



MODELAGEM DA REAÇÃO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE SUBSTRATO CELULÓSICO

Felipe Tadeu Fiorini Gomide

Tese de Doutorado 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 Doutor em Engenharia Química.

Orientadores: Tito Lívio Moitinho Alves
 Elba Pinto da Silva Bon

Rio de Janeiro
Fevereiro de 2019

MODELAGEM DA REAÇÃO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE SUBSTRATO
CELULÓSICO

Felipe Tadeu Fiorini Gomide

TESE 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 DOUTOR EM
CIÊNCIAS EM ENGENHARIA QUÍMICA.

Examinada por:

Prof. Tito Lívio Moitinho Alves, D.Sc.

Prof. Elba Pinto da Silva Bon, D.Sc.

Prof. Ariane Leites Larentis, D.Sc.

Prof. Argimiro Resende Secchi, D.Sc.

Prof. Ricardo Sposina Sobral Teixeira, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ – BRASIL
FEVEREIRO DE 2019

Gomide, Felipe Tadeu Fiorini

Modelagem da Reação de Hidrólise Enzimática de Substrato Celulósico / Felipe Tadeu Fiorini Gomide. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2019.

XXIX, 249 p.: il.; 29,7cm.

Orientadores: Tito Lívio Moitinho Alves

Elba Pinto da Silva Bon

Tese (doutorado) – UFRJ/COPPE/Programa de Engenharia Química, 2019.

Referências Bibliográficas: p. 167 – 195.

1. Celulose. 2. Propriedades estruturais. 3. Hidrólise enzimática. 4. Modelagem matemática. 5. Celulases. I. Alves, Tito Lívio Moitinho *et al.* II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Química. III. Título.

“Eu não te disse que se você mexesse
iria cair?” Tânia Mara

Agradecimentos

A minha decisão de fazer doutorado na UFRJ foi aceitar um enorme desafio, decisão de correr vários riscos e arcar com suas consequências. Se lançar ao mundo. Assumir o maior compromisso acadêmico da minha vida, o doutorado, em uma área diferente à da minha graduação. Foi ouvir de vários que era loucura. Na prática, consistia em simplesmente em aprender. Aprender a me comunicar com fenômenos naturais usando linguagem matemática em um ambiente de programação, aprender a viver em uma cidade situada fisicamente logo alí (de mineiro) mas com cultura e estilo de vida sensivelmente diferentes. Aprender a ter liberdade, insegurança, responsabilidade, privacidade. Tudo passou por profunda ressignificação. Muitas foram as dificuldades, mas também os aprendizados. Mas o maior desafio ainda permanece. Aprender a aprender.

Minhas conquistas não são fruto apenas de minha dedicação. Agradeço minha mãe Tânia pelo seu ensinamento de colossal garra e esforço, por meio do exemplo e honestidade. Seus ensinamentos sólidos são irretocáveis na minha vida e de meu irmão Artur, sempre lutando ao seu lado para construir o presente e o futuro da nossa família. Diante dos desafios, ficarmos sempre juntos foi nossa melhor escolha. Tenho orgulho de nós. Agradeço também o carinho do meu pai, por se manter sempre presente e amigo. A Tia Vanda, Tio Waldir e Juninho, por ampliarem minhas visões de família.

Agradeço ao Douglas, pelo amor, companheirismo e paciência. Minha trajetória até aqui teve mais suavidade e significado por você estar ao meu lado em minha vida.

A todos meus professores até aqui. Meu muito obrigado.

Eu não teria conseguido finalizar essa jornada sem o apoio do meu orientador Tito Lívio, que acreditou, tanto no meu projeto, quanto na minha perspectiva de empreender, ajudada pela equipe do COPPE/IDEA do Alfredo Laufer e Juliana de Castro.

Também devo meus agradecimentos à minha coorientadora Elba e toda a equipe do laboratório Bioetanol, que me ensinou a trabalhar com as técnicas envolvendo biomassa lignocelulósica, em especial Raul, Rodrigo, Marcella, Ricardo e Sharon, também Marcello, Daniel e Leandro.

Quero agradecer a todo laboratório de bioprocessos 1 e 2, em especial Aline e Isis pela paciência em conciliarmos metas para melhorarmos juntos nosso ambiente de trabalho. Kalil, Mônica e Letícia por contribuírem no isolamento de leveduras. Mairely pelo companheirismo doce no ambiente de trabalho.

Também agradeço aos amigos da G-130 que contribuíram diretamente para a ampliação do meu conhecimento em engenharia como um todo. Fomos grandes parceiros. Jimena, Bruno, Mayara, Tahyná, Carol Sá, Jonildo, Carol (bonita), Roymel, Alessandra, Fábio (Fabinho), Afrânio, Amanda Lemette, Primo (Charles), Rafael Marinho, Sérgio e Daniel. Em especial ao Guilherme Cassol, Lucas e ao Javier por me ajudarem a ampliar meus conhecimentos sobre modelagem e estimação. A Mariana Kuster, a emburrada mais adorável do mundo, por todo companheirismo quando trabalhamos lado a lado no laboratório Bioetanol. Também aos divos Tiago Lemos, pela bela amizade, Leonardo, Cauê e Pedro Alijó que faziam dos meus cafés da tarde momentos de deleite e também aprendizado.

Não poderia me esquecer do Maurício e Dorival que, juntos com o Gobério, formamos uma bela equipe empenhada em nos fazermos voz dos alunos como representantes discentes. Quero ressaltar a contribuição do Jeiverson Gobério por ter sistematicamente me ensinado muito, tanto a modelar, quanto a programar em Mathematica. Muitas vezes em reuniões em sua casa madrugada a dentro. Obrigado à Idia pela paciência, mesmo querendo me matar nessas noites. Também ao Maurício por todas discussões muito produtivas sobre a estrutura do meu modelo matemático, e pela revisão do meu texto.

Agradeço também aos funcionários do PEQ, em especial a Vera, que me acudiu em vários imbróglis acadêmicos.

Agradeço toda a equipe do laboratório de biocatálise do INT. Em especial a pessoa da Ayla, que contribuiu imensamente para a realização desse trabalho e que guia sua equipe pelo seu exemplo de retidão e cuidado. Agradeço ao Betinho, pelo seu exemplo de persistência e pelas ótimas conversas.

A natureza interdisciplinar desse trabalho me colocou em movimento pela UFRJ e me fez conhecer vários de seus rincões. Me aventurei em meio de métodos e técnicas em outras áreas de conhecimento básico para contribuir com essa obra, e fui desafiado a

enfrentar a realidade de desmonte de educação e da pesquisa e desenvolvimento, evidente pela escassez de recursos materiais para a realização do meu trabalho. Diante das dificuldades, só não estive desamparado porque encontrei parceiros e amigos em vários locais que acreditaram em minha pessoa e meu propósito. Quero agradecer profundamente às equipes dos laboratórios NUCAT (I-132), Griffit, PAM, LabPol, EngePol, do Programa de Engenharia Química da COPPE. Também à equipe do Laboratório LMCP (IMA), CENANO (INT), Laboratório de Hidrogênio (MetalMat), Laboratório de Investigação de Estrutura Química e Nanotecnologia (Interlab/IQ), Biological System Engineering Group (Biose) e Laboratório de Tecnologia do Hidrogênio (LabTech) ambos da Escola de Química e ao Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (LabTif/Fafar/CCS). Obrigado. Obrigado mesmo.

Agradeço aos colaboradores da plataforma Sci-hub por democratizarem o acesso ao conhecimento, um direito humano muitas vezes dificultado às nações mais pobres.

Agradeço o CNPq por ter me assistido com bolsa para pesquisa.

Agradeço ao Felipe Carvalho, Nayher Clavijo e Reinaldo Supelano por me receberem em suas casas quando não mais recebia bolsa e ajudaram a perseguir meu sonho. Amigos que jamais me esquecerei.

Obrigado ao guerreiro besouro por me conduzir em segurança para faculdade e de volta para casa e por estragar sempre em lugares estratégicos, permitindo seu conserto menos complicado. E ao Pedro por ter me resgatado nos lugares mais improváveis.

Obrigado aos amigos da Ilha do Governador, principalmente os do grupo de carona.

Obrigado à todos amigos e amigas que indiretamente contribuíram com esse trabalho, como o Lucas por ter emprestado o seu computador quando o meu estragou. E outros muitos, que nos doamos quando mais nos precisávamos.

Se toda bondade a mim dirigida coubesse em um nome, ousaria agradecer à Deus. Obrigado por viver e aprender a cada dia.

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

MODELAGEM DA REAÇÃO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE SUBSTRATO CELULÓSICO

Felipe Tadeu Fiorini Gomide

Fevereiro/2019

Orientadores: Tito Lívio Moitinho Alves

Elba Pinto da Silva Bon

Programa: Engenharia Química

Nesse trabalho foram desenvolvidos vários estudos para produzir modelos cinéticos alternativos de hidrólise enzimática com respeito às características do substrato. Inicialmente, foi determinada a metodologia mais apropriada para calcular o índice de cristalinidade de uma mistura de celulosas cristalina e amorfa, além terem sido gerados materiais com características específicas de conteúdo amorfo e cristalino a partir de pré-tratamentos de celulose. O pré-tratamento com moínho de bolas planetário por 2:30 h a 400 rpm e líquido iônico ([EMIM][OAc]) a 120°C/120 min geraram diferentes materiais com propriedades exclusivas de tamanho de partícula, cristalinidade, morfológicas e de área superficial que influenciaram significativamente na sua hidrólise por extratos enzimáticos Celluclast 1.5L e Novozymes N188. Dois modelos cinéticos admitiam diferentes características do sistema reacional para as enzimas e substrato, cujos parâmetros foram estimados utilizando dados experimentais da literatura. No modelo com celulose em uma fase, descreveu-se o sistema contendo celulase e β -glicosidase, adsorvíveis e inibíveis e conversão à glicose estritamente hidrolisando celobiose. No modelo com celulose em duas fases, verificou-se maior taxa hidrolítica na degradação da celulose amorfa sobre a cristalina, bem como maior adsorção e maior inibição das celulases catalisando a celulose amorfa. Por meio dos modelos desenvolvidos e dados experimentais de celulose modificada, foram expandidas as influências das características estruturais da celulose pura sobre sua cinética.

Abstract of Thesis presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Science (D.Sc.)

MODELLING OF REACTION OF ENZYMATIC HYDROLYSIS OF CELLULOSIC SUBSTRATE

Felipe Tadeu Fiorini Gomide

February/2019

Advisors: Tito Lívio Moitinho Alves

Elba Pinto da Silva Bon

Department: Chemical Engineering

Several studies were developed in this work to produce alternative kinetic models of enzymatic hydrolysis with respect to the characteristics of the substrate. First, the most appropriate methodology for calculating the crystallinity index of a mixture of crystalline and amorphous celluloses was determined, in addition to generating materials with specific characteristics of amorphous and crystalline content from cellulose pretreatments. The pretreatment with planetary ball mill for 2:30 h at 400 rpm and ionic liquid ([EMIM][OAc]) at 120°C/120 min generated different materials with unique properties of particle size, crystallinity, morphology, and surface area that significantly influenced its hydrolysis by enzymatic extracts Celluclast 1.5L and Novozymes N188. Additionally, the adsorption isotherm of Celluclast 1.5L was obtained, but not for the laboratory extract of *Aspergillus awamori*. Two kinetic models admitted different characteristics of the reaction system for the enzymes and the substrate, whose parameters were estimated using experimental data from the literature. In the cellulose model in one phase, it was described the system containing cellulase and cellobiase, adsorbable and inhibitable, and conversion to glucose strictly hydrolyzing cellobiose. In the two-phase cellulose model, a higher hydrolytic rate was found in the degradation of amorphous cellulose on crystalline, as well as higher adsorption and stronger inhibition of cellulases catalyzing amorphous cellulose. By the developed models and experimental data on modified cellulose, the influence of pure cellulose structural characteristics on its kinetic was expanded.

Sumário

Lista de Figuras	xiv
Lista de Tabelas.....	xix
Lista de Símbolos	xxi
Lista de Abreviaturas.....	xxviii
1. Introdução.....	1
2. Revisão Bibliográfica	6
2.1. A constituição da biomassa lignocelulósica	6
2.2. A celulose	7
2.3. A produção do etanol celulósico: pré-tratamentos como promotores da reatividade do substrato	13
2.3.1. O efeito do pré-tratamento sobre o substrato.	14
2.3.2. Tipos de pré-tratamento.	15
2.3.3. Tipos de pré-tratamento: físico, por moinho de bolas.....	15
2.3.4. Tipos de pré-tratamento: químico, por líquidos iônicos.	16
2.4. A produção do etanol celulósico: hidrólise.....	21
2.4.1. A estrutura e função de celulasas	22
2.4.2. Tipo de celulasas	25
2.4.3. Inibição das celulasas	38
2.4.4. Sinergismo entre as celulasas	40
2.4.5. Obtenção das celulasas.....	42
2.5. Modelagem matemática do processo de hidrólise enzimática.....	45
3. Justificativa.....	66
4. Objetivo	69
Objetivo Principal	69
Objetivos Específicos.....	69
5. Materiais e métodos.....	70

5.1. Hidrólise enzimática	70
5.1.1. Atividade beta-glicosidásica	70
5.1.2. Atividade celulásica pelo método do Filtro de papel (FPA)	71
5.1.3. Dosagem de proteínas pelo método de Coomassie Blue G-250 (Bradford)	71
5.1.4. Determinação de carboidratos solúveis.....	72
5.2. Análise da cristalinidade de uma mistura de celulose microcristalina e carboximetilcelulose	73
5.3. Estudos em pré-tratados de Avicel PH-101	73
5.3.1. Pré-tratamento de Avicel por moinho de bolas.....	73
5.3.1.1. Preparação para caracterizações físicas estruturais do substrato pré-tratado por moinho de bolas.....	74
5.3.1.2. Análise da área por Adsorção de Nitrogênio a 77K pelo método de Brunauer, Emmet e Taller – BET da celulose pré-tratada por moinho de bolas.	75
5.3.2. Pré-tratamento de Avicel por líquido iônico ([EMIM][OAc]).....	75
5.3.2.1. Preparação para caracterizações físicas estruturais do substrato pré-tratado por ([EMIM][OAc]).....	77
5.3.3. Caracterizações estruturais em ambos os pré-tratados de Avicel PH-101	78
5.3.3.1. Análise de difração de raios-X – DRX – Adaptado de (de Oliveira Mouta, 2013).	78
5.3.3.2. Fisissorção de Nitrogênio a 77K e análise da área por pelo método de Brunauer, Emmet e Taller – BET da celulose pré-tratada por ([EMIM][OAc]).	79
5.3.3.3. Análise estrutural e morfológica por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	80
5.3.3.4. Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)	80
5.3.4. Hidrólise em pré-tratados de Avicel PH-101	81
5.3.4.1. Hidrólise de Avicel PH-101 pré-tratado por moinho de bolas e líquido iônico ([EMIM][OAc])	81

5.3.4.2. Hidrólise de avicel pré-tratado por moinho de bolas para investigação de alteração do padrão cristalino.....	81
5.4. Modelagem matemática.....	82
5.4.1. Simulação de modelos adaptados para descrever diferentes componentes e rotas reacionais.....	82
5.4.2. Caso 1: Adaptação do modelo de Tsai <i>et al.</i> , (2014) para celulose em uma fase, sorção enzimática transiente, inativação celulásica e sistema de equações diferencial	82
5.4.3. Caso 2: Adaptação do modelo de Tsai <i>et al.</i> , (2014) para celulose em duas fases, sorção enzimática transiente dependente de área superficial do substrato, inativação celulásica e sistema de equações diferencial	88
5.4.4. Descrição do modelo.....	92
5.4.5. Estimação de parâmetros.....	93
5.4.6. Resolução numérica dos modelos	94
6. Resultados.....	95
6.1. Correlação da fração mássica e cristalinidade de substrato celulósico .	95
6.2. Pré-tratamento de Avicel por moinho de bolas.....	99
6.3. Pré-tratamento de Avicel PH-101 por líquido iônico ([EMIM][OAc])....	108
6.3.1. Caracterização de pré-tratados a 120°C em diferentes tempos de exposição	108
6.3.2. Caracterização e hidrólise de pré-tratados em diferentes temperaturas e tempos de exposição	116
6.3.3. Caracterização dos resíduos de hidrólise de Avicel pré-tratado a 120°C por 120 min	120
6.4. Modelagem matemática.....	127
6.4.1. Simulação de modelos adaptados para descrever diferentes componentes e rotas reacionais.....	127

6.4.1.1. Caso 1: Adaptação do modelo de Tsai <i>et al.</i> (2014) para celulose em uma fase, sorção enzimática transiente, inativação celulásica e sistema de equações diferencial	127
6.4.1.2. Caso 2: Adaptação do modelo de Tsai <i>et al.</i> (2014) para celulose em duas fases, sorção enzimática transiente dependente de área superficial do substrato, inativação celulásica e sistema de equações diferencial	131
6.5. Estimação de parâmetros	136
6.5.1. Estimação do modelo do Caso 1: Adaptação do modelo de Tsai <i>et al.</i> (2014) para celulose em uma fase, sorção enzimática transiente, inativação celulásica e sistema de equações diferencial	136
6.5.2. Estimação do modelo do Caso 2: Adaptação do modelo de Tsai <i>et al.</i> (2014) para celulose em duas fases, sorção enzimática transiente dependente de área superficial do substrato, inativação celulásica e sistema de equações diferencial....	146
7. Conclusões.....	161
8. Perspectivas Futuras	166
Bibliografia.....	167
Anexo I – Adaptação do modelo de Langmuir para adsorção de enzimas. ...	196
Anexo II – Aproximação matemática para obtenção das equações de taxa reacional.....	198
Anexo III – Resultados de simulação da Seção 6.4.1.2 (Caso 2).....	201
Anexo IV – Dados experimentais utilizados em estimação	206
Anexo V – Tabela de valores de correlação paramétrica	210
Anexo VI – Resultados da estimação do modelo do Caso 1	213
Anexo VII – Resultados da estimação do modelo do Caso 2	230
Anexo VIII – Dados adicionais utilizados na estimação do Caso 2.....	247

Lista de Figuras

Figura 1 – Estrutura da biomassa vegetal, desde a planta até seus componentes em representação molecular.....	6
Figura 2 – Composição química e estrutura cristalográfica da celulose a partir da união de β -D-glicopiranoses.....	8
Figura 3 – Polimorfismo de celulose em visão lateral e superior e cristais da forma I α , I β e II.....	9
Figura 4 – Modelo de tamanho e formatos de microfibrilas de celulose I β a partir de dados de (RMN) em tecidos vegetais	11
Figura 5 – Seção de fibra de celulose, evidenciando regiões cristalinas, amorfas e também celulosas interfibrilares	12
Figura 6 – Configurações de operação de moagem por moinho de bolas	16
Figura 7 – Estrutura e numeração da cadeia do Líquido Iônico acetato de 1-Etil-3-metilimidazólio ([EMIM][OAc])	18
Figura 8 – Representação esquemática do processo de formação de celulose II a partir do tratamento de celulose I com líquidos iônicos.....	19
Figura 9 – Estrutura de celulase fúngica em verde-água, com destaque dos seus três principais domínios: domínio catalítico, peptídeo de ligação e domínio de ligação a carboidrato.....	22
Figura 10 – Similaridades estruturais nas diferentes famílias celulásicas das GH e as atividades catalisadas por essas subunidades catalíticas	25
Figura 11 – Estrutura tridimensional da TrCel7a com túnel possuindo substrato no sítio catalítico flanqueado por alças fechadas formando o túnel onde a celulose é desconstituída	27
Figura 12 – Ciclo processivo hidrolítico das CBH I.....	29
Figura 13 – Ciclo processivo hidrolítico das CBH II	33
Figura 14 – Estrutura tridimensional da TrCel7b com túnel possuindo substrato no sítio catalítico flanqueado por menos alças, também mais abertas	35

Figura 15 – Estrutura tridimensional de β -glicosidase II de <i>Hypocrea jecorina</i> (TrCell1a).	36
Figura 16 – Mecanismos catalíticos das β -glicosidases	37
Figura 17 – Mecanismo de ação conjunta de celulases e LPMOs na degradação da celulose	41
Figura 18 – Estruturas cristalográficas disponíveis das celulases de <i>Hypocrea jecorina</i> (<i>Trichoderma reesei</i>) e sua classificação para as diferentes famílias de glicosil-hidrolases (GH) e atividades enzimáticas existentes	42
Figura 19 - Efeito da carga inicial de enzimas no progresso da reação hidrolítica.	53
Figura 20 - Rota reacional de hidrólise enzimática da celulose até glicose, evidenciando as inibições por glicose, celobiose e xilose.	55
Figura 21 - Diferentes rotas reacionais de modelos oriundos de modificações do modelo de Kadam et al. (2004).	59
Figura 22 – Rota reacional do modelo cinético de Tsai et al, (2014) adaptado e concebendo a celulose em uma fase e conversão direta da celulose em glicose.	84
Figura 23 – Rota reacional do modelo cinético de Tsai et al, (2014) adaptado para dois substratos e duas enzimas.	89
Figura 24 – Difratoograma das misturas de celulose cristalina para cromatografia e carboximetilcelulose, com diferentes frações percentuais de material cristalino na mistura.	95
Figura 25 – Cristalinidade da mistura de celulose cristalina para cromatografia e carboximetilcelulose.....	97
Figura 26 – Difratoogramas de Avicel nativo e pré-tratado por moinho de bolas.	100
Figura 27 – Hidrólise de Avicel PH-101 pré-tratado por moinho de bolas utilizando enzima Celluclast 1.5L e extrato <i>Trichoderma reesei</i> RUT C30.....	101
Figura 28 – Difratoogramas de Avicel nativo e pré-tratado por moinho de bolas (MB) após a hidrólise utilizando enzima Celluclast 1.5L e extrato <i>Trichoderma reesei</i> RUT C30, ambas suplementadas por extrato de <i>Aspergillus awamori</i>	102

Figura 29 – Índice de cristalinidade do resíduo de substrato de reação de hidrólise com celulose pré-tratada por moinho de bolas após 48h de hidrólise utilizando extratos de Celluclast 1.5L e RUT C30.	103
Figura 30 – Área superficial BET de Avicel PH-101 pré-tratado por moinho de bolas por fisissorção de N ₂	103
Figura 31 -Distribuição do tamanho de partícula para Avicel PH-101 não pré-tratada (NPA) e tratada por moinho de bolas (BMA) com representação boxplot dos dados.....	104
Figura 32 – Micrografia eletrônica de Avicel PH-101 com e sem pré-tratamento por moinho de bolas	106
Figura 33 – Hidrólise de Avicel PH-101 não pré-tratado (NPA) e pré-tratado por moinho de bolas (BMA).....	107
Figura 34 – Difractogramas de Avicel PH-101 pré-tratados em diferentes tempos por ([EMIM][OAc]) a 120°C.	109
Figura 35 – Índice de cristalinidade para diferentes alomorfos de celulose dos pré-tratados de Avicel PH-101 com ([EMIM][OAc]) a 120°C em diferentes tempos de exposição.	110
Figura 36 – Área superficial BET de Avicel PH-101 pré-tratada com ([EMIM][OAc]) a 120°C em diferentes tempos e medidas equipamentos Quantachrome Nova-e 4000 e ASAP 2020;	111
Figura 37 – Correlação de Área superficial e Índice de Cristalinidade (Celulose II) de Avicel pré-tratado com ([EMIM][OAc]) a 120°C por diferentes tempos	112
Figura 38 – Micrografias eletrônicas de Avicel PH-101 pré-tratado por ([EMIM][OAc]) a 120°C em diferentes tempos de exposição.	113
Figura 39 – Distribuição do tamanho de partícula para Avicel PH-101 não pré-tratada e tratada por ([EMIM][OAc]) a 120°C em diferentes tempos com representação boxplot dos dados. As médias de diâmetro de partícula são mostradas nos pontos do gráfico.....	114
Figura 40 – Distribuição do tamanho de partícula para Avicel PH-101 não pré-tratada e tratada por ([EMIM][OAc]) a 120°C em diferentes tempos de exposição....	118

Figura 41 – Hidrólise de Avicel PH-101 pré-tratado por ([EMIM][OAc]) a diferentes temperaturas e tempos de exposição, utilizando extratos Celluclast 1.5L + Novozymes N188	119
Figura 42 – Hidrólise com diferentes tempos de parada de Avicel PH-101 pré-tratado por ([EMIM][OAc]) a 120°C por 120 min, utilizando extratos Celluclast 1.5L + Novozymes N188	121
Figura 43 – Difratoogramas dos substratos residuais de hidrólise com diferentes tempos de parada de Avicel PH-101 de pré-tratado por ([EMIM][OAc]) a 120°C por 120 min.....	121
Figura 44 – Índice de cristalinidade para celulose II dos substratos residuais de hidrólise com diferentes tempos de parada de Avicel PH-101 pré-tratado a 120°C em 120 min	122
Figura 45 – Área superficial dos resíduos de hidrólise de diferentes tempos reacionais de Avicel PH-101 pré-tratado a 120°C em 120 min	123
Figura 46 – Micrografias eletrônicas de resíduos de hidrólise de diferentes tempos racionais de Avicel PH-101 pré-tratado por ([EMIM][OAc]) a 120°C por 120min....	124
Figura 47 – Distribuição do tamanho de partícula dos substratos residuais de hidrólise com diferentes tempos de parada de Avicel PH-101 pré-tratada por ([EMIM][OAc]) a 120°C por 120 min, com representação boxplot dos dados.	126
Figura 48 – Simulação das variáveis do modelo de Tsai et al. (2014) adaptado em cenário com celulose.	130
Figura 49 – Simulação do modelo cinético com dados de hidrólise de celulose amorfa e cristalina e parâmetros adaptados de Tsai et al., 2014.	134
Figura 50 – Simulação do modelo cinético com dados de hidrólise de celulose amorfa e cristalina e parâmetros de Tsai et al., 2014.	135
Figura 51 – Análise do resíduo de estimação do modelo do caso 1.....	144
Figura 52 – Glicose predita x observada para do modelo do Caso 1 para os diferentes casos experimentais da Tabela 41, Anexo IV.....	145
Figura 53 – Análise do resíduo de estimação do modelo do caso 2.....	158
Figura 54 - Glicose predita x observada para do modelo do Caso 2 para os diferentes casos experimentais da (Tabela 21, Anexo IV)	159

Figura 55 – Simulação do modelo cinético com dados de celulose amorfa (a) e cristalina (b) e parâmetros de Tsai et al., 2014.	201
Figura 56 – Simulação do modelo cinético com dados de celulose total (a) e celobiose (b) e parâmetros de Tsai et al., 2014.	202
Figura 57 – Simulação do modelo cinético com dados de celulase adsorvida (a) e inibida (b) sobre celulose cristalina.	203
Figura 58 – Simulação do modelo cinético com dados de celulase adsorvida (a) e inibida (b) sobre celulose amorfa	204
Figura 59– Simulação do modelo cinético com dados de celulase adsorvida (a) e inibida (b) sobre celulose amorfa	205

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Comparação entre as regiões codificantes para celulase de <i>Trichoderma reesei</i> e <i>Aspergillus niger</i> CBS 513.88 das diferentes famílias de glicosil-hidrolases.....	44
Tabela 2 - Modelos semi-mecanísticos de hidrólise considerando características estruturais e funcionais do substrato para a limitação de taxa reacional.	61
Tabela 3 – Regime de lavagem e troca de solvente submetido ao material lignocelulósico.....	75
Tabela 4 – Condições de pré-tratamento de Avicel por ([EMIM][OAc])	77
Tabela 5 – Modelo cinético de hidrólise enzimática adaptado de Tsai <i>et al.</i> (2014) para celulose em uma fase, duas enzimas e conversão direta de celulose a glicose	86
Tabela 6 – Modelo cinético de hidrólise enzimática adaptado de Angarita <i>et al.</i> , 2014 para duas enzimas e celulose em duas fases.....	90
Tabela 7 – Qualidade do ajuste do difratogramas para os diferentes padrões cristalográficos para o cálculo do índice de cristalinidade	110
Tabela 8 – Parâmetros utilizados para as simulações dos modelo cinético do Caso 1 para diferentes características e rotas reacionais.	128
Tabela 9 – Parâmetros utilizados para as simulações dos modelo cinético do Caso 2 para diferentes características e rotas reacionais.	132
Tabela 10 – Dados de estimação do modelo de hidrólise enzimática de Avicel PH-101 para o caso 1.	137
Tabela 11 – Parâmetros cinéticos estimados do modelo de hidrólise enzimática de Avicel PH-101 para o Caso 1 diretamente comparáveis com a literatura.....	138
Tabela 12 – Comparação entre os parâmetros de inibição relacionados entre si	139
Tabela 13 – Análises de qualidade de estimação para o Caso 1.....	140
Tabela 14 – Matriz de correlação paramétrica para o modelo do Caso 1.....	141

Tabela 15 – Dados de estimação do modelo de hidrólise enzimática de Avicel PH-101 para o caso 2.....	146
Tabela 16 – Parâmetros cinéticos estimados do modelo de hidrólise enzimática de Avicel PH-101 para o Caso 2 diretamente comparáveis com a literatura.....	147
Tabela 17 – Comparação entre os parâmetros de inibição relacionados entre si.....	148
Tabela 18 – Análises de qualidade de estimação para o Caso 2 (valor p = 0,05).....	150
Tabela 19 – Matriz de correlação paramétrica para o modelo do Caso 2*.....	152
Tabela 20 – Comparação do ajuste dos modelos (R^2) para todos casos experimentais com destaque aos mais baixos, correspondente a 10% dos totais.....	160
Tabela 21- Concentrações experimentais de glicose do trabalho de Tsai <i>et al.</i> , 2014.....	206
Tabela 22–Matriz de correlação paramétrica para o modelo do Caso 1.....	210
Tabela 23 – Matriz de correlação paramétrica para o modelo do Caso 2.....	211
Tabela 24- Concentrações experimentais de glicose dessa tese para pré-tratados de celulose com moínho de bolas e LI.....	247

Lista de Símbolos

Símbolo	Descrição	Unidade
%	porcentagem	
→	reação química	
°	graus	
°C	graus Célsius	
Å	ångström	
A_a	Área superficial de celulose amorfa	$[m^2 \cdot g_{S_a}^{-1}]$
A_c	Área superficial de celulose cristalina	$[m^2 \cdot g_{S_c}^{-1}]$
A_{c1}	Área superficial de celulose cristalina I β	$[m^2 \cdot g_{S_{c1}}^{-1}]$
<i>cal</i>	calorias	
<i>D</i>	dextrorrotatório	
<i>Da</i>	Daltons	
E_{bCelC}	Enzima celulase adsorvida em celulose	$\left[\frac{g_{CelC}}{g_S} \right]$
E_{bCelCa}^\dagger	Enzima celulase adsorvida em celulose amorfa	$\left[\frac{g_{CelC}}{g_{S_a}} \right]$
$E_{bCelCc1}^\dagger$	Enzima celulase adsorvida em celulose cristalina	$\left[\frac{g_{CelC}}{g_{S_c}} \right]$
E_{bN188}	Enzima β -glicosidase adsorvida em celulose	$\left[\frac{g_{N188}}{g_S} \right]$
E_{bN188}^\dagger	Enzima β -glicosidase adsorvida em celulose amorfa e cristalina	$\left[\frac{g_{N188}}{g_S} \right]$

<i>EbSa</i>	Pseudoenzima ligada à celulose amorfa	$\left[\frac{g_{PE}}{g_{S_a}} \right]$
<i>EbSc</i>	Pseudoenzima ligada à celulose cristalina	$\left[\frac{g_{PE}}{g_{S_c}} \right]$
<i>E_f</i>	Concentração de pseudoenzima solúvel	$[g_{PE}.L^{-1}]$
<i>E_{fCelC}</i>	Concentração de celulase solúvel	$[g_{CelC}.L^{-1}]$
<i>E_{fN188}</i>	Concentração de β-glicosidase solúvel	$[g_{N188}.L^{-1}]$
<i>E_{fN188}[†]</i>	Concentração de β-glicosidase solúvel	$[g_{N188}.L^{-1}]$
<i>E_{maxCelC}</i>	Concentração limite de adsorção de celulase em celulose	$\left[\frac{g_{CelC}}{g_S} \right]$
<i>E_{maxCelCa}[†]</i>	Concentração limite de adsorção de celulase em celulose amorfa	$\left[\frac{g_{CelC}}{g_{S_a}} \right]$
<i>E_{maxCelCc1}[†]</i>	Concentração limite de adsorção de celulase em celulose cristalina	$\left[\frac{g_{CelC}}{g_{S_c}} \right]$
<i>E_{maxN188}[†]</i>	Concentração limite de adsorção de β-glicosidase em celulose	$\left[\frac{g_{N188}}{g_S} \right]$
<i>E_{maxN188}[†]</i>	Concentração limite de adsorção de celulase em celulose amorfa e cristalina	$\left[\frac{g_{CelC}}{g_{(S_a+S_c)}} \right]$
<i>E_T</i>	Pseudoenzima total	$[g.L^{-1}]$
<i>E_{TCelC}</i>	Concentração total de celulase	$[g_{CelC}.L^{-1}]$
<i>E_{TN188}</i>	Concentração total de β-glicosidase	$[g_{N188}.L^{-1}]$
<i>FPU</i>	<i>filter paper unit</i>	
<i>g</i>	grama	
<i>G</i>	Glicose	$[g.L^{-1}]$

$G2$	Celobiose	$[g.L^{-1}]$
K	temperatura em Kelvin	
K_{11G}^*	Constante de inibição da glicose sobre a reação de conversão de celulose em celobiose	$[g.L^{-1}]$
K_{11G}^\dagger	Constante de inibição da glicose sobre a reação de conversão de celulose amorfa em celobiose	$[g.L^{-1}]$
K_{11G2}^*	Constante de inibição da celobiose sobre a reação de conversão de celulose em celobiose feita por celulase	$[g.L^{-1}]$
K_{11G2}^\dagger	Constante de inibição da celobiose sobre a reação de conversão de celulose amorfa em celobiose por celulas	$[g.L^{-1}]$
K_{11X}^*	Constante de inibição da xilose sobre a reação de conversão de celulose em celobiose	$[g.L^{-1}]$
K_{1r}^*	Constante de taxa da conversão de celulose em celobiose por celulase	$\left[\frac{g_s}{h \cdot g_{CelC}} \right]$
K_{1r}^\dagger	Constante de taxa da conversão de celulose amorfa em celobiose por celulase	$\left[\frac{g_{s_a}}{h \cdot g_{CelC_a}} \right]$
K_{21G}^*	Constante de inibição da glicose sobre a reação de conversão de celulose em glicose	$[g.L^{-1}]$
K_{21G}^\dagger	Constante de inibição da glicose sobre a reação de conversão de celulose em glicose	$[g.L^{-1}]$
K_{21G2}^*	Constante de inibição da celobiose sobre a reação de conversão de celulose em glicose	$[g.L^{-1}]$
K_{21G2}^\dagger	Constante de inibição da celobiose sobre a reação de conversão de celulose cristalina em celobiose	$[g.L^{-1}]$

K_{2IX}^*	Constante de inibição da xilose sobre a reação de conversão de celulose em glicose	$[g.L^{-1}]$
K_{2r}^*	Constante de taxa da conversão de celulose em glicose	$\left[\frac{g s_a}{h. (g_{celC} + g_{N188})} \right]$
K_{2r}^\dagger	Constante de taxa da conversão de celulose cristalina em celobiose	$\left[\frac{g s_{c1}}{h. g_{celCc1}} \right]$
K_{3IG}	Constante de inibição da glicose sobre a reação de conversão de celobiose em glicose	$[g.L^{-1}]$
K_{3IX}	Constante de inibição da xilose sobre a reação de conversão de celobiose em glicose	$[g.L^{-1}]$
K_{3M}	Constante de Michaelis da reação de conversão de celobiose em glicose	$[g.L^{-1}]$
K_{3r}	Constante de taxa da conversão de celobiose em glicose	$[h^{-1}]$
K_{5r}^\dagger	Constante de inibição processual de enzima celulase adsorvida sobre celulose cristalina	$\left[\frac{g s_c}{L. h} \right]$
K_{6r}^*	Constante de dessorção de celulase adsorvida em celulose	$\left[\frac{g s}{L. h} \right]$
K_{7r}^*	Constante de inibição processual de enzima celulase adsorvida sobre celulose	$\left[\frac{g s}{L. h} \right]$
K_{7r}^\dagger	Constante de inibição processual de enzima celulase adsorvida sobre celulose amorfa	$\left[\frac{g s_a}{L. h} \right]$
K_{8r}^*	Constante de dessorção de β -glicosidase adsorvida em celulose	$\left[\frac{g s}{L. h} \right]$
K_{8r}^\dagger	Constante de inibição processual de enzima celulase adsorvida sobre celulose cristalina	$\left[\frac{g s_c}{L. h} \right]$

K_{9r}^{\dagger}	Constante de inibição processual de enzima celulase adsorvida sobre celulose amorfa	$\left[\frac{g_{Sa}}{L \cdot h} \right]$
K_{aCelC}	Constante de equilíbrio de adsorção da enzima celulase em celulose	$\left[\frac{-L(h - L)}{g_{CelC} \cdot h} \right]$
K_{aCelCa}^{\dagger}	Constante de equilíbrio de adsorção da enzima celulase em celulose amorfa	$\left[\frac{g_{Sa}L}{g_{CelCa}(g_{Sa} - m^2h)} \right]$
$K_{aCelCc1}^{\dagger}$	Constante de equilíbrio de adsorção da enzima celulase em celulose cristalina para alomorfo β	$\left[\frac{g_{Sc1}L}{g_{CelCc1}(g_{Sc1} - m^2h)} \right]$
K_{aN188}	Constante de equilíbrio de adsorção da enzima β -glicosidase em celulose	$\left[\frac{-L(h - L)}{g_{N188} \cdot h} \right]$
K_{aN188}^{\dagger}	Constante de equilíbrio de adsorção da enzima β -glicosidase em celulose	$\left[\frac{g_S L}{g_{N188}(g_S - m^2h)} \right]$
K_{eq1}	Constante de equilíbrio de adsorção da pseudoenzima sobre celulose amorfa	$\left[\frac{L^2}{(L - g_{Sa} \cdot m^2)} \right]$
K_{eq2}	Constante de equilíbrio de adsorção da pseudoenzima sobre celulose cristalina	$\left[\frac{L^2}{(L - g_{Sc1} \cdot m^2)} \right]$
kg	quilogramas	
KV	quilovolts	
L	levorrotatório	
L	litros	
mg	miligramas	
min	minuto	
mL	mililitros	
mm	milímetros	
mol	$6,023 \times 10^{23}$ espécies	

<i>nm</i>	nanômetros	
<i>o</i>	orto	
<i>p</i>	para	
<i>Pa</i>	Pascal	
<i>pH</i>	potencial hidrogeniônico	
r_1	Taxa reacional de conversão de celulose amorfa em celobiose por pseudoenzima	
r_1^*	Taxa reacional de conversão de celulose em celobiose por celulase	
r_1^\dagger	Taxa reacional de conversão de celulose amorfa em celobiose por celulase	
r_2	Taxa reacional de conversão de celulose cristalina em celobiose por pseudoenzima	
r_2^*	Taxa reacional de conversão de celulose em glicose por celulase	
r_2^\dagger	Taxa reacional de conversão de celulose cristalina em celobiose por celulase	
r_3	Taxa reacional de conversão de celobiose em glicose por pseudoenzima	
<i>S</i>	Celulose	$[g.L^{-1}]$
S_a	Celulose amorfa	$[g.L^{-1}]$
S_c	Celulose cristalina	$[g.L^{-1}]$
S_{c1}	Celulose cristalina 1 β	$[g.L^{-1}]$
<i>US\$</i>	Dólares americanos	
<i>X</i>	concentração de xilose	$[g.L^{-1}]$

α	alfa
β	beta
θ	teta
e	número de Euler

Lista de Abreviaturas

BET – isoterma de Brunauer–Emmett–Teller

BSA – Soroalbumina bovina

C5 – açúcares cujas moléculas são constituídas por seis átomos de carbono

C6 – açúcares cujas moléculas são constituídas por seis átomos de carbono

Ca²⁺ – íon Calcio

CBH – Celobiohidrolases

CBP – bioprocesso consolidado

CDH – celobiose desidrogenase

Cel7a – Celobiohidrolase de *T. reesei*

CF – cofermentação

CMC – Carboximetilcelulose

CMCase – Carboximetilcelulase

CO₂ – Dióxido de Carbono

DC – Domínio catalítico

DCCR – delineamento composto central rotacional

DL – Domínio de ligação

DNS – ácido 3,5-dinitrosalicílico

EC – *Enzyme classification*

EG – endoglicanases

ENZITEC – Laboratório de Tecnologia Enzimática

EUA – Estados Unidos da América

ExpASy – ExPasy Bioinformatic Resource Portal

FPase – atividade celulolítica genérica em filtro de papel

HMF – Hidroximetilfurfural

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

I₀₀₂ – intensidade de difração do pico do plano 002

LI – Líquido iônico

Mg²⁺ – íon Magnésio

N₂ – Nitrogênio molecular

NaOH – Hidróxido de Sódio

ODE – Equações diferenciais ordinárias (*Ordinary differential equations*)

OGM – Organismos geneticamente modificados

PA – Padrão analítico

PE – pseudoenzima

PMO – polissacarídeo monooxigenases

Proálcool – Programa Nacional do Álcool

R – constante universal dos gases (cal.mol⁻¹.K⁻¹).

SSCF – sacarificação e co-fermentação simultâneas

SSF – fermentação e sacarificação simultânea

T – temperatura

t_n – tempo genérico de reação

UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro

α – a constante de proporcionalidade adimensional.

βG – beta glicosidase

1. Introdução

A produção de alternativas custo-competitivas para substituir o petróleo é necessária devido aos crescentes riscos ambientais associados ao seu consumo, como os seus derramamentos e aquecimento global. Também devido a riscos estratégicos, como os causados pelo desbalanço observado entre as regiões produtoras e consumidoras ao redor do mundo, as consequências de uma inadequada disponibilidade de petróleo em países fortemente dependentes dele podem ser severas (Saad, 2010).

O etanol já foi pensado como combustível da operação do motor de combustão interna feita por Samuel Morey em 1826 (Raele *et al.*, 2014) e na criação do motor de quatro tempos, feita por Otto, em 1860 (Limayem & Ricke, 2012). Além disso, ele era utilizado pela França e Alemanha antes de 1894 com essa finalidade (Balat, 2011). De modo geral, os preços de mercado do petróleo ante o etanol promoveram os seus derivados como as principais soluções energéticas para atender os veículos automotores, sobretudo na primeira metade do século passado, desbancando a iniciativa do etanol (Limayem & Ricke, 2012).

Em 2010, o Brasil perdeu o protagonismo na produção mundial de etanol combustível para os Estados Unidos (Limayem & Ricke, 2012) devido a diversos fatores, como a elevação do custo de produção no Brasil e às más condições climáticas para o cultivo da cana-de-açúcar – *Saccharum officinarum* (Rodrigues, 2012), mas ambos os países controlavam 89% do mercado mundial desse álcool em 2012. Essas nações desenvolveram políticas específicas de fomento à produção e consumo desses combustíveis (Stephen *et al.*, 2012). Destacam-se o PEA (Policy Energy Act) e o EISA (Energy Independence Security Act) desenvolvidos na década de 1990 nos Estados Unidos, e o Proálcool, iniciado na década de 1970 no Brasil, para produzir o etanol advindo do mosto fermentado da cana-de-açúcar – *Saccharum officinarum* nesse país (Limayem & Ricke, 2012). Todavia, o Brasil tem enorme vantagem competitiva por fazer álcool etílico a partir da cana-de-açúcar, pois com esse cultivar, produz $7000 \text{ L}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{ano}^{-1}$, em comparação com outras fontes de matéria prima, como o milho nos Estados Unidos, que permite produzir $3300 \text{ L}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{ano}^{-1}$ somente (Silva & Fischetti, 2008). Por outro lado, países como China, Índia e Tailândia, que juntos não contribuem com mais do que 5% da produção mundial de etanol, também estão investindo em tecnologia para a produção do

combustível a partir de outras fontes, assim como Brasil e EUA (Limayem & Ricke, 2012).

Em 1975, foi instaurado o programa Proálcool que objetivava estimular a indústria nacional a produzir etanol a partir da cana-de-açúcar para responder às ameaças decorrentes da crise do petróleo daquela década, quando o preço do barril de petróleo aumentou em mais de 300% (Vaz, 2012). Isso foi possível, pois haviam pesquisas sendo executadas no ITA (Instituto Tecnológico da Aeronáutica) para produzir um motor que operasse somente com etanol e também porque existiam intenções da diretoria da Petrobrás para promover a expansão da produção do biocombustível (Silva & Fischetti, 2008). O Proálcool instituiu a compulsória adição de 18% de etanol na gasolina (Vaz, 2012), mas a partir da adição de 25% de etanol à gasolina, o programa diminuiu a compra de 550 milhões de barris de petróleo e, por consequência, 110 milhões de toneladas de CO₂ não foram emitidos para a atmosfera. De fato, a presença do etanol como combustível oxigenado na mistura, aumenta a oxidação do hidrocarboneto e diminui a concentração de gases de efeito estufa (Mood *et al.*, 2013), mas a principal redução na emissão de gases ocorre durante o crescimento da cana, já grande parte do CO₂ emitido na queima é absorvido pelo vegetal nessa etapa.

A instituição do aumento de 2% para 3% da mistura de etanol no diesel promoveu a economia de 976 milhões de dólares em 2008 aos cofres públicos brasileiros (Soccol *et al.*, 2010). O Proetanol repercutiu na diminuição do preço da cana, criando uma demanda para sustentar o preço do etanol (Balat, 2011). Em resposta ao programa implementado, em 1979 o Brasil produziu 76,1% de seus carros movidos a álcool combustível (Da Costa *et al.*, 2010) culminando com 94% dos carros operando através da queima de etanol em 1984 (Soccol *et al.*, 2010).

Foi observada a desaceleração do Proálcool já na segunda metade da década de 1980 devido aos altos preços pagos pelo açúcar no mercado internacional (Raele *et al.*, 2014). Em 1990, o consumo de etanol atingiu um recorde histórico da época, com 11,7 bilhões de litros anuais (Vaz, 2012). Com o aumento da produção de petróleo no mercado doméstico, o baixo valor pago pelo álcool, o fim dos subsídios do governo para os produtores, o déficit de abastecimento seguido de redução da compra de carros movidos a etanol, além do abaixamento dos preços do petróleo com o fim da URSS, uma crise abateu o setor alcooleiro, sobretudo a partir de 1990 (Vaz, 2012; Raele *et al.*, 2014).

A retomada do vigor do setor ocorreu, principalmente, após o advento dos carros flex, que permitiam o uso de etanol ou gasolina, em 2003. Em 2010, 80% dos veículos automotores eram capazes de utilizar etanol como combustível, (Soccol *et al.*, 2010). Porém, um retrospecto de 2007-2012 revelou que os custos de produção do etanol superaram a receita média do produto final, resultado da nova crise no setor que teve como uma das suas principais explicações a elevação dos custos de produção e a política tributária, que manteve o preço da gasolina artificialmente baixo, desfavorecendo o etanol (Rodrigues, 2012). Mesmo assim, em 2008, a transformação de energia a partir da cana (16%), superou, em quantidade absoluta, a energia hidroelétrica na matriz energética brasileira (14,7%) (Silva & Fischetti, 2008).

Segundo Ueki (2008, Apud Silva & Fischetti, 2008), continuar a investir no setor de biocombustíveis em um cenário atual de constantes e novas descobertas de reservas de petróleo pode expandir o potencial do Brasil em gerar riquezas adicionais a partir da comercialização de bioenergia ou de produtos derivados dos biocombustíveis. Isso pode diminuir a dependência externa, reduzindo os impactos sócio-ambientais oriundos dos combustíveis poluentes. A partir do etanol, é possível a síntese de derivados do petróleo como etileno, propileno, buteno e butadieno (Saad, 2010).

O atual método de produção de etanol comercializado, chamado de primeira geração, envolve a fermentação do mosto da cana-de-açúcar, principalmente no Brasil, ou do amido do milho, majoritariamente nos EUA, além da separação do produto final basicamente (Limayem & Ricke, 2012). O etanol combustível está adaptado ao mercado de vários países, principalmente no Brasil, onde pode ser adquirido nas bombas de postos de abastecimento.

O etanol advindo da rota de primeira geração provoca benefícios ambientais e sociais (Goldemberg *et al.*, 2004) em substituição a gasolina como a diminuição da emissão de gases estufa, mas ainda enfrenta dificuldades quando sua produção compete com a de alimentos. Isso acontece quando sua produção aloca matérias primas alimentares para a produção dos combustíveis. Mas também quando competem com terra e água para a produção dos mesmos. Embora o etanol de primeira geração seja mais sustentável ambientalmente do que a gasolina como fonte de energia, ele não o é completamente, excetuando-se o etanol de cana-de-açúcar o que motiva o desenvolvimento de tecnologias ainda menos nocivas à biosfera. Dentre os desafios, os combustíveis de primeira geração

não são produzidos em quantidades suficientes para suprir os programas e aos mercados de energia renovável já que eles podem fazer uso de matérias primas que ameaçam a viabilidade econômica do produto final. Em certas localidades, também, o etanol de primeira geração carece de infraestrutura de transporte, distribuição e adaptação dos motores (Sun & Cheng, 2002; Bomtempo, 2012).

Alternativamente, o etanol lignocelulósico, também chamado de segunda geração, é conhecido como o produto da rota que utiliza como matéria prima materiais lignocelulósicos (Stephen *et al.*, 2012). Esse material lignocelulósico corresponde basicamente à palha e ao bagaço, no caso da cana-de-açúcar. Esses componentes são utilizados na planta industrial de primeira geração para obter calor (Soccol *et al.*, 2010), sendo esse convertido em energia elétrica ou transferido ao vapor utilizado para movimentar equipamentos industriais. Ainda assim, são gerados excedentes de bagaço na planta da ordem de 10% em usinas que utilizam caldeiras de baixa pressão e de 30% naquelas que possuem caldeiras de alta pressão (> 20 bar) (Saad, 2010).

Das possíveis matérias primas para a produção do etanol lignocelulósico, cogita-se que os resíduos de agricultura poderão ter maior potencial para utilização do que os da indústria agroflorestal (Stephen *et al.*, 2012). Em geral, resíduos da agricultura requerem menor energia para serem modificados durante os seus pré-tratamentos do que materiais lenhosos (Limayem & Ricke, 2012). Esses rejeitos da lavoura contêm maior teor de açúcar, evitam o desflorestamento e são obtidos mais vezes durante o ano do que o resíduo da silvicultura, além de serem mais abundantes. Exemplo maior de abundância foi detectada no estudo sobre a produção relativa de biomassa nos EUA para o ano de 2009, que identificou que a geração de resíduos da agricultura (31,28%) superou a da produção florestal (27,05%) e, também, das lavouras destinadas a produção de energia (27,55%) (Limayem & Ricke, 2012). Um dos resíduos agroindustriais mais promissores para a obtenção do etanol lignocelulósico é o bagaço de cana-de-açúcar. O bagaço-de-cana é o resíduo poroso que é deixado depois da extração do suco da cana mediante prensagem, sendo constituído de feixes fibrosos e outros elementos estruturais como elementos de vaso, parênquima e células epiteliais (Soccol *et al.*, 2010).

Existem quatro etapas processuais para a produção do etanol lignocelulósico: pré-tratamento, hidrólise, fermentação e recuperação do produto final (Olofsson *et al.*, 2008; Limayem & Ricke, 2012). Todavia, o mecanismo de hidrólise enzimática é alvo de

pesquisa, pois existem vários desafios e perguntas não esclarecidos, muito embora existam vários trabalhos de modelagem matemática cobrindo esse tópico (Sousa Jr, 2011; Bansal, 2009; Zhang & Lynd, 2004). A hidrólise enzimática apresenta-se mais vantajosa que outras propostas de hidrólise, como a ácida (Balat, 2011), devido o processo enzimático gerar menor quantidade de inibidores (Olofsson *et al.*, 2008), requerer equipamentos mais baratos (Cara *et al.*, 2007) e operar em condições reacionais mais brandas (Angarita Martinez, 2014). Investimentos na produção de etanol lignocelulósico tem sido feitos utilizando a tecnologia enzimática, mesmo com toda a complexidade inerente da catálise enzimática da lignocelulose (Zhang & Lynd, 2004), influenciada pela inibição enzimática pela lignina e outros compostos, além do elevado custo do processo muito explicado pelo alto custo das enzimas (Cara *et al.*, 2007). No mundo, existem empresas investindo na produção do etanol lignocelulósico através dessa rota, sendo três no Brasil (Granbio – Alagoas, Raizen – São Paulo e uma planta experimental no Centro de Tecnologia Canavieira – São Paulo).

A pesquisa dessa tese se insere em um cenário do processo de produção de etanol celulósico. Por meio da modelagem matemática, demonstrou-se como algumas características do substrato celulósico influenciavam na sua degradação por enzimas. Sobretudo área superficial e cristalinidade, contribuindo para o maior conhecimento e melhoramento das tecnologias de produção. Com melhores tecnologias de utilização e beneficiamento de resíduos, contornam-se alguns problemas de produção do etanol por essa rota e alcançam-se menores custos de produção do combustível, aproximando-o de sua provável utilização pelo consumidor final. Ademais, o meio ambiente pode se beneficiar com a eventual substituição de derivados de petróleo pelo etanol celulósico, por meio da tecnológica apresentada nesse texto.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. A constituição da biomassa lignocelulósica

A biomassa lignocelulósica tem potencial de contribuir com as demandas atuais de energia, de materiais e substâncias químicas no mundo. A biomassa lignocelulósica é composta principalmente de celulose, hemicelulose e lignina (Figura 1), figurando com cerca de 90% da massa seca vegetal (Bidlack *et al.*, 1992; Balat, 2011).

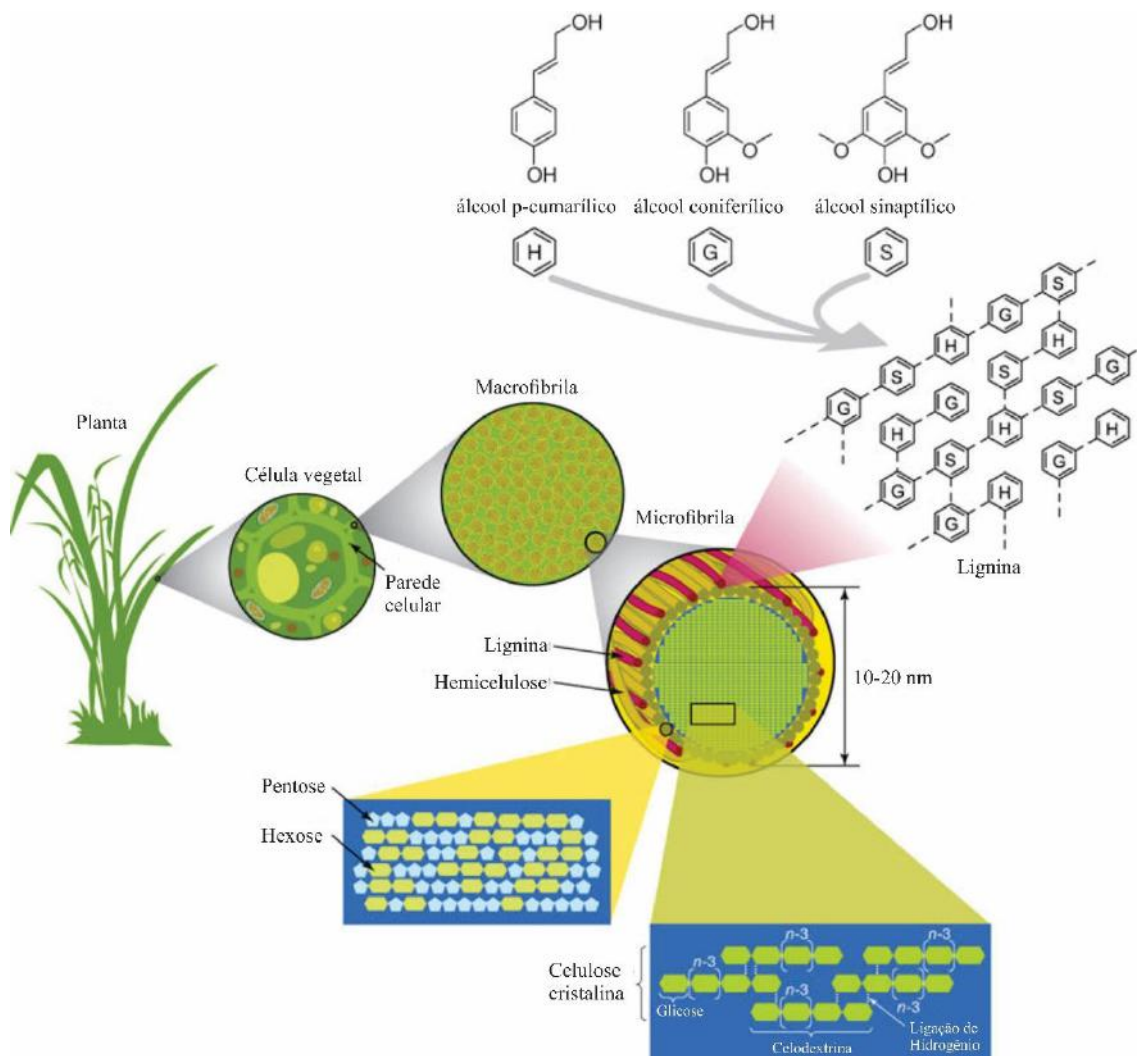


Figura 1 – Estrutura da biomassa vegetal, desde a planta até seus componentes em representação molecular. Adaptada de Rubin, 2008.

Estas três substâncias principais constituintes da biomassa vegetal: celulose, hemicelulose e lignina estão emaranhadas por fortes ligações de hidrogênio através de um arcabouço de lignina, constituindo a microfibrila vegetal. As proporções desses componentes tem grande variação dentre os diferentes clados vegetais e seus tecidos (Limayem & Ricke, 2012; Balat, 2011).

Tomando o bagaço de cana de açúcar como exemplo, esse tem uma composição média de 50% de celulose, 25% de hemicelulose e 25% de lignina (Pandey *et al.*, 2000), muito embora outros autores mostram algumas variações nessas porcentagens: (32% – 45%) de celulose, (27% – 35%) de hemiceluloses e (19% – 30%) de lignina (Peng *et al.*, 2009; Soccol *et al.*, 2010; de Oliveira Moutta *et al.*, 2013; Guilherme *et al.*, 2015). Já a palha de cana-de-açúcar, que é um resíduo correlato, contém, em geral, a proporção de celulose:hemicelulose:lignina de 44% : 31% : 23% em sua biomassa (Santos *et al.*, 2012).

2.2. A celulose

O componente presente em maior quantidade na composição da biomassa celulósica, a celulose, é o biopolímero mais importante no fluxo global de carbono. Sua produção anual é estimada em 100×10^9 toneladas anuais (Quiroz-Castañeda e Folch-Mallol, 2013). Ele pode ser produzido por organismos fotossintéticos, como plantas superiores e algas, mas também pelos não fotossintéticos como bactérias, invertebrados marinhos, fungos, bolores limosos e amebas.

A celulose foi descoberta em 1838 por Anselme Payen, como um material que remanesce do tratamento de tecidos vegetais com ácidos e bases fortes em condições específicas (Hallac & Ragauskas, 2011). Trata-se um polissacarídeo linear de milhares de monômeros de β -D-anidroglicopiranosose ligados entre si por ligações glicosídicas β (1 \rightarrow 4) (Zhang & Lynd, 2004). Em geral, o grau de polimerização da molécula atinge 10.000 unidades (Andersen, 2007).

A união de duas β -D-glicoses na suas conformações cíclicas, β -D-glicopiranoses, forma uma molécula de celobiose por meio da exclusão de uma molécula de água. O dissacarídeo formado pelos monômeros β -D-anidroglicopiranoses tem tamanho médio de 1,04 nm. (Figura 2). Consequentemente, a ligação de β -D-anidroglicopiranoses permite

formar polímeros com diferentes tamanhos, denominados celodextrinas. Celodextrinas com 2 a 6 meros são solúveis em água; entre 7 e 13 meros, são parcialmente solúveis; maiores do que desse intervalo são insolúveis. O polímero com 30 meros e acima desse é denominado celulose, também insolúvel (Zhang & Lynd, 2004).

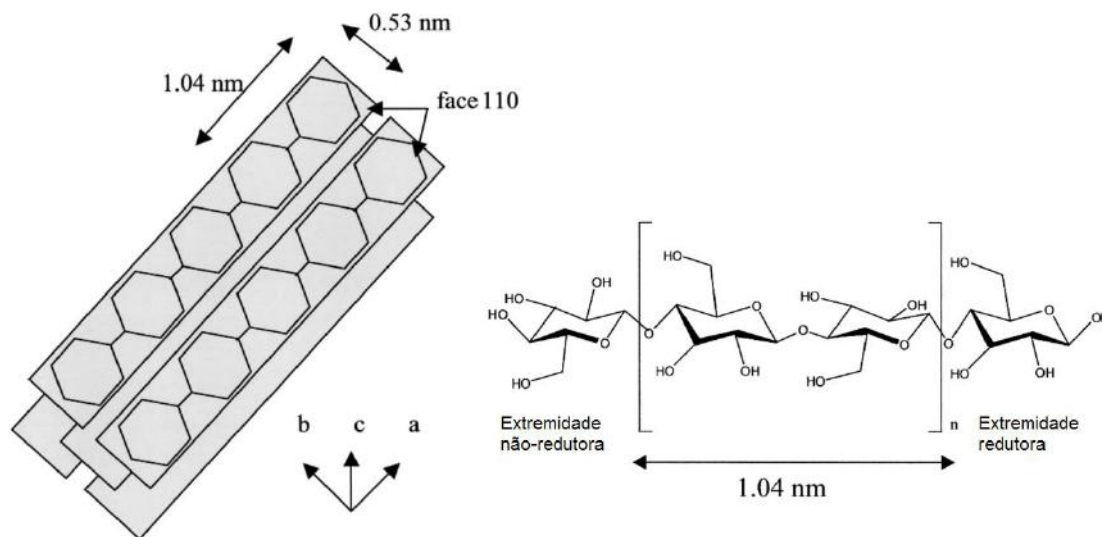


Figura 2 – Composição química e estrutura cristalográfica da celulose a partir da união de β-D-glicopiranoses. Adaptado de Zhang & Lynd (2004).

Em maiores adensamentos poliméricos, a molécula de anidroglicose é girada 180° uma em relação à outra, implicando em um ordenamento altamente simétrico da estrutura formada (Zhang & Lynd, 2004). Nela, as cadeias realizam diversas interações do tipo ligação de hidrogênio e forças de van der Waals nos seus três eixos dimensionais (Quiroz-Castañeda e Folch-Mallol, 2013) do tipo: intercadeia (2 para cada anidroglicopiranosose) e intracadeia (2-3 para cada anidroglicopiranosose), conferindo à molécula força tênsil, cristalinidade e densidade às microfibrilas vegetais (Limayem & Ricke, 2012; Zhang & Lynd, 2004). Com toda simetria e empacotamento permitida, a celulose pode ser encontrada nas microfibrilas formando cristais. A celulose também pode ser encontrada em menor densidade e organização, sendo denominada celulose amorfa.

A celulose presente na microfibrila na forma cristalina apresenta seus cristais constituídos e organizados pela superposição dos anéis formados por glicose em que as ligações β se orientam na mesma direção da face 110 (Figura 2). O plano que tangencia as faces laterais dos anéis formam o plano $1\bar{1}0$ (Zhang & Lynd, 2004).

A celulose pode ser apresentada sobre diferentes formas cristalinas (I, II, III (III_I, III_{II}) e IV (IV_I, IV_{II})) (Quiroz-Castañeda e Folch-Mallol, 2013). A celulose IV tem sido revelada como tendo estrutura similar à celulose I_β, mas a elucidação de sua estrutura requer a realização de mais caracterizações sobre esse material (Payne *et al.*, 2015). A celulose I existe nas aloformas I_α e I_β (Figura 3).

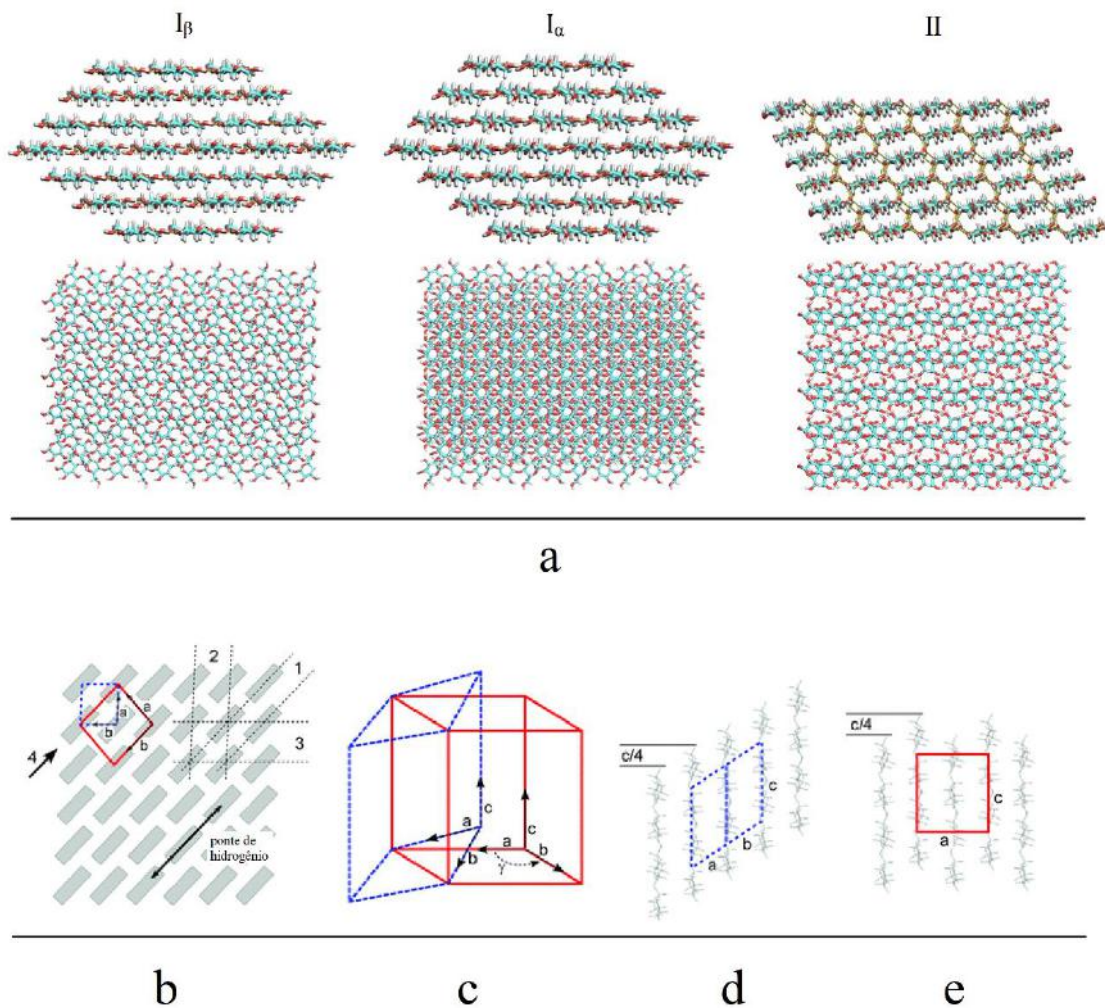


Figura 3 – Polimorfismo de celulose em visão lateral e superior e cristais da forma I_α, I_β e II. a) Os alomorfos do tipo I, apresentam pontes de hidrogênio intracadeias enquanto as formas II e III apresentam pontes inter e intracadeias (linhas amarelas). b) projeção das células unitárias dos aloformas I_α (triclínica – linha azul pontilhada) e I_β (monoclínica – linha vermelha cheia) com relação ao eixo c estrutura da fibra de celulose I. Nessa configuração, os aloformas compartilham os mesmos planos cristalinos 1, 2 e 3 com espaçamentos-d de 0,39, 0,53 e 0,61, correspondendo aos planos (110)_t, (010)_t, e (100)_t para I_α e (200)_m, (110)_m, and (1 $\bar{1}$ 0)_m para I_β. (c-e)

Perspectiva das células unitárias a partir da posição 4. c) configuração da célula unitária de I_α (linha azul pontilhada) relativa à I_β (linha vermelha cheia). Posicionamento das fibras dentro das cadeias ao longo do eixo c, (d) deslocadas com distanciamento de $c/4$ para celulose I_α (e) e alternadas deslocadas com distanciamento de $\pm c/4$ para celulose I_β . Adaptado de Moon *et al.* (2011) e Payne *et al.* (2015).

A celulose I_α possui simetria triclínica, e todos os lados e ângulos do cristal são distintos entre si. Já a celulose I_β possui simetria monoclínica, pois apresenta dois pares de vetores perpendiculares e um terceiro par, não perpendicular (Atalla e VanderHart, 1984) (Figura 3). Embora ambas as formas celulósicas estejam presentes nas microfibrilas vegetais, a celulose I do tipo I_α é mais comum entre bactérias e algas, enquanto a celulose I_β é predominante em plantas superiores (Zhang & Lynd, 2004). O alomorfo I_α pode se converter no I_β , termodinamicamente mais estável, por deslizamento das fibras pelo processo de recozimento (Hallac & Ragauskas, 2011).

A celulose I_β apresenta-se em formas geométricas específicas nas microfibrilas vegetais. A determinação das dimensões dessas microfibrilas que tem sido alvo de investigações em vários grupos de pesquisa (Figura 4). Estudos de RMN de um mesmo grupo de pesquisa (Kennedy *et al.*, 2007) determinaram que a seção transversal microfibrilar da celulose I_β de salsão tinha dimensões em torno de 2,4 e 3,2 nm, sendo composto por cadeias em número entre 15 a 25. Em outros trabalhos, assumindo que o número de cadeias em uma microfibrila deveria ser divisível por 6, determinaram que 24 cadeias comporiam a microfibrila para o espruce e salsão. Esses resultados contrapuseram o difundido modelo de 36 cadeias para a composição de microfibrila vegetal (Brown & Saxena, 2000). Para explicar os dados experimentais a partir da proposição do modelo de microfibrila com 24 cadeias, tanto satisfizeram os formatos de microfibrilas retangulares, quanto losangulares (diamante). Resultados para feijão-mungo ajustaram-se melhor para o modelo de 18 cadeias losangulares (Payne *et al.*, 2015).

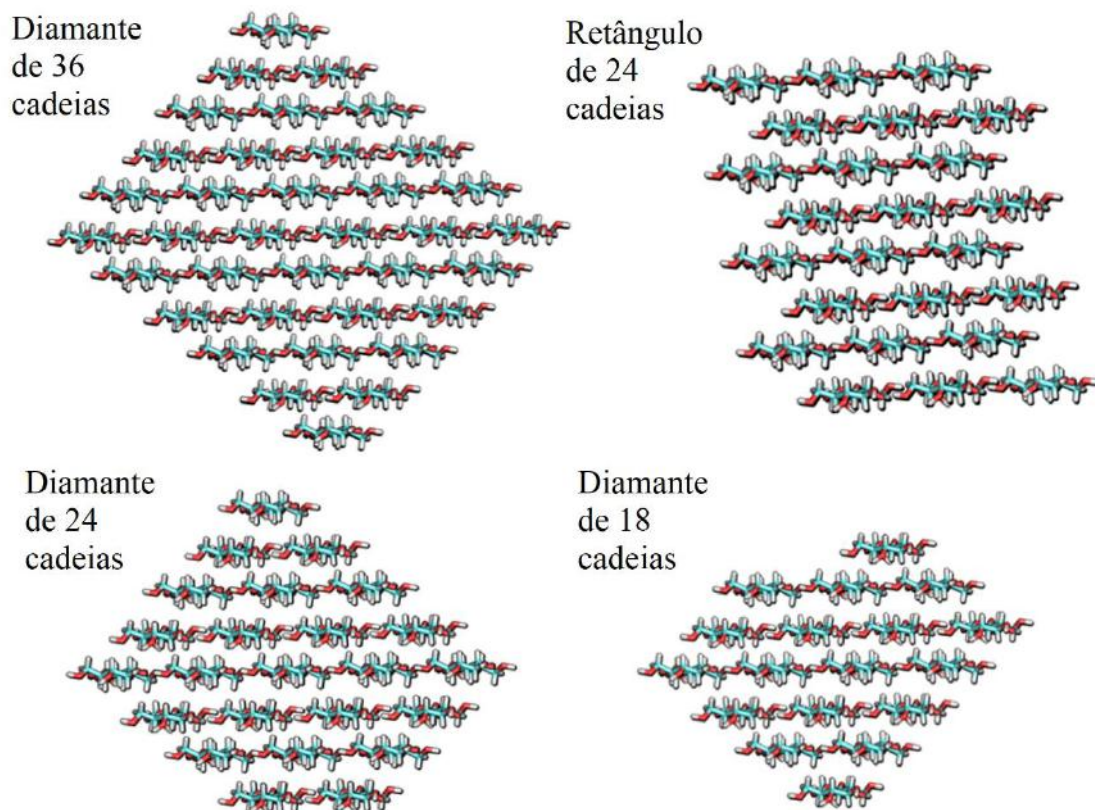


Figura 4 – Modelo de tamanho e formatos de microfibrilas de celulose I_β a partir de dados de (RMN) em tecidos vegetais (modificado de Payne *et al.*, 2015).

