usou cargas de sólidos, cargas de enzima e substratos diferentes; alguns usaram complementação de  $\beta$ -

glicosidase e modelaram o complexo enzimático considerando mais de uma enzima, tornando mais difícil a comparação.

As inibições relativas apresentadas na Tabela 4.7 revelam que não é possível generalizar os efeitos da inibição da enzima pelos produtos da hidrólise. Enquanto para Flores-Sánchez *et al.* (2013) que trabalhou com milho, na reação de conversão de celulose em celobiose ( $r_1$ ),  $K_{IG2}$  é muito pequena com respeito à  $K_{IG}$  ( $1,36 \times 10^{-6}$ ), para Khodaverdi *et al.* (2011),  $K_{IG2}$  é 158 vezes maior que  $K_{IG}$ . Outro dos vários casos que podem ser analisados na Tabela 4.7, aconteceu com a reação de conversão de celobiose em glicose ( $r_2$ ), onde para PCA,  $K_{2IX}$  é quase igual que  $K_{2IG}$ , enquanto, para Flores-Sánchez *et al.* (2013),  $K_{2IX}$  é mais de 5000 vezes  $K_{2IG}$  e para Prunescu *et al.* (2013),  $K_{2IG}$  é 11 vezes maior que  $K_{2IX}$ . Assim, diferentes esquemas reacionais podem resultar em diferentes valores para os parâmetros, sendo possível que um parâmetro com alto valor compense outro parâmetro com menor valor (KADAM *et al.*, 2004; ZHENG *et al.*, 2009a). Isso também pode ser explicado pela alta correlação entre os parâmetros do modelo de Kadam *et al.* (2004), referida por Sin *et al.* (2010).

Depois de uma análise rigorosa de identificabilidade do modelo de Kadam *et al.* (2004), Sin *et al.* (2010) concluíram que o modelo estava superparametrizado com respeito às medições disponíveis. Três abordagens podem ajudar a superar este tipo de problemas: (1) modificar a estrutura do modelo avaliando a necessidade de introduzir todos os parâmetros; (2) melhorar o planejamento experimental para obter mais dados que contribuíssem a superar o problema de identificabilidade e (3) usar uma análise de incertezas para quantificar a incerteza de predição do modelo. Sin *et al.* (2010), recomendam altamente as abordagens (1) e (2) como soluções a longo prazo, porém, propõem uma solução na linha da abordagem (3) que permita usar o modelo apesar das imperfeições.

Para superar a superparametrização do modelo, uma modificação das Equações de taxa  $r_1$  (Eq.3.6),  $r_2$  (Eq.3.7) e  $r_4$  (Eq.3.9) foi formulada da forma das equações (3.6b), (3.7b) e (3.9b) abaixo. Baseado nos fundamentos das reações enzimáticas (ver Anexo 1), um só conjunto de parâmetros de inibição ( $K_{IG2}$ ,  $K_{IG}$  e  $K_{IX}$ ) foi considerado para as reações que ocorrem na interface sólido-líquido, uma vez que o complexo enzimático está sendo modelado como uma pseudo-enzima com uma única capacidade enzimática.



Conversão da celulose (C) em celobiose (G2) com inibição competitiva por glicose, celobiose e xilose

$$r_1 = \frac{k_{1r} E_{BC} R_S S}{1 + \frac{G2}{K_{IG2}} + \frac{G}{K_{IG}} + \frac{X}{K_{IX}}} \quad (3.6b)$$

Conversão da celulose (C) em glicose (G) com inibição competitiva por glicose, celobiose e xilose

$$r_2 = \frac{k_{2r} E_{BC} R_S S}{1 + \frac{G2}{K_{IG2}} + \frac{G}{K_{IG}} + \frac{X}{K_{IX}}} \quad (3.7b)$$

Conversão da hemicelulose (H) em xilose (X) com inibição competitiva por glicose, celobiose e xilose

$$r_4 = \frac{k_{4r} E_{BH} R_S S}{1 + \frac{G2}{K_{IG2}} + \frac{G}{K_{IG}} + \frac{X}{K_{IX}}} \quad (3.9b)$$

A simplificação proposta do modelo reduz o número total de parâmetros de 16 para 10, ao considerar um só conjunto de parâmetros de inibição para as taxas das reações heterogêneas  $r_1$ ,  $r_2$  e  $r_4$ . Os resultados da estimação do novo conjunto de parâmetros cinéticos são apresentados na Tabela 4.8.

Tabela 4.8. Parâmetros cinéticos estimados para o modelo simplificado de hidrólise na condição de referência

Função objetivo	20,4									
Graus de Liberdade* (GL)	17									
Parâmetros	$k_{1r}$	$k_{2r}$	$k_{3r}$	$k_{4r}$	$K_{IG2}$	$K_{IG}$	$K_{IX}$	$K_{3IG}$	$K_{3IX}$	$K_{3M}$
Unidades	l/g/h	l/g/h	1/h	l/g/h	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l
Valor	0,104	2,76	143,2	21,42	1,98	0,546	1,60	0,409	73,10	45,49
Confiança	0,103	2,71	2373,9	21,05	16553	7548,3	$3,7 \times 10^5$	$5,2 \times 10^6$	27754	$1,5 \times 10^9$
Significância	-0,50	-0,50	-0,50	-0,50	-0,50	-0,50	-0,50	-0,50	-0,50	-0,50
Matriz de correlação										
	$k_{1r}$	$k_{2r}$	$k_{3r}$	$k_{4r}$	$K_{IG2}$	$K_{IG}$	$K_{IX}$	$K_{3IG}$	$K_{3IX}$	$K_{3M}$
$k_{1r}$	1	1,00	-0,31	1,00	-0,65	-0,97	0,95	-0,41	-0,64	0,99
$k_{2r}$		1	-0,29	1,00	-0,65	-0,97	0,95	-0,39	-0,62	0,99
$k_{3r}$			1	-0,29	0,35	0,20	-0,17	0,96	0,82	-0,35
$k_{4r}$				1	-0,65	-0,97	0,95	-0,39	-0,62	0,99
$K_{IG2}$					1	0,47	-0,40	0,34	0,41	-0,69
$K_{IG}$						1	-1,00	0,33	0,58	-0,93
$K_{IX}$							1	-0,30	-0,55	0,90
$K_{3IG}$								1	0,93	-0,45
$K_{3IX}$									1	-0,67
$K_{3M}$										1

\*GL=Número experimentos\*Número de variáveis\*Número de amostras - Número de parâmetros

Na estimação dos parâmetros do modelo considerando todos os 16 parâmetros (GL=11), o valor da função objetivo foi 18,2, porém, outras estatísticas como o intervalo de confiança, a significância e a matriz de correlação dos parâmetros, não tinham sido possíveis de calcular pelo EMSO devido ao mau condicionamento da matriz de informação de Fisher. A modificação proposta do modelo permitiu estimar estas estatísticas e observar a forte correlação que existe no modelo entre os parâmetros (valores sombreados na Tabela 4.8).

A qualidade do ajuste das variáveis não foi afetada pela redução dos parâmetros proposta, isso pode ser observado nas Figuras 4.15 e 4.16, onde se observa que tanto o modelo com todos os parâmetros quanto o modelo simplificado ajustam os dados experimentais de glicose (G.exp), celobiose (G2.exp) e xilose (X.exp) com o mesmo grau de ajuste. Foi propositalmente omitida a comparação entre a celulose e hemicelulose teórica e predita, uma vez que a celulose e hemicelulose não foram medidas senão estimadas a partir da concentração dos açúcares e, portanto, o ajuste do modelo corresponde exatamente ao ajuste apresentado nas figuras para os produtos da hidrólise.

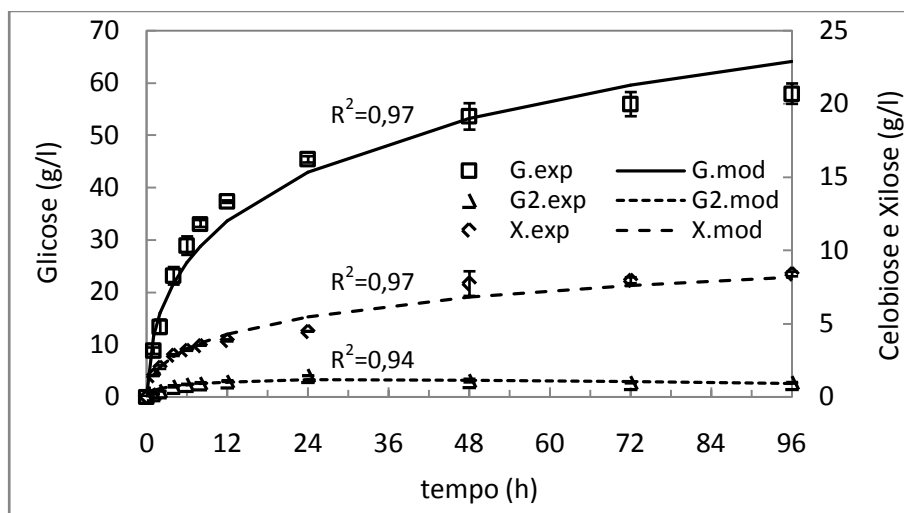


Figura 4.15. Ajuste dos parâmetros estimados para o modelo com todos os parâmetros na condição de referência

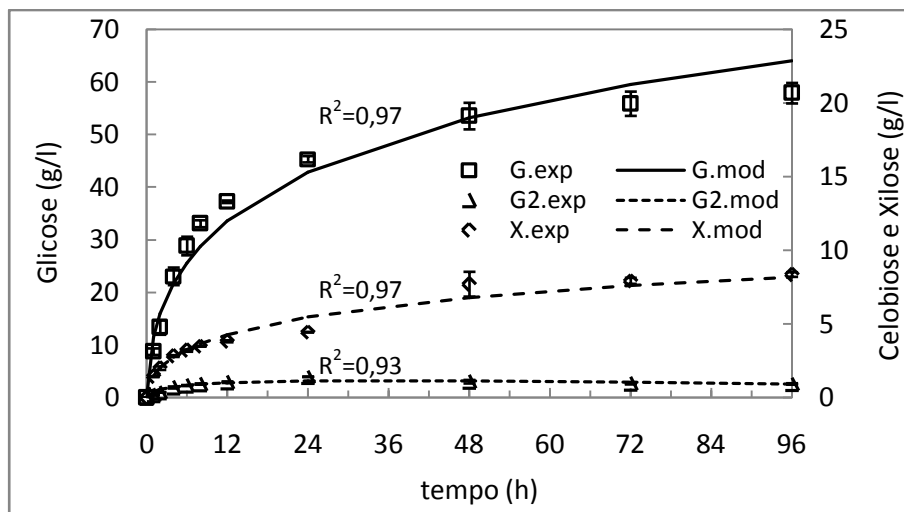


Figura 4.16. Ajuste dos parâmetros estimados para o modelo simplificado na condição de referência

Os resultados completos da validação dos modelos usando todos os dados experimentais são resumidos na Tabela 4.9, que apresenta o valor do coeficiente de correlação ( $R^2$ ) de cada modelo para cada variável de saída. Além de mostrar que a qualidade do ajuste dos modelos é quase a mesma para todas as variáveis em todos os experimentos, a Tabela 4.9 revela que os modelos têm algumas limitações.

Tabela 4.9. Comparação do ajuste dos modelos ( $R^2$ ) para cada variável de saída ao longo de todos os experimentos

Efeito da carga enzimática (FPU/g-celulose)																		
		5		15			20			25			30			60		
	G	G2	X	G	G2	X	G	G2	X	G	G2	X	G	G2	X	G	G2	X
M1	0,98	0,87	0,99	0,99	0,67	0,97	0,98	0,16	0,96	0,98	0,09	0,93	0,93	0,21	0,89	0,89	0,02	0,87
M2	0,98	0,85	0,99	0,99	0,66	0,97	0,98	0,15	0,96	0,98	0,07	0,94	0,93	0,19	0,90	0,89	0,01	0,87

Efeito da carga de sólidos (%m/v)						Efeito da inibição pelos açúcares (g/l)												
		10		20		10X			30G			60G			10G2			
	G	G2	X	G	G2	X	G	G2	X	G	G2	X	G	G2	X	G	G2	X
M1	0,96	0,38	0,83	0,94	0,67	0,99	0,97	0,54	0,82	0,87	0,82	0,74	0,91	0,08	0,43	0,96	0,83	0,75
M2	0,96	0,35	0,83	0,94	0,66	0,99	0,96	0,56	0,85	0,88	0,83	0,75	0,91	0,06	0,44	0,96	0,78	0,75

M1: modelo original com todos os 16 parâmetros, M2: modelo simplificado com 10 parâmetros

Embora o ajuste dos modelos tenha sido satisfatório nas condições de referência ( $R^2 \geq 0,93$ ) (Figuras 4.15 e 4.16), a validação das previsões em condições diferentes mostrou certas dificuldades comuns aos dois modelos. Em geral, os modelos

conseguiram ajustar muito melhor a concentração de glicose e xilose enquanto a carga de enzima foi próxima do valor de referência (10 FPU/g-celulose) e tiveram alguma dificuldade com o ajuste da celobiose. No entanto, para a carga de enzima de 60 FPU/g-celulose, todas as predições foram insatisfatórias. Com respeito ao efeito dos sólidos, as predições da glicose e xilose foram boas ( $R^2 > 0,83$ ) tanto para 10% como para 20%, porém as predições de celobiose não foram as melhores. Nos casos da avaliação da inibição, os modelos conseguiram prever relativamente bem a concentração de glicose para todas as cargas de açúcar inicial ( $R^2 > 0,87$ ), sendo melhores para as cargas iniciais de xilose e celobiose ( $R^2 = 0,96$ ), o que é razoável, lembrando que tanto a xilose quanto a celobiose tiveram pouco efeito inibidor sobre a produção de glicose, como foi discutido anteriormente na Seção 4.3.3. Os modelos tiveram especial dificuldade em prever a concentração de celobiose com carga inicial de 60 g/l de glicose.