A celulose possui estrutura que tem a capacidade de girar em torno de seu próprio eixo em aproximadamente $1,5^\circ$ para cada unidade de celobiose dentro da estrutura polimérica. Essa característica tem sido verificada por simulações moleculares de celulose I_β, mas também por meio de dados experimentais. Os efeitos desse giro sobre a ação das celulasas é ainda desconhecido (Payne *et al.*, 2015). Dependendo do organismo que produz a celulose, as suas fibras em nanoescala, denominadas nanocristais, podem apresentar giros de 180° a cada 700 nm a $3,2 \mu\text{m}$ (Moon *et al.*, 2011).

A característica de cristalinidade da celulose é incomum dentre os biopolímeros vegetais. Ela confere relativa impermeabilidade da estrutura microfibrilar para moléculas, como a água e enzimas. O eventual acesso nessa estrutura pode se dar junto às irregularidades em sua superfície por meio das quais a água tem capacidade de inchá-la, deixando-a com microporos e cavidades (Sukumaran *et al.*, 2005). O acesso é facilitado sobretudo na porção amorfa da molécula. Também, a descristalinização do material é mais facilitada nos cristais de celulose II e III com relação à celulose I_α e I_β (Payne *et al.*, 2015).

Segundo Hallac & Ragauskas (2011), ao compor as microfibrilas e fibras dos tecidos vegetais, a celulose se apresenta sob três formas cristalinas, sendo essas a celulose I_{α} , I_{β} e celulose para-cristalina, mas também duas formas não cristalinas: celulose amorfa e superfícies fibrilares acessíveis e inacessíveis. A celulose para-cristalina é caracterizada como uma estrutura mais organizada que a celulose amorfa, porém menos estruturada que as formas I_{α} e I_{β} . As superfícies fibrilares acessíveis são aquelas em contato com a água enquanto as inacessíveis são contatos fibrila-fibrila e distorções no interior da estrutura (Figura 5).

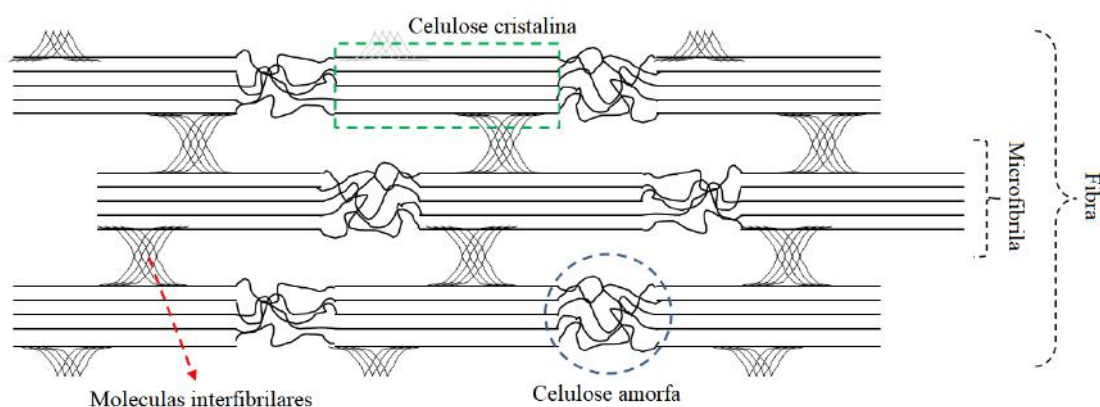


Figura 5 – Seção de fibra de celulose, evidenciando regiões cristalinas, amorfas e também celulosas interfibrilares. Adaptado de Börjesson & Westman, (2015).

A variação da fração em peso de celulose cristalina em relação ao peso total desse biolímero varia de 40% a 95% na natureza (Quiroz-Castañeda & Folch-Mallol, 2013). Mesmo que, por muitas vezes, a concepção da distribuição das regiões amorfas e cristalinas seja motivo de investigação, existem estudos que sugerem as regiões amorfas mais superficiais e recobrimo uma região cristalina, de aspecto cilíndrico central (Larsson *et al.*, 1997). Como se fosse um fio cristalino encapado com celulose amorfa. Outros estudos suportam a descrição de uma microfibrila apresentando regiões cristalinas de extensão de 200 resíduos intercaladas por regiões amorfas (Andersen, 2007), como também cita Junior, (2011) (Figura 5).

A verificação da cristalinidade em materiais celulósicos é muito relevante para a escolha de qual substrato usar em testes. Esses testes são realizados principalmente a partir de técnicas de difração de raios-X, RMN de ^{13}C , espectroscopia de IV com TF e RAMAN. Cada técnica se baseia em um princípio físico distinto, mas a difração de raios-

X permanece sendo a mais usada na literatura (Payne *et al.*, 2015). Ainda que, ao utilizá-la a cristalinidade possa variar amplamente dependendo da técnica utilizada para analisar os resultados (Thygesen *et al.*, 2005).

Embora exista dificuldade em representar cada uma das estruturas amorfas e cristalinas a partir de substratos-modelos, algumas representações tem sido usadas na literatura. Como modelo de celulose cristalina, verificam-se o Avicel, Sigmacell, Solka-floc, BMCC (*bacterial microcrystalline cellulose*), celulose de algas ou tunicados, biomassas pré-tratadas e polimorfos não naturais derivados de celulose I. Representações de celulose amorfa incluem o PASC (*phosphoric acid swollen cellulose*), substratos oligoméricos de celulose regenerada ou solúveis (Payne *et al.*, 2015).

A polpa de celulose ou pasta de celulose é a matéria prima base para a produção de celulose comercial. A celulose do tipo Avicel® foi inicialmente preparada em 1962 pela American Viscose Company, dando origem ao nome do material. Ela é preparada a partir da polpa vegetal do línter de algodão, reconhecida como a penugem associada às sementes da planta. Esse material é hidrolisado com ácidos fortes em ambiente com específicas temperaturas e pressões. Nessa etapa remove-se as porções mais maleáveis da polpa, denominadas de beta e gama celulose (que consistem majoritariamente de hemicelulose) restando uma porção mais cristalina – alfa celulose – após filtração e secagem por spray (Reier, 2000). Uma vez pura para uso na indústria farmacêutica, recebe a sigla PH (FMC, 2017). Dependendo da sua granulometria e umidade, ainda recebe numerações específicas (Reier, 2000).

2.3. A produção do etanol celulósico: pré-tratamentos como promotores da reatividade do substrato

Devido à alta recalcitrância da matéria-prima vegetal, vários processos podem ser utilizados para a sua resistência a reagir, os quais são denominados pré-tratamentos (Limayem & Ricke, 2012). Diferentes métodos e técnicas intensivos de energia e/ou reagentes químicos promovem a desorganização ou modificação da biomassa nesse processo. Segundo Mosier *et al.* (2005), o objetivo dos pré-tratamentos é reduzir a cristalinidade e/ou o grau de polimerização da celulose e remover seletivamente lignina ou hemicelulose sem formar inibidores de fermentação. Atualmente, não existe um tipo

de pré-tratamento que seja capaz de promover o mesmo rendimento reacional na etapa de hidrólise em todos os tipos de biomassa existentes, dada a efetividade variar bastante frente a diversidade composicional vegetal.

2.3.1. O efeito do pré-tratamento sobre o substrato.

O pré-tratamento altera a estrutura da biomassa propiciando a sua conversão no sentido de gerar açúcares fermentescíveis pela etapa seguinte processo, a hidrólise (Potumarthi *et al.*, 2013). Esses autores consideraram que as modificações físicas decorrentes do pré-tratamento que proporcionam aumento do rendimento de hidrólise por ações de enzimas para uma biomassa celulósica pura são o aumento da área superficial e da porosidade e a redução da cristalinidade da celulose. Olofsson *et al.* (2008) relaciona a fragmentação e quebra das estruturas como motivo para haver aumento da área superficial causada pelos pré-tratamentos.

De modo geral, porém, não se verifica consenso sobre a importância dessas características apontadas sobre a eficiência na hidrólise entre os diferentes autores. Mood *et al.* (2013) desconsidera o efeito da porosidade, mas ressalta a importância do grau de polimerização sobre o processo. Por outro lado Sun & Cheng, (2002) e outros autores, indicam que a porosidade do substrato celulósico permite maior acesso para atuação dos complexos enzimáticos (Andersen, 2007; Junior, 2011; Santos *et al.*, 2012; Limayem & Ricke, 2012). Zhang & Lynd, 2004 argumentam que vários tratamentos alteram ambas as características, porém a conversão aumentada da celulose está mais relacionada à melhor adsorção das enzimas na biomassa pré-tratada do que devido a uma maior reatividade do substrato. Sathitsuksanoh *et al.* (2013) aponta que todas as características acima impactam na recalcitrância do substrato. Barcelos *et al.* (2015) consideram que para se estabelecer qualquer processo de conversão de biomassa lignocelulósica deve ser feita a redução da recalcitrância, da cristalinidade e da polimerização das fibras vegetais, de modo que a disponibilidade dos carboidratos é dependente da despolimerização causada pelos pré-tratamentos.

Deve se ressaltar que mesmo entre as celulosas puras existe grande variação entre as propriedades como grau de polimerização, cristalinidade, formatos das fibras e microfibrilas, área superficial (Payne *et al.*, 2015). Contudo, uma vez escolhido e feito

um pré-tratamento, as alterações físico-estruturais do material pré-tratado raramente são quantificadas. Não quantificá-la colabora com o atraso no entendimento sobre os processos que governam a hidrólise enzimática como um todo. Segundo Junior (2011), em muitos casos a dificuldade para obter essas informações sobre um material está associada à metodologia do preparo da amostra para as caracterizações.

2.3.2. Tipos de pré-tratamento.

Os diferentes pré-tratamentos, podem ser classificados em grupos: os físicos, os termoquímicos e os biológicos (Cardona *et al.*, 2010). Alguns autores entendem o grupo de termoquímicos como sendo subdivisível por dois outros: um grupo de pré-tratamentos químicos e outro de físico-químicos (Lamsal *et al.*, 2010, Mood *et al.*, 2013; Angarita Martínez, 2014).

O pré-tratamento de biomassas pode ser executado pelos métodos hidrotérmico, explosão a vapor, solventes orgânicos, AFEX (explosão a vapor de amônia), ácidos diluídos, bases diluídas, moinho de bolas, moinho de martelos, pirólise, líquidos iônicos, dentre outros (Sun & Cheng, 2002; Zhang & Lynd, 2004; Stephen *et al.*, 2012). Dentre as técnicas existentes, destacam-se as técnicas de moinho de bolas e líquidos iônicos por propiciarem altos rendimentos de hidrólise dos resíduos de celulose pré-tratados pelas suas técnicas. Estruturalmente, verifica-se alguma similaridade nas modificações estruturais que elas causam sobre a biomassa tratada. Outras técnicas como tratamentos baseados em vapor ou hidrotérmicos ácidos não promovem redução significativa de cristalinidade nos seus pré-tratados (da Silva *et al.*, 2013).

2.3.3. Tipos de pré-tratamento: físico, por moinho de bolas.

O pré-tratamento com moinho de bolas é uma técnica do tipo física, que tem um alto custo comparativo com outras pela sua alta demanda energética associada. O método opera provocando tensão de cisalhamento no material através do impacto mecânico (Lin *et al.*, 2010) por meio de esferas em movimento contidas em um frasco agitado. Frasco

esse existente com diferentes configurações. A moagem promove redução no tamanho de partículas, aumento da área superficial do material pré-tratado, diminuição do grau de polimerização da celulose e sua descristalinização (Mood *et al.* 2013; da Silva *et al.*, 2013; Nemoto *et al.*, 2017) (Figura 6).

Em condição de 30% de água (m/v) no sistema de moagem de celulose obtida de algodão, Ago *et al.* (2004) verificaram que o material sofria conversão do alomorfo I para a II devido a aumentada capacidade das fibras de celulose de se movimentarem nessa condição hidratada. Yang *et al.* (2013) verificaram leve padrão característico de celulose II para línter pré-tratado com moinho de bolas por 24 h a 1000 rpm e registro híbrido de celulose I e II para o material oriundo de moinho de bolas quando seguido de pré-tratamento com hidrólise ácida com ácido sulfúrico por 4h.

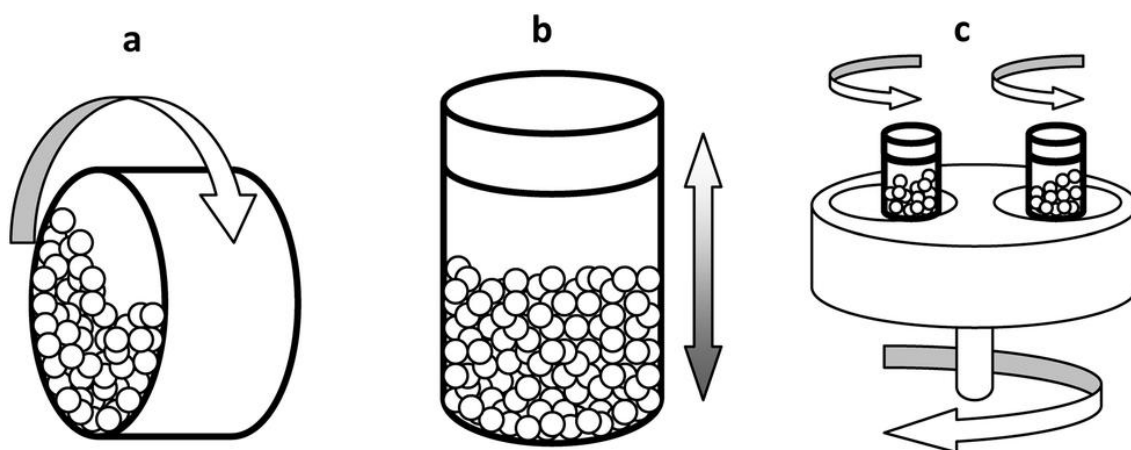


Figura 6 – Configurações de operação de moagem por moinho de bolas. (a) Moinho de tambor, (b) Moinho vibratório ou agitador, e (c) Moinho planetário. Retirado de Gorrasi & Sorrentino (2015).

O pré-tratamento com moinho de bolas tem ainda a vantagem de não proporcionar perdas mássicas de componentes de baixo peso molar do substrato tratado (da Silva *et al.*, 2013).

2.3.4. Tipos de pré-tratamento: químico, por líquidos iônicos.

A técnica de pré-tratamento com líquidos iônicos é caracterizada por ser do tipo química que faz uso de solventes de celulose (Balat *et al.*, 2010). Os líquidos iônicos foram primeiramente aplicados para dissolver celulose em 1934 (Graenacher, 1934) embora a primeira espécie desse grupo tenha sido descoberta em 1914 (Walden, 1914).

Os líquidos iônicos são sais que se fundem a temperaturas abaixo de 100°C. Eles possuem baixa pressão de vapor a temperatura ambiente e conseguem dissolver vários tipos de biomassa celulósica e lignocelulósica mediante aquecimento, que geralmente é realizado entre 80°C e 150°C (da Silva *et al.*, 2013). Mas também tem ampla janela eletroquímica, alta estabilidade térmica, não são inflamáveis e conseguem dissolver compostos inorgânicos. Suas propriedades de hidrofobicidade, polaridade e potencial de solvatação podem ser ajustadas com mudanças nos cátions e ânions desses compostos (Zhang *et al.*, 2017).

Cabe ressaltar que o grupo de líquidos iônicos tem sido considerado classe à parte dos solventes eutéticos. A diversidade dos compostos tem aumentado e várias subdivisões dessa classe de substâncias tem surgido: líquidos iônicos a temperatura ambiente (RTILs), líquidos iônicos tarefa-específicos (TSILs), líquidos poliônicos (PILs), líquidos iônicos suportados por membranas (SILMs) que englobam compostos de líquidos iônicos suportados por redes organometálicas (MOFs) (Plutschack *et al.*, 2017).

Desse grupo de substâncias iônicas, aquelas que possuem cátions de imidazólio ou piridínio pareados com ânions Cl^- , CF_3SO_3^- , CF_3CO_2^- , CH_3CO_2^- , HCOO^- , R_2PO_4^- são capazes de dissolver as fibras de celulose através da forte basicidade da ponte de hidrogênio. Porém, a maioria dos líquidos iônicos inibem a atividade enzimática. Para remover o líquido iônico do sistema são utilizados contrassolventes, que pode ser água, acetona ou álcoois. A necessidade de remoção completa dos líquidos iônicos do sistema reacional para a sua aplicação industrial inviabiliza economicamente sua utilização (Sathitsuksanoh *et al.*, 2013).

Desses líquidos iônicos, destaca-se o acetato de 1-Etil-3-metilimidazólio ([EMIM][OAc]), que tem provadas capacidades de dissolver celulose do tipo Avicel e bagaço de cana de açúcar, aumentando suas propriedades de área superficial (da Silva, 2006) e diminuir suas cristalinidades (Cheng *et al.*, 2011).

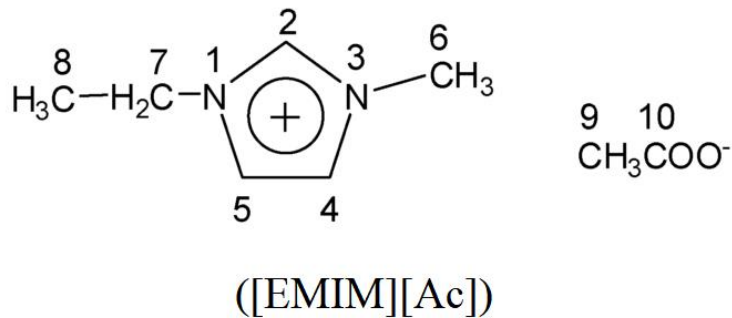


Figura 7 – Estrutura e numeração da cadeia do Líquido Iônico acetato de 1-Etil-3-metilimidazólio ([EMIM][OAc]). (Adaptado de Zhang *et al.*, 2010).

O mecanismo de dissolução da celulose por líquidos iônicos tem mostrado que a efetividade do processo é dependente do rompimento das ligações de hidrogênio dentro do polímero (Payal *et al.*, 2015) e o ânion do líquido iônico é aquele que desempenha maior contribuição com esse processo.

Todavia, o mecanismo de dissolução de celulose por ([EMIM][OAc]) revelou que o cátion participa desse processo. Por meio da alteração do espectro de Ressonância Magnética Nuclear – RMN a partir de um modelo de celobiose, verificou-se que o acetato do LI formava pontes de hidrogênio preferenciais com os átomos de hidrogênio da hidroxila do anel de celulose. O cátion do líquido iônico também se associava às hidroxilas mais expostas estericamente, sobretudo o hidrogênio na posição H2 (Zhang *et al.*, 2010).

A técnica tem demonstrado ser útil em dissolver a celulose sem alterar significativamente o grau de polimerização da molécula (Hallac & Ragauskas, 2011). Por outro lado, o pré-tratamento com líquidos iônicos provoca redução na cristalinidade do material a ser tratado (da Silva *et al.*, 2013) e aumenta a acessibilidade do polímero mais efetivamente do que outros pré-tratamentos tradicionais (Sathitsuksanoh *et al.*, 2013).

Sob certas condições de tratamento com líquidos iônicos, ocorre o favorecimento de morfologias de celulose com menor cristalinidade e maior taxa de degradação. Assim, diminui-se a demanda de enzima e, conseqüentemente, melhora-se a viabilidade econômica dos processos que empregam a celulose como reagente (Cruz *et al.* 2013). A aplicação do líquido iônico e sua posterior retirada com o antissolvente seguido de sua

secagem, parcialmente promove mudança no padrão cristalino de celulose I para celulose II, não somente para a forma amorfizada (Figura 8) (Samayam *et al.*, 2011).

Cruz, 2013 e Samayam, 2011 ambos verificaram que, tanto para o Avicel tratado com ([EMIM][OAc]) a 50°C e 120°C, quanto para outras biomassas lignocelulósicas pré-tratadas em temperaturas de 120°C a 50°C, em diferentes tempos de pré-tratamento, houve manutenção parcial do perfil característico de celulose I no material pré-tratado. O Avicel pré-tratado, mas não lavado com o antissolvente apresentou difração de raios-X sem picos característicos, indicando a não formação de um intermediário para a recristalização nesse sistema, bem como se percebeu para fibras dos materiais lignocelulósicos testados. Ademais, a hidrólise dos materiais pré-tratados contendo celulose II apresentaram em torno de duas vezes maior rendimento reacional. Sob o ponto de vista estrutural, a susceptibilidade à hidrólise de materiais contendo as alomorfos de celulose mais recalcitrantes I_{α} e I_{β} pode ser drasticamente aumentada quando esses alomorfos forem convertidos para as formas II, III_I, III_{II}, ou até amorfa, todas elas mais reativas à degradação enzimática (Zhang *et al.*, 2014).

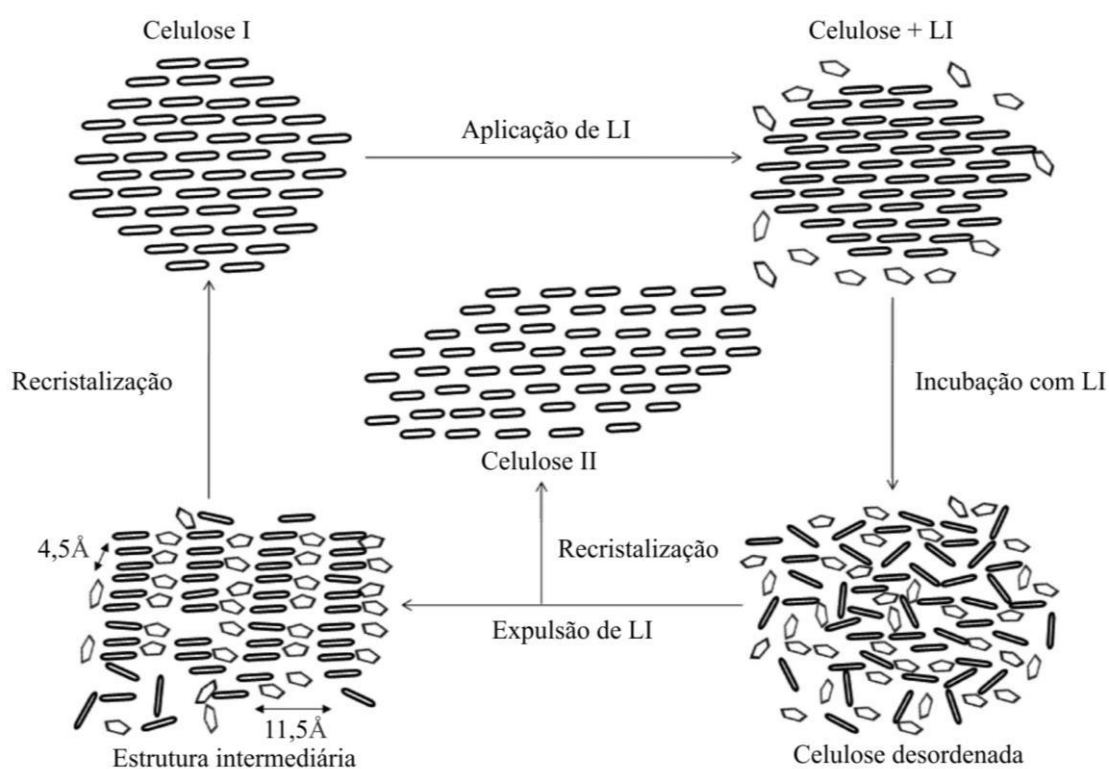


Figura 8 – Representação esquemática do processo de formação de celulose II a partir do tratamento de celulose I com líquidos iônicos. A aplicação e incubação do líquidos iônicos abre e desordena a estrutura que é parcialmente recristalizada

quando aplicado um antissolvente. Fibras lignocelulósicas quando tensionadas no processo de expulsão de LI por lavagem, apresentam estrutura intermediária que leva a recristalização do material em celulose I. Adaptado de Samayan *et al.*, 2011

Como exemplo de pré-tratamentos empregando líquidos iônicos modificando a estrutura da celulose, Zhang *et al.* (2014) pré-trataram com ([BMIM][OAc]) switchgrass (*Panicum virgatum*), palha de milho e casca de arroz em temperaturas desde 50°C a 130°C por 6 h com 5% de carga de sólidos. Verificou-se queda na cristalinidade até a temperatura de 70°C. Porém, entre 80°C e 90°C, verificou-se a formação de picos característicos da formação de celulose II, formada a partir da regeneração da celulose dissolvida em solução. Já na condição de 130°C e 30% de carga de sólidos, os picos não eram mais observados. Em outro trabalho, Barr *et al.* (2014) verificaram que o valor mínimo do índice de cristalinidade foi alcançado em temperaturas em torno de 100-110°C para as amostras de álamo, palha de milho e switchgrass (*Panicum virgatum*) tratadas com 5% de razão de biomassa/líquidos iônicos com ([EMIM][OAc]) por 4h.

Zhang *et al.* (2014) sugere pelos dados de materiais lignocelulósicos que em temperaturas mais reduzidas que 80°C e em 6 h de tratamento seja possível a produção de materiais amorfos, sem a presença do alomorfo celulose II. Todavia, Samayam *et al.* (2011) trabalhando com avicel pré-tratado com ([EMIM][OAc]) a 50°C, de 12 a 14h obteve conversão do alomorfo I_β para a II. Esse autor sugere que a formação de celulose II está relacionada a capacidade do material em inchar e ser dissolvido pelo LI e também haver aproximação das fibras com polaridades opostas. Esses fenômenos seriam impedidos pela lignina em lignoceluloses. Além disso o trabalho de Barr *et al.* (2014) mostrou aumento da amorfização da amostra de álamo, palha de milho e switchgrass (*Panicum virgatum*) submetidas a temperaturas crescentes de pré-tratamento com ([EMIM][OAc]). Ainda que a cristalinidade medida por DRX decrescesse, foi demonstrado aumento no conteúdo de celulose II no material a partir de análises de RMN de ¹³C no estado sólido. Nos substratos com maior rendimento de hidrólise, verificou-se quase apenas a presença de celulose II e celulose amorfa. Esse autor propõe reação preferencial das enzimas na porção amorfa em comparação com a celulose II.

Cruz *et al.* (2013) verificaram que a cristalinidade da celulose em switchgrass (*Panicum virgatum*) foi modificada da forma I_β para o alomorfo II em cargas de sólidos de 3% e 20% pré-tratamento com ([EMIM][OAc]) a 160°C por 3h. Todavia em 40% e

50% de carga de sólidos verificou-se alta amorfização da amostra, com índice de cristalinidade de 0,08 e 0,03. Os autores atribuíram que a permanência do material na sua forma amorfizada é devido a efeitos de transferência de massa das cadeias celulósicas solúveis na parede vegetal, ou seja, da sua restrição de movimentação.

2.4. A produção do etanol celulósico: hidrólise

No processo de produção do etanol lignocelulósico, a hidrólise, ou sacarificação, sucede a etapa de pré-tratamento da biomassa. Para realizá-la consideram-se principalmente a estratégia em rota ácida (H_2SO_4 – diluída ou concentrada) ou através da rota enzimática (Cara *et al.*, 2007; Limayem & Ricke, 2012). Os resultados experimentais para hidrolisados ácidos tem levado pesquisadores buscarem técnicas de hidrólise mais favoráveis (Limayem & Ricke, 2012), dentre as quais destaca-se a lise enzimática.

A rota de lise enzimática é considerada mais favorável do que a mediada por ácido segundo Balat (2011), porque tem o potencial de apresentar hidrolisados com melhores rendimentos que a hidrólise ácida e não gera compostos tóxicos para etapa de fermentação (Olofsson *et al.*, 2008). Também a reação enzimática demanda equipamentos mais baratos do que os necessários para executar a hidrólise ácida (Cara *et al.*, 2007). Porém, fenômeno de hidrólise enzimática é de natureza intrincada (Zhang & Lynd, 2004) e ele é impactado negativamente pelo alto custo que as enzimas contabilizam nele (Cara *et al.*, 2007). Quem governa esse processo são as celulasas.

As celulasas são hidrolases que clivam ligações o-glicosídicas, logo são denominadas o-glicosil hidrolases uma vez que quebram a ligação entre dois carboidratos ou entre um carboidrato e outra molécula (Andersen, 2007). As glicosil hidrolases (GH)(EC 3.2.1.-) são um grupo bastante grande e diverso, no qual as celulasas se inserem (CAZy, 2017).

A estrutura e função das celulasas são profundamente características do reino biológico do organismo no qual elas são produzidas. Essa diferença é bastante marcante entre as celulasas fúngicas e bacterianas (Kuhad *et al.*, 2011). As celulasas de bactérias são geralmente maiores e comumente se associam à outras proteínas para constituir ultraestruturas catalíticas singulares e são detalhadas por autores como Akinosho *et al.*

(2014), Barcelos *et al.* (2015), Akhtar *et al.* (2016), Sukumaran *et al.* (2017). Por outro lado, as fúngicas possuem estrutura mais simples do que as bacterianas e são mais utilizadas industrialmente.

2.4.1. A estrutura e função de celulases

As celulases de fungos e leveduras são geralmente constituídas por três domínios. O domínio catalítico, que processa as reações químicas; o domínio glicopeptídico de ligação à celulose (CBM – *carbohydrate binding module*), que acopla o domínio catalítico no substrato e, finalmente, a sequência ou peptídeo de ligação, que liga o domínio catalítico e o módulo de ligação entre si (Abuja, 1994; Bansal, 2009) (Figura 9). Cada domínio contribui diferentemente sobre a função da enzima celulase. Segundo a base de dados de enzimas ativas sobre carboidratos (CAZy-2, 2018), existem 145 famílias de glicosil hidrolases e 81 famílias de módulos de ligação à carboidratos.

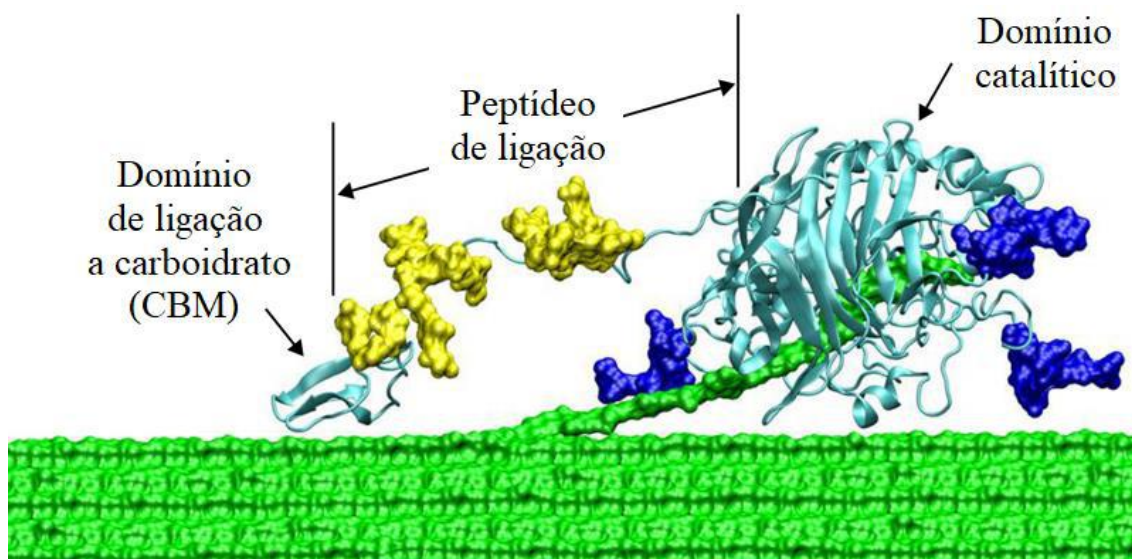


Figura 9 – Estrutura de celulase fúngica em verde-água, com destaque dos seus três principais domínios: domínio catalítico, peptídeo de ligação e domínio de ligação a carboidrato. As regiões volumosas em amarelo e azul representam as glicosilações da celulase. (Adaptado de Barcelos *et al.*, 2015).

O domínio de ligação com a celulose (CBM) é importante para as celulases iniciarem e processarem a catálise sobre a celulose, mas várias dessas enzimas ativas podem não possuir esse domínio. Os CBM possuem domínios que são constituídos de 30

a 200 aminoácidos, usualmente o-glicosilados (Quiroz-Castañeda e Folch-Mallol, 2013), presentes na porção carboxi ou aminoterminal da proteína. Das 81 famílias existentes atualmente (CAZy-2, 2018), muitos fungos possuem o CBM da família 1, cujo conhecimento estrutural a seu respeito adveio de estudos quase exclusivos sobre moléculas de *T. reesei*. A diversidade da família 1 é subdividida em três tipos: A, B e C para as estruturas seletivas que se ligam sobre moléculas cristalinas, amorfas e não poliméricas, respectivamente (Payne *et al.*, 2015). Boraston *et al.* (2004) admitem que as funções dos CBM envolvem melhorar a proximidade de enzima-substrato, função de direcionamento e função disruptiva (não hidrolítica). Foi verificado que o CBM se liga preferencialmente na porção mais hidrofóbica da molécula de celulose I_β (Nimlos *et al.*, 2007) e I_α (Liu *et al.*, 2011). A interação do CBM com a celulose é atribuída ao plano cristalino 110 da celulose pela sua maior hidrofobicidade, mas também onde eram expostas as ligações β-glicosídicas (Zhang & Lynd, 2004). Essa interação entre a face hidrofóbica da celulose microcristalina e o CBM foi atribuída aos componentes estruturais hidrofóbicos do CBM de Cel7a de *Trichoderma reesei* (TrCel7a) de forma a alinhar preferencialmente a base plana do seu CBM paralelamente à uma celohexalose (Mattinen *et al.*, 1997). O processo de sorção de celulasas em Avicel e outros substratos é possivelmente ser reversível por completo, segundo Linder *et al.* (1996). Porém, para a enzima análoga TrCel6a notou-se que ela não se desorvia da celulose bacteriana em temperaturas de 4 a 50°C, mesmo após 8 h do sistema diluído e da TrCel7a (Carrard & Linder, 1999). Por outro lado, o CBM da enzima correlata que cliva porções mais amorfizadas de celulose, Cel7b, também possuía maior afinidade por celulose cristalina (Linder *et al.*, 1995). Cruys-Bagger *et al.* (2013) verificaram em seu estudo que a presença de CBM em TrCel7a aumentava sua atividade sobre a celulose cristalina, mas não sobre celulose amorfizada, indicando que o CBM pode participar também na descristalinização do substrato. Uma modulação da capacidade adsortiva dos CBM pode alterar profundamente a dinâmica de hidrólise da celulose (Takashima *et al.*, 2007). Sua perda, porém, acarreta na redução da afinidade do domínio catalítico com a celulose (Várnai *et al.*, 2013). Ståhlberg *et al.*, 1993 sugeriram que a afinidade preferencial dos CBM para a celulose cristalina, aumenta a concentração dos domínios catalíticos sobre o substrato, mas também os CBM possuem difusão bidimensional permitindo maior eficiência catalítica. Em altas concentrações de sólido em solução, como Avicel e palha de trigo, o incremento na capacidade difusiva da celulase de *T. reesei* por seus CBM não é percebido. Já em baixa concentração, os CBM direcionam seletivamente a celulase para seu

substrato, favorecendo que as etapas catalíticas da reação como as limitantes do processo de hidrólise, não as difusivas. Efeitos em condições menos hidratadas, se assemelham aos de alta concentração de sólidos (Várnai *et al.*, 2013).

O peptídeo de ligação é geralmente constituído de 6 a 59 aminoácidos (Quiroz-Castañeda e Folch-Mallol, 2013) e são ricos de resíduos de prolina, principalmente em bactérias. Existe abundância de treonina e serina em fungos. Mesmo havendo prevalência de alguns aminoácidos, o peptídeo possui baixa homologia de sequência entre as celulasas (Payne *et al.*, 2015). O peptídeo de ligação admite diversas possibilidades conformacionais com similar custo de energia livre e permite o funcionamento independente dos domínios catalítico e de ligação a carboidratos (Quiroz-Castañeda e Folch-Mallol, 2013). Pela sua presença foi proposto um mecanismo de funcionamento das celulasas como ao de uma minhoca, propiciando a contração e afastamento dos outros módulos na medida em que se processa a hidrólise enzimática. A diminuição do número de resíduos ou ausência dessa estrutura reduz ou depleta a atividade catalítica das celulasas, enquanto sua presença aumenta a afinidade de ligação do CBM em dez vezes. Alguns aminoácidos dessa porção podem ser apresentados o-glicosilados exercendo efeitos estruturais, efeitos de exclusão estérica e de controle de motilidade do peptídeo e também protetivos contra proteólise (Payne *et al.*, 2015). Verificou-se que a Cel7a de *T. reesei* ALKO2877 apresentou pelo menos uma o-manose em seus resíduos de serina e treonina (Harrison *et al.*, 1998) e que essa glicosilação acontecia heterogeneamente nos resíduos das linhagens RUT-C30, Iogen-M4 e Iogen-B13 (Hui *et al.*, 2001).

O domínios catalíticos (DC) compreendem mais de 70% da sequência das celulasas e evoluíram com a capacidade de hidrolisar a enorme diversidade e multiplicidade da ligações entre as moléculas de carboidratos (Payne *et al.*, 2015). A classificação das celulasas leva em consideração características do DC. As celulasas podem ser classificadas com vistas às características reacionais dos domínios catalíticos (EC) (IUPAC/IUBMB, 2014); considerando às similaridades da sequência de aminoácidos da proteína da respectiva família de glicosil-hidrolases (GH) a qual pertencem; considerando domínio de ligação e CBM (CAZy-2, 2018; BRENDA, 2018); e, finalmente, pelos padrões de estruturas secundárias, permitindo uma terceira categorização por estruturas similares. Assim, é possível correlacionar as famílias estruturais e as propriedades catalíticas, tão bem quanto comparar as estruturas

secundárias com as classificações com base na sequência de aminoácidos e na atividade catalítica (Figura 10), revelando padrões entre forma e função em alguns grupos.

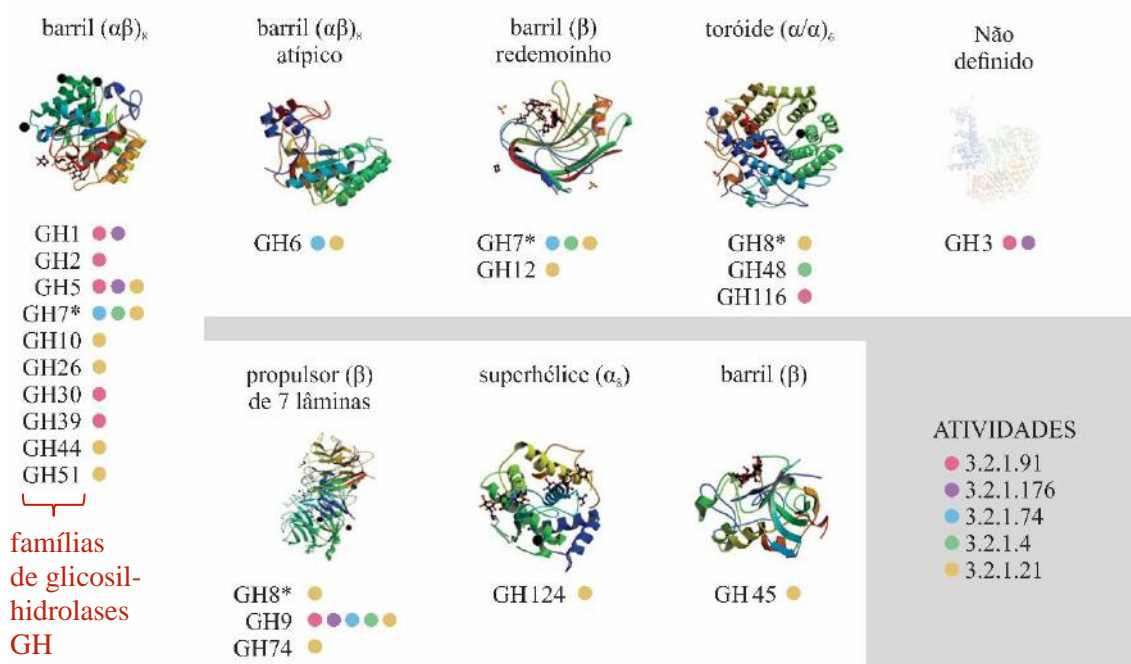


Figura 10 – Similaridades estruturais nas diferentes famílias celulásicas das GH e as atividades catalisadas por essas subunidades catalíticas. Adaptado de Sukharnikov *et al.*, 2011 complementando com os dados de CAZY (2017) para informações estruturais. As atividades de cada classe de moléculas foram providas por Abuja (1994), Olofsson (2008), Bansal (2009), Dimarogona *et al.* (2012), Quiroz-Castañeda e Folch-Mallol (2013). (*) informações em conflito entre as duas referências.

2.4.2. Tipo de celulases

As celulases são um ramo de enzimas pertencentes a um grupo muito mais amplo: aos das enzimas glicosil-hidrolases. O aspecto que permite unir as celulases em um grupo exclusivo é com vistas às suas atividades. As celulases compreendem o conjunto aquele que contém um, de três grupos de atividades (Abuja, 1994; Olofsson, 2008; Bansal, 2009; Dimarogona *et al.*, 2012; Quiroz-Castañeda e Folch-Mallol, 2013):

- I) as exo-glicanases ou exo-(1,4)-β-glicanases ou 1,4-β-D-glicanocelobiohidrolases, também chamadas de celobiohidrolases, compreende as famílias CBH I (Cel7a) e CBH II (Cel6A);

- a. CBH I (Cel7a) – (EC 3.2.1.91; GH7, GH6, GH9), para as enzimas atuando nas extremidades redutoras;
 - b. CBH II (Cel6A) – (EC 3.2.1.176; GH7, GH9, GH48), para as extremidades não-redutoras, incluindo as celodextrinases (EC 3.2.1.74; GH1, GH3, GH5, GH9);
- II) as endoglicanases ou endo-(1,4)- β -D-glicanases, abrangendo as famílias EGI (Cel7b), EGII (Cel5A), EGIII (Cel12A), EGIV (Cel61A)*, e EGV (Cel45A); (EC 3.2.1.4 – GH 5-10, GH12, GH26, GH 44-45, GH 48, GH51, GH74, GH124 e NC).
- III) as β -glicosidades, BGLI (Cel3A), BGLII (Cel1A), e outras (Cel3B, Cel3C, Cel3D, Cel3E, Cel3F, Cel3G, Cel3H e Cel1B); (EC 3.2.1.21 – GH 1-3, GH5, GH9, GH30, GH39, GH116 e NC), em que NC se refere a proteínas não classificadas. (Como exemplo de β -glicosidades, tomaram-se as produzidas pelo microorganismo *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) (Foreman *et al.*, 2003; Payne *et al.*, 2015, Li, *et al.*, 2016).

* a classificação das Cel61A e Cel61B permanece ainda controversa (Gupta *et al.*, 2014)

Cada uma dessas enzimas possui uma forma particular de interagir e catalisar reações da degradação da celulose.

Uma das principais enzimas celulolíticas, as exo-glicanases ou 1,4- β -D-glicanocelobiohidrolases (CBH) do tipo I têm peso molecular médio de 50 a 65 kDa, baixo nível de glicosilação, pH médio de atuação em torno de 4,0 e 5,0 e operam em temperaturas geralmente entre os limites de 37°C a 60°C (Quiroz-Castañeda e Folch-Mallol, 2013). Elas têm maior afinidade com celulose cristalina e liberam celobiose como principal produto reacional (Chanzy *et al.*, 1983; Balat, 2011; Soccol *et al.*, 2010; Bansal *et al.*, 2009; Kuhad *et al.*, 2011; Koivula *et al.*, 2002), podendo também gerar glicose em menores proporções na reação catalítica (Nidetzky *et al.*, 1994b).

A CBH I de *T. reesei* (TrCel7a) atua sobre as extremidades redutoras da cadeia polimérica (Bansal *et al.*, 2009), com auxílio de um túnel enzimático de ~50 Å, o dobro do tamanho do túnel da enzima análoga CBH II (Cel6a) (Rouvinen *et al.*, 1990). Dentro desse túnel, a celulose estabelece 7 a 10 de ligações em sítios específicos com a enzima, por meio de alinhamento com resíduos de triptofano. Nas CBH I de *T. reesei* MCG77, o túnel do sítio ativo pode abranger seis monômeros de glicose (Nidetzky *et al.*, 1994b).

Esse túnel é característico por ser flanqueado por alças bem conservadas entre as enzimas do tipo e possibilita a desfibrilação e catálise do polímero celulósico ao mesmo tempo que inibe o polímero desfibrilado readerir à fase condensada. Todavia, as CBH podem hidrolisar a celulose no meio da sua cadeia polimérica quando essas enzimas abrem suas alças (Payne *et al.*, 2015). Fora do túnel catalítico, as CBH I de *T. reesei* QM9414 conseguem cobrir aproximadamente a área de 156 moléculas de glicose sobre a rede de ligações glicosídicas em um substrato celulósico (Levine *et al.*, 2010). Isoladamente, existe maior afinidade do domínio catalítico pela porção amorfa da celulose (Ståhlberg *et al.*, 1991) (Figura 11).

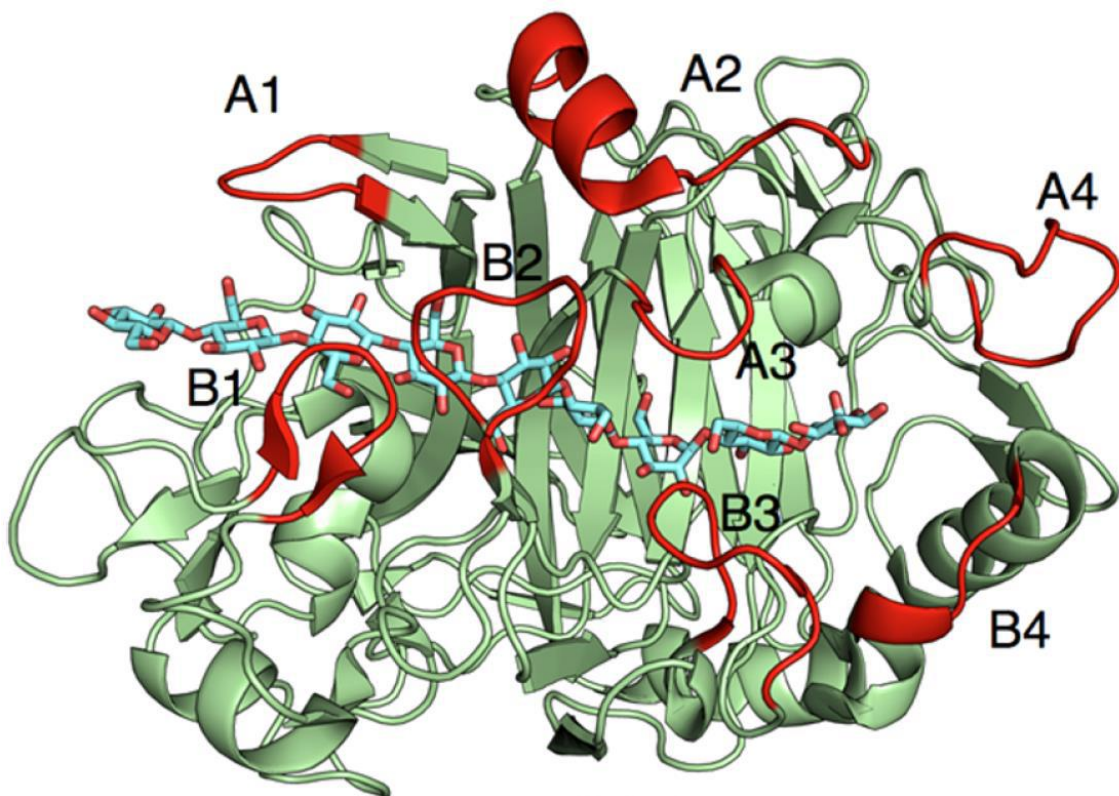


Figura 11 – Estrutura tridimensional da *TrCel7a* com túnel possuindo substrato no sítio catalítico flanqueado por alças fechadas formando o túnel onde a celulose é desconstituída. PDB 4C4C. Modificado de Payne, (2015).

A celulose cristalina na forma de Avicel[®], a celulose bacteriana microcristalina ou a celulose de filtro de papel são os substratos que têm sido mais comumente utilizados

para acessar a atividade das exoglicanases devido ao seu baixo grau de polimerização e baixa acessibilidade relativa (Quiroz-Castañeda e Folch-Mallol, 2013).

A atuação das CBH I sobre substratos envolve uma sequência de eventos comum entre as espécies do grupo, refletindo diretamente as características estruturais das entidades que as compõe, mas pode não representar a de outras enzimas celulásicas, como as betaglicosidases. Os eventos catalíticos das CBH I podem se dividir em duas etapas: o ciclo processivo geral e o ciclo processivo repetitivo, sendo o ciclo repetitivo contido dentro do ciclo geral. Denomina-se como habilidade processiva ou processividade aparente o número de eventos hidrolíticos ocorridos para cada número de ciclos processivos gerais da enzima (Payne *et al.*, 2015).

O ciclo processivo geral compreende na adsorção da CBH na fase cristalina da celulose, provavelmente protagonizado pelo CBM junto à face hidrofóbica do plano cristalino (100) da celulose; na descristalinização da cadeia de celulose pelo CBM e DC; no deslizamento e aquisição da cadeia de celulose no túnel da enzima; na hidrólise; na expulsão do produto e, finalmente, na dessorção da enzima (Figura 12, parte superior).

Dentro do ciclo processivo repetitivo das CBH I incluem as etapas de movimento processivo, ativação catalítica, hidrólise e expulsão do produto (Figura 12). O ciclo repetitivo (fundo laranja) inicia-se com a etapa pré-deslizante (superior a esquerda) quando o substrato ocupa as posições -7 a -1 dentro do túnel; (1) pelo movimento processivo da enzima, os sítios no túnel são preenchidos por unidades glicosídicas em forma de cadeira e o do produtos são ocupados por uma unidade de celobiose; (2) Na etapa de ativação catalítica a cadeia é girada $\sim 90^\circ$, distorcendo o resíduo na posição -1 que admite conformação de “meia-cadeira” ou envelope, formando o complexo de Michaelis, permitindo o acesso do nucleófilo ao centro de reação com o carbono anomérico; (3) na etapa de glicosilação, uma unidade de celobiose é clivada da porção redutora da cadeia celulósica, formando ligação covalente entre o nucleófilo e a cadeia clivada, formando o intermediário glicosil-enzima (IGE) não ativado; (4) que se ativa (IGE ativado) pela movimentação do produto, permitindo o acesso de uma molécula de água no centro catalítico; (5) a deglicosilação se processa produzindo um complexo com o produto, onde o intermediário glicosil-enzima é quebrado e os resíduos catalíticos são regenerados; (6) a expulsão do produto libera os sítios +1 e +2. O ciclo processivo geral

é interrompido com a dessorção da enzima. Em atuação das CBH I sobre o meio da cadeia, o ciclo pode se iniciar pela modo deslizante.

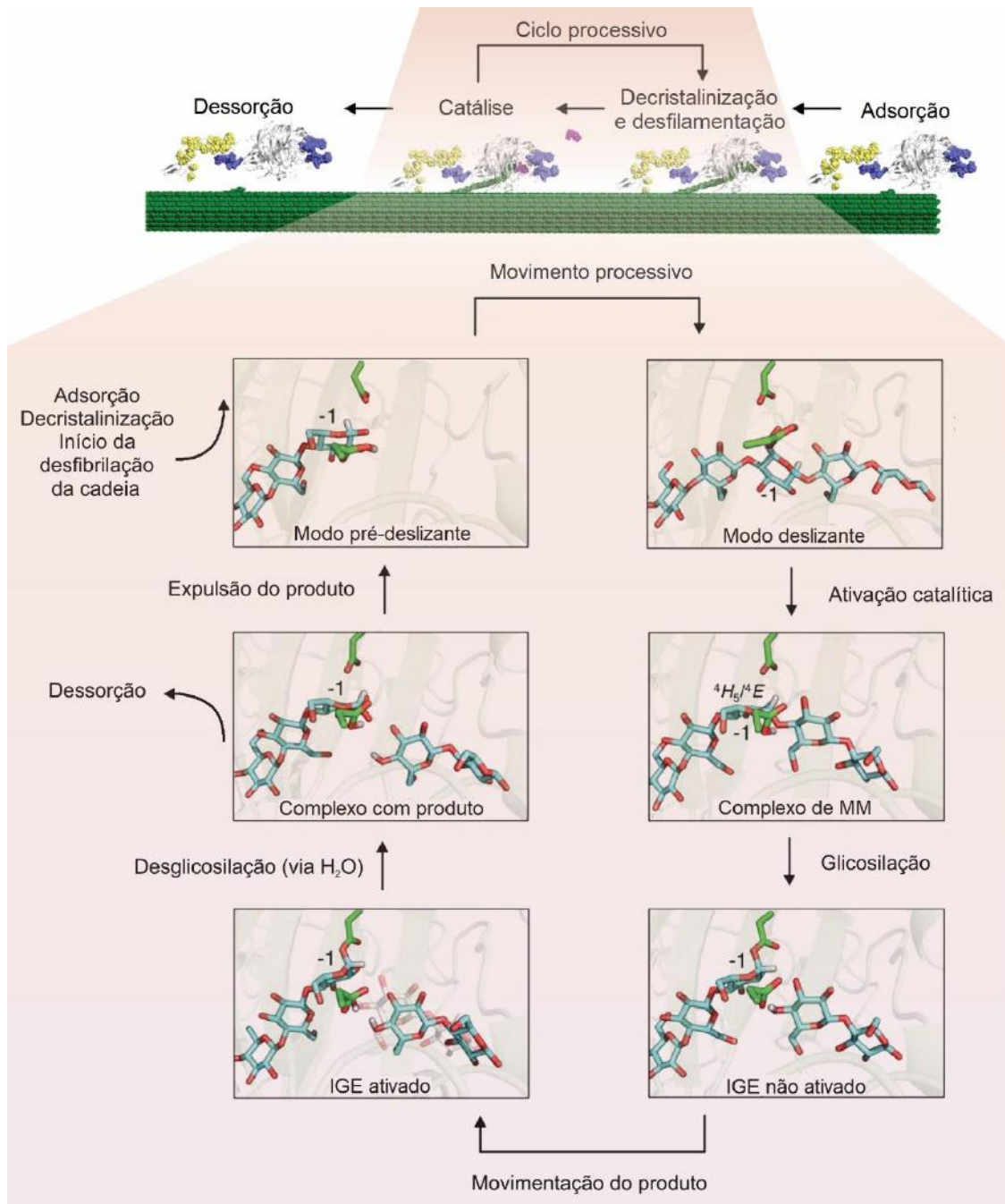


Figura 12 – Ciclo processivo hidrolítico das CBH I. Adaptado de Payne *et al.* (2015). Os domínios proteicos são representados em cinza e N- e O- glicosilações em azul e amarelo respectivamente. Celulose em verde e celobiose magenta.

Dentro do ciclo processivo repetitivo das CBH I incluem as etapas de movimento processivo, ativação catalítica, hidrólise e expulsão do produto (Figura 12). O ciclo repetitivo (fundo laranja) inicia-se com a etapa pré-deslizante (superior a esquerda)

quando o substrato ocupa as posições -7 a -1 dentro do túnel; (1) pelo movimento processivo da enzima, os sítios no túnel são preenchidos por unidades glicosídicas em forma de cadeira e o do produtos são ocupados por uma unidade de celobiose; (2) Na etapa de ativação catalítica a cadeia é girada $\sim 90^\circ$, distorcendo o resíduo na posição -1 que admite conformação de “meia-cadeira” ou envelope, formando o complexo de Michaelis, permitindo o acesso do nucleófilo ao centro de reação com o carbono anomérico; (3) na etapa de glicosilação, uma unidade de celobiose é clivada da porção redutora da cadeia celulósica, formando ligação covalente entre o nucleófilo e a cadeia clivada, formando o intermediário glicosil-enzima (IGE) não ativado; (4) que se ativa (IGE ativado) pela movimentação do produto, permitindo o acesso de uma molécula de água no centro catalítico; (5) a deglicosilação se processa produzindo um complexo com o produto, onde o intermediário glicosil-enzima é quebrado e os resíduos catalíticos são regenerados; (6) a expulsão do produto libera os sítios +1 e +2. O ciclo processivo geral é interrompido com a dessorção da enzima. Em atuação das CBH I sobre o meio da cadeia, o ciclo pode se iniciar pela modo deslizante.

No estudo de Payne *et al.* (2013), verificou-se que a energia impulsionadora do movimento catalítico processivo das CBH I era consistido na maior energia de ligação da enzima com os produtos reacionais comparada com a da CBH I com os reagentes. Tal comportamento favorecia a catálise, mas também a inibição da enzima por celobiose. Igarashi *et al.* (2009) detectaram que o movimento das celulasas sobre a celulose é dependente da catálise se processar efetivamente. Bommarius *et al.* (2008) verificaram um decréscimo de $\sim 30\%$ da taxa reacional nos períodos iniciais de hidrólise usando a enzima Celluclast[®] suplementada com β -glicosidase Sigma (G0395) para três substratos de Avicel pré-tratados diferentemente. Nessa reação o baixo rendimento foi atribuído à problemas de processividade das enzimas. Ganner *et al.* (2012) e Jalak *et al.* (2012) indicaram que a presença das regiões amorfas do substrato interrompia o ciclo de movimentação processiva das CBH I. Também foi notado que a dissociação é etapa limitante da reação exceto em cargas muito baixas de substrato. Verifica-se que a dissociação do CBM é mais rápida do que o desligamento da celulose dentro do sítio ativo (Cruys-Bagger *et al.*, 2013), sugerindo que a inibição processiva se relaciona com o impedimento no domínio catalítico. Jung *et al.* (2013) observaram que 90% das TrCel7a estagnaram sobre a superfície da celulose durante o intervalo de suas observações. Também, Igarashi *et al.* (2011) verificaram por microscopia de força atômica (MFA) que

parte da população de *TrCel7a* acumulava-se ante um obstáculo durante a hidrólise e, por vezes, deixava de se acumular espontaneamente, dando continuidade à catálise. Jalak & Våljamäe (2010) investigaram as características de rápido decréscimo na taxa de hidrólise enzimática quantificando as enzimas ligadas ao substrato. Para CBH isoladas, a taxa de dissociação foi considerada aquela de menor velocidade em todo o ciclo processivo. Foi sugerido por esses autores que as CBH com características de proporcionar menores processividades (com túneis mais abertos) produziram mais celobiose ao catalisarem na medida em que seriam menos impedidas de atuar pois se desligariam mais facilmente do polímero e reiniciariam novo ciclo processivo antes de serem inibidas. Em outro trabalho do grupo Kurašin & Våljamäe (2011) desenvolveram um método para acessarem o número de eventos catalíticos em um polímero real antes da dissociação da enzima e assim verificaram que a processividade intrínseca (razão da taxa hidrolítica da enzima pela taxa de dissociação da celulase na celulose) só poderia ser acessada em substratos perfeitos, pois substratos reais incrementam imperfeições que impedem a movimentação processiva plena. Os autores verificaram que a processividade de duas CBH I incluindo *TrCel7a* é dependente da natureza do substrato e a dissociação da enzima é a etapa limitante de todo o ciclo processivo das CBH I isoladamente, sem sinergismo (Kurašin & Våljamäe, 2011). Estudos recentes sobre a limitação processividade de CBH I tem revelado alvos para melhoria enzimática de proteínas (Payne *et al.*, 2015) e do processo enzimático. No que diz respeito ao mecanismo catalítico, as CBH I catalisam a hidrólise através de um mecanismo ácido-base envolvendo um doador de prótons e uma base nucleofílica: ou dois ácidos aspárticos ou glutâmicos (Andersen, 2007) por meio do mecanismo de retenção de duas etapas através da tríade catalítica dos resíduos de Glu212, Asp214, Glu217 em *T. reesei* (Payne *et al.*, 2015). A diversidade mecanística de hidrólisedas celulases será detalhada mais a frente nessa seção do texto.

Outra enzima utilizada em degradação da celulose, a celobiohidrolase II (Cel6a) pertence à família das GH6, e possui dobramento possuindo um barril β circundado por α -hélices. Para as enzimas Cel6A em *Trichoderma reesei* nota-se um túnel de 20 Å, constituído de vários resíduos aromáticos, estabelecendo 6 sítios de interação com o substrato (Koivula *et al.*, 1998), valor que varia de 4 a 8 sítios de ligação para outros membros da família GH6. Esse túnel é formado duas alças flexíveis em formato de pinça, que desempenham influência sobre o modo de atuação dessas enzimas. Nesse túnel, a enzima abriga tanto celulose quanto moléculas de água em seu interior, mas podem ser

em formato de túnel (Payne *et al.*, 2015). As CBH II degradam a extremidade não redutora da celulose (Bansal *et al.*, 2009), muito embora foi notado que a CBH II de *Trichoderma reesei* MCG77 (Nidetzky *et al.*, 1994b) e de *T. emersonii* (Tuohy *et al.*, 2002), apresentaram atividade sobre extremidades redutoras (Nidetzky *et al.*, 1994b).

A catálise pelas *TrCel6a* se inicia via aquisição de cadeias por um resíduo de triptofano na posição +4, indispensável para a atuação da enzima sobre a celulose cristalina (Koivula *et al.*, 1998) (Figura 13). O ciclo se inicia no modo pré-deslizante quando a alça contendo o resíduo de serina (em rosa) está afastado, resultando em uma conformação da enzima mais aberta em que o substrato (em azul) ocupa os sítios +1, +2 e +3 da enzima. O ciclo continua no modo deslizante com o deslizamento da cadeia do substrato no túnel, ocupando os sítios -1 e -2 de maior energia de ligação. Na formação do complexo de Michaelis, o loop se fecha, propiciando a interação entre resíduos (verde) e moléculas de água (esferas vermelhas) para catalisar a hidrólise da ligação glicosídica. A hidrólise ocorre, gerando o produto α -celobiose. Com a expulsão do produto, novo ciclo se inicia. Evidências experimentais também mostraram que o sítio -2 é importante para catálise, processividade e ligação da enzima com produto (Zhang *et al.*, 2000, Vuong *et al.*, 2009).

Já foi descrita a capacidade das *TrCel6a* em também atacar a celulose no meio de sua cadeia, de modo que as enzimas dessa classe não têm sido consideradas como exoglicanases exclusivas por Stahlberg *et al.* (1993), pois agem eventualmente como endoglicanases (EG), inclusive quando atuando sobre celulose III_I (Igarashi *et al.*, 2011). Harjunpää *et al.* (1996), contraditoriamente, reportaram atividades estritamente processivas das *TrCel6a* pela inexistência de celotetralose ao se clivar celohexalose, o que era esperado em uma atividade endolítica, segundo os autores. De modo geral, elas têm revelado ser capazes de criar novas terminações de cadeia para ação celobiohidrolásica, tão bem quanto tem sido mostrado sua capacidade em remover obstáculos para aumentar a processividade das CBH em coquetéis (Payne *et al.*, 2015).

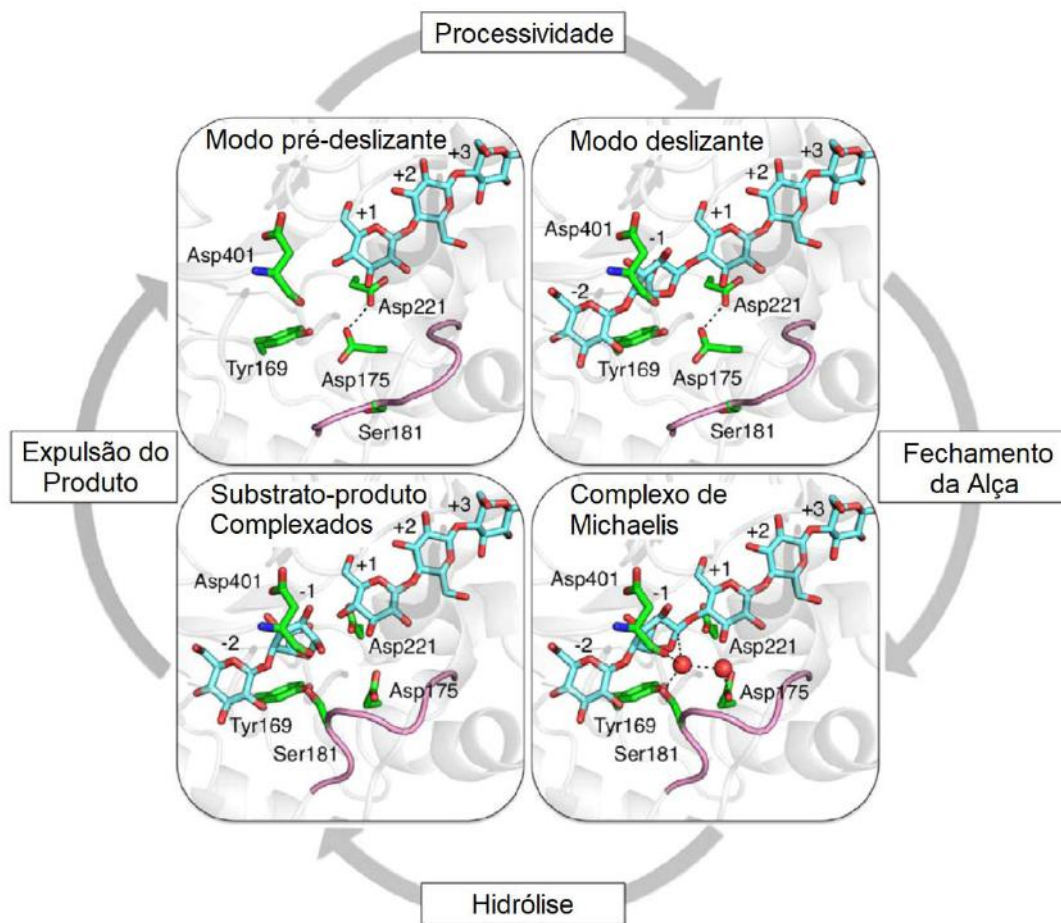


Figura 13 – Ciclo processivo hidrolítico das CBH II. PDB: 4AVN. Modificado de Payne *et al.* (2015) sobre proposta de Zou *et al.* (1999). Moléculas de água destacadas em vermelho no complexo de Michaelis.

Outra enzima muito importante nas hidrólises celulósicas, as endoglicanases possuem atividade endo-1,4- β -D-glicanásicas (EC 3.2.1.4) e têm afinidade com as regiões amorfas da celulose. Essas enzimas são, em geral monoméricas e curiosamente não requerem um domínio de ligação a carboidrato para atuarem, são muito pouco glicosiladas, têm peso médio de 22 a 45 kDa, pH médio de atuação entre 4 e 5 e sua atividade é frequentemente medida pelo substrato carboximetilcelulose (CMC) (Quiroz-Castañeda e Folch-Mallol, 2013). Elas promovem ataques internos à estrutura polimérica de forma não processiva (Murphy *et al.*, 2012), exibindo novas porções finais de cadeia, substrato inicial para as Cel7a e Cel6a atuarem (Balat, 2011; Soccol *et al.*, 2010; Bansal *et al.*, 2009; Kuhad *et al.*, 2011). As endoglicanases secretadas por *T. reesei* se dividem em diversas famílias GH5, GH7, GH12, GH45, GH74 (www.CAZy.org, acessado em 24/08/17) sendo que as EG da família GH5 contabilizam com 55% do total da atividade

endoglicanásica nesse microorganismo (Suominen *et al.*, 1993) e as EG da família GH12 representam 0,2% das proteínas produzidas nele (Ülker & Sprey, 1990).

Tendo em vista as características estruturais e funcionais de algumas das EG, a endoglicanase da família GH7, *TrCel7b*, possui mesmo dobramento da CBH I *TrCel7a*, mas um sítio ativo muito mais disponível para a celulose (Kleywegt *et al.*, 1997) (Figura 14), tendo visto que alças presentes da CBHI, como as B3 e B2 da *TrCel7a* (Figura 11) foram severamente deletadas ou encurtadas na sequência da EG *TrCel7b*. Essa maior abertura dessas EG correlaciona-se com a diminuição da processividade dessa classe de enzimas. As EG *TrCel12a* e *TrCel45a* possuem similaridades estruturais. Frente a outras celulasas ambas são menores e possuem sítios ainda mais expostos do que *TrCel7b*, permitindo maior ampla diversidade de substratos. Também seus menores tamanhos do que *TrCel7a* podem ajudar em sua acessibilidade em poros do substrato mais diminutos (Payne *et al.*, 2015).

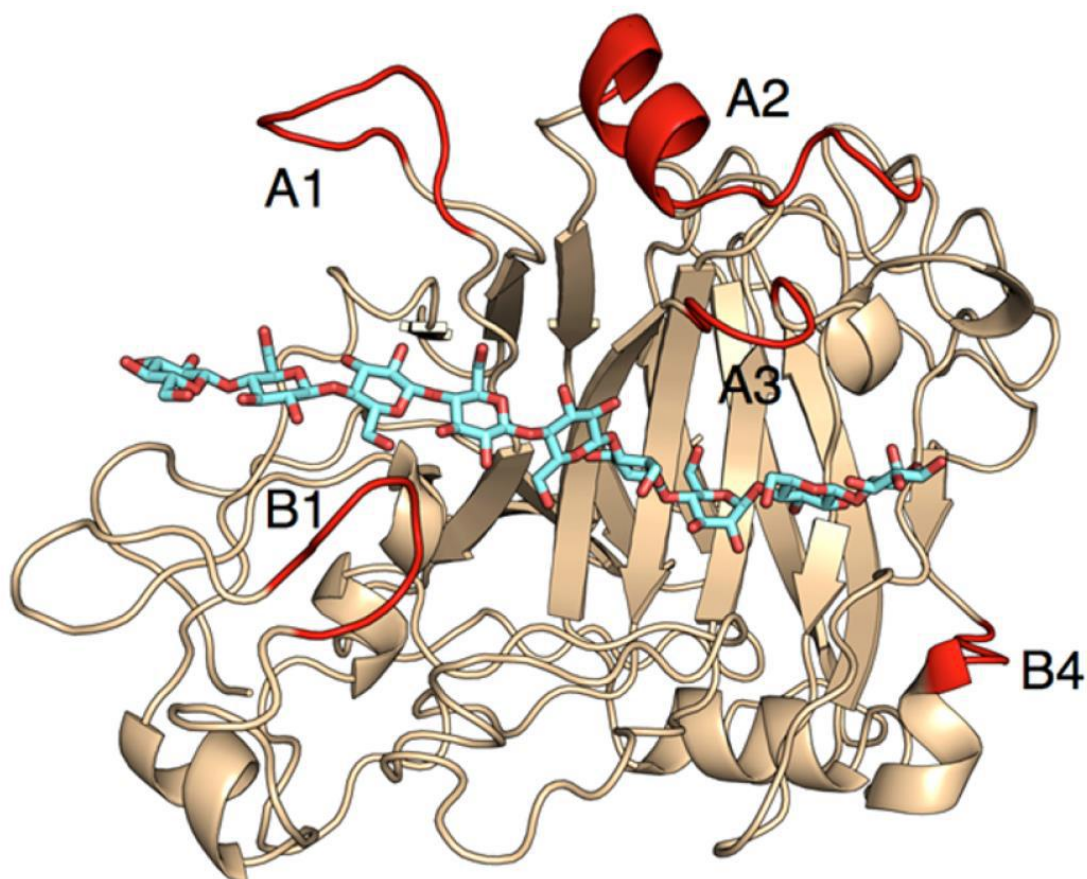


Figura 14 – Estrutura tridimensional da *TrCel7b* com túnel possuindo substrato no sítio catalítico flanqueado por menos alças, também mais abertas. PDB 1EG1. Modificado de Payne *et al.* (2015).

Foi verificado que existem adsorções não produtivas em EG. Para as *TrCel5a*, a relação entre a adsorção delas e a hidrólise do material não era linear para filtro de papel (Nidetzky *et al.*, 1994a) e materiais lignocelulósicos (Palonen *et al.*, 2004). Em estudo de inibição comparativa entre EG e *TrCel7a* por produto da em hidrólise da celulose amorfa verificou-se que a inibição tendia a ser cem vezes superior para as CBH em comparação com as EG, devido a menor força de ligação dos produtos reacionais com as EG do que com as CBH (Gruno *et al.*, 2004).

Embora existam divergências sobre se β -glicosidases são celulasas (Barati & Sadeh Amiri, 2015), as β -glicosidases (β -D-glicosil glicohidrolases, EC 3.2.1.21) ou β -glicosidases são enzimas celulásicas que hidrolisam celobiose e outras celodextrinas com grau de polimerização até 6 unidades. São enzimas de peso molecular de 35 a 640 kDa que podem existir como monômeros ou homo-oligômeros. Em geral, essas enzimas são muito glicosiladas, chegando a valores superiores a 90% de sua massa, atuam em pH entre 3,5 a 5,5 e em temperaturas ótimas médias entre 45 a 75°C (Figura 15). Usa-se celobiose para medir sua atividade, cuja molécula não é degradada pelas exo e endoglicanases (Quiroz-Castañeda e Folch-Mallol, 2013).

A maioria das β -glicosidases possui ampla especificidade de substratos, podendo clivar ligações β -1,4; β -1,6; β -1,2 e também α . As enzimas de *A. niger* foram capazes de clivar, além das β -ligações citadas acima, as β -1,3 (Unno *et al.*, 1993). Além disso, as β -glicosidases desse mesmo microrganismo, apresentaram baixa afinidade para se adsorverem junto a Avicel (Zheng *et al.*, 2016), atuando, assim, em fase aquosa.

O mecanismo hidrolítico das celulasas reportadas acima pode ser um de dois tipos gerais de catálise ácido-base: o de retenção ou o de inversão, tendo essa nomenclatura com relação à preservação ou modificação estereoquímica do carbono anomérico do açúcar liberado pela catálise (Figura 16). Para realizarem a catálise nessas enzimas, o ácido ou base catalítica constituem-se geralmente de resíduos de ácido aspártico ou glutâmico. Porém existem exceções, principalmente para enzimas com o mecanismo de retenção. Frequentemente, ao processarem a catálise nos anéis de glicopiranoose, as celulasas distorcem a conformação de cadeira que carboidrato admite (Payne *et al.*, 2015).