Uma nova estimação dos parâmetros cinéticos foi feita na tentativa de melhorar as predições do modelo nas condições fora do espaço de projeto padrão, usando todos os dados experimentais disponíveis (13 experimentos). Os resultados são apresentados na Tabela 4.10.

Tabela 4.10. Parâmetros cinéticos estimados para o modelo simplificado de hidrólise considerando todos os dados experimentais

Função objetivo	264,4										
Graus de Liberdade (GL)	269										
Parâmetros	$k_{1r}$	$k_{2r}$	$k_{3r}$	$k_{4r}$	$K_{IG2}$	$K_{IG}$	$K_{IX}$	$K_{3IG}$	$K_{3IX}$	$K_{3M}$	
Unidades	l/g/h	l/g/h	1/h	l/g/h	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	
Valor	0,015	0,548	170,9	6,85	6,02	3,57	5,45	0,032	79,42	45,60	
Confiança	$7,1 \times 10^{-6}$	$2,7 \times 10^{-4}$	101,4	0,003	20,02	6,81	16,98	16,04	$5,9 \times 10^6$	120187	
Significância	0,61	0,61	-0,50	0,61	0,17	0,55	0,21	-0,50	-0,50	-0,50	
Matriz de correlação											
	$k_{1r}$	$k_{2r}$	$k_{3r}$	$k_{4r}$	$K_{IG2}$	$K_{IG}$	$K_{IX}$	$K_{3IG}$	$K_{3IX}$	$K_{3M}$	
$k_{1r}$	<b>1</b>	0,99	-0,02	0,99	-0,66	-0,99	-0,78	-0,03	0,03	-0,02	
$k_{2r}$		<b>1</b>	-0,03	0,99	-0,67	-0,99	-0,79	-0,03	-0,04	-0,05	
$k_{3r}$			<b>1</b>	-0,03	0,04	0,03	0,01	1,00	0,99	-0,06	
$k_{4r}$				<b>1</b>	-0,66	-0,98	-0,78	-0,03	-0,04	-0,05	
$K_{IG2}$					<b>1</b>	0,64	0,51	0,04	0,01	0,03	
$K_{IG}$						<b>1</b>	0,71	0,03	0,04	0,02	
$K_{IX}$							<b>1</b>	0,01	0,02	0,15	
$K_{3IG}$								<b>1</b>	1,00	-0,06	
$K_{3IX}$									<b>1</b>	-0,05	
$K_{3M}$										<b>1</b>	

A nova estimação considerando todo o conjunto de experimentos melhorou o intervalo de confiança dos parâmetros  $k_{1r}$ ,  $k_{2r}$ ,  $k_{4r}$  e  $K_{IG}$ , mas sem chegar a torná-los significativos. A correlação paramétrica foi reduzida em 50% em relação aos resultados apresentados na Tabela 4.8. Os parâmetros da reação homogênea  $r_3$  ( $k_{3r}$ ,  $K_{3IG}$ ,  $K_{3IX}$ ) exibiram uma forte correlação, própria das equações deste tipo originadas da cinética clássica de Michaelis-Menten (SIN *et al.*, 2011). Os resultados do ajuste para a condição de referência apresentados na Figura 4.17 mostram que o modelo continuou estimando bem o comportamento da glicose e xilose, porém o ajuste da celobiose apresentou resultados um pouco piores. A validação completa das predições do modelo com os novos parâmetros é discutida na próxima seção.

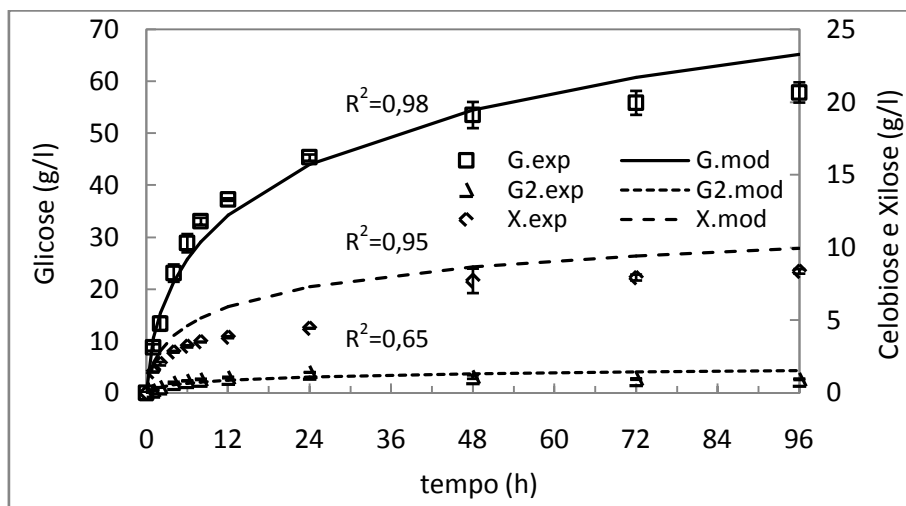


Figura 4.17. Ajuste dos parâmetros estimados para o modelo simplificado na condição de referência, usando todos os experimentos

#### 4.4.2 Verificação do modelo

Além de avaliar o modelo na condição de referência (Figura 4.17), as predições do modelo foram verificadas usando simulações para as diferentes cargas de enzima, sólidos e açúcares avaliadas experimentalmente. Os resultados são discutidos abaixo.

- **Análise do efeito da carga de sólidos:** Para verificar as predições do modelo com respeito à carga de sólidos, foram utilizados os dados experimentais de glicose, celobiose e xilose obtidos das hidrólises com carga de 10 e 20 %m/v. Os resultados são apresentados nas Figuras 4.18-4.20.

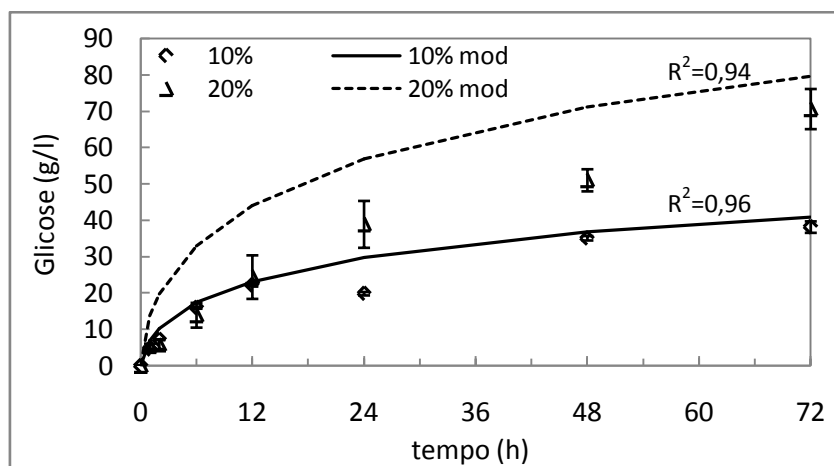


Figura 4.18. Glicose experimental e predita para diferentes cargas de sólidos

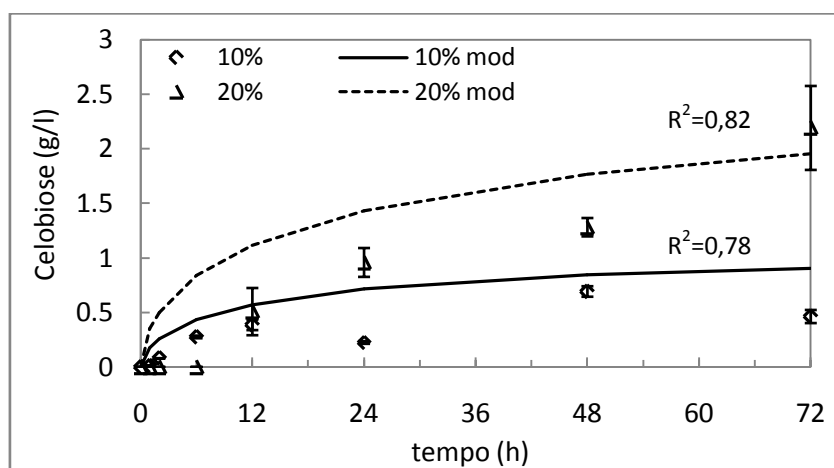


Figura 4.19. Celobiose experimental e predita para diferentes cargas de sólidos

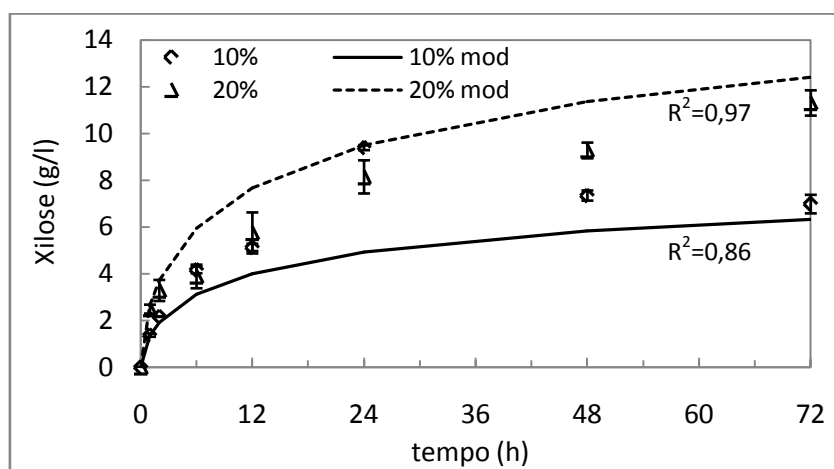


Figura 4.20. Xilose experimental e predita para diferentes cargas de sólidos

O modelo teve a capacidade de prever a concentração dos produtos da hidrólise para diferentes cargas de sólidos com relativa boa acurácia ( $R^2 > 0,78$ ). No início da hidrólise as previsões do modelo estão geralmente acima dos valores experimentais (exceto na Fig. 4.20 para a formação de xilose com carga de sólidos de 10%), mas o modelo consegue prever bem as concentrações no tempo final. A superestimação inicial na produção dos produtos poderia ser explicada pela possível maior inibição das enzimas durante os experimentos de hidrólise devido às limitações à transferência de massa e calor em alta concentração de sólidos (BOER e KOIVULA, 2003; XIAO *et al.*, 2004). No entanto, as previsões do modelo a partir da estimação usando todos os dados experimentais, melhoraram o ajuste ( $R^2$ ) quando comparado com o modelo M2 da Tabela 4.9.

- **Análise do efeito da carga de enzima:** As previsões da concentração de açúcares do modelo para diferentes cargas de enzima foram avaliadas usando os dados das hidrólises com cargas de enzima entre 5, 15 e 60 FPU/g-celulose. Os resultados são representados nas Figuras 4.21-4.23.

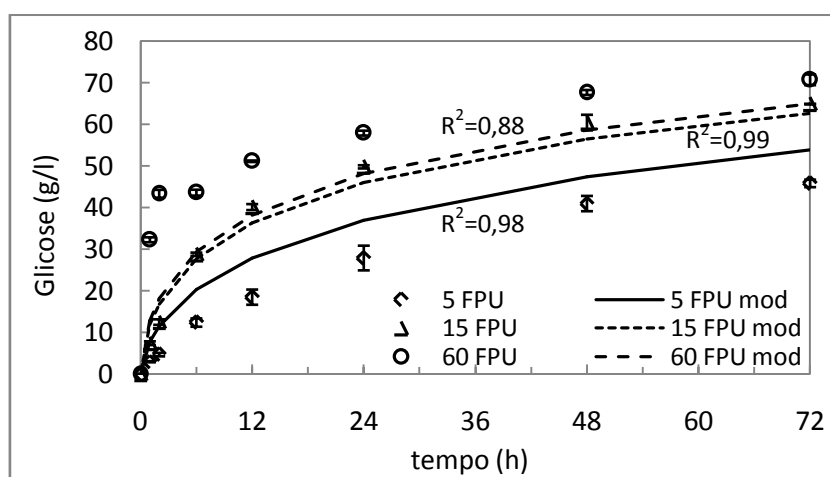


Figura 4.21. Glicose experimental e predita para diferentes cargas de enzima

O modelo consegue prever com boa acurácia ( $R^2 > 0,88$ ) as concentrações de glicose e xilose para diferentes cargas de enzima, porém tem alguma dificuldade para descrever o comportamento da celobiose. Embora os parâmetros tenham sido estimados usando todos os dados experimentais disponíveis, são observadas limitações na predição da concentração de açúcares para altas cargas de enzima (próximas de 60 FPU/g-celulose), mas consegue prever relativamente bem o comportamento da hidrólise para a maioria

das cargas enzimáticas avaliadas. Uma análise dos valores dos parâmetros estimados com os dados de cada experimento mostrou uma dependência linear dos parâmetros do modelo com a carga de enzima (ver Anexo 2), sugerindo uma dificuldade do modelo para achar um conjunto de parâmetros que consiga descrever satisfatoriamente o efeito da carga da enzima sobre a concentração dos produtos da hidrólise. As limitações da modelagem tanto na adsorção da enzima pela isoterma de Langmuir quanto na reatividade do substrato, ou a simplificação de considerar o complexo enzimático como uma pseudo-enzima com múltiplas atividades poderiam ter influenciado este resultado. No entanto, as razões exatas precisam ser estudadas com maior profundidade.

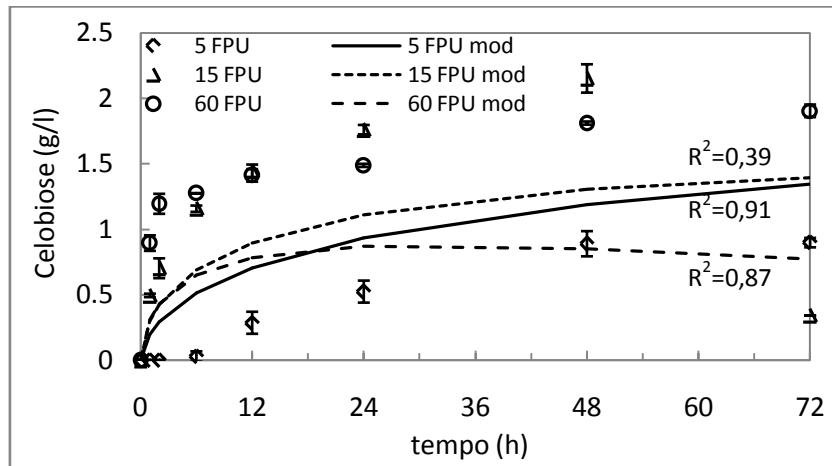


Figura 4.22. Celobiose experimental e predita para diferentes cargas de enzima

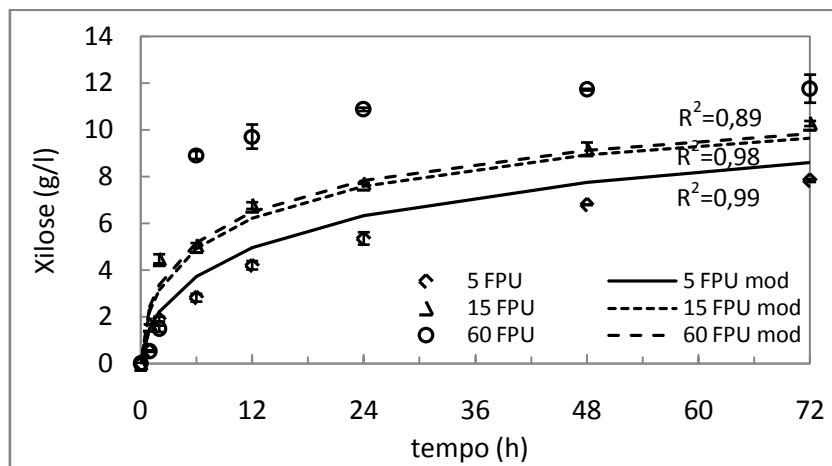


Figura 4.23. Xilose experimental e predita para diferentes cargas de enzima



- Avaliação do efeito da carga de açúcares:** A inibição pelos açúcares é um fator negativo que afeta de maneira importante a atividade enzimática, sendo mais acentuado em operação com alta carga de sólidos, pelo que é importante avaliar a previsibilidade do modelo com respeito a esta inibição. Os experimentos de inibição com cargas iniciais de glicose (30 e 60 g/l), celobiose (10 g/l) e xilose (g/l), foram usados para verificar as previsões do modelo. Os resultados são apresentados nas Figuras 4.24-4.26.

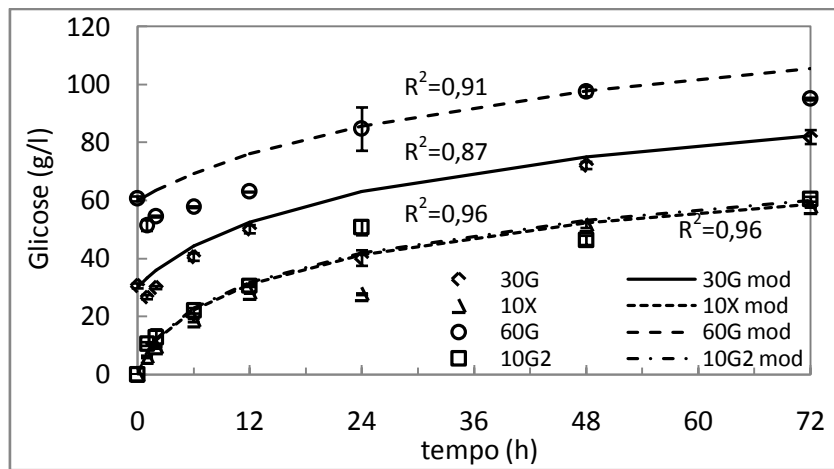


Figura 4.24. Glicose experimental e predita para diferentes cargas iniciais dos açúcares

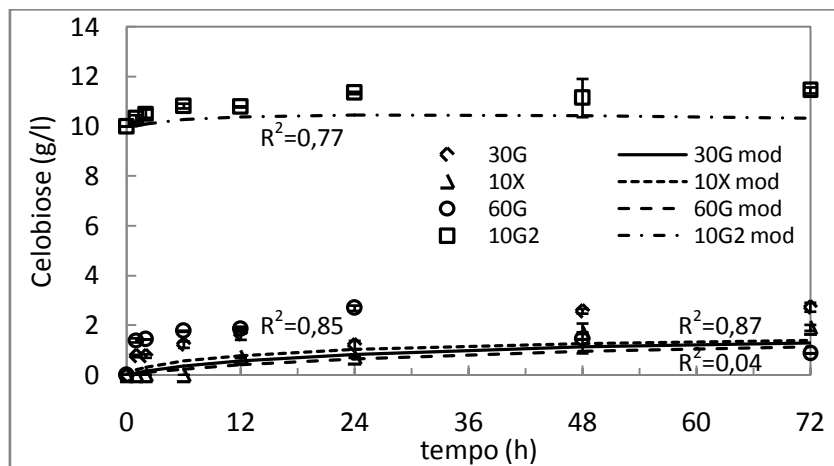


Figura 4.25. Celobiose experimental e predita para diferentes cargas iniciais dos açúcares

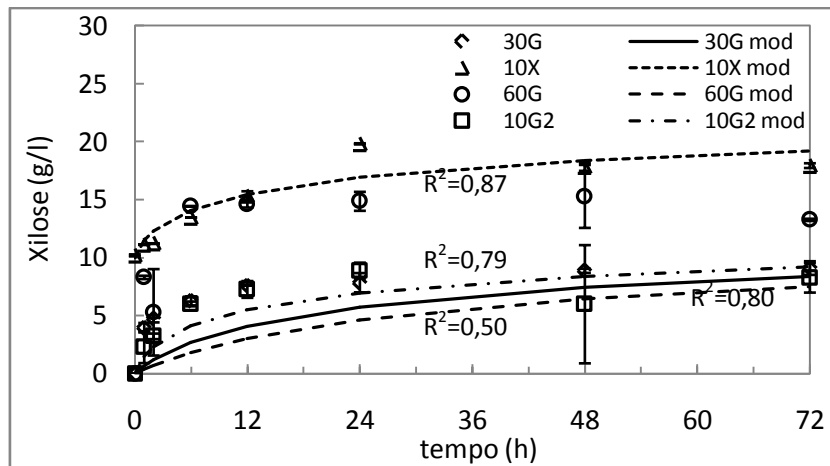


Figura 4.26. Xilose experimental e predita para diferentes cargas iniciais dos açúcares

O modelo consegue descrever bem ( $R^2 \geq 0,87$ ) a concentração de glicose sob o efeito da carga inicial de diferentes açúcares. Para a celobiose e xilose, o modelo consegue descrever a tendência dos dados com relativa acurácia ( $R^2 > 0,77$ ), embora tenha algumas dificuldades para prever a concentração de celobiose e xilose com carga inicial de glicose de 60 g/l. Contudo, estas previsões melhoraram em comparação com os resultados obtidos para o modelo M2 da Tabela 4.9.

## 5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

Um modelo semimecanístico multireacional baseado no modelo de Kadam *et al.* (2004) foi proposto para descrever a hidrólise enzimática da palha de cana-de-açúcar (PCA) pré-tratada hidrotêrmicamente. O modelo considerou a reação homogênea de conversão da celobiose em glicose e duas reações heterogêneas para a conversão de celulose à glicose e celulose à celobiose. A isoterma de Langmuir foi usada para modelar a adsorção da enzima sobre a PCA pré-tratada e a inibição competitiva da enzima pelos produtos foi considerada. A conversão da hemicelulose em xilose foi também incorporada no modelo seguindo a proposta de Câmara (2012).

Dados experimentais de glicose, celobiose e xilose, obtidos da hidrólise da PCA variando a carga de sólidos entre 10-15 %m/v, a carga enzimática entre 5-60 FPU/g-celulose e a carga inicial de açúcares, incluindo glicose (30-60 g/l), celobiose (10 g/l) e xilose (10 g/l) foram usados para estimar os parâmetros cinéticos e para avaliar as predições do modelo.

A análise dos dados mostrou que não houve um incremento significativo na concentração da glicose (56 g/l) no tempo final da hidrólise (72h), para cargas de sólidos maiores que 15% e cargas de enzima acima de 10 FPU/g-celulose. A produção de glicose foi inibida pela concentração inicial de glicose, enquanto a xilose e a celobiose não apresentaram um efeito inibidor significativo no tempo final da hidrólise.

Os dados da proteína livre para diferentes cargas enzimática mostraram que o equilíbrio de adsorção é atingido após 6h de hidrólise. Estes dados foram usados para modelar a adsorção da enzima no substrato através da isoterma de Langmuir. Os parâmetros estimados mostraram estar concordantes com os resultados referidos na literatura para outros substratos lignocelulósicos. Estes parâmetros foram usados como dados de entrada na estimação dos parâmetros cinéticos.

O *software* EMSO (SOARES e SECCHI, 2003) foi utilizado para estimar os parâmetros cinéticos do modelo e para avaliar por simulação, as predições do modelo ajustado. O modelo proposto para descrever o comportamento da hidrólise enzimática da PCA mostrou ter capacidade para prever a concentração da glicose, celobiose e xilose ( $R^2 \geq 0,93$ ) nas condições de alta concentração de sólidos da condição de referência (15% de sólidos e 10 FPU/g-celulose). Porém, apresentou alta correlação paramétrica, como tem sido referido recentemente na literatura (SIN *et al.*, 2011), impedindo atribuir um significado físico a cada parâmetro. O incerto mecanismo enzimático da hidrólise da celulose e as diferenças nas condições experimentais dificultaram a comparação direta dos parâmetros obtidos com os parâmetros referidos na literatura por outros autores que utilizaram uma extensão ou modificação do modelo de Kadam *et al.* (2004).

Baseado nos fundamentos das reações enzimáticas, uma simplificação do modelo original foi proposta para superar o problema da correlação paramétrica, reduzindo o número de parâmetros de 16 para 10. O modelo simplificado reduziu em 50% a correlação paramétrica, permitindo calcular tanto a matriz de correlação como os intervalos de confiança e a significância dos parâmetros, sem alterar a capacidade de predição do modelo.