Todavia, o mecanismo de atuação proposto para as Cel6a é do tipo “water wire” ou “Grothus”, por meio do qual a função da base catalítica é substituída por uma rede de moléculas de água que carrega o próton que ataca a ligação glicosídica (Koivula *et al.*, 2002) ao invés de um aminoácido.

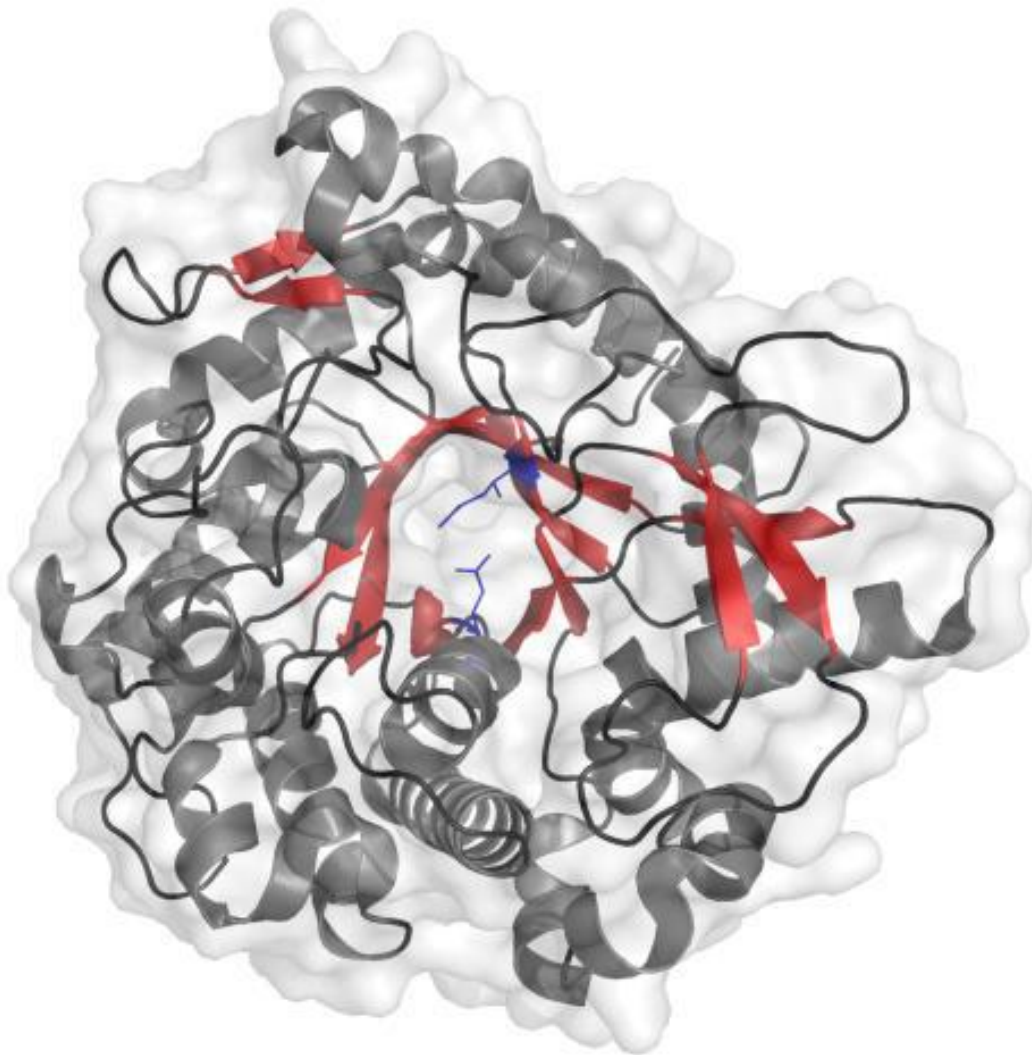


Figura 15 – Estrutura tridimensional de β -glicosidase II de *Hypocrea jecorina* (*TrCel1a*). Resíduos da fenda catalítica em azul, folha- β em vermelho, α -hélice em cinza e alças em preto exibindo arranjo $(\alpha/\beta)_8$ -TIM. PDB:3AHY (Jeng *et al.*, 2011).

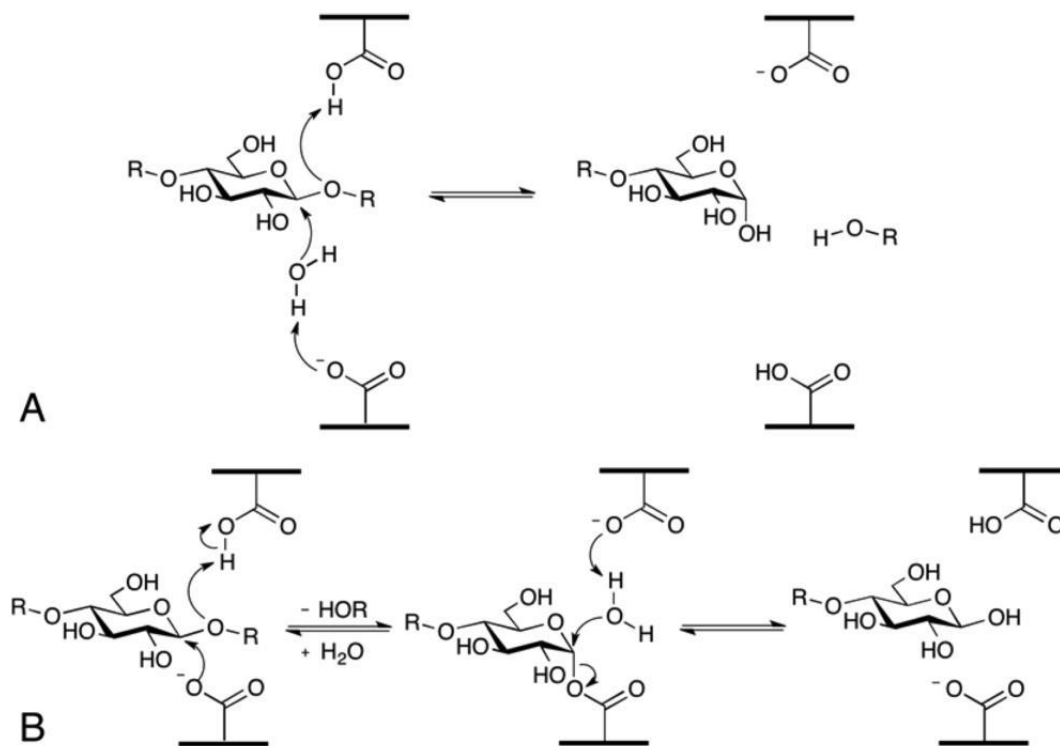


Figura 16 – Mecanismos catalíticos das β -glicosidases. A – Mecanismo de inversão. A molécula de água ataca o carbono anomérico do açúcar e assim perde um próton para a base catalítica. O ácido catalítico transfere um próton para o açúcar, resultando na quebra da ligação e na inversão da estereoquímica do carbono anomérico. B – Mecanismo de retenção: Esse processo de duas etapas inicia pelo ataque do resíduo do aminoácido no sítio catalítico sobre o carbono anomérico, resultando na quebra da ligação glicosídica e formação do intermediário glicosil-enzima. Em um segundo momento, a água entra no sítio catalítico e ataca o carbono anomérico, transferindo seu próton para a base catalítica, restaurando o sítio catalítico (retirado de Payne *et al.*, 2015).

Outras enzimas não celulásicas têm sido estudadas pela sua contribuição no processo de hidrólise da celulose. Dessas, as LPMOs (lytic polysaccharide monooxygenases), foram descobertas em 2010 (Vaaje-Kolstad *et al.*, 2010) e tinham sido previamente caracterizadas como pertencentes a família 33 das CBM ou também da família GH61. Essas enzimas têm o cobre como cofator no sítio ativo e o oxigênio molecular necessários para operar a catálise enzimática (Westereng *et al.*, 2011). As LPMO podem liberar radicais livres através de reações do tipo Fenton, e tem a capacidade de atacar a estrutura lignocelulósica em conjunção com as enzimas já mencionadas

(Dimarogona *et al.*, 2012). Porém podem atuar conjuntamente com enzimas celulose desidrogenases (CDH) (Langston *et al.*, 2011) ou com outras moléculas adicionadas externamente como agentes redutores das LPMOs, exceto as derivadas de lignina. As LPMOs atuam criando quebras nas regiões cristalinas da celulose em regiões onde as EG não poderiam eventualmente acessar o substrato (Payne *et al.*, 2015). Porém, devido a formação ácido glicônico como um dos seus produtos em altas cargas de sólido, as β -glicosidases podem ser inibidas significativamente (Canella *et al.*, 2012).

Complementarmente, proteínas acessórias não catalíticas também têm demonstrado capacidade de auxiliar na diminuição da recalcitrância da celulose e despertado interesse para sua possível aplicação industrial. Destacam-se as proteínas expansinas, tipo-expansinas, swolleinas, looseninas e outras que são similares às glicosil hidrolases da família GH45 (Dimarogona *et al.*, 2012, Payne *et al.*, 2015) e que aumentam a hidrólise da celulose quando presentes.

Em suma, no que diz respeito à catálise mediada pelas diferentes entidades moleculares, a degradação da celulose até glicose ocorre em dois processos de hidrólise principais. A primária, que ocorre sobre a celulose, acontece devido a ação de endo e exoglicanases e libera celodextrinas de aproximadamente 6 oligômeros (Quiroz-Castañeda e Folch-Mallol, 2013). A segunda hidrólise é ocasionada pela ação das β -glicosidases sobre a celobiose ou algumas celodextrinas transformando essas substâncias em glicose (Balat, 2011, Soccol *et al.*, 2010; Bansal *et al.*, 2009; Kuhad *et al.*, 2011). Processos esses que são sujeitos de serem inibidos.

2.4.3. Inibição das celulases

Os efeitos de inibição nas celulases são amplamente reportados. Vários compostos têm sido relatados como inibidores de celulases, sendo principalmente os solúveis em água (Hodge *et al.*, 2008): a celobiose (Mandels & Reese, 1963); glicose; lignina; lactose; vários íons; solventes como etanol, acetona e butanol; açúcares derivados da hemicelulose tais como manose, galactose e xilose; além de xilanas e xilooligômeros e longos xilo- ou glico-oligosacarídeos, que podem inibir as celobiohidrolases cem vezes mais intensamente do que a celobiose. Essa última inibição é de importante consideração, tendo em vista que as β -glicosidases têm capacidades de síntese de di- e oligossacarídios

por reações de transglicosilação em sistemas contendo alta carga de substrato. Além disso o ácido glicônico, que é significativamente produzido pelas LPMOs, pode também inibir as β -glicosidases significativamente. Exceto pelos xilo e oligossacarídeos, a celobiose se destaca como o mais forte inibidor das celulases (Payne *et al.*, 2015).

Devido capacidade de forte ligação do produto nos sítios específicos das celulases, os sacarídeos glicose e celobiose têm sido os seus mais importantes inibidores, sobretudo em altas cargas de substrato (Andrić *et al.*, 2010; Gan *et al.*, 2002). Em trabalhos com enzimas de *T. reesei*, foi verificado que a inibição por produto pode ser uma ordem de magnitude menor para as EG *TrCel7b* e *TrCel5a*, em comparação com CBH *TrCel7a*, provavelmente devido à maior abertura da fenda do sítio ativo das EG (Gruno *et al.*, 2004). Outro trabalho mostrou que GH7 CBH são mais sensíveis à inibição do que as GH6 CBH e EG (Teugjas & Våljamäe *et al.*, 2013). O etanol possui intensidade de inibição 1,4 vezes menor do que para a glicose sobre CBH *TrCel7a* (Gruno *et al.*, 2004). Lee e Fan (1983), verificaram que a celobiose inibia o coquetel de celulases mais intensamente do que a glicose. A inibição por glicose se mostrava maior para as enzimas CBH *TrCel7a* do que as outras quatro principais celulases de *T. reesei* (Murphy *et al.*, 2013), devido à sua maior força de ligação junto aos sítios do produto na enzima (Bu *et al.*, 2012). Sobre a celobiose, cogita-se que sua inibição acontece de forma não competitiva (Holtzaple *et al.*, 1990), porém novas evidências experimentais sustentam a hipótese de inibição mista de celobiose em *TrCel7a* (Jalak *et al.*, 2012), que diminuem conforme com que a temperatura aumenta (Teugjas & Våljamäe, 2013).

A presença de β -glicosidase nos preparados enzimáticos visa contornar o problema de inativação causada por celobiose nas exo- e endoglicanases, ao degradar o dissacarídeo inibidor (Soccol *et al.*, 2010; Stephen *et al.*, 2012; Balat 2010). A adição do extrato contendo β -glicosidases do microorganismo *A. niger* foi capaz de minimizar a inibição no trabalho de Dekker *et al.* (1983). Entretanto, a inibição por celobiose não era a responsável pela diminuição da taxa reacional no início da hidrólise, pois a adição de novo substrato a um experimento avançado com apenas CBH *TrCel7a* originava um novo aumento de taxa de reação (Våljamäe *et al.*, 1998). A inibição pelos açúcares inibidores também tem sido evitada por métodos como filtração por membrana (Gan *et al.*, 2002; Gavlighi *et al.*, 2013) e conversão da celobiose por celobiose desigrogenase (Igarashi *et al.*, 1998).

Outras estratégias também se mostraram eficientes contornar modular as atividades enzimáticas. Seja por íons (Limayem & Ricke, 2012), condições bioquímicas (Balat, 2011), amoniação ou a aplicação de soroalbumina bovina (BSA) (Limayem & Ricke, 2012) e sonicação (Rolz, 1986 e Szabó & Csiszár, 2013).

2.4.4. Sinergismo entre as celulases

Para melhor explicação do fenômeno o qual essa proposta de tese se pretende, deve-se acrescentar nesse texto a forma com que as diferentes enzimas celulases operam em conjunto durante a desconstrução da biomassa. As celulases tem capacidade de operar de forma conjunta e interdependente (Figura 17) de forma que várias cooperações ou sinergias já são conhecidas e descritas durante esse processo. A sinergia “endo-exo” ocorre pela criação de novas extremidades redutoras e não redutoras pelas EG nas quais as CBH são capazes dese acoplarem e atuarem processivamente. A do tipo “exo-exo” compreende a ação de CBH I e II degradando a celulose conjuntamente em diferentes extremidades (provavelmente por endo-iniciação das CBH). A sinergia “exo- β -glicosidase” é conhecida pelo aumento da taxa global de reação pela degradação da celobiose inibidora pelas β -glicosidases. Finalmente, a sinergia “interdomínios catalíticos e de ligação ao substrato das celulases” ocorre quando os CBM direciona as celulases para atuarem em sítios do substrato mais favoráveis à degradação (Quiroz-Castañeda e Folch-Mallol, 2013).

Estudos mais antigos sobre sinergias sustentavam os modelos de cooperação enzimática clássicas do tipo “endo-exo” pautados apenas na criação de novos terminos de cadeia na celulose pelas EG, capazes de serem pontos de adsorção e iniciação catalítica pelas CBH. Esses modelos eram alicerçados em evidências experimentais tais como a de Nidetzky *et al.* (1994a), que verificaram que, quando adicionando *TrCel5a* ao extrato de *TrCel7a*, a atividade global de desconstrução do substrato aumentava duas vezes. Mesmo sabendo da competição de alguns sítios para a adsorção das EG e CBH (Medve *et al.*, 1998), esse mecanismo de sinergismo se sustentava. Porém um novo tipo de evidência experimental de sinergismo do tipo “endo-exo” tem sido descrito na literatura mostrando um papel até então desconhecido das EG, relacionado ao auxílio à dissociação das CBH pelas EG (Igarashi *et al.*, 2011). Utilizando de microscopia de força atômica (MFA), esses

autores perceberam que a adição de endoglicanases *TrCel5a* sobre a superfície da celulose causava menor parada e acumulação de populações enzimáticas de celulases *TrCel7a*, que estavam sem catalisar reação eficientemente. Jalak *et al.* (2012) propuseram que essa nova sinergia predomina sobre a anterior, principalmente em condições de ótima razão de substrato e enzima. Também, nessas condições de ótima razão enzimática, a limitação reacional está centrada no ciclo processivo das CBH. As clivagens endolíticas, portanto, permitem rotas de escape das CBH antes que elas atinjam as regiões amorfas (Payne *et al.*, 2015) e sejam inibidas.

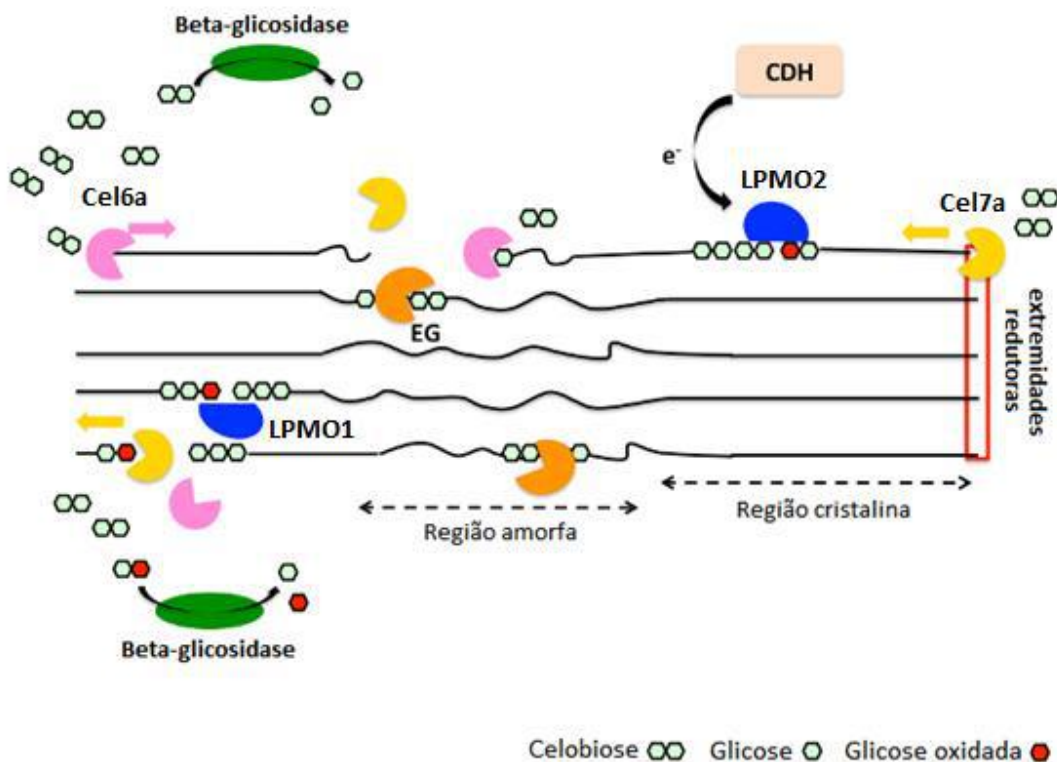


Figura 17 – Mecanismo de ação conjunta de celulases e LPMOs na degradação da celulose. Preferencialmente, celobiohidrolases atuam na porção não redutora (Cel6a) e redutora (Cel7a) do polímero respectivamente, liberando celobiose, enquanto endoglicanases (EG) clivam as porções amorfas. Enzimas acessórias polissacarídeo monooxigenases (LPMO1 e LPMO2) atuam randomicamente sobre a estrutura, sendo eventualmente regeneradas com as enzimas doadoras de elétrons celobiose desidrogenase (CDH). Modificado de Dimarogona *et al.* (2012).

2.4.5. Obtenção das celulases

Vários microrganismos como bactérias aeróbicas e anaeróbicas, fungos filamentosos, plantas e animais produzem celulases. Porém as mais utilizadas na indústria são as fúngicas pertencentes à subdivisão *Deuteromycota*, dos gêneros *Aspergillus*, *Hypocrea* (*Trichoderma*), *Humicola* e *Penicillium* (Barcelos *et al.*, 2015) e também *Acremonium*.

A produção de enzimas celulases para uma hidrólise industrial é feita principalmente pelo fungo filamentoso *Hypocrea jecorina* que secreta β -glicosidases, endoglicanases e exoglicanases (Limayem & Ricke, 2012; Balat, 2011). As celulases desse microrganismo são as mais amplamente estudadas. Elas possuem diferentes classificações e nomenclaturas e várias das suas enzimas tiveram sua estrutura cristalográfica resolvida (Figura 18).

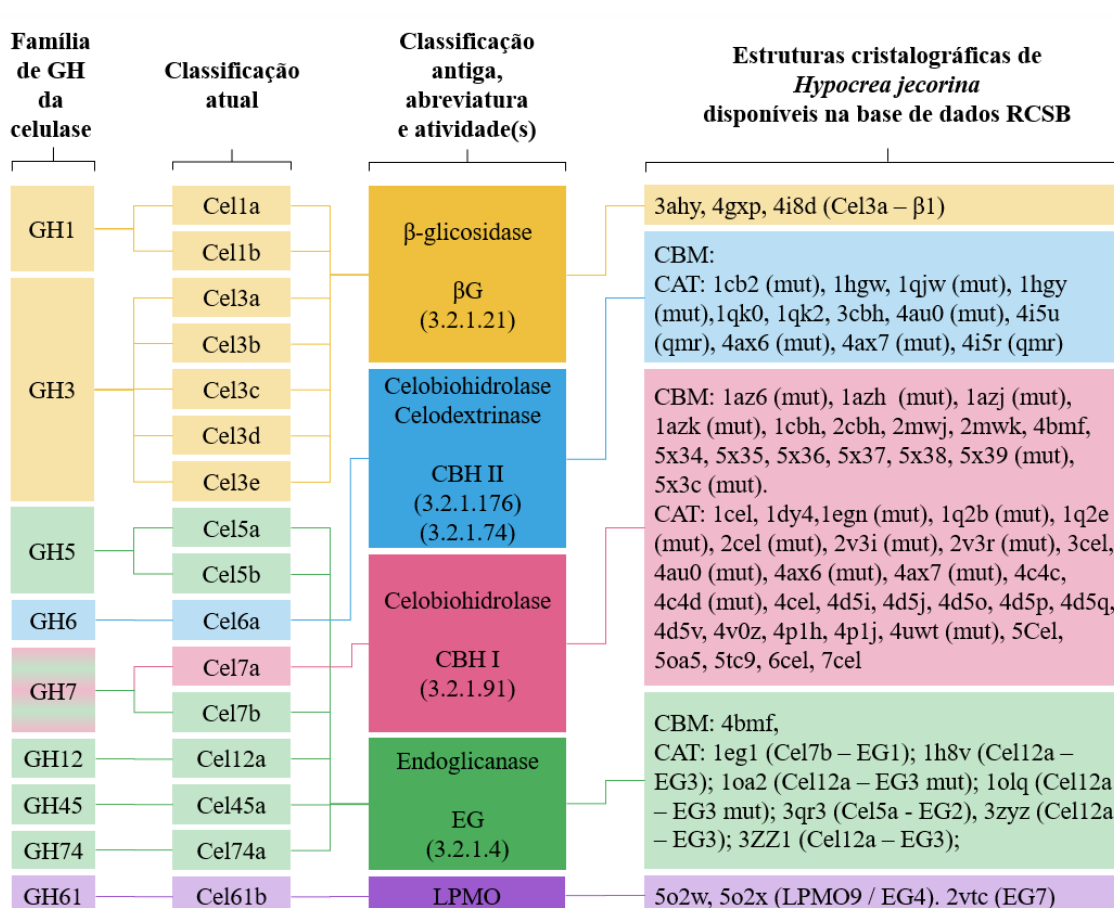


Figura 18 – Estruturas cristalográficas disponíveis das celulases de *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) e sua classificação para as diferentes famílias de

glicosil-hidrolases (GH) e atividades enzimáticas existentes. GH – glicosil-hidrolases; CBM – Domínio de ligação a carboidratos; CAT – Domínio catalítico; LPMO – Monooxigenases polissacarídicas líticas; (mut) – mutante; (qui) – quimérica. (RCSB, 2017, Berman *et al.* 2000). Enzimas GH61 tem sido consideradas como LPMO.

Em comparação com outros extratos enzimáticos, os de *Hypocrea jecorina* mostram alta atividade exoglicanase e, por sua vez, apresentam deficiência comparativa na atividade de β -glicosidase (Gottschalk *et al.*, 2013), pois a maioria dessas enzimas β -glicosidases são pouco secretadas (Kubicek, 1987) por serem encontradas ligadas à parede celular (Jackson & Talburt, 1988). As celulases de *Hypocrea jecorina* contribuem com a maior parte da atividade exoglicanase presente nos extratos em que suas enzimas constituem (Payne *et al.*, 2015). A maior produção de celobiohidrolases em detrimento das demais enzimas pelos microrganismos responde às distintas condições ambientais que eles enfrentam (Andersen, 2007), mas também pode estar correlacionada com o fato de que etapa de hidrólise do substrato insolúvel seja aquela limitante do processo (Quiroz-Castañeda e Folch-Mallol, 2013).

Em geral, os preparados enzimáticos comerciais contêm glicanases, celobiohidrolases, β -glicosidases e enzimas auxiliares (Stephen *et al.*, 2012). Os mais eficientes extratos contêm enzimas que degradam tanto as porções de cadeia reduzida e não reduzida, em orquestração sinérgica, mas a maioria desses preparados são constituídos por CBH da família GH7 (Payne *et al.*, 2015). A suplementação de extratos de *Hypocrea jecorina* com *Aspergillus niger* já é descrita na literatura (Andrić *et al.*, 2010; van den Brink *et al.*, 2014; da Silva *et al.*, 2016).

Através da análise secretômica comparativa para dois cultivos distintos de *Trichoderma reesei* Rut-C30 e *Aspergillus niger* wild type A12, Florencio *et al.* (2016) conseguiram demonstrar que os microrganismos secretavam suas várias celulases de forma muito distinta, mas apresentando padrão complementar. Essa complementariedade tornava a combinação dos extratos desses microrganismos interessante para para hidrolisar eficientemente a celulose, pois as enzimas que um primeiro microrganismo secretava em baixas concentrações era produzido por outro em maior quantidade. Borin *et al.* (2015) também mostraram padrões de secreção enzimática distintos e relativamente complementares para *Trichoderma reesei* Rut-C30 e *Aspergillus niger* N402, com

exclusividade da produção da enzima TrCell1a feita por *T. reesei*, somente. Curiosamente a diferença entre as capacidades produtivas de celulasas entre microorganismos produtores de celulasas industriais não pode ser prevista tão claramente comparando os seus genomas. Isso porque esses microorganismos contêm genes responsáveis pela produção de quase todas as classes de glicosil-hidrolases (GH) pertencentes às celulasas mas secreta algumas somente (Tabela 1), reforçando a hipótese da secreção de celulasas como resposta adaptativa de Andersen (2007).

Tabela 1 – Comparação entre as regiões codificantes para celulasase de *Trichoderma reesei* e *Aspergillus niger* CBS 513.88 das diferentes famílias de glicosil-hidrolases.

Número de ORFs de celulasas nas diferentes famílias de glicosil-hidrolases										
	GH1	GH3	GH5	GH6	GH7 exo	GH7 endo	GH12	GH45	GH61 *	GH74
<i>T. reesei</i> [‡]	--	--	2	1	1	1	1	1	3	--
<i>A. niger</i> [†]	3	12	4	2	2	0	3	0	7	1

[†]Pel *et al.* (2007); [‡]Martinez *et al.* (2008); * Enzimas GH61 tem sido consideradas como LPMO.

Ao se tratar da produção de preparados enzimáticos eficientes, o Laboratório Bioetanol do Instituto de Química da UFRJ, desenvolve algumas tecnologias apresentando enzimáticos eficientes (Bon *et al.*, 2007; da Silva *et al.*, 2016). Porém, no sentido de reduzir o impacto econômico das enzimas sobre o processo produtivo, existem quatro pontos alvos de aperfeiçoamento: redução da quantidade de enzima adicionada nos reatores, aumento da atividade enzimática, redução do custo da proteína e aumento dos rendimentos de hidrólise. Porém, os esforços de melhoria da atividade enzimática não se converteram em soluções com custo produtivo reduzidos. Muito embora existam organismos que produzam enzimas com alta atividade, microorganismos em geral não sintetizam grande quantidade delas ainda (Stephen *et al.*, 2012). Porém com o melhoramento de enzimas, provavelmente processos como de hidrólise em altas concentrações de sólidos (com cerca de 15% m/v) podem ser exequíveis por permitirem uma diminuição dos custos de capital e os custos com enzimas (Hodge *et al.*, 2008), permitindo a obtenção de hidrolisados com alto rendimento.

Em suma, entende-se que hidrólise pode ser executada por enzimas celulases, que individualmente podem possuir estrutura constitutiva básica em três diferentes domínios: catalítico, pepídeo de ligação e CBM, como no caso de uma *TrCel7a*. Cada domínio executa uma função complementar à outra. Nota-se que a diversidade das celulases é grande, tanto no aspecto estrutural quanto catalítico. Diferentes atividades catalíticas revelam-se como desdobramentos da diversidade estrutural, mas também a morfologia implica em mecanismos de atuação extremamente sofisticados. Percebe-se no sistema hidrolítico uma necessidade de cooperação sinérgica entre as enzimas, mas também existem elementos de regulação das atividades como pelos intermediários e pelos produtos reacionais.

2.5. Modelagem matemática do processo de hidrólise enzimática

Para viabilizar a produção do etanol celulósico e a produção de materiais derivados de celulose hidrolisada, é preciso ampliar o entendimento sobre a forma com que as enzimas atuam sobre os seus substratos (Peri *et al.*, 2007). A modelagem cinética é uma ferramenta que pode contribuir decisivamente nesse entendimento.

Construir modelos cinéticos requer descrever o balanço de massa para cada componente de um sistema. Para tanto, se definem as etapas ou reações elementares assumindo, ou não, algumas hipóteses simplificadoras durante a sua construção. Dessa forma, o modelo adquire uma estrutura definida. A partir de dados teóricos e/ou experimentais é possível determinar seus parâmetros com o uso da ferramenta de estimação de parâmetros. Em um modelo, a atribuição de uma relação entre variáveis obtidas pelos balanços do sistema e dos ajustes dos seus parâmetros associados, gera novo conhecimento. Possibilita melhor compreensão do fenômeno o qual se pretende elucidar. Schwaab e Pinto (2007) destacam a necessidade de existência dos seguintes elementos característicos no processo de inferência paramétrica:

- Necessidade de um modelo de referência, que serve como uma tentativa de descrição (teórica ou empírica) do processo, dentro do qual será feita a inserção dos dados experimentais obtidos;

- Consideração dos parâmetros do modelo como as verdadeiras variáveis consideradas;
- Métrica, correspondendo a uma função objetivo que mede a distância dos dados previstos do modelo, com os experimentais;
- Consideração do erro influenciando o processo de estimação de parâmetros.

Os modelos matemáticos do processo de hidrólise enzimática são extremamente úteis. Alguns deles disponíveis na literatura descreveram as reações enzimáticas de cada celulase isolada incluindo na descrição sua mecanística processiva (Praestgaard *et al.*, 2011; Jeoh *et al.*, 2017). Porém, os modelos cinéticos com múltiplos componentes enzimáticos permite acessar as influências dos sinergismos, das concentrações de substratos, das suas propriedades reacionais (Payne *et al.*, 2015), das heterogeneidade desses substratos, além dos efeitos de inibição dos intermediários e produtos reacionais na medida em que incorpora essas características na forma de variáveis. Dentre as variáveis mais comumente descritas por modelos cinéticos, citam-se as características da enzima, conformação e composição do substrato, as inibições enzimáticas, considerações termodinâmicas, limitações de transferência de massa, a desativação de enzimas, dentre outras (Peri *et al.*, 2007). Essas variáveis podem ser controladas e acompanhadas em realidades industriais: um dos objetivos da modelagem.

A modelagem cinética de substratos lignocelulósicos se justifica pela necessidade de se ampliar a escala produtiva, controlando possíveis limitações processuais (Bansal, 2009). Porém, ela é um dos temas mais difíceis no ramo de engenharia de biorreatores pela complexidade e pela diversidade das possibilidades de se abordar o tema (Sousa Jr, 2011); pela heterogeneidade do substrato sobre o qual atuam várias enzimas (Kadam *et al.*, 2004) e pelo desconhecimento sobre alguns detalhes da atividade das celulasas e sobre as propriedades do substrato no qual elas atuam (Bansal, 2009).

No que diz respeito aos mais distintos modelos cinéticos de hidrólise existentes, Payne *et al.* (2015) os dividem entre aqueles baseados em equações diferenciais (ODE), como o do trabalho dessa tese, que são compostos por descrições etapas que se sucedem, onde parâmetros de taxa e outros advêm de um ajuste aos dados experimentais. A outra divisão consiste nos modelos baseados em agentes (chamados também de autômato

celular), em que substrato e enzima são considerados como entidades individuais espacialmente distribuídas, com propriedades com base em parâmetros já publicados.

Tratando-se dos modelos de hidrólise de celulose baseados em ODE, Peri *et al.*, 2007 propõem uma classificação desses em empíricos e mecanísticos.

- Os modelos empíricos são mais fáceis de serem desenvolvidos e aplicados (Peri *et al.*, 2007). Porém, a sua confiabilidade fica restrita à região experimental estabelecida durante o processo de estimação de parâmetros. Eles não fornecem detalhes sobre o mecanismo de atuação da enzima, mas fornecem dados importantes como variáveis se relacionam umas com as outras na estimativa das taxas iniciais de hidrólise (Balat, 2009), por exemplo.
- Já os modelos mecanísticos podem incorporar algumas das leis de transferência de massa ou características da enzima e do substrato. Sendo assim, eles podem variar consideravelmente em suas complexidades e detalhamentos acerca do processo (Peri *et al.*, 2007).

A classificação de Peri *et al.* (2007) é expandida por Balat (2009) que subdivide a classificação dos modelos mecanísticos em mais três outras: de Michaelis-Menten, de adsorção e aqueles concebendo substratos solúveis.

Outra classificação dos modelos ODE de hidrólise foi proposta por Zhang & Lynd (2004), baseando-se no aprofundamento de informações sobre o substrato e/ou a enzima. Quatro classes foram propostas por eles: os não-mecanísticos, os semi-mecanísticos (com relação ao substrato ou enzima), os baseados em aspectos funcionais e aqueles baseados em aspectos estruturais. Essa classificação cresce em nível de detalhamento, partindo dos não-mecanísticos, que correlacionam dados experimentais em uma expressão matemática sem descrição mecanística; os semi-mecanísticos, que fazem correlações, porém incorporam as concentrações como única variável de estado e também descrevem apenas uma atividade relacionada com a solubilização do substrato. Prosseguindo, os modelos que incluem ainda mais características, como múltiplas atividades enzimáticas solubilizadoras, um modelo de adsorção e múltiplas atividades enzimáticas são classificados como modelos funcionalmente baseados. Por fim, os modelos baseados estruturalmente se prestam a esclarecer relações entre estrutura dos componentes

celulásicos e suas funções em nível molecular, mas enfrentam desafios de obterem informações em tal nível para alimentá-los.

Os modelos mais comuns e os mais usados para o projeto de sistemas industriais descrevem a hidrólise por meio de constantes de taxa, constantes de afinidade à agregação das enzimas, número de sítios da celulose com sítios adsorvidos, fração da enzima não inibida pelo produto ou mesmo a fração de enzima inibida, podendo se basear no de Michaelis-Menten, outros no de Langmuir (Zhang & Lynd, 2004).

O primeiro trabalho de modelagem cinética da hidrólise enzimática foi realizado por Suga *et al.*, (1975), que descreveu a ação de EG e CBH na hidrólise de Dextran T 250, utilizando um sistema de equações diferenciais. Desde o advento dessa primeira obra, já existe cerca de uma centena de trabalhos sobre o assunto (Sousa Jr, 2011; Bansal, 2009; Zhang & Lynd, 2004). Ainda assim, os mecanismos de ação da celulase permanecem alvo de investigação. Os esforços de pesquisa visam a compreensão da ação das celulasas e apresenta desafios, que, em grande parte, é atribuído às dificuldades de se medir as propriedades físicas do substrato, de se determinar os efeitos tanto de sinergia enzimática, quanto de transferência de massa na hidrólise (Peri *et al.*, 2007). Zhang & Lynd (2004) elencaram algumas demandas a serem ainda esclarecidas por meio de estudos que envolvem a modelagem cinética de hidrólise:

Questões fundamentalmente definidas com contribuições aplicadas ao processo:

1. Em que as propriedades do substrato influenciam na efetividade dos componentes da celulase?
2. Qual a contribuição das interações entre os domínios das enzimas na efetividade da hidrólise enzimática?
3. Qual a base mecanística para a diferença de ação dos sistemas das celulasas (complexada, não complexada) e como essas diferenças respondem às propriedades do substrato?

Questões aplicadas com contribuições fundamentais ao processo:

1. Quais as características do substrato que devem ser alteradas no tratamento da biomassa celulósica e como se deve avaliar tais características?

2. Quais princípios e estratégias (ou forças) que guiam a combinação dos componentes das mais diferentes celulasas para alcançar uma hidrólise efetiva?
3. Quais princípios e estratégias devem direcionar o desenvolvimento de enzimas celulasas modificadas para alcançar uma hidrólise mais efetiva?

Dos vários trabalhos dedicados a esclarecer a redução da taxa reacional, verificou-se que, geralmente, existe correlação entre taxas/rendimentos reacionais. Em maior número com as características das enzimas do que com as do substrato. Eriksson *et al.* (2002) correlacionaram os efeitos de estabilidade térmica das enzimas e a inibição do produto nos sistemas hidrolíticos como sendo as principais causas de redução de taxa. Bommarius *et al.* (2008) relacionam a redução com a acumulação de enzimas ligadas na superfície da celulose. Obstruções estéricas eram atribuídas como fator limitante para a hidrólise de celulasas puras combinadas em extrato (Kurašin & Våljamäe, 2011; Fox *et al.*, 2012). Levine *et al.*, (2010) concluíram que a acumulação de enzimas não poderia ser a única causa da redução da taxa reacional de celobiohidrolases *TrCel7a* e *TrCel5a*, sugerindo influências das heterogeneidades estruturais na inibição da reação. Griggs *et al.* (2012) atribuíram à limitação de disponibilidade de substrato a razão da redução de taxas.

Das características do substrato que podem estar relacionadas explicitamente à reduções de taxas, citam-se a mudança da forma do substrato, a área superficial e o aumento da cristalinidade do mesmo. A grande maioria dos trabalhos, entretanto, reportaram as mudanças da taxa ao longo da hidrólise a partir de parâmetros ajustados em um contexto empírico, ao invés de propo-la mecanisticamente (Zhang & Lynd 2004), mesmo já tendo sido reportado que as características do substrato e as da enzima explicam a limitação do progresso da reação (Júnior, 2011). Zhou *et al.* (2009) pontua que vários dos modelos existentes não concebem que o substrato tem uma natureza fibrilar bem adensada e que existem mudanças no substrato durante o processo de hidrólise enzimática. Levine *et al.*, 2010 por outro lado, levantou os trabalhos de modelagem de acordo com a forma com que o substrato foi descrito neles e os distribuiu nas seguintes categorias de modelo que reportam o substrato como:

- polimérico e solúvel;

- representado como uma concentração mássica ou volumétrica unicamente;
- dividido em porções inertes e não inertes;
- representado como uma concentração mássica ou volumétrica, apresentando sítios de adsorção distintos;
- representado como uma superfície com características físico-químicas hipoteticamente periódicas, apresentando cadeias poliméricas randômicas;
- representado como uma concentração mássica ou volumétrica que tem sua morfologia modificada ao longo do tempo de reação.

Para se descrever o substrato em modelo cinético em função de suas características, Zhang & Lynd (2004) defendem considerar o grau de polimerização, a cristalinidade, a área acessível, a concentração, além da presença de outros componentes, como a lignina em lignoceluloses. Zhou *et al.* (2009) apontam o grau de polimerização, a fração das ligações acessíveis para a enzima, área superficial interna, o índice de cristalinidade e a distribuição das heterogeneidades estruturais como as principais características para se considerar no substrato. Andersen (2007) descreve como importantes características físicas a se considerar para a lignocelulose a cristalinidade, o grau de polimerização, a área superficial, a organização macro e microestutural das fibras e a presença de hemicelulose e lignina.

Paralelamente, Kadam *et al.* (2004) propõem em sua descrição mecanística sobre a hidrólise em que a propriedade “reatividade” do substrato seja alterada no decorrer da reação e que ela conteria a informação sobre a mudança da capacidade do material em ser hidrolisado. Para estimar a influencia da reatividade do substrato sobre a taxa de reação ao longo do tempo, os autores retiraram a enzima do sistema reacional em cada instante do tempo de reação, lavaram o substrato, repesaram-no e adicionaram enzima nova junto a ele, mantendo a mesma razão enzima/substrato, acompanhando a reação por mais 4 horas (Kadam *et al.*, 2004). Nesses modelos, o “Índice de reatividade do substrato – R_s ” era denotado por:

$$R_s = \alpha \frac{S_n}{S_0} \quad [1]$$

S_n : concentração do substrato em um dado tempo (g/kg);
 S_0 : concentração inicial de substrato (g/kg);
 a : constante de proporcionalidade adimensional.

A incorporação dessa característica nesses modelos foi feita sem detalhar, porém, como a mudança de reatividade do substrato decorre em função da alteração das suas características físico-químicas longo do tempo. Mesmo assim, a propriedade de reatividade se manteve sem alguma ligação com as características físicas para os modelos adaptados de Kadam *et al.* (2004): Câmara (2012), Tsai *et al.* (2014), Angarita (2014), dentre outros.

Por outro lado, para Zhang & Lynd (2004), as eficiências das hidrólises enzimáticas poderiam estar atribuídas mais às alterações da área superficial do que à cristalinidade. Porém, a característica de acessibilidade, que é ligada à medida de área superficial, por sua vez, pode variar significativamente, refletindo, muitas vezes, às muitas variações da técnica de fisissorção de N₂ para a obtenção do valor da área. Mansfield *et al.*, 1999 citam que os principais fatores que influenciam na medida de área são: tempo de adsorção do gás na amostra, tempo em que a amostra fica submetida em vácuo, forma de preparação da amostra e origem da amostra. Grandes variações no valor de medida de área de uma mesma amostra foram atribuídas a diferentes formas de sua preparação para a técnica. Para manter a estrutura da matriz lignocelulósica como observado no estado hidratado, recomenda-se usar amostras secadas em solventes orgânicos. Discute-se a relevância do método de obtenção da medida da área para correlacionar a grandeza física da superfície do material com a hidrólise enzimática (Mansfield *et al.*, 1999). Especialmente porque as medidas de área não reproduzem o material no seu estado inchado (hidratado) e o gás de adsorção é muito menor do que uma molécula de enzima, superestimando a área real acessível (Andersen, 2007).

São necessárias melhores comprovações para determinar a influência das características físicas no processo de hidrólise. Como exemplo, o efeito produzido da cristalinidade está confundido com outras características como grau de polimerização e fração do substrato acessível à enzima. Isso porque um pré-tratamento, em geral, altera as três características supracitadas concomitantemente (Zhou *et al.*, 2009). Além disso, deve-se levar em consideração que a eventual obtenção da influência de uma característica estrutural sobre a taxa feita em um material muito puro, não deve ser prontamente extrapolada para o material lignocelulósico, muito mais heterogêneo

(Andersen, 2007). Essa autora sugeriu que a descrição de fenômenos relacionados à heterogeneidade da composição dos substratos esclareça sua recalitrância.

Sob o ponto de vista das enzimas, várias das suas características têm sido retratadas em modelos de degradação do substrato celulósico, citam-se:

- Concentração das enzimas;
- Adsorção da enzima no substrato;
- Inibição pelo produto reacional;
- Ligação enzimática irreversível (com lignina em lignocelulose);
- Sinergismo das celulases;
- Desnaturação mecânica (tensão de cisalhamento ou influências de interface gás-líquido);
- Inativação térmica;
- Composição do preparado enzimático;
- Tamanho relativo das enzimas.

Sabe-se que aplicando maior concentração de enzima nos ensaios de hidrólise, maior a conversão do substrato, porém a relação entre a concentração enzimática e a conversão não é linear, pois é limitada por fenômenos como os adsorptivos (Figura 19). Sabe-se que quanto melhor for a adsorção da enzima na celulose, melhor será a catálise promovida por ela (Andersen, 2007). Logo, esse efeito também pode ser considerado na modelagem.

No tocante à adsorção da enzima, vários modelos têm utilizado a descrição da isoterma de Langmuir para ajustar aos dados experimentais com as enzimas, ainda que a mecânica de adsorção da enzima não siga as mesmas hipóteses usadas para esse modelo de adsorção, que foi concebido para a adsorção de gases em metais. O distanciamento vem do fato de que as celulases, diferente dos gases: se adsorvem ao substrato com alta afinidade; interagem com as demais enzimas celulases quando essas estão presentes em altas concentrações no meio reacional; têm capacidade de se adsorver em vários sítios no substrato e, assim, podem ficar presas em alguns poros da celulose e, também, têm adsorção no substrato mediada por seus subdomínios componentes com distintas afinidades (Zhang & Lynd, 2004; Câmara, 2014). Segundo Kadam *et al.* (2004), o

primeiro modelo que propôs descrever a adsorção da enzima pela isoterma de Langmuir foi o de Wald *et al.* (1984).

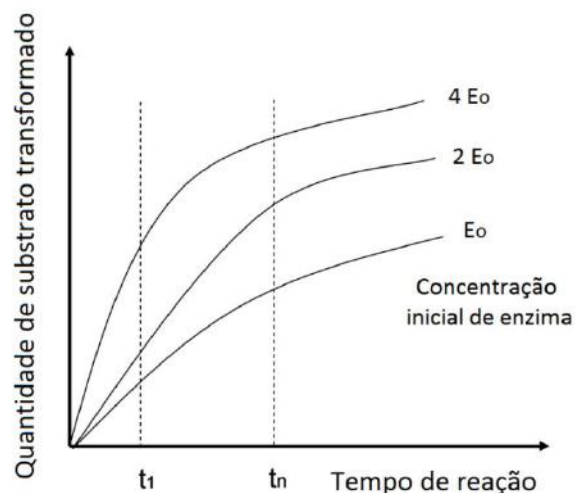


Figura 19 - Efeito da carga inicial de enzimas no progresso da reação hidrolítica. Destaca-se a importância das medidas de atividade em tempos reduzidos de reação. E_0 – concentração de enzima inicial genérica; t_n – tempo de reação genérico. Adaptado de Andersen (2007).

O modelo de Kadam *et al.*, (2004), se propôs a incorporar em sua descrição o balanço das enzimas adsorvidas no substrato a partir de um equacionamento algébrico determinado pela seguinte expressão:

$$E_{tot} = E_{Ft} + E_{Bt} \quad [2]$$

Tal que:

E_{tot} : concentração total de enzimas ($g.kg^{-1}$);

E_{Ft} : concentração de enzimas em solução ($g.kg^{-1}$);

E_{Bt} : concentração de enzimas adsorvidas ($g.kg^{-1}$).

Em que a quantidade de enzima adsorvida era determinada por uma isoterma do tipo Langmuir,

$$E_{Bt} = \frac{E_{imax} * K_{iad} * E_{Ft} * S}{1 + K_{iad} * E_{Ft}}$$

Tal que:

E_{Bt} : concentração de enzimas adsorvidas ($g.kg^{-1}$);

E_{imax} : concentração máxima de enzimas adsorvidas ($g.kg^{-1}$);

K_{iad} : constante de adsorção enzima-substrato ($g.kg^{-1}$);

E_{Ft}: concentração de enzimas em solução ($g.kg^{-1}$);
S: concentração de celulose ($g.kg^{-1}$).

Essa descrição se manteve muitas vezes conservada nos modelos adaptados de Kadam *et al.*, (2004), mesmo quando aplicado para outras espécies enzimáticas modeladas em trabalhos derivados do original (Câmara, 2012, Tsai *et al.*, 2014, Angarita, 2014).

Além dessas premissas, o modelo de Kadam *et al.*, (2004) foi construído sobre a suposição de que (Tsai *et al.*, 2014):

- A adsorção da enzima seguiu o modelo de adsorção de Langmuir com as reações de primeira ordem ocorrendo na superfície do substrato;
- Não existiam diferenças entre a celulose amorfa e cristalina;
- A concentração da enzima total era constante no reator;
- A conversão da celobiose para glicose seguia o modelo de Michaelis-Menten;
- Foi considerada distinta ação das enzimas (EG – endoglicosidase + CBH-celobiohidrolase) e β G - beta glicosidase e, inclusive, a inibição das mesmas por carboidratos simples.

Em vários trabalhos de modelagem foram consideradas inibições enzimáticas no processo de hidrólise (Bansal *et al.*, 2008; Jeoh *et al.*, 2017). Observam-se parâmetros associados à inibição reversível causada pela glicose, xilose e celobiose (Camara, 2012, Angarita *et al.*, 2015) e pelo etanol (Sousa Jr, 2011) mais frequentemente. As características do processo que influenciam as inibições enzimáticas são: a origem das enzimas, a razão substrato-enzima e a natureza do substrato. A adsorção irreversível e não específica da celulase junto à lignina (Andersen, 2007) e o impedimento processivo delas na própria celulose (Grano *et al.*, 2004; Jalak & Våljamäe, 2010) explica parte da contínua perda de atividade da enzima no decorrer da hidrólise, mas sobretudo essa última inibição tem sido frequentemente descrita em modelos cinéticos sobre a ação de celulases isoladas.

Com base nessas premissas, as etapas de conversão da celulose no modelo de Kadam *et al.* (2004) foram concebidas em três reações principais com várias inibições causadas pelos produtos reacionais (Figura 20), tendo sido o primeiro que incorpora a inibição da xilose sobre as enzimas (Angarita, 2014):

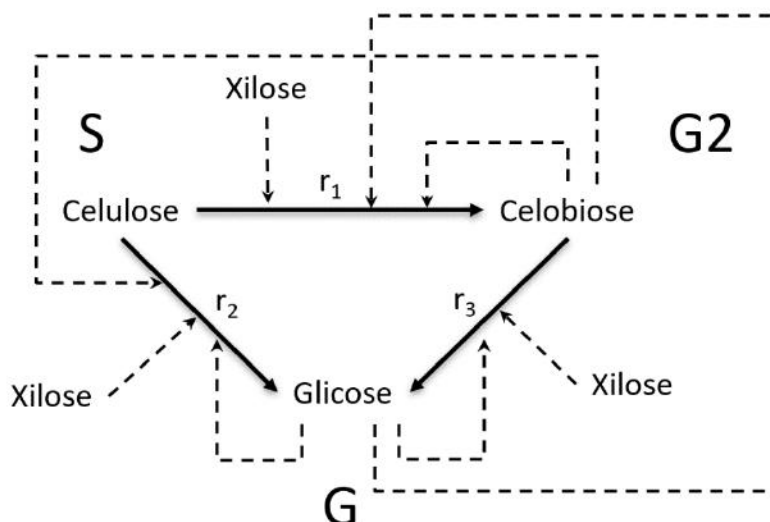


Figura 20 - Rota reacional de hidrólise enzimática da celulose até glicose, evidenciando as inibições por glicose, celobiose e xilose. r_1 = reação catalisada por endo- β -1,4-glicanase (EG) e exo- β -1,4-glicanase (CBH), r_2 = reação catalisada por exo- β -1,4-glicanase (CBH) e exo- β -1,4-glicosidase; r_3 = reação catalisada por β -glicosidases (Modificado de Kadam *et al.*, 2004).

No qual observaram-se as seguintes reações:

- A conversão da celulose para celobiose com inibição competitiva pela xilose, glicose e celobiose.

$$r_1 = \frac{K_{1r} E_{1B} R_S S}{1 + \frac{G_2}{K_{1G2}} + \frac{G}{K_{1IG}} + \frac{X}{K_{1IX}}} \quad [3]$$

Tal que:

- r_1 : taxa reação de conversão da celulose para celobiose ($\text{g.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$);
- K_{1r} : constante da taxa de reação de conversão da celulose para celobiose ($\text{kg.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$);
- E_{1B} : soma da concentração de CBH e EG adsorvidas (g.kg^{-1});
- R_S : Reatividade do substrato;
- S : concentração de substrato – Celulose (g.kg^{-1});
- G_2 : concentração de celobiose (g.kg^{-1});
- G : concentração de glicose (g.kg^{-1});
- X : concentração de xilose (g.kg^{-1});
- K_{1G2} : constante de inibição para celobiose da reação de conversão da celulose para celobiose (g.kg^{-1});
- K_{1IG} : constante de inibição para glicose da reação de conversão da celulose para celobiose (g.kg^{-1});
- K_{1IX} : constante de inibição para xilose de reação de conversão da celulose para glicose (g.kg^{-1}).

- Conversão da celulose a glicose com inibição competitiva por glicose, celobiose e xilose.

$$r_2 = \frac{K_{2r}(E_{1B} + E_{2B})R_S S}{1 + \frac{G_2}{K_{2IG2}} + \frac{G}{K_{2IG}} + \frac{X}{K_{2IX}}} \quad [4]$$

Tal que:

r_2 : taxa reação de conversão da celulose para glicose ($g.kg^{-1}.h^{-1}$);

K_{2r} : constante da taxa de reação de conversão da celulose para glicose ($kg.g^{-1}.h^{-1}$);

E_{1B} : soma da concentração de CBH e EG adsorvidas ($g.kg^{-1}$);

E_{2B} : concentração de β -glicosidase adsorvida ($g.kg^{-1}$);

R_S : Reatividade do substrato;

S : Concentração de substrato – Celulose ($g.kg^{-1}$);

G_2 : concentração de celobiose ($g.kg^{-1}$);

G : concentração de glicose ($g.kg^{-1}$);

X : concentração de xilose ($g.kg^{-1}$);

K_{2IG2} : constante de inibição para celobiose da reação de conversão da celulose para celobiose ($g.kg^{-1}$);

K_{2IG} : constante de inibição para glicose da reação de conversão da celulose para celobiose ($g.kg^{-1}$);

K_{2IX} : constante de inibição para xilose de reação de conversão da celulose para glicose ($g.kg^{-1}$).

- Conversão da celobiose a glicose com inibição competitiva por glicose e xilose.

$$r_3 = \frac{K_{3r}E_{2F}G_2}{K_{3M} \left(1 + \frac{G}{K_{3IG}} + \frac{X}{K_{3IX}} \right) + G_2} \quad [5]$$

Tal que:

r_3 : taxa reação de conversão da celobiose para glicose ($g.kg^{-1}.h^{-1}$);

K_{3r} : constante da taxa de reação de conversão da celobiose para glicose ($g.kg^{-1}.h^{-1}$);

E_{2F} : concentração de β -glicosidase em solução ($g.kg^{-1}$);

G_2 : concentração de celobiose ($g.kg^{-1}$);

G : concentração de glicose ($g.kg^{-1}$);

X : concentração de xilose ($g.kg^{-1}$);

K_{3M} : constante de saturação de celobiose da reação de conversão da celobiose para glicose ($g.kg^{-1}$);

K_{3IG} : constante de inibição para glicose da reação de conversão da celulose para celobiose ($g.kg^{-1}$);

K_{3IX} : constante de inibição para xilose de reação de conversão da celulose para glicose ($g.kg^{-1}$).

As equações de taxa do balanço de massa por componente do modelo foram:

- CELULOSE:

$$\frac{dS}{dt} = -r_1 - r_2 \quad [6]$$

Tal que:

S : Concentração de substrato – Celulose (g.kg^{-1});

r_1 : taxa de reação de conversão da celulose para celobiose ($\text{g.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$);

r_2 : taxa de reação de conversão da celulose para glicose ($\text{g.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$).

- CELOBIOSE:

$$\frac{dG_2}{dt} = 1,056 r_1 - r_3 \quad [7]$$

Tal que:

G_2 : concentração de celobiose (g.kg^{-1});

r_1 : taxa de reação de conversão da celulose para celobiose ($\text{g.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$);

r_3 : taxa de reação de conversão da celobiose para glicose ($\text{g.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$).

Obs.: a constante surge da estequiometria da reação

- GLICOSE:

$$\frac{dG}{dt} = 1,111 r_2 + 1,053 r_3 \quad [8]$$

Tal que:

G : concentração de glicose (g.kg^{-1});

r_2 : taxa de reação de conversão da celulose para glicose ($\text{g.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$);

r_3 : taxa de reação de conversão da celobiose para glicose ($\text{g.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$).

Obs.: as constantes surgem da estequiometria da reação

A equação da dependência da temperatura na taxa reacional foi descrita pela equação de Arrhenius:

$$k_{ir(T_2)} = k_{ir(T_1)} e^{-\frac{E_{at}}{R} \left[\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right]} \quad [9]$$

Para $30^\circ\text{C} \leq T \leq 55^\circ\text{C}$

Tal que:

$K_{ir(T_1)}$: constante da taxa de reação de conversão genérica na temperatura inicial ($\text{kg.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$);

$K_{ir(T_2)}$: constante da taxa de reação de conversão genérica na temperatura final ($\text{kg.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$);

E_{at} : energia de ativação ($\text{cal.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$);

R : constante universal dos gases ($\text{cal.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$).

O modelo cinético de Kadam *et al.*, 2004 foi adaptado por alguns autores para prever e explicar resultados obtidos em condições experimentais similares aos das experimentadas pelos autores do modelo original. Sendo assim, foram feitos ajustes do modelo para reações com diferentes substratos, enquanto outros o adaptaram-nos, admitindo novas reações (Figura 21).

Saad (2010) utilizou do modelo original sem modificações para estudar as condições de processo da hidrólise do bagaço pré-tratado por explosão a vapor que forneceriam o menor valor de custo de etanol lignocelulósico para ser vendido.

Tsai *et al.* (2014) modificou a proposta de mecanismo reacional do modelo de Kadam *et al.* (2004) validando-a para uma reação com celulose Avicel em alta carga de sólidos utilizando extratos enzimáticos de Celluclast 1.5L e de Novozymes N188. Foram considerados mais dois componentes reacionais: a celotriose e a celotrealose por meio da incorporação da reação de transglicosilação, que corresponde à reação de aumento da cadeia glicosídica a partir dos oligômeros de glicose em condições de alta carga de sólidos. Também o modelo incorporou inibições. Assim, frente do modelo de Kadam *et al.* (2004), o novo modelo teve menores erros de ajuste para os dados experimentais em condições de altas concentrações de glicose no meio reacional ($> 40 \text{ g.L}^{-1}$) e, também, para elevadas concentrações de substrato no início da reação.

Zheng (2009) modificou o modelo da Kadam *et al.* (2004) desconsiderando as inibições causadas pelas xiloses, pois trabalhou com um material lignocelulósico de uma gramínea norte americana que tinha baixíssima proporção de hemiceluloses. Câmara, 2012, modelou a hidrólise enzimática do bagaço-de-cana tratado pelo método alcalino. Dada a natureza de sua biomassa, foi feita inserção da reação de formação de xilose a partir da degradação de hemicelulose. Já a proposta de Angarita Martinez (2014) utilizou o modelo de Câmara (2012), para estimar os parâmetros para reação de hidrólise enzimática de palha de cana-de-açúcar tratada hidrotermicamente observando que igualando o valor dos parâmetros de inibição, não haveriam grandes prejuízos de ajuste do modelo aos dados experimentais.

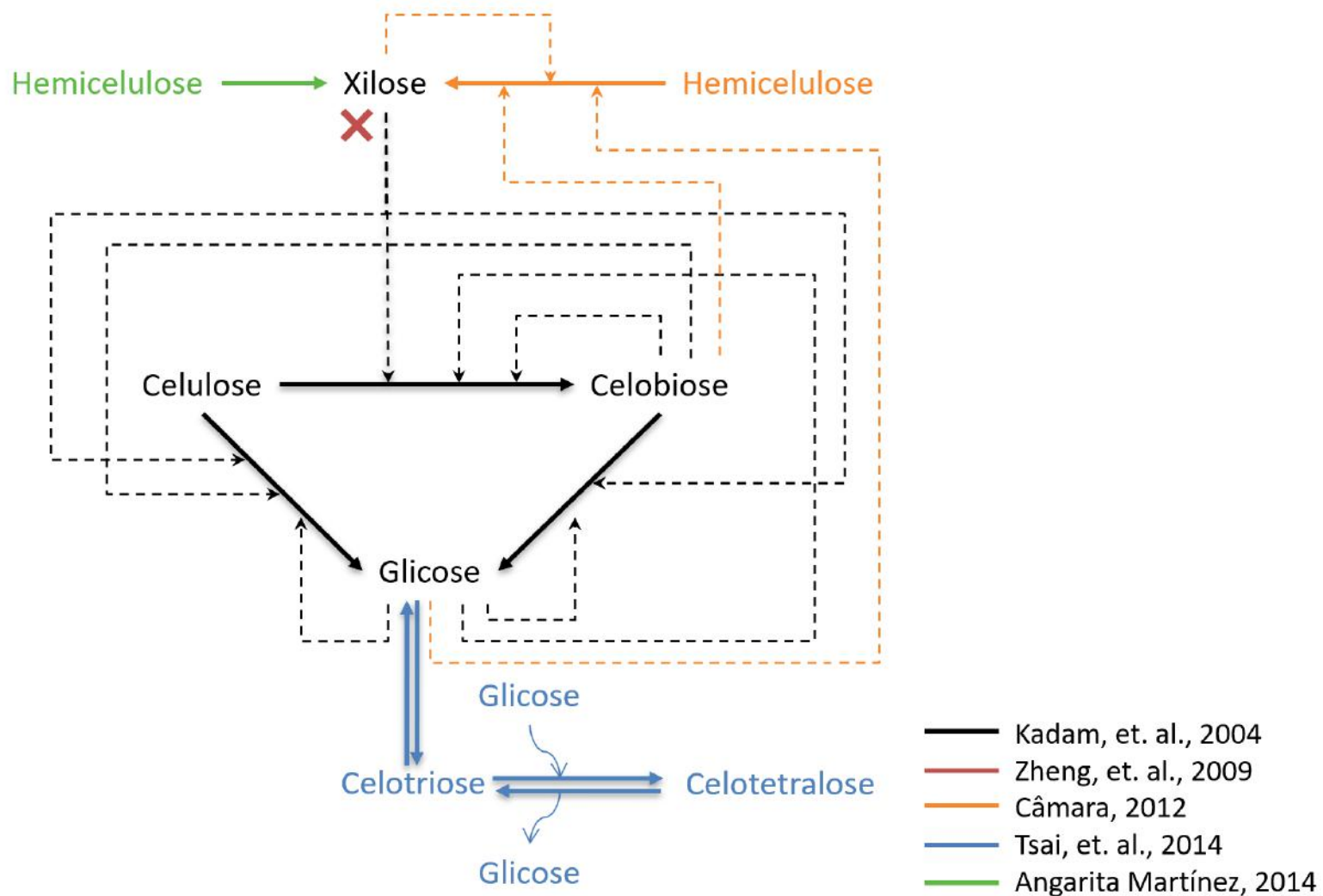


Figura 21 - Diferentes rotas reacionais de modelos oriundos de modificações do modelo de Kadam *et al.* (2004).

Indo além dos trabalhos adaptados de Kadam *et al.* (2004), outros modelos cinéticos da literatura já fizeram descrições da hidrólise de vários materiais através de suas características físicas, sejam eles pré-tratados ou não, por meio de enzimas diversas. Os modelos levantados na (Tabela 2) descreviam degradação da lignocelulose ou da celulose pura e estimaram parâmetros para seus modelos tendo em posse um conjunto específico de dados experimentais. Dada essa diversidade de substratos, pré-tratamentos e condições hidrolíticas, não foram expostos os rendimentos reacionais nessas abordagens, por variarem amplamente.

A partir da bibliografia, notou-se que poucos modelos foram adaptados para reações para substrato lignocelulósico antes da década de 2000. Os achados feitos em celulose anteriores a essa data poderiam ter sido extrapolados para sistemas reacionais complexos como a lignocelulose de bagaço-de-cana. A eventual falta de ajuste para esses modelos mais recentes podem estar ligados, de algum modo, a exclusão de efeitos ligados à heterogeneidade estrutural do substrato. Por outro lado, os efeitos extraídos nas reações com substratos mais puros podem estar livres de interferências de outros compostos nas reações descritas. Assim, os efeitos dos componentes isolados são mais precisamente determinados e os parâmetros ficam mais livres de confundimento.

Alguns trabalhos consideraram a reação hidrolítica como um fenômeno de natureza cinética homogênea, como o de Michaelis-Menten (Peiterson e Edward, 1979, Gusakov e Sinitsyn, 1985, Shin *et al.*, 2006). Essa representação simplificada é muito justificada para aplicações práticas, porém não contribui para a descrição fenomenológica do processo, ao passo que fenômenos em uma escala maior, como a degradação da celulose, não estão descritos e validados em fenômenos físicos em escala reduzida, como a adoração, suas inibições relacionadas e a catálise enzimática (Payne *et al.*, 2015).

Devido a natureza mais pura do substrato, alguns dos modelos cinéticos que incorporam características estruturais do substrato, conceitualmente, não descreveram as inibições pela xilose, nem pela lignina (Peiterson e Edward Ross, 1979, Ryu *et al.*, 1982, Scheidling *et al.*, 1984, Gusakov e Sinitsyn, 1985), limitando a sua extrapolação para descrever a hidrólise da lignocelulose. Porém, eles acessam o efeito da cristalinidade do substrato na reação, embora apenas no início, mas não as influências das fases de celulose.

Tabela 2 - Modelos semi-mecanísticos de hidrólise considerando características estruturais e funcionais do substrato para a limitação de taxa reacional. Adaptado de Bansal *et al.* (2009).

Referência	Cinética	Substrato	Enzima	Característica do substrato limitando a taxa reacional	Observações
Peiterson e Edward Ross, 1979	M-M	Celulose delignificada pretratada por moinho de bolas	<i>T. reesei</i> + β G	Substrato com fases (A+C)	Considerou a conversão da celulose cristalina em amorfa por enzimas, mas não se mediu cristalinidade durante a reação.
Ryu <i>et al.</i> , 1982	Ads, M-M	Solka Floc, Avicel, algodão higrófilo	<i>T. reesei</i>	Acessibilidade decresce com o aumento da cristalinidade	Incluiu acessibilidade e área no modelo, mas não se mediu cristalinidade durante a reação
Lee e Fan, 1983	Ads	Solka Floc	<i>T. reesei</i> + β G	Reatividade	
Holtzapple <i>et al.</i> , 1984	Ads, QSS	Solka Floc	<i>T. viride</i> + β G	Acessibilidade	
Scheiding <i>et al.</i> , 1984	M-M (celobiose) Ads (celulose)	Avicel	<i>T. reesei</i> + β G	Cristalinidade	Não se mediu a cristalinidade durante a reação.
Gusakov e Sinitsyn, 1985	M-M	Talos de algodão quimicamente tratados	<i>T. longibrachiatum</i> + β G (<i>A. foetidus</i>)	Cristalinidade (A+C) (cristalinidade medida antes da reação e comparada com taxas de formação de glicose).	Não se mediu a cristalinidade durante a reação.

				Inativação reversível das enzimas mediante adsorção	
Nakasaki <i>et al.</i> , 1988	M-M	Papel de filtro	Meicelase CEPB-5081	Fração não degradável	
Converse <i>et al.</i> , 1990	Ads	Madeira pretratada	<i>T. reesei</i> + β G	Área superficial (mutável)	
Philipidis <i>et al.</i> , 1992, 1993	Ads	α -celulose, celobiose e glicogalactona	<i>T. reesei</i> + β G	Adsorção das celulases e β G na lignina, reatividade da celulose	
Nidetzky e Steiner, 1993	Ads, M-M, substrato em duas fases	Sigmacell, Avicell, α -celulose, forros de algodão	Celluclast + β G (Novozymes)	Duas fases de substrato	
South <i>et al.</i> , 1995	Ads		<i>T. reesei</i>	Reatividade	Dados de Nutor e Converse, 1991
Schell <i>et al.</i> , 1999	Ads	Madeira de <i>Pseudotsuga menziessi</i> pré-tratada por ácido diluído	logen Super Clean cellulase	Presença de lignina onde adsorvem celulases e β G, reatividade da celulose	
Movagarnejad <i>et al.</i> , 2000	Ads, teoria de encolhimento de partículas	Celulose microcristalina	Celluclast + β G (Novozymes)	Substrato que permite a formação de complexos enzimáticos inativos	
Moon <i>et al.</i> , 2001	Ads	α -celulose, madeira moída tratada ou em moinho de bolas ou em explosão a vapor	Celluclast + β G (Novozymes)	Reatividade	

Pettersson <i>et al.</i> , 2002	Ads	Madeira de gimnosperma	Celluclast 2L + β G (Novozymes)	Diminuição na área superficial Presença de lignina, na qual celulase e β G adsorvem	
Gan <i>et al.</i> , 2003	Ads	α -celulose (Sigma C802)	<i>T. reesei</i>	Fração inerte da celulose	
Movagharnejad e Sorabi, 2003 / Movagharnejad, 2005	Ads, teoria de encolhimento de partículas	Materiais residuais celulósicos	Celluclast + β G (Novozymes)	Substrato possuindo porções inacessíveis aos sítios ativos da enzima	
Kadam <i>et al.</i> , 2004	Ads	Palha de milho pretratada	Celulase não comercial CPN (Iogen corp) + β G	Reatividade	
Lin <i>et al.</i> , 2005	Ads	Celulose em pó 101-F (Sigma)	<i>T. reesei</i> + β G	Enzima adsorvida convertida em complexo inativo	
Ljurggren, 2005	Ads	Madeira de espruce e bagaço de cana pré-tratados	Celluclast + β G (Novozymes)	Presença de lignina promovendo adsorção da beta glicosidase	
Shin <i>et al.</i> , 2006	M-M	α -celulose, madeira tratada em moinho de bolas e explosão a vapor	<i>T. reesei</i> + β G (Novozymes)	Inibição pela lignina	
Zhang & Lynd, 2006	Ads	Substrato celulósico (?)	<i>Trichoderma sp.</i>	Fração acessível do substrato	Dados experimentais da literatura (não definido)
Al-Zuhair, 2008	Ads	Aparas de madeira altamente cristalinas	<i>Aspergillus niger</i>	Substrato em duas fases	

Liao <i>et al.</i> , 2008	Ads	Material lignocelulósico de esterco	Celluclast + β G (Sigma)	Reatividade	
Shao <i>et al.</i> , 2009 ^a Shao <i>et al.</i> , 2009b	Ads	Lodo de resíduo de papel	Spezyme CP (Genencor) + β G (Sigma)	Reatividade	
Zheng, 2009	Ads	<i>Leymus triticoides</i> (gramínea)	Celluclast + β G Novozymes)	Reatividade, Presença de lignina que adsorve enzimas.	
Levine <i>et al.</i> , 2010	Ads	Avicel	<i>T. reesei</i> CBHI e II	Incerto (Área superficial influenciando complexação enzimática em caso específico)	Dados de Medve <i>et al.</i> , 1998. Requer mais experimentos para investigar diminuição da taxa.
Khodaverdi <i>et al.</i> , 2012	Ads	Fiapos de algodão (celulose altamente cristalina)	Celluclast + β G (Novozymes)	Reatividade	Incerteza quanto a contribuição da reatividade na mecanística cinética
Camara, 2012	Ads	Bagaço de cana pré-tratado com peróxido de hidrogênio	Celluclast + β G (Novozymes)	Reatividade	
Angarita <i>et al.</i> , 2015	Ads	Palha de cana pretratada hidrotermicamente	Cellic CTec2 (Novozymes)	Reatividade	
Nag <i>et al.</i> , 2015	Ads	α -celulose-I β e celulose-I β altamente cristalina	CBHI, EG e β G isoladas	Acessibilidade, distribuição do tamanho de cadeia, cristalinidade	

M-M: Michaelis-Menten; Ads: adsorção; CBH: celobiohidrolase; EG: endoglicanase; β G: betaglicosidase; A: amorfo; C: cristalino.

O trabalho de Ryu *et al.* (1985) demonstrou a correlação entre as características físicas medidas índice de cristalinidade e acessibilidade em materiais pré-tratados por métodos físicos. Também, mostrou como a cristalinidade exerceu efeito sobre os parâmetros cinéticos da enzima ao longo da hidrólise. Nidetzky e Steiner (1993), modelaram os efeitos da característica de cristalinidade em um modelo de duas fases. O levantamento de dados estruturais ao longo da reação não foi feito para esses casos.

Alguns trabalhos a partir de 1990 com materiais ainda muito puros, modelaram hidrólises ou investigando efeitos da presença da lignina ou da área superficial, porém desconsiderando a cristalinidade. A partir de 2000 observa-se o advento de grande número de modelos que incorporavam aspectos estruturais do substrato, porém focando lignoceluloses, muitos deles de vegetais superiores com conteúdo de lignina mais elevado do que em gramíneas inclusive, dificultando extrapolações dos achados obtidos para substratos puros para materiais utilizados na produção de álcool de segunda geração. Ainda assim, a investigação dos efeitos da cristalinidade e área superficial não foi acessado para as reações envolvendo esses substratos.

O bagaço-de-cana de açúcar aparece em modelos estruturais apenas para um trabalho na literatura de modelos cinéticos estruturais e funcionais (Ljurggen, 2005), no qual não são contabilizados outros efeitos, como de área superficial do material e a influência que exerce a presença da lignina nesse material ao longo da hidrólise enzimática, mas não a cristalinidade conjuntamente com a área superficial.

Recentemente Nag *et al.* (2015) modelaram a reação de hidrólise enzimática de celulose cristalino e amorfo, acompanhando as características de cristalinidade e distribuição de tamanho da cadeia polimérica durante a reação. Os resultados mostraram pouca variação na distribuição do tamanho de cadeia no tempo, tão bem quanto pouca variação da cristalinidade. O modelo cinético não contabiliza a estrutura porosa da biomassa. Sendo assim, não levou em consideração a difusão interna das enzimas no material, nem as variações na área superficial da celulose ao longo da reação.

3. Justificativa

Durante a etapa de pré-tratamento no processo de produção de etanol lignocelulósico, verifica-se a alteração das características físico-químicas e constitutivas do substrato. No material pré-tratado ocorrem alterações estruturais da celulose, como o seu grau de polimerização, cristalinidade, área superficial, dentre outras características que, por sua vez, podem ter sido modificadas de forma independente ou dependente entre si (Zhou *et al.*, 2009). A discriminação das propriedades físico-químicas que exercem influência na hidrólise enzimática daquelas que não influenciam no processo precisa ser feita de forma mais precisa, para esclarecer as razões fenomenológicas da recalcitrância. De todas as características estruturais do substrato que podem exercer influência na hidrólise enzimática, provavelmente a cristalinidade e área superficial são aquelas que se têm mais dúvida no processo reacional. Na literatura visitada percebe-se, todavia, que modelos semi-mecanísticos que incorporam características estruturais e funcionais são muito escassos quanto a sua quantidade, mas também quanto ao número de características estudadas (Tabela 2).

No que diz respeito à cristalinidade, em trabalhos de modelagem cinética de hidrólise enzimática com substrato celulósico ou lignocelulósico, alguns autores propuseram que a celulose presente nesse substrato era constituída de duas fases, cada uma apresentando diferentes propriedades reacionais (Peitersen & Ross, 1979; Nidetzky e Steiner, 1993; Gan *et al.*, 2003; Al-Zuhair, 2008). Todavia, na literatura a determinação do índice de cristalinidade não emprega a técnica que melhor correlaciona a fração cristalina na amostra, a partir de sua investigação. Alguns desses autores assumiram que cada uma das fases possuía cristalinidade distinta da outra e que a fração menos cristalina seria degradada preferencialmente ao longo da reação. acarretando no aumento da cristalinidade do reagente, o que estaria correlacionado, por sua vez, com o decréscimo da taxa reacional (Peiterson e Edward Ross, 1979; Ryu *et al.*, 1982; Scheiding *et al.*, 1984; Gusakov e Sinitsyn, 1985). Esses trabalhos, porém, não mediram a cristalinidade da mistura reacional ao longo da reação. Logo, não foi feita uma correlação da cristalinidade com as frações de cada um dos componentes na mistura para construir os modelos cinéticos como pretende esse trabalho. A exceção seria o trabalho de Nag *et al.* (2015), que debruçou sobre as características listadas e a do grau de polimerização.

No que diz respeito à descrição da quantidade de enzimas adsorvidas junto ao substrato, a literatura retrata modelos que incorporam a isoterma de Langmuir em modelos cinéticos, enquanto outros descrevem a quantidade de enzima adsorvida no substrato por correlações empíricas (Bansal *et al.*, 2009). Porém a maioria dos modelos descreve a adsorção das celulases pela isoterma de Langmuir (Câmara, 2012), mesmo que algumas hipóteses dos modelos de Langmuir não possam ser aplicadas para todas as condições de uma cinética enzimática heterogênea (Zhang & Lynd, 2004), principalmente no que diz respeito à formação do complexo enzima-substrato e à dinâmica do equilíbrio de adsorção da enzima durante o curso da hidrólise. Medve *et al.* (1997), por exemplo, modificou o modelo de adsorção de Langmuir para obter melhores expressões para explicar os dados experimentais, resultando na expressão de Langmuir-Freundlich, com dois sítios de adsorção. Nesse trabalho, pretende-se encontrar uma expressão baseada no modelo de Langmuir para as enzimas do processo que respeite a dinâmica do equilíbrio de adsorção da enzima durante o curso da hidrólise, relacionando com a área do material modificada ao longo do tempo, algo que não foi ainda investigado.

Nos modelos adaptados de Kadam *et al.* (2004), as modificações do substrato durante a hidrólise são descritas por um termo que denota a reatividade do substrato, que decresce com o tempo. Acredita-se ser possível nesse estudo incorporar no modelo as características físicas que têm maiores correlações com a taxa e rendimento reacionais ao invés de inserir um termo de reatividade do substrato, que é pouco descritivo em termos de estrutura e composição do substrato. Essa incorporação pode ser feita a partir da determinação dos efeitos que desempenham essas características no processo, elencando aquelas que exercem maior influência, por exemplo. O esclarecimento das contribuições das características físicas e químicas dos componentes reacionais sobre a hidrólise enzimática pode contribuir com o surgimento de novos modelos cinéticos mais precisos ou mais funcionais, expandindo o conhecimento mecanístico do processo e permitindo a adaptação das descrições anteriores. Essas características, por sua vez, poderiam ser tomadas como parâmetros de controle de qualidade do processo de pré-tratamento, já que estimativas dos rendimentos reacionais de hidrólise poderiam ser feitos a partir do modelo com parâmetros de substrato mais realísticos (características físico-químicas mensuráveis) incorporados nele.

Esse trabalho vem suprir a carência de um modelo cinético estrutural e funcional para as características do substrato, uma vez que poucos dos modelos propostos

incorporam tais características em suas descrições e existe incerteza sobre as influências de cada característica na hidrólise isoladamente (Zhang & Lynd, 2004). Nesse estudo serão acrescentadas as influências que as características estruturais exercem na reação de hidrólise de um substrato simplificado. Percebe-se que essa investigação deve ser realizada em um substrato celulósico mais puro, já que se investiga a influência de suas propriedades isoladas sobre o processo. Assim, admite-se ser possível a realização de experimentos complementares aos realizados em celulose feitos no estudo que resultou no modelo de Tsai *et al.* (2014), concebido para descrever a reação de celulose de Avicel com o pool de enzimas Celluclast 1.5L e Novozymes N188. Imagina-se que ele retenha algumas das propriedades observadas em um substrato mais complexo, como um substrato lignocelulósico.

Pretende-se analisar os efeitos exercidos pela cristalinidade e área superficial em materiais com essas propriedades modificadas por pré-tratamentos, mas, também, acrescentar as inibições causadas pelos produtos reacionais sobre cada uma das enzimas. Dessa forma, um novo modelo cinético que expanda a descrição fenomenológica da reação cinética pode ser escrito a partir do proposto por Tsai *et al.* (2014) para hidrólise de celulose.

4. Objetivo

Objetivo Principal

Desenvolver um modelo semi-mecanístico da hidrólise de celulose Avicel PH-101 incorporando características estruturais da biomassa e suas respectivas propriedades reacionais.

Objetivos Específicos

- Seleção da metodologia de determinação da fração de celulose cristalina em misturas de materiais celulósicos, a partir de testes de difração de raios-X e cálculos do índice de cristalinidade;
- Geração de celulose modificada pelo pré-tratamento de Avicel por moinho de bolas, caracterização e hidrólise enzimática do pré-tratado;
- Geração de celulose modificada pelo pré-tratamento de Avicel por ([EMIM][OAc]), caracterização e hidrólise enzimática do pré-tratado;
- Implementação e simulação de adaptações de modelos de Angarita (2014) e Tsai *et al.* (2014) para cinco casos distintos em ambiente Mathematica®;
- Estimação de parâmetros para modelos algébrico-diferenciais compreendendo duas espécies enzimáticas passíveis de adsorção e inibição e substrato em uma ou duas fases.

5. Materiais e métodos

5.1. Hidrólise enzimática

5.1.1. Atividade beta-glicosidásica

Seguindo o método de Ghose (1987), 51,3 mg de D-(+)-celbiose Sigma[®], lote 078K1543, foi dissolvida em solução tampão 0,05 mol.L⁻¹ de citrato de sódio, Reagen[®], lote 930721 / ácido cítrico Proquímios, lote 10/0265, pH 4,8 e o volume foi completado para 10 mL. Um volume de 0,5 mL dessa solução foi colocada em tubos de ensaio junto com 0,5 mL da solução enzimática testada. Depois da agitação, a solução foi incubada em banho maria em equipamento Solab[®] SL 155/22 a 50°C por 30 minutos. Em seguida a solução foi fervida a 100°C por 5 minutos. Depois de esfriada a solução, a concentração de glicose foi medida, em triplicata em equipamento bioanalizador YSI[®] 2700 SELECT. A atividade enzimática foi calculada pela seguinte expressão:

$$\frac{UI}{mL} = \frac{Diluição * \Delta[Glicose] \left(\frac{g}{L}\right) * 5,55 \left(\frac{\mu mol}{mL}\right) * volume da reação (mL)}{tempo (min) * volume da sol. enzima (mL)} \quad [10]$$

Em que:

UI – Unidades de atividade de β-glicosidase

UI/mL – Concentração das unidades de β-glicosidase “diluição” – Diluição da preparação enzimática

Δ [Glicose] – Média da concentração de glicose nas reações, subtraída da concentração do controle

5,55 – Fator para conversão da concentração de glicose de g/L (dados do bioanalizador YSI ou HPLC) para μMol/mL

5.1.2. Atividade celulásica pelo método do Filtro de papel (FPA)

A técnica se baseia na oxidação do açúcar pelo ácido 3,5-dinitrosalicílico que adquire cor laranja-amarronzada na presença de açúcares redutores (Adney *et al.*2008). Papéis de filtro Whatman nº1 de dimensões de 1,0 cm x 6,0 cm foram enrolados e colocados dentro dos tubos de ensaio de dimensões de 13 mm x 100 mm (Ghose, 1987). Em cada um deles foram colocados 1,0 mL de tampão citrato de sódio Reagen[®], lote 930721 50 m.mol⁻¹/ ácido cítrico Proquímios, lote 10/0265, pH 4,8, e os tubos foram deixados em banho maria em equipamento Solab[®] SL 155/22 a 50°C por 1 min. Em seguida 0,5 mL de solução enzimática e suas diluições foram colocadas nos tubos, em triplicata, e incubadas em 50°C por 60 min. Foram adicionados 3,0 mL de solução de 4,4 x 10⁻² mol.L⁻¹ de DNS e 4,0 x 10⁻¹ mol.L⁻¹ de NaOH com 1,06 mol.L⁻¹ de tartarato de sódio e potássio. Os tubos foram colocados a 100°C por 5 min e resfriados. A leitura foi feita diluindo-se 0,2 mL da solução reacional com 2,5 mL de água destilada. As amostras foram analisadas a 540 nm, depois de zerar o aparelho com tampão citrato. As análises foram feitas comparando-se os experimentos frente aos controles do substrato e da enzima, ambos submetidos às mesmas condições reacionais. Os valores obtidos foram analisados frente a uma curva padrão de D(+)-glucose anidra P.A. ACS, Vetec, Lote, DCBB8443, com concentrações de 2,0; 3,3; 5,0 e 6,7 mg.mL⁻¹. A concentração da enzima que libera 2,0 mg de glicose foi calculada pela expressão:

$$\text{concentração} \left(\frac{\text{FPU}}{\text{mL}} \right) = \frac{0,37}{\left[\frac{1}{Y} \right]}, \quad [11]$$

tal que Y = diluição da enzima que liberou 2,0 mg de glicose em 60 min

5.1.3. Dosagem de proteínas pelo método de Coomassie Blue G-250 (Bradford)

O método de Bradford escolhido para quantificação de proteínas em solução se baseia na observação de que o máximo da absorvância para luz de uma solução ácida de corante Cromassie Brilliant Blue G-250 muda de 465 nm a 595 nm quando sua molécula se liga a uma proteína (Bradford, 1976), tanto nos grupamentos carregados positivamente

dela ou por interações de Van der Waals. 16 µL da solução contendo concentração desconhecida de proteína foi diluída em 160 µL de solução de corante reagente (0,087%_(m/m)) de Cromassie Brilliant Blue G-250 Sigma, lote 115H0497 em solução contendo 3,9%_(v/v) de etanol Vetec, lote DCBB6557 e 7,4%_(v/v) de ácido fosfórico P.A. Vetec, lote 01296. A solução foi filtrada previamente ao seu uso em papel Whatman #1. Após a adição da proteína junto ao corante, a solução foi incubada por 10 minutos sob agitação orbital e foi analisada em leitor Biotek[®] Epoch 2 Microplate Spectrophotometer para a razão das absorbâncias nos comprimentos de onda de 590 nm e 450 nm, respectivamente (Ernst & Zor, 2010). O valor obtido foi comparado frente à uma curva padrão obtida com Soroalbumina Bovina Sigma (Albumin from Bovine Serum, Sigma, lote #SLBF3307V) na faixa de 25 µg a 500 µg para a mesma técnica.

5.1.4. Determinação de carboidratos solúveis

Amostras líquidas em frascos eppendorf que possuíam glicose e outros carboidratos solúveis foram sujeitas a centrifugação a 12.000 rpm por 5 min a temperatura ambiente em centrífuga Kasvi[®] K14-1215 minicentrífuga para a deposição de material suspenso. A concentração de glicose foram determinadas usando ou por bioanalisador, ou via cromatografia líquida. Para os demais carboidratos, apenas por cromatografia. Quando deferminando a concentração por bioanalisador, utilizou-se o equipamento YSI 2700 SELECT, equipado com membrana de glicose apropriada. Quando as concentrações foram feitas por cromatografia, o sobrenadante isolado foi posteriormente filtrado por filtro de seringa de PTFE Millex[®] de 13 mm, com exclusão de 0,22 µm, lote R6NA28416. O filtrado foi submetido em cartucho deashing e coluna BioRad[®] Aminex[®] HPX-87P de dimensões 7,8 mm de diâmetro interno por 30 cm de altura, acoplado a um detector de índice de refração Shodex[®] RI-2031 Plus, mantido a 50°C em equipamento HPLC Ultimate 3000 Thermoscientific[®]. A amostra foi eluída à 80 °C, com fluxo constante de água de 0,6 mL/min, com pressão entre 600 e 900 psi, por 60 min para a obtenção do cromatograma.

5.2. Análise da cristalinidade de uma mistura de celulose microcristalina e carboximetilcelulose

A fim de investigar a técnica que proporcionava a maior relação linear entre a fração cristalina de uma amostra e o índice de cristalinidade, foram preparadas diferentes misturas de materiais celulósicas. Elas continham celulose cristalina (Celulose D microcristalina para cromatografia de camada fina – Vetec, lote 032356) e celulose amorfa (carboximetilcelulose (alta viscosidade) – Sigma, lote 12K0060) contendo 100%, 80%, 60%, 40%, 20% e 0% da fração mássica correspondendo a celulose cristalina na mistura. Essa mistura foi submetida à análise de cristalinidade pelo método de difração de raios-X e seus índices de cristalinidade foram obtidos conforme indica o ítem 5.3.3 e comparados entre si.

5.3. Estudos em pré-tratados de Avicel PH-101

5.3.1. Pré-tratamento de Avicel por moinho de bolas

O material foi amorfizado adaptando a técnica de (da Silva *et al.*, 2010) e foi executado no laboratório BIOETANOL/IQ/UFRJ e o material foi obtido nas seguintes condições. 5 gramas de Avicel PH-101 (Seção 2.2) Sigma[®], lote #BCBN0933V foram moídos a 400 rpm em cada estação de moagem em aparelho Restch[®] PM 400. A amostra foi disposta em cadinho de óxido de zircônio Restch[®], lote 01.436.0219 de 250 mL contendo 50 esferas de mesmo material, lote 05.368.0096 de 10 mm de diâmetro. Procedeu-se a moagem do material por 2:30 h em intervalos de 10 minutos de operação espaçados por 10 minutos de descanso, totalizando 5:00 h de operação.

5.3.1.1. Preparação para caracterizações físicas estruturais do substrato pré-tratado por moinho de bolas

O substrato foi submetido à lavagem sequencial e troca de solvente antes de terem suas áreas determinadas (Svensson *et al.*, 2013) para preservar a integridade do material (Pönni *et al.*, 2013; Jiang & Hiseh, 2014), evitando o fenômeno denominado “hornificação” (Luo *et al.*, 2011). Foi colocado o substrato em tubo de centrifuga do tipo falcon em razão amostra:solvente igual a 1:5. A cada regime de lavagem a amostra foi agitada em vortex e, em seguida, foi feito um repouso de 15 min. A cada três trocas, o material permaneceu por um dia em bancada. Foram trocados os solventes das amostras na seguinte ordem como segue a Tabela 3. Após a troca de solventes, as amostras foram submersas em nitrogênio líquido e liofilizadas em liofilizador Liotop[®], modelo K105 e armazenadas em dessecador até serem feitas análises subsequentes.

Tabela 3 – Regime de lavagem e troca de solvente submetido ao material lignocelulósico

Troca	Solvente	Número de lavagens	Especificação
1	Águamilli-Q	3	-----
2	Águamilli-Q	3	-----
3	Etanol 95%	2	Alcool Etílico 95%, Vetec, lote 110947
	EtanolAnidro	1	Alcool Etílico Absoluto, Vetec, lote 1203249
4	EtanolAnidro	3	Alcool Etílico Absoluto, Vetec, lote 1203249
5*	Acetona	6	Acetona PA ACS, Vetec lote 1004274
6	Pentano	3	n-Pentano, TEDIA, lote 803012
7	Pentano	3	n-Pentano, TEDIA, lote 803012

*a amostra foi lavada seis vezes e deixada no por três dias sobre a bancada

5.3.1.2. Análise da área por Adsorção de Nitrogênio a 77K pelo método de Brunauer, Emmet e Taller – BET da celulose pré-tratada por moinho de bolas.

Cerca de 200 mg de celulose foi submetida a atmosfera a vácuo a 60°C durante 16h para dessorção da água residual. Após essa etapa, varreu-se a janela de pressão relativa (P/P_0) até 0,3 em aparelho Micromeritics® ASAP 2020 do laboratório NUCAT (PEQ/COPPE/UFRJ). A determinação da área superficial específica foi feita pela aplicação do modelo de adsorção de Brunauer, Emmett e Teller (B.E.T.) sobre os dados experimentais. A pesagem do sistema foi feita em quadruplicata.

5.3.2. Pré-tratamento de Avicel por líquido iônico ([EMIM][OAc])

O material amorfizado por essa técnica, foi oriundo do laboratório de Biocatálise do INT e obtido em diferentes blocos experimentais (Tabela 4). Em banho de glicerina previamente aquecido na temperatura de tratamento desejada, foi imerso um balão de

50 mL contendo quantidade mássica de ([EMIM][OAc]) (acetato de 1-etil-3-metilimidazólio) Iolitec[®], lote N00652.1-IL-0189 contendo $0,200 \pm 0,002$ g de Avicel PH-101 Sigma[®], lote #BCBN0933V. O sistema foi mantido sob agitação magnética por tempo de incubação variável em placa Fisatom[®], modelo 752A. O sistema experimental foi tampado com um chapéu cônico de vidro em cuja base foi colocado algodão hidrofílico sustentando uma coluna de $\sim 3,0$ cm de cloreto de cálcio. Algodão hidrofóbico foi colocado no orifício superior para fechá-lo. Após contabilizado o tempo de tratamento, interrompeu-se a reação adicionando-se no balão 10 mL de água milli-Q e submeteu-se o sistema em banho maria em temperatura ambiente por 10 minutos. Agitou-se o sistema com agitação magnética durante o resfriamento para otimizar a extração do líquido iônico da matriz inchada. Em seguida, filtrou-se a suspensão a vácuo através uma membrana de fibra de vidro Schleicher & Schuell GF 52-C, lote 514. Recolheu-se o líquido iônico filtrado. Adicionou-se no Avicel retido, 500 mL de água milli-Q, pressionando o material pré-tratado contra as paredes e o fundo do suporte de filtração com um bastão de vidro. Transferiu-se o material pré-tratado para um falcon de 15 mL no qual adicionou-se ~ 10 mL de água milli-Q. Agitou-se e pressionou-se o material pré-tratado junto as paredes do frasco para extrair mais resíduo de líquido iônico. Particulados e placas de Avicel não dissolvidas no pré-tratamento foram desmembradas em Ultra Turrex IKA[®] T18 acoplado com elemento dispersor S18N – 19 G operando a 8000 rpm. Centrifugou-se a suspensão aquosa com material pré-tratado a 2414g em centrífuga Cientec[®] CT-6000R ou Eppendorf[®] 5810-R (12.000 rpm) por 10 min a 20°C. Repetiu-se essa etapa de lavagem e centrifugação até o desaparecimento do odor característico de ([EMIM][OAc]) junto ao pré-tratado.

Tabela 4 – Condições de pré-tratamento de Avicel por ([EMIM][OAc])

	Massa Avicel PH -101 (g)	Massa ([EMIM][OAc]) (g)	Massa total de Avicel tratada (g)	Ímã	Temp. (°C)	Tempo de pré-tratamento (min)
Série 1	0,2 ± 0,01	2,00 ± 0,02	0,4	Neodímio coberto com fita de PTFE	120	10; 20; 40; 60; 80; 100; 120
Série 2	0,2 ± 0,01	4,00 ± 0,01	4,0	Fisatom® 9 x 25 mm	120	10; 30; 120
Série 3	0,2 ± 0,01	4,00 ± 0,01	4,0	(cód.190.223)	90	10

5.3.2.1. Preparação para caracterizações físicas estruturais do substrato pré-tratado por ([EMIM][OAc]).

Após o pré-tratamento, procedeu-se a troca de solvente dos substratos em tubo falcon de 15 mL, adicionando 5 mL de álcool tert-butílico TEDIA® lote 111216R para cada ciclo de troca. Após a adição, vorticou-se o tubo e centrifugou-se o seu conteúdo, com velocidade igual ou superior a 3273 g por 10 min a 20°C em centrífuga Hettich® modelo ROTINA 380R ou em centrífuga Beckman Coulter® modelo Allegra X-14R. Repetiu-se o procedimento por 7 vezes para a exclusão da água da solução. Congelaram-se as amostras com o uso de nitrogênio líquido antes de submete-las ao liofilizador K105, Liotop® por 24 h.

5.3.3. Caracterizações estruturais em ambos os pré-tratados de Avicel PH-101

5.3.3.1. Análise de difração de raios-X – DRX – Adaptado de (de Oliveira Mouta, 2013).

A cristalinidade das fibras de celulose foi avaliada por difração de Raio X utilizando um difratômetro Rigaku® miniflex com radiação $K\alpha$ ($\lambda = 0.1542$ nm) usando monocromador a 30 KV de voltagem e 15 mA de corrente elétrica, divergência variável, espalhamento de $4,2^\circ$, com passo de $0,05^\circ$ e velocidade de varredura de $2^\circ/\text{min}$, ângulo 2θ em uma janela de leitura de 10 a 50° . O índice de cristalinidade (IC) foi calculado por diferentes metodologias. Através do método de Segal *et al.* 1959, o índice foi obtido considerando a intensidade do pico do plano 002 ($I_{002,2\theta = 22.5^\circ}$) e a intensidade do ponto de menor leitura referente à estrutura amorfa ($I_{am, 2\theta = 18.5^\circ}$) entre os picos dos planos 002 e 101, de acordo com a equação:

$$IC = \left(\frac{I_{002} - I_{am}}{I_{002}} \right) \times 100 \quad [12]$$

Através do método de deconvolução, foram analisados os dados entre 10° e 40° dos quais foram descontados uma linha de base linear desde o primeiro e o último dos dados. Foram considerados os índices de Miller $1\bar{1}0$ ($\sim 14,88^\circ$), 110 ($\sim 16,68^\circ$) e 020 ($\sim 23,00^\circ$) (French, 2014), referentes aos planos de difração para a célula unitária de celulose cristalina do tipo 1β . Quando analisando a cristalinidade da celulose II, foram considerados os índices de Miller $1\bar{1}0$ ($\sim 12,30^\circ$), 110 ($\sim 20,00^\circ$) e 020 ($\sim 22,10^\circ$) (French, 2014). Nesses ângulos eram alinhadas as médias das gaussianas e essa gaussiana apresentaria a área do sinal obtido no software Peakfit® v4.12. A distribuição correspondendo à celulose amorfa foi escolhida como àquela de maior intensidade e largura que melhor ajustava abaixo do pico correspondente ao plano de 020. O índice de cristalinidade por esse método para a celulose do tipo 1β e II foi calculado pela expressão (Terinte *et al.*, 2011):

$$IC = \frac{\{int(1\bar{1}0) + int(110) + int(020)\}}{\{int(1\bar{1}0) + int(110) + int(020) + int(amorfa)\}} \quad [13]$$

Pela técnica de Ruland–Vonk de subtração do conteúdo amorfo, foi subtraída uma linha de base de spline cúbica nos dados tomando os valores mais no extremo dos ângulos medidos como base para construção da curva amorfa e cristalina no software MDI Jade® 5. Somadas as áreas das curvas, o índice de cristalinidade foi calculado pela expressão (Thygesen *et al.*, 2005):

$$IC = \frac{\int_{S_0}^{S_p} I_{CR}(s) \cdot s^2 ds}{\int_{S_0}^{S_p} I(s) \cdot s^2 ds} \quad [14]$$

Onde $I(s)$ consistiu na intensidade referente à soma das contribuições $I_{CR}(s)$, cristalina e $I_{AM}(s)$, amorfa da celulose. S_p consistiu no limite inferior do ângulo analisado e S_0 consistiu no limite inferior do ângulo analisado.

5.3.3.2. Fisissorção de Nitrogênio a 77K e análise da área por pelo método de Brunauer, Emmet e Taller – BET da celulose pré-tratada por ([EMIM][OAc]).

~200 mg de celulose foi submetida a 60°C durante 16h para dessorção da água residual. Após essa etapa, varreu-se a janela de pressão relativa (P/P_0) até 0,3 em aparelho Micromeritics® ASAP 2020 do laboratório NUCAT (PEQ/COPPE/UFRJ) ou Laboratório de Caracterização de Materiais (DICAP/INT). A determinação da área superficial específica foi feita pela aplicação do modelo de adsorção de Brunauer, Emmett e Teller (B.E.T.) sobre os dados experimentais. A pesagem do sistema foi feita em quadruplicata. ~20 mg de celulose foi submetida às mesmas condições de preparação de amostra e leitura quando analisada pelo equipamento Quantachrome® NOVA-e 4200®.

5.3.3.3. Análise estrutural e morfológica por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura foi realizada em diferentes amostras com diferentes aparelhos. Os pré-tratados por ([EMIM][OAc]) na etapa de correlação estrutural (Tabela 4 – Série 1), tiveram suas imagens obtidas em microscópio FEI Quanta[®] 200 (FEI[®] Company) (PAM/PEQ/COPPE/UFRJ). Os materiais foram aderidos em fita de carbono dupla face e metalizados com ouro através de sublimação em Metalizador Quorum Q150R ES e analisadas com aumento de 50.000x usando detector ETD (Everhart-Thornley SE detector). As amostras foram observadas com o uso de uma voltagem de aceleração entre 20 e 30 KV e corrente não especificada. A distância de trabalho foi de aproximadamente 7,2 a 8,3 mm. As demais amostras foram analisadas em microscópio Helios[®] Nanolab DualBeam[®] G3 CX microscope (FEI[®] Company) (CENANO/INT). As amostras foram aderidas a uma fita adesiva de carbono de dupla face afixada em um porta-amostra de alumínio e recobertas com platino metalizador Emitech[®] K550X plasma coater usando corrente de 20 mA por 2,5 min, resultando numa taxa de deposição de platina superficial de 4 nm/min. A platina foi escolhida por gerar grãos suavemente distribuídos sobre a amostra, aumentando a qualidade da imagem obtida. Elas foram observadas com o uso de uma voltagem de aceleração de 10 KV e 1 pA distância de trabalho de aproximadamente 4 nm a 10 mm, usando detector TLD (*through-lens detector*). Foram obtidas amostras no modo “field free” ao gerar imagens em aumento de 2500 x e modo de imersão para gerar imagens a 100000 x.

5.3.3.4. Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)

Cerca de 0,15 g de material celulósico foi adicionado em água destilada sob agitação de 750 rpm até fornecer 15% de obscurecimento da suspensão à um feixe de laser vermelho (He-Ne) e azul (iluminação de estado sólido). 3 leituras foram feitas em aparelho Malvern[®] Mastersizer 2000[®] acoplado com unidade de dispersão Hydro 2000 S (A)[®]. Os resultados foram analisados pelo software Malvern[®] Mastersizer 2000[®] V. 5.61 utilizando o modelo de espalhamento de Mie (Bohren & Huffman, 1983), que relaciona o o ângulo de luz espalhada com o tamanho de partícula. Para o cálculo da área superficial, foi considerada a área de partículas esféricas de diferentes tamanhos, preditos pela sua

distribuição. As análises foram feitas no laboratório Engepol, do Programa de Engenharia Química da COPPE.

5.3.4. Hidrólise em pré-tratados de Avicel PH-101

5.3.4.1. Hidrólise de Avicel PH-101 pré-tratado por moínho de bolas e líquido iônico ([EMIM][OAC])

A hidrólise de Avicel pré-tratado por moinho de bolas foi feita utilizando de extrato Celluclast 1.5L de *Hypocrea jecorina* (Cellulase from *Trichoderma reesei* ATCC 26921) Sigma[®], lote SLB P6225V suplementado por extrato de *Aspergillus niger* (Novozymes[®] N188 – NS 22118), fabricado por Novozymes[®], batelada DCN 00216. As reações de hidrólise foram feitas volume de 15 mL, em frascos Erlenmeyer de 50 mL contendo tampão citrato de sódio 0,05 mol.L⁻¹, pH 4.8. A temperatura de hidrólise foi controlada a 50°C e agitação mantida em 300 rpm no aparelho G24 Enviromental Incubator Shaker, New Brunswick Scientific[®]. Foi utilizada uma carga de sólidos de 2% (m/v) e carga de enzimas de 10 FPU.g⁻¹ de celulose.

5.3.4.2. Hidrólise de avicel pré-tratado por moinho de bolas para investigação de alteração do padrão cristalino

A hidrólise de Avicel pré-tratado por moinho de bolas foi feita utilizando de extrato de *Hypocrea jecorina* – Cellulase from *Trichoderma reesei* ATCC 26921Sigma[®], lote SLB P6225V ou extrato laboratorial de *Trichoderma reesei*RUT C30, ambos suplementados por extrato contendo atividade β-glicosidase de *Aspergillus awamori*. Os extratos laboratoriais foram obtidos no laboratório Bioetanol. As reações de hidrólise foram feitas em volume total de 30 mL, em frascos Erlenmeyer de 100 mL contendo tampão citrato de sódio 0,05 mol.L⁻¹, pH 4.8, temperatura de 50°C e agitação a 170 rpm em aparelho G24 Enviromental Incubator Shaker, New Brunswick Scientific[®]. Foi utilizada uma carga de sólidos de 10% (m/v) e carga de enzimas de 10 FPU.g⁻¹ de celulose,

e razão de FPU:BGU de 1,00:2,00. Uma alíquota foi recolhida para análise e diluída em água milli-Q nos tempos de hidrólise de 1, 4, 6, 9, 12, 24 e 48h.

5.4. Modelagem matemática

5.4.1. Simulação de modelos adaptados para descrever diferentes componentes e rotas reacionais

Adaptou-se o modelo de Tsai *et al.*, (2014), derivado de Kadam *et al.*, (2004) (Figura 20) para observar sua descrição das principais características do sistema bioquímico em questão. Duas adaptações foram estudadas a partir da modificação do modelo da literatura, e as simulações usaram parâmetros modificados desses trabalho para acompanhar as variáveis de estado (Seções 5.4.2 0). Em cada uma das modificações era pretendido analisar uma característica em particular do fenômeno físico-químico que o modelo-base era incapaz de retratar. Foram feitas alterações que permitissem uma descrição mais precisa do sistema experimental da hidrólise de Avicel PH-101 e enzimas celulases presentes nos extratos de Celluclast 1.5L e Novozymes 188. Também, desejou-se que o modelo capturasse as influências das características do substrato: área superficial e cristalinidade na degradação da celulose por essas enzimas.

5.4.2. Caso 1: Adaptação do modelo de Tsai *et al.*, (2014) para celulose em uma fase, sorção enzimática transiente, inativação celulásica e sistema de equações diferencial

O modelo de Tsai *et al.* (2014) possui descrição algébrico-diferencial das reações de hidrólise de celulose. Nesses modelos, as equações algébricas descreviam o balanço mássico de enzima no sistema. Na proposta original de Tsai *et al.*, (2014), cada uma das enzimas possuía diferentes capacidades adsorptivas, porém as adsorções não admitiam a influencia da área superficial dos substratos. Sua proposta incluía a concepção da celulose em apenas uma fase, além de representar duas espécies enzimáticas envolvidas no

processo hidrolítico. O sistema era constituído pelo conjunto de reações de Kadam *et al.* (2004), incluindo a presença da “reatividade do substrato” como parâmetro relacionado à taxa reacional. O modelo de Tsai *et al.*, (2014) incluiu reações de formação de celotriose e celotetralose a partir de glicose e celobiose. Essa adaptação explicava, em parte, rendimentos abaixo do esperado em condições de altas concentrações de glicose no sistema, frequentemente ocasionada pela alta carga de sólidos no sistema em situações de alta conversão do substrato. Além disso, esse modelo concebia a inibição das enzimas por glicose, celobiose e xilose. As reações do modelo original também compreendiam a formação de glicose a partir da lise da celulose mediada por celulases em uma única etapa, tal qual Angarita, (2014) e Kadam *et al.*, (2004).

A adaptação desse modelo, objetivou manter as três reações do modelo original (Figura 22): a conversão da celulose no intermediário celobiose (r_1^*), a conversão direta da celulose no produto da rota glicose (r_2^*) e finalmente a conversão do intermediário celobiose em glicose (r_3), excluindo as reações formação de celotriose e celotetralose. A celulose permaneceu com uma fase apenas. Nesse caso, foram mantidas na descrição duas enzimas com diferentes propriedades. Uma com atividade celulásica, derivada do extrato de Celluclast 1.5L (CelC) e outra celobiásica, que é derivada em grande parte do extrato de Novozymes N188 (N188) (Figura 22). A reação de degradação de celulose (r_1^*) foi mediada pela enzima celulase (CelC) adsorvida junto à sua superfície (EbCelC); (r_2^*) mediada pela conjugação das enzima celulase e β -glicosidase (CelC + N188) adsorvidas na superfície (EbCelC + EfN188), enquanto a reação de conversão de celobiose era mediada pela enzima β -glicosidase (N188) não adsorvida (EfN188). Manteve-se a descrição de inibição das enzimas por glicose e celobiose, mostrado pelas linhas pontilhadas da rota reacional. Foram modificadas as notações das reações de adsorção de celulase em celulose (r_4^*), adsorção de β -glicosidase em celulose (r_5^*) em versão diferencial. Foram acrescentadas as reações de dessorção de celulase em celulose (r_6^*), e sua inibição uma vez adsorvida em celulose (r_7^*). Finalmente, foi adicionada a reação de dessorção da β -glicosidase da celulose (r_8^*).

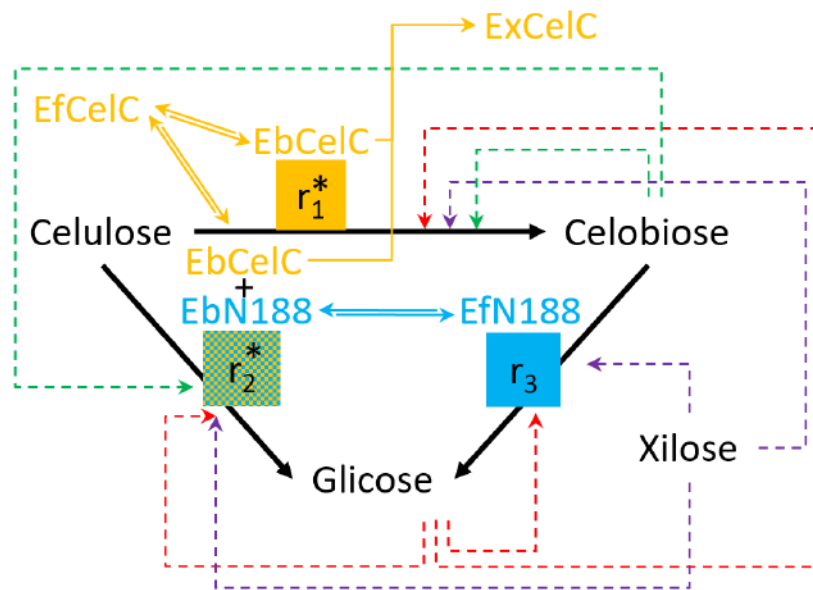


Figura 22 – Rota reacional do modelo cinético de Tsai *et al*, (2014) adaptado e concebendo a celulose em uma fase e conversão direta da celulose em glicose. As reações envolvendo as enzimas estão representadas em amarelo e azul. As setas pontilhadas indicam as inibições pelo intermediário e produto reacional. EfCelC = Celulase livre; EfN188 = β -glicosidase livre; EbCelC = Celulase adsorvida; EbN188 = β -glicosidase adsorvida; ExCelC = Celulase inibida;

As hipóteses simplificadoras do sistema físico-químico admitidas para a construção do modelo, foram:

Gerais

1. As reações são elementares e irreversíveis, exceto para a adsorção e dessorção das enzimas;
2. O processo é isotérmico;
3. O sistema é pseudo-homogêneo. As variáveis de estado não se alteram com as coordenadas espaciais;
4. A conversão de celulose em celobiose segue uma cinética heterogênea a partir de isotermas de adsorção das pseudoenzimas;
5. A conversão de celobiose em glicose segue uma cinética do tipo Michaelis-Menten;
6. A reação de hidrólise de celulose por celobiohidrolases e β -glicosidasas em glicose não é desprezível;
7. A celulase pode ser inativada uma vez adsorvida em celulose;

Acerca da enzima:

8. Duas enzimas passíveis de adsorção, contendo atividades celulásicas e celobiásicas foram consideradas na construção do modelo. A enzima celulase adsorvida contém atividade celulásica e a enzima β -glicosidase não adsorvida contém a atividade beta-glicosidásica;
9. Foram desconsiderados os efeitos de sinergia entre as enzimas acessórias na taxa de hidrólise enzimática. Portanto, são desconsiderados os efeitos de proteínas acessórias no processo de hidrólise enzimática, como expansinas e de enzimas monooxigenases, lignases, pectinases, dentre outras tantas;
10. Considerou-se a velocidade enzimática das enzimas com atividade celulásica como sendo aquela correspondente à quantidade de enzima adsorvida no substrato (Ooshima *et al.*, 1990, apud Angarita Martinez, 2014) e a velocidade enzimática das enzimas celobiásicas como aquela correspondente à quantidade de enzima não adsorvida no substrato;
11. Considerou-se que as enzimas adsorvem diferentemente na celulose para a mesma base mássica, sem sofrer influência da área superficial do substrato;
12. Não existe perda de atividade enzimática por razões outras que não seja pelas inibições causada por celobiose, glicose e xilose;
13. A enzima que se desorve do substrato em decorrência do avanço da reação, não apresenta atividade, exceto para β -glicosidase .

Acerca do substrato

14. Considerou-se que o substrato é constituído por celulose em uma única fase;
15. Considera-se que o material celulósico apresenta porosidade, porém são desconsiderados efeitos de transferência de massa como relacionados à etapa limitante da reação;
16. Considera-se que a reatividade da celulose é igual em toda sua composição;
17. Considera-se que a degradação da celulose origina celobiose ou glicose, a depender da reação catalisada;
18. A adsorção das enzimas é uniforme dentro da estrutura do substrato;
19. A reatividade do substrato é um parâmetro que influencia na taxa reacional e não tem relação com as características físicas dos substratos;

Tendo em vista o conjunto de hipóteses que sustenta o modelo, as equações foram expostas na Tabela 5:

Tabela 5 – Modelo cinético de hidrólise enzimática adaptado de Tsai *et al.* (2014) para celulose em uma fase, duas enzimas e conversão direta de celulose a glicose

Equações de taxa (dedução no Anexo II)		
Conversão da celulose (S) em celobiose (G2) com inibição competitiva por glicose (G) celobiose (G2) e xilose (X)	$r_1^* = \frac{K_{1r}^* * E_{bCelC} * R_S * S}{1 + \frac{G2}{K_{1G2}^*} + \frac{G}{K_{1G}^*} + \frac{X}{K_{1X}^*}}$	[15]
Conversão da celulose (S) em glicose (G2) com inibição competitiva por glicose (G) e celobiose (G2) e xilose (X)	$r_2^* = \frac{K_{2r}^* * (E_{bCelC} + E_{bN188}) * R_S * S}{1 + \frac{G2}{K_{2G2}^*} + \frac{G}{K_{2G}^*} + \frac{X}{K_{2X}^*}}$	[16]
Conversão da celobiose (G2) a glicose (G) com inibição competitiva por glicose (G) celobiose (G2) e xilose (X)	$r_3 = \frac{K_{3r} * E_{fN188} * G2}{K_{3M} * \left(1 + \frac{G}{K_{3G}} + \frac{X}{K_{3X}}\right) + G2}$	[17]
Isoterma de adsorção da enzima celulase (EbCelC)	$r_4^* = \frac{K_{aCelC} * E_{maxCelC} * E_{fCelC} * S}{1 + K_{aCelC} * E_{fCelC}}$	[18]
Isoterma de adsorção da enzima β -glicosidase (EbN188)	$r_5^* = \frac{K_{aN188} * E_{maxN188} * E_{fN188} * S}{1 + K_{aN188} * E_{fN188}}$	[19]
Dessorção da enzima celulase (EfCelC)	$r_6^* = K_{6r}^* * E_{bCelC}$	[20]
Inibição da enzima celulase (ExCelC)	$r_7^* = K_{7r}^* * E_{bCelC}$	[21]
Dessorção da enzima β -glicosidase (EfN188)	$r_8^* = K_{8r}^* * E_{bN188}$	[22]
Balances de massa		
Enzima celulase livre	$\frac{dE_{fCelC}}{dt} = -r_4^* + r_6^*$	[23]

$$\begin{array}{l} \text{Enzima } \beta\text{-glicosidase} \\ \text{livre} \end{array} \quad \frac{dE_{fN188}}{dt} = -r_5^* + r_8^* \quad [24]$$

$$\begin{array}{l} \text{Enzima celulase} \\ \text{adsorvida} \end{array} \quad \frac{dE_{bcCelC}}{dt} = +r_4^* - r_6^* - r_7^* \quad [25]$$

$$\begin{array}{l} \text{Enzima } \beta\text{-glicosidase} \\ \text{adsorvida} \end{array} \quad \frac{dE_{bN188}}{dt} = +r_5^* - r_8^* \quad [26]$$

$$\begin{array}{l} \text{Enzima celulase} \\ \text{inibida} \end{array} \quad \frac{dE_{xCelC}}{dt} = -r_7^* \quad [27]$$

$$\begin{array}{l} \text{Celulose amorfa} \end{array} \quad \frac{dS}{dt} = -r_1^* - r_2^* \quad [28]$$

$$\begin{array}{l} \text{Celobiose} \end{array} \quad \frac{dG2}{dt} = (1,056 * r_1^*) - r_3 \quad [29]$$

$$\begin{array}{l} \text{Glicose} \end{array} \quad \frac{dG}{dt} = 1,111 * r_2^* + 1,053 * r_3 \quad [30]$$

A partir das equações de balanço de massa acima, as grandezas abaixo podem ser calculadas a partir das seguintes expressões:

$$\begin{array}{l} \text{Celulose consumida} \end{array} \quad SC = \frac{G(t)}{1,111} + \frac{G2(t)}{1,056} \quad [31]$$

$$\begin{array}{l} \text{Celulose residual} \end{array} \quad S_r = S_0 - SC \quad [32]$$

1,056 corresponde à constante de conversão de glicana contida na celulose em celobiose e glicose respectivamente. 1,053 corresponde à constante de conversão de uma unidade de glucano presente na celobiose em glicose.

5.4.3. Caso 2: Adaptação do modelo de Tsai *et al.*, (2014) para celulose em duas fases, sorção enzimática transiente dependente de área superficial do substrato, inativação celulásica e sistema de equações diferencial

Nessa seção, o modelo de Tsai (2014) foi modificado para possuir a celulose em duas fases: amorfa e cristalina. Assim, o substrato foi representado em duas fases e o modelo foi analisado quanto à presença de duas enzimas com distintas atividades no sistema, ambas elas podendo ser desorvidas e a celulase desativada quando adsorvida. Incorporou-se a influência da área superficial sobre o fenômeno adsorptivo das enzimas, o que foi explorado anteriormente (Seção 5.4.2). Também, foi eliminada a reação de conversão direta de celulose para glicose no sistema.

A adaptação desse modelo objetivou se aproximar de uma descrição mais elaborada do sistema reacional em termos de retratar mais elementos contidos no sistema real. O processo foi descrito envolvendo espécies celulósicas de celulase amorfa e cristalina, em cujas superfícies adsorvem celulases ($EbCelCa^\dagger$ e $EbCelCc1^\dagger$) (Figura 23). Essa adsorção foi descrita por uma equação diferencial de modo que o sistema de equações fosse diferencial, diferente do reportado no trabalho original de Angarita, (2014) e Tsai *et al.*, (2014). As enzimas são responsáveis por catalisando a reação de hidrólise de celulose amorfa (r_1^\dagger) e cristalina (r_2^\dagger) em celobiose. O intermediário celobiose, por sua vez, é sujeito a ação de enzimas β -glicosidase em fase aquosa ($EfN188^\dagger$) que catalisa a reação de hidrólise de celobiose a glicose (r_3^\dagger). A retirada da reação direta de conversão de celulose para glicose, porém, incorreria em suposta simplificação. Todavia, tem sido mostrado que celobiohidrolases convertem celulose a glicose clivando o polímero em dissacarídeos (Payne *et al.*, 2015). Uma vez que o Avicel PH-101 consiste em celulose em quase sua totalidade, foram excluídas as inibições causadas por xilose, restando apenas celobiose e glicose.

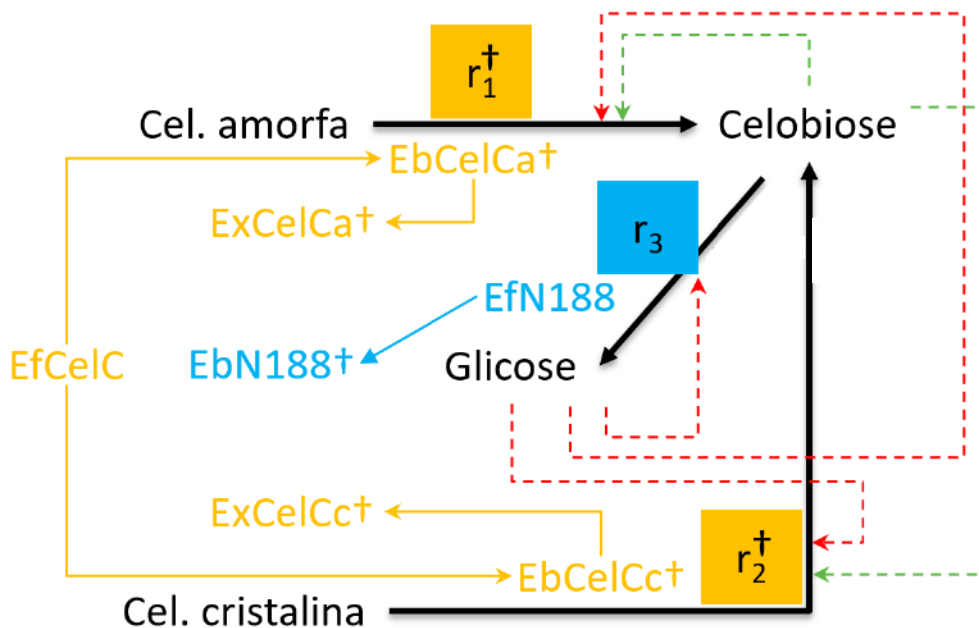


Figura 23 – Rota reacional do modelo cinético de Tsai *et al.*, (2014) adaptado para dois substratos e duas enzimas. As reações envolvendo as enzimas consideradas estão representadas em amarelo e azul. As setas pontilhadas indicam as inibições pelo intermediário e produto reacional. EfCelC = Celulase livre; EfN188 = B-glicosidase livre; EbCelCa[†] = Celulase adsorvida em celulose amorfa; EbCelCc[†] = Celulase adsorvida em celulose cristalina; EbN188[†] = B-glicosidase adsorvida; ExCelCa[†] = Celulase inibida em celulose amorfa; ExCelCc[†] = Celulase inibida em celulose cristalina;

As hipóteses simplificadoras adicionais com relação ao caso 1 (Seção 5.4.2) e que foram admitidas nessa construção, foram:

Acerca da enzima:

8. Duas enzimas são passíveis de adsorção, contendo atividades celulásicas e celobiásicas foram consideradas na construção do modelo. A enzima celulase adsorvida contém atividade celulásica e a enzima β-glicosidase não adsorvida contém a atividade beta-glicosidásica.
10. Considerou-se e a velocidade enzimática das enzimas com atividade celulásica como sendo aquela correspondente à quantidade de enzima adsorvida no substrato (Ooshima *et al.*, 1990, apud Angarita Martinez, 2014) e a velocidade enzimática das enzimas celobiásicas como aquela correspondente à quantidade de enzima não adsorvida no substrato

11. Considerou-se que as diferentes enzimas adsorvem na celulose amorfa, e celulose cristalina com vistas a área superficial de cada uma das frações;
13. A enzima celulase que se desorve do substrato em decorrência do avanço da reação não apresenta atividade. A β -glicosidase tem sua atividade anulada quando adsorvida em celulose.

Acerca do substrato

As hipóteses do modelo foram consideradas para a notação das equações que regeriam o processo (Tabela 6).

Tabela 6 – Modelo cinético de hidrólise enzimática adaptado de Angarita *et al.*, 2014 para duas enzimas e celulose em duas fases

Adsorção da enzima (dedução no Anexo I)

Isoterma de adsorção da enzima β -glicosidase (EbN188[†]) $E_{bN188}^{\dagger} = \frac{K_{aN188}^{\dagger} * E_{maxN188}^{\dagger} * E_{fN188} * (S_a + S_{c1})}{1 + K_{aN188}^{\dagger} * E_{fN188}}$ [33]

Equações de taxa (dedução no Anexo II)

Conversão da celulose amorfa (S_a) em celobiose (G2) com inibição competitiva por glicose (G), celobiose (G2) e xilose (X) $r_1^{\dagger} = \frac{K_{1r}^{\dagger} * E_{bCelCa}^{\dagger} * S_a}{1 + \frac{G}{K_{1G2}^{\dagger}} + \frac{G}{K_{1G}^{\dagger}} + \frac{X}{K_{1IX}^{\dagger}}}$ [34]

Conversão da celulose cristalina (S_c) em celobiose (G2) com inibição competitiva por glicose (G), celobiose (G2) e xilose (X) $r_2^{\dagger} = \frac{K_{2r}^{\dagger} * E_{bCelCc1}^{\dagger} * S_{c1}}{1 + \frac{G}{K_{2IG2}^{\dagger}} + \frac{G}{K_{2IG}^{\dagger}} + \frac{X}{K_{2IX}^{\dagger}}}$ [35]

Conversão da celobiose (G2) a glicose (G) com inibição competitiva por glicose (G), celobiose (G2) e xilose (X) $r_3 = \frac{K_{3r} * E_{fN188}^{\dagger} * G2}{K_{3M} * \left(1 + \frac{G}{K_{3IG}^{\dagger}} + \frac{X}{K_{3IX}^{\dagger}}\right) + G2}$ [36]

Isoterma de adsorção da enzima
celulase em celulose amorfa
(EbCelCa[†])

$$r_4 = \frac{K_{aCelCa}^{\dagger} * E_{maxCelCa}^{\dagger} * E_{fCelC} * S_a * A_a}{1 + K_{aCelCa}^{\dagger} * E_{fCelC}} \quad [37]$$

Inibição da enzima celulase adsorvida
sobre celulose cristalina (EbCelCc1)

$$r_5 = K_{5r}^{\dagger} * E_{bCelCc1}^{\dagger} \quad [38]$$

Isoterma de adsorção da enzima
celulase em celulose cristalina
(EbCelCc1[†])

$$r_6 = \frac{K_{aCelCc1}^{\dagger} * E_{maxCelCc1}^{\dagger} * E_{fCelC} * S_{c1} * A_{c1}}{1 + K_{aCelCc1}^{\dagger} * E_{fCelC}} \quad [39]$$

Inibição da celulase adsorvida sobre
celulose amorfa (EbCelCa)

$$r_7 = K_{7r}^{\dagger} * E_{bCelCa}^{\dagger} \quad [40]$$

Dessorção da celulase adsorvida
sobre celulose cristalina (EbCelCc1)

$$r_8 = K_{8r}^{\dagger} * E_{bCelCc1}^{\dagger} \quad [41]$$

Dessorção da celulase adsorvida
sobre celulose amorfa (EbCelCa)

$$r_9 = K_{9r}^{\dagger} * E_{bCelCa}^{\dagger} \quad [42]$$

Balanços de massa

Enzima celulase livre

$$\frac{dE_{fCelC}}{dt} = -r_4^{\dagger} - r_6^{\dagger} + r_8^{\dagger} + r_9^{\dagger} \quad [43]$$

Enzima β-glicosidase
livre

$$\frac{dE_{fN188}}{dt} = -E_{bN188}^{\dagger} \quad [44]$$

Enzima celulase
adsorvida sobre celulose
cristalina

$$\frac{dE_{bCelCc1}}{dt} = +r_4^{\dagger} - r_5^{\dagger} - r_9^{\dagger} \quad [45]$$

Enzima celulase
adsorvida sobre celulose
amorfa

$$\frac{dE_{bCelCa}}{dt} = +r_6^{\dagger} - r_7^{\dagger} - r_8^{\dagger} \quad [46]$$

Enzima celulase inibida
sobre celulose cristalina

$$\frac{dE_{xcelCc1}}{dt} = r_5^{\dagger} \quad [47]$$

$$\begin{array}{l} \text{Enzima celulase inibida} \\ \text{sobre celulose amorfa} \end{array} \quad \frac{dE_{xCelCa}}{dt} = r_7^\dagger \quad [48]$$

$$\text{Celulose amorfa} \quad \frac{dS_a}{dt} = -r_1^\dagger \quad [49]$$

$$\text{Celulose cristalina} \quad \frac{dS_c}{dt} = -r_2^\dagger \quad [50]$$

$$\text{Celobiose} \quad \frac{dG_2}{dt} = 1,056 * (r_1^\dagger + r_2^\dagger) - r_3^\dagger \quad [51]$$

$$\text{Glicose} \quad \frac{dG}{dt} = 1,053 * r_3^\dagger \quad [52]$$

A partir das equações de balanço de massa acima, as grandezas abaixo podem ser calculadas a partir das seguintes expressões:

$$\text{Celulose consumida} \quad SC = \frac{G_{(t)}}{1,111} + \frac{G_2_{(t)}}{1,056} \quad [53]$$

$$\text{Celulose residual} \quad S_r = S_0 - SC \quad [54]$$

1,056 corresponde à constante de conversão de glicana contida na celulose em celobiose e glicose respectivamente. 1,053 corresponde à constante de conversão de uma unidade de glucano presente na celobiose em glicose.

5.4.4. Descrição do modelo

Utilizando dados experimentais da literatura e os obtidos nesta pesquisa de tese, dois modelos cinéticos de hidrólise enzimática de celulose tiveram parâmetros estimados para representar cada um conjunto de suas equações e foram analisados quanto à qualidade de seu ajuste e de seus parâmetros. Para a rodada de estimação utilizando dados experimentais da literatura, fez-se o uso do sistema descritivo do caso 1 (Seção 5.4.2). A

estimação feita combinando os dados experimentais dessa tese com os da literatura foi feita utilizando o sistema descritivo do caso 2 (Seção 5.4.3).

5.4.5. Estimação de parâmetros

A estimação de parâmetros foi dividida em duas etapas, uma para cada condição estudada com o modelo cinético. A primeira delas foi feita estudando o ajuste dos dados experimentais de Tsai *et al.* (2014) para o sistema de equações do mesmo autor adaptado para o Caso 1 (Seção 5.4.2), com substrato em uma fase, sistema diferencial, duas espécies enzimáticas apresentando adsorção não dependente da área do substrato e sorção transiente. Na segunda etapa do Caso 2 (Seção 5.4.3), utilizaram-se os mesmos dados experimentais de Tsai *et al.* (2014). Porém cada uma das frações de celulose contidas no substrato do trabalho da literatura foi calculada com base nos dados obtidos pelo índice de cristalinidade dessa tese por se tratar do mesmo Avicel. A quantidade de proteína contida nas hidrólises foi calculada a partir do volume adicionado dos extratos-fonte de enzima em cada experimento e também pela sua concentração protéica obtida pelo método de Bradford (Seção 5.1.3). O modelo do Caso 2 descreveria duas fases de celuloses, duas espécies enzimáticas cuja adsorção admitia influência da área superficial do substrato e dessorção transiente.

Os modelos desse trabalho foram implementados em ambiente MATHEMATICA[®] v.10.2.0.0. Foram minimizadas as funções objetivo de mínimos quadrados ponderados pelo inverso da variância dos dados experimentais de glicose obtidas no trabalho de Tsai *et al.* (2014). Foram utilizados os métodos de busca determinísticos de *QuasiNewton* e *Principal Axis* e estocástico de *Differential Evolution* para encontrar os mínimos da função objetivo. Alternaram-se os métodos de busca para certificar do atingimento do mínimo da função objetivo. Os parâmetros utilizados na simulação do artigo foram utilizados como chutes iniciais das diferentes estimações.

A qualidade de predição dos dados pelo modelo foi obtida por meio de análises de desvio médio global de predição, teste F de Fischer para a qualidade do desvio de predição com o desvio experimental, teste χ^2 para os erros experimentais, coeficiente de determinação do modelo para a variável predita, correlação paramétrica a partir da matriz de sensibilidade dos parâmetros, significância dos parâmetros pelo teste t e intervalo de

confiança do modelo (McDonald, 2014). Também foi analisada a qualidade do modelo pela dispersão dos resíduos, ajuste de normalidade dos mesmos para distribuição normal cumulativa com intervalos de confiança de 95% para a distribuição e teste χ^2 para a distribuição. Por fim, foram comparados os coeficientes de determinação dos dois modelos para cada caso experimental utilizado na estimação de parâmetros.

5.4.6. Resolução numérica dos modelos

Para simulação dos modelos, utilizou-se do ambiente Wolfram MATHEMATICA[®] v.10.2.0.0, e da rotina para resolução de equações algébrico-diferenciais *NDSolve* equipado com o pacote SUNDAILS (*SUite of Nonlinear and Differential/ALgebraic equation Solvers*) e o método Pantelides para a resolução, tanto das equações diferenciais quanto algébrico-diferenciais.

6. Resultados

6.1. Correlação da fração mássica e cristalinidade de substrato celulósico

Investigando o comportamento da fração cristalina de uma mistura de materiais celulósicos sobre o resultado de difração de raios-X, notou-se o incremento da intensidade da difração da mistura em resposta ao aumento da fração do material cristalino contido nela. Nesse caso, a celulose cristalina para cromatografia (Figura 24). Observou-se dois sinais na região de 15° , seguido de um ombro e um pico principal em 23° seguido de um declive e um novo pico na região de 34° , característicos de celulose I β (French, 2014).

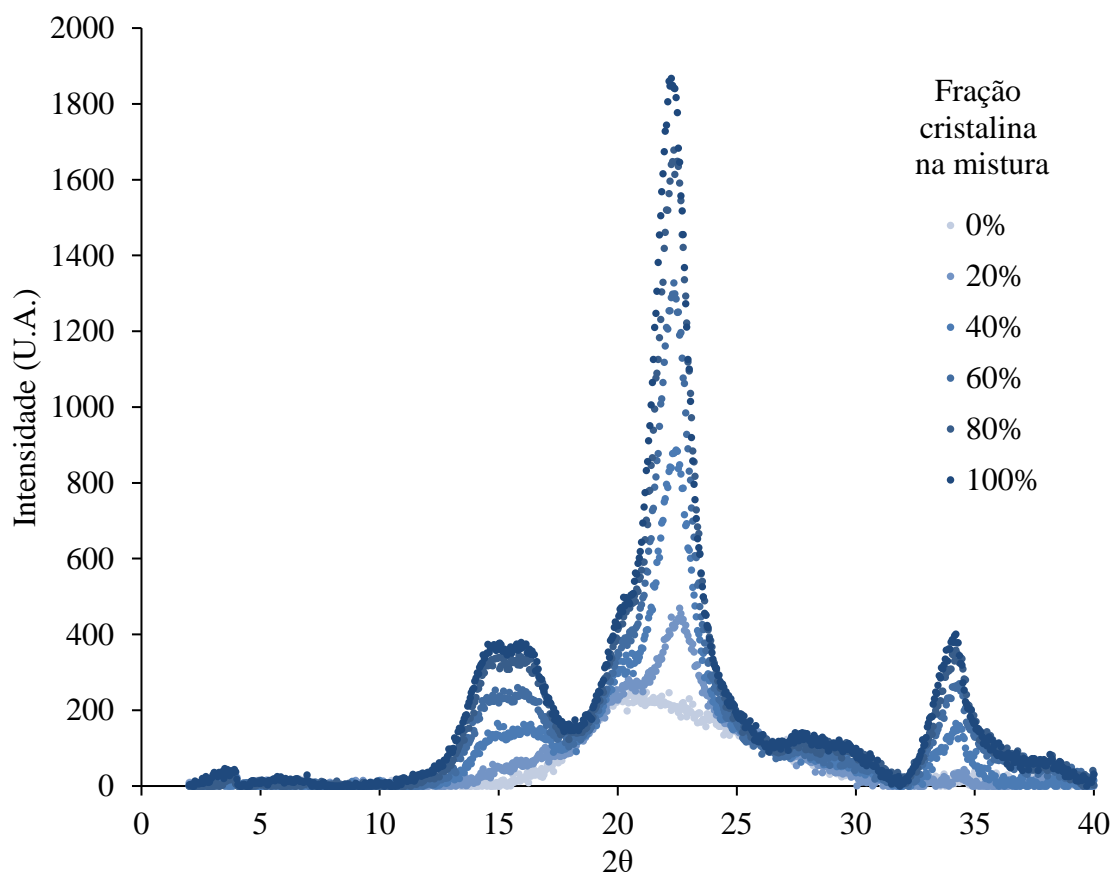


Figura 24 – Difratograma das misturas de celulose cristalina para cromatografia e carboximetilcelulose, com diferentes frações percentuais de material cristalino na mistura.

Para se determinar a melhor técnica para medir o índice de cristalinidade das amostras, foram analisados os resultados do difratograma calculando o índice de cristalinidade para diferentes técnicas (Figura 25). Verificou-se que o índice de cristalinidade calculado pelo o método de Segal (1959) apresentou aumento praticamente linear na faixa desde 0% de material cristalino na mistura até 60%. A partir desse valor, percebe-se uma inflexão nos valores obtidos. Ademais, essa técnica não apresentou o maior coeficiente de determinação linear dentre as técnicas de cálculo utilizadas. O índice de determinação do índice de cristalinidade de Segal (1959) com a fração do componente cristalino na mistura amostral foi de 0,97 para a faixa de 0% a 60% de fração do componente cristalino. Entretanto, para a faixa de 0% a 100%, usando o método de Segal (1959), o índice de determinação diminuiu para 0,8994.

Verificou-se também que o uso da técnica de Segal (1959) para os dados experimentais gerou valores de IC superestimados (Figura 25), pois o IC das amostras de 40% e 60% de constituição mássica cristalina, possuíam índice de cristalinidade superior do que 0,4 e 0,6 respectivamente. Materiais candidatos para a produção de etanol lignocelulósico, como bagaços e palhas, nativos ou pré-tratados por diversos métodos, geralmente apresentam valores de seus índices de cristalinidade variando amplamente (Revol *et al.*, 1987; Laureano-Perez *et al.*, 2005; da Silva *et al.*, 2010; Corrales *et al.*, 2012), requerendo uma metodologia robusta capaz de determinar o índice de cristalinidade para amostras com composições mássicas cristalinas as mais diversas. O uso do método de Segal (1959), portanto, não se mostra adequado, tanto pela superestimação em valores intermediários de composição mássica, quanto pela baixa linearidade do IC sobre amostras com ampla variação composicional cristalina.

Park *et al.* (2010) comparou a medida do IC pelo método de Segal, de deconvolução, de subtração do sinal amorfo e por RMN para a medição de IC em vários substratos celulósicos. O método de Segal (1959) forneceu valores quase sempre superiores aos de outras técnicas utilizadas. Todavia, mesmo apresentando incertezas, o método de Segal (1959) é utilizado em 70% a 85% dos trabalhos científicos de determinação do IC em celulosas comerciais (Barnette *et al.*, 2012). No estudo comparativo de técnicas de medição de IC utilizando Avicel pelos últimos autores, foi demonstrada superestimação dos IC para o método de Segal (1959), sobretudo na região entre 0,2 e 0,8 do índice calculado. Essa superestimação foi atribuída à utilização frequente da intensidade difratada em 18° para quantificar a contribuição amorfa, sendo

que em Avicel a intensidade do conteúdo amorfo pode estar deslocado para $\sim 19,5^\circ$. Em 18° , a intensidade encontrada para o conteúdo amorfo pode estar sobreposta com a difração de outros planos, resultando em IC superestimados (Hall *et al.*, 2010).

O IC obtido pelas técnicas de subtração do conteúdo amorfo e deconvolução dos picos, forneceram valores mais próximos das frações cristalinas presentes nas misturas amostrais, mas também apresentaram melhores índices de correlação comparado ao método de Segal (1959). O coeficiente de regressão para a técnica de subtração do conteúdo amorfo foi de 0,9622 e para a técnica de deconvolução 0,9630, em comparação com os 0,8994 do método de Segal (1959) (Figura 25). Esses melhores resultados comparativos frente ao método de Segal (1959) também foram verificados para Avicel PH-101 em trabalho de Barnette *et al.*, 2012.

Pela correlação entre fração de conteúdo cristalino e índice de cristalinidade obtida pelo método de deconvolução, é possível determinar e acompanhar as concentrações de celulose amorfa e cristalina de uma espécie durante sua reação com relativa confiabilidade: $r^2 = 0,9630$ (Figura 25). Assim, a partir da difração de raios-X e da determinação do índice de cristalinidade utilizando o método de deconvolução, seguido da determinação concentração de celulose total, pode-se saber a concentração dessas espécies em qualquer tempo reacional.

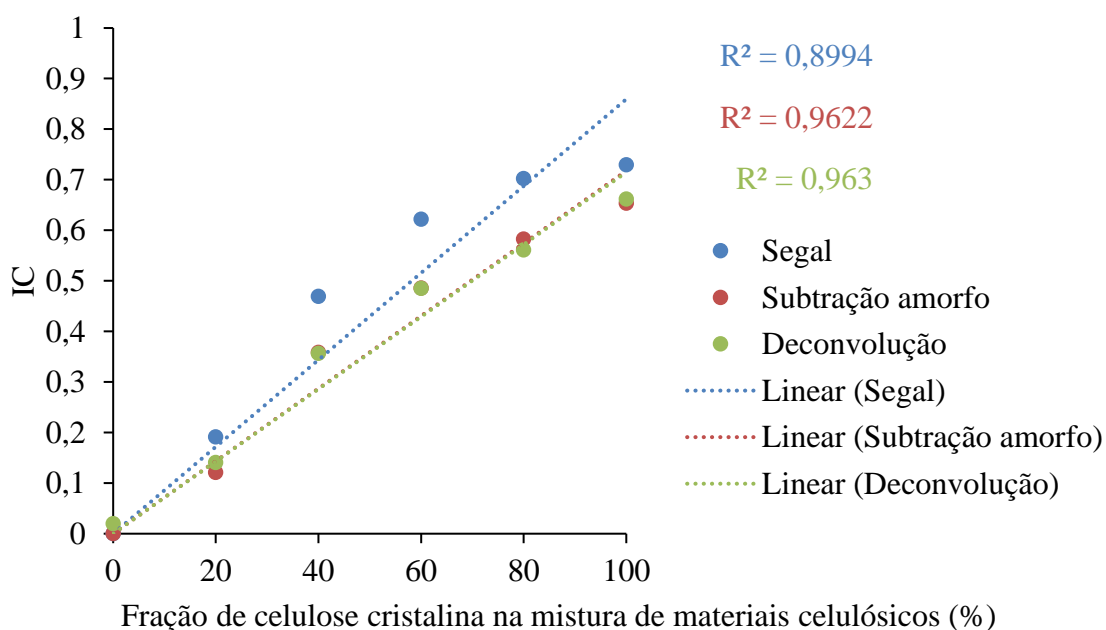


Figura 25 – Cristalinidade da mistura de celulose cristalina para cromatografia e carboximetilcelulose

Entretanto, novas metodologias devem ser desenvolvidas de modo que o índice de cristalinidade apresente valores mais acurados quando eliminando a necessidade de, por exemplo, se traçar uma linha de base ou distribuições de probabilidade na deconvolução. Percebe-se que as etapas para o processamento dos dados de difração de raios-x não são reportados com muito detalhe nos trabalhos da literatura, principalmente no que diz às linhas de base adotadas para sua realização. Assim, diferenças no processamento dos dados, podem culminar em resultados mais difíceis de se comparar entre si. Também, acredita-se que melhores metodologias de determinação da fração cristalina e amorfa surgirá da expansão do conhecimento acerca da estrutura desses componentes, como feito por Mori *et al.* (2012) para celulose amorfa e Nam *et al.* (2016) para celulose cristalina I β e II. Ressalta-se o trabalho de Yue *et al.* (2015) que determina a composição de duas espécies cristalinas I β e II em amostra lignocelulósica a partir da simulação dos dados experimentais e sua decomposição nos diferentes padrões cristalinos que o explicam.

6.2. Pré-tratamento de Avicel por moinho de bolas

Como estratégia de diminuir o conteúdo cristalino da amostra, o pré-tratamento de Avicel por moinho de bolas proporcionou a diminuição da intensidade dos sinais do cristal 1β de celulose, característicos do material não pré-tratado. O difratograma revelou diminuição substancial da intensidade das linhas correspondentes aos planos cristalinos 1β $1\bar{1}0$ ($\sim 14,88^\circ$), 110 ($\sim 16,68^\circ$) e 020 na região de $22,5 - 23,0^\circ$ (Figura 26). O difratograma adquiriu aspecto geral mais largo para a amostra pré-tratada, característico do espalhamento randômico de raios-X em amostras sem organização molecular preferencial. Não somente, o pré-tratamento sugeriu que a moagem alterou o tipo de cristalinidade da celulose, pelo aparecimento de linhas características aos padrões de celulose do tipo II (Figura 26). Em condições de moagem semelhantes, o aparecimento desse alomorfo já foi sugerido em outros trabalhos da literatura (Ishii *et al.*, 2003; Ago *et al.*, 2004; Yeh *et al.*, 2010; Oubani *et al.*, 2011; Yu & Wu, 2011; Avolio *et al.*, 2012; Shimura *et al.*, 2014; Phanthong *et al.*, 2016; Podgorbunskikh *et al.*, 2018). Nesses trabalhos foi verificada tendência de formação de celulose II mediante moagem de celulose em pó em condições secas, pelo deslocamento da posição do principal sinal amorfo para a região de máximo de intensidade de difração para a o alomorfo de celulose II ao redor de $\sim 20^\circ$ e de um ombro $\sim 12^\circ$. Porém, em amostras de papel moídas por moinhos planetários (Phanthong *et al.*, 2016) ou em pó moídas por moinhos de tambor (Zhao *et al.*, 2005; Nemoto *et al.*, 2017), não sinalizaram haver formação de celulose II pela ausência do deslocamento do pico amorfo. A formação de celulose II mediante moagem havia sido descrita somente para algodão moído por moagem de bolas em condições úmidas (Ago *et al.*, 2004). Ainda que a formação de celulose II tenha sido verificada em condições secas para celulose em pó KC Flock W-100 (Nippon Paper Chemicals Co.) mediante hidrólise parcial do material (Teixeira *et al.*, 2013; da Silva, 2013), não foram feitas similares comprovações com Avicel PH-101.

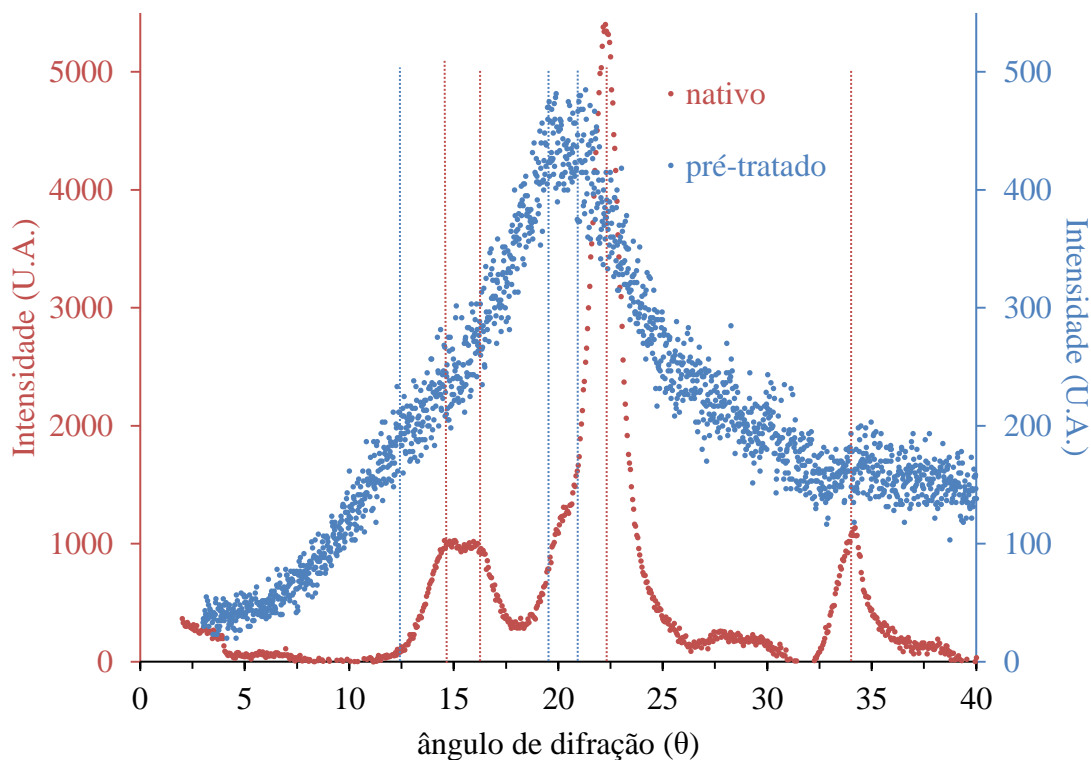


Figura 26 – Difratogramas de Avicel nativo e pré-tratado por moinho de bolas. Linhas de difração indicam as intensidades características dos cristais de celulose I β (vermelhas) e celulose II (azuis).