A significância dos parâmetros e as predições do modelo para diferentes cargas de sólidos, cargas enzimas e carga inicial de açúcares foram melhoradas estimando um novo conjunto de parâmetros usando todos os dados experimentais disponíveis. Estes resultados mostraram uma forte correlação especialmente entre os parâmetros da reação de conversão de celobiose em glicose ( $r_3$ ) que é atribuída como característica dos modelos baseados na cinética clássica de Michaelis-Menten (SIN *et al.*, 2011). O modelo simplificado mostrou ter a capacidade de prever o comportamento dos produtos da hidrólise para a condição de referência, e melhorou as predições do modelo ajustado com uma única condição de experimental. O modelo predisse com relativa acurácia a produção dos açúcares para diferentes cargas de sólidos ( $R^2 > 0,78$ ), tendendo a superestimar as concentrações de açúcares, devido possivelmente, à maior inibição das enzimas em hidrólises com alta concentração de sólidos. O modelo melhorou o ajuste e a predição da concentração dos açúcares quando a carga enzimática foi mudada, mas conservou algumas dificuldades com cargas próximas de 60FPU/g-celulose. Além

disso, o modelo conseguiu prever razoavelmente bem os importantes efeitos inibitórios dos açúcares sobre a concentração dos produtos da hidrólise.

A partir dos resultados obtidos e discutidos, algumas sugestões para trabalhos futuros são propostas:

- Determinar experimentalmente a reatividade do substrato ( $R_s$ ) para a PCA ou avaliar outras abordagens para modelar as variações estruturais do material durante a hidrólise;
- Determinar as isotermas de adsorção das enzimas celulase e  $\beta$ -glicosidase separadamente para ter em consideração os efeitos de cada uma delas. Além disso, explorar o uso de outras isotermas ou outras abordagens para modelar a adsorção da enzima no substrato;
- Fazer uma análise rigorosa de identificabilidade que permita identificar os parâmetros estimáveis do modelo com a informação experimental disponível;
- Estudar o efeito da adsorção improdutiva das enzimas na lignina;
- Usar uma técnica de otimização global para estimar os parâmetros cinéticos do modelo para ter uma melhor avaliação do valor esperado dos parâmetros.

# BIBLIOGRAFIA

- A DEN, A., RUTH, M., IBSEN, K., JECHURA, J., NEEFES, K., SHEEHAN, J., WALLACE, B., MONTAGUE, L., SLAYTON, A., LUKAS, J., 2002. *Lignocellulosic biomass to ethanol process design and economics utilizing co-current dilute acid prehydrolysis and enzymatic hydrolysis for corn stover*. In: Technical Paper 510-32438, NREL, Golden, Colorado, USA.
- AEC, 2013. *Cellulosic biofuels. Industry progress report. 2012-2013*. Advanced Ethanol Council. Washington, D.C. Disponível em: <<http://goo.gl/xtili5>>. Acesso em: 17 mar. 2014.
- AGBOR, V. B., CICEK, N., SPARLING, R., BERLIN, A., LEVIN, D. B., 2011. "Biomass pretreatment: fundamentals toward application". *Biotechnology Advances*, v.29, pp. 675-685.
- ALLEN, S. G., KAM, L. C., ZEMANN, A. J., ANTAL Jr., M. J., 1996. "Fractionation of sugar cane with hot, compressed, liquid water". *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v.35, pp. 2709-2715.
- ALLEN, S. G., SCHULMAN, D., LICHWA, J., ANTAL Jr., M. J., LASER, M., LYND, L. R., 2001. "A Comparison between hot liquid water and steam fractionation of corn fiber". *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v.40, pp.2934-2941.
- ALVIRA, P., TOMÁS-PEJÓ E., BALLESTEROS M., NEGRO M. J., 2010. "Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review". *Bioresource Technology*, v.101, pp. 4851-4861.
- AL-ZUHAIR, S., 2008. "The effect of crystallinity of cellulose on the rate of reducing sugars production by heterogeneous enzymatic hydrolysis". *Bioresource Technology*, v.99: pp. 4078-4085.
- ANDERSEN, N., 2007. *Enzymatic hydrolysis of cellulose. Experimental and modeling studies*. Ph.D thesis, BioCentrum-DTU, Technical University of Denmark, Copenhagen, Denmark.
- ANDRIĆ, P., MEYER, A. S., JENSEN, P. A., DAM-JOHANSEN, K., 2010a. "Effect and modeling of glucose inhibition and in situ glucose removal during enzymatic hydrolysis of pretreated wheat straw". *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.160, pp. 280-297.
- ANDRIĆ, P., MEYER, A. S., JENSEN, P. A., DAM-JOHANSEN, K., 2010b. "Reactor design for minimizing product inhibition during enzymatic lignocellulose

- hydrolysis: I. Significance and mechanism of cellobiose and glucose inhibition on cellulolytic enzymes". *Biotechnology Advances*, v.28, pp. 308-324.
- ASK, M., OLOFSSON, K., DI FELICE, T., RUOHONEN, L., PENTTILÄ, M., LIDÉN, G., OLSSON, L., 2012. "Challenges in enzymatic hydrolysis and fermentation of pretreated *Arundo donax* revealed by a comparison between SHF and SSF". *Process Biochemistry*, v.47, pp. 1452-1459.
- BALAT, M., 2011. "Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review". *Energy Conversion and Management*, v.52, pp. 858-875.
- BALLESTEROS, I., OLIVA, J. M., NEGRO, M. J., MANZANARES, P., BALLESTEROS, M., 2002. "Ethanol production from olive oil extraction residue pretreated with hot water". *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.98-100, pp. 717-732.
- BANSAL, P., HALL, M., REALFF, M. J., LEE, J. H., BOMMARIUS, A. S., 2009. "Modeling cellulase kinetics on lignocellulosic substrates". *Biotechnology Advances*, v.27, pp. 833-848.
- BAYONA, O. L., 2012. *Avaliação de pré-tratamentos para a hidrólise enzimática de palha de cana-de-açúcar considerando a produção de etanol*. Dissertação de M.Sc., Unicamp, Campinas, São Paulo (SP), Brasil.
- BEZERRA, R. M. F., DIAS, A. A., 2004. "Discrimination among eight modified Michaelis-Menten kinetics models of cellulose hydrolysis with a large range of substrate/enzyme ratios. Inhibition by cellobiose." *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.112, pp. 173-184.
- BEZERRA, R. M. F., DIAS, A. A., 2005. "Enzymatic kinetic of cellulose hydrolysis. Inhibition by ethanol and cellobiose." *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.125, pp. 49-59.
- BIERMANN, C. J., SCHULTZ, T. P., MCGINNIS, G. D., 1984. "Rapid steam hydrolysis/extraction of mixed hardwoods as a biomass pretreatment". *Journal of Wood Chemistry and Technology*, v.4, pp. 111-128.
- BOER, H., KOIVULA, A., 2003. "The relationship between thermal stability and pH optimum studied with wild-type and mutant *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase Cel7A". *European Journal of Biochemistry*, v.270, pp. 841-848.
- BOUSSARSAR, H., ROGÉ, B., MATHLOUTHI, M., 2009. "Optimization of sugarcane bagasse conversion by hydrothermal treatment for the recovery of xylose". *Bioresource Technology*, v.100, pp. 6537-6542.
- BP, 2014. *BP Energy Outlook 2035*. British Petroleum, London, UK. Disponível em: <<http://goo.gl/O954f5>>. Acesso em: 17 mar. 2014.

- BRADFORD, M. M., 1976. "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding". *Analytical Biochemistry*, v.72, pp. 248-254.
- BROWN, R. F., AGBOGBO, F. K., HOLTZAPPLE, M. T., 2010. "Comparison of mechanistic models in the initial rate enzymatic hydrolysis of AFEX-treated wheat straw". *Biotechnology for Biofuels*, v.3:6, doi:10.1186/1754-6834-3-6.
- CÂMARA, M. M., 2012. *Modelagem e simulação da hidrólise de bagaço de cana pré-tratado com peróxido de hidrogênio em meio alcalino*. Dissertação de M.Sc., UEM, Maringá, Paraná (PR), Brasil.
- CANELLA, D., HSIEH, C-W. C., FELBY, C., JØRGENSEN, H., 2012. "Production and effect of aldonic acids during enzymatic hydrolysis of lignocellulose at high dry matter content". *Biotechnology for Biofuels*, v.5:26, doi:10.1186/1754-6834-5-26.
- CANILHA, L., SANTOS, V. T. O., ROCHA, G. J. M., ALMEIDA e SILVA, J. B., GIULIETTI, M., SILVA, S.S., FELIPE, M. G. A., FERRAZ, A., MILAGRES, A. M. F, CARVALHO, W., 2011. "A study on the pretreatment of a sugarcane bagasse sample with dilute sulfuric acid". *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v.38, pp. 1467–1475.
- CARA, C., ROMERO, I., OLIVA., J. M., SÁEZ, F., CASTRO, E., 2007. "Liquid Hot water pretreatment of olive tree pruning residues". *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.136-140, pp. 379-394.
- CARDONA, C., QUINTERO, J., PAZ, I., 2010. "Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives". *Bioresource Technology*, v.101, pp. 4751-4766.
- CARLY, C. M., 2011. *Hidrólise e fermentação do bagaço de cana-de-açúcar em escala de bancada para produção de etanol 2G*. Dissertação de M.Sc., UFSCar, São Carlos, São Paulo (SP), Brasil.
- CARVALHO, M. L., 2011. *Estudo cinético da hidrólise enzimática de celulose de bagaço de cana-de-açúcar*. Dissertação de M.Sc., UFSCar, São Carlos, São Paulo (SP), Brasil.
- CAVALCANTI-MONTAÑO I. D., GALEANO, S. C. A., RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA, U. F., GIORDANO, R. L. C., GIORDANO, R. C., SOUSA Jr., R., 2013. "Optimal bioreactor operational policies for the enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse". *Bioenergy Research*, v.6, pp. 776-785.
- CHEN, M., XIA, L., XUE, P., 2007. "Enzymatic hydrolysis of corncob and ethanol production from cellulosic hydrolysate". *International Biodeterioration & Biodegradation*, v.59, pp. 85-89.



- CHEN, M., JING, Z., LIMING, X., 2008. "Enzymatic hydrolysis of maize straw polysaccharides for the production of reducing sugars". *Carbohydrate Polymers*, v.71, pp. 411-415.
- CONAB, 2013, *Acompanhamento de safra brasileira: cana-de-açúcar, primeiro levantamento, abril/2013*. CONAB, Brasília, Brasil. Disponível em: <<http://goo.gl/ZoU9pc>>. Acesso em: 03 mar. 2014.
- CONVERSE, A. O., OPTEKAR, J. D., 1993. "A synergistic kinetics model for enzymatic cellulose hydrolysis compared to degree-of-synergism experimental results". *Biotechnology and Bioengineering*, v.42, pp. 145-148.
- DE BARI, I., VIOLA, E., BARISANO, D., CARDINALE, M., NANNA, F., ZIMBARDI, F., CARDINALE, G., BRACCIO, G., 2002. "Ethanol production at flask and pilot scale from concentrated slurries of steam-exploded Aspen". *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v.41, pp. 1745-1753.
- DESAI, S. G., CONVERSE, A. O., 1997. "Substrate reactivity as a function of the extent of reaction in the enzymatic hydrolysis of lignocellulose". *Biotechnology and Bioengineering*, v.56, pp. 650-655.
- DÍAZ, J. M., CARA, C., RUIZ, E., ROMERO, I., MOYA, M., CASTRO, E., 2010. "Hydrothermal pre-treatment of rapeseed straw". *Bioresource Technology*, v.101, pp. 2428–2435.
- EGGEMAN, T., ELANDER, R. T., 2005. "Process and economic analysis of pretreatment technologies". *Bioresource Technology*, v.96, pp. 2019–2025.
- ERIKSSON, T., BÖRJESSON, J., TJERNELD, F., 2002. "Mechanism of surfactant effect in enzymatic hydrolysis of lignocellulose". *Enzyme and Microbial Technology*, v.31, pp. 353-364.
- FAN, L. T., LEE, Y-H., GHARPURAY, M. M., 1982. "The nature of lignocellulosics and their pretreatments for enzymatic hydrolysis". *Advances in Biochemical Engineering*, v.23, pp. 157-187.
- FAN, L. T., LEE, Y-H., 1983. "Kinetic studies of enzymatic hydrolysis of insoluble cellulose: Derivation of a mechanistic kinetic model". *Biotechnology and Bioengineering*, v.25, pp. 2707-2733.
- FAN, Z., SOUTH, C., LYFORD, K., MUNSIE, J., VAN WALSUM, P., LYND, L. R., 2003. "Conversion of paper sludge to ethanol in a semicontinuous solids-fed reactor". *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v.26, pp. 93-101.
- FENSKE, J. J., PENNER, M.H., BOLTE, J. P., 1999. "A simple individual-based model of insoluble polysaccharide hydrolysis: the potential for autosynergism with dualactivity glycosidases". *Journal of Theoretical Biology*, v.199, pp. 113-118.