Uma segunda hidrólise de Avicel pré-tratado por moinho de bolas visou gerar material residual para caracterização e verificação da mudança do conteúdo cristalino pela moagem. Após 48 h de experimento, verificou-se rendimento reacional de 32,71% ao utilizando a combinação de extratos de *Trichoderma reesei* (*Hypocrea jecorina*) RUT C30 como fonte de atividade FPase e de *Aspergillus awamori* (RUT+AWA) como principal fonte BGásica. Rendimento similar de 35,60% foi encontrado utilizando extrato comercial de *Trichoderma reesei* suplementado com o de *Aspergillus awamori* (Celluclast 1.5L + AWA) (Figura 27). Os resultados de rendimento indicaram que a fonte do extrato com atividade FPásica pouco interferiu no desempenho relativo delas durante a hidrólise. Uma vez que os extratos adviessem da mesma espécie biológica, embora de linhagens diferentes, pode ter contribuído com seu desempenho similar. Os rendimentos de hidrólise da celulose (Figura 27) se assemelharam com os resultados de hidrólise de celulose moída por moinho de bolas com enzima comercial Optimash™ do trabalho de Teixeira *et al.* (2013). Segundo esses autores reportaram, a atividade BGase do extrato comercial utilizado é baixa. Assim, a suplementação de BGase na hidrólise da celulose

desse trabalho pode ter sido insuficiente para evitar inibição das enzimas por celobiose e promover maiores rendimentos reacionais.

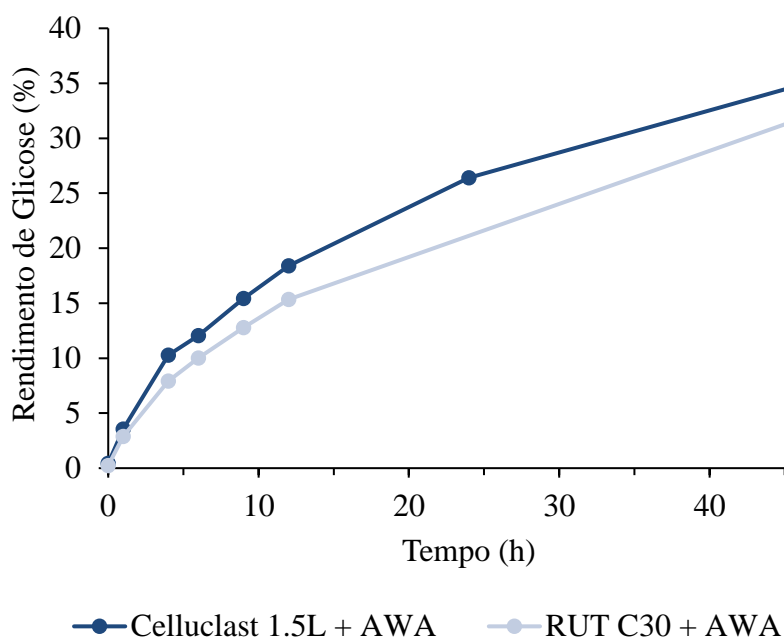


Figura 27 – Hidrólise de Avicel PH-101 pré-tratado por moinho de bolas utilizando enzima Celluclast 1.5L e extrato *Trichoderma reesei* RUT C30. Suplementação de atividade β -glicosidásica por extrato de *Aspergillus awamori* (AWA). 10% carga de sólidos, 10 FPU/g, FPU:BGU = 1,00:2,00, 170 rpm, 50°C. As linhas ligando os pontos são mero auxílio a visualização e não representam modelo.

A análise dos substratos residuais após 48h de reação, permitiu verificar que os picos característicos para o alomorfo do tipo II aumentaram de intensidade com relação ao material amorfizado sem ter sido hidrolisado. Os maiores aumentos foram percebidos para dois picos em torno de $\sim 20^\circ$ e o terceiro em $12,5^\circ$ (Figura 28). Assim, a amorfização da amostra em pó seca acompanhou a sua parcial modificação estrutural de celulose I β para celulose II. A verificação de formação de celulose II em condições secas amplia as condições de sua formação (Teixeira *et al.*, 2013), até então restrita a ambientes úmidos (Ago *et al.*, 2004).

Adotando esse novo cristalito para o cálculo do índice de cristalinidade, verificou-se que o IC para o Avicel moído atingiu 0,09, ao passo que os hidrólidos com extrato Celluclast 1.5L e RUT C30 alcançaram 0,28 e de 0,29 respectivamente (Figura 29). Com base nos resultados, concluiu-se que o consumo da fração amorfa é favorecido para

quando ambas as formas cristalinas de celulose (I β e II) estão presentes na amostra. Pois, também se observou aumento relativo da fração cristalina do tipo II comparada com a amorfa ao longo do tempo de hidrólise. O aumento do IC para o alomorfo I β durante hidrólises enzimáticas de um material celulósico já foi reportado em condições distintas (Fan *et al.*, 1980; Sinitsyn *et al.*, 1991; Kafle *et al.*, 2015).

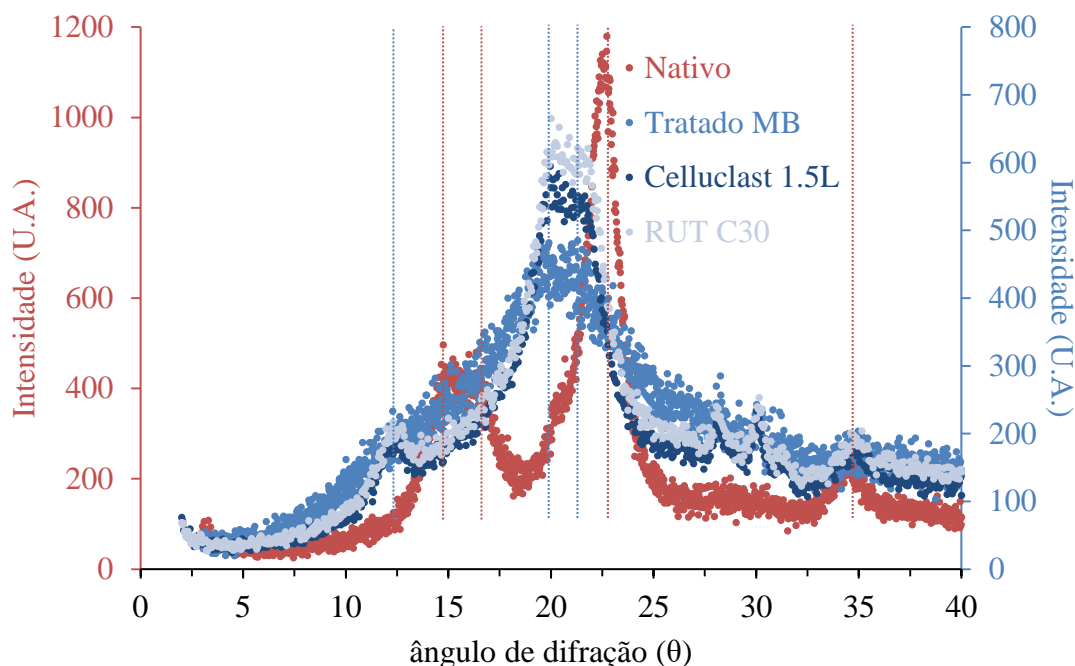


Figura 28 – Difratogramas de Avicel nativo e pré-tratado por moinho de bolas (MB) após a hidrólise utilizando enzima Celluclast 1.5L e extrato *Trichoderma reesei* RUT C30, ambas suplementadas por extrato de *Aspergillus awamori*. Linhas de difração indicam as intensidades características dos cristais de celulose I β (vermelhas) e celulose II (azuis).

O Avicel pré-tratado por moinho de bolas também diminuiu a área superficial da celulose moída, independente do método de preparação da amostra. A celulose liofilizada em meio aquoso, apresentou 0,46 m².g⁻¹ para a celulose não pré-tratada e 0,22 m².g⁻¹ para a moída. Após a troca de solvente, o Avicel não pré-tratado apresentou 5,71 m².g⁻¹ de área contra 0,01 m².g⁻¹ para o material moído (Figura 30). O pré-tratamento de celulose KC Flock W-100 (Nippon Paper Chemicals Co.) forneceu 0,6 m².g⁻¹ para a celulose pré-tratada por moinho de bolas e 1,2 m².g⁻¹ para celulose não-pré-tratada, ambos materiais medidos por meio da técnica de fisissorção de N₂ seguido de análise pelo método de BET (da Silva, 2013).

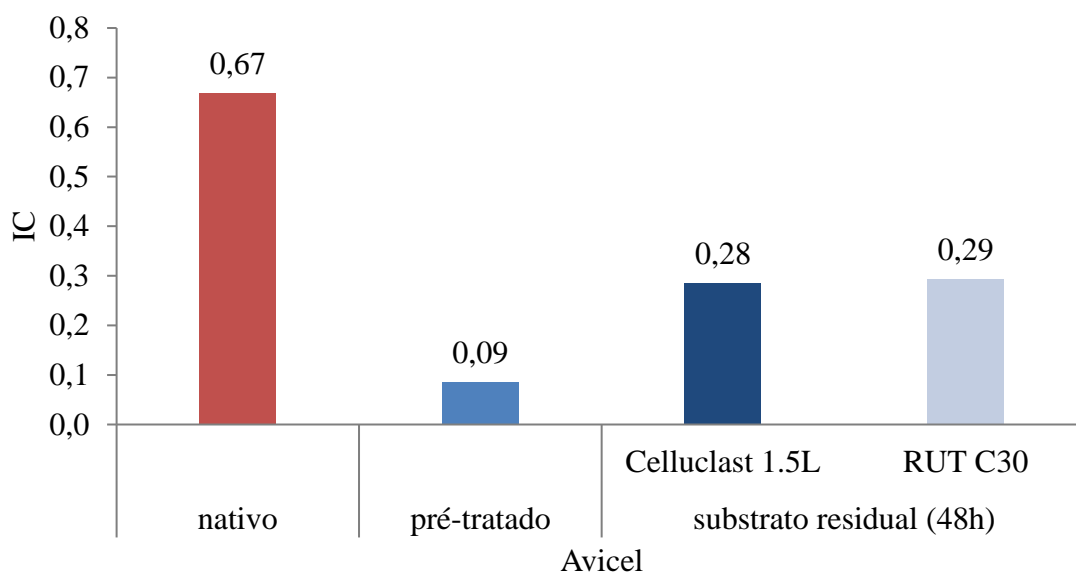


Figura 29 – Índice de cristalinidade do resíduo de substrato de reação de hidrólise com celulose pré-tratada por moinho de bolas após 48h de hidrólise utilizando extratos de Celluclast 1.5L e RUT C30.

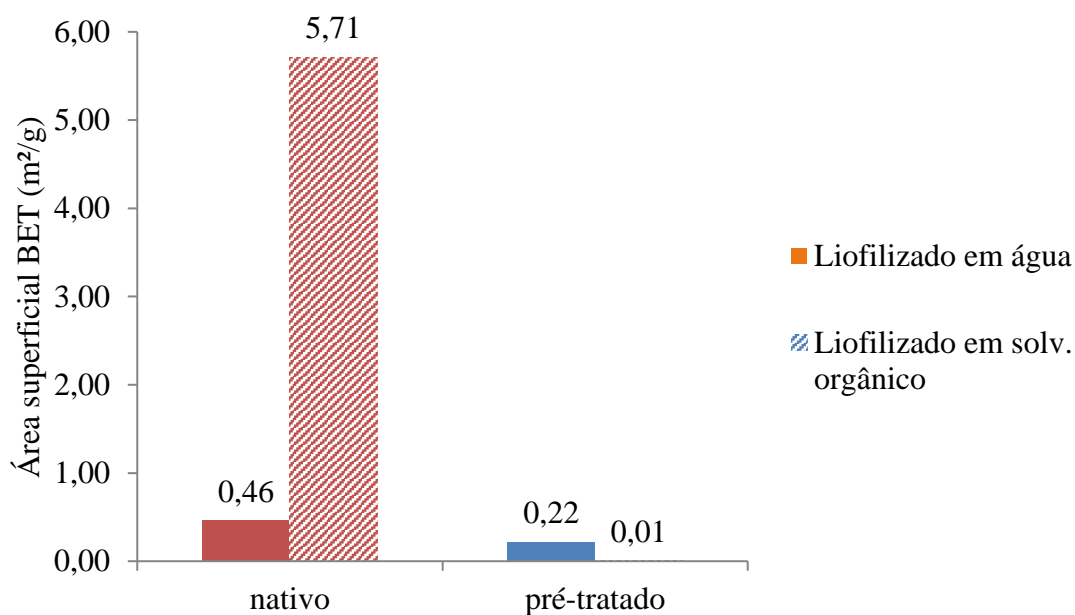


Figura 30 – Área superficial BET de Avicel PH-101 pré-tratado por moinho de bolas por fisssorção de N₂. Foi feita troca de solvente nos materiais das barras hachuradas.

A redução da área superficial do material pré-tratado em comparação com o Avicel nativo, pode refletir a compactação na estrutura intra e interfibrilar da celulose causada pela moagem. Além disso, o aumento da área superficial do Avicel sem pré-

tratamento após a troca de solvente, indicou haver preservação de estruturas em seu estado inchado (Pönni *et al.*, 2013; Jiang & Hiseh, 2014), evitando a “hornificação” (Luo *et al.*, 2011). Essa preservação resultou no aumento de área quando comparando com as amostras liofilizadas em ambiente aquoso (Svensson *et al.*, 2013; Nemoto *et al.*, 2015; Beaumont *et al.*, 2016).

O pré-tratamento de Avicel com moinho de bolas promoveu pouca diminuição do tamanho de partícula (Figura 31). Percebeu-se que a distribuição de ambas as amostras permanecia praticamente concorrente, refletindo no tamanho médio de partícula similar entre o avicel moído (74,95 μm) e do não pré-tratado (81,09 μm), mas também na aproximação dos valores dos percentis das duas distribuições.

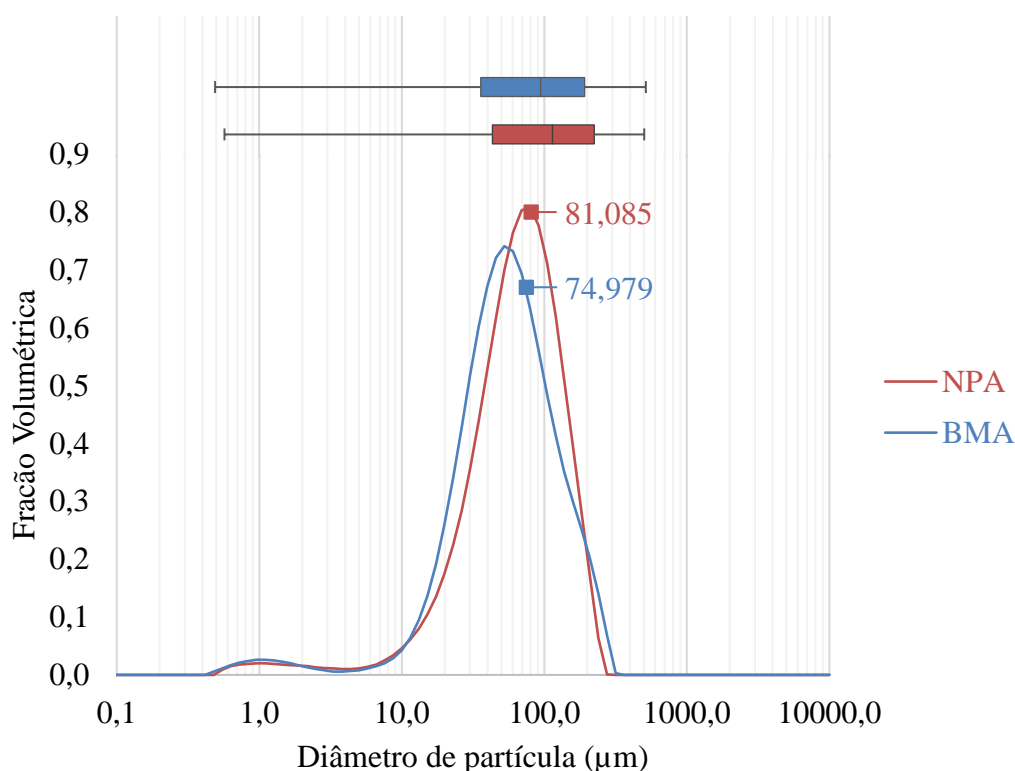


Figura 31 -Distribuição do tamanho de partícula para Avicel PH-101 não pré-tratada (NPA) e tratada por moinho de bolas (BMA) com representação boxplot dos dados. As médias de diâmetro de partícula são mostradas nos pontos do gráfico.

Peng *et al.*, (2013) forneceram indícios de que a moagem planetária de celulose poderia aumentar ou diminuir a área superficial da celulose, dependendo do tamanho de partícula existente no início do procedimento. Esses autores revelaram que ao moerem partículas de VIVAPUR® 12 (25-40 μm) de tamanho aproximado ao do Avicel (~50 μm),

a área superficial do material diminuía. Quando moendo celulose VIVAPUR® 105 com partículas maiores (180-200 µm), a área aumentava. Essa diferença de resultados pode refletir a eficiência da técnica em conseguir diminuir o tamanho das partículas e, dependendo do tamanho inicial, o que está relacionado à sua área específica (Yeh *et al.*, 2010), mas também em compactar a estrutura do material.

As micrografias eletrônicas do Avicel moído mostraram que a moagem alterou as características da celulose. A partícula do Avicel não pré-tratado mostram um material contendo várias vilosidades e lamelas com alguns sulcos rasos (Figura 32a). A superfície do material exibia um emaranhado de fibras altamente compacto e com textura rugosa. Algumas protuberâncias tornaram a superfície ondulada (Figura 32b). A partícula de Avicel moído exibia aspecto mais adensado e sem estruturas lamelares se desprendendo da partícula como no material não pré-tratado (Figura 32c). A superfície do material moído se mostrou mais plana e de textura mais lisa, perdendo o aspecto fibroso-rugoso do material original (Figura 32d).

A micrografia permite visualizar as alterações estruturais causadas pela moagem e correlacionar elas com o aumento do conteúdo amorfo após moagem (Figura 29). Também a compactação da estrutura da partícula, bem como a perda de sulcos, vilosidades e da microtextura da superfície devido ao pré-tratamento, permitiu entender a diminuição da área superficial do Avicel após moagem (Figura 30), tão bem quanto a modificação da distribuição do tamanho de partícula, culminando com valores médios menores (Figura 31).

A hidrólise comparativa de Avicel pré-tratado por moinho de bolas em condições otimizadas revelou aumento do rendimento do material pré-tratado (Figura 33). Até as 6h de reação, ambos os materiais apresentaram resultados similares. Após esse tempo, o material moído apresentava taxas mais elevadas do que o não moído, culminando com rendimentos reacionais mais elevados. Em 48 h de reação, os rendimentos alcançaram 54% para o material moído, enquanto o não moído 34,80%. Em 144 h, o pré-tratado apresentou 74,40%, frente 41,55% do não pré-tratado.

Essa diferença entre os rendimentos de materiais nativos e pré-tratados por moagem planetária de celulose já foi reportada na literatura em alguns trabalhos (Yeh *et al.*, 2010; Teixeira *et al.*, 2013). A diferença no rendimento para esses experimentos comparativos, se justifica não só pelo menor conteúdo amorfo do Avicel moído, mas

eventualmente devido a uma maior taxa reacional mediada pelo cristal de celulose II, presente após moagem (Figura 33).

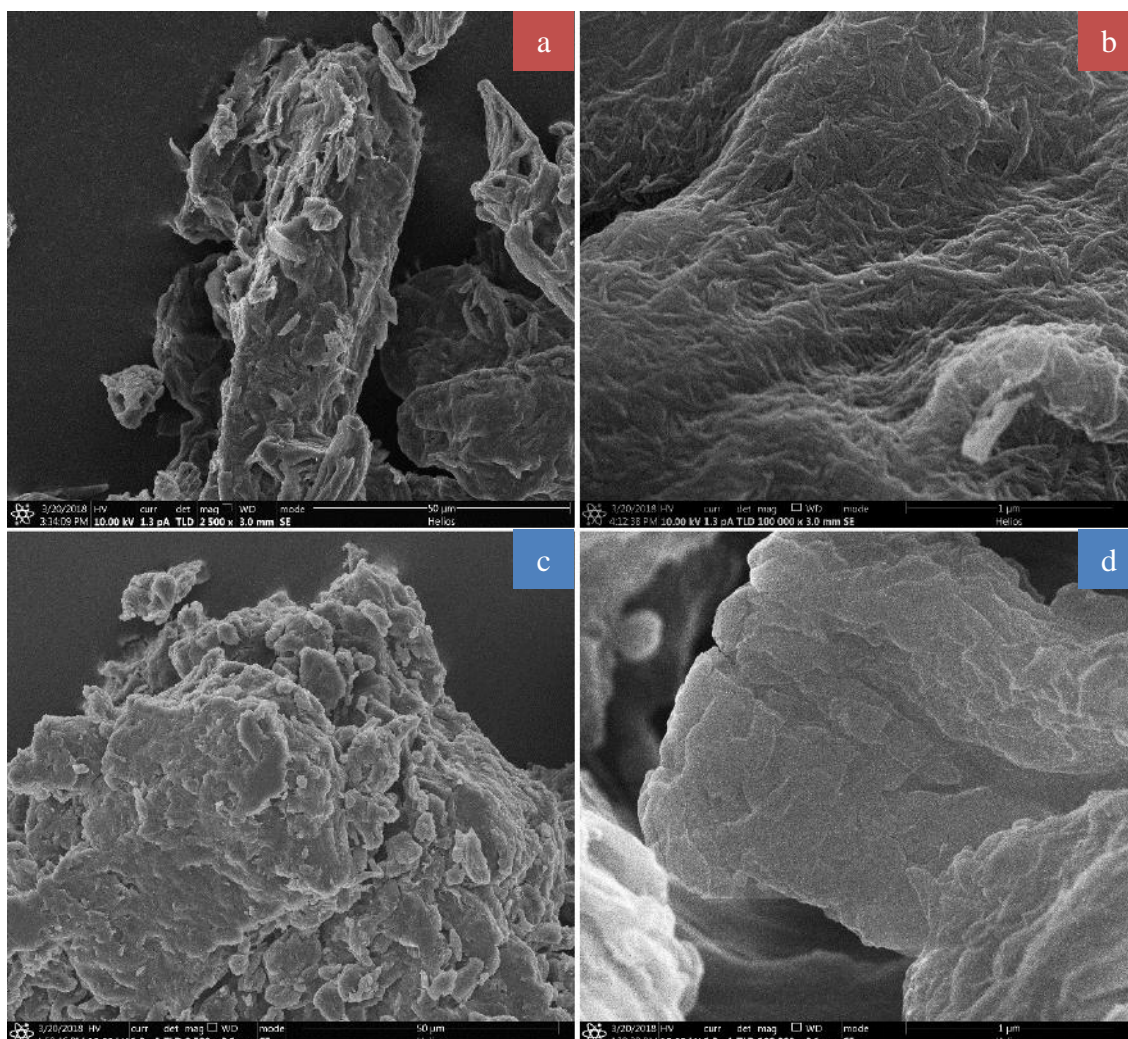


Figura 32 – Micrografia eletrônica de Avicel PH-101 com e sem pré-tratamento por moinho de bolas. a- partícula e b- superfície de avicel sem pré-tratamento; c- partícula e d- superfície de avicel pré-tratado por moinho de bolas.

Os rendimentos de hidrólise de avicel amorfizado por moinho de bolas em 48 h em condições otimizadas (54,0%) (Figura 33) comparados com os trabalhos da literatura com Avicel sem pré-tratamento (41,2 – 79,4%) (Börjesson *et al.*, 2007; Bak *et al.*, 2009; Ouyang *et al.*, 2010; Martinez, 2014; Kafle *et al.*, 2015, e outros) indicaram que a fonte de enzimas poderia estar exercendo influência negativa para os hidrolisado do Avicel moído. Porém essa fonte era inviável de ser mudada.

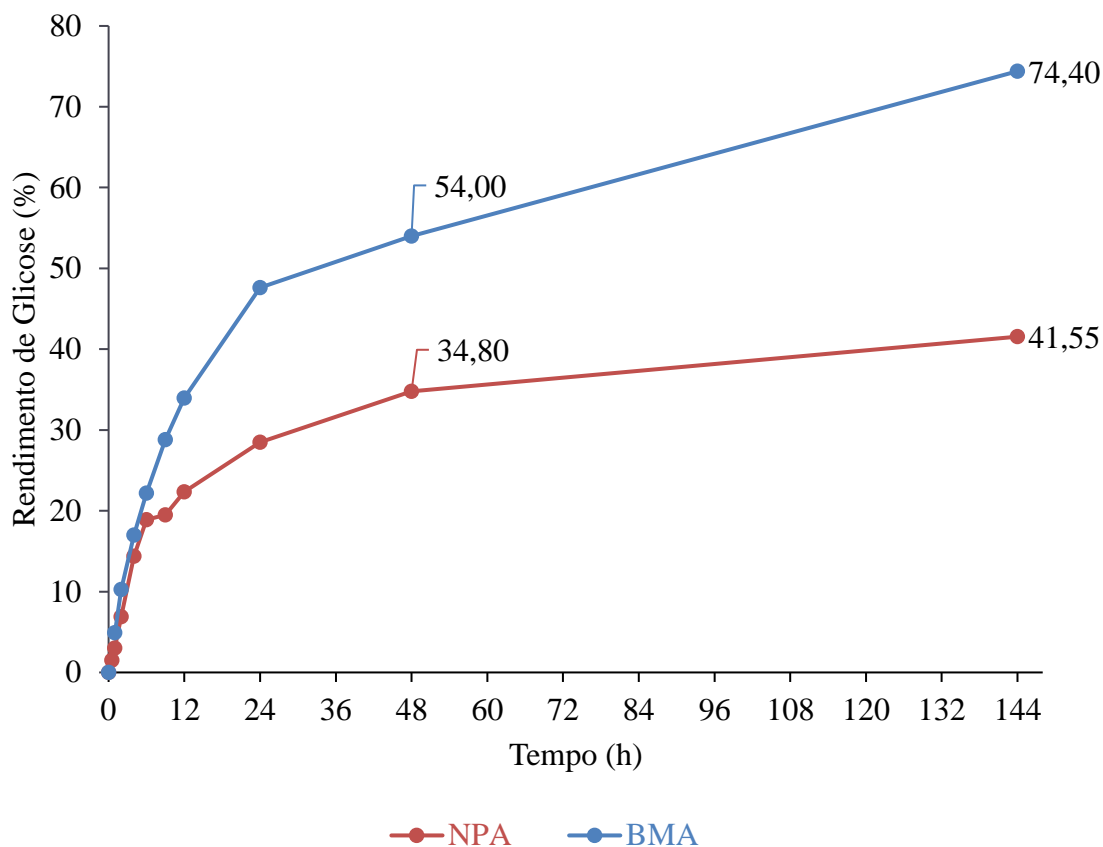


Figura 33 – Hidrólise de Avicel PH-101 não pré-tratado (NPA) e pré-tratado por moinho de bolas (BMA). Celluclast 1.5L + Novozymes N188; 2% carga de sólidos; 10 FPU/g, FPU:BGU = 1,00:3,00, 300 rpm, 50°C; pH = 4,8. As linhas ligando os pontos são mero auxílio a visualização e não representam modelo.

Em conjunto, os dados do pré-tratamento de Avicel com moinho de bolas resultaram em um material com características de baixas cristalinidade e área superficial. A baixa área superficial apresentada pelo material pré-tratado inviabilizava a utilização da técnica gerar material amorfizado para alimentar o modelo matemático, pois a área baixa seria incapaz de ser medida e acompanhada ao longo da reação, Assim, propôs-se mudança da técnica de pré-tratamento dar prosseguimento o trabalho de investigação (Seção 6.3).

6.3. Pré-tratamento de Avicel PH-101 por líquido iônico ([EMIM][OAc])

6.3.1. Caracterização de pré-tratados a 120°C em diferentes tempos de exposição

A primeira série experimental de tratamento com líquidos iônicos pretendeu avaliar a correlação entre o tempo de tratamento da celulose com as características estruturais do material pré-tratado, principalmente área superficial e cristalinidade (Tabela 4 – Série 1). O intuito era obter uma correlação das condições de pré-tratamento com as características físicas, de modo que, ao defini-las, retiraria-se a necessidade de repetir a caracterização da amostra toda vez que um pré-tratamento fosse executado. Foram executados pré-tratamentos a 120°C em diferentes tempos de exposição, representando diferentes graus de severidade.

Os difratogramas revelaram que a intensidade relativa do pico da celulose não pré-tratada (alomorfo do tipo I β), diminuía com o aumento do tempo de exposição ao líquido iônico. Foram observadas diminuições nas linhas correspondentes aos planos cristalinos 1 $\bar{1}$ 0 (~14,88°), 110 (~16,68°) e 020, na região de 22,5 – 23,0° (Figura 34). Nos tempos de 10 e 20 min, percebeu-se alargamento do pico do material pré-tratado e deslocamento do pico de maior intensidade para perto de 20°. Nos tempos de maior exposição, dois picos eram perceptíveis na região de 20,0° e 22,10°, característicos dos planos cristalinos 110 e 020 do alomorfo do tipo II. Também, um pequeno ombro foi notado na região de 12,3° a partir de 20 min de exposição da celulose, também característico do alomorfo do tipo II (French, 2014).

O ajuste dos difratogramas obtidos para cada tempo de pré-tratamento com relação às linhas características de cada um dos alomorfos de celulose do tipo II e I β , permitiu obter correlação linear entre o tempo de pré-tratamento e o índice de cristalinidade. Foi obtida correlação linear para o alomorfo do tipo II com índice de determinação de 0,96. Para o alomorfo do tipo I β obteve-se índice de determinação de 0,01 (Figura 35). Não somente, notou-se que a celulose submetida ao líquido iônico ([EMIM][OAc]) alterava seu padrão cristalino, mesmo nas exposições mais breves.

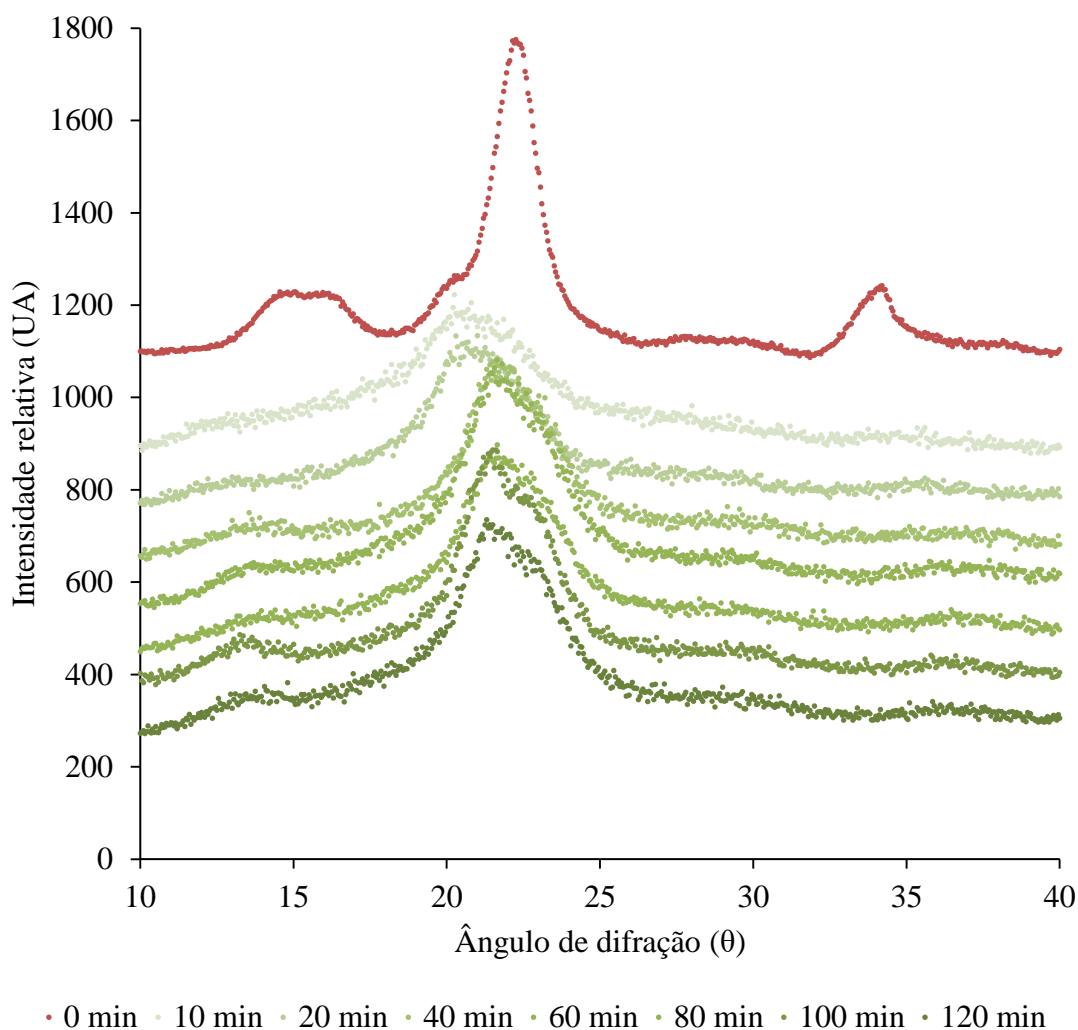


Figura 34 – Difratogramas de Avicel PH-101 pré-tratados em diferentes tempos por ([EMIM][OAc]) a 120°C.

A qualidade de ajuste para o alomorfo de celulose II foi capturada não apenas para o coeficiente de determinação do índice de cristalinidade em diferentes tempos de pré-tratamento. Verificou-se que a qualidade dos cálculos do índice de cristalinidade foi maior para todos os pré-tratados comparando-se a celulose do tipo II com relação ao tipo 1 β (Tabela 7). Na medida em que os ajustes para o alomorfo II alcançava no mínimo $r^2=0,95$, os valores para o ajuste do alomorfo 1 β variaram desde 0,40 até 0,72 para as mesmas amostras. Além disso, a celulose sem nenhum pré-tratamento apresentou melhor ajuste para o alomorfo 1 β ($r^2=0,95$) com relação à II ($r^2=0,83$), refletindo sua integridade estrutural.

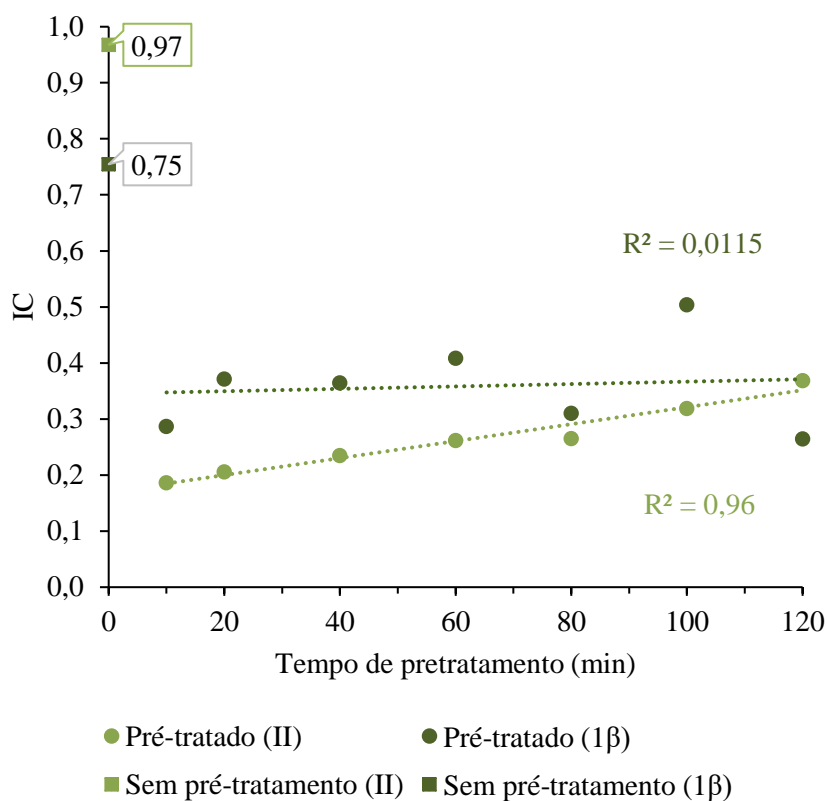


Figura 35 – Índice de cristalinidade para diferentes alomorfos de celulose dos pré-tratados de Avicel PH-101 com ([EMIM][OAc]) a 120°C em diferentes tempos de exposição.

Tabela 7 – Qualidade do ajuste do difratogramas para os diferentes padrões cristalográficos para o cálculo do índice de cristalinidade

Tempo de pré-tratamento	Celulose 1β		Celulose II	
	IC	r ²	IC	r ²
0	0,75	0,97	0,97	0,83
10	0,29	0,53	0,19	0,95
20	0,37	0,71	0,21	0,96
40	0,36	0,60	0,23	0,97
60	0,41	0,72	0,26	0,98
80	0,31	0,62	0,26	0,96
100	0,50	0,40	0,32	0,96
120	0,26	0,57	0,37	0,98

A área superficial dos materiais pré-tratados não apresentou relação linear com o tempo de pré-tratamento que a amostra foi submetida, independente do aparelho utilizado para a medição da área (Figura 36). Para as amostras de 10 min e 120 min, a área superficial medida em repetição, usando os diferentes aparelhos diferiu mais para as amostras pré-tratadas nesses tempos do que para as obtidas nos outros intervalos de incubação. Tal diferença pode residir na falta de réplicas de medição para todas as amostras em geral, que implica em obter o resultado de uma análise em função da qualidade da alíquota escolhida.

Ademais, a falta de correlação da área superficial com o tempo de pré-tratamento com ([EMIM][OAc]), indica que outra condição experimental além do tempo de exposição ao solvente deve contribuir com a geração de um material com maior ou menor área superficial: sistema de agitação, velocidade de agitação, volume do sistema, velocidade de esfriamento, agitação durante esfriamento *etc.* Essas variáveis podem ser estudadas com o intuito de controlar as características do material pré-tratado.

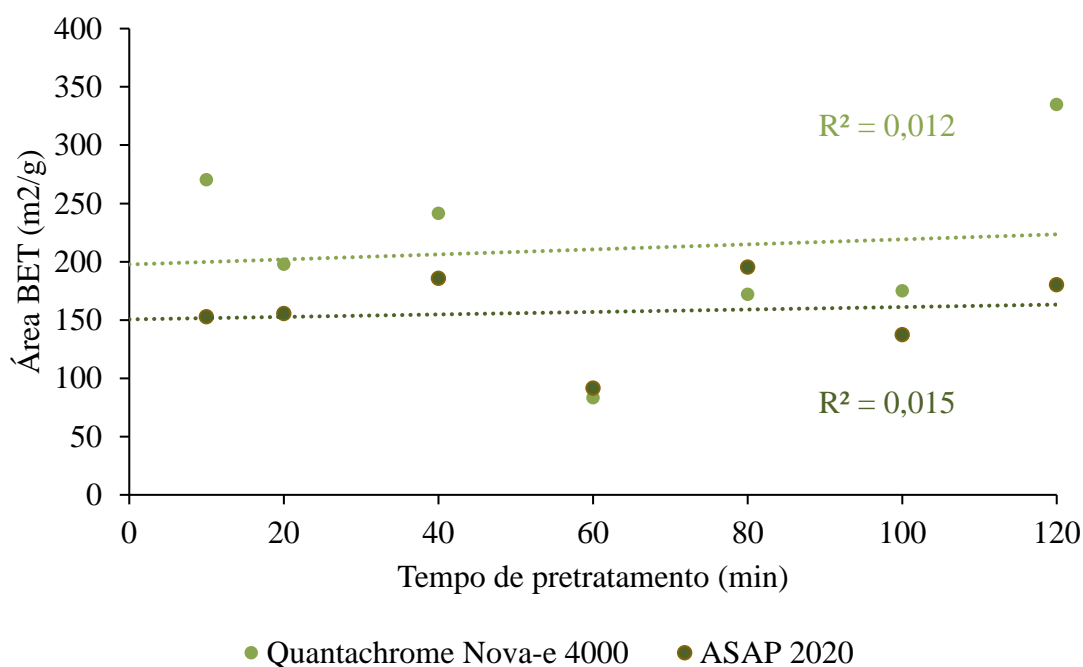


Figura 36 – Área superficial BET de Avicel PH-101 pré-tratada com ([EMIM][OAc]) a 120°C em diferentes tempos e medidas equipamentos Quantachrome Nova-e 4000 e ASAP 2020;

Com base nos resultados de área superficial e cristalinidade, foi traçada uma correlação entre essas características, indicando não haver tendência entre essas

propriedades nos diferentes tempos de pré-tratamento (Figura 37). Os resultados tiveram baixos índices de correlação para ambos os aparelhos utilizados na medição da área, pois para a série “quanta” obteve-se o índice de determinação de 0,0445 e para a série medida em aparelho “ASAP” 0,0067.

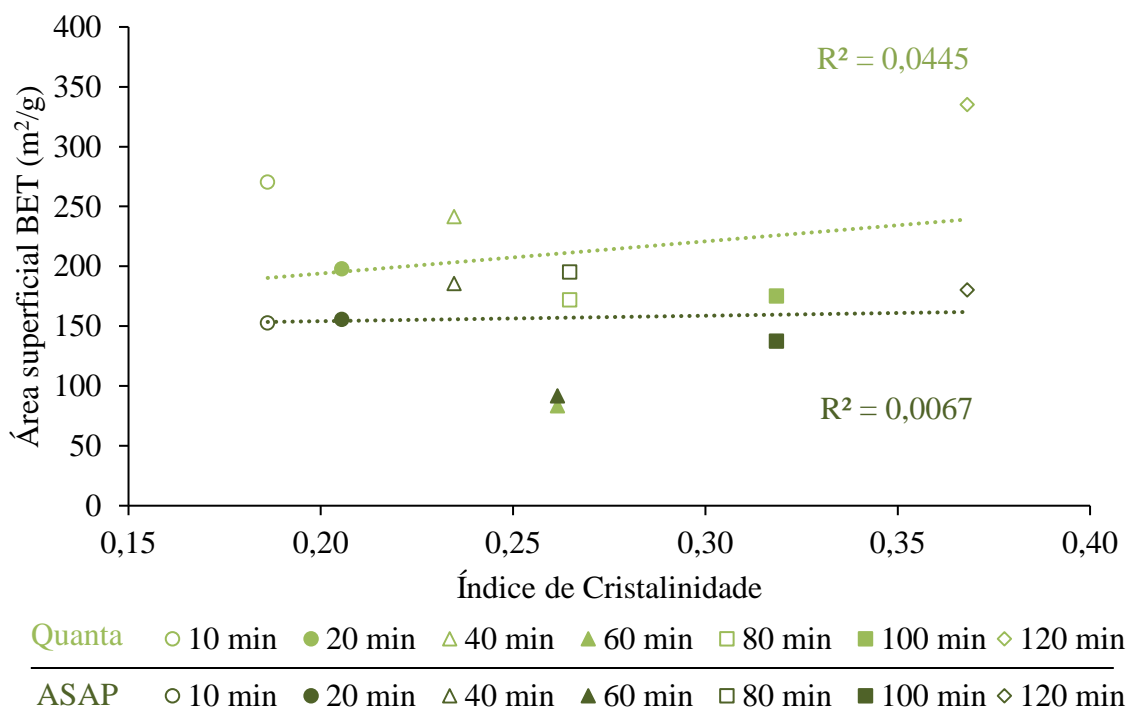


Figura 37 – Correlação de Área superficial e Índice de Cristalinidade (Celulose II) de Avicel pré-tratado com ([EMIM][OAc]) a 120°C por diferentes tempos. Quanta: Quantachrome Nova-e 4000; ASAP: ASAP 2020.

Foi notado que a tendência dos dados da (Figura 37) acompanhou as observadas na (Figura 36). Principalmente pelas medições de área de 10 min e 120 min serem maiores em relação aos demais e distantes entre si. Mas também pelos valores de área em 60 min ser também mais baixo como na (Figura 36). A baixa correlação da característica área superficial com o tempo explicava a baixa correlação da área com a cristalinidade para o alomorfo II (Figura 37), pois a cristalinidade se mostrou correlacionada com o tempo para o alomorfo citada (Figura 35).

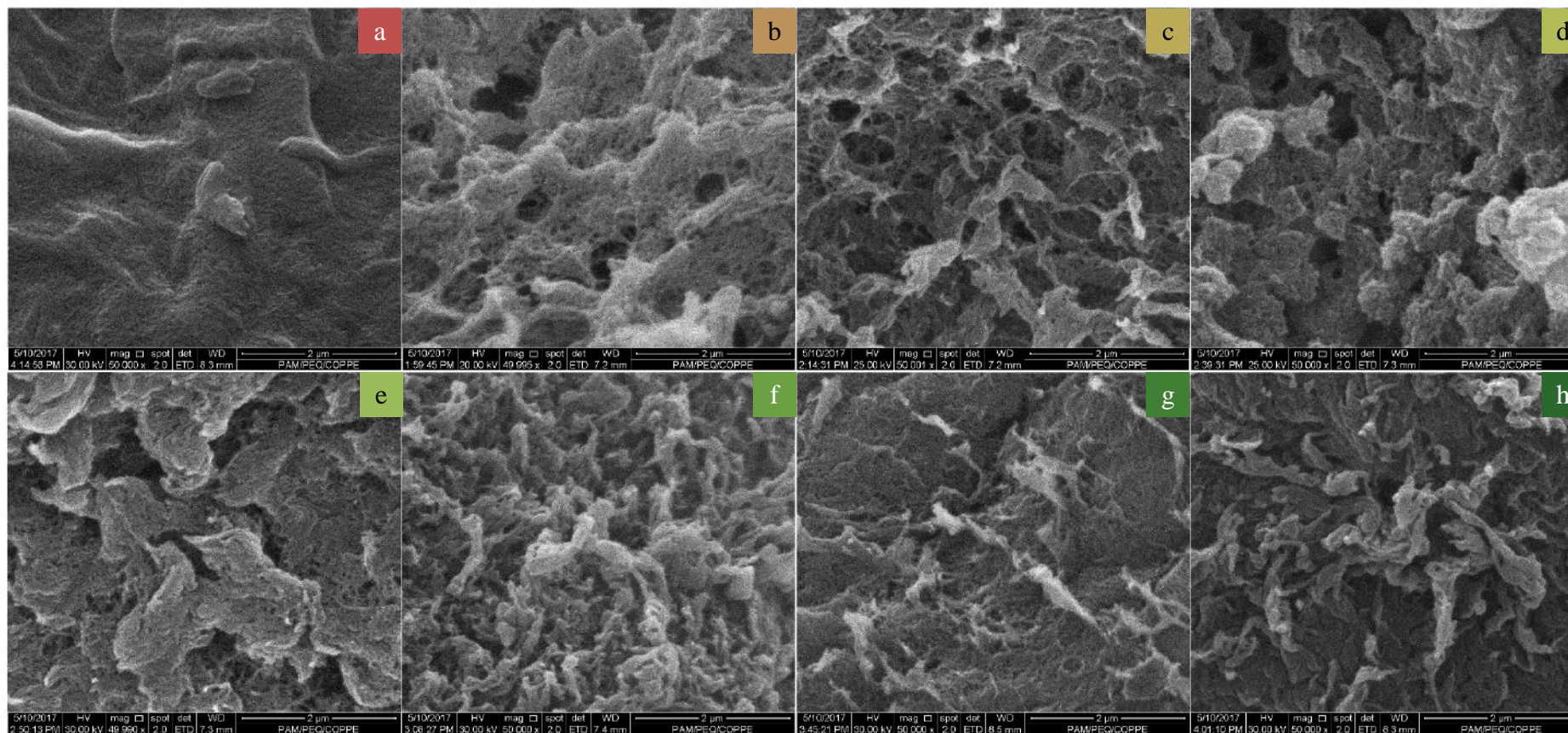


Figura 38 – Micrografias eletrônicas de Avicel PH-101 pré-tratado por ([EMIM][OAc]) a 120°C em diferentes tempos de exposição. a-0 min (sem pré-tratamento); b-10 min; c-20 min; d- 40 min; e-60 min; f-80 min; g-100 min; h-120 min; (a-h) – aumento de 50.000X;

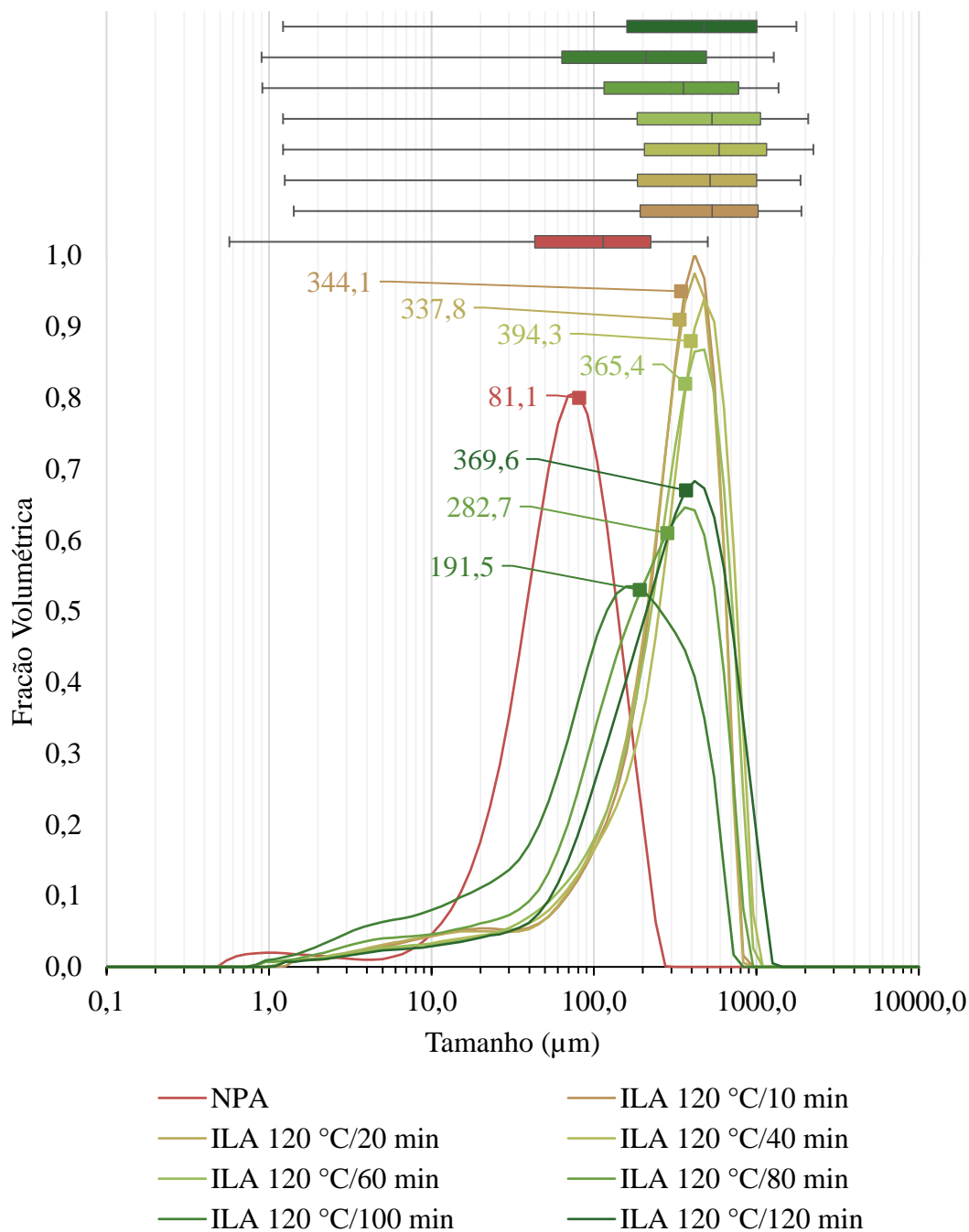


Figura 39 – Distribuição do tamanho de partícula para Avicel PH-101 não pré-tratada e tratada por ([EMIM][OAc])a 120°C em diferentes tempos com representação boxplot dos dados. As médias de diâmetro de partícula são mostradas nos pontos do gráfico.

Os resultados de caracterização de Avicel que identificaram aumento da sua área superficial (Figura 37) e mudança do alomorfo seguido da diminuição do conteúdo cristalino da amostra (Figura 35) quando submetida ao líquido iônico, refletiram as

alterações morfológicas sofridas pelos materiais vistas por microscopia eletrônica de varredura (Figura 38).

O Avicel não pré-tratado, apresentou morfologia composta por fibras que se emaranhavam em uma estrutura compacta, superfície relativamente plana com poucas vilosidades, porém com textura rugosa (Figura 38a). A estrutura compacta e mais densa se relaciona com sua alta cristalinidade (Figura 35) e baixa área superficial (Figura 37).

Por outro lado, os materiais pré-tratados por ([EMIM][OAc]) apresentaram fibras mais afastadas uma das outras e superfície interrompida por vilosidades e sulcos, distribuídos por toda estrutura (Figura 38b-h). O aspecto do material se tornou esponjoso para todas as amostras, porém em 80 min de exposição ao líquido iônico e em tempos superiores, notou-se aparecimento de estruturas lamelares na superfície de aparência esponjosa (Figura 38f-h).

As alterações morfológicas do Avicel pré-tratado se relacionam com a mudança do padrão cristalino da celulose, mas também pelo aumento da área superficial quando comparando com as características do material intacto. O afastamento das fibras observado nas figuras (Figura 38b-h), pode ter refletido a desorganização também no nível molecular da celulose, trazendo-a para um novo padrão conformacional de celulose II (Tabela 7). Também, o aparecimento de sucros e vilosidades, se relaciona com o aumento da área superficial dos pré-tratados em comparação com a estrutura original (Figura 37).

Não foi observada tendência entre a morfologia da superfície e o tempo de exposição do Avicel ao líquido iônico que indicasse relação entre essas propriedades (Figura 38). Pela ausência de uma tendência de aspecto morfológico detectável na microscopia e pela variação textural entre os pré-tratados, independente do tempo de pré-tratamento, é possível interpretar a falta de correlação entre área superficial e o tempo de exposição ao líquido iônico (Figura 36).

O pré-tratamento de Avicel com ([EMIM][OAc]) alterou o tamanho de partícula do material pré-tratado em todos os tempos de exposição com relação ao material original (Figura 39). Todas as séries possuíam distribuições assimétricas, visto que suas médias, mostradas nas distribuições, diferiam das medianas, mostradas pelas representações em boxplot.

Verificou-se o aumento do tamanho de partícula, tanto pelo aumento dos valores extremos máximo e mínimo das distribuições em comparação com o Avicel sem pré-tratamento (Figura 39 – Boxplot), como também pelo incremento dos valores médios de diâmetro médio de partícula mostrados nos pontos junto às curvas de distribuição. Ao passo que o Avicel sem pré-tratamento apresentou 81,1 μm , as amostras pré-tratadas apresentaram desde 191,5 μm até 394,3 μm , um aumento mínimo de 2,36 x chegando até 4,86 x.

O aumento de tamanho de partícula em função do pré-tratamento pode ser explicado pelo afastamento das fibras de celulose e sua dissolução. Em estado líquido, a água adicionada no final da incubação, reaproxima as fibras umas das outras em uma configuração tal que permite novo emaranhamento delas em novas formas, eventualmente maiores que as estruturas originais.

Os resultados de caracterização (Figura 37) mostraram que as alterações sofridas nas características de área superficial e cristalinidade durante o pré-tratamento foram independentes entre si. Portanto, elas não foram alteradas na mesma intensidade durante o processo e apenas a cristalinidade foi alterada linearmente com o pré-tratamento. Essa comprovação exigiu que materiais capazes de serem gerados em novas rodadas de pré-tratamento para que fossem hidrolisados, deveriam ser caracterizados amplamente antes da reação ser executada. Assim, seria possível correlacionar os efeitos de cristalinidade e área superficial sobre a hidrólise.

6.3.2. Caracterização e hidrólise de pré-tratados em diferentes temperaturas e tempos de exposição

A fim de avaliar a influência das características físicas sobre a hidrólise de material pré-tratado por líquido iônico, foram feitos pré-tratamentos sequenciais para gerar material suficiente para ser caracterizado e hidrolisado (Tabela 4 – Séries 2 e 3). Os resultados das séries 2 e 3 foram feitos utilizando barra magnética Fisatom[®], substituindo a barra construída com ímã de neodímio. A série 2 teve suas amostras caracterizadas antes da hidrólise, enquanto a amostra da série 3 foi apenas hidrolisada. Nessa seção serão apresentadas as caracterizações e hidrólise desses grupos conjuntamente.

Verificou-se que o sistema de agitação pouco influenciou nos resultados obtidos nas séries 2 e 3. Assim, os resultados foram resumidos. Em suma, os resultados da série 2 também evidenciaram a formação de celulose II e o índice de cristalinidade desses pré-tratados igualmente forneceu valores crescentes de cristalinidade para celulose II quanto mais aumentava-se o tempo de pré-tratamento. Todavia, comparando-se as séries 1 e 2 de pré-tratamentos, os índices de cristalinidades da série 2 ficaram maiores do que da série 1. Para o tempo de 10 min de pré-tratamento o IC foi de 0,19 na primeira série (Tabela 7) e 0,22 na segunda. Em 120 min de pré-tratamento verificou-se 0,37 para a primeira série e 0,34 para a segunda. A análise de área superficial dos pré-tratados de Avicel da série 2 também mostraram falta de correlação dos valores de área superficial com relação ao tempo (Figura 36). Os novos resultados foram encontrados para a mesma faixa de valores anteriores. Em 10 min de pré-tratamento obteve-se 94,4 m²/g na série 2, contra 270,5 m²/g da série 1 (Figura 36). Em 120 min obteve-se 143,9 m²/g na série 2, contra 335,0 m²/g da série 1. Os resultados da série 2 variaram desde 94,4 m²/g até 194,8 m²/g. A série 1 apresentou valores de 83,6 m²/g até 335,0 m²/g.

A distribuição de tamanho de partícula dos materiais da série 2 apresentou resultados diferentes do que foi percebido para a série 1 (Tabela 4). Para a série 2, haviam menores valores médios de partícula, mais próximos do Avicel sem pré-tratamento. Ademais, notou-se a presença de distribuições mais assimétricas na série 1 (Figura 39) do que a série 2 (Figura 40), que podiam ser melhor comparadas por meio dos gráficos de boxplot. Além disso, verificou-se que havia tendência de alargamento das distribuições de tamanho de partícula quanto maior fosse o tempo de pré-tratamento do Avicel para a série 1, enquanto o oposto se notou para a série 2, pois em menores tempos se tinham distribuições mais largas.

O tamanho médio de partícula para a amostra de 10 min de exposição da celulose ao líquido iônico foi de 108,7 µm (Figura 40) na série 2 contra 344,1 µm (Figura 38) para a série 1. Porém a série 1 apresentou distribuição mais fina do que na série 2. Em 120 min de exposição da celulose ao líquido iônico notou-se de 270,2 µm na série 2 contra 369,6 µm para a série 1.

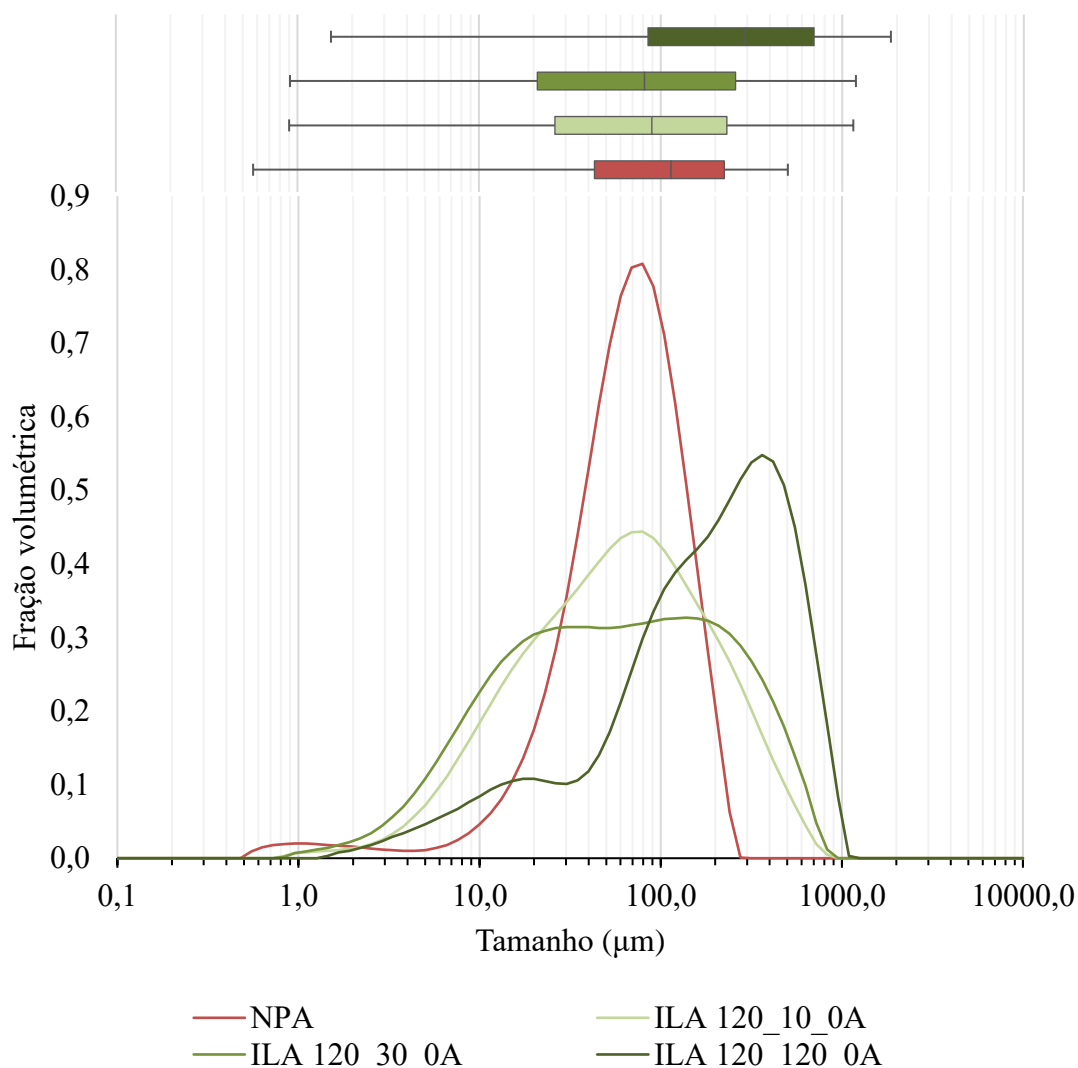


Figura 40 – Distribuição do tamanho de partícula para Avicel PH-101 não pré-tratada e tratada por ([EMIM][OAc]) a 120°C em diferentes tempos de exposição. Contém representação boxplot das distribuições. As médias de diâmetro de partícula são mostradas nos pontos do gráfico.

Por fim, a hidrólise dos pré-tratados foi testada na série 2 e 3 em caráter inédito. Verificou-se que, em diferentes temperaturas e tempos de exposição, poucas diferenças foram observadas em termos de rendimento, pois todos os hidrolisados apresentaram perfis de glicose similares até 12 h de reação (Figura 41). Após esse período o pré-tratado de 90°C/10 min apresentou menor rendimento que os materiais preparados a 120°C. Em 48 h de reação, o pré-tratado a 90°C atingiu 82,7% de rendimento, enquanto os materiais pré-tratados a 120°C alcançavam rendimentos entre 90,6% e 95,8%. Em 148 h de reação

os materiais pré-tratados a 120°C obtiveram rendimentos acima de 95,6%, ao passo que o material obtido a 90°C 85,6%.

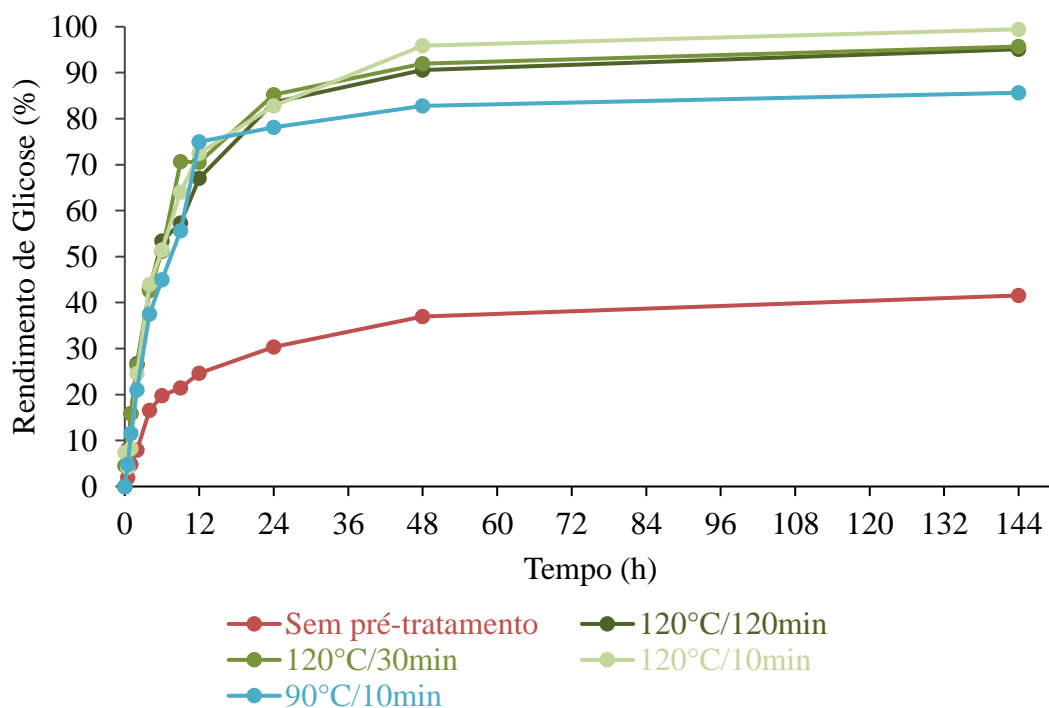


Figura 41 – Hidrólise de Avicel PH-101 pré-tratado por ([EMIM][OAc]) a diferentes temperaturas e tempos de exposição, utilizando extratos Celluclast 1.5L + Novozymes N188; 2% carga de sólidos; 10 FPU/g, FPU:BGU = 1,00:3,00, 300 rpm, 50°C; pH= 4,8. As linhas ligando os pontos são mero auxílio a visualização e não representam modelo.

6.3.3. Caracterização dos resíduos de hidrólise de Avicel pré-tratado a 120°C por 120 min

Nessa seção foram investigadas algumas mudanças das propriedades físicas da celulose ao longo da reação de hidrólise. Para tanto, tomou-se o Avicel pré-tratado por ([EMIM][OAc]) em 120°C por 120 min e sujeitou-o à enzimas celulásicas. Uma quantidade de celulose inicial foi dividida em frascos, junto aos quais foram adicionados extratos contendo celulasas. Nos tempos de 1 h, 4 h e 6 h de reação, as reações foram interrompidas e os resíduos reacionais preparados para serem analisados quanto à sua área superficial, cristalinidade, distribuição de tamanho de partícula e morfologia.

A hidrólise do Avicel pré-tratado por ([EMIM][OAc]) proporcionou resultados de hidrólise similares entre as réplicas, como esperado, pois até 4 h as linhas-guia de rendimento apresentavam-se sobrepostas (Figura 42). Nos tempos em que foram recolhidas as amostras, foi alcançado rendimento em torno de 10,4% em 1 h, 29,6% em 4 h e 37,3% em 6 h de reação. Todavia, os rendimentos desses materiais foram inferiores do Avicel hidrolisado na batelada anterior, executada por 144 h (Figura 41), mesmo a hidrólise tendo sido executada nas mesmas condições. Para aquela hidrólise, alcançaram-se em 6 h, 53,4% de rendimento ao passo que na hidólise com retiradas de material foi atingido 37,3%. Mesmo com essa diferença nos rendimentos entre as duas bateladas, considera-se que a caracterização das amostras nos tempos selecionados representam as características dos substratos para aqueles referidos avanços reacionais.

Recolhidas e caracterizadas as amostras residuais para a técnica de difração de raios-X, notou-se que seu conteúdo cristalino aumentou com o avanço da reação. O difratograma das amostras mostrou aumento de intensidade das linhas características da celulose II com o avanço reacional (Figura 43). O avicel não hidrolisado possuía difratograma característico para celulose II, porém seus picos principais na região de 20,5° e 22,0°, correspondentes aos planos cristalinos 110 e 020 desse alomorfo, apresentavam-se largos de modo que eles assumiam a forma de um apenas. Com o avanço da reação, notou-se que não somente esses picos ficaram mais bem resolvidos, quanto outros que são característicos de outros característicos desso alomorfo de celulose. Citam-se os picos na região de 12,2° (plano $\bar{1}10$), 20,0° (plano 110), plano 22,1° (plano 020), 26,4° (plano $\bar{1}22$), 28,8° (plano $\bar{1}13$), 34,2° (plano $\bar{2}13$) e 34,8° (plano 004) (French, 2014).

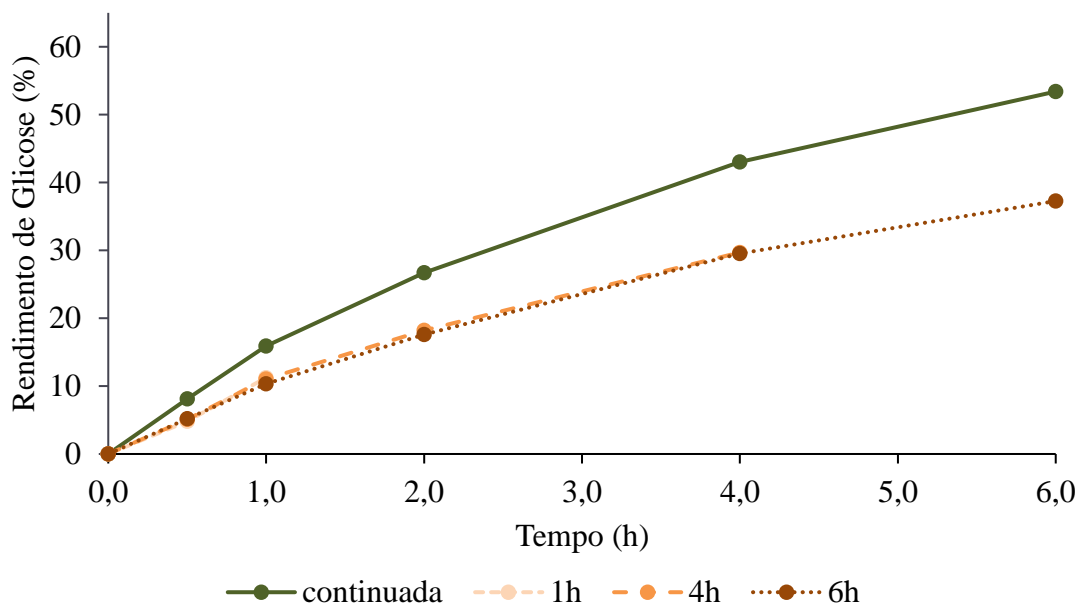


Figura 42 – Hidrólise com diferentes tempos de parada de Avicel PH-101 pré-tratado por ([EMIM][OAc]) a 120°C por 120 min, utilizando extratos Celluclast 1.5L + Novozymes N188; 2% carga de sólidos; 10 FPU/g, FPU:BGU = 1,00:3,00, 300 rpm, 50°C; pH = 4,8, volume 15,0 mL. As linhas ligando os pontos são mero auxílio à visualização e não representam ajuste a modelo.