- FLORES-SÁNCHEZ, A., FLORES-TLACUAHUAC, A., PEDRAZA-SEGURA, L. L., 2013. "Model-based experimental design to estimate kinetic parameters of the enzymatic hydrolysis of lignocellulose". *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v.52, pp. 4834-4850.
- FONTANA, J. D., RAMOS, L. P., DESCHAMPS, F. C., 1995. "Pretreated sugar cane bagasse as a model for cattle feeding". *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.51/52, pp.105-116.
- FOO, K. Y., HAMEED, B.H., 2010. "Insights into the modeling of adsorption isotherm systems". *Chemical Engineering Journal*, v.156, pp. 2-10.
- GALBE, M., EKLUND, R., ZACCHI, G., 1990. "Adsorption of cellulases on steam-pretreated willow". *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.24-25, pp. 87-101.
- GAMA, F. M., TEIXEIRA, J. A., MOTA, M., 1994. "Cellulose morphology and enzymatic reactivity: A modified solute exclusion technique". *Biotechnology and Bioengineering*, v.43, pp. 381-387.
- GAN, Q., ALLEN, S. J., TAYLOR, G., 2003. "Kinetic dynamics in heterogeneous enzymatic hydrolysis of cellulose: An overview, an experimental study and mathematical modelling". *Process Biochemistry*, v.38, pp. 1003-1018.
- GANESH, K., JOSHI, J. B., SAWANT, S. B., 2000. "Cellulase deactivation in a stirred reactor". *Biochemical Engineering Journal*, v.4, pp. 137-141.
- GARCIA, D. D. R., 2009. *Determinação de dados cinéticos do pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar com peróxido de hidrogênio alcalino e da hidrólise enzimática posterior*. Dissertação de M.Sc., Unicamp, Campinas, São Paulo (SP), Brasil.
- GARROTE, G., DOMÍNGUEZ, H., PARAJÓ, J. C., 1999. "Hydrothermal processing of lignocellulosic materials". *Holz als Roh- und Werkstoff*, v.57, pp. 191-202.
- GARZÓN, F. L. L., 2009. *Determinação de dados cinéticos da deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar e da hidrólise enzimática no pré-tratamento com hidróxido de cálcio*. Dissertação de M.Sc., Unicamp, Campinas, São Paulo (SP), Brasil.
- GHOSE, T. K., DAS, K., 1971. "A simplified kinetic approach to cellulose-cellulase system". *Advances in Biochemical Engineering*, v.1, pp. 55-76.
- GHOSE, T. K., 1987. "Measurement of cellulase activities". *Pure and Applied Chemistry*, v.59, pp. 257-268.
- GÍRIO, F. M., FONSECA, C., CARVALHEIRO, F., DUARTE, L. C., MARQUES, S., BOGEL-LUKASIK., R., 2010. "Hemicelluloses for fuel ethanol: a review". *Bioresource Technology*, v.101, pp. 4775-800.

- GÓMEZ, R. S. M., 2010. *Pré-tratamento e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar*. Dissertação de M.Sc., Unicamp, Campinas, São Paulo (SP), Brasil.
- GREGG, D. J., SADDLER, J. N., 1996. "Factors affecting cellulose hydrolysis and the potential of enzyme recycle to enhance the efficiency of an integrated wood to ethanol process". *Biotechnology and Bioengineering*, v.51, pp. 375-383.
- GRIGGS, A. J., STICKEL, J. J., LISCHESKE, J. J., 2011a. "A mechanistic model for enzymatic saccharification of cellulose using continuous distribution kinetics I: Depolymerization by EGI and CBHI". *Biotechnology and Bioengineering*, v.109, pp. 665-675.
- GRIGGS, A. J., STICKEL, J. J., LISCHESKE, J. J., 2011b. "A mechanistic model for enzymatic saccharification of cellulose using continuous distribution kinetics II: Cooperative enzyme action, solution kinetics, and product inhibition". *Biotechnology and Bioengineering*, v.109, pp. 675-685.
- GUPTA, R., KUMAR, S., GOMES, J., KUHAD, R. C., 2012. "Kinetic study of batch and fed-batch enzymatic saccharification of pretreated substrate and subsequent fermentation to ethanol". *Biotechnology for Biofuels*, v.5:16, doi:10.1186/1754-6834-5-16.
- GUSAKOV, A. V., SINITSYN, A. P., KLYOSOV, A. A., 1985a. "Kinetics of the enzymatic hydrolysis of cellulose. I: A mathematical model for a batch reactor process". *Enzyme and Microbial Technology*, v.7, pp. 346-352.
- GUSAKOV, A. V., SINITSYN, A. P., KLYOSOV, A. A., 1985b. "Kinetics of the enzymatic hydrolysis of cellulose. II: A mathematical model for process in a plug flow column reactor". *Enzyme and Microbial Technology*, v.7, pp. 383-388.
- GUSAKOV, A. V., SINITSYN, A. P., 1992. "A theoretical analysis of cellulase product inhibition effect of cellulase binding constant, enzyme substrate ratio, and betaglucosidase activity on the inhibition pattern". *Biotechnology and Bioengineering*, v.40, pp. 663-671.
- HAHN-HÄGERDAL, B., GALBE, M., GORWA-GRAUSLUND, M. F., LIDÉN, G., ZACCHI, G., 2006. "Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today". *Trends in Biotechnology*, v.24, pp. 549-556.
- HODGE, D. B., KARIM, M. N., 2002. "Modeling and advanced control of recombinant *Zymomonas mobilis* fed-batch fermentation". *Biotechnology Progress*, v.18, pp. 572-579.
- HODGE, D. B., KARIM, M. N., SCHELL, D. J., McMILLAN, J. D., 2009. "Model-based fed-batch for high-solids enzymatic cellulose hydrolysis". *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.152, pp. 88-107.
- HOLTZAPPLE, M. T., CARAM, H. S., HUMPHREY, A. E., 1984. "Determining the inhibition constants in the HCH-1 model of cellulose hydrolysis". *Biotechnology and Bioengineering*, v.26, pp. 735-757.

- HOLTZAPPLE, M. T, COGNATA, M., SHU, Y., HENDRICKSON, C., 1990."Inhibition of *Trichoderma reesei* cellulase by sugars and solvents". *Biotechnology and Bioengineering*, v.36, pp. 275-287.
- HOSSEINI, S. A., SHAH, N., 2011. "Enzymatic hydrolysis of cellulose part II: Population balance modelling of hydrolysis by exoglucanase and universal kinetic model". *Biomass and Bioenergy*, v.35, pp. 3830-3840.
- HOSSEINI, S. A., SHAH, N., 2011a. "Modelling enzymatic hydrolysis of cellulose part I: Population balance modelling of hydrolysis by endoglucanase". *Biomass and Bioenergy*, v.35, pp. 3841-3848.
- HOSSEINI, S. A., SHAH, N., 2011b. "Enzymatic hydrolysis of cellulose part II: Population balance modelling of hydrolysis by exoglucanase and universal kinetic model". *Biomass and Bioenergy*, v.35, pp. 3830-3840.
- HOYER, K., GALBE, M., ZACCHI, G., 2010. "Effects of enzyme feeding strategy on ethanol yield in fed-batch simultaneous saccharification and fermentation of spruce at high dry matter". *Biotechnology for Biofuels*, v.3:14, doi:10.1186/1754-6834-3-14.
- IEA, 2013.*Key world energy statistic*. International Energy Agency, Paris, França. Disponível em: <<http://goo.gl/79G4tu>>. Acesso em: 17 mar. 2014.
- JACKSON, L. S., HEITMANN, J. A., JOYCE, T. W., 1993. "Enzymatic modifications of secondary fiber". *TAPPI Journal*, v.76, pp. 147-154.
- JØRGENSEN, H., VIBE-PEDERSEN, J., LARSEN, J., FELBY, C., 2007. "Liquefaction of lignocellulose at high-solids concentrations". *Biotechnology and Bioengineering*, v.96, pp. 862-870.
- JUHÁSZ, T., SZENGYEL, Z., RÉCZEY, K., SIIKA-AHO, M., VIKARI, L., 2005."Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources". *Process Biochemistry*, v.40, pp. 3519-3525.
- KADAM, K. L., RYDHOLM, E. C., McMILLAN, J. D., 2004. "Development and validation of a kinetic model for enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass". *Biotechnology Progress*, v.20, pp. 698-705.
- KHODAVERDI, M., JEIHANIPOUR, A., KARIMI, K., TAHERZADEH, M. J., 2012."Kinetic modeling of rapid enzymatic hydrolysis of crystalline cellulose after pretreatment by NMMO". *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v.39, pp. 429-438.
- KIM, M. H., LEE, S. B., RYU, D. D. Y., 1982. "Surface deactivation of cellulase and its prevention". *Enzyme and Microbial Technology*, v.4, pp. 99-103.

- KLYOSOV, A. A., 1990. "Trends in biochemistry and enzymology of cellulose degradation". *Biochemistry*, v.29, pp. 10577-10585.
- KRISTENSEN, J. B., BÖTJESSON, J. BRUUN, M., TJEMELD, F., JØRGENSEN, H., 2007. "Use of surface active additives in enzymatic hydrolysis of wheat straw lignocellulose". *Enzyme and Microbial Technology*, v.40, pp. 888-895.
- KRISTENSEN, J. B., FELBY, C., JØRGENSEN, H., 2009. "Yield-determining factors in high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose". *Biotechnology for Biofuels*, v.2:11, doi:10.1186/1754-6834-2-11.
- KUHAD, R. C., MEHTA, G., GUPTA, R., SHARMA, K. K., 2010. "Fed batch enzymatic saccharification of news paper cellulose improves the sugar content in the hydrolysates and eventually the ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*". *Biomass and Bioenergy*, v.34, pp. 1189-1194.
- KUMAR, D., MURTHY, G. S., 2011. "Impact of pretreatment and downstream processing technologies on economics and energy in cellulosic ethanol production". *Biotechnology for Biofuels*, v.4:27, doi:10.1186/1754-6834-4-27.
- KUMAR, D., MURTHY, G. S., 2013. "Stochastic molecular model of enzymatic hydrolysis of cellulose for ethanol production". *Biotechnology for Biofuels*, v.6:63, doi:10.1186/1754-6834-6-63.
- KUMAR, R.; WYMAN, C.E., 2009. "Cellulase adsorption and relationship to features of corn stover solids produced by leading pretreatments". *Biotechnology and Bioengineering*, v.103, pp. 252-267.
- LASER, M., SCHULMAN, D., ALLEN, S. G., LICHWA, J., ANTAL Jr., M. J., LYND, L. R., 2002. "A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol". *Bioresource Technology*, v.81, pp. 33-44.
- LEE, Y. H., FAN, L. T., 1982. "Kinetics studies of enzymatic hydrolysis of insoluble cellulose: analysis of the initial rates". *Biotechnology and Bioengineering*, v.24, pp. 2383-2406.
- LEE, Y. H., FAN, L. T., 1983. "Kinetic studies of enzymatic hydrolysis of insoluble cellulose (II): Analysis of extended hydrolysis times". *Biotechnology and Bioengineering*, v.25, pp. 936-966.
- LEE, S. B., SHIN, H. S., RYU, D. D. Y., MANDELS, M., 1982. "Adsorption of cellulase on cellulose: effect of physicochemical properties of cellulose on adsorption and rate of hydrolysis". *Biotechnology and Bioengineering*, v.24, pp. 2137-2153.
- LENZ, J., ESTERBAUER, H., SATTLER, W., SCHURZ, J., WRENTSCHUR, E., 1990. "Changes of structure and morphology of regenerated cellulose caused by acid and enzymatic hydrolysis". *Journal of Applied Polymer Science*, v.41, pp. 1315-1326.

- LEVINE, S. E., FOX, J. M., BLANCH, H. W., CLARK, D. S., 2010. "A mechanistic model of the enzymatic hydrolysis of cellulose". *Biotechnology and Bioengineering*, v.107, pp. 37-51.
- LIAO, W., LIU, Y., WEN, Z., FREAR, C., CHEN, S., 2008. "Kinetic modeling of enzymatic hydrolysis of cellulose in differently pretreated fibers from dairy manure". *Biotechnology and Bioengineering*, v.101, pp. 441-451.
- LYND, L. R., 1996a. "Overview and evaluation of fuel ethanol from cellulosic biomass: Technology, economics, the environment, and policy". *Annual Review of Energy and the Environment*, v.21, pp. 403-465.
- LYND, L. R., ELANDER, R. T., WYMAN, C. E., 1996b. "Likely features and costs of mature biomass ethanol technology". *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.57/58, pp. 741-761.
- LYND, L. R., WEIMER, P. J., VAN ZYL, W. H., PRETORIUS, I. S., 2002. "Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology ". *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v.66, pp. 506-577.
- MES-HARTREE, M., BOGAN, C. M., SADDLER, J. N., 1987. "Recycle of enzymes and substrate following enzymatic hydrolysis of steam pretreated aspen wood". *Biotechnology and Bioengineering*, v.30, pp. 558-564.
- McMILLAN, J. D., 1994. "Pretratment of Lignocellulosic Biomass". In: Himmel, M., et al., *Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production*, chapter 15, Washington, DC, ACS Symposium Series; American Chemical Society.
- MOHAGHEGHI, A., TUCKER, M., GROHMANN, K., WYMAN, C., 1992. "High solids simultaneous saccharification and fermentation of pretreated wheat straw to ethanol". *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.33, pp. 67-81.
- MONOT, F., POROT, P., 2013. *Status report on demonstration plants for advanced biofuels production - Biochemical Pathway -*. IFP Energies Nouvelles, França. Disponível em: <<http://www.biofuelstp.eu/spm5/pres/monot.pdf>>. Acesso em: 17 mar. 2014.
- MORALES-RODRIGUEZ, R., CAPRON, M., HUUSOM, J. K., SIN, G., 2010. "Controlled fed-batch operation for improving cellulose hydrolysis in 2G bioethanol production". *20th European Symposium on Computer Aided Process Engineering – ESCAPE20*. Ischia, Naples, Italy, June 6-9.
- MORALES-RODRIGUEZ, R., MEYER, A. S., GERNAEY, K. V., SIN, G., 2011a. "Dynamic model-based evaluation of process configurations for integrated operation of hydrolysis and co-fermentation for bioethanol production from lignocellulose". *Bioresource Technology*, v.102, pp. 1174-1184.
- MORALES-RODRIGUEZ, R., MEYER, A. S., GERNAEY, K. V., SIN, G., 2011b. "A mathematical model for simultaneous saccharification and co-fermentation

- (SSCF) of C6 and C5 sugars". *Chinese Journal of Chemical Engineering*, v.19, pp. 185-191
- MORIYA, R. Y., 2007. *Uso de xilanases e lacases de microrganismos no branqueamento de polpas Organosolv de palha de cana-de-açúcar e estudo dos derivados celulósicos obtidos*. Tese de D.Sc., USP, Lorena, São Paulo (SP), Brasil.
- MOSIER, N., WYMAN, C., DALE, B., ELANDER, R., 2005, "Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass". *Bioresource Technology*, v.96, pp. 673-686.
- MOUTTA, R. O., 2009. *Hidrólise ácida de palha de cana-de-açúcar para obtenção de hidrolisado hemicelulósico visando a utilização em processos de produção de bioetanol*. Dissertação de M.Sc., USP, Lorena, São Paulo (SP), Brasil.
- MUKATAKA, S., TADA, M., TAKAHASHI, J., 1983. "Effects of agitation on enzymatic hydrolysis of cellulose in a stirred-tank reactor". *Journal of Fermentation Technology*, v.61, pp. 615-621.
- MUTTURI, S., LIDEN, G., 2013. "Model-based estimation of optimal temperature profile during simultaneous saccharification and fermentation of *Arundo donax*". *Biotechnology and Bioengineering*, doi:10.1002/bit.25165.
- NOGUEIRA, L. A. H., 2008. *Bioetanol de cana-de-açúcar. Energia para o desenvolvimento sustentável / Coordenação BNDES e CGEE*. 1 ed. Rio de Janeiro, BNDES.
- NOVOZYMES, 2010. *Cellic<sup>®</sup> CTec2 and HTec2 - Enzymes for hydrolysis of lignocellulosic materials*. Application Sheet. Novozymes A/S, Denmark. Disponível em: <<http://goo.gl/V0mJGU>>. Acesso em: 04 mar. 2014.
- NYKO, D., GARCIA, J. L. F., MILANEZ, A. Y., DUNHAM, F. B., 2010. "A corrida tecnológica pelos biocombustíveis de segunda geração: uma perspectiva comparada". *Biocombustíveis-BNDES*, v.32, pp. 5-48.
- O'DWYER, J. P., ZHU, L., GRANDA, C. B., HOLTZAPPLE, M. T., 2007. "Enzymatic hydrolysis of lime-pretreated corn stover and investigation of the HCH-1 Model: Inhibition pattern, degree of inhibition, validity of simplified HCH-1 model". *Bioresource Technology*, v.98, pp. 2969-2977.
- OHLSON, I., TRÄGÅRDH, G., HAHN-HÄGERDAL, B., 1984. "Enzymatic hydrolysis of sodium hydroxide-pretreated sallow in an ultrafiltration membrane bioreactor". *Biotechnology and Bioengineering*, v.26, pp. 647-653.
- OHMINE, K., OOSHIMA, H., HARANO, Y., 1983. "Study on enzymatic hydrolysis of cellulose by cellulase from *Trichoderma viride*". *Biotechnology and Bioengineering*, v.25, pp. 2041-2053.

- OKAZAKI, M., MOO-YOUNG, M., 1978. "Kinetics of enzymatic hydrolysis of cellulose: Analytical description of a mechanistic model". *Biotechnology and Bioengineering*, v.20, pp. 637-663.
- OLIVEIRA, F. M. V., 2010. *Avaliação de diferentes pré-tratamentos e deslignificação alcalina na sacarificação da celulose de palha de cana*. Dissertação de M.Sc., USP, Lorena, São Paulo (SP), Brasil.
- OOSHIMA, H., BURNS, D. S., CONVERSE, A. O., 1990. "Adsorption of cellulase from *Trichoderma reesei* on cellulose and lignocellulosic residue in wood pretreated by dilute sulfuric acid with explosive decompression". *Biotechnology and Bioengineering*, v.36, pp. 446-452.
- PEITERSEN, N., MADEIROS, J., MANDELS, M., 1977. "Adsorption of *Trichoderma cellulase* on cellulose". *Biotechnology and Bioengineering*, v.19, pp. 1091-1094.
- PEREIRA Jr., N., COUTO, M. A., MELO, L. M., 2008. *Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production within the context of biorefinery*. 1ed. Rio de Janeiro. Escola de Química/UFRJ. Disponível em: <<http://goo.gl/IMqqqsE>>. Acesso em: 15 de novembro de 2013.
- PHILIPPIDIS, G. P., SMITH, T. K., WYMAN, C. E., 1993. "Study of the enzymatic hydrolysis of cellulose for production of fuel ethanol by the simultaneous saccharification and fermentation process". *Biotechnology and Bioengineering*, v.41, pp. 846-853.
- PIMENOVA, N. V., HANLEY, T. R., 2003. "Measurement of rheological properties of corn stover suspensions". *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.106, pp. 383-392.
- PRISTAVKA, A. A., SALOVAROVA, V. P., ZACCHI, Z., BEREZIN, I. V., RABINOVICH, M. L., 2000. "Enzyme regeneration during hydrolysis of steam-pretreated willow and requirement for cellulase complex composition" (Article in Russian). *Prikladnaia Biohimiia i Mikrobiologiia*, v.36, pp. 278-86.
- PRUNESCU R. M., SIN, G., 2013. "Dynamic modeling and validation of a lignocellulosic enzymatic hydrolysis process - A demonstration scale study". *Bioresource Technology*, v.150, pp. 393-403.
- PULS, J., WOOD, T. M., 1991. "The degradation pattern of cellulose by extracellular cellulases of aerobic and anaerobic microorganisms". *Bioresource Technology*, v.36, pp. 15-19.
- QING, Q., YANG, B., WYMAN, C. E., 2010. "Xylooligomers are strong inhibitors of cellulose hydrolysis by enzymes". *Bioresource Technology*, v.101, pp. 9624-9630.
- RABELO, C. S., 2007. *Avaliação de desempenho do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar*. Dissertação de M.Sc., Unicamp. Campinas, São Paulo (SP), Brasil.



- RABELO, C. S., 2010. *Avaliação e otimização de pré-tratamentos e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração*. Tese de D.Sc., Unicamp, Campinas, São Paulo (SP), Brasil.
- RFA, 2014. *Falling walls & rising tides: 2014 Ethanol industry outlook*. Renewable Fuels Association. Washington, D.C. Disponível em: <<http://goo.gl/bHKt9y>>. Acesso em: 17 mar. 2014.
- ROCHA, G. J. M., SILVA, F. T., ARAÚJO, G. T., CURVELO, A. A. S., 1997. "A fast and accurate method for determination of cellulose and polyoses by HPLC". In: *Proceedings of the V Brazilian Symposium on the Chemistry of Lignin and Other Wood Components*, v.5, pp. 113-115.
- ROSGAARD, L., ANDRIĆ, P., DAM-JOHANSEN, K., PEDERSEN, S., MEYER, A. S., 2007. "Effects of substrate loading on enzymatic hydrolysis and viscosity of pretreated barley straw". *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.143, pp. 27-40.
- RUBIN, E. M., 2008. "Genomics of cellulosic biofuels". *Nature*, v.454, pp. 841-845, doi:10.1038/nature07190.
- RUDOLF, A., ALKASRAWI, M., ZACCHI, G., LIDÉN, G., 2005. "A comparison between batch and fed-batch simultaneous saccharification and fermentation of steam pretreated spruce". *Enzyme and Microbial Technology*, v.37, pp. 195-204.
- RUDOLF, A., GALBE, M., LIDÉN, G., 2004. "Controlled fed batch fermentations of dilute acid hydrolysate in pilot development unit scale". *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.114, pp. 601-617.
- RUIZ, H. A., RUZENE, D. S., SILVA, D. P., QUINTAS, M. A. C., VICENTE, A. A., TEIXEIRA, J. A., 2011. "Evaluation of a hydrothermal process for pretreatment of wheat straw-effect of particle size and process conditions". *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, v.86, pp. 88-94.
- RYU, D. D. Y., LEE, S. B., 1986. "Enzymatic hydrolysis of cellulose: determination of kinetic parameters". *Chemical Engineering Communications*, v.45, pp. 119-134.
- SAAD, M. B., OLIVEIRA, L. R., CÂNDIDO, R. G., QUINTANA, G., ROCHA, G. J. M., GONÇALVES, A. R., 2008. "Preliminary studies on fungal treatment of sugarcane straw for Organosolv pulping". *Enzyme and Microbial Technology*, v.43, pp. 220-225.
- SAAD, M. B. W., 2010. *Avaliação técnica e econômica da produção de etanol via hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar*. Dissertação de M.Sc., USP. Lorena (SP), Brasil.
- SÁNCHEZ, O. J., CARDONA, C. A., 2008. "Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks". *Bioresource Technology*, v.99, pp. 5270-5295.

- SANTOS, F. A., QUEIRÓZ, J. H., COLODETTE, J. L., FERNANDES, S. A., GUIMARÃES, V. M., REZENDE, S. T., 2012. "Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol". *Química Nova*, v.35, pp. 1004-1010.
- SARKAR, N., GHOSH, S. K., BANNERJEE, S., AIKAT, K., 2012. "Bioethanol production from agricultural wastes: An overview". *Renewable Energy*, v.37, pp. 19-27.
- SASKA, M., OZER, E., 1995. "Aqueous extraction of sugarcane bagasse hemicellulose and production of xylose syrup". *Biotechnology and Bioengineering*, v.45, pp. 517-523
- SILVA, V. F. N., 2009. *Estudos de pré-tratamento e sacarificação enzimática de resíduos agroindustriais como etapas no processo de obtenção de etanol celulósico*. Dissertação de M.Sc., USP. Lorena, São Paulo (SP), Brasil.
- SIN, G., MEYER, A. S., GERNAEY, K. V., 2010. "Assessing reliability of cellulose hydrolysis models to support biofuel process design-Identifiability and uncertainty analysis". *Computers and Chemical Engineering*, v.34, pp. 1385-1392.
- SOARES, R. P., SECCHI, A. R., 2003. "EMSO: A new environment for modelling, simulation and optimisation". *Computer Aided Chemical Engineering*, v.14, pp. 947-952.
- SÖDERSTRÖM, J., GALBE, M., ZACCHI, G., 2004."Effect of washing on yield in one- and two-step steam pretreatment of softwood for production of ethanol". *Biotechnology Progress*, v.20, pp.744-749.
- SOUZA, R. B. A., CRUZ, A. J. G., "Pré-tratamento, hidrólise enzimática e fermentação da palha de cana-de-açúcar". *XIX simpósio nacional de bioprocessos e X simpósio de hidrólise enzimática de biomassas*, Foz de Iguaçu, PR, Brasil, 30 de julho-02 de agosto de 2013.
- SPINDLER, D. D., WYMAN, C. E., MOHAGHEGHI, A., GROHMANN, K., 1988. "Thermotolerant yeast for simultaneous saccharification and fermentation of cellulose to ethanol". *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.17, pp. 279-293.
- STEINER, W., SATTLER, W., ESTERBAUER, H., 1988."Adsorption of *Trichoderma reesei* cellulase on cellulose: experimental data and their different equations". *Biotechnology and Bioengineering*,v.32, pp. 853-865.
- SUGA, K., VAN DEDEM, G., MOO-YOUNG, M., 1975. "Degradation of polysaccharides by endo and exo enzymes: A theoretical analysis". *Biotechnology and Bioengineering*, v.17, pp. 433-439.
- SUN, Y., CHENG, J., 2002. "Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review". *Bioresource Technology*, v.83, pp. 1–11.