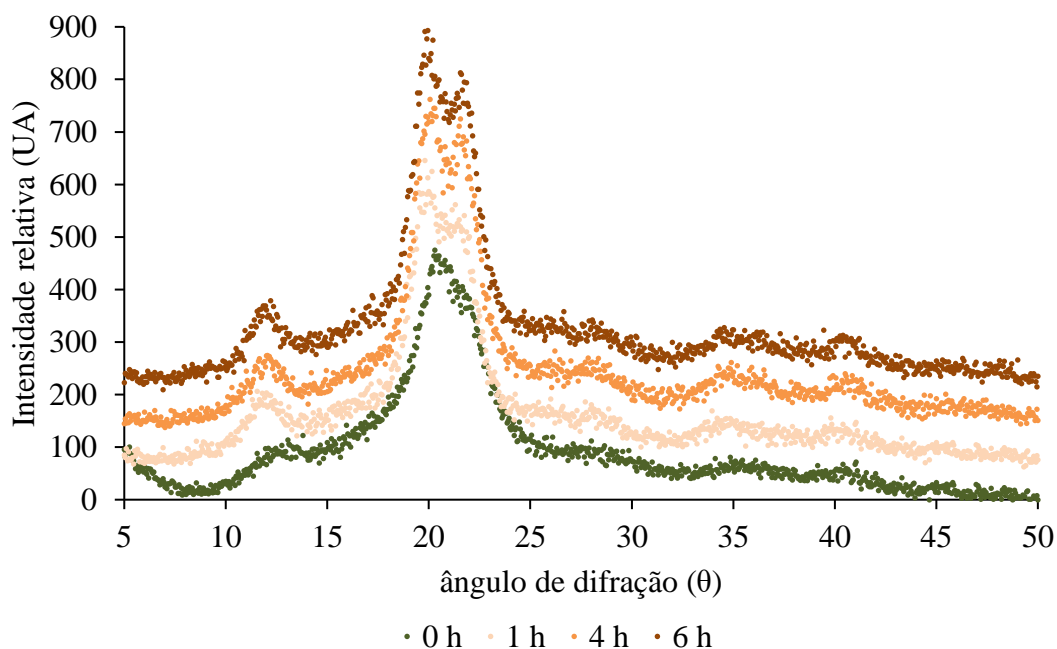


Figura 43 – Difratogramas dos subtratos residuais de hidrólise com diferentes tempos de parada de Avicel PH-101 de pré-tratado por ([EMIM][OAc]) a 120°C por 120 min

O índice de cristalinidade para o alomorfo II capturou o aumento da intensidade dos picos para esse tipo de celulose ao longo da reação. Ao passo que o Avicel pré-tratado em 120°C por 120 min possuía IC= 0,34, verificou-se seu aumento para 0,41 em 1h de reação, passando para 0,45 em 4 h e finalmente 0,49 em 6 h de reação (Figura 44).

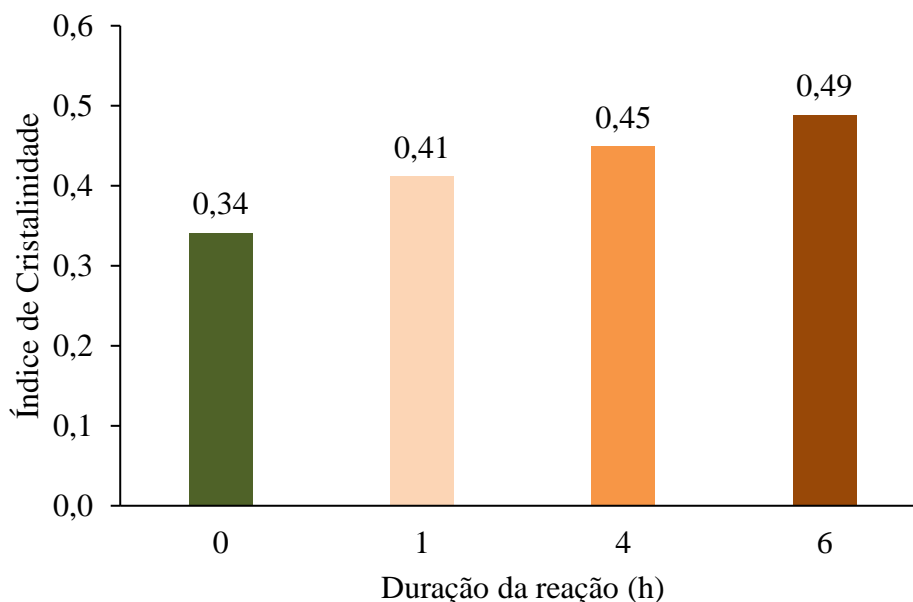


Figura 44 – Índice de cristalinidade para celulose II dos substratos residuais de hidrólise com diferentes tempos de parada de Avicel PH-101 pré-tratado a 120°C em 120 min

O aumento do índice de cristalinidade com o avanço reacional indicou que as enzimas celulasas hidrolisam o conteúdo amorfo mais rapidamente, não só com relação ao o alomorfo de celulose 1 β (Heriksson *et al.*, 2005), mas também para a celulose II. Sendo assim, o aumento de conteúdo cristalino junto ao substrato residual pode explicar a diminuição da taxa reacional ao longo do tempo de hidrólise. Todavia, imagina-se que a hidrólise da celulose II aconteça em taxas mais elevadas do que para a celulose 1 β .

Andersen (2007) argumenta que o aumento da fração cristalina do substrato celulósico ao longo da reação aumentaria os índices de cristalinidade desse substrato, explicando os perfis de conversão teórica e experimental do substrato ao longo da reação. O aumento de cristalinidade explicaria parcialmente o não atingimento dos valores teóricos esperados para a conversão da reação de hidrólise. A autora discorre que as rápidas taxas iniciais de reação são atribuídas à presença da celulose amorfa estar mais acessível às celulasas do que a celulose cristalina, provavelmente apoiando-se nos

achados da década de 1980 que atribuíam à limitação da hidrólise à cristalinidade do substrato. Mas a real contribuição dessa característica no processo precisa ser mais investigada (Júnior, 2011).

Aliado ao aumento da cristalinidade pelo consumo preferencial da fração amorfa da amostra, a área superficial dos pré-tratados decresceu sob a ação das enzimas celulases. Enquanto a amostra não hidrolisada possuía 143,9 m²/g, na primeira hora de reação, a área superficial reduziu para 14,5 m²/g, diminuindo novamente para 6 h de reação, para 9,7 m²/g (Figura 45).

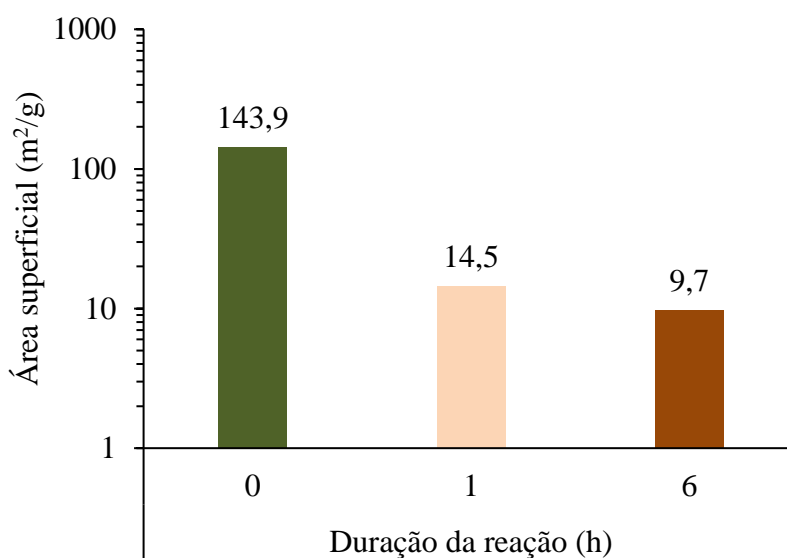


Figura 45 – Área superficial dos resíduos de hidrólise de diferentes tempos reacionais de Avicel PH-101 pré-tratado a 120°C em 120 min

A redução da área decorrente da reação foi acompanhada por alterações significativas na morfologia do Avicel pré-tratado, desde a primeira hora de reação. O material pré-tratado não reagido apresentava partículas com aspecto reticulado e poroso (Figura 46a) ao passo que as partículas parcialmente hidrolisadas tinham aspecto mais compacto e liso (Figura 46ceg). Também, observou-se que as partículas durante a hidrólise diminuíram seu tamanho com relação a partícula não hidrolisada. Nota-se na (Figura 46a) uma partícula de diâmetro aparente de ~50 µm e também alguns debris menores presentes na porção superior a direita. As maiores partículas dos demais tempos reacionais tinham tamanho médio na ordem de 25-35 µm, mas percebia-se menores particulados de várias frações do tamanho dessas maiores partículas.

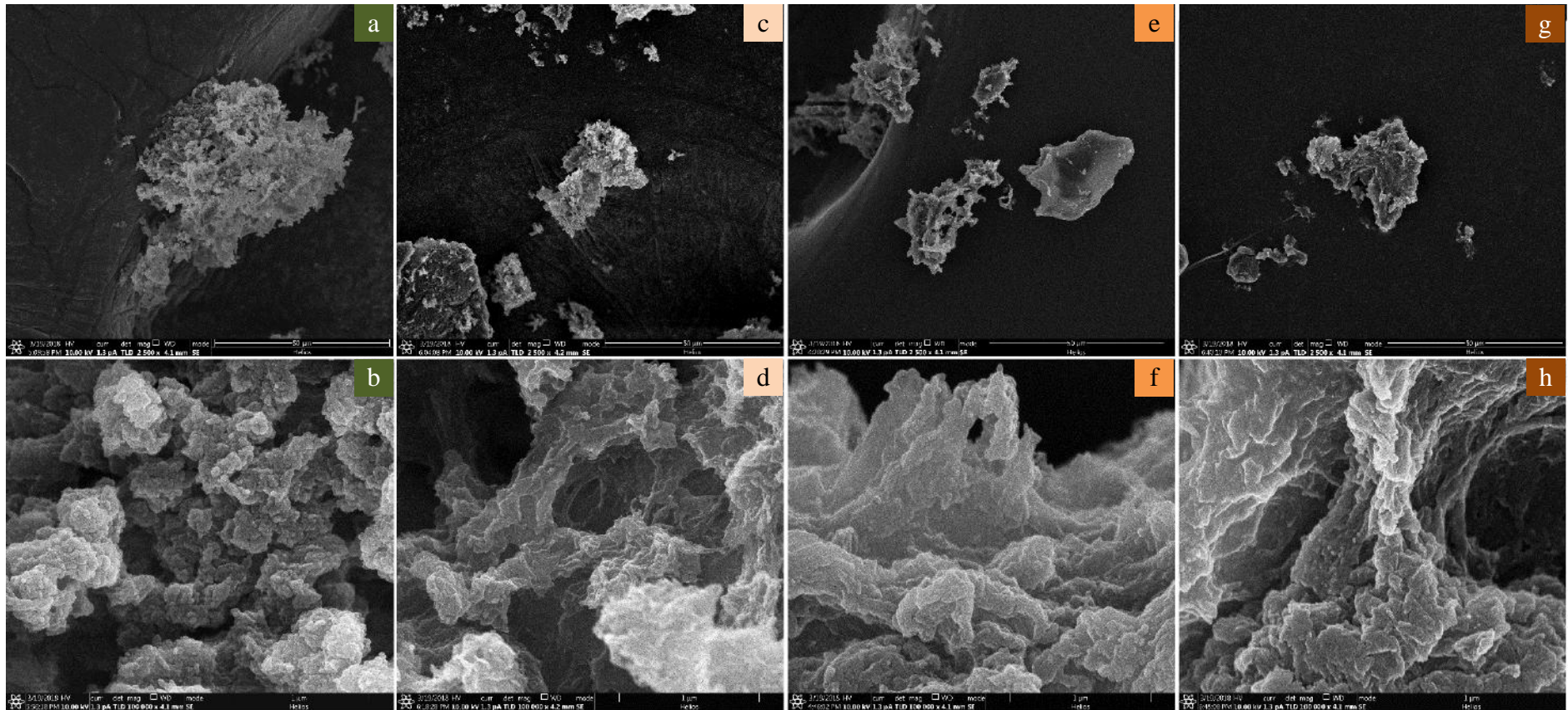


Figura 46 – Micrografias eletrônicas de resíduos de hidrólise de diferentes tempos racionais de Avicel PH-101 pré-tratado por ([EMIM][OAc]) a 120°C por 120min. Partículas dos resíduos de hidrólise em tempos de a-0 min (não hidrolisado); c-1 h; e-4 h; g- 6 h; Superfícies dos resíduos de hidrólise em tempos de c-0 min (não hidrolisado); d-1 hora; f-4 horas; h- 6 horas; Figuras a, c, e, g - aumento de 2500 X; Figuras b, d, f, h - aumento de 100000 X.

A redução de tamanho das partículas celulósicas pela hidrólise enzimática foi confirmada pela técnica de espalhamento de luz dinâmico (Figura 47). Verificou-se redução do tamanho médio de partículas entre 3 e 4 vezes, pois o tamanho médio de partícula antes da hidrólise era de 270,3 μm , ao passo que em 1 h de reação o tamanho médio caiu para 67,5 μm , passando para 72,0 μm em 4 h de reação e 85,8 μm em 6 h de reação (Figura 47). Interessantemente, verificou-se que o diâmetro médio de partícula aumentou com o tempo de hidrólise e seus valores aproximaram-se do tamanho médio da partícula de avicel sem pré-tratamento, já que a média de tamanho dessa partícula era de 81,1 μm (Figura 40). Imagina-se que degradadas partículas maiores e mais susceptíveis ao ataque das enzimas, partículas menores passam a ser consumidas mais rapidamente pela maior área relativa que elas possuem com relação às demais.

Alterações em nível de superfície dos materiais residuais também foram observadas, principalmente com relação à diminuição de microporos, da rugosidade e de protuberâncias dos materiais (Figura 46dfh). O material com 1 h de reação tem alargamento dos poros, formando sulcos mais largos e cavidades (Figura 46d). Algumas poucas protuberâncias do material ainda podem ser observadas, mas o aspecto rugoso é fortemente diminuído em comparação com o material não pré-tratado (Figura 46b). Em 4 h e 6 h de hidrólise, percebe-se uma superfície muito mais lisa (Figura 46fh), porém em 6 h observou-se a formação de cavidades mais amplas (Figura 46h).

As mais altas taxas iniciais para os pré-tratados de Avicel com ([EMIM][OAc]) com relação aos demais materiais (Figura 41) estavam mais associadas à variação na área superficial desses materiais do que da cristalinidade, mas a cristalinidade exerceu bastante influência no processo. Para o período de 6 h de reação, aumentou-se 44,1% da cristalinidade inicial (Figura 44) enquanto reduziu-se 93,3% da área superficial inicial (Figura 45). Ademais, a variação do tamanho de partícula pode contribuir com informação relevante sobre a dinâmica da hidrólise dos materiais pré-tratados por ([EMIM][OAc]) haja visto que foi observada diminuição de 4x o diâmetro de partícula na primeira hora de hidrólise e aumento de 22% desse diâmetro até as 6 h de reação.

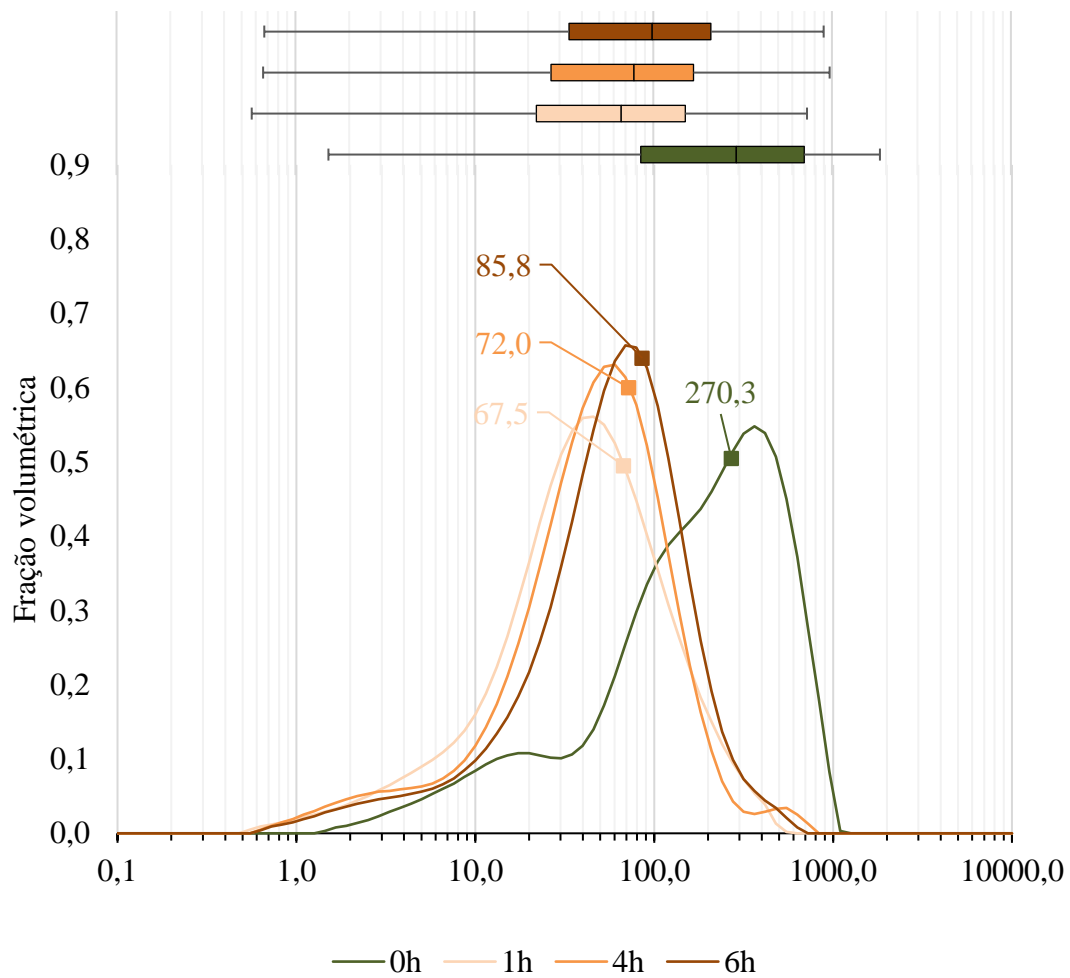


Figura 47 – Distribuição do tamanho de partícula dos subtratos residuais de hidrólise com diferentes tempos de parada de Avicel PH-101 pré-tratada por ([EMIM][OAc]) a 120°C por 120 min, com representação boxplot dos dados. As médias de diâmetro de partícula são mostradas nos pontos do gráfico.

6.4. Modelagem matemática

6.4.1. Simulação de modelos adaptados para descrever diferentes componentes e rotas reacionais

Os parâmetros utilizados nas diferentes simulações encontram-se nas Tabela 8 e Tabela 9, e determinaram os resultados de simulação dos respectivos casos 1 e 2. Esses parâmetros são originários do trabalho de Tsai *et al.* (2014), sendo alguns deles modificados para representar certas condições especificadas em cada caso abaixo detalhado.

6.4.1.1. Caso 1: Adaptação do modelo de Tsai *et al.* (2014) para celulose em uma fase, sorção enzimática transiente, inativação celulásica e sistema de equações diferencial

A simulação desse modelo pretendeu descrever os efeitos da presença da dessorção de celulase e β -glicosidase, tão bem quanto a capacidade desse modelo em demonstrar as enzimas celulasas sendo inativadas durante o processo hidrolítico. Tal opção adveio da necessidade de reverter a incapacidade do modelo de Tsai *et al.* (2014) em descrever as menores taxas de reação de uma fração cristalina para uma mistura de fases de celulose sem acoplar a menor taxa com adsorção improdutiva e acumulativa de celulase.

Foram utilizados para esse teste os parâmetros da Tabela 8, que foi derivada da tabela de parâmetros do trabalho de Tsai *et al.* (2014). Foram acrescentados parâmetros para as novas reações acrescentadas, de modo que instituiu-se os parâmetros de taxa de dessorção de enzima celulase como menores do que de sua adsorção $K_{6r}^* = 0,005 < K_{aCelc} = 1,238$ (Wang *et al.*, 2012).

Tabela 8 – Parâmetros utilizados para as simulações dos modelo cinético do Caso 1 para diferentes características e rotas reacionais. Adaptado de Tsai *et al.* (2014)

Parâmetro	Descrição	Valor
$E_{maxCelC}$	Concentração limite de adsorção de celulase em celulose	0,03257
$E_{maxN188}$	Concentração limite de adsorção de β -glicosidase em celulose	0,00102
K_{11G}^*	Constante de inibição da glicose sobre a reação de conversão de celulose em celobiose	0,0947
K_{11G2}^*	Constante de inibição da celobiose sobre a reação de conversão de celulose em celobiose mediada por celulase	0,0042
K_{11X}^*	Constante de inibição da xilose sobre a reação de conversão de celulose em celobiose	0,00859
K_{1r}^*	Constante de taxa da conversão de celulose em celobiose por celulase	18,86
K_{21G}^*	Constante de inibição da glicose sobre a reação de conversão de celulose em glicose	0,01509
K_{21G2}^*	Constante de inibição da celobiose sobre a reação de conversão de celulose em glicose	147,87
zK_{21X}^*	Constante de inibição da xilose sobre a reação de conversão de celulose em glicose	0,0097
K_{2r}^*	Constante de taxa da conversão de celulose em glicose	7,926
K_{3iG}	Constante de inibição da glicose sobre a reação de conversão de celobiose em glicose	0,9617
K_{3iX}	Constante de inibição da xilose sobre a reação de conversão de celobiose em glicose	12,614
K_{3r}	Constante de taxa da conversão de celobiose em glicose	228,264
K_{3M}	Constante de Michaelis da reação de conversão de celobiose em glicose	3,1740
K_{6r}^*	Constante de dessorção de celulase adsorvida em celulose	0,005
K_{7r}^*	Constante de inibição processual de enzima celulase adsorvida sobre celulose	0,05
K_{8r}^*	Constante de dessorção de β -glicosidase adsorvida em celulose	2,0
K_{aCelC}	Constante de equilíbrio de adsorção da enzima celulase em celulose	1,238
K_{aN188}	Constante de equilíbrio de adsorção da enzima β -glicosidase em celulose	1,865
R_s	Constante de reatividade da celulose	1,0

Também foi admitido que a taxa de dessorção da enzima β -glicosidase seria maior do que da celulase $K_{3r}^* = 2,0$. Isso porque fora reportada a irreversibilidade de dessorção de algumas CBH I e II (Zhu *et al.*, 2009), além da divulgada ausência de CBM nas β -

glicosidasas (Huang *et al.*, 2017) e sua baixa afinidade a Avicel (Zheng *et al.*, 2016). A taxa de inativação processiva da celulase foi considerada maior do que a sua dessorção $K_{7r}^* = 0,05$ dado que Hatfield, 2010 mostrou que alguns autores suportam que a adsorção de CBH I não é completamente irreversível. Outros estudos citados no seu trabalho, contradizem os achados de irreversibilidade das enzimas.

A simulação do modelo para as condições iniciais impostas demonstraram a descrição da celulose (S) sendo degradada parcialmente, mostrando a liberação da celobiose (G2) como intermediário reacional, que era degradado, por sua vez, para formar glicose (G). Deve ser ressaltado que o modelo desse caso descreve a liberação de glicose pela degradação direta de celulose (Figura 48a). Na figura seguinte (Figura 48b), observou-se que as espécies celulásicas (EbCelC) adsorveram muito mais intensamente do que as celobiásicas (EbN188). A adsorção das celulases se relacionou com a queda das concentrações dessas enzimas não adsorvidas (EfCelC). Também, verificou-se que a queda das celulases livres foi maior do que a das β -glicosidasas (EfN188).

O perfil das enzimas hidrolíticas revelou aspectos interessantes. Notou-se que a quantidade de β -glicosidasas adsorvidas (EbN188) era menor do que das celulases. Também, na medida em que era consumida a celulose que a suportava, a adsorção dessas enzimas era sucedida pela sua liberação para a forma solúvel (EfN188). Para as enzimas celulases verificou-se que o consumo da espécie de enzima ligada (EbN188) estava mais deslocado no sentido de formar espécies inibidas (ExCelC) do que livres (EfCelC), pois a concentração dessas últimas espécies não aumentaram no decréscimo das espécies já adsorvidas. Assim, a concentração de celulases inibidas (ExCelC) aumentou ao longo do tempo. Em 100 h a quantidade de enzimas inibidas representou quase a totalidade das celulases adicionadas no sistema no momento inicial.

A concentração de celulose (S) sendo degradada parcialmente mostra como a inibição das celulases (ExCelC) reflete o consumo incipiente do substrato, mesmo quando ele está em abundância. Esse dado é importante para mostrar como a inibição das celulases adsorvidas, que influencia negativamente a liberação de glicose, está desacoplada do fenômeno de adsorção, que influencia positivamente a geração desse composto final.

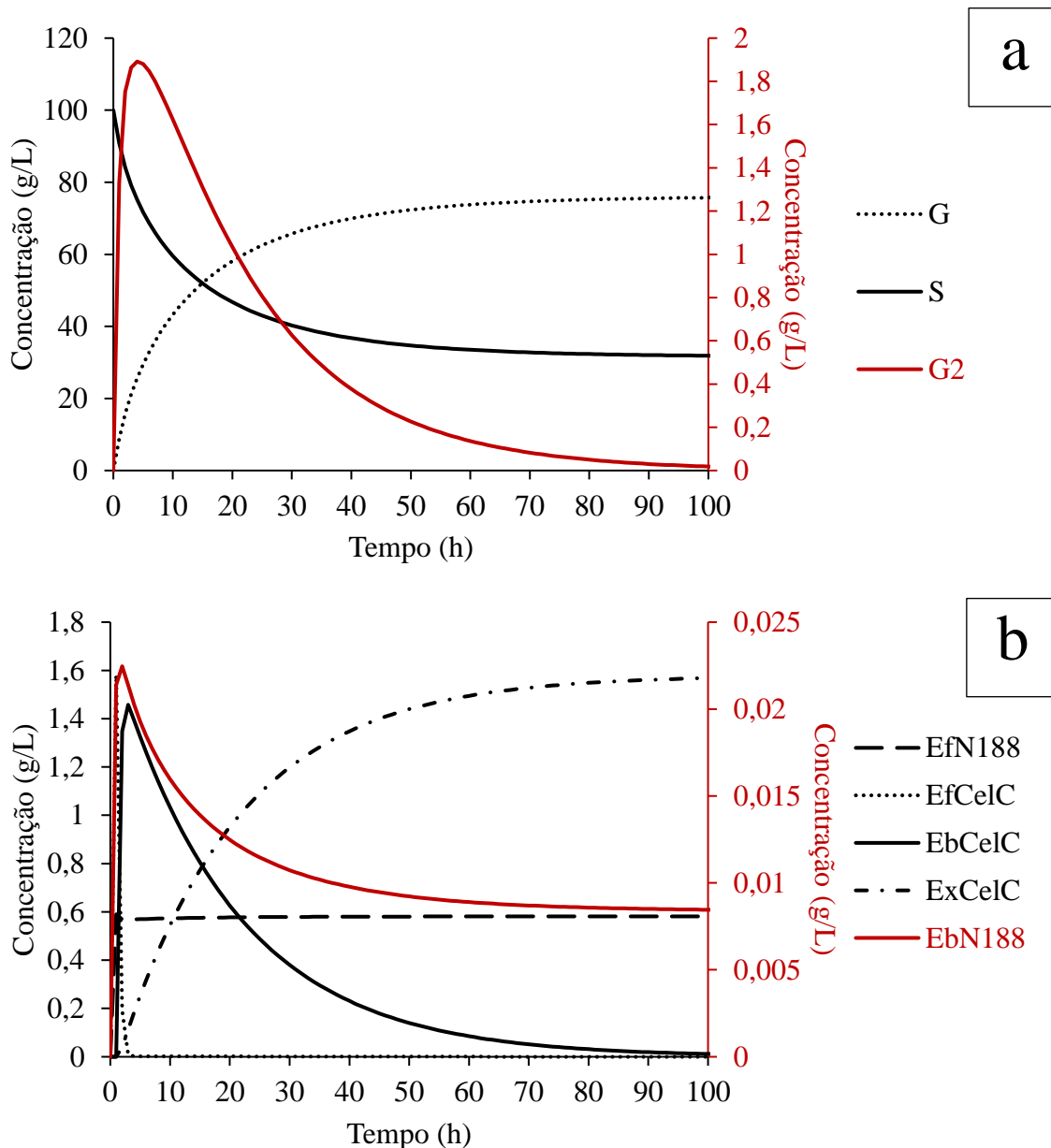


Figura 48 – Simulação das variáveis do modelo de Tsai *et al.* (2014) adaptado em cenário com celulose. $S_{(0)} = 100 \text{ g.L}^{-1}$; $G_{2(0)} = 0 \text{ g.L}^{-1}$; $G_{(0)} = 50 \text{ g.L}^{-1}$; $EfCelC_{(0)} = 1,58 \text{ g.L}^{-1}$; $EfN188_{(0)} = 0,59 \text{ g.L}^{-1}$; $EbCelC_{(0)} = 0 \text{ g.L}^{-1}$; $ExCelC_{(0)} = 0 \text{ g.L}^{-1}$; $EbN188_{(0)} = 0 \text{ g.L}^{-1}$. a – descrição das espécies reativas; b – descrição das enzimas.

Verificou-se que o sistema proposto foi capaz de descrever as variáveis de processo de forma satisfatória. Tanto por mostrar a concentração das espécies reacionais, quanto por desacoplar os efeitos de adsorção e inibição enzimática que estavam confundidas na proposta anterior a essa. Assim, verificou-se um avanço descritivo substancial ao permitir atribuir fenomenologicamente à inativação enzimática como causa pela reatividade incipiente. Todavia, pode ser proposto um novo modelo

incorporando duas fases compondo o material celulósico a ser hidrolisado. Esse modelo pode contribuir na compreensão do processo hidrolítico, sobretudo quando se alteram as quantidades dessas fases aplicando-se um pré-tratamento. Devido às mudanças físicas ocorridas no substrato pré-tratado, incorporar a área superficial influenciando na adsorção enzimática é desejada para mostrar como tais alterações se relacionam com as taxas reacionais ao longo da hidrólise.

6.4.1.2. Caso 2: Adaptação do modelo de Tsai *et al.* (2014) para celulose em duas fases, sorção enzimática transiente dependente de área superficial do substrato, inativação celulásica e sistema de equações diferencial

A adaptação do Caso 2 pretendeu incorporar os ganhos descritivos ao processo, tendo-se um modelo contendo duas fases de substrato, adsorção das enzimas dependente de área superficial do substrato, de forma a agregar as adaptações do trabalho de Tsai *et al.* (2014). Assim, foi desejado representar o comportamento de taxa como dependente de duas frações de celulose, amorfa e cristalina. Foram concebidas duas espécies enzimáticas, celulásica e betaglicosidásica e o balanço de enzimas descrito por equações diferenciais. Também foram incorporadas os fenômenos de desorção das enzimas celulases e β -glicosidases. Por meio desse modelo, pretendeu-se relacionar a inativação enzimática como consequência da fração cristalina na amostra. Assim, incorporou-se inativação da celulase uma vez adsorvida sobre celulose cristalina do Caso 1 (Seção 6.4.1.1) (Praestgaard *et al.*, 2011).

Os parâmetros gerais adotados para essas simulações foram adotados do trabalho de Tsai *et al.* (2014) (Tabela 9). Alguns merecem considerações especiais, como área da celulose amorfa assumida como maior do que da cristalina $A_a = 3,0 \text{ m}^2/\text{g}$; $A_{c1} = 0,5 \text{ m}^2/\text{g}$. Outros foram adaptados parâmetros do Caso 1 (Tabela 8) para valores que melhor representassem a dinâmica esperada das variáveis de estado. As constantes sobre a quantidade máxima de celulase adsorvida, tanto em celulose amorfa, quanto cristalina foram iguais $E_{maxCelCa} = E_{maxCelC1} = 0,003257 \frac{g_{CelC}}{g_{cel}}$.

Tabela 9 – Parâmetros utilizados para as simulações dos modelo cinético do Caso 2 para diferentes características e rotas reacionais. Adaptado de Tsai et al. (2014)

Parâmetro	Descrição	Valor
A_a	Área superficial de celulose amorfa	3,0
A_{c1}	Área superficial de celulose cristalina I β	0,5
$E_{maxCelCa}$	Concentração limite de adsorção de celulase em celulose amorfa	0,003257
$E_{maxCelCc1}$	Concentração limite de adsorção de celulase em celulose cristalina	0,003257
$E_{maxN188}^\dagger$	Concentração limite de adsorção de celulase em celulose amorfa e cristalina	0,00102
K_{1IG}^\dagger	Constante de inibição da glicose sobre a reação de conversão de celulose amorfa em celobiose	947,0
K_{1IG2}^\dagger	Constante de inibição da celobiose sobre a reação de conversão de celulose amorfa em celobiose por celulas	42,0
K_{1r}^\dagger	Constante de taxa da conversão de celulose amorfa em celobiose por celulase	0,8
K_{2IG}^\dagger	Constante de inibição da glicose sobre a reação de conversão de celulose em glicose	947,0
K_{2IG2}^\dagger	Constante de inibição da celobiose sobre a reação de conversão de celulose cristalina em celobiose	42,0
K_{2r}^\dagger	Constante de taxa da conversão de celulose cristalina em celobiose	0,4
K_{3iG}	Constante de inibição da glicose sobre a reação de conversão de celobiose em glicose	0,9617
K_{3r}	Constante de taxa da conversão de celobiose em glicose	228,826
K_{3M}	Constante de Michaelis da reação de conversão de celobiose em glicose	3,1740
K_{5r}^\dagger	Constante de inibição processual de enzima celulase adsorvida sobre celulose cristalina	1,4
K_{7r}^\dagger	Constante de inibição processual de enzima celulase adsorvida sobre celulose amorfa	0,005
K_{8r}^\dagger	Constante de inibição processual de enzima celulase adsorvida sobre celulose cristalina	0,005
K_{9r}^\dagger	Constante de inibição processual de enzima celulase adsorvida sobre celulose amorfa	0,005
K_{aCelCa}^\dagger	Constante de equilíbrio de adsorção da enzima celulase em celulose amorfa	1,238
$K_{aCelCc1}^\dagger$	Constante de equilíbrio de adsorção da enzima celulase em celulose cristalina para alomorfo I β	1,238
K_{aN188}^\dagger	Constante de equilíbrio de adsorção da enzima β -glicosidase em celulose	0,1865

Foram admitidas iguais as taxas de dessorção, inativação da celulase e a taxa de dessorção de β -glicosidase $K_{7r}^{\dagger} = K_{8r}^{\dagger} = K_{9r}^{\dagger} = 0,005 \text{ g.L}^{-1}$. Os valores atribuídos foram menores, tanto frente às taxas de adsorção das celulases sobre as fases cristalina e amorfa, $K_{aCelCa} = K_{aCelCc1} = 1,238 \text{ L.g}^{-1} \text{ CelC}$, quanto para a taxa de adsorção da β -glicosidase sobre a celulose $K_{aN188} = 0,1865 \text{ L.g}^{-1} \text{ N188}$. Os parâmetros de taxa admitiram maior susceptibilidade da celulose amorfa de ser degradada $K_{1r}^{\dagger} = 0,8 \text{ g.L}^{-1}$ do que celulose cristalina $K_{2r}^{\dagger} = 0,4 \text{ g.L}^{-1}$.

A simulação permitiu verificar que as maiores taxas de formação glicose (G) se encontravam no início da reação (Figura 49a). Esse acréscimo se relacionava mais com a maior taxa de degradação da celulose amorfa (Sa) do que a cristalina (Sc1). Todavia, em tempos mais avançados de reação, as taxas de formação de glicose (G) se aproximavam da taxa de degradação da celulose cristalina (Sc), sobretudo a partir de 10 h de reação. Isso porque a celulose amorfa já tinha sido quase toda degradada. Logo, a fração remanescente a ser degradada era da celulose cristalina e suas propriedades eram determinantes para ditar o comportamento da celulose total.

Por outro lado, a concentração das celulases livres (EfCelC) e β -glicosidases livres (EfN188) ao longo do tempo de hidrólise decresceram (Figura 49b), porém em intensidades distintas. Notou-se que as enzimas celulásicas adsorveram muito mais rapidamente, tanto junto à superfície da celulose cristalina (EbCelCc1) e amorfa (EbCelCa) do que enquanto as celobiásicas junto a celulose (EbN188). Além disso, verificou-se que as enzimas inibidas sobre celulose cristalina foram mais inibidas (ExCelCc1) do que frente à celulose amorfa (ExCelCa). Notou-se que o processo de adsorção prevaleceu sobre o de dessorção e o de liberação de enzimas. As celulases eram competitivamente inibidas em detrimento à sua adsorção.

A partir do modelo com dois substratos, foi possível executar a simulação de condições hipotéticas para reações com diferentes substratos, cada um deles com distintas frações de conteúdo amorfo (Sa) e cristalino (Sc1). Para essa simulação, foram alterados alguns parâmetros de taxa anteriormente pré-estabelecidos (Tabela 9) para facilitar a visualização do gradiente de respostas produzidas. Citam-se $K_{1r}^{\dagger} = 8,0$ e $K_{2r}^{\dagger} = 0,5$.

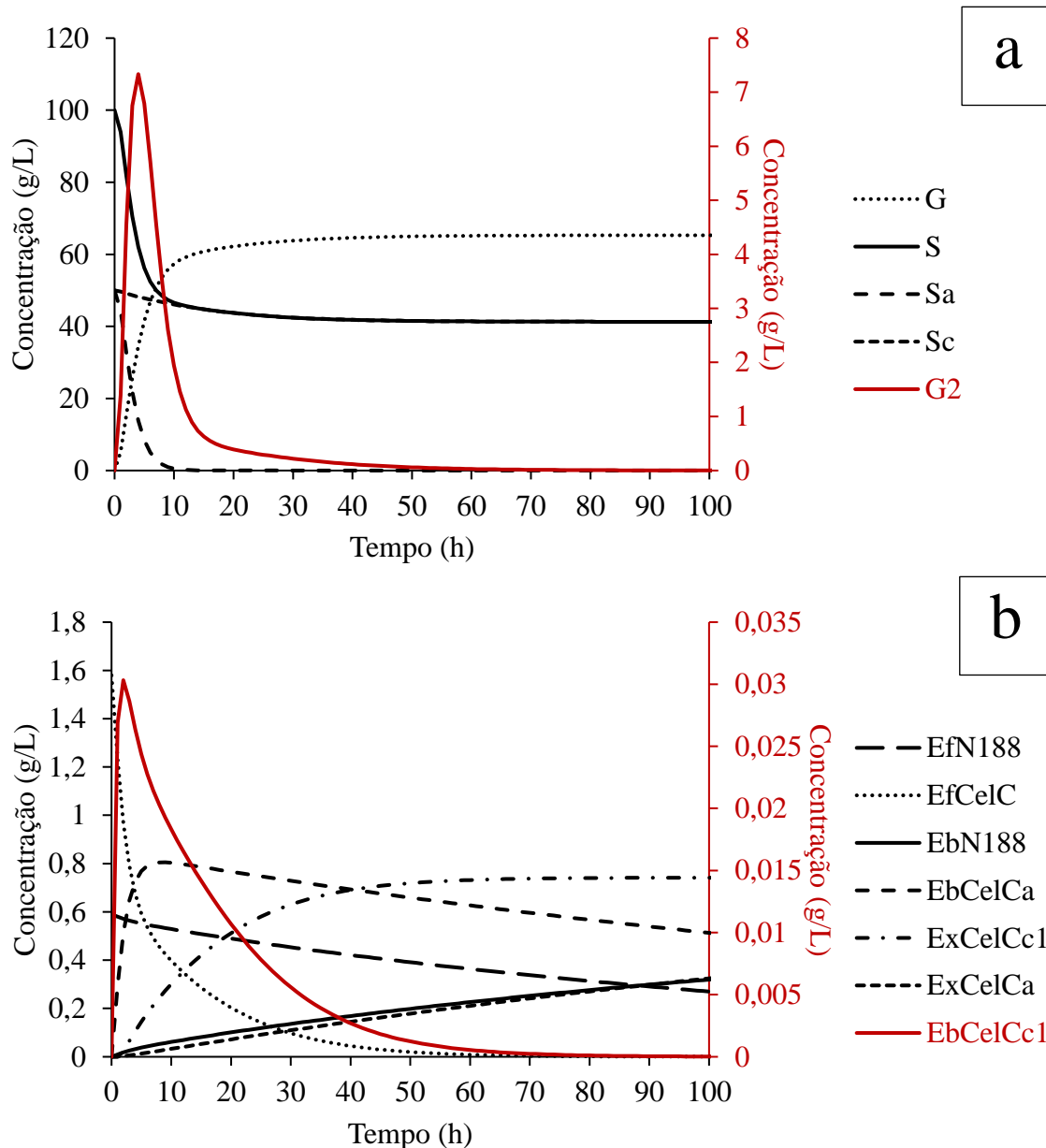


Figura 49 – Simulação do modelo cinético com dados de hidrólise de celulose amorfa e cristalina e parâmetros adaptados de Tsai *et al.*, 2014. $S_{(0)} = 100 \text{ g.L}^{-1}$, sendo $S_{a(0)} = 50 \text{ g.L}^{-1}$; $S_{c(0)} = 50 \text{ g.L}^{-1}$; $G_{2(0)} = 0 \text{ g.L}^{-1}$; $G_{(0)} = 0 \text{ g.L}^{-1}$, $EfCelC_{(0)} = 1,58 \text{ g.L}^{-1}$, $EfN188_{(0)} = 0,59 \text{ g.L}^{-1}$, $EbCelCa_{(0)} = 0 \text{ g.L}^{-1}$, $EbCelCc1_{(0)} = 0 \text{ g.L}^{-1}$, $ExCelCc1_{(0)} = 0 \text{ g.L}^{-1}$, $EbN188_{(0)} = 0 \text{ g.L}^{-1}$, $t=168 \text{ h}$. a- descrição das espécies reativas; b- descrição das enzimas.

Os resultados de simulação conseguiram descrever a variação de liberação do produto da rota reacional, glicose, seguindo a composição do conteúdo da fração cristalina e amorfa do substrato (Figura 50). Verificou-se que quanto maiores eram as frações mássicas de celulose amorfa (Sa), maiores eram as taxas iniciais e rendimentos reacionais e maiores eram os formatos hiperbólicos da curva de glicose. Na medida em que

crescia o conteúdo cristalino na mistura, a hipérbole suavizava suas curvas. Embora a representação do modelo cinético em duas fases seja incomum, o decréscimo das fases descrita celulose seguiu os modelos anteriores para uma única fase (Kadam *et al.*, 2004; Angarita *et al.*, 2014, Kadam *et al.*, 2014).

O comportamento das demais variáveis de processo na medida em que eram alterados os conteúdos de componentes amorfo e cristalino do substrato foi demonstrado no Anexo III. Percebeu-se que a menor reatividade de celulose cristalina estava descrita em termos da sua maior capacidade em inibição das enzimas celulases sobre si. Para celulose amorfa, verificou-se uma inibição muito menos bem sucedida.

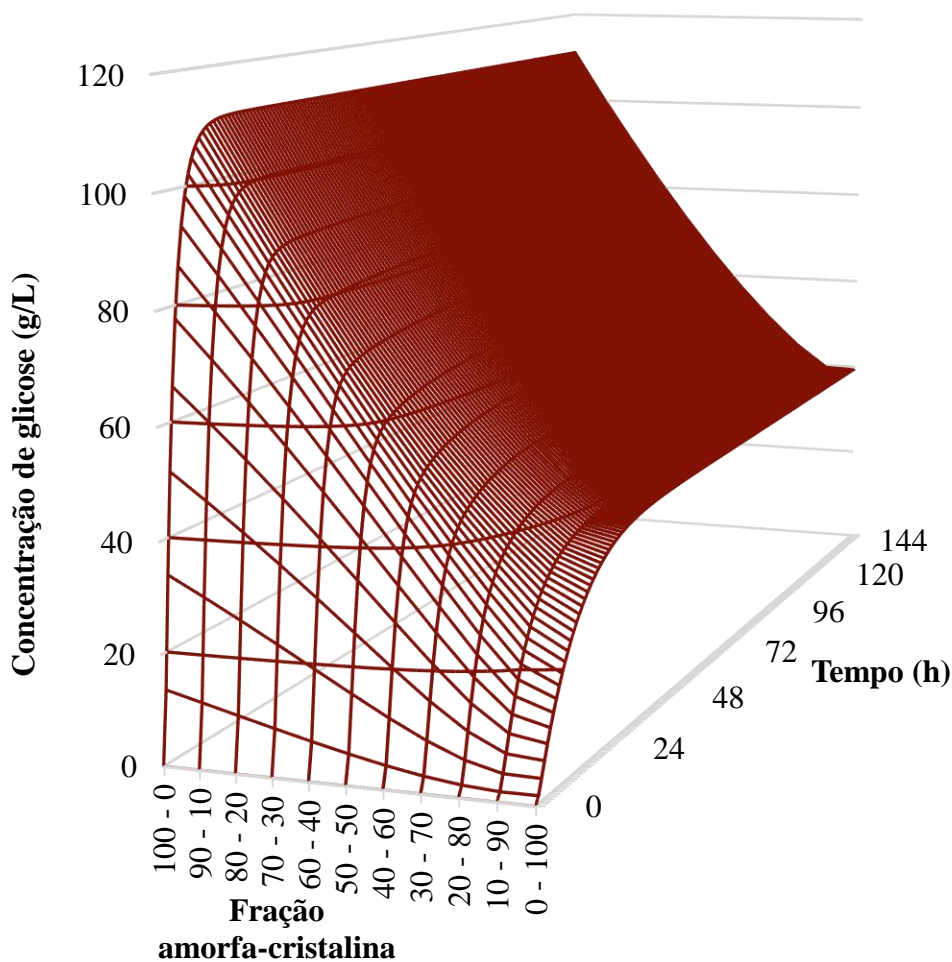


Figura 50 – Simulação do modelo cinético com dados de hidrólise de celulose amorfa e cristalina e parâmetros de Tsai *et al.*, 2014. $S_{(0)} = 100 \text{ g.L}^{-1}$, sendo $S_{a(0)} = 50 \text{ g.L}^{-1}$; $S_{c(0)} = 50 \text{ g.L}^{-1}$; $G_{2(0)} = 0 \text{ g.L}^{-1}$; $G_{(0)} = 0 \text{ g.L}^{-1}$; $EfCelC_{(0)} = 1,58 \text{ g.L}^{-1}$; $EfN188_{(0)} = 0,59 \text{ g.L}^{-1}$; $EbCelCa_{(0)} = 0 \text{ g.L}^{-1}$; $EbCelCc1_{(0)} = 0 \text{ g.L}^{-1}$; $ExCelCc1_{(0)} = 0 \text{ g.L}^{-1}$; $EbN188_{(0)} = 0 \text{ g.L}^{-1}$; $t=168 \text{ h}$.

Essa nova descrição do fenômeno de hidrólise incrementou o detalhamento do sistema ao aglutinar os ganhos descritivos das representações anteriores. Percebeu que é possível descrever a celulose em duas fases, sendo degradada por duas enzimas, cada uma com adsorções dependentes da área do substrato e suas inibições mediante adsorção. Foi possível também isolar os efeitos das características do substrato, área superficial e cristalinidade no processo pelas equações. Uma vez que o sistema admite premissas exclusivas, se torna necessário reestimar os parâmetros do modelo para os dados experimentais, para melhorar o entendimento do comportamento do sistema.

6.5. Estimação de parâmetros

Nessa seção serão apresentados os resultados de estimação utilização para as duas adaptações do modelo de Tsai *et al.*, 2014. Essas versões utilizaram dos dados experimentais de concentração de glicose do trabalho citado para executar a estimação de seus parâmetros. Tais dados se encontram no (Anexo IV – Dados experimentais utilizados em estimação) Para essas estimativas, cabe ressaltar que os dados de celulose ao longo do tempo não estavam disponíveis e os de celobiose incompletos, logo não puderam ser usados. Bem como resalta Angarita (2014), essa ausência de dados implica que o modelo predirá ao longo do tempo as variáveis cujas medidas encontram-se indisponíveis. Isso colabora com o aumento da correlação entre os parâmetros estimados.

6.5.1. Estimação do modelo do Caso 1: Adaptação do modelo de Tsai *et al.* (2014) para celulose em uma fase, sorção enzimática transiente, inativação celulásica e sistema de equações diferencial

O ajuste do modelo do Caso 1 para os dados experimentais foi conseguido com a determinação dos seus 19 parâmetros para ajustar aos dados experimentais de glicose. Foram observados com 15 graus de liberdade com a estimação, conforme mostra a Tabela 10. O aumento de 14 parâmetros do trabalho de Tsai *et al.* (2014) para 19 para o Caso 1 desse trabalho se deveu justamente a incorporação das equações de adsorção para duas espécies enzimáticas sobre a celulose.

Tabela 10 – Dados de estimação do modelo de hidrólise enzimática de Avicel PH-101 para o caso 1.

Nº de parâmetros	Número de experimentos (pontos)	Número de experimentos (casos)	Graus de liberdade	Função objetivo
19	260	34	15	51842,56

Os dezenove parâmetros ajustados para o modelo no Caso 1 encontram-se na (Tabela 11). Resumiu-se a apresentação dos parâmetros cinéticos da literatura, pois os parâmetros nomeados similarmente por outros estudos não representavam as mesmas reações do que as apresentadas nesse trabalho. Ainda que a comparação seja possível entre os parâmetros listados, ela deve ser feita com cautela, pois os dados experimentais dos outros estudos foram levantados em condições diferentes desse trabalho: eventualmente com outros substratos, como os lignocelulósicos, com cargas de sólidos distintas, além de enzimas diferentes das usadas aqui. Excetua-se o caso do trabalho de (Tsai *et al.*, 2014).

A diferença encontrada dos parâmetros entre o Caso 1 e o de Tsai *et al.*, (2014) pode ser entendida em termos da modelagem. Nesse trabalho, foi admitido que os dois extratos microbianos eram responsáveis pelas atividades betaglicosidásicas no sistema reacional quando suas enzimas estivessem livres. Assim, foi conservada a concepção da enzima não adsorvida do extrato de novozymes N188 possuindo a atividade BGase, tal qual Tsai *et al.*, 2014. Todavia também a enzima do extrato de Celluclast quando não adsorvida em celulose possuía atividade BGase. Isso foi feito justamente para que o modelo pudesse explicar a produção de glicose em condições experimentais quando não foi adicionada nenhuma quantidade de Novozymes N188 no sistema. Assim, como as quantidades iniciais de enzimas capazes de promover a conversão de celobiose a glicose eram distintas entre os dois trabalhos, se distanciaram os parâmetros de taxa e de inibição para essas reações. Isso, inclusive, explica os resultados da Tabela 12.

Com relação à inibição, as relações entre as parâmetros desse trabalho se distanciaram daquelas obtidas no trabalho de Tsai *et al.* (2014) principalmente para as reações 1 e 2 (Tabela 12). Para a reação 1, o esforço dessa tese encontrou uma relação entre as constantes K_{1IG2}^* e K_{1IX}^* de oito ordem de grandeza maiores do que K_{1IG}^* . Com relação à celobiose nessa reação, ambos os trabalhos não conseguiam traduzir com seus parâmetros as observações experimentais que mostram que celobiose é um inibidor mais

forte das celulases em comparação com a glicose (Murphy *et al.*, 2013), pois $K_{1IG}^* < K_{1IG}^*$.

Tabela 11 – Parâmetros cinéticos estimados do modelo de hidrólise enzimática de Avicel PH-101 para o Caso 1 diretamente comparáveis com a literatura, adaptado de Angarita (2014).

Parâmetros cinéticos	Este trabalho Caso 1	Tsai, (2014)	Angarita, (2014)	Câmara, (2012)	Zheng, (2007)	Kadam (2004)	Flores- Sánchez (2013)	Prunescu (2013)	Khodaverdi (2012)
K_{1r}^*	17,116								
K_{2r}^*	0,823								
K_{3r}	192,9	228,3	187,8	254,5	267,6	285,5	432,2	252	102,9
K_{3M}	0,0174	3,174	25,5	24,5	25,5	24,3	0,022	24,3	184,8
K_{6r}^*	1,197								
K_{7r}^*	0,0927								
K_{8r}^*	5,8996								
K_{acelC}	2,3242								
$E_{maxCelC}$	0,0022								
K_{aN188}	0,0063								
$E_{maxN188}$	4332,53								
K_{1IG}^*	161046								
K_{1IG2}^*	0,0323								
K_{1IX}^*	0,0006								
K_{2IG}^*	6,0289								
K_{2IG2}^*	$9,3 \times 10^{-5}$								
K_{2IX}^*	6,8323								
K_{3iG}	0,0055	0,9617	0,216	41,75	2,1	3,9	$1,45 \times 10^{-5}$	3,9	1,9
K_{3iX}	0,1467	59,07	-	-	201,0	39,19	-	201	-

Para a reação 2, a maior inibição esperada por celobiose sobre as reações foi captada no trabalho Tsai *et al.* (2014), mas não nesse trabalho. A diferença encontrada entre os dois trabalhos com relação a esses parâmetros é atribuída à incorporação de reações de inativação enzimática nesse modelo do Caso 1. Essa incorporação capturou parte do efeito de decréscimo de atividade ao longo do tempo, explicado pela perda de processividade das celulases. Decréscimo que foi atribuído apenas às inativações por produto sobre as celulases nas reações. A inibição por xilose na reação 2 foi maior do que a causada pela glicose contrariando os achados de que os principais produtos inibidores das reações celulolíticas eram ou glicose ou celobiose (Andrić *et al.*, 2010; Gan *et al.*,

2002). Por outro lado, a relação entre os parâmetros de inibição da reação 3 foram mais próximos do que os das respectivas reações do trabalho de (Tsai *et al.*, 2014). Isso porque a descrição dessa reação não foi alterada com relação a esse trabalho. Esses resultados mostram como a inclusão do efeito de inibição enzimática consegue capturar e descrever a perda de atividade enzimática com eficiência. Mas essa descrição merece ser aperfeiçoada para conseguir capturar a inibição maior da celobiose sobre as enzimas em comparação com a glicose.

Tabela 12 – Comparação entre os parâmetros de inibição relacionados entre si

Parâmetros cinéticos	Este trabalho Caso 1	Tsai, (2014)	Angarita, (2014)	Câmara, (2012)	Zheng, <i>et al.</i> , (2007)	Kadam, <i>et al.</i> , (2004)	Flores- Sánchez <i>et al.</i> , (2013)	Khodaverdi, <i>et al.</i> , (2012)	Prunescu, <i>et al.</i> , (2013)
K_{1IG2}^*/K_{1IG}^*	$2,01 \times 10^{-7}$	0,044	0,2	55,85	0,40	0,15	$1,36 \times 10^{-6}$	158	0,19
K_{1IX}^*/K_{1IG}^*	$3,48 \times 10^{-8}$	0,907	1,7	54,20	--	--	--	--	--
K_{2IG2}^*/K_{2IG}^*	$1,54 \times 10^{-5}$	9799	356	--	13250	3300	6374	756	388
K_{2IX}^*/K_{2IG}^*	1,13	0,643	1,0	58,6	--	--	--	--	--
K_{3iX}/K_{3iG}	26,67	13,12	269,9	426	--	--	309	--	84,10

Obs.: os parâmetros diretamente comparáveis estão assinalados

A análise sobre a qualidade da estimação revelou que o modelo tinha forte associação ($r > 0,97$) para os dados experimentais, cujas variabilidade das variáveis de entrada conseguiam capturar grandemente ($r^2 > 0,94$) a variabilidade da glicose experimental com os parâmetros estimados (Tabela 13). O modelo encontrado se distanciava das concentrações experimentais em um valor médio de 14,66 g/L.

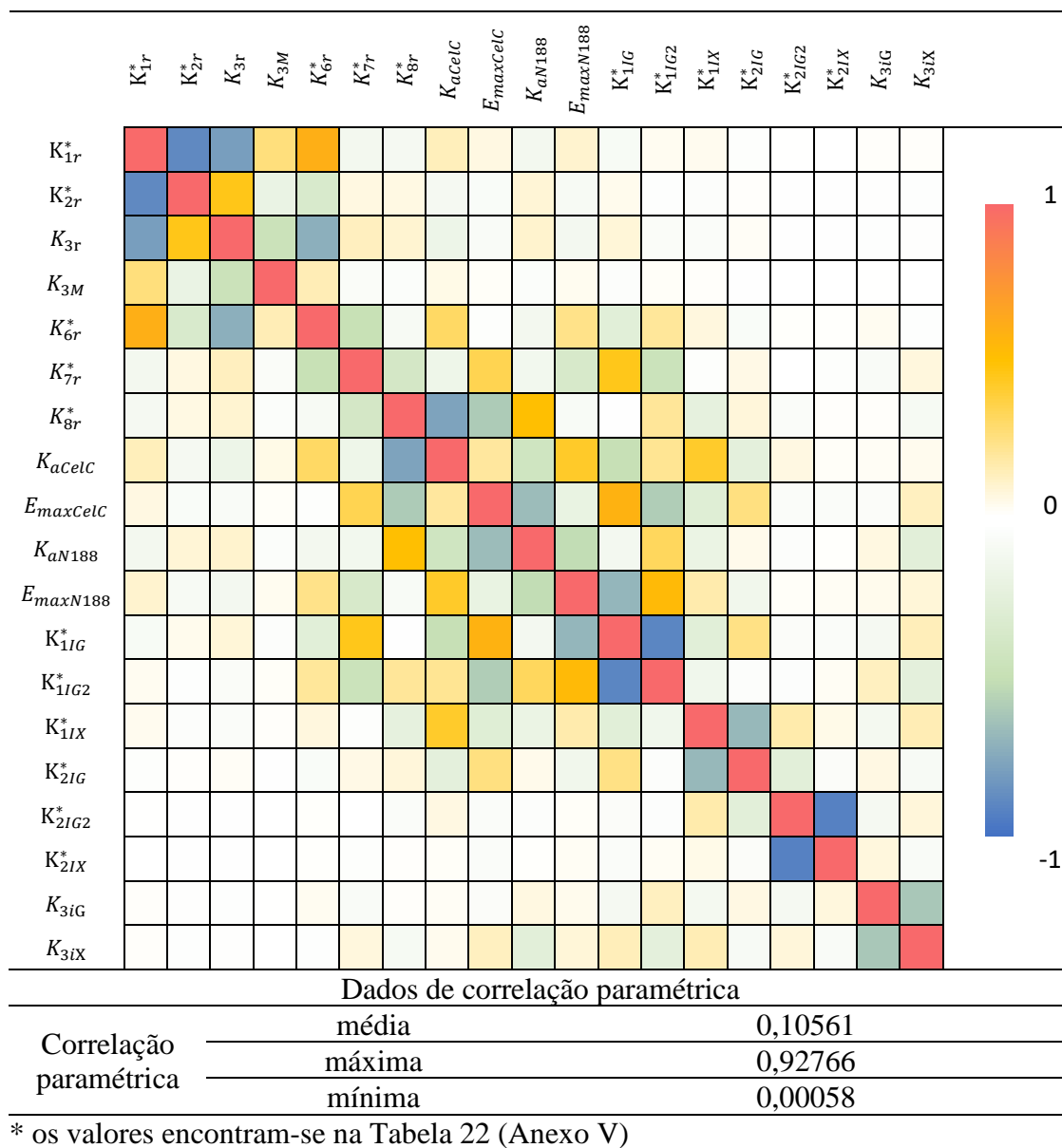
Esse modelo se mostrou significativo para explicar a variância dos dados experimentais segundo o teste F ($p < 0,05$) e todos seus parâmetros foram considerados significativos pelo teste t, cujos valores foram representados com sua respectiva região de confiança (Tabela 13).

Tabela 13 – Análises de qualidade de estimação para o Caso 1 (valor $p = 0,05$)

		Coefficiente de correlação	0,972	
		Coefficiente de determinação	0,946	
		Desvio médio global de predição (g/L)	14,6668	
		Análise de variância via teste F	0,19657 < F=355,083 < 1056,15	
Análise paramétrica				
Parâmetros cinéticos	LICI	Este trabalho	LICS	Significância
				Teste t (significativo para $t > 0$)
K_{1r}^*	17,115	17,116	17,118	292,971
K_{2r}^*	0,823	0,823	0,824	0,677
K_{3r}	192,9	192,9	192,9	37210,5
K_{3M}	0,0174	0,0174	0,0175	0,0003
K_{6r}^*	1,197	1,197	1,198	1,433
K_{7r}^*	0,0924	0,0927	0,0929	0,0085
K_{8r}^*	5,8993	5,8996	5,8998	34,805
K_{aCelC}	2,3234	2,3242	2,3243	5,4017
$E_{maxCelC}$	0,0020	0,0022	0,0023	4,6x10 ⁻⁶
K_{aN188}	0,0061	0,0063	0,0064	3,9x10 ⁻⁵
$E_{maxN188}$	4332,53	4332,53	4332,53	1,9x10 ⁷
K_{11G}^*	161046	161046	161046	2,6x10 ¹⁰
K_{11G2}^*	0,0318	0,0323	0,0327	0,0010
K_{11X}^*	0,0003	0,0006	0,0008	2,5x10 ⁻⁷
K_{21G}^*	6,0288	6,0289	6,0289	36,348
K_{21G2}^*	9,3x10 ⁻⁵	9,3x10 ⁻⁵	9,3x10 ⁻⁵	8,8x10 ¹³
K_{21X}^*	6,8320	6,8323	6,8325	46,68
K_{3iG}	0,0033	0,0055	0,0076	2,5x10 ⁻⁵
K_{3iX}	0,1466	0,1467	0,1469	7,9x10 ⁻²
LICI = Limite inferior do intervalo de confiança; LICS = Limite superior do intervalo de confiança				

Os parâmetros estimados do modelo se mostraram em média com baixa correlação (0,106), possuindo alguns parâmetros mais intensamente correlacionados (Tabela 14). Verificou-se mais alta correlação entre os parâmetros dentro do bloco de reações, mas principalmente de K_{1r}^* sobre K_{2r}^* e K_{3r} . Tal correlação dentro desse bloco é um demonstrativo de que a proposição teórica para descrever as reações tal qual foi posto é insuficiente para explicar os dados experimentais. Tal insuficiência reside na simplificação que se fez necessária para poder explicar a conversão de celulose na ausência de extrato com atividade betaglicosidásica e também a produção direta de glicose ao degradar celulose, ambas admitidas nessa modelagem como simplificação.

Tabela 14 – Matriz de correlação paramétrica para o modelo do Caso 1*



A associação do parâmetro K_{1r}^* e K_{3r} (-0,799) (Anexo V – Tabela de valores de correlação paramétrica pode ser explicada pela simplificação necessária do fenômeno físico em admitir atividade celobiásica no extrato celulásico de Celluclast 1.5L para que o modelo conseguisse explicar a formação de glicose quando não houvesse adição de Novozymes N188. A associação de K_{1r}^* e K_{2r}^* (-0,891) pode ser explicada como consequência à simplificação que admite produção direta de glicose por celulasas. Experimentalmente se verifica que a catálise de celulose por CBH I resulta na produção preferencial de celobiose ao invés de glicose (Chanzy *et al.*, 1983; Balat, 2011; Soccol *et al.*, 2010; Bansal *et al.*, 2009; Kuhad *et al.*, 2011; Koivula

et al., 2002). E a catálise de celulose gerando celobiose é diretamente contestada pela reação 2, porém descrita pela reação 1.

Percebeu-se correlação mais elevada entre alguns parâmetros de inibição. Os maiores valores foram observados para parâmetros de uma mesma reação do que para parâmetros de reações distintas. Os maiores valores foram observados para K_{1IG}^* e K_{1IG2}^* (-0,909), além de K_{2IG2}^* e K_{2IX}^* (-0,928) (Anexo V – Tabela de valores de correlação paramétrica - Tabela 22). A correlação negativa entre os parâmetros de inibição indica que não se pode distinguir o efeito físico para cada um desses compostos independentemente, permitindo até na redução de parâmetros de inibição do modelo cinético. Tal estratégia de redução foi experimentada por Angarita, 2014 em seu modelo cinética, com baixo prejuízo de ajuste do modelo aos dados experimentais.

Estendendo o raciocínio da correlação negativa dos parâmetros de inibição para as reações cinéticas, entendeu-se que a correlação negativa entre K_{1r}^* e K_{2r}^* coloca a presença da reação 2 desnecessária ou suprimida quando a reação 1 estiver descrita, até certo nível, o qual não se pode determinar. Assim, novamente depreendeu-se que existe uma incerteza mecanística na proposição dessas duas reações separadamente pelos motivos já supracitados.

Das correlações positivas, ressaltam-se três: entre K_{1r}^* e K_{6r}^* (0,603); K_{1IG}^* e $E_{maxCelC}$ (0,582) (Anexo V – Tabela de valores de correlação paramétrica– Tabela 22). A correlação do primeiro par pode ser entendida pela necessidade do modelo em se ajustar às condições onde não existiria suplementação do extrato Novozymes N188. Segundo a descrição do modelo para esse caso, a atividade betaglicosidária necessária para explicar as reações de hidrólise da celulose adviria da enzima celulase não adsorvida. Logo, um aumento na constante de desorção de celulase para explicar a atividade betaglicosidária, forçaria no aumento de atividade da enzima celulase remanescente no substrato, correlacionando essas constantes positivamente. Esse resultado reforça a necessidade de uma quantificação mais precisa das quantidades e atividades enzimáticas em cada extrato e da necessidade de modelos que incluam as diferentes espécies e atividades enzimáticas presentes nos extratos. K_{1IG}^* e $E_{maxCelC}$ é uma associação positiva pode ser igualmente entendida como um efeito de aumento da quantidade de enzima adsorvida sobre o substrato como efeito compensatório à inibição enzimática causada.

De modo geral, as associações foram relativamente baixas e, quando existiram, apontam para direções de melhoria de futuros modelos. Principalmente no que diz ao conjunto de reações de hidrólise de celulose e também de inibição pelo intermediário e produto reacionais, celobiose e glicose.

A qualidade do ajuste do modelo também foi testada pela análise dos resíduos de da estimação. Para a primeira análise, os resíduos foram organizados em blocos de tempo. Esses blocos foram alinhados sequencialmente na medida em que avançava o tempo no qual foram gerados. Por fim, foram plotados em forma gráfica (Figura 51a). Percebeu-se que os resíduos não apresentavam tendência que indicaria sub ou superestimação do modelo para a variável de estado, glicose. A tendência linear dos resíduos não foi verificada $R^2 = 0,003$. Todavia percebeu-se aumento do valor de alguns resíduos na medida em que o número de observações (tempo reacional) avançava. Também, verificou-se um comportamento oscilatório nos dados, que pode estar relacionado ao ajuste do modelo dentro dos diferentes blocos experimentais para algumas condições em específico. Superestimando em alguns casos, e subestimando em outros. De modo geral, percebeu-se que o modelo consegue ajustar aos dados de forma adequada. Porém a menor capacidade de ajuste em tempos estendidos pode ser associada à baixa eficiência do modelo em descrever os efeitos inibitórios.

A normalidade dos resíduos foi verificada pela função de distribuição empírica dos dados (Figura 51b) e pelo histograma dos resíduos, seguido do teste χ^2 dos dados para a distribuição normal (Figura 51c). Verificou-se a distribuição empírica dos dados comportava a distribuição normal dentro dos limites de confiança de 95%. A normalidade dos resíduos, então foi testada pelo teste χ^2 , que verificou a normalidade dos resíduos e um adequado ajuste do modelo aos dados.

De modo geral, o ajuste do modelo frente aos dados para os diferentes casos experimentais foi adequado, pois os dados preditos x estimados se situaram relativamente próximos à diagonal da (Figura 52). Esse dado, explica os baixos resíduos observados na Figura 51. Apenas em alguns casos, como C4, C5 e B5 houve maior distanciamento para tempos avançados de suas reações. Todos os casos correspondiam àqueles contendo celobiose no meio reacional em tempos iniciais de reação (Tabela 21, Anexo IV – Dados experimentais utilizados em estimação

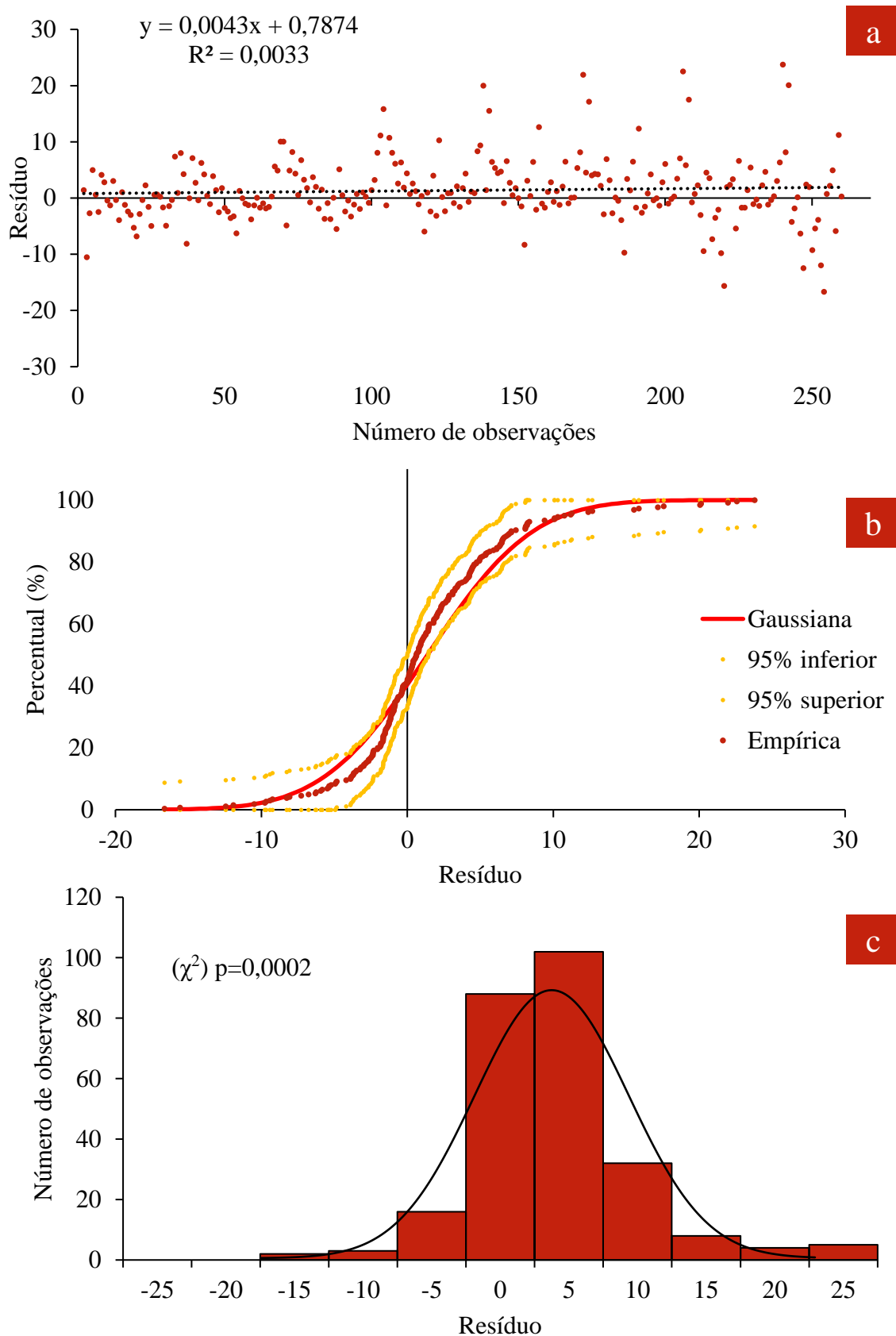


Figura 51 – Análise do resíduo de estimação do modelo do caso 1. (a) – análise de dispersão; (b) – distribuição empírica dos dados; (c) – histograma dos resíduos

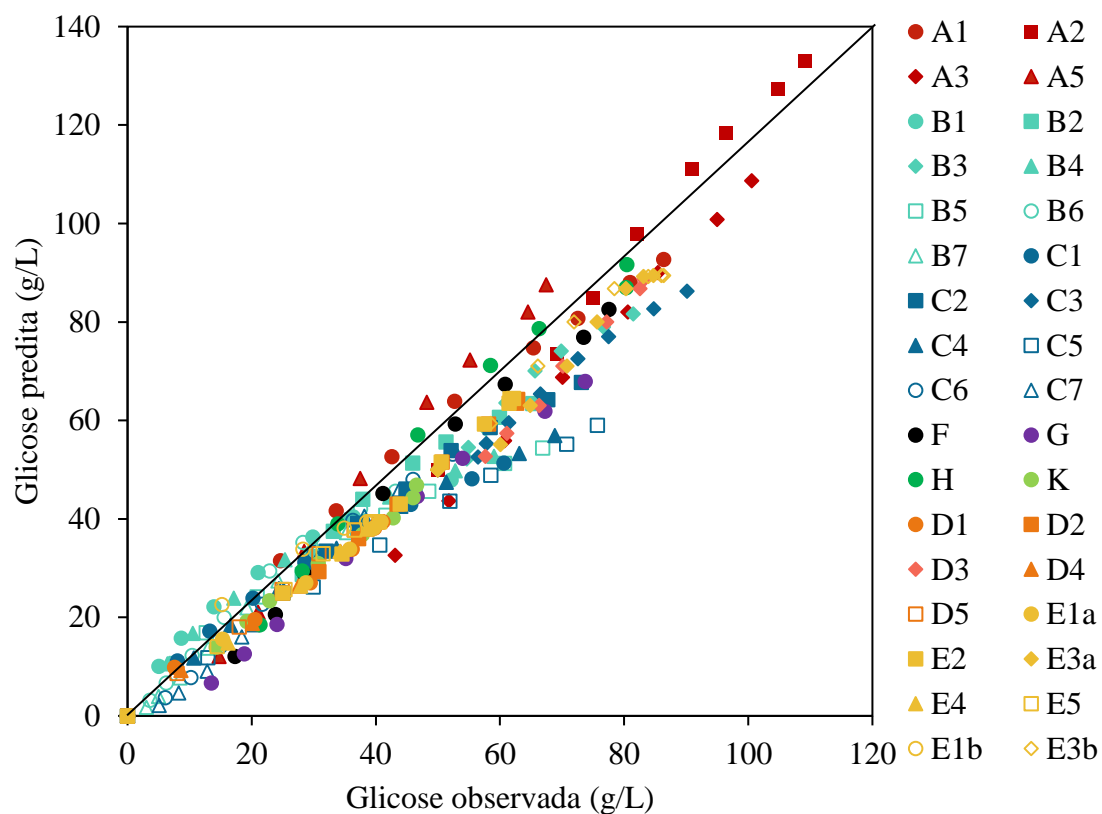


Figura 52 – Glicose predita x observada para do modelo do Caso 1 para os diferentes casos experimentais da Tabela 21, Anexo IV – Dados experimentais utilizados em estimação.