- SUN, Y., CHENG, J. J., 2005. "Dilute acid pretreatment of rye straw and bermuda grass for ethanol production". *Bioresource Technology*, v.96, pp. 1599-1606.
- TAHERZADEH, M. J., NIKLASSON, C., LIDÉN, G., 2000. "On-line control of fed-batch fermentation of dilute-acid hydrolyzates". *Biotechnology and Bioengineering*, v.69, pp. 330-338.
- TAO, L., ADEN, A., ELANDER, R. T., PALLAPOLU, V. R., LEE, Y. Y., GARLOCK, R. J., BALAN, V., DALE, B. E., KIM, Y., MOSIER, N. S., LADISCH, M. R., FALLS, M., HOLTZAPPLE, M. T., SIERRA, R., SHI, J., EBRIK, M. A., REDMOND, T., YANG, B., WYMAN, C. E., HAMES, M., THOMAS, S., WARNER, R. E., 2011. "Process and technoeconomic analysis of leading pretreatment technologies for lignocellulosic ethanol production using switchgrass". *Bioresource Technology*, v.102, pp. 11105-11114.
- TENGBORG, C., GALBE, M., ZACCHI, G., 2001. "Influence of enzyme loading and physical parameters on the enzymatic hydrolysis of steam-pretreated softwood". *Biotechnology Progress*, v.17, pp. 110-117.
- TENKANEN, M., PULS, J., POUTANEN, K., 1992. "Two major xylanases of *Trichoderma reesei*". *Enzyme and Microbial Technology*, v.14, pp. 566-574.
- TIETZ, N. W., 1976. In: *Clinical Guide to Laboratory Tests*. W.B. Saunders, Philadelphia, pp. 238-240.
- TOMÁS-PEJÓ, E., OLIVIA J. M., GONZÁLEZ A., BALLESTEROS, I., BALLESTEROS, M., 2009. "Bioethanol production from wheat straw by the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marximus* CECT 10875 in a simultaneous saccharification and fermentation fed-batch process". *Fuel*, v. 88, pp. 2142-2147.
- TSAI, C-T., MORALES-RODRIGUEZ, R., SIN, G., MEYER, A. S., 2014. "A dynamic model for cellulosic biomass hydrolysis: A comprehensive analysis and validation of hydrolysis and product inhibition mechanisms". *Applied Biochemistry and Biotechnology*, doi:10.1007/s12010-013-0717-x.
- UN, 2012. *Report of the United Nations conference on sustainable development*. In: Report A/CONF.216/16, United Nations, Rio de Janeiro (RJ), Brasil.
- UNICA, 2009. *Etanol e bioeletricidade: A cana-de-açúcar no futuro da matriz energética*. União da Indústria de Cana-de-açúcar, São Paulo (SP), Brasil.
- VAN WALSUM, G. P., ALLEN, S. G., SPENCER, M. J., LASER, M. S., ANTAL Jr., M. J., LYND, L. R., 1996. "Conversion of lignocellulosics pretreated with liquid hot water to ethanol". *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.57/58, pp. 157-170.

- VARGA, E., KLINKE, H. B., RÉCZEY, K., THOMSEN A. B., 2004. "High solid simultaneous saccharification and fermentation of wet oxidized corn stover to ethanol". *Biotechnology and Bioengineering*, v.88, pp. 567-574.
- WALD, S., WILKE, C. R., BLANCH, H. W., 1984. "Kinetics of the enzymatic hydrolysis of cellulose". *Biotechnology and Bioengineering*, v.26, pp. 221-230.
- WALKER, L. P., WILSON, D. B., 1991. "Enzymatic hydrolysis of cellulose: An overview". *Bioresource Technology*, v.36, pp. 3-14.
- WANDERLEY, A. M. C., MARTÍN, C., ROCHA, G. J. M., GOUVEIA, E. R., 2013. "Increase in ethanol production from sugarcane bagasse based on combined pretreatments and fed-batch enzymatic hydrolysis". *Bioresource Technology*, v.128, pp. 448-453.
- WEIMER, P. J., FRENCH, A. D., CALAMARI, T. A., 1991. "Differential fermentation of cellulose allomorphs by ruminal cellulolytic bacteria". *Applied and Environmental Microbiology*, v.57, pp. 3101-3106.
- WINGREN, A., GALBE, M., ZACCHI, G., 2003. "Techno-economic evaluation of producing ethanol from softwood: Comparison of SSF and SHF and identification of bottlenecks". *Biotechnology Progress*, v.19, pp. 1109-1117.
- WINGREN, A., SÖDERSTRÖM, J., GALBE, M., ZACCHI, G., 2004. "Process considerations and economic evaluation of two-step steam pretreatment for production of fuel ethanol from softwood". *Biotechnology Progress*, v.20, pp. 1421-1429.
- XIAO, Z., ZHANG, X., GREGG, D. J., SADDLER, J. N., 2004. "Effects of sugar inhibition on cellulases and  $\beta$ -glucosidase during enzymatic hydrolysis of softwood substrates". *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.115, pp. 1115-1126.
- YAN, S., YAO, J., YAO, L., ZHI, Z., CHEN, X., WU, J., 2012. "Fed batch enzymatic saccharification of food waste improves the sugar concentration in the hydrolysates and eventually the ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* H058". *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v.55, pp. 183-192.
- YANG, M., LI, W., LIU, B., LI, Q., XING, J., 2010. "High-concentration sugars production from corn stover based on combined pretreatments and fed-batch process". *Bioresource Technology*, v.101, pp. 4884-4888.
- ZHANG, J., SHAO, X., LYND, L. R., 2009. "Simultaneous Saccharification and Co-fermentation of paper sludge to ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* RWB222. Part II: Investigation of discrepancies between predicted and observed performance at high solids concentration". *Biotechnology and Bioengineering*, v.104, pp. 932-938.

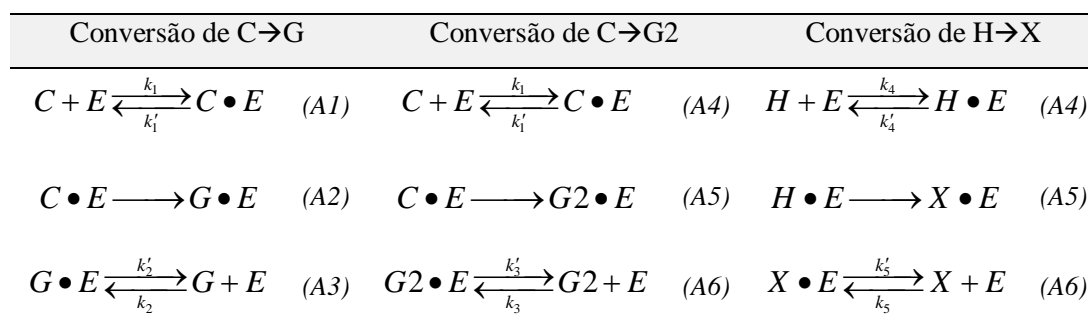
- ZHANG, Y-H. P., HONG, J., YE, X., 2009b. "Cellulase Assays". In: Jonathan R. Mielenz (eds), *Biofuels: Methods and Protocols*, v.581, chapter 14, Oak Ridge (TN), USA, © Humana Press.
- ZHANG, Y-H. P., LYND, L. R., 2004. "Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems". *Biotechnology and Bioengineering*, v.88, pp. 797-824.
- ZHANG, Y-H. P., LYND, L. R., 2006. "A functionally based model for hydrolysis of cellulose by fungal cellulase". *Biotechnology and Bioengineering*, v.94, pp. 888-898.
- ZHANG, Y-H. P., SCHELL, D. J., McMILLAN, J. D., 2007. "Methodological analysis for determination of enzymatic digestibility of cellulosic materials". *Biotechnology and Bioengineering*, v.96, pp. 188-194.
- ZHAO, X., DONG, L., CHEN, L., LIU, D., 2013. "Batch and multi-step fed-batch enzymatic saccharification of Formiline-pretreated sugarcane bagasse at high solid loadings for high sugar and ethanol titers". *Bioresource Technology*, v.135, pp. 350-356.
- ZHENG, Y., 2007. *Kinetic modeling of enzymatic saccharification and particleboard characteristics of saline biomass*. Ph.D thesis, University of California Davis, Davis (CA), USA.
- ZHENG, Y., PAN Z., ZHANG, R., JENKINS, B. M., 2009a. "Kinetic modeling for enzymatic hydrolysis of pretreated creeping wild ryegrass". *Biotechnology and Bioengineering*, v.102, pp. 1558-1569.
- ZHENG, Y., PAN, Z., ZHANG, R., WANG, D., 2009b. "Enzymatic saccharification of dilute acid pretreated saline crops for fermentable sugar production". *Applied Energy*, v.86, pp. 2459-2465.
- ZHOU, W., SCHÜTTLER, H.-B., HAO, Z., XU, Y., 2009a. "Cellulose hydrolysis in evolving substrate morphologies I: A general modeling formalism". *Biotechnology and Bioengineering*, v.104, pp. 261-274.
- ZHOU, W., HAO, Z., XU, Y., SCHÜTTLER, H.-B., 2009b. "Cellulose hydrolysis in evolving substrate morphologies II: Numerical results and analysis". *Biotechnology and Bioengineering*, v.104, pp. 275-289.
- ZHOU, W., XU, Y., SCHÜTTLER, H.-B., 2010. "Cellulose hydrolysis in evolving substrate morphologies III: Time-Scale analysis". *Biotechnology and Bioengineering*, v.107, pp. 224-234.

# ANEXO 1

## A1. SIMPLIFICAÇÃO DO MODELO CINÉTICO DE HIDRÓLISE

Baseado nos fundamentos da cinética enzimática, um único conjunto de parâmetros de inibição ( $K_{IG2}$ ,  $K_{IG}$  e  $K_{IX}$ ) pode ser considerado para as reações que ocorrem na interface sólido-líquido ( $r_1$ ,  $r_2$  e  $r_4$ ), uma vez que o complexo enzimático está sendo modelado como uma pseudo-enzima com uma única capacidade enzimática. A seguir é apresentado o raciocínio seguido para a simplificação.

Nas reações catalisadas por enzimas, uma enzima E, que é uma proteína ou uma substância parecida com propriedades catalíticas, liga a um substrato S transformando-o para produzir um produto P de maneira específica. Nos substratos celulósicos, as enzimas celulasas (CBH/EG) e hemicelulasas, modeladas neste trabalho como uma pseudo-enzima (E), atuam sinergicamente sobre a celulose (C) e hemicelulose (H), para formar glicose (G), celobiose (G2) e xilose (X). Um possível mecanismo destas reações é descrito pelas equações elementares A1-A6, onde C•E e H•E representam os complexos enzima-substrato, e G•E, G2•E e X•E os complexos enzima-produto.



As taxas de consumo de substrato e de formação de produtos são dadas pelas Equações A7-A11. Aplicando a hipótese de estado pseudo-estacionário (*Pseudo Steady State Hypothesis*, PSSH)<sup>17</sup>, obtém-se as Equações (A7b-A10b).

<sup>17</sup> A alta reatividade das moléculas dos intermediários ativos e sua baixa concentração permitem considerar que a taxa de formação seja igual à taxa de consumo, resultando em uma taxa de formação líquida igual a zero.

$$-r_C = k_1 \left( [C][E] - \frac{1}{K_{eq1}} [C \bullet E] \right) \quad (A7) \quad [C \bullet E] = K_{eq1} [C][E] \quad (A7b)$$

$$-r_H = k_4 \left( [H][E] - \frac{1}{K_{eq4}} [H \bullet E] \right) \quad (A8) \quad [H \bullet E] = K_{eq4} [H][E] \quad (A8b)$$

$$r_{G \bullet E} = k_2 \left( [G][E] - \frac{1}{K_{eq2}} [G \bullet E] \right) \quad (A9) \quad [G \bullet E] = K_{eq2} [G][E] \quad (A9b)$$

$$r_{G2 \bullet E} = k_3 \left( [G2][E] - \frac{1}{K_{eq3}} [G2 \bullet E] \right) \quad (A10) \quad [G2 \bullet E] = K_{eq3} [G2][E] \quad (A10b)$$

$$r_{X \bullet E} = k_5 \left( [X][E] - \frac{1}{K_{eq5}} [X \bullet E] \right) \quad (A11) \quad [X \bullet E] = K_{eq5} [X][E] \quad (A11b)$$

A concentração de enzima no sistema ( $E_B$ ) é igual à soma da enzima não ligada (E) mais a enzima dos complexos enzima-substrato e enzima-produto.

$$E_B = [E] + [C \bullet E] + [H \bullet E] + [G \bullet E] + [G2 \bullet E] + [X \bullet E] \quad (A12)$$

Substituindo as concentrações dos complexos (A7b-A11b) em (A12) e deixando [E] em evidência, obtém-se:

$$[E] = \frac{E_B}{1 + K_{eq1}[C] + K_{eq4}[H] + K_{eq2}[G] + K_{eq3}[G2] + K_{eq5}[X]} \quad (A13)$$

As taxas de formação de glicose, celobiose e xilose a partir da celulose e hemicelulose são proporcionais à velocidade de formação do complexo enzima-substrato.

$$r_{C \rightarrow G} = k_G [C \bullet E] \quad (A14)$$

$$r_{C \rightarrow G2} = k_{G2} [C \bullet E] \quad (A15)$$

$$r_{H \rightarrow X} = k_X [X \bullet E] \quad (A16)$$

Por fim, substituindo A7b, A8b e A13 em A14-A16, obtemos a expressão para as velocidades de hidrólise do substrato.

$$r_{C \rightarrow G} = \frac{k_G K_{eq1} E_B [C]}{1 + K_{eq1} [C] + K_{eq4} [H] + K_{eq2} [G] + K_{eq3} [G2] + K_{eq5} [X]} \quad (A17)$$

$$r_{C \rightarrow G2} = \frac{k_{G2} K_{eq3} E_B [C]}{1 + K_{eq1} [C] + K_{eq4} [H] + K_{eq2} [G] + K_{eq3} [G2] + K_{eq5} [X]} \quad (A18)$$

$$r_{H \rightarrow X} = \frac{k_X K_{eq5} E_B [H]}{1 + K_{eq1} [C] + K_{eq4} [H] + K_{eq2} [G] + K_{eq3} [G2] + K_{eq5} [X]} \quad (A19)$$

A analogia entre as Equações A17 e A19 com as Equações 3.6, 3.7 e 3.9 do modelo é evidente. No modelo, a enzima ligada  $E_B$ , modelada usando a isoterma de Langmuir e uma constante de reação só no numerador, substitui o produto de constantes das expressões acima. Os termos no denominador relacionados com o substrato não aparecem e as chamadas constantes de inibição são independentes para cada reação. No entanto segundo o mecanismo desenvolvido, parece razoável utilizar um só conjunto de parâmetros de inibição para as três reações heterogêneas ( $r_1$ ,  $r_2$  e  $r_4$ ), uma vez que a enzima tem sido modelada como uma pseudo-enzima com múltiplas atividades enzimáticas.



## ANEXO 2

### A2. EFEITO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS SOBRE OS PARÂMETROS

Para mostrar a dependência dos parâmetros cinéticos com as condições experimentais, foi feita uma análise dos valores dos parâmetros estimados com os dados de cada experimento. Os resultados sugerem uma dificuldade do modelo para achar um conjunto único de parâmetros que consiga descrever satisfatoriamente o comportamento da hidrólise para diferentes condições de carga da enzima, sólidos e açúcares iniciais.

Os resultados da estimação dos parâmetros do modelo usando tanto todos os dados dos experimentos como cada um dos experimentos da Tabela 3.1, incluindo os ensaios com diferente carga enzimática (5FPU-60FPU), com diferente carga de sólidos (10% SOL e 20% SOL) e diferente carga inicial de açúcares (10X, 30G, 60G e 10G2) são apresentados na Tabela A2.1.

Tabela A2.1. Parâmetros estimados do modelo para diferentes condições experimentais

PARÂMETRO	$k_{1r}$	$k_{2r}$	$k_{3r}$	$k_{4r}$	$K_{IG2}$	$K_{IG}$	$K_{IX}$	$K_{3IG}$	$K_{3IX}$	$K_{3M}$
UNIDADES	$l/g/h$	$l/g/h$	$l/h$	$l/g/h$	$g/l$	$g/l$	$g/l$	$g/l$	$g/l$	$g/l$
5FPU	0,031	1,57	231,1	21,28	0,134	0,558	4,12	0,032	53,13	42,52
10FPU	0,057	1,49	187,0	11,57	0,715	1,04	5,39	0,528	37,52	74,71
15FPU	0,020	0,347	124,6	4,63	2,62	8,50	6,18	0,677	12,77	68,98
20FPU	0,071	2,68	188,1	32,10	0,030	3,92	12,59	0,032	21,97	41,22
25FPU	0,077	2,93	164,5	38,02	0,045	2,96	0,840	0,032	19,20	65,36
30FPU	0,065	1,98	165,5	29,78	0,135	4,08	2,65	0,070	20,81	60,22
60FPU	0,094	2,94	173,1	33,66	0,432	1,91	6,21	0,009	46,06	32,36
10% SOL	0,012	0,696	184,2	21,07	1,60	1,63	10,45	0,032	49,51	3,69
20% SOL	0,068	1,90	177,2	32,53	0,018	0,433	11,02	9,83	0,325	66,56
10X	0,092	3,00	170,1	43,76	0,123	0,318	18,08	0,028	42,49	77,77
30G	0,041	0,473	5,90	17,72	0,196	4,16	18,35	22,67	78,95	102,6
60G	0,364	0,656	209,2	18,32	2,74	1,44	3,52	0,012	95,53	0,107
10G2	0,150	4,16	1,97	33,66	0,440	0,503	5,87	1,99	177,7	55,85
TODOS_EXP	0,015	0,548	170,9	6,85	6,02	3,57	5,45	0,032	79,42	45,60

Os resultados da Tabela A2.1 são apresentados graficamente nas Figuras A2.1-A2.10, para uma melhor análise da dependência dos parâmetros com as condições experimentais.

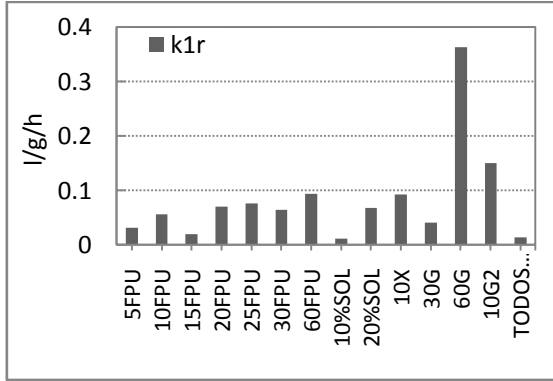


Figura A2.1. Valores para  $k_{1r}$  em função das condições experimentais

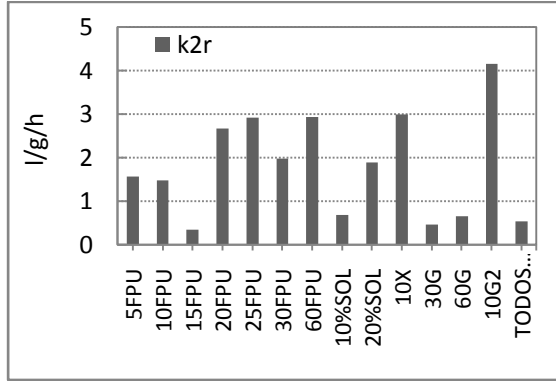


Figura A2.2. Valores para  $k_{2r}$  em função das condições experimentais

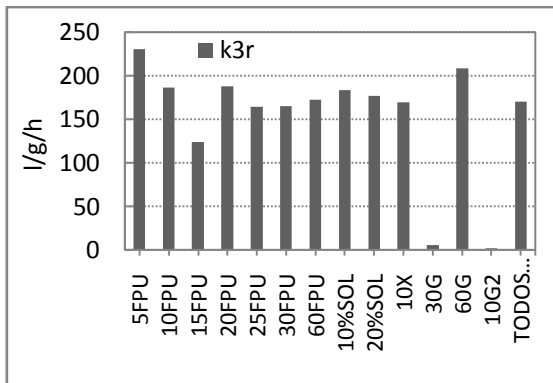


Figura A2.3. Valores para  $k_{3r}$  em função das condições experimentais

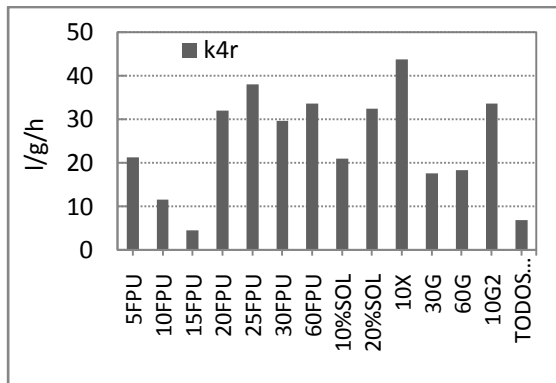


Figura A2.4. Valores para  $k_{4r}$  em função das condições experimentais

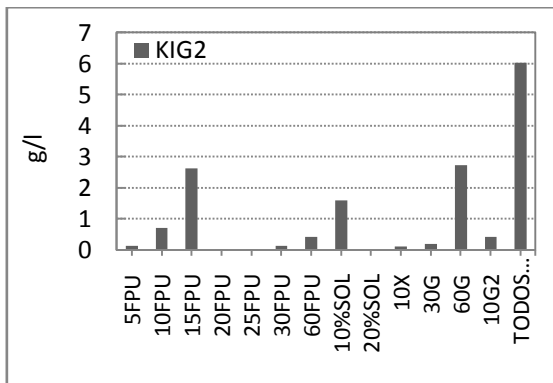


Figura A2.5. Valores para  $K_{IG2}$  em função das condições experimentais

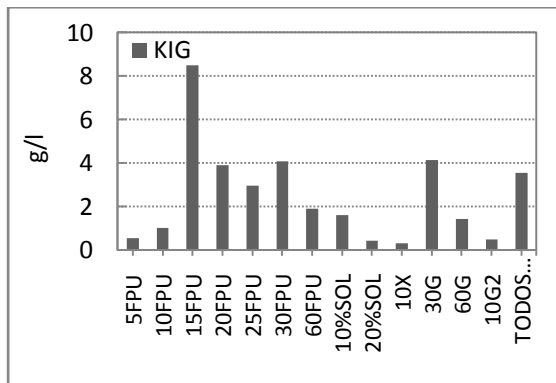


Figura A2.6. Valores para  $K_{IG}$  em função das condições experimentais

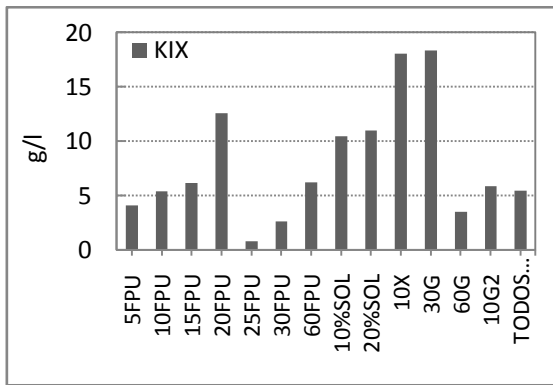


Figura A2.7. Valores para  $K_{IX}$  em função das condições experimentais

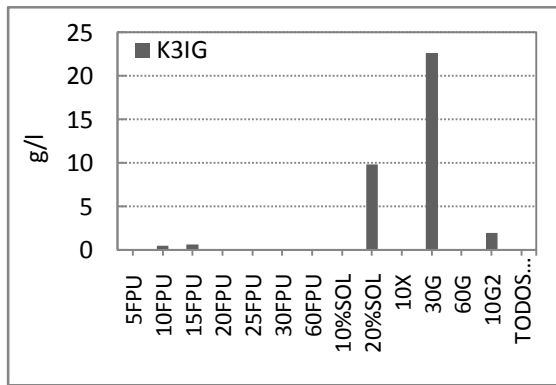


Figura A2.8. Valores para  $K_{3IG}$  em função das condições experimentais

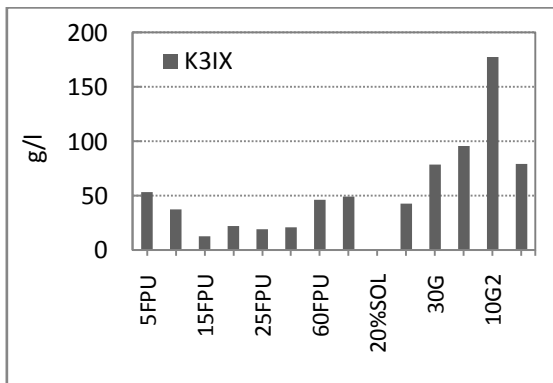


Figura A2.9. Valores para  $K_{3IX}$  em função das condições experimentais

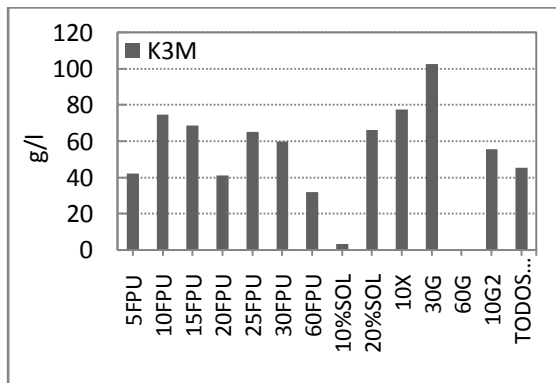


Figura A2.10. Valores para  $K_{3M}$  em função das condições experimentais