O modelo desse Caso 1 representou os dados experimentais com relativo sucesso. Considerou-se um ganho descritivo a inclusão dos efeitos inibitórios das enzimas celulases adsorvidas sobre a celulose para explicar parte da tendência de redução de atividade das enzimas e a conseqüente redução de glicose. A inclusão desse fenômeno vem ao encontro com processos inibitórios já reportados experimentalmente (Igarashi *et al.*, 2011; Jalak & Våljamäe, 2010; Kurašin & Våljamäe, 2011). Todavia, alguns dos seus parâmetros correlacionados mostram que ele precisa ser aperfeiçoado para representar as diferentes espécies enzimáticas nos extratos, com suas respectivas atividades e mecanismos de inibição.

6.5.2. Estimação do modelo do Caso 2: Adaptação do modelo de Tsai *et al.* (2014) para celulose em duas fases, sorção enzimática transiente dependente de área superficial do substrato, inativação celulásica e sistema de equações diferencial.

A aproximação do modelo do Caso 2 para os dados experimentais foi conseguido ajustando seus 26 parâmetros, com 8 graus de liberdade, minimizando a função objetivo com valor de 62784,83 (Tabela 15). O aumento de 19 parâmetros do modelado Caso 1, para 26 para o Caso 2 refletiu a incorporação das equações de adsorção para as duas espécies enzimáticas envolvidas a na hidrólise da celulose em duas fases distintas. O aumento do número de equações e parâmetros para esse modelo não refletiu em um melhor ajuste aos dados experimentais em comparação com o modelo Caso 1 em termos do valor da função objetivo F_{obj} Caso 1 = 51842,56 (Tabela 10).

Tabela 15 – Dados de estimação do modelo de hidrólise enzimática de Avicel PH-101 para o caso 2.

Nº de parâmetros	Número de experimentos (pontos)	Número de experimentos (casos)	Graus de liberdade	Função objetivo
26	260	34	8	62784,83

A alteração do conjunto de reações envolvendo enzimas e uma representação do substrato ampliada para duas fases, permitiu uma comparação mais limitada entre os 26 parâmetros estimados no caso 2 com a literatura (Tabela 16), do que os Caso 1 com a mesma. Todo o conjunto de reações envolvendo espécies distintas, permitia serem traçados poucos paralelos entre os parâmetros. Apenas as reações envolvendo a espécie do extrato de Novozymes N188 (reação 3) eram diretamente comparáveis.

Percebeu-se que K_{3r} do Caso 2 (165,1) foi menor do que para o Caso 1 (192,9), mas permanecia na mesma ordem de grandeza que os dados da literatura. K_{3M} para o Caso 2 (0,781) foi maior que para o Caso 1 (0,0174), indicando que no Caso 1 era conseguida atividade máxima da enzima celobiohidrolase em menores concentrações de celobiose sistema. Porém, esse parâmetro foi mais próximo ao do trabalho de Tsai *et al.* (2014) (3,174). Os parâmetros de inibição para esse Caso 2 também se aproximaram com

o de Tsai, 2014. Para o Caso 2, $K_{3iG} = 0,2883$ e $K_{3iX} = 24,53$ enquanto nesse trabalho $K_{3iG} = 0,9617$ e $K_{3iX} = 59,07$, todavia para o Caso 1 $K_{3iG} = 0,0055$ e $K_{3iX} = 0,1467$.

Tabela 16 – Parâmetros cinéticos estimados do modelo de hidrólise enzimática de Avicel PH-101 para o Caso 2 diretamente comparáveis com a literatura, adaptado de Angarita (2014).

Parâmetros cinéticos	Este trabalho Caso 2	Este trabalho Caso 1	Tsai, (2014)	Angarita, (2014)	Câmara, (2012)	Zheng, <i>et al.</i> , (2007)	Kadam, <i>et al.</i> , (2004)	Flores-Sánchez <i>et al.</i> , (2013)	Prunescu, <i>et al.</i> , (2013)
K_{1r}^\dagger	2692,69								
K_{2r}^\dagger	1,004								
K_{3r}	165,1	192,9	228,3	187,8	254,5	267,6	285,5	432,2	252
K_{3M}	0,781	0,0174	3,174	25,5	24,5	25,5	24,3	0,022	24,3
K_{5r}^\dagger	$2,9 \times 10^{-5}$								
K_{7r}^\dagger	0,0078								
K_{8r}^\dagger	$9,1 \times 10^{-5}$								
K_{9r}^\dagger	179,226								
K_{10r}^\dagger	44,106								
K_{10M}^\dagger	67,936								
K_{aCelCa}	0,2634								
$E_{maxCelCa}$	1,0747								
K_{aCelCc}	1,9797								
$E_{maxCelCc}$	1,7356								
K_{aN188}	0,1735								
$E_{maxN188}$	0,0072								
K_{1iG}^\dagger	80,4155								
K_{1iG2}^\dagger	5,1912								
K_{1iX}^\dagger	6,7929								
K_{2iG}^\dagger	1,5705								
K_{2iG2}^\dagger	129915								
K_{2iX}^\dagger	6,3689								
K_{3iG}	0,2883	0,0055	0,9617	0,216	41,75	2,1	3,9	$1,45 \times 10^{-5}$	3,9
K_{3iX}	24,5381	0,1467	59,07	-	-	201,0	39,19	-	201
K_{10iG}	0,3000								
K_{10iX}	218457								

A comparação entre os parâmetros de inibição do Caso 2 com o Caso 1 e os demais trabalhos da literatura foi impossibilitada em função da diferença das reações descritas. Percebeu-se, porém, que a relação entre os parâmetros de inibição foram < 1 para a reação 1 e > 1 para a reação 2 (Tabela 17). Esses dados mostram de que a inibição da celobiose e xilose eram mais forte sobre as enzimas envolvidas na reação 2 (degradação da celulose cristalina). Glicose inibia mais significativamente as enzimas da reação 1 (com celulose amorfa). Na literatura, é reportado que a celobiose é um inibidor mais forte das celulasas em comparação com a glicose (Gusakov and Sinitsyn, 1992; Holtzapple *et al.*, 1990, Murphy *et al.*, 2013). Os resultados de inibição por glicose para a reação 1 contradizem os achados da literatura.

Tabela 17 – Comparação entre os parâmetros de inibição relacionados entre si

Parâmetros cinéticos	Este trabalho Caso 2	Este trabalho Caso 1	Tsai, (2014)	Angarita, (2014)	Câmara, (2012)	Zheng, <i>et al.</i> , (2007)	Kadam, <i>et al.</i> , (2004)	Flores- Sánchez <i>et al.</i> , (2013)	Prunescu, <i>et al.</i> , (2013)
K_{1IG2}^*/K_{1IG}^*	0,065	$2,01 \times 10^{-7}$	0,044	0,2	55,85	0,40	0,15	$1,36 \times 10^{-6}$	0,19
K_{1IX}^*/K_{1IG}^*	0,0845	$3,48 \times 10^{-8}$	0,907	1,7	54,20	--	--	--	--
K_{2IG2}^*/K_{2IG}^*	82722	$1,54 \times 10^{-5}$	9799	356	--	13250	3300	6374	388
K_{2IX}^*/K_{2IG}^*	4,05	1,13	0,643	1,0	58,6	--	--	--	--
K_{3IX}/K_{3iG}	85,11	26,67	13,12	269,9	426	--	--	309	84,10
K_{10iX}/K_{10iG}	$7,28 \times 10^5$	--	--	--	--	--	--	--	--

Obs.: os parâmetros diretamente comparáveis estão assinalados

A inibição das enzimas é uma consequência do seu mecanismo de atuação em que energia impulsora para a atuação das enzimas deriva do sítio de interação com o produto (Payne *et al.*, 2013). Porém, a maioria dos estudos sobre inibição enzimática não considera como a diversidade morfo-estrutural dos substratos influencia na inibição. As conclusões acerca dos efeitos dos diferentes inibidores sobre as enzimas pode estar subacessado.

Daqueles poucos que tentam acessar as inibições de celulasas em função da diversidade morfológica do substrato, esses surgem a partir de 2004. Merece destaque o trabalho de Gruno *et al.* (2004), que acessou os efeitos inibitórios de celobiose sobre várias espécies enzimáticas puras e diferentes substratos. Verificou-se que a CBHI de *T. reesei* (TrCel7a) é 100 vezes mais inibida por celobiose atuando sobre substratos

cristalinos do que sobre substratos de baixo peso molecular. Outros trabalhos para essa mesma enzima mostraram que as constantes de inibição para a celobiose era cerca de 10 vezes maior para quando ela atuava sobre substratos cristalinos (Jalak *et al.*, 2012, Teugas & Våljamäe, 2013) do que substratos amorfos (Murphy *et al.*, 2013). O modelo do Caso 2 conseguiu representar diferença entre as capacidades inibitórias da celobiose sobre as enzimas atuando nos dois substratos, cristalino K_{2IG2}^{\dagger} (129915) e amorfo K_{1IG2}^{\dagger} (5,19) (Tabela 16).

Por outro lado, os parâmetros de inibição para xilose foram relativamente parecidos para as reações envolvendo as celulasas nas duas fases K_{1X}^{\dagger} (6,79) e K_{2X}^{\dagger} (6,37) (Tabela 16). Para a glicose, foi observado o oposto do que a celobiose, pois a inibição da glicose foi mais intensa para a fase amorfa do que cristalina K_{1IG}^{\dagger} (80,4) e K_{2IG}^{\dagger} (1,57). Embora não se tenham visto estudos que relacionassem a capacidade inibitória desses monossacarídeos para *TrCel7a* hidrolisando a celulose amorfa ou cristalina, as diferenças nas capacidades inibitórias de *TrCel7a* para glicose e xilose se relacionavam com o tamanho do oligossacarídeo hidrolisado (Baumann *et al.*, 2011; Kont *et al.*, 2013).

A diferença no perfil inibitório entre as duas fases de celulose para esses diferentes carboidratos pode se dever à diferença na estrutura das enzimas quando atuando sobre cada um desses substratos, amorfo e cristalino. A modulação da inibição enzimática dependente da natureza do substrato (Gruno *et al.*, 2003) e do estado molecular da enzima (Kuusk *et al.*, 2015) já foi verificado experimentalmente para estudos envolvendo a *TrCel7a*. Essa modulação pode repercutir na diferença da intensidade em que as interações enzima-substrato são estabelecidas (Gruno *et al.*, 2004; Baumann *et al.*, 2011), mas também no mecanismo de atuação da enzima durante a hidrólise (Jalak *et al.*, 2012).

O modelo do Caso 2 apresentou forte associação ($r > 0,97$) para os dados experimentais. Ele conseguiu descrever grandemente a variabilidade da glicose experimental tendo em vista as variáveis de entrada ($r^2 > 0,95$) uma vez feita a estimação de seus parâmetros (Tabela 18). Os valores de associação e regressão foram bastante similares quando comparados com o modelo do Caso 1 ($r > 0,97$ e $r^2 > 0,94$) (Tabela 13). O modelo do Caso 2 se distanciava das concentrações experimentais em um valor médio de 16,38 g/L, um pouco mais do que para o Caso 1, que distanciava 14,67 g/L.

Tabela 18 – Análises de qualidade de estimação para o Caso 2 (valor p = 0,05)

	Coefficiente de correlação	0,973		
	Coefficiente de determinação	0,948		
	Desvio médio global de predição (g/L)	16,3801		
	Análise de variância via teste F	0,1964 < F=442,89 < 1016,08		
Análise paramétrica				
Parâmetros cinéticos	LICI	Este trabalho	LICS	Significância
				Teste t (significativo para t > 0)
K_{1r}^{\dagger}	2692,7	2692,7	2692,7	7250558
K_{2r}^{\dagger}	1,0044	1,0044	1,0044	1,008786
K_{3r}	165,10	165,10	165,10	27257,71
K_{3M}	0,7813	0,7813	0,7813	0,610452
K_{5r}^{\dagger}	$4,16 \times 10^{-4}$	$2,89 \times 10^{-5}$	$-3,58 \times 10^{-4}$	$-1,5 \times 10^{-7}$
K_{7r}^{\dagger}	$8,03 \times 10^{-3}$	$7,83 \times 10^{-3}$	$7,63 \times 10^{-3}$	$6,13 \times 10^{-5}$
K_{8r}^{\dagger}	$1,07 \times 10^{-4}$	$9,10 \times 10^{-5}$	$7,49 \times 10^{-5}$	$8,02 \times 10^{-9}$
K_{9r}^{\dagger}	179,2	179,2	179,2	32122,12
K_{10r}^{\dagger}	44,11	44,11	44,11	1945,305
K_{10M}^{\dagger}	67,94	67,94	67,94	4615,229
K_{aCelCa}	0,2634	0,2634	0,2634	0,069395
$E_{maxCelCa}$	1,0747	1,0747	1,0747	1,155046
K_{aCelCc}	1,9797	1,9797	1,9797	3,919208
$E_{maxCelCc}$	1,7356	1,7356	1,7356	3,01218
K_{aN188}	0,1735	0,1735	0,1735	0,030098
$E_{maxN188}$	$7,16 \times 10^{-3}$	$7,15 \times 10^{-3}$	$7,15 \times 10^{-3}$	$5,12 \times 10^{-5}$
K_{1IG}^{\dagger}	80,416	80,415	80,415	6466,65
K_{1IG2}^{\dagger}	5,1913	5,1912	5,1911	26,94835
K_{1IX}^{\dagger}	6,7930	6,7929	6,7928	46,14339
K_{2IG}^{\dagger}	1,5706	1,5705	1,5704	2,466577
K_{2IG2}^{\dagger}	129915	129915	129915	$1,69 \times 10^{10}$
K_{2IX}^{\dagger}	6,3698	6,3698	6,3698	40,57436
K_{3iG}	0,2884	0,2884	0,2884	0,08317
K_{3iX}	24,5381	24,5381	24,5381	602,1171
K_{10iG}	0,3000	0,3000	0,3000	0,090005
K_{10iX}	218457	218457	218457	$4,77 \times 10^{10}$

LICI = Limite inferior do intervalo de confiança; LICS = Limite superior do intervalo de confiança; a célula da variável não significativa teve o fundo da célula referente ao seu teste t escurecido.

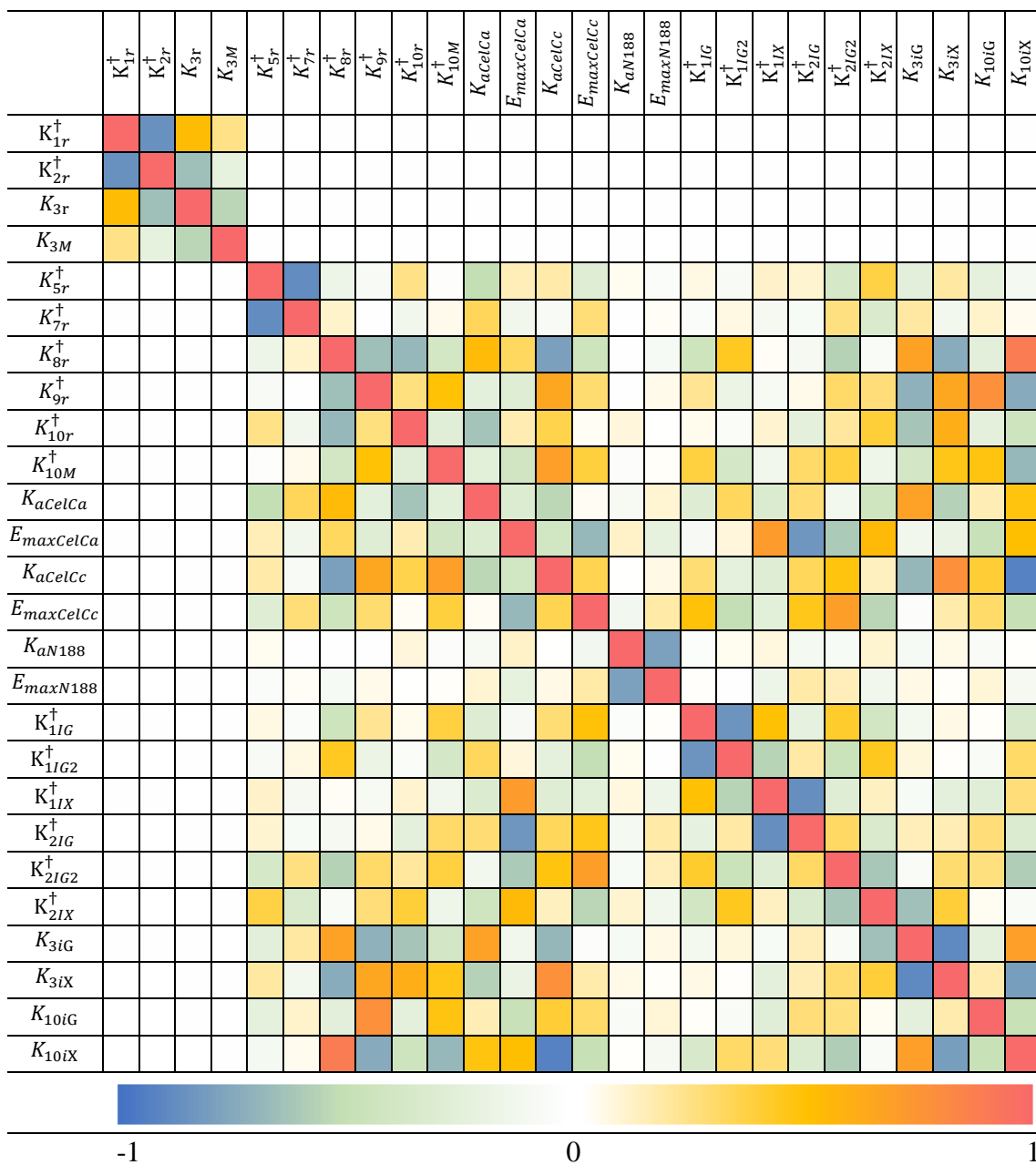
Tal qual o Caso 1 anterior, o modelo do Caso 2 se mostrou significativo para explicar a variância dos dados experimentais via teste F ($p < 0,05$). Entretanto, um de seus parâmetros não foi considerado significativo pelo teste t, K_{5r}^{\dagger} ($-1,5 \times 10^{-7} < 0$) (Tabela 18). Os limites da região de confiança dos parâmetros estão representados na mesma tabela.

A equação cujo parâmetro foi considerado não significativo refere-se a inibição da enzima celulase adsorvida sobre celulose cristalina (EbCelCc1). A não significância desse parâmetro é interessante, pois, em tese, contraria a hipótese que sustenta a descrição da reação 5 desse modelo: de que parte das enzimas adsorvidas junto a celulose são desativadas durante o processo de hidrólise.

Contudo, percebeu-se que K_{5r}^{\dagger} estava altamente correlacionado com K_{7r}^{\dagger} ($-0,880$) (Tabela 23, Anexo V – Tabela de valores de correlação paramétrica). Essa reação 5, por sua vez, descreve justamente o efeito de inibição da celulase sobre a celulose cristalina. Dado que o valor de correlação é negativo, nota-se que grande parte do efeito inibitório sobre a hidrólise feito pela descrição pretendida da reação 5 sobre a celulose cristalina, está sendo capturado pela reação 7 sobre a celulose amorfa. Assim, o efeito global de redução da produção de glicose em função da inibição das enzimas adsorvidas está sendo feito, não anulando a hipótese geral.

O efeito de inibição da celulase por razões da inibição do seu movimento processivo requer que sejam feitos experimentos em substratos específicos, cujas variações em suas frações amorfa e cristalina sejam diferentes entre si. Uma vez que no conjunto experimental (Tabela 21) não haviam substratos com alguma variação em sua composição para estimar os parâmetros desse modelo 4, não foi possível precisar sob qual das duas reações propostas exerceria o maior efeito inibitório sobre as celulases. Isso explica a correlação entre os parâmetros (Tabela 19). Interessantemente, K_{5r}^{\dagger} e K_{7r}^{\dagger} não se correlacionaram com nenhum outro parâmetro de inibição muito fortemente, sinalizando que seu fenômeno inibitório, mesmo correlacionado entre si, descrevia um fenômeno desacoplado dos demais. A maior correlação observada analisando os dois parâmetros com relação aos demais foi encontrada para K_{5r}^{\dagger} para com K_{2IX}^{\dagger} ($0,368$) (Tabela 23, Anexo V – Tabela de valores de correlação paramétrica). Uma correlação ainda assim baixa.

Tabela 19 – Matriz de correlação paramétrica para o modelo do Caso 2*



Dados de correlação paramétrica		
	média	0,170
Correlação paramétrica	máxima	0,930
	mínima	0,000

* os valores encontram-se na Tabela 23 (Anexo V)

A inibição das celulasas causada por razões de sua atuação sobre o substrato celulósico é descrita de forma genérica nessa tese. Porém ainda na literatura não é possível determinar as origens da inibição enzimática da celulase, considerando apenas uma fase

de celulose e uma enzima purificada TrCel7a. O processo de inibição dessas enzimas tem várias causas propostas. Porém a etapa limitante dessa inibição é ainda incerto.

Kuusk (2015) listou os mais prováveis fenômenos apontados por outros autores como as principais causas de inibição de *TrCel7a* ao atuar sobre celulose. Primeiro a inibição tendo como ou origem na etapa de dissociação (fenômeno descrito pelas equações 8 e 9, Tabela 6); segundo quando causada pela baixa complexação das enzimas com a cadeia de celulose e, finalmente, ocasionada pela dificuldade do destacamento da cadeia celulósica dos cristais durante o movimento processivo das celulasas. Percebe-se que a discriminação a etapa limitante para uma enzima purificada, implica em fazer experimentos específicos para cada caso. Com extratos enzimáticos, tais comprovações não parecem ser facilmente exequíveis, bem como a comprovação das rotas de inibição. Pois os experimentos necessários para a comprovação das inibições requerem um esforço laboratorial para purificação das entidades moleculares. Essa dificuldade de obtenção de dados experimentais muito específicos, inviabilizariam a proposição de um modelo cinético de inibição mais detalhado.

A ausência de dados experimentais com variações de cada uma das frações para serem estimados os parâmetros do modelo, repercutiu não apenas na correlação dos parâmetros K_{5r}^{\dagger} e K_{7r}^{\dagger} (Tabela 19). Notou-se que K_{1r}^{\dagger} e K_{2r}^{\dagger} estavam fortemente correlacionados (-0,856) (Tabela 23, Anexo V – Tabela de valores de correlação paramétrica), reforçando a necessidade de serem incluídos experimentos com distintas frações de cada um dos componentes para a estimação de parâmetros.

Sendo assim, na tentativa de melhorar o ajuste do modelo para as reações em que esses parâmetros se propunham a descrever, foi feita uma nova rodada de estimação de parâmetros para esse modelo incluindo os dados experimentais obtidos nas hidrólises de pré-tratados (Tabela 24, Anexo VIII – Dados adicionais utilizados na estimação do Caso 2).

Todavia, o modelo não apresentou bom ajuste para esses dados experimentais. As razões para desajuste se explicam pela tentativa de se estimar parâmetros utilizando dados que, embora tivessem sido ambos obtidos a partir de reagentes semelhantes (Avicel PH-101, Celluclast 1.5L e Novozymes N188), possuíam diferenças que se mostraram determinantes em distanciar os dois grupos. As principais delas são: os dados de hidrólise

foram obtidos em laboratórios diferentes e em equipamentos diferentes; os reagentes utilizados foram de lotes desiguais, o que dificilmente possibilitaria uma mesma razão atividade/dosagem para as duas atividades enzimáticas dos dois extratos entre os trabalhos; os métodos e técnicas não foram validados e testados quanto à sua equivalência; os volumes reacionais entre as hidrólises dos dois trabalhos era diferente. Assim, no intuito de desconfundir os parâmetros associados às taxas de reação e inibição das enzimas sobre elas, é necessário levantar dados experimentais nas condições similares às conseguidas para os materiais pré-tratados para estimar, aí sim, os dados em conjunto.

Verificou-se também que a correlação dos parâmetros de inibição do Caso 2 (Tabela 19) seguiu uma tendência similar do que o Caso 1 (Tabela 14), pois parâmetros de inibição eram mais frequentemente correlacionados com outros de uma mesma reação, indicando que pudessem ser igualados eventualmente tal qual fez Angarita, 2014. A correlação entre K_{1IG}^{\dagger} e K_{1IG2}^{\dagger} pode ser explicada pelo fato de que glicose e celobiose competem pelo mesmo sítio da celulase, tal qual glicose e xilose para a β -glicosidase, podendo explicar em parte a correlação entre K_{3iG} e K_{3iX} .

De modo geral, notou-se um “cluster” de correlações entre os parâmetros inibitórios por celobiose, glicose e xilose com relação aos parâmetros, ou de adsorção de celulase, ou de inibição da enzima adsorvida ou de dessorção das mesmas (Tabela 19). Percebe-se porém que de todas essas correlações K_{10iX} se mostrou como um dos parâmetros mais correlacionados com os demais. Positivamente com K_{gr}^{\dagger} (0,891) e negativamente com K_{aCelC} (-0,930).

O modelo do Caso 2 (Figura 23) foi construindo rejeitando a hipótese do Caso 1 de que celulases formariam glicose diretamente por meio de sua catálise (Figura 22). As condições obtidas pelos experimentos contidos nos casos 5 a 18 de Tsai, 2014 (Tabela 21) permitiam a formação de glicose na ausência de um extrato fonte de β -glicosidase e, assim, demandavam uma resposta a nível de modelo para explicar a formação de glicose nessas condições. A reação 10 descreve a conversão de celobiose por glicose por proteínas não adsorvidas em celulose. Tal hipótese se sustenta por haver nos extratos de Celluclast atividade celobiásica em seu sobrenadante (Rana *et al.*, 2014), oriunda de enzimas β -glicosidasas com baixa capacidade adsorviva (Zheng *et al.*, 2016) e atividade em celodextrinas de até 6 mers apenas (Quiroz-Castañeda e Folch-Mallol, 2013).

A associação entre K_{10iX} e K_{8r}^\dagger ou K_{aCelCc} se explica no momento em que se atribuiu uma atividade celobiásica à espécie enzimática celulásica. Na ausência de suplementação celobiásica, a reação necessária para serem degradadaa celobioseadvirá da reação 10, ou seja, das celulases que serão demandadas por não estarem adsorvidas junto ao substrato, mas também bastante ativas em solução. Por outro lado, para se degradar a celulose é necessária adsorção dessas mesmas enzimas: efeitos concorrentes. Uma vez que a reação 8 descreve a dessorção da celulase adsorvida sobre celulose cristalina (EbCelCc1), toda vez que mais enzimas celulases livres estiverem disponíveis para catálise, teriam de ter sua atividade suprimida por K_{10iX} para regular a atividade das celulases livres e explicar os dados de glicose obtidos. Por outro lado, quando mais enzima fosse adsorvida no substrato celulósico, como dita K_{aCelCc} , mais alívio na repressão das enzimas livres por parte de K_{10iX} deveria de haver para processar a celobiose formada pelas espécies adsorvidas e explicar o resultado de glicose obtido.

A correlação entre os parâmetros nesse caso evidencia a necessidade de serem desenvolvidos modelos mais precisos para descrever a realidade experimental a partir de novos dados de bancada. Especificamente no que diz respeito de quando há produção de glicose quando hidrolisando celulose a partir de um extrato sem suplementação celobiásica. Isso porque, atualmente, mesmo se sabendo da existência de atividades celulásicas e celobiásicas nos extratos de Celluclast e em outros tantos comerciais, a comum proposição simplificada nos modelos de que esses extratos não contém atividades celobiásicas é desafiador. Todavia, avançar nessa proposição esbarra no trabalho necessário para a quantificação das espécies envolvidas nesse extratos enzimáticos, além da proposição de reações específicas para cada uma dessas espécies quantificadas. Haja visto que os modelos se baseiam em balanços mássicos, a caracterização das atividades de um extrato, por si só, não basta. É necessário determinar e quantificar as espécies que possuem cada atividade.

Outras correlações com maior intensidade dignas de atenção foram entre os parâmetros de adsorção e alguns de inibição, como K_{3iG} e K_{aCelCc} (0,682); $E_{maxCelCc}$ e K_{2iG2}^\dagger (0,696); K_{aCelCc} e K_{3iG} (0,780); $E_{maxCelCa}$ e K_{1iX}^\dagger (0,708); $E_{maxCelCa}$ e K_{2iG}^\dagger (-0,833). As associações positivas dentro desse grupo são facilmente compreendidas como a necessidade de se reprimir um excesso de atividade para com as enzimas mais disponíveis para a catálise do substrato, seja atuando sobre elas diretamente como no caso

$E_{maxCelCc}$ e K_{2IG2}^{\dagger} , também $E_{maxCelCa}$ e K_{1IX}^{\dagger} ou atuando na supressão da catálise do intermediário celobiose, como em K_{aCelCc} e K_{3iG} , também K_{3iG} e K_{aCelCc} . Por outro lado, a correlação negativa entre $E_{maxCelCa}$ e K_{2IG}^{\dagger} se explica pela necessidade de se balancear a degradação da celulose entre as suas diferentes fases para realizar o ajuste aos dados de glicose. Uma vez aumentando a quantidade de enzima disponível na fase amorfa, suprimiria-se a atividade na fase oposta, cristalina.

Um segundo bloco digno de nota é aquele que agrupa a correlação mais intensa entre os parâmetros de inibição das reações: K_{1IX}^{\dagger} e K_{2IG}^{\dagger} (-0,868); K_{3iG} e K_{3iX} (-0,894); K_{1IG2}^{\dagger} e K_{1IG}^{\dagger} (-0,841). A associação negativa entre os parâmetros de inibição K_{1IX}^{\dagger} e K_{2IG}^{\dagger} , também K_{1IG2}^{\dagger} e K_{1IG}^{\dagger} de suas respectivas reações 1 e 2, envolvendo as diferentes fases do substrato explica a modulação da atividade de degradação de celulose. Aumentando a atividade de degradação em uma fase, suprime-se a atividade em outra para se ajustar aos dados experimentais de glicose. Em posse de dados experimentais de hidrólise de celulose em diferentes frações de celulose, amorfa e cristalina, acredita-se ser possível diminuir a associação entre esses parâmetros. Com esses dados, a diferenciação das atividades entre as diferentes fases pode ser regular mais pela taxa de hidrólise dessas fases do que em nível de regulação por inibição, embora sempre uma associação entre esses parâmetros haverá de existir devido a natureza da proposição do substrato e pela dificuldade de se obter um substrato completamente amorfo ou cristalino. Por outro lado, a associação entre K_{3iG} e K_{3iX} se explica por inibição competitiva (Qing *et al.*, 2010). Em situações experimentais quando a xilose está presente e existe formação de glicose, a regulação das atividades da enzima por esses parâmetros tem de ser tal que o aumento de K_{3iX} causada por xilose, exige o alívio da inibição de glicose K_{3iG} para ajustar aos dados experimentais já que concorrem pelo mesmo sítio da β -glicosidase. Porém a dependência do modelo em se ajustar aos dados experimentais por meio de K_{3iX} não pode ser muito alta na medida em que ele deve ser capaz de explicar os dados na ausência de xilose no meio reacional.

Mesmo diante dos desafios de se estimar parâmetros para um modelo em duas fases, percebeu-se que isso foi conseguido com relativo sucesso pelo valor médio de correlação entre seus parâmetros de (0,170) (Tabela 19). No entanto, percebeu-se que é necessário serem obtidos dados de uma série experimentais completa e bem padronizada para ser possível isolar efeitos e desconfundir alguns dos parâmetros mais correlacionados. Embora isso não tenha sido possível com os dados experimentais dessa

tese dos pré-tratados de Avicel por moínho de bolas (Seção 6.2) e por líquido iônico (Seção 6.3), o sucesso nessa tarefa de obter esses dados e ajustá-los a esse modelo permitirá não só um melhor ajuste, como também maior entendimento do efeito das duas fases da celulose sobre sua hidrólise.

O ajuste do modelo aos dados experimentais foi analisado com relação aos resíduos de estimação. Os resíduos foram alinhados pelo tempo que foram gerados na hidrólise em número crescente de observações. A dispersão dos dados indica não haver tendência de super ou subpredição dos dados (Figura 53a). Havia, porém, ligeira subpredição dos dados de glicose conforme aumentava o tempo reacional, como evidenciava a inclinação da reta de tendência dos resíduos ($\alpha = -0,0092$).

A normalidade dos resíduos pode ser verificada pela distribuição normal cumulativa estar situada dentro dos limites de confiança de 95% dos resíduos (Figura 53b), mas também pela significância do teste χ^2 para normalidade ($1,4 \times 10^{-7} < 0,05$). O histograma dos resíduos mostra que em algumas situações o modelo tendia a subpredizer os dados experimentais, afastando a tendência desses resíduos da normalidade. Todavia, embora a normalidade ter sido verificada, os resíduos com maior frequência tinham valores entre -1 e +1 (Figura 53b).

A subpredição dos dados nos tempos mais avançados de hidrólise foram mais perceptíveis para os casos A5, B2, B3, B4, B5, C5, F, G e H com tempos mais avançados de reação. Os casos C2, C3 contribuíram mais geração de resíduos de subpredição em tempos iniciais de reação (Anexo VII – Resultados da estimação do modelo do Caso 2).

Verificou-se bom ajuste do modelo para todos os caso experimentais da (Tabela 21, Anexo IV – Dados experimentais utilizados em estimação). O desvio no sentido de subpredição dos dados experimentais em tempos mais avançados de reação podem ser vistos pelo deslocamento ao longo do eixo X dentro de uma mesma série experimental (Figura 54). A subpredição em tempos estendidos de reação mostram uma dificuldade do modelo do Caso 2 em descrever o decréscimo nas taxas reacionais, mesmo contendo duas fases. Se atribuiu a esse desajuste à insuficiência de dados experimentais com celulose em duas fases e em diferentes proporções para permitir melhor estimação de parâmetros em reações com alta correlação paramétrica. Principalmente as que descreviam os fenômenos de inibição processiva das celulasas, dessorção enzimática e de inibição da atividade

enzimática por intermediários e produtos reacionais. Todas responsáveis por regular o decréscimo de atividade ao longo do tempo.

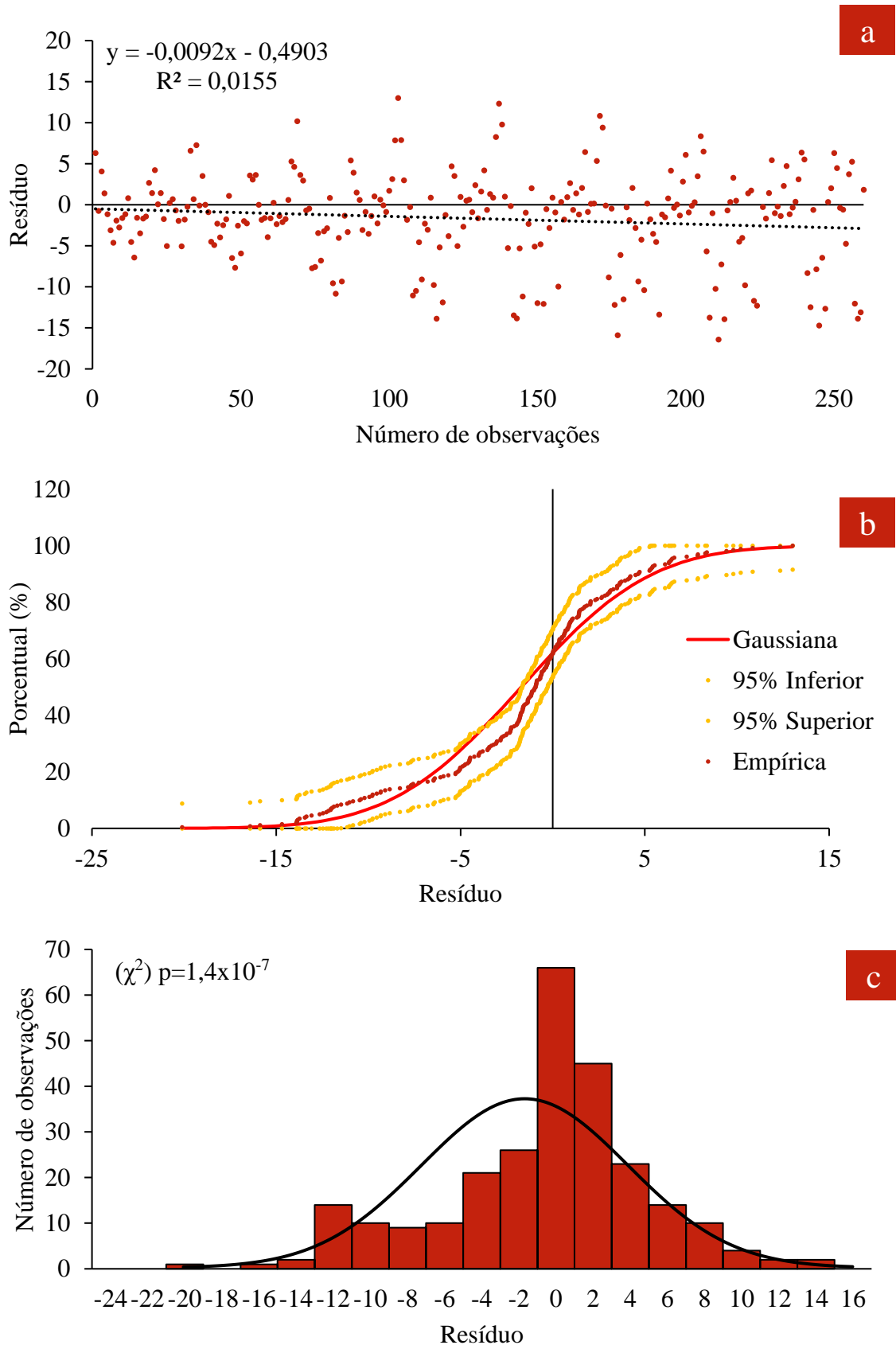


Figura 53 – Análise do resíduo de estimação do modelo do caso 2. (a) – análise de dispersão; (b) – distribuição empírica dos dados; (c) – histograma dos resíduos.

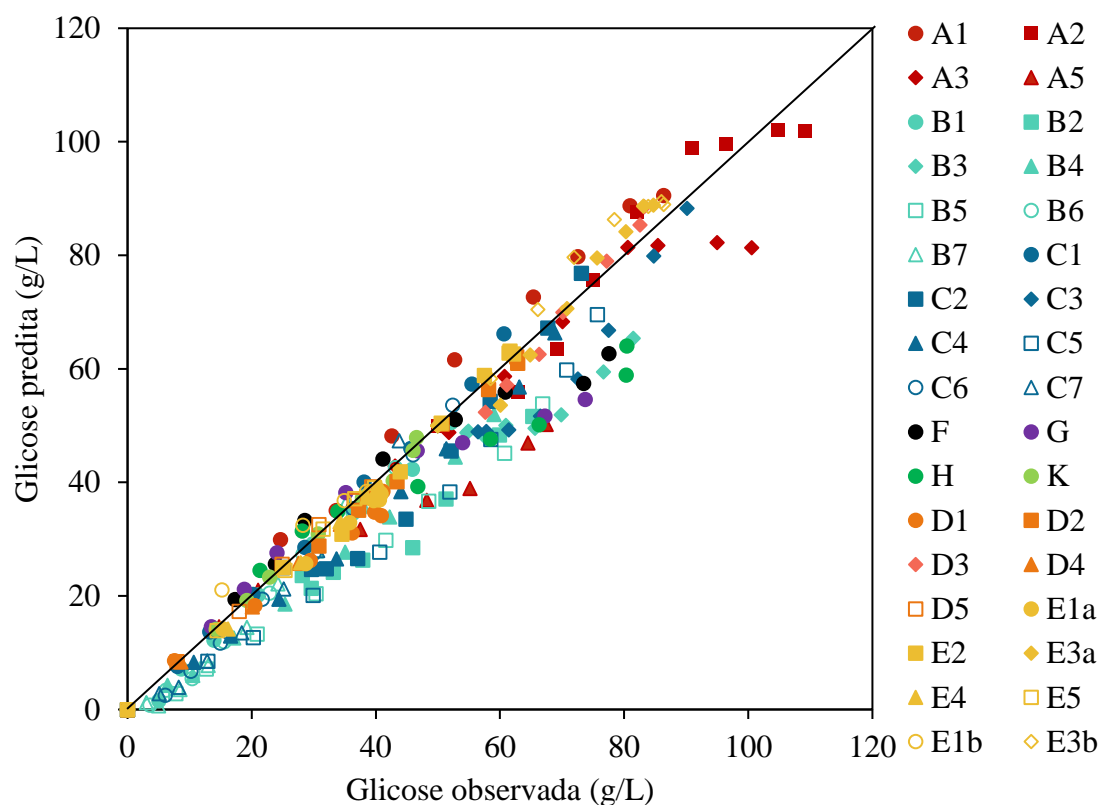


Figura 54 - Glicose predita x observada para do modelo do Caso 2 para os diferentes casos experimentais da (Tabela 21, Anexo IV – Dados experimentais utilizados em estimação)

Comparando-se o ajuste dos modelos para cada um dos casos experimentais da (Tabela 21, Anexo IV – Dados experimentais utilizados em estimação), percebeu-se que o modelo do Caso 1 possuía melhor ajuste global (0,992) que o modelo 4 (0,984) (Tabela 20). O grupo contendo os valores mais baixos e que reunia 10% de todos os coeficientes de determinação ajustados sobre os diferentes casos experimentais corresponderam todos ao modelo do Caso 2. Os ajustes mais baixos foram para o caso A2 (0,965); B2 (0,947); B3 (0,870); C3 (0,936); G (0,969) e H (0,974). Excetuando-se o caso de A2, todos os demais casos experimentais já eram apontados apresentando subestimação dos dados pelo modelo. Comumente a todos esses casos, percebe-se a presença de algum inibidor no tempo inicial de hidrólise (Tabela 20).

Percebeu-se que ambos os modelos apresentam capacidade preditiva dos dados experimentais. Todavia, embora o Caso 2 possuísse mais parâmetros, o conjunto de suas reações não possuiu o suporte de dados experimentais necessário para descrever de forma

mais satisfatória as concentrações de glicose do trabalho de Tsai *et al.*, (2014) e desconfundir parâmetros, sobretudo os de inibição.

Tabela 20 – Comparação do ajuste dos modelos (R^2) para todos casos experimentais com destaque aos mais baixos, correspondente a 10% dos totais

Celluclast (g/L)	1,58			1,05					
Novozymes (g/L)	0,59			0					
Inibidor (g/L)	--	G 50	G2 30	X 80	--	G 25	G 50		
Série*	A1	A2	A3	A5	B1	B2	B3		
C3	0,996	0,997	0,989	0,996	0,974	0,974	0,985		
C4	0,997	0,965	0,982	0,990	0,998	0,947	0,870		
Diferença	-0,002	0,032	0,008	0,006	-0,024	0,027	0,115		
Celluclast (g/L)	1,05			2,11					
Novozymes (g/L)	0			0,00					
Inibidor (g/L)	G2 15	G2 30	X 40	X 80	--	G 25	G 50		
Série*	B4	B5	B6	B7	C1	C2	C3		
C3	0,981	0,987	0,992	0,997	0,987	0,993	0,994		
C4	0,997	0,997	0,995	0,986	0,999	0,975	0,936		
Diferença	-0,016	-0,010	-0,004	0,011	-0,011	0,018	0,059		
Celluclast (g/L)	2,11			1,58000				3,16	
Novozymes (g/L)	0,00			0,30				0,10	0,59
Inibidor (g/L)	G2 15	G2 30	X 40	X 80	X 40	X 40	X 40		
Série*	C4	C5	C6	C7	F	G	H		
C3	0,991	0,997	0,997	0,996	0,995	0,995	0,992		
C4	0,996	0,989	0,997	0,989	0,976	0,969	0,974		
Diferença	-0,005	0,008	-0,001	0,006	0,020	0,026	0,019		
Celluclast (g/L)	0,79			0,00				0,00	
Novozymes (g/L)	2,95			0,07				0,15	
Inibidor (g/L)	--	--	G 25	G 50	G2 15	G2 30	X 40		
Série*	K	D1	D2	D3	D4	D5	E1a		
C3	0,999	0,998	0,999	0,987	0,999	0,999	0,999		
C4	0,999	0,996	0,997	0,986	0,999	0,999	1,000		
Diferença	0,000	0,002	0,002	0,001	0,000	0,000	0,000		
Celluclast (g/L)	0,00			0,00					
Novozymes (g/L)	0,15			0,29					
Inibidor (g/L)	X 80	X 40	X 40	X 40	G2 38	G2 38 / G 50			
Série*	E2	E3a	E4	E5	E1b	E3b			
C3	0,998	0,987	1,000	0,999	0,980	0,985			
C4	0,996	0,985	0,999	0,998	0,983	0,985			
Diferença	0,003	0,003	0,000	0,001	-0,003	0,000			

GLOBAL

Série* Média DP

C3	0,992	0,007
C4	0,984	0,025

Legenda: G= glicose; G2= celobiose; X= xilose; C3= modelo do Caso 1; C4= modelo do Caso 2; *número das séries de acordo com (Tabela 21, Anexo IV – Dados experimentais utilizados em estimação

7. Conclusões

Com o estudo dessa tese, foi possível expandir o conhecimento sobre a hidrólise enzimática de celulose por meio de respostas que foram extraídas em várias frentes de investigação.

O estudo para determinação da melhor metodologia para o cálculo do índice de cristalinidade demonstrou que a técnica de Segal (1959), a mais usual, não produzia a melhor relação entre a fração cristalina de celulose e seu índice de cristalinidade celulose. A técnica de deconvolução foi a escolhida por estabelecer essa melhor relação, revelando que maior rigor na escolha da metodologia de medição da propriedade da cristalinidade pode fornecer resultados mais acurados. Também, os resultados mostraram que mais estudos sobre o tema são necessários para a criação de uma metodologia mais precisa, estabelecendo uma relação linear entre fração cristalina na amostra e índice de cristalinidade, seja via difração de raios-X, seja por meio de outras técnicas.

Os pré-tratamentos de Avicel PH-101 conseguiram produzir materiais com distintas propriedades físicas entre si. Inicialmente, o pré-tratamento por moínho de bolas produziu um material alterado com relação à celulose não pré-tratada, com menor cristalinidade geral, ligeiramente menor tamanho médio de partícula e aparência mais compactada em nível microscópico, menor área superficial e apresentando celulose II como resultado do processo de moagem. Essas características combinadas culminaram com uma hidrólise mais susceptível da celulose moída, resultando em 74,40% em 48h, contra 41,55% de uma celulose não pré-tratado. Também, mostrou que a celulose moída tinha seu conteúdo amorfizado mais rapidamente degradado do que a celulose II pelas celulases, mesmo hidrolisando esse material por uma composição enzimática mais deficitária em atividade betaglicosidásica, mas capaz de demonstrar tal fenômeno. Contudo, esse material não foi considerado bom material para estudar o efeito da área

superficial sobre a hidrólise, justo porque essa propriedade era baixa para ser monitorada e quantificada ao longo do tempo de reação.

O pré-tratamento de Avicel PH-101 com ([EMIM][OAc]) feito em diferentes tempos de exposição a 120°C conseguiu produzir materiais com cristalinidades gerais mais baixas e com áreas superficiais maiores, maior tamanho médio de partícula, além de produzir um material com morfologia esponjosa, tanto em nível de partícula quanto de superfície. Em dois experimentos independentes, foi observado mudança do alomorfo de celulose e aumento do índice de cristalinidade com relação ao tempo de pré-tratamento a 120°C para o alomorfo II de celulose. Por outro lado, nenhuma relação foi observada entre o tempo de pré-tratamento e a área superficial desses materiais pré-tratados nessa mesma temperatura. Tais resultados indicam que o pré-tratamento com ([EMIM][OAc]) atua de formas distintas para influenciar área superficial e cristalinidade da celulose. Todavia, mesmo com essas diferenças entre as características estruturais, não foi observada diferença nos rendimentos de hidrólise para os materiais pré-tratados em 10 30 e 120 min a 120°C ou a 10 min a 90°C. Acredita-se que as modificações estruturais sofridas na amostra após certo tempo mínimo de pré-tratamento nas condições utilizadas causam efeito similar sobre a hidrólise da celulose. Isolar os efeitos de cada uma das características sobre a hidrólise exige produzir materiais em ainda menores temperaturas de pré-tratamento para diferentes tempos de exposição e repetir as reações.

A caracterização dos resíduos de hidrólise de Avicel PH-101 pré-tratada por ([EMIM][OAc]) por 120 min a 120°C confirmou que a celulose amorfa é mais susceptível a hidrólise do que a celulose II, o que já sido observado pela hidrólise de pré-tratados de moínho de bolas. Isso porque a cristalinidade dos resíduos aumentava ao longo do tempo de 1, 4 e 6 h de reação. Por outro lado, a mais intensa diminuição da área superficial dos resíduos celulósicos nos momentos iniciais de hidrólise indicou que essa característica se relaciona mais às altas taxas iniciais de reação do que a cristalinidade. A cristalinidade, por sua vez, pode estar relacionada a eventual inibição das enzimas celulasas.

Foi obtido sucesso em conseguir materiais com propriedades diferenciadas em área superficial e cristalinidade para suportar o desenvolvimento de um novo modelo cinético a partir dos dados de hidrólises deles. Porém, os materiais obtidos por moínho de bolas não possuíam características de área superficial altas o suficiente de modo que pudessem ser monitoradas ao longo de hidrólise enzimática. Seu valor relativamente

baixo dificultaria sua análise ao longo do tempo. A influência da área superficial sobre a taxa reacional é mais facilmente avaliada por meio da análise dos pré-tratados de Avicel PH-101 pelo líquido iônico ([EMIM][OAc]).

A modelagem matemática de hidrólise conseguiu testar dois conjuntos de hipóteses, denominados como casos 1 e 2. O Caso 1, adaptado de Tsai *et al.*, 2014, conseguiu ganhos descritivos ao ampliar a descrição do fenômeno de adsorção das celulases e β -glicosidases descritas no processo como dependentes da área superficial, incorporando dessorções, mas também a inativação das entidades envolvidas. Porém, manteve a rota de degradação de celulose proposta por Kadam, (2004), que admitia formação de glicose a partir de celulose, sem formar celobiose. O Caso 2 conseguiu descrever as variáveis do processo para duas fases de substrato, além da formação de glicose exclusivamente por meio da formação de celobiose e sua subsequente degradação, negando a hipótese feita por Tsai, (2014) e Kadam, (2004), dentre outros autores da degradação direta da celulose para glicose. No Caso 2, também, e celulases e β -glicosidases sendo capazes de serem dessorvidas e inibidas, como no Caso 1. Essas simulações permitiram testar diferentes concepções de sistema e escolher, dentre elas, as mais aptas a terem seus parâmetros estimados.

No que diz respeito à estimação de parâmetros, ela foi executada utilizando os dados experimentais de Tsai, (2014). As tentativas de incorporar os dados de hidrólise dos materiais celulósicos pré-tratados dessa tese aos dados experimentais de Tsai, (2014) não foi bem sucedido para estimar parâmetros dos diferentes modelos testados. Embora fossem utilizados os mesmos extratos enzimáticos na realização de experimentos nesse trabalho e no trabalho da literatura, mas também o mesmo substrato Avicel PH-101 e mesma carga enzimática, as outras características dos blocos experimentais foram determinantes para diferenciar os blocos experimentais desse trabalho e da literatura. Os dois blocos experimentais não foram equivalentes, comparáveis, agrupáveis para uma estimação. Assim, entende-se que é desejável que sejam estimados parâmetros para um mesmo conjunto de dados experimentais, ou assegurar que os dados de diferentes origens sejam igualmente obtidos em termos estatísticos de qualidade. Dada a dificuldade atual de se controlar mais fatores do que os descritos nessa tese para considerar dois experimentos equivalentes, entende-se como mais confiável apostar na produção de todos os dados experimentais para a estimação de parâmetros de modelos cinéticos de hidrólise de celulose. Entende-se como mais válido verificar e compreender cada fenômeno

envolvido na hidrólise de celulose e incorporar eles, subsequentemente, a partir de um modelos que são alimentados por uma mesma base de dados experimentais reproduzível e crescente. Apostar em unir dados de diferentes origens, dificilmente equivalentes por razões de natureza experimental se mostrou infrutífero neste trabalho. Mesmo quista a realização de tais experimentos, não existiram recursos materiais e temporais suficientes para a realização da tarefa completa.

No que tange ao ajuste alcançado para os dois modelos cinéticos: modelo do Caso 1 e Caso 2, foi possível ajustar parâmetros para ambos os modelos. Cada um possuía diferentes hipóteses constitutivas e apresentou distintas eficiências descritivas. O melhor ajuste do modelo 1, foi observado pelo menor valor da função objetivo e por meio de um amoldamento conseguido com um menor número de parâmetros propostos. Mas também, esse melhor ajuste se explicou pela manutenção da descrição simplificada do processo. Ou seja, da celulose constituída apenas em uma fase e da manutenção da reação de formação de glicose a partir da celulose diretamente, ambas premissas do modelo de Tsai, (2014). Premissas essas que permitiram esse modelo de se ajustar a esses mesmos dados experimentais. Mesmo o modelo do caso 2 não tendo sido alimentado dados experimentais específicos sobre a quantidade de enzima desorvida e inibida ao longo da hidrólise durante a estimação, ele foi capaz de capturar parte do efeito de decréscimo de taxa de reação pela desorção das celulasas e sua inibição, descrevendo fenomenologias já comprovadas experimentalmente em outros trabalhos na literatura. Ou seja, esse conjunto fenomenológico de desorção e inibição é cabível para explicar o decréscimo reacional. Atribuiu-se à correlação entre K_{1r}^* e K_{2r}^* justamente à inadequada descrição da reação 2 desse modelo por admitir formação direta de glicose a partir de celulose sem experimentos que sustentem essa hipótese, seja nesse conjunto experimental, quicá na literatura. Por isso, ela foi abandonada na proposição do Caso 2.

O ajuste do modelo do Caso 2, foi menor do que do Caso 1 observando a função objetivo. Além de admitir desorção e inibição das enzimas como no Caso 1, esse modelo descreveu a hidrólise da celulose em duas fases: amorfa e cristalina, abandonando a formação de glicose sem intermediário celobiose como no Caso 1. Para estimação dos parâmetros desse modelo, fez-se o uso do mesmo conjunto de dados experimentais do que o Caso 1. Ou seja, não foram utilizados os dados experimentais de hidrólise de celulose em duas fases, seja pela inexistência dos mesmos na série de Tsai *et al.*, 2014, ou pela não equivalência das condições que geraram os dados da literatura e dessa tese na

tentativa feita ou agrupá-los. Sendo assim, não foi possível separar algumas fenomenologias descritas pelo Caso 2. Sobretudo as taxas de degradação da celulose amorfa e cristalina. Isso ficou evidente pelo confundimento K_{1r}^+ e K_{2r}^+ , mas também desses para com K_{3r} , mas também entre parâmetros de inibição K_{5r}^+ e K_{7r}^+ , relacionados ao decréscimo da taxa reacional. O relativo bom ajuste do modelo, mesmo com esses confundimentos, reforça a necessidade de serem produzidos dados experimentais em um conjunto específico para a estimação dos parâmetros do modelo 2 e, pelo menos, não exclui a hipótese subjacente de um modelo de degradação em duas fases de substrato.

A realização da tarefa de geração de um conjunto de dados experimentais é extremamente importante para desvendar a fenomenologia de hidrólise enzimática. Embora demandado grande esforço nessa empreitada, a necessidade de se desvendar o processo de hidrólise passa invariavelmente subjacente à geração de mais dados experimentais com maior qualidade, mais descritivos, tanto em termos das enzimas envolvidas, quanto em termos das características do substrato ao longo do tempo. Provavelmente uma tarefa nesse sentido necessitará a divisão de blocos de trabalho em pré-tratamento, hidrólise e caracterização estrutural dos resíduos para sua execução com sucesso.

8. Perspectivas Futuras

Tendo em vista os dados gerados nesse trabalho em padronizar as condições de hidrólise que atingiam maior rendimento, de padronização de pré-tratamentos e de caracterização das amostras e, também, no esforço de estimação com base nos dados experimentais disponíveis acredita-se que a estimação dos parâmetros do modelo do Caso 1 e 2 é bastante possível realizando-se as seguintes tarefas:

- Novos experimentos nas exatas 34 condições descritas por Tsai, (2014) em seu bloco de dados experimentais (Anexo IV – Dados experimentais utilizados em estimação)
- Realizar mais pré-tratados por ([EMIM][OAc]) e por moínho de bolas em condições de pré-tratamentos distintas para gerar materiais com características diferenciadas
- Realização de rigorosa e ampla caracterização das amostras e sua hidrólise
- Purificação dos extratos comerciais e realização de experimentos com enzimas isoladas

Bibliografia

- Abuja, P. M., Schmuck, M., Pilz, I., Tomme, P., Claeysens, M., e Esterbauer, H. (1988). Structural and functional domains of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. *European Biophysics Journal*, 15(6), 339–342. <http://doi:10.1007/BF00254721>
- Adney, B., Baker, J., e NREL. (2008). Measurement of Cellulase Activities Laboratory Analytical Procedure (LAP) Issue Date : 08 / 12 / 1996 Measurement of Cellulase Activities Laboratory Analytical Procedure (LAP). *Renewable Energy*. Acessado em from www.nrel.gov/docs/gen/fy08/42628.pdf
- Ago, M., Endo, T., & Hirotsu, T. (2004). Crystalline transformation of native cellulose from cellulose I to cellulose II polymorph by a ball-milling method with a specific amount of water. *Cellulose*, 11(2), 163–167. <http://doi.org/10.1023/B:CELL.0000025423.32330.f>
- Akhtar, N., Aanchal, Goyal, D., e Goyal, A. (2016). BIODIVERSITY OF CELLULASE PRODUCING BACTERIA AND THEIR APPLICATIONS. *Technology, Cellulose Chemistry and*, 50(9–10), 983–995.
- Akinosho, H., Yee, K., Close, D., e Ragauskas, A. (2014). The emergence of *Clostridium thermocellum* as a high utility candidate for consolidated bioprocessing applications. *Frontiers in Chemistry*, 2(August), 66. <http://doi.org/10.3389/fchem.2014.00066>
- Al-Zuhair, S. (2008). The effect of crystallinity of cellulose on the rate of reducing sugars production by heterogeneous enzymatic hydrolysis. *Bioresource Technology*, 99(10), 4078–85. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.09.003>
- Andersen, N. (2007). Enzymatic Hydrolysis of Cellulose. Technical University of Denmark. Acessado em from [http://orbit.dtu.dk/services/downloadRegister/5466093/Afhandling A4 format.pdf](http://orbit.dtu.dk/services/downloadRegister/5466093/Afhandling%20A4%20format.pdf)
- Andrić, P., Meyer, A. S., Jensen, P. a, & Dam-Johansen, K. (2010). Reactor design for minimizing product inhibition during enzymatic lignocellulose hydrolysis: I. Significance and mechanism of cellobiose and glucose inhibition on cellulolytic

enzymes. *Biotechnology Advances*, 28(3), 308–24.
<http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.01.003>

Angarita Martínez, J. D. (2014). Modelagem Cinética da Hidrólise Enzimática da Palha de Cana-de-Açúcar Pré-tratada Hidrotermicamente. Federal University of Rio de Janeiro.

Angarita, J. D., Souza, R. B. a., Cruz, a. J. G., Biscaia, E. C., e Secchi, a. R. (2015). Kinetic modeling for enzymatic hydrolysis of pretreated sugarcane straw. *Biochemical Engineering Journal*. <http://doi.org/10.1016/j.bej.2015.05.021>

Atalla, R., e Vanderhart, D. (1984). Native cellulose: a composite of two distinct crystalline forms. *Science*, 223(4633), 6–8. Acessado em from <http://www.sciencemag.org/content/223/4633/283.short>

Avolio, R., Bonadies, I., Capitani, D., Errico, M. E., Gentile, G., & Avella, M. (2012). A multitechnique approach to assess the effect of ball milling on cellulose. *Carbohydrate Polymers*, 87(1), 265–273.
<http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.07.047>

Bak, J. S., Ko, J. K., Han, Y. H., Lee, B. C., Choi, I.-G., & Kim, K. H. (2009). Improved enzymatic hydrolysis yield of rice straw using electron beam irradiation pretreatment. *Bioresource Technology*, 100(3), 1285–90.
<http://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.09.010>

Balat, M. (2011). Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy Conversion and Management*, 52(2), 858–875. doi:10.1016/j.enconman.2010.08.013

Bansal, P., Hall, M., Realf, M. J., Lee, J. H., eBommarius, A. S. (2009). Modeling cellulase kinetics on lignocellulosic substrates. *Biotechnology Advances* (27), 833–848.

Barati, B., & Sadegh Amiri, I. (2015). Literature Review of Cellulase and Approaches to Increase Its Stability. In *SpringerBriefs in Applied Sciences and Technology* (Vol. 153, pp. 7–21). http://doi.org/10.1007/978-981-287-432-0_2

- Barcelos, C. A., Rocha, V. A., Groposo, C., de Castro, A. M., e Pereira Jr, N. (2015). Enzymes and Accessory Proteins involved in the Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass for Bioethanol Production. In R. Silva (Ed.), *Mycology: Current and Future Developments* (Vol. 1, pp. 23–56). BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS. <http://doi.org/10.2174/97816810807411150101>
- Barnette, A. L., Lee, C., Bradley, L. C., Schreiner, E. P., Park, Y. B., Shin, H., ... Kim, S. H. (2012). Quantification of crystalline cellulose in lignocellulosic biomass using sum frequency generation (SFG) vibration spectroscopy and comparison with other analytical methods. *Carbohydrate Polymers*, 89(3), 802–809. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.04.014>
- Barr, C. J., Hanson, B. L., Click, K., Perrotta, G., & Schall, C. A. (2014). Influence of ionic-liquid incubation temperature on changes in cellulose structure, biomass composition, and enzymatic digestibility. *Cellulose*, 21(2), 973–982. <http://doi.org/10.1007/s10570-013-0052-y>
- Basso, T. P., Basso, T. O., Gallo, C. R., & Basso, L. C. (2013). Towards the Production of Second Generation Ethanol from Sugarcane Bagasse in Brazil. *Biomass Now – Cultivation and Utilization*. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/54179>
- Baumann, M. J., Borch, K., & Westh, P. (2011). Xylan oligosaccharides and cellobiohydrolase i (TrCel7A) interaction and effect on activity. *Biotechnology for Biofuels*, 4, 1–8. <http://doi.org/10.1186/1754-6834-4-45>
- Beaumont, M., Rennhofer, H., Opietnik, M., Lichtenegger, H. C., Potthast, A., & Rosenau, T. (2016). Nanostructured Cellulose II Gel Consisting of Spherical Particles. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 4(8), 4424–4432. <http://doi.org/10.1021/acssuschemeng.6b01036>
- Beckham, G. T., Matthews, J. F., Bomble, Y. J., Bu, L., Adney, W. S., Himmel, M. E., ... Crowley, M. F. (2010). Identification of amino acids responsible for processivity in a family 1 carbohydrate-binding module from a fungal cellulase. *Journal of Physical Chemistry B*, 114(3), 1447–1453. <http://doi.org/10.1021/jp908810a>

- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., ... Bourne, P. E. (2000). The protein data bank. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 235–242. <http://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>
- Bidlack, J., Malone, M., e Benson, R. (1992). Molecular structure and component integration of secondary cell walls in plants. *Proc. Okla. Acad. Sci*, 56(72), 51–56. Acessado em from http://digital.library.okstate.edu/oas/oas_pdf/v72/p51_56.pdf
- Bommarius, A. S., Katona, A., Cheben, S. E., Patel, A. S., Ragauskas, A. J., Knudson, K., & Pu, Y. (2008). Cellulase kinetics as a function of cellulose pretreatment. *Metabolic Engineering*, 10(6), 370–81. <http://doi.org/10.1016/j.ymben.2008.06.008>
- Bomtempo, J. V. O Futuro dos Biocombustíveis. In: Duailibe, A. K. (org.), *Combustíveis no Brasil: desafios e perspectivas*. Synergia: Centro de Estudos de Energia e Desenvolvimento (CEEND), Rio de Janeiro, 2012. p. 114-127
- Boraston, A. B., Bolam, D. N., Gilbert, T. H. J., & Davies, G. J. (2004). Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. *Biochemical Journal*, 382(3), 769–781. <http://doi.org/10.1042/BJ20040892>
- Borin, G. P., Sanchez, C. C., De Souza, A. P., De Santana, E. S., De Souza, A. T., Leme, A. F. P., ... De Castro Oliveira, J. V. (2015). Comparative secretome analysis of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* during growth on sugarcane biomass. *PLoS ONE*, 10(6), 1–20. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0129275>
- Börjesson, J., Engqvist, M., Sipos, B., & Tjerneld, F. (2007). Effect of poly(ethylene glycol) on enzymatic hydrolysis and adsorption of cellulase enzymes to pretreated lignocellulose. *Enzyme and Microbial Technology*, 41(1–2), 186–195. <http://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.01.003>
- Börjesson, M., e Westman, G. (2015). Crystalline Nanocellulose — Preparation, Modification, and Properties. *Cellulose – Fundamental Aspects and Current Trends*, 159–191. <http://doi.org/10.5772/61899>
- 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*, 72(1-2), 248–254. [http://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](http://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

- BRENDA, The Comprehensive Enzyme Information System. (2018). Acessado em 24 de Agosto de 2017 em <https://www.brenda-enzymes.org>.
- Brown, R. M., & Saxena, I. M. (2000). Cellulose biosynthesis: A model for understanding the assembly of biopolymers. *Plant Physiology and Biochemistry*, 38(1–2), 57–67. [http://doi.org/10.1016/S0981-9428\(00\)00168-6](http://doi.org/10.1016/S0981-9428(00)00168-6)
- Câmara, M. M. (2012). Modelagem e Simulação da Hidrólise Enzimática de Bagaço-de-cana Pré-Tratado com Peróxido de Hidrogênio em Meio Alcalino. Universidade Estadual de Maringá.
- Cardona, C. a, Quintero, J. a, e Paz, I. C. (2010). Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives. *Bioresourcetchnology*, 101(13), 4754–66. doi:10.1016/j.biortech.2009.10.097
- Carrard, G., & Linder, M. (1999). Widely different off rates of two closely related cellulose-binding domains from *Trichoderma reesei*. *European Journal of Biochemistry*, 262(3), 637–643. <http://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00455.x>
- CAZY – Carbohydrate Active Enzyme Database. (2017). Acessado em August 24, 2017, from <http://www.cazy.org>
- CAZY-2 – Carbohydrate-Binding Module family classification. (2018). Acessado em 8 de Junho de 2018, <http://www.cazy.org/Carbohydrate-Binding-Modules.html>
- Chanzy, H., Henrissat, B., Vuong, R., & Schülein, M. (1983). The action of 1,4-β-D-glucan cellobiohydrolase on Valonia cellulose microcrystals. An electron microscopic study. *FEBS Letters*, 153(1), 113–118. [http://doi.org/10.1016/0014-5793\(83\)80129-X](http://doi.org/10.1016/0014-5793(83)80129-X)
- Cheng, G., Varanasi, P., Li, C., Liu, H., Melnichenko, Y. B., Simmons, B. A., ... Singh, S. (2011). Transition of Cellulose Crystalline Structure and Surface Morphology of Biomass as a Function of Ionic Liquid Pretreatment and Its Relation to Enzymatic Hydrolysis. *Biomacromolecules*, 12(4), 933–941. <http://doi.org/10.1021/bm101240z>
- Corrales, R. C. N. R., Mendes, F. M., Perrone, C., Sant'Anna, C., de Souza, W., Abud, Y., ... Ferreira-Leitão, V. (2012). Structural evaluation of sugar cane bagasse

steam pretreated in the presence of CO₂ and SO₂. *Biotechnology for Biofuels*, 5(1), 36. <http://doi.org/10.1186/1754-6834-5-36>

Cruys-Bagger, N., Tatsumi, H., Ren, G. R., Borch, K., & Westh, P. (2013). Transient kinetics and rate-limiting steps for the processive cellobiohydrolase Cel7a: Effects of substrate structure and carbohydrate binding domain. *Biochemistry*, 52(49), 8938–8948. <http://doi.org/10.1021/bi401210n>

da Costa, A. C. A., Junior, N. P., e Aranda, D. A. G. (2010). The situation of biofuels in Brazil: New generation technologies. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(9), 3041–3049. doi:10.1016/j.rser.2010.07.058

da Silva, A. S. (2006). PRÉ-TRATAMENTO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR COM LÍQUIDOS IÔNICOS: EFEITO NA DESESTRUTURAÇÃO DA PAREDE CELULAR E NA EFICIÊNCIA DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA. UFRJ. Acessado em from https://www.google.com.br/url?sa=terct=jeq=eescr=sesource=webecd=1ecad=rjaeuact=8eved=0ahUKEwiJ5efs1_rSAhVCyyYKHQVnCFUQFggcMAAeurl=http%3A%2F%2Fpct.capes.gov.br%2Fteses%2F2013%2F31001017013P2%2FTES.PDFeug=AFQjCNGiFMMuR-aUGw0h1bU4vKpugNyNZAesig2=xHqkN8tvj

da Silva, A. S. A., Fernandes de Souza, M., Ballesteros, I., Manzanares, P., Ballesteros, M., & P. S. Bon, E. (2016). High-solids content enzymatic hydrolysis of hydrothermally pretreated sugarcane bagasse using a laboratory-made enzyme blend and commercial preparations. *Process Biochemistry*, 51(10), 1561–1567. <http://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.07.018>

da Silva, A. S. A., Inoue, H., Endo, T., Yano, S., e Bon, E. P. (2010). Milling pretreatment of sugarcane bagasse and straw for enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. *Bioresource technology*, 101(19), 7402-7409. doi:10.1016/j.biortech.2010.05.008

da Silva, A. S. A., Teixeira, R. S. S., Moutta, R. de O., Ferreira-Leitão, V. S., de Barros, R. da R. O., Ferrara, M. A., e Bon, E. P. da S. (2013). Sugarcane and woody biomass pretreatments for ethanol production. In A. K. Chandel e S. S. da Silva (Eds.), *Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass – Techniques, Applications and Commercialization* (pp. 47–88). INTECH. doi:10.5772/53378

- de Oliveira Moutta, R. De, Cristina Silva, M., Reis Corrales, R. C. N., Santos Cerullo, M. A., Ferreira-Leitão, V. S., e Bon, E. P. S. (2013). Comparative Response and Structural Characterization of Sugarcane Bagasse, Straw and Bagasse-Straw 1:1 Mixtures Subjected to Hydrothermal Pretreatment and Enzymatic Conversion. *Journal of Microbial e Biochemical Technology*, 01(S12). doi:10.4172/1948-5948.S12-005
- Dekker, R. F. H., & Wallis, A. F. A. (1983). Enzymic saccharification of sugarcane bagasse pretreated by autohydrolysis-steam explosion. *Biotechnology and Bioengineering*, 25(12), 3027–3048. <http://doi.org/10.1002/bit.260251218>
- Dimarogona, M., Topakas, E., e Christakopoulos, P. (2012). Cellulose degradation by oxidative enzymes. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2(3). doi:10.5936/csbj.201209015
- Eriksson, T., Karlsson, J., & Tjerneld, F. (2002). A Model Explaining Declining Rate in Hydrolysis of Lignocellulose Substrates with Cellobiohydrolase I (Cel7A) and Endoglucanase I (Cel7B) of *Trichoderma reesei*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 101(1), 41–60. <http://doi.org/10.1385/ABAB:101:1:41>
- Ernst, O., & Zor, T. (2010). Linearization of the Bradford Protein Assay. *Journal of Visualized Experiments*, (38), 1–6. <http://doi.org/10.3791/1918>
- Fan, L. T., Lee, Y.-H., & Beardmore, D. H. (1980). Mechanism of the enzymatic hydrolysis of cellulose: Effects of major structural features of cellulose on enzymatic hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering*, 22(1), 177–199. <http://doi.org/10.1002/bit.260220113>
- Florencio, C., Cunha, F. M., Badino, A. C., Farinas, C. S., Ximenes, E., & Ladisch, M. R. (2016). Secretome data from *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* cultivated in submerged and sequential fermentation methods. *Data in Brief*, 8, 588–598. <http://doi.org/10.1016/j.dib.2016.05.080>
- FMC. (2017). Avicel. Acessado em 01/08/2017, em <http://www.fmcbiopolymer.com/Pharmaceutical/Products/Avicelforsoliddoseforms.aspx>

- Foreman, P. K., Brown, D., Dankmeyer, L., Dean, R., Diener, S., Dunn-Coleman, N. S., ... Ward, M. (2003). Transcriptional regulation of biomass-degrading enzymes in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Journal of Biological Chemistry*, 278(34), 31988–31997. <http://doi.org/10.1074/jbc.M304750200>
- Fox, J. M., Levine, S. E., Clark, D. S., & Blanch, H. W. (2012). Initial- and Processive-Cut Products Reveal Cellobiohydrolase Rate Limitations and the Role of Companion Enzymes.
- French, A. D. (2014). Idealized powder diffraction patterns for cellulose polymorphs. *Cellulose*, 21(2), 885–896. <http://doi.org/10.1007/s10570-013-0030-4>
- Gan Q., Allen, S. ., e Taylor, G. (2003). Kinetic dynamics in heterogeneous enzymatic hydrolysis of cellulose: an overview, an experimental study and mathematical modelling. *Process Biochemistry*, 38(7), 1003–1018. [http://doi.org/10.1016/S0032-9592\(02\)00220-0](http://doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00220-0)
- Gan, Q., Allen, S. J., & Taylor, G. (2002). Design and operation of an integrated membrane reactor for enzymatic cellulose hydrolysis. *Biochemical Engineering Journal*, 12(3), 223–229. [http://doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00072-4](http://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00072-4)
- Ganner, T., Bubner, P., Eibinger, M., Mayrhofers, C., Planks, H., & Nidetzky, B. (2012). Dissecting and reconstructing synergism: In situ visualization of cooperativity among cellulases. *Journal of Biological Chemistry*, 287(52), 43215–43222. <http://doi.org/10.1074/jbc.M112.419952>
- Gavlighi, H. A., Meyer, A. S., & Mikkelsen, J. D. (2013). Enhanced enzymatic cellulose degradation by cellobiohydrolases via product removal. *Biotechnology Letters*, 35(2), 205–212. <http://doi.org/10.1007/s10529-012-1067-4>
- Ghose, T. K. (1987). Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry*, 59(2), 257–268. <http://doi.org/10.1351/pac198759020257>
- Goldemberg, J., Coelho, S. T., Nastari, P. M., e Lucon, O. (2004). Ethanol learning curve – The Brazilian experience. *Biomass and Bioenergy*, 26(3), 301–304. [http://doi.org/10.1016/S0961-9534\(03\)00125-9](http://doi.org/10.1016/S0961-9534(03)00125-9)

- Gorrasi, G., & Sorrentino, A. (2015). Mechanical milling as a technology to produce structural and functional bio-nanocomposites. *Green Chem.*, 17(5), 2610–2625. <http://doi.org/10.1039/C5GC00029G>
- Gottschalk, L. M. F., Paredes, R. D. S., Teixeira, R. S. S., Silva, A. S. da, & Bon, E. P. D. S. (2013). Efficient production of lignocellulolytic enzymes xylanase, β -xylosidase, ferulic acid esterase and β -glucosidase by the mutant strain *Aspergillus awamori* 2B.361 U2/1. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(2), 569–576. <http://doi.org/10.1590/S1517-83822013000200037>
- Graenacher, C. (1934). Cellulose Solution. Switzerland. Acessado em from <http://www.freepatentsonline.com/1943176.pdf>
- Griggs, A. J., Stickel, J. J., & Lischeske, J. J. (2012). A mechanistic model for enzymatic saccharification of cellulose using continuous distribution kinetics I: Depolymerization by EGI and CBHI. *Biotechnology and Bioengineering*, 109(3), 665–675. <http://doi.org/10.1002/bit.23355>
- Gruno, M., Våljamäe, P., Pettersson, G., & Johansson, G. (2004). Inhibition of the *Trichoderma reesei* cellulases by cellobiose is strongly dependent on the nature of the substrate. *Biotechnology and Bioengineering*, 86(5), 503–11. <http://doi.org/10.1002/bit.10838>
- Guilherme, A. A., Dantas, P. V. F., Santos, E. S., Fernandes, F. A. N., e Macedo, G. R. (2015). Evaluation of composition, characterization and enzymatic hydrolysis of pretreated sugar cane bagasse. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 32(1), 23–33. <http://doi.org/10.1590/0104-6632.20150321s00003146>
- Gupta, V. K., Schmoll, M., Herrera-Estrella, A., Upadhyay, R. S., Druzhinina, I., & Tuohy, M. G. (2014). *Biotechnology and Biology of Trichoderma*. *Biotechnology and Biology of Trichoderma*. <http://doi.org/10.1016/C2012-0-00434-6>
- Gusakov, a. V., Sinitsyn, a. P., e Klyosov, a. P. (1985). Kinetics of the enzymatic hydrolysis of cellulose: 1. A mathematical model for a batch reactor process. *Enzyme and Microbial Technology*, 7(7), 346–352. [http://doi.org/10.1016/0141-0229\(85\)90114-0](http://doi.org/10.1016/0141-0229(85)90114-0)

- Hallac, B. B., & Ragauskas, A. J. (2011). Analyzing cellulose degree of polymerization and its relevancy to cellulosic ethanol. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 5(2), 215–225. <http://doi.org/10.1002/bbb.269>
- Harjunpää, V., Teleman, a, Koivula, a, Ruohonen, L., Teeri, T. T., Teleman, O., & Drakenberg, T. (1996). Cello-oligosaccharide hydrolysis by cellobiohydrolase II from *Trichoderma reesei*. Association and rate constants derived from an analysis of progress curves. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 240(3), 584–91. <http://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1996.0584h.x>
- Harrison, M. J., Nouwens, A. S., Jardine, D. R., Zachara, N. E., Gooley, A. A., Nevalainen, H., & Packer, N. H. (1998). Modified glycosylation of cellobiohydrolase I from a high cellulase- producing mutant strain of *Trichoderma reesei*. *European Journal of Biochemistry*, 256(1), 119–127. <http://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1998.2560119.x>
- Hatfield, K. (2010). Enzyme-substrate interaction significantly affects activity loss during enzymatic hydrolysis of cellulose. University of Louisville. Retrieved from <http://ir.library.louisville.edu/etd/583>
- Hodge, D. B., Karim, M. N., Schell, D. J., e McMillan, J. D. (2008). Soluble and insoluble solids contributions to high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Bioresource Technology*, 99 (18), 8940-8948. doi:10.1016/j.biortech.2008.05.015
- Holtzapple, M. T., Caram, H. S., e Humphrey, A. E. (1984). A comparison of two empirical models for the enzymatic hydrolysis of pretreated poplar wood. *Biotechnology and Bioengineering*, 26(8), 936–941. <http://doi.org/10.1002/bit.260260818>
- Holtzapple, M., Cognata, M., Shu, Y., & Hendrickson, C. (1990). Inhibition of *Trichoderma reesei* cellulase by sugars and solvents. *Biotechnology and Bioengineering*, 36(3), 275–287. <http://doi.org/10.1002/bit.260360310>
- Huang, R., Guo, H., Su, R., Qi, W., & He, Z. (2017). Enhanced cellulase recovery without β -glucosidase supplementation for cellulosic ethanol production using an

engineered strain and surfactant. *Biotechnology and Bioengineering*, 114(3), 543–551. <http://doi.org/10.1002/bit.26194>

Hui, J. P. M., Lanthier, P., White, T. C., McHugh, S. G., Yaguchi, M., Roy, R., & Thibault, P. (2001). Characterization of cellobiohydrolase I (Cel7a) glycoforms from extracts of *Trichoderma reesei* using capillary isoelectric focusing and electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 752(2), 349–368. [http://doi.org/10.1016/S0378-4347\(00\)00373-X](http://doi.org/10.1016/S0378-4347(00)00373-X)

Ibbett, R. N., Domvoglou, D., e Phillips, D. a. S. (2007). The hydrolysis and recrystallisation of lyocell and comparative cellulosic fibres in solutions of mineral acid. *Cellulose*, 15(2), 241–254. <http://doi.org/10.1007/s10570-007-9157-5>

Igarashi, K., Koivula, A., Wada, M., Kimura, S., Penttilä, M., & Samejima, M. (2009). High speed atomic force microscopy visualizes processive movement of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I on crystalline cellulose. *Journal of Biological Chemistry*, 284(52), 36186–36190. <http://doi.org/10.1074/jbc.M109.034611>

Igarashi, K., Samejima, M., & Eriksson, K.-E. L. (1998). Cellobiose dehydrogenase enhances *Phanerochaete chrysosporium* cellobiohydrolase I activity by relieving product inhibition. *European Journal of Biochemistry*, 253(1), 101–106. <http://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1998.2530101.x>

Igarashi, K., Uchihashi, T., Koivula, A., Wada, M., Kimura, S., Okamoto, T., ... Samejima, M. (2011). Traffic Jams Reduce Hydrolytic Efficiency of Cellulase on Cellulose Surface. *Science*, 333(6047), 1279–1282. <http://doi.org/10.1126/science.1208386>

Ishii, D., Tatsumi, D., & Matsumoto, T. (2003). Effect of solvent exchange on the solid structure and dissolution behavior of cellulose. *Biomacromolecules*, 4(5), 1238–1243. <http://doi.org/10.1021/bm034065g>

IUPAC / IUBMB. (2014). *Enzyme Nomenclature*. Acessado em September 20, 2017, from <http://www.sbcs.qmul.ac.uk/iupac/jcbn/index.html#6>

- Jackson, M. A., & Talburt, D. E. (1988). Mechanism for β -glucosidase release into cellulose-grown *Trichoderma reesei* culture supernatants. *Experimental Mycology*, 12(2), 203–216. [http://doi.org/10.1016/0147-5975\(88\)90009-6](http://doi.org/10.1016/0147-5975(88)90009-6)
- Jalak, J., & Våljamäe, P. (2010). Mechanism of initial rapid rate retardation in cellobiohydrolase catalyzed cellulose hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering*, 106(6), 871–883. <http://doi.org/10.1002/bit.22779>
- Jalak, J., Kurašin, M., Teugjas, H., & Våljamä, P. (2012). Endo-exo synergism in cellulose hydrolysis revisited. *Journal of Biological Chemistry*, 287(34), 28802–28815. <http://doi.org/10.1074/jbc.M112.381624>
- Jeng, W. Y., Wang, N. C., Lin, M. H., Lin, C. T., Liaw, Y. C., Chang, W. J., ... Wang, A. H. J. (2011). Structural and functional analysis of three β -glucosidases from bacterium *Clostridium cellulovorans*, fungus *Trichoderma reesei* and termite *Neotermes koshunensis*. *Journal of Structural Biology*, 173(1), 46–56. <http://doi.org/10.1016/j.jsb.2010.07.008>
- Jeoh, T., Cardona, M. J., Karuna, N., Mudinoor, A. R., & Nill, J. (2017). Mechanistic kinetic models of enzymatic cellulose hydrolysis-a review. *Biotechnology and Bioengineering*. <http://doi.org/10.1002/bit.26277>
- Jiang, F., & Hsieh, Y. Lo. (2014). Assembling and redispersibility of rice straw nanocellulose: Effect of tert-butanol. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 6(22), 20075–20084. <http://doi.org/10.1021/am505626a>
- Jung, J., Sethi, A., Gaiotto, T., Han, J. J., Jeoh, T., Gnanakaran, S., & Goodwin, P. M. (2013). Binding and movement of individual Cel7a cellobiohydrolases on crystalline cellulose surfaces revealed by single-molecule fluorescence imaging. *Journal of Biological Chemistry*, 288(33), 24164–24172. <http://doi.org/10.1074/jbc.M113.455758>
- Junior, C. S. (2011). Distribuição do tamanho de poros e sacarificação enzimática de amostras de bagaço de cana-de-açúcar submetidas à deslignificação e secagem. Universidade de São Paulo. Acessado em from <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/97/97131/tde-22082013-162558/>

- 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*, 20(3), 698–705. Acessado em from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15176871>
- Kafle, K., Shin, H., Lee, C. M., Park, S., & Kim, S. H. (2015). Progressive structural changes of Avicel, bleached softwood, and bacterial cellulose during enzymatic hydrolysis. *Scientific Reports*, 5(October), 1–10. <http://doi.org/10.1038/srep15102>
- Kennedy, C. J., Apperley, D. C., Cameron, G. J., Wess, T. J., Šturcová, A., Altaner, C., & Jarvis, M. C. (2007). Microfibril diameter in celery collenchyma cellulose: X-ray scattering and NMR evidence. *Cellulose*, 14(3), 235–246. <http://doi.org/10.1007/s10570-007-9116-1>
- Khodaverdi, M., Jeihanipour, A., Karimi, K., e Taherzadeh, M. J. (2012). Kinetic modeling of rapid enzymatic hydrolysis of crystalline cellulose after pretreatment by NMMO. *Journal of Industrial Microbiology e Biotechnology*, 39(3), 429–38. <http://doi.org/10.1007/s10295-011-1048-y>
- Kleywegt, G. J., Zou, J. Y., Divne, C., Davies, G. J., Sinning, I., Ståhlberg, J., ... Jones, T. a. (1997). The crystal structure of the catalytic core domain of endoglucanase I from *Trichoderma reesei* at 3.6 Å resolution, and a comparison with related enzymes. *Journal of Molecular Biology*, 272(3), 383–397. <http://doi.org/10.1006/jmbi.1997.1243>
- Koivula, A., Kinnari, T., Harjunpää, V., Ruohonen, L., Teleman, A., Drakenberg, T., ... Teeri, T. T. (1998). Tryptophan 272: An essential determinant of crystalline cellulose degradation by *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase Cel6A. *FEBS Letters*, 429(3), 341–346. [http://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)00596-1](http://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)00596-1)
- Koivula, A., Ruohonen, L., Wohlfahrt, G., Reinikainen, T., Teeri, T. T., Piens, K., Claeyssens, M. *et al.* (2002). The active site of cellobiohydrolase Cel6A from *Trichoderma reesei*: The roles of aspartic acids D221 and D175. *Journal of the American Chemical Society*, 124(34), 10015-10024.

- Kont, R., Kurašin, M., Teugjas, H., & Väljamäe, P. (2013). Strong cellulase inhibitors from the hydrothermal pretreatment of wheat straw. *Biotechnology for Biofuels*, 6(1), 1–14. <http://doi.org/10.1186/1754-6834-6-135>
- Kubicek, C. P. (1987). Involvement of a Conidial Endoglucanase and a Plasma-membrane-bound α -Glucosidase in the Induction of Endoglucanase Synthesis by Cellulose in *Trichoderma reesei*. *Microbiology*, 133(6), 1481–1487. <http://doi.org/10.1099/00221287-133-6-1481>
- Kuhad, R. C., Gupta, R., & Singh, A. (2011). Microbial cellulases and their industrial applications. *Enzyme Research*, 2011, 280696. doi:10.4061/2011/280696
- Kurašin, M., & Väljamäe, P. (2011). Processivity of cellobiohydrolases is limited by the substrate. *Journal of Biological Chemistry*, 286(1), 169–177. <http://doi.org/10.1074/jbc.M110.161059>
- Kuusk, S., Sørli, M., & Väljamäe, P. (2015). The predominant molecular state of bound enzyme determines the strength and type of product inhibition in the hydrolysis of recalcitrant polysaccharides by processive enzymes. *Journal of Biological Chemistry*, 290(18), 11678–11691. <http://doi.org/10.1074/jbc.M114.635631>
- Lamsal, B., Yoo, J., Brijwani, K., & Alavi, S. (2010). Extrusion as a thermo-mechanical pre-treatment for lignocellulosic ethanol. *Biomass and Bioenergy*, 34(12), 1703–1710. doi:10.1016/j.biombioe.2010.06.009
- Langston, J. A., Shaghasi, T., Abbate, E., Xu, F., Vlasenko, E., & Sweeney, M. D. (2011). Oxidoreductive cellulose depolymerization by the enzymes cellobiose dehydrogenase and glycoside hydrolase 61. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(19), 7007–7015. <http://doi.org/10.1128/AEM.05815-11>
- Larsson, P. T., Wickholm, K., & Iversen, T. (1997). A CP/MAS¹³C NMR investigation of molecular ordering in celluloses. *Carbohydrate Research*, 302(1–2), 19–25. [http://doi.org/10.1016/S0008-6215\(97\)00130-4](http://doi.org/10.1016/S0008-6215(97)00130-4)
- Laureano-Perez, L., Teymouri, F., Alizadeh, H., & Dale, B. E. (2005). Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass. *Applied Biochemistry and ...*, 124, 1081–1099. http://doi.org/10.1007/978-1-59259-991-2_91

- Lee, Y.-H., e Fan, L. T. (1983). Kinetic studies of enzymatic hydrolysis of insoluble cellulose: (II). Analysis of extended hydrolysis times. *Biotechnology and Bioengineering*, 25(4), 939–966. <http://doi.org/10.1002/bit.260250406>
- Levine, S. E., Fox, J. M., Blanch, H. W., e Clark, D. S. (2010). A mechanistic model of the enzymatic hydrolysis of cellulose. *Biotechnology and Bioengineering*, 107(1), 37–51. doi:10.1002/bit.22789
- Liao, W., Liu, Y., Wen, Z., Frear, C., e Chen, S. (2008). Kinetic modeling of enzymatic hydrolysis of cellulose in differently pretreated fibers from dairy manure. *Biotechnology and Bioengineering*, 101(3), 441–451. <http://doi.org/10.1002/bit.21921>
- Limayem, A., & Ricke, S. C. (2012). Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. *Progress in Energy and Combustion Science*, 38(4), 449–467. doi:10.1016/j.pecs.2012.03.002
- Lin, J., Lee, S.-M., & Koo, Y.-M. (2005). Modeling and Simulation of Simultaneous Saccharification and Fermentation of Paper Mill Sludge to Lactic Acid. In *Journal of Microbiology and Biotechnology* (Vol. 15, pp. 40–47). Retrieved from <http://www.koreascience.or.kr/article/JAKO200515875836818.page>
- Lin, Z., Huang, H., Zhang, H., Zhang, L., Yan, L., e Chen, J. (2010). Ball milling pretreatment of corn stover for enhancing the efficiency of enzymatic hydrolysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162(7), 1872–1880. <http://doi.org/10.1007/s12010-010-8965-5>
- Linder, M., Lindeberg, G., Reinikainen, T., Teeri, T. T., & Pettersson, G. (1995). The difference in affinity between two fungal cellulose-binding domains is dominated by a single amino acid substitution. *FEBS Letters*, 372(1), 96–98. [http://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)00961-8](http://doi.org/10.1016/0014-5793(95)00961-8)
- Linder, M., Salovuori, I., Ruohonen, L., & Teeri, T. T. (1996). Characterization of a double cellulose-binding domain. Synergistic high affinity binding to crystalline cellulose. *Journal of Biological Chemistry*, 271(35), 21268–21272. <http://doi.org/10.1074/jbc.271.35.21268>

- Liu, Y. S., Baker, J. O., Zeng, Y., Himmel, M. E., Haas, T., & Ding, S. Y. (2011). Cellobiohydrolase hydrolyzes crystalline cellulose on hydrophobic faces. *Journal of Biological Chemistry*, 286(13), 11195–11201. <http://doi.org/10.1074/jbc.M110.216556>
- Luo, X. L., Zhu, J. Y., Gleisner, R., & Zhan, H. Y. (2011). Effects of wet-pressing-induced fiber hornification on enzymatic saccharification of lignocelluloses. *Cellulose*, 18(4), 1055–1062. <http://doi.org/10.1007/s10570-011-9541-z>
- Lynd, L.R., Van Zyl, W. H., McBride, J. E., e Laser, M., (2005). Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: An update. *Current Opinion in Biotechnology*, 16(5), p.577-583.
- Mandels, M., Reese, E. In.: Reese, E. T. (1963). *Advances in Enzymic Hydrolysis of Cellulose and Related Materials*. New York: Oxford, Pergamon Press., p. 115;
- Martinez, D., Berka, R. M., Henrissat, B., Saloheimo, M., Arvas, M., Baker, S. E., ... Brettin, T. S. (2008). Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). *Nature Biotechnology*, 26(5), 553–560. <http://doi.org/10.1038/nbt1403>
- Mattinen, M.-L., Linder, M., Teleman, A., & Annala, A. (1997). Interaction between cellobiohydrolase and cellulose binding domains from *Trichoderma reesei* cellulases. *FEBS Letters*, 407(3), 291–296. [http://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)00356-6](http://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)00356-6)
- McDonald, J.H. 2014. *Handbook of Biological Statistics* (3rd ed.). Sparky House Publishing, Baltimore, Maryland
- Medve, J., Ståhlberg, J., & Tjerneld, F. (1997). Isotherms for adsorption of cellobiohydrolase I and II from *Trichoderma reesei* on microcrystalline cellulose. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 66(1), 39–56. <http://doi.org/10.1007/BF02788806>
- Medve, J., Karlsson, J., Lee, D., & Tjerneld, F. (1998). Hydrolysis of microcrystalline cellulose by cellobiohydrolase I and endoglucanase II from *Trichoderma reesei*: adsorption, sugar production pattern, and synergism of the enzymes. *Biotechnology and Bioengineering*, 59(5), 621–34. Acessado em from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10099380>

- Mood, S.H., Golfeshan, A.H., Tabatabaei, M., Jouzani, G. S., Najafi, G. H., Gholami, M., e Ardjmand, M. (2013). Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 27, 77–93. doi:10.1016/j.rser.2013.06.033
- Moon, H.-S., Kim, J.-S., Oh, K.-K., Kim, S.-W., e Hong, S.-I. (2001). Kinetic Modeling of Simultaneous Saccharification and Fermentation for Ethanol Production Using Steam – Exploded Wood with Glucose- and Cellobiose- Fermenting Yeast, *Brettanomyces custersii*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 11(4), 598–696.
- Moon, R. J., Martini, A., Nairn, J., Simonsen, J., e Youngblood, J. (2011). Cellulose nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites. *Chemical Society Reviews* (Vol. 40). <http://doi.org/10.1039/c0cs00108b>
- Mori, T., Chikayama, E., Tsuboi, Y., Ishida, N., Shisa, N., Noritake, Y., ... Kikuchi, J. (2012). Exploring the conformational space of amorphous cellulose using NMR chemical shifts. *Carbohydrate Polymers*, 90(3), 1197–1203. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.06.027>
- Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y. Y., Holtzapple, M., e Ladisch, M. (2005). Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 96(6), 673–86. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.06.025>
- Movagharnejad, K. (2005). Modified shrinking particle model for the rate of enzymatic hydrolysis of impure cellulosic waste materials with enzyme reuse by the substrate replacement. *Biochemical Engineering Journal*, 24(3), 217–223. <http://doi.org/10.1016/j.bej.2005.03.001>
- Movagharnejad, K., e Sohrabi, M. (2003). A model for the rate of enzymatic hydrolysis of some cellulosic waste materials in heterogeneous solid–liquid systems. *Biochemical Engineering Journal*, 14(1), 1–8. [http://doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00104-3](http://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00104-3)
- Murphy, L., Bohlin, C., Baumann, M. J., Olsen, S. N., Sørensen, T. H., Anderson, L., ... Westh, P. (2013). Product inhibition of five *Hypocrea jecorina* cellulases. *Enzyme*

and *Microbial Technology*, 52(3), 163–169.
<http://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2013.01.002>

- Murphy, L., Cruys-Bagger, N., Damgaard, H. D., Baumann, M. J., Olsen, S. N., Borch, K., ... Westh, P. (2012). Origin of initial burst in activity for *Trichoderma reesei* endo-glucanases hydrolyzing insoluble cellulose. *Journal of Biological Chemistry*, 287(2), 1252–1260. <http://doi.org/10.1074/jbc.M111.276485>
- Nag, A., Sprague, M. A., Griggs, A. J., Lischeske, J. J., Stickel, J. J., Mittal, A., ... Johnson, D. K. (2015). Parameter determination and validation for a mechanistic model of the enzymatic saccharification of cellulose-I β . *Biotechnology Progress*. <http://doi.org/10.1002/btpr.2122>
- Nakasaki, K., Murai, T., e Akiyama, T. (1988). Kinetic modeling of simultaneous saccharification and fermentation of cellulose. *Journal of Chemical Engineering of Japan*, 21(4), 436–438. <http://doi.org/10.1252/jcej.21.436>
- Nam, S., French, A. D., Condon, B. D., & Concha, M. (2016). Segal crystallinity index revisited by the simulation of X-ray diffraction patterns of cotton cellulose I β and cellulose II. *Carbohydrate Polymers*, 135, 1–9. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.08.035>
- Nemoto, J., Saito, T., & Isogai, A. (2015). Simple Freeze-Drying Procedure for Producing Nanocellulose Aerogel-Containing, High-Performance Air Filters. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 7(35), 19809–19815. <http://doi.org/10.1021/acsami.5b05841>
- Nemoto, S., Ueno, T., Watthanaphanit, A., Hieda, J., e Saito, N. (2017). Crystallinity and surface state of cellulose in wet ball-milling process. *Journal of Applied Polymer Science*, 134(22), 1–7. <http://doi.org/10.1002/app.44903>
- Nidetzky, B., & Steiner, W. (1993). A new approach for modeling cellulase-cellulose adsorption and the kinetics of the enzymatic hydrolysis of microcrystalline cellulose. *Biotechnology and Bioengineering*, 42(4), 469–479. <http://doi.org/10.1002/bit.260420410>
- Nidetzky, B., Steiner, W., & Claeysens, M. (1994a). Cellulose hydrolysis by the cellulases from *Trichoderma reesei*: adsorptions of two cellobiohydrolases, two

endocellulases and their core proteins on filter paper and their relation to hydrolysis. *The Biochemical Journal*, 303 (Pt 3, 817–23. Acessado em from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1137620&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Nidetzky, B., Zachariae, W., e Gercken, G. (1994b). Hydrolysis of cellooligosaccharides by *Trichoderma reesei* cellobiohydrolases: Experimental data and kinetic modeling. *Enzyme and Microbial ...*, 16(1), 43–52. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0141-0229\(94\)90108-2](http://dx.doi.org/10.1016/0141-0229(94)90108-2)

Olofsson, K., Bertilsson, M., e Lidén, G. (2008). A short review on SSF – an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. *Biotechnology for Biofuels*, 1(1), 7. doi:10.1186/1754-6834-1-7.

Oubani, H., Abbas, A., & Harris, A. (2011). Investigation on the Mechanical Pretreatment of Cellulose By High Intensity Ultrasound and Ball Milling. In *Chemeca 2011: Engineering a Better World*. Sidney. Acessado em from <https://search.informit.com.au/documentSummary;dn=176071187623742;res=IELENG>

Palonen, H., Tjerneld, F., Zacchi, G., & Tenkanen, M. (2004). Adsorption of *Trichoderma reesei* CBH I and EG II and their catalytic domains on steam pretreated softwood and isolated lignin. *Journal of Biotechnology*, 107(1), 65–72. <http://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2003.09.011>

Pandey, A., Soccol, C. R., Nigam, P., e Soccol, V. T. (2000). Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*, 74(1), 69–80. [http://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00142-X](http://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00142-X)

Park, S., Baker, J. O., Himmel, M. E., Parilla, P. a, e Johnson, D. K. (2010). Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance. *Biotechnology for Biofuels*, 3, 10. <http://doi.org/10.1186/1754-6834-3-10>

Payal, R. S., Bejagam, K. K., Mondal, A., e Balasubramanian, S. (2015). Dissolution of Cellulose in Room Temperature Ionic Liquids: Anion Dependence. *The Journal of Physical Chemistry B*, 4(119), 1654–1659. <http://doi.org/10.1021/jp512240t>

- Payne, C. M., Jiang, W., Shirts, M. R., Himmel, M. E., Crowley, M. F., & Beckham, G. T. (2013). Glycoside hydrolase processivity is directly related to oligosaccharide binding free energy. *Journal of the American Chemical Society*, 135(50), 18831–18839. <http://doi.org/10.1021/ja407287f>
- Payne, C. M., Knott, B. C., Mayes, H. B., Hansson, H., Himmel, M. E., Sandgren, M., ... Beckham, G. T. (2015). Fungal cellulases. *Chemical Reviews*, 115(3), 1308–1448. <http://doi.org/10.1021/cr500351c>
- Peitersen, N., & Ross, E. W. (1979). Mathematical model for enzymatic hydrolysis and fermentation of cellulose by *Trichoderma*. *Biotechnology and Bioengineering*, XXI, 997–1017.
- Pel, H. J., de Winde, J. H., Archer, D. B., Dyer, P. S., Hofmann, G., Schaap, P. J., ... Stam, H. (2007). Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. *Nature Biotechnology*, 25(2), 221–231. <http://doi.org/10.1038/nbt1282>
- Peng, F., Ren, J.-L., Xu, F., Bian, J., Peng, P., e Sun, R.-C. (2009). Comparative study of hemicelluloses obtained by graded ethanol precipitation from sugarcane bagasse. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(14), 6305–17. <http://doi.org/10.1021/jf900986b>
- Peri, S., Karra, S., Lee, Y. Y., e Karim, M. N. (2007). Modeling Intrinsic Kinetics of Enzymatic Cellulose Hydrolysis. *Biotechnologyprogress*, 23(3), 626–637.
- Phanthong, P., Guan, G., Ma, Y., Hao, X., & Abudula, A. (2016). Effect of ball milling on the production of nanocellulose using mild acid hydrolysis method. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 60, 617–622. <http://doi.org/10.1016/j.jtice.2015.11.001>
- Plutschack, M. B., Bartholomäus, P., Gilmore, K., e Seeberger, P. H. (2017). Introduction: Ionic Liquids. *Chemical Reviews*, 10(117), 6633–6635. <http://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00246>
- Podgorbunskikh, E. M., Bychkov, A. L., Bulina, N. V., & Lomovskii, O. I. (2018). Disorder of the Crystal Structure of Cellulose Under Mechanical Activation.

Journal of Structural Chemistry, 59(1), 204–211.
<http://doi.org/10.1134/S0022476618010328>

Pönni, R., Kontturi, E., & Vuorinen, T. (2013). Accessibility of cellulose: Structural changes and their reversibility in aqueous media. *Carbohydrate Polymers*, 93(2), 424–429. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.12.025>

Potumarthi, Ravichandra; Baadhe, Rama Raju; Bhattacharya, S. (2013). Biofuel Technologies. In V. K. Gupta e M. G. Tuohy (Eds.), *Biofuel Technologies* (pp. 3–27). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. <http://doi.org/10.1007/978-3-642-34519-7>

Praestgaard, E., Elmerdahl, J., Murphy, L., Nymand, S., McFarland, K. C., Borch, K., & Westh, P. (2011). A kinetic model for the burst phase of processive cellulases. *FEBS Journal*, 278(9), 1547–1560. <http://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08078.x>

Qing, Q., Yang, B., & Wyman, C. E. (2010). Xylooligomers are strong inhibitors of cellulose hydrolysis by enzymes. *Bioresource Technology*, 101(24), 9624–9630. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.137>

Raele, R., Boaventura, J. M. G., Fischmann, A. A., e Sarturi, G. (2014). Scenarios for the second generation ethanol in Brazil. *Technological Forecasting and Social Change*, 87, 205–223. doi:10.1016/j.techfore.2013.12.010

Rana, V., Eckard, A. D., & Ahring, B. K. (2014). Comparison of SHF and SSF of wet exploded corn stover and loblolly pine using in-house enzymes produced from *T. reesei* RUT C30 and *A. saccharolyticus*. *SpringerPlus*, 3(1), 516. <http://doi.org/10.1186/2193-1801-3-516>

RCSB – Protein Data Bank, acessado em setembro de 2017 em www.rcsb.org

Reier, G. E. (2000). Avicel PH Microcrystalline Cellulose , NF , Ph Eur ., JP , BP. FMC Corporation. Fonte: www.fmcbiopolymer.com/Portals/bio/content/Docs/PS-Section 11.pdf

- Revol, J. F., Dietrich, A., e Goring, D. A. I. (1987). Effect of mercerization on the crystallite size and crystallinity index in cellulose from different sources. *Canadian Journal of Chemistry*, 65(8), 1724–1725. <http://doi.org/10.1139/v87-288>
- Rodrigues, A. P. de. Perspectivas para o Etanol no Brasil e no Mundo. In: Duailibe, A. K. (org.),. *Combustíveis no Brasil: desafios e perspectivas*. Synergia: Centro de Estudos de Energia e Desenvolvimento (CEEND), Rio de Janeiro, 2012. p. 72-85
- Rolz, C. (1986). Ultrasound effect on enzymatic saccharification. *Biotechnology Letters*, 8(2), 131–136. <http://doi.org/10.1007/BF01048471>
- Rouvinen, J., Bergfors, T., Teeri, T., Knowles, J., & Jones, T. (1990). Three-dimensional structure of cellobiohydrolase II from *Trichoderma reesei*. *Science*, 249(4967), 380–386. <http://doi.org/10.1126/science.2377893>
- Rubin, E. M. (2008). Genomics of cellulosic biofuels. *Nature*, 454(7206), 841–5. doi:10.1038/nature07190
- Ryu, D. D., Lee, S. B., Tassinari, T., e Macy, C. (1982). Effect of compression milling on cellulose structure and on enzymatic hydrolysis kinetics. *Biotechnology and Bioengineering*, 24(5), 1047–1067. <http://doi.org/10.1002/bit.260240503>
- Saad, M. B. W. (2010). Avaliação Técnica e Econômica Preliminar da Produção de Etanol via Hidrólise Enzimática de Bagaço de Cana-de-açúcar. Universidade de São Paulo. Acessado em from <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/97/97131/tde-04102012-113629/>
- Samayam, I. P., Hanson, B. L., Langan, P., e Schall, C. A. (2011). Ionic-liquid induced changes in cellulose structure associated with enhanced biomass hydrolysis. *Biomacromolecules*, 12(8), 3091–3098. <http://doi.org/10.1021/bm200736a>
- Santos, D.S. *et al.* ethanol Production from Sugarcane Bagasse by *Zymomonas mobilis* Using Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) Process Applied *Biochemistry and Biotechnology*; May 2010, Volume 161, Issue 1-8, pp 93-105
- Santos, F., Queiróz, J. de, Colodette, J., Fernandes, S. A., Guimarães, V. M., e Resende, S. T. (2012). Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. *Quim.*

Nova, 35(5), 1004–1010. Acessado em from
<http://www.scielo.br/pdf/qn/v35n5/a25v35n5.pdf>

Santos, J.R.A. *Et al.*; Optimization of ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* UFPEDA 1238 in simultaneous saccharification and fermentation of delignified sugarcane bagasse *Industrial Crops and Products* 36 (2012) 584–588

Sathitsuksanoh, N., George, A., e Zhang, Y. H. P. (2013). New lignocellulose pretreatments using cellulose solvents: A review. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 88(September), 169–180. <http://doi.org/10.1002/jctb.3959>

Scheiding, W., Thoma, M., Ross, A., e Schügerl, K. (1984). Modelling of the enzymatic hydrolysis of cellobiose and cellulose by a complex enzyme mixture of *Trichoderma reesei* QM 9414. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 20(3). <http://doi.org/10.1007/BF00253727>

Schell, D. J., Ruth, M. F., e Tucker, M. P. (1999). Modeling the Enzymatic Hydrolysis of Dilute-Acid Pretreated Douglas Fir. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 77(1-3), 67–82. <http://doi.org/10.1385/ABAB:77:1-3:67>

Segal, L., Creely, J. J., Martin, A. E., e Conrad, C. M. (1959). An Empirical Method for Estimating the Degree of Crystallinity of Native Cellulose Using the X-Ray Diffractometer. *Textile Research Journal*, 29(10), 786–794. <http://doi.org/10.1177/004051755902901003>

Shao, X., Lynd, L., e Wyman, C. (2009). Kinetic modeling of cellulosic biomass to ethanol via simultaneous saccharification and fermentation: Part II. Experimental validation using waste paper sludge and anticipation of CFD analysis. *Biotechnology and Bioengineering*, 102(1), 66–72. <http://doi.org/10.1002/bit.22047>

Shao, X., Lynd, L., Wyman, C., e Bakker, A. (2009). Kinetic modeling of cellulosic biomass to ethanol via simultaneous saccharification and fermentation: Part I. Accommodation of intermittent feeding and analysis of staged reactors. *Biotechnology and Bioengineering*, 102(1), 59–65. <http://doi.org/10.1002/bit.22048>

- Shimura, R., Nishioka, A., Kano, I., Koda, T., & Nishio, T. (2014). Novel method for producing amorphous cellulose only by milling. *Carbohydrate Polymers*, 102(1), 645–648. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.11.014>
- SIGMA-ALDRICH. (2017). SDS Avicel® PH-101. Acessado em from <http://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=BR&language=pt&productNumber=11365&brand=SIALePageToGoToURL=http%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fproduct%2Fsial%2F11365%3Fflang%3Dpt>
- Sinitsyn, A. P., Gusakov, A. V., & Vlasenko, E. Y. (1991). Effect of structural and physico-chemical features of cellulosic substrates on the efficiency of enzymatic hydrolysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 30(1), 43–59. <http://doi.org/10.1007/BF02922023>
- Soccol, C. R., Vandenberghe, L. P. D. S., Medeiros, A. B. P., Karp, S. G., Buckeridge, M., Ramos, L. P., Pitarelo, A. P. *et al.* (2010). Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. *Bioresource technology*, 101(13), 4820–5. doi:10.1016/j.biortech.2009.11.067
- Sousa Jr, R., Carvalho, M. L., Giordano, R. L. C., Giordano, R. C., (2011) Recent Trends in the Modeling of Cellulose Hydrolysis. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 28 (04) p. 545-564. Doi: 10.1590/S0104-66322011000400001
- South, C. R., Hogsett, D. A. L., e Lynd, L. R. (1995). Modeling simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulose to ethanol in batch and continuous reactors. *Enzyme and Microbial Technology*, 17(9), 797–803. [http://doi.org/10.1016/0141-0229\(94\)00016-K](http://doi.org/10.1016/0141-0229(94)00016-K)
- Ståhlberg, J., Johansson, G., & Pettersson, G. (1991). A New Model For Enzymatic Hydrolysis of Cellulose Based on the Two-Domain Structure of Cellobiohydrolase I. *Nature Biotechnology*, 9(3), 286–290. <http://doi.org/10.1038/nbt0391-286>
- Ståhlberg, J., Johansson, G., & Pettersson, G. (1993). *Trichoderma reesei* has no true exo-cellulase: all intact and truncated cellulases produce new reducing end groups on cellulose. *BBA – General Subjects*, 1157(1), 107–113. [http://doi.org/10.1016/0304-4165\(93\)90085-M](http://doi.org/10.1016/0304-4165(93)90085-M)

- Suga, K., van Dedem, G., & Moo-Young, M. (1975). Degradation of polysaccharides by endo and exo enzymes: A theoretical analysis. *Biotechnology and Bioengineering*, 17(3), 433–439. <http://doi.org/10.1002/bit.260170311>
- Sukumaran, R. (2005). Microbial cellulases-production, applications and challenges. *Journal of Scientific and ...*, 64 (November), 832–844. Acessado em from <http://nopr.niscair.res.in/handle/123456789/5375>
- Sukumaran, R. K., Abraham, A., & Mathew, A. K. (2017). Enzymes for Bioenergy. In S. Sugathan, N. Pradeep, & A. Sabu (Eds.), *Bioresources and Bioprocess in Biotechnology* (pp. 3–43). Singapore: Springer Singapore. http://doi.org/10.1007/978-981-10-4284-3_1
- Sun, Y., & Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource technology*, 83, 1–11. doi:10.1016/S0960-8524(01)00212-7
- Suominen, P. L., Mäntylä, A. L., Karhunen, T., Hakola, S., & Nevalainen, H. (1993). High frequency one-step gene replacement in *Trichoderma reesei*. II. Effects of deletions of individual cellulase genes. *MGG Molecular & General Genetics*, 241(5–6), 523–530. <http://doi.org/10.1007/BF00279894>
- Svensson, A., Larsson, P. T., Salazar-Alvarez, G., & Wågberg, L. (2013). Preparation of dry ultra-porous cellulosic fibres: characterization and possible initial uses. *Carbohydrate Polymers*, 92(1), 775–83. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.09.090>
- Szabó, O. E., & Csiszár, E. (2013). The effect of low-frequency ultrasound on the activity and efficiency of a commercial cellulase enzyme. *Carbohydrate Polymers*, 98(2), 1483–1489. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.08.017>
- Takashima, S., Ohno, M., Hidaka, M., Nakamura, A., Masaki, H., & Uozumi, T. (2007). Correlation between cellulose binding and activity of cellulose-binding domain mutants of *Humicola grisea* cellobiohydrolase 1. *FEBS Letters*, 581(30), 5891–5896. <http://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.11.068>
- Terinte, N., Ibbett, R., e Schuster, K. C. (2011). Overview on Native Cellulose and Microcrystalline Cellulose I Structure Studied By X-Ray Diffraction (WAXD):

- Comparison Between Measurement Techniques. *Lenzinger Berichte*, 89, 118–131. Accessed from http://www.lenzing.com/fileadmin/template/pdf/konzern/lenzinger_berichte/ausgabe_89_2011/LB_2011_15_Terinte.pdf
- Teugjas, H., & Väljamäe, P. (2013). Product inhibition of cellulases studied with ¹⁴C-labeled cellulose substrates. *Biotechnology for Biofuels*, 6(1), 104. <http://doi.org/10.1186/1754-6834-6-104>
- Thygesen, A., Oddershede, J., Lilholt, H., Thomsen, A. B., & Ståhl, K. (2005). On the determination of crystallinity and cellulose content in plant fibres. *Cellulose*, 12(6), 563–576. <http://doi.org/10.1007/s10570-005-9001-8>
- 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*, 172(6), 2815–37. <http://doi.org/10.1007/s12010-013-0717-x>
- Tu, M., Chandra, R. P., & Saddler, J. N. (2007). Evaluating the distribution of cellulases and the recycling of free cellulases during the hydrolysis of lignocellulosic substrates. *Biotechnology Progress*, 23(2), 398–406. <http://doi.org/10.1021/bp060354f>
- Tu, M., & Saddler, J. N. (2010). Potential Enzyme Cost Reduction with the Addition of Surfactant during the Hydrolysis of Pretreated Softwood. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 161(1–8), 274–287. <http://doi.org/10.1007/s12010-009-8869-4>
- Tuohy, M. G., Walsh, D. J., Murray, P. G., Claeysens, M., Cuffe, M. M., Savage, A. V., & Coughlan, M. P. (2002). Kinetic parameters and mode of action of the cellobiohydrolases produced by *Talaromyces emersonii*. *Biochimica et Biophysica Acta – Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1596(2), 366–380. [http://doi.org/10.1016/S0167-4838\(01\)00308-9](http://doi.org/10.1016/S0167-4838(01)00308-9)
- Ülker, A., & Sprey, B. (1990). Characterization of an unglycosylated low molecular weight 1,4-β-glucan-glucanohydrolase of *Trichoderma reesei*. *FEMS*

- Microbiology Letters, 69(3), 215–219. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1990.tb04232.x>
- Unno, T., Ide, K., Yazaki, T., Tanaka, Y., Nakakuki, T., & Okada, G. (1993). High recovery purification and some properties of a β -glucosidase from *Aspergillus niger*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 57(12), 2172–2173. <http://doi.org/10.1080/bbb.57.2172>
- Vaaje-Kolstad, G., Westereng, B., Horn, S. J., Liu, Z., Zhai, H., Sorlie, M., & Eijsink, V. G. H. (2010). An Oxidative Enzyme Boosting the Enzymatic Conversion of Recalcitrant Polysaccharides. *Science*, 330(6001), 219–222. <http://doi.org/10.1126/science.1192231>
- Väljamäe, P., Sild, V., Pettersson, G., & Johansson, G. (1998). The initial kinetics of hydrolysis by cellobiohydrolases I and II is consistent with a cellulose surface-erosion model. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 253(2), 469–75. Acessado em from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9654098>
- van den Brink, J., Maitan-Alfenas, G. P., Zou, G., Wang, C., Zhou, Z., Guimarães, V. M., & de Vries, R. P. (2014). Synergistic effect of *Aspergillus niger* and *Trichoderma reesei* enzyme sets on the saccharification of wheat straw and sugarcane bagasse. *Biotechnology Journal*, 9(10), 1329–1338. <http://doi.org/10.1002/biot.201400317>
- Várnai, A., Siika-aho, M., & Viikari, L. (2013). Carbohydrate-binding modules (CBMs) revisited: reduced amount of water counterbalances the need for CBMs. *Biotechnology for Biofuels*, 6(1), 30. <http://doi.org/10.1186/1754-6834-6-30>
- Vuong, T. V., & Wilson, D. B. (2009). Processivity, synergism, and substrate specificity of *Thermobifida fusca* Cel6B. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(21), 6655–6661. <http://doi.org/10.1128/AEM.01260-09>
- Walden, P. (1914). Ueber die Molekulargrösse und elektrische Leitfähigkeit einiger geschmolzenen Salze. *Bulletin de l'Académie Impériale Des Sciences de St.-Pétersbourg*, 8(6), 405–422.
- Wang, Q. Q., Zhu, J. Y., Hunt, C. G., & Zhan, H. Y. (2012). Kinetics of adsorption, desorption, and re-adsorption of a commercial endoglucanase in lignocellulosic

- suspensions. *Biotechnology and Bioengineering*, 109(8), 1965–75.
<http://doi.org/10.1002/bit.24483>
- Westereng, B., Ishida, T., Vaaje-Kolstad, G., Wu, M., Eijsink, V. G. H., Igarashi, K., ... Sandgren, M. (2011). The putative endoglucanase pcGH61D from *phanerochaete chrysosporium* is a metal-dependent oxidative enzyme that cleaves cellulose. *PLoS ONE*, 6(11). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0027807>
- Yang, D., Peng, X. W., Zhong, L. X., Cao, X. F., Chen, W., e Sun, R. C. (2013). Effects of pretreatments on crystalline properties and morphology of cellulose nanocrystals. *Cellulose*, 20(5), 2427–2437. <http://doi.org/10.1007/s10570-013-9997-0>
- Yeh, A.-I., Huang, Y.-C., & Chen, S. H. (2010). Effect of particle size on the rate of enzymatic hydrolysis of cellulose. *Carbohydrate Polymers*, 79(1), 192–199. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.07.049>
- Yu, Y., & Wu, H. (2011). Effect of ball milling on the hydrolysis of microcrystalline cellulose in hot-compressed water. *AIChE Journal*, 57(3), 793–800. <http://doi.org/10.1002/aic.12288>
- Yue, Y., Han, J., Han, G., Zhang, Q., French, A. D., & Wu, Q. (2015). Characterization of cellulose I/II hybrid fibers isolated from energycane bagasse during the delignification process: Morphology, crystallinity and percentage estimation. *Carbohydrate Polymers*, 133, 438–447. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.07.058>
- Zhang, J., Zhang, H., Wu, J., Zhang, J., He, J., e Xiang, J. (2010). NMR spectroscopic studies of cellobiose solvation in EmimAc aimed to understand the dissolution mechanism of cellulose in ionic liquids. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 12, 1941–1947. <http://doi.org/10.1039/b920446f>
- Zhang, S., Barr, B. K., & Wilson, D. B. (2000). Effects of noncatalytic residue mutations on substrate specificity and ligand binding of *Thermobifida fusca* endocellulase Cel6A. *European Journal of Biochemistry*, 267(1), 244–252. <http://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.00988.x>

- Zhang, Y.-H. P., & Lynd, L. R. (2004). Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. *Biotechnology and bioengineering*, 88(7), 797–824. doi:10.1002/bit.20282
- Zhang, Z., Song, J., & Han, B. (2017). Catalytic Transformation of Lignocellulose into Chemicals and Fuel Products in Ionic Liquids. *Chemical Reviews*, 10(117), 6834–6880. <http://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00457>
- Zhao, H., Kwak, J. H., Wang, Y., Franz, J. A., White, J. M., & Holladay, J. E. (2005). Effects of crystallinity on dilute acid hydrolysis of cellulose by cellulose ball-milling. *Energy Fuels*, 20(2), 807–811. <http://doi.org/10.1021/ef050319a>
- Zheng, Y., Pan, Z., Zhang, R., & Jenkins, B. M. (2009). Kinetic modeling for enzymatic hydrolysis of pretreated creeping wild ryegrass. *Biotechnology and Bioengineering*, 102(6), 1558–69. doi:10.1002/bit.22197
- Zheng, Y., Zhang, R., & Pan, Z. (2016). Investigation of adsorption kinetics and isotherm of cellulase and β -glucosidase on lignocellulosic substrates. *Biomass and Bioenergy*, 91, 1–9. <http://doi.org/10.1016/j.biombioe.2016.04.014>
- Zhou, W., Schüttler, H.-B., Hao, Z., & Xu, Y. (2009). Cellulose hydrolysis in evolving substrate morphologies I: A general modeling formalism. *Biotechnology and Bioengineering*, 104(2), 261–74. doi:10.1002/bit.22389
- Zhu, Z., Sathitsuksanoh, N., & Percival Zhang, Y.-H. (2009). Direct quantitative determination of adsorbed cellulase on lignocellulosic biomass with its application to study cellulase desorption for potential recycling. *The Analyst*, 134(11), 2267. <http://doi.org/10.1039/b906065k>
- Zou, J. Y., Kleywegt, G. J., Ståhlberg, J., Driguez, H., Nerinckx, W., Claeyssens, M., ... Jones, T. A. (1999). Crystallographic evidence for substrate ring distortion and protein conformational changes during catalysis in cellobiohydrolase Cel6A from *Trichoderma reesei*. *Structure*, 7(9), 1035–1045. [http://doi.org/10.1016/S0969-2126\(99\)80171-3](http://doi.org/10.1016/S0969-2126(99)80171-3)

Anexo I – Adaptação do modelo de Langmuir para adsorção de enzimas.

A partir de modificações do modelo clássico de cinética heterogênea, que é baseado no modelo de adsorção de Langmuir, foi possível fazer adaptações para se obter uma equação mecanística que mais se aproximava à equação semi-mecanística de isoterma da enzima utilizada nesse trabalho. Tal qual é feita a dedução da expressão de taxa para catalisadores sólidos a partir do balanço de sítios, foi feita a dedução a partir da fração de enzimas livres para se catalisar a reação com o substrato. Sendo assim, denotou-se as entidades que podem interagir com a enzima como:

Celulose (S)

Celobiose (G_2)

Glicose (G)

Denominando a quantidade de enzima livre como a quantidade total subtraída da quantidade que está ligada a cada um dos substratos, tem-se:

$$E_f = E_T - ES - EG_2 - EG \quad [55]$$

Logo os modelos de adsorção para a enzima teórica nos respectivos substratos é o seguinte (considerando K como constante de equilíbrio da sorção da enzima e A_S como a área da celulose), obtêm-se:

para celulose $E_{bS} = K_S[S]A_S(E_T - E_bC - E_bG_2 - E_bG) \quad [56]$

para celobiose $E_{bG_2} = K_{G_2}[G_2](E_T - E_bC - E_bG_2 - E_bG) \quad [57]$

para glicose $E_{bG} = K_G[G](E_T - E_bC - E_bG_2 - E_bG) \quad [58]$

Dividindo-se a fração de enzima adsorvida em cada um dos substratos, são obtidas as seguintes expressões:

$$E_b S = \frac{K_C[S]A_S}{K_G[G]} E_b G_2 \quad [59]$$

$$E_b G_2 = \frac{K_{G_2}[G_2]}{K_G[G]} E_b G \quad [60]$$

$$E_b S = \frac{K_S[S]}{K_G[G]} E_b G \quad [61]$$

Como exemplo, substituindo as expressões [68], [69] e [61] nos termos correspondentes na equação da enzima ligada na glicose [58], ou nas demais [56] e [57], obtém-se:

$$E_{bS} = K_G[S]A_S \left(E_T - \frac{K_S[S]A_S}{K_G[G]} E_b[G] - \frac{K_{G_2}[G_2]}{K_G[G]} E_b[G] - E_b[G] \right) \quad [62]$$

Resultando em

$$E_{bS} = \frac{K_S[S]A_S}{1 + K_S[S] + K_{G_2}[G_2] + K_G[G]} \quad [63]$$

A expressão obtida para a isoterma obtida pela abordagem mecanística [64] se assemelha às expressões empregadas nos modelos cinéticos

Anexo II – Aproximação matemática para obtenção das equações de taxa reacional

É possível se chegar em uma aproximação das equações utilizadas nesse trabalho a partir de um conjunto de equações que se baseiam no mecanismo reacional teórico dos componentes do sistema. Todavia, como a própria natureza das equações são de natureza semi-mecanística, temos que as equações de adsorção das enzimas e de taxas de consumo de reagentes não podem ser puramente deduzidas a partir de proposições reacionais, somente. Mas uma aproximação matemática com base nos mecanismos mostra equações tomadas como base para serem feitas adaptações.

Considerou-se que a celulose amorfa (C_a) e celulose cristalina (C_c) são degradadas por uma enzima genérica formando celobiose ($G2$), que finalmente é degradada a glicose (G).

Conversão de celulose amorfa (C_a) em celobiose ($G2$)		Conversão de celulose cristalina (C_c) em celobiose ($G2$)		Conversão de celobiose ($G2$) em glicose (G)		Inibição enzimática por glicose (G)	
$C_a + E_{bca} \leftrightarrow C_a E_{bca}$	[64]	$C_c + E_{bcc} \leftrightarrow C_c E_{bcc}$	[65]	$G2 + E_f \leftrightarrow G2 E_f$	[66]	$G2 + E_f \leftrightarrow G2 E_f$	[67]
$C_a E_{bca} \rightarrow G2 E_{bca}$	[68]	$C_c E_{bcc} \rightarrow G2 E_{bcc}$	[69]	$G2 E_f \rightarrow G E_f$	[70]		

$G_2E_{bca} \leftrightarrow G_2 + E_{bca}$	[71]	$G_2E_{bcc} \leftrightarrow G_2 + E_{bcc}$	[72]	$GE_f \leftrightarrow G + E_f$	[73]		
--------------------------------------------	------	--------------------------------------------	------	--------------------------------	------	--	--

Para as taxas de associação dos reagentes com as enzimas formando os intermediários reacionais contendo substrato e enzima, tem-se:

$-r_{c_a} =$ $K_1 \left([C_a][E] - \frac{1}{K_{eq_1}} [C_aE] \right)$	[74]	$-r_{c_c} =$ $K_3 \left([C_c][E] - \frac{1}{K_{eq_3}} [C_cE] \right)$	[75]	$-r_{G_2} =$ $K_5 \left([G_2][E] - \frac{1}{K_{eq_5}} [G_2E] \right)$	[76]	$-r_{c_c} =$ $K_3 \left([C_c][E] - \frac{1}{K_{eq_3}} [C_cE] \right)$	[77]
---------------------------------------------------------------------------	------	---------------------------------------------------------------------------	------	---------------------------------------------------------------------------	------	---------------------------------------------------------------------------	------

Para as taxas de dessociação do complexo contendo o produto e a enzima nas espécies químicas: produtos reacionais e enzima, tem-se:

$r_{G_2E} = K_2 \left([G_2][E] - \frac{1}{K_{eq_2}} [G_2E] \right)$	[78]	$r_{GE} =$ $K_6 \left([G][E] - \frac{1}{K_{eq_6}} [GE] \right)$	[79]	$r_{G_2E} =$ $K_2 \left([G_2][E] - \frac{1}{K_{eq_2}} [G_2E] \right)$	[80]
----------------------------------------------------------------------	------	---------------------------------------------------------------------	------	---------------------------------------------------------------------------	------

A concentração de enzima livre foi tomada considerando-se como a enzima presente no sistema reacional, descontando-se as enzimas ligadas nos complexos ativados, portanto:

$E_T = E + [C_aE] + [C_cE] + [G_2E] + [GE]$	[81]
---------------------------------------------	------

Além disso, foi utilizada a hipótese do estado pseudo-estacionário, em que a taxa de consumo da espécie intermediária é muito alta em comparação a formação do complexo ativado, de modo que o acúmulo da espécie intermediária é virtualmente nulo. Na condição de equilíbrio, obtém-se:

$[C_aE] = K_{eq_1} [C_a][E]$	[82]	$[C_cE] = K_{eq_3} [C_c][E]$	[83]	$[G_2E] = K_{eq_5} [G_2][E]$	[84]	$[GE] = K_{eq_7} [G][E]$	[85]
------------------------------	------	------------------------------	------	------------------------------	------	--------------------------	------

Substituindo as equações [82], [83], [84] e [85] em [81] e isolando o termo da enzima livre, obtém-se:

$$E = \frac{E_T}{1 + K_{eq_1}[C_a] + K_{eq_3}[C_c] + K_{eq_5}[G_2] + K_{eq_7}[G]} \quad [86]$$

As taxas reacionais foram tomadas considerando a hipótese de que a etapa limitante da reação corresponde à reação com o intermediário (complexo ativado). Logo:

$$r_{C_a \rightarrow G_2} = K_{C_a}[C_a]E \quad [87]$$

$$r_{C_c \rightarrow G_2} = K_{C_c}[C_c]E \quad [88]$$

$$r_{G_2 \rightarrow G} = K_{G_2}[G_2]E \quad [89]$$

Substituindo a expressão para a concentração de enzimas da [86] nas equações [82], [83] e [84] e adicionando-se a expressão resultante nos termos correspondentes das equações [87], [88] e [89], obtém-se finalmente as seguintes expressões de taxa:

$r_{C_a \rightarrow G_2} = \frac{K_{C_a}K_{eq_1}[C_a]E_T}{1 + K_{eq_1}[C_a] + K_{eq_3}[C_c] + K_{eq_5}[G_2] + K_{eq_7}[G]} \quad [90]$	$r_{C_c \rightarrow G_2} = \frac{K_{C_c}K_{eq_3}[C_c]E_T}{1 + K_{eq_1}[C_a] + K_{eq_3}[C_c] + K_{eq_5}[G_2] + K_{eq_7}[G]} \quad [91]$	$r_{G_2 \rightarrow G} = \frac{K_{G_2}K_{eq_5}[G_2]E_T}{1 + K_{eq_1}[C_a] + K_{eq_3}[C_c] + K_{eq_5}[G_2] + K_{eq_7}[G]} \quad [92]$
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

As expressões [90], [91] e [92] tem a estrutura geral dos modelos cinéticos dessa tese. Mas esses últimos modelos são semi-mecanísticos e possuem modificações das deduções mecanísticas. Os modelos desse estudo se diferenciam dos construídos pela dedução de mecanismo pelas seguintes razões: os modelos desse estudo têm nulos os termos de inibição relativos aos próprios substratos. Também foi considerado o efeito da área do substrato para promover taxa reação. As constantes de inibição também são independentes para cada reação, relativos a cada produto-inibidor. O modelo também se distancia da proposição teórica, pois nos modelos desse estudo consideram a concentração de enzima ligada ao substrato. Essa concentração, por sua vez, é obtida pelas isotermas de adsorção da enzima.

Anexo III – Resultados de simulação da Seção 6.4.1.2 (Caso 2)

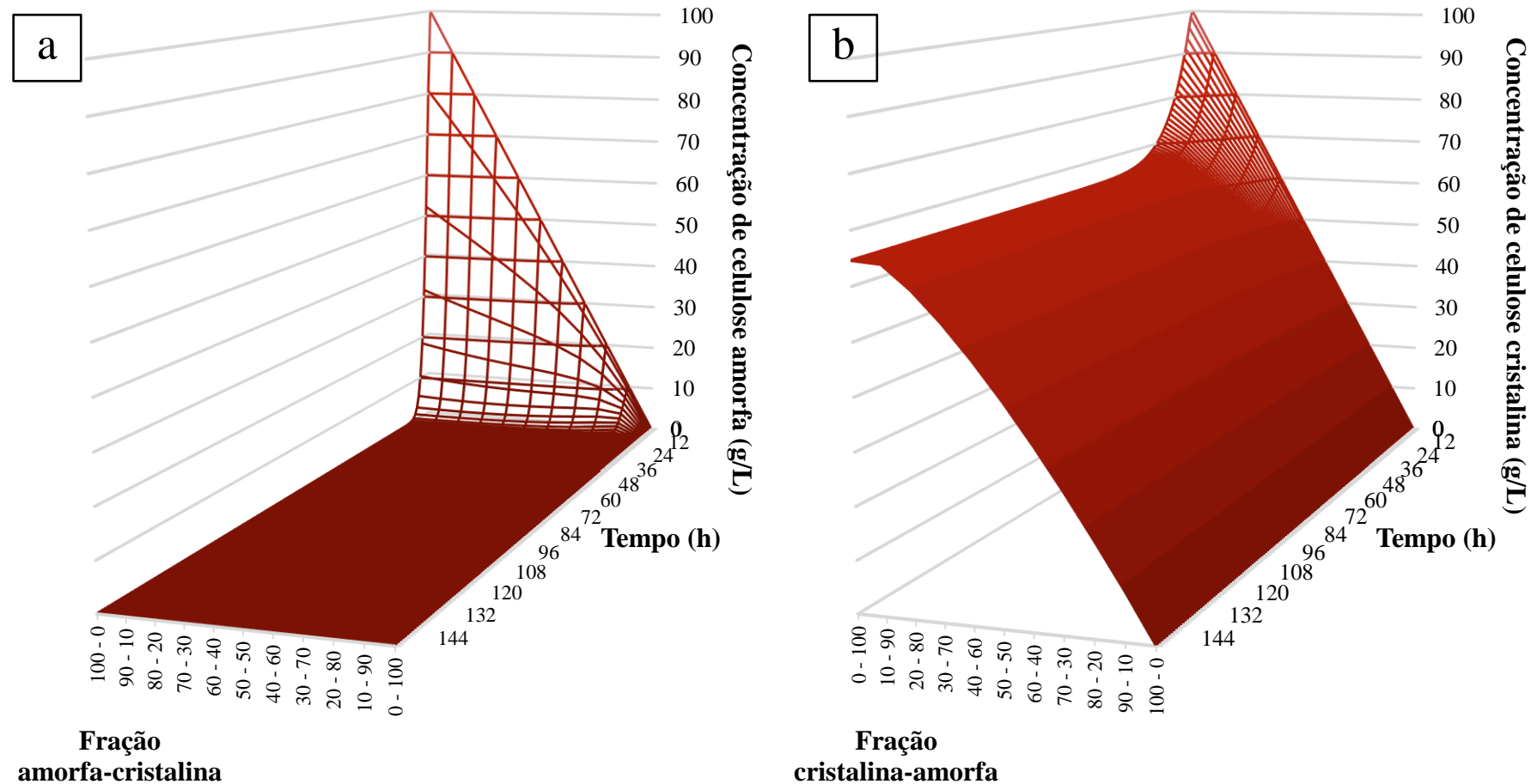


Figura 55 – Simulação do modelo cinético com dados de celulose amorfa (a) e cristalina (b) e parâmetros de Tsai *et al.*, 2014. $S_{(0)} = 100 \text{ g.L}^{-1}$, sendo $S_{a(0)} = 50 \text{ g.L}^{-1}$; $S_{c(0)} = 50 \text{ g.L}^{-1}$; $G_{2(0)} = 0 \text{ g.L}^{-1}$; $G_{(0)} = 0 \text{ g.L}^{-1}$, $EfCelC_{(0)} = 1,58 \text{ g.L}^{-1}$, $EfN188_{(0)} = 0,59 \text{ g.L}^{-1}$, $EbCelCa_{(0)} = 0 \text{ g.L}^{-1}$, $EbCelCc1_{(0)} = 0 \text{ g.L}^{-1}$, $ExCelCc1_{(0)} = 0 \text{ g.L}^{-1}$, $EbN188_{(0)} = 0 \text{ g.L}^{-1}$, $t=168 \text{ h}$.

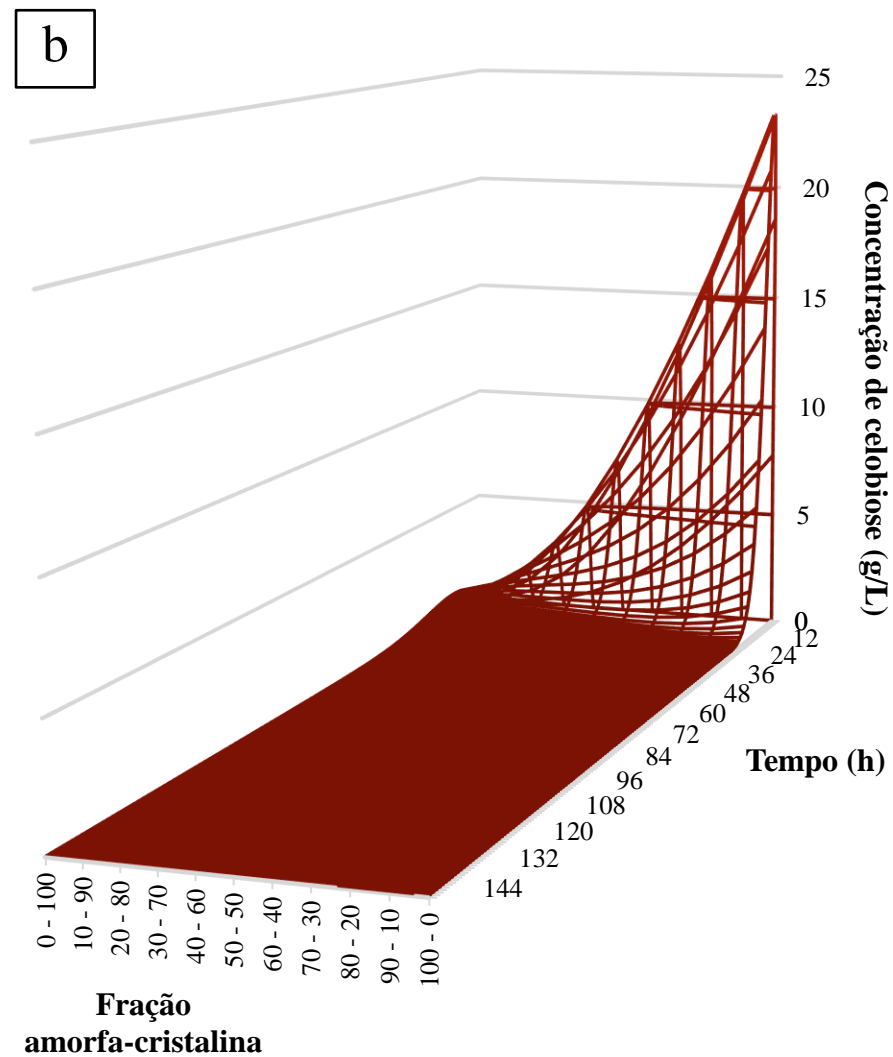
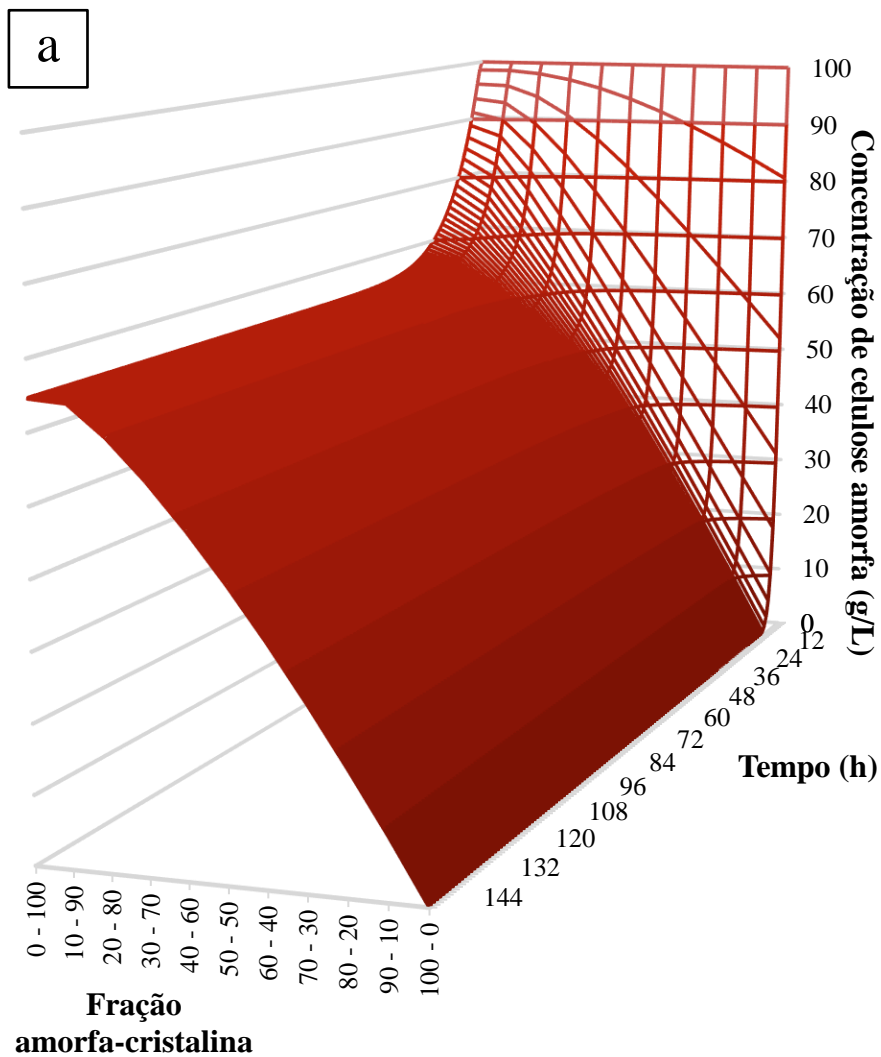


Figura 56 – Simulação do modelo cinético com dados de celulose total (a) e celobiose (b) e parâmetros de Tsai *et al.*, 2014. $S_{(0)} = 100 \text{ g.L}^{-1}$, sendo $S_{a(0)} = 50 \text{ g.L}^{-1}$; $S_{c(0)} = 50 \text{ g.L}^{-1}$; $G_{2(0)} = 0 \text{ g.L}^{-1}$; $G_{(0)} = 0 \text{ g.L}^{-1}$, $EfCelC_{(0)} = 1,58 \text{ g.L}^{-1}$, $EfN188_{(0)} = 0,59 \text{ g.L}^{-1}$, $EbCelCa_{(0)} = 0 \text{ g.L}^{-1}$, $EbCelCc1_{(0)} = 0 \text{ g.L}^{-1}$, $ExCelCc1_{(0)} = 0 \text{ g.L}^{-1}$, $EbN188_{(0)} = 0 \text{ g.L}^{-1}$, $t=168 \text{ h}$.

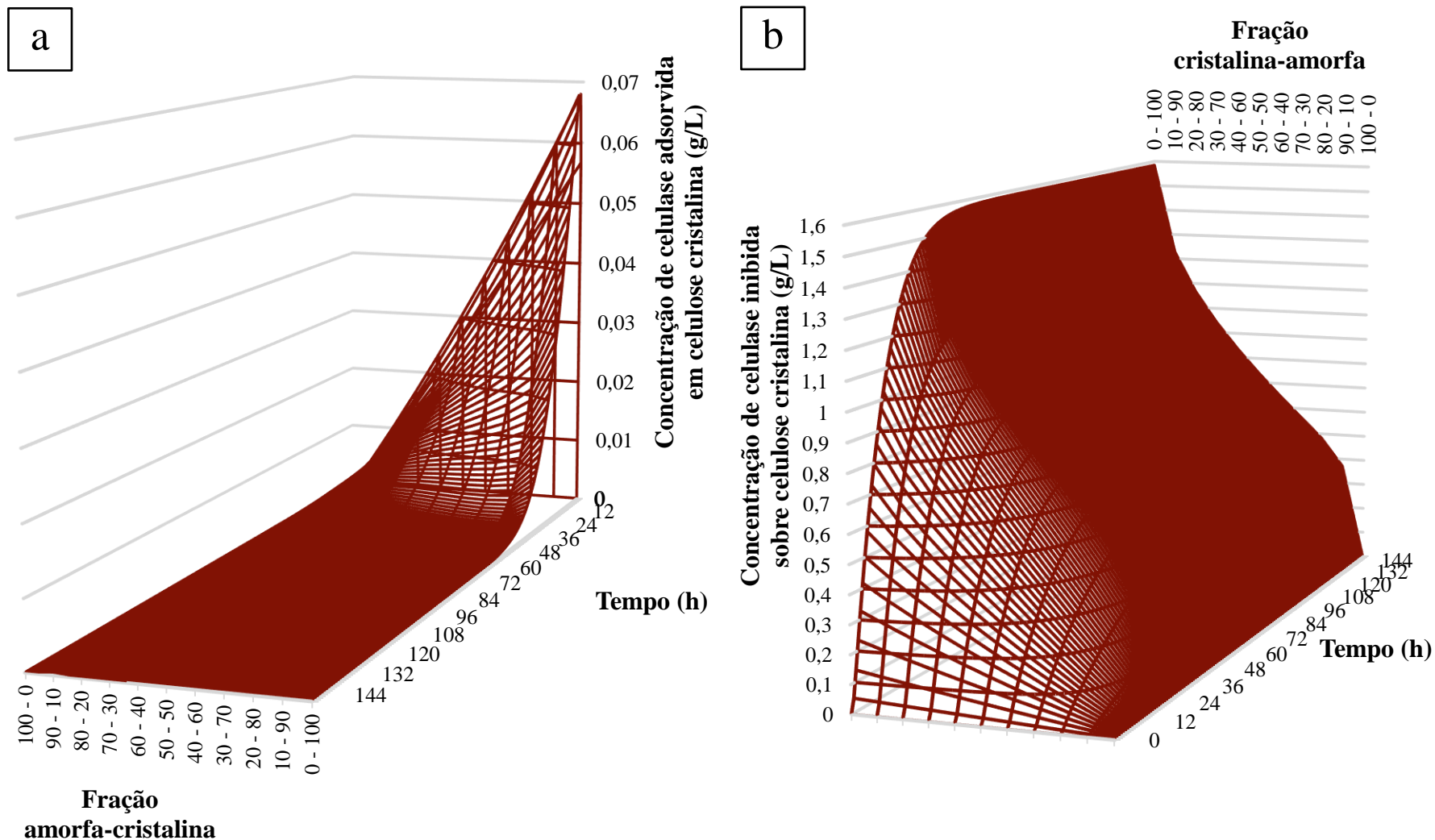


Figura 57 – Simulação do modelo cinético com dados de celulase adsorvida (a) e inibida (b) sobre celulose cristalina. Parâmetros de Tsai *et al.*, 2014. $S_{(0)} = 100 \text{ g.L}^{-1}$, sendo $S_{a(0)} = 50 \text{ g.L}^{-1}$; $S_{c(0)} = 50 \text{ g.L}^{-1}$; $G_{2(0)} = 0 \text{ g.L}^{-1}$; $G_{(0)} = 0 \text{ g.L}^{-1}$, $EfCelC_{(0)} = 1,58 \text{ g.L}^{-1}$, $EfN188_{(0)} = 0,59 \text{ g.L}^{-1}$, $EbCelCa_{(0)} = 0 \text{ g.L}^{-1}$, $EbCelCc1_{(0)} = 0 \text{ g.L}^{-1}$, $ExCelCc1_{(0)} = 0 \text{ g.L}^{-1}$, $EbN188_{(0)} = 0 \text{ g.L}^{-1}$, $t=168 \text{ h}$.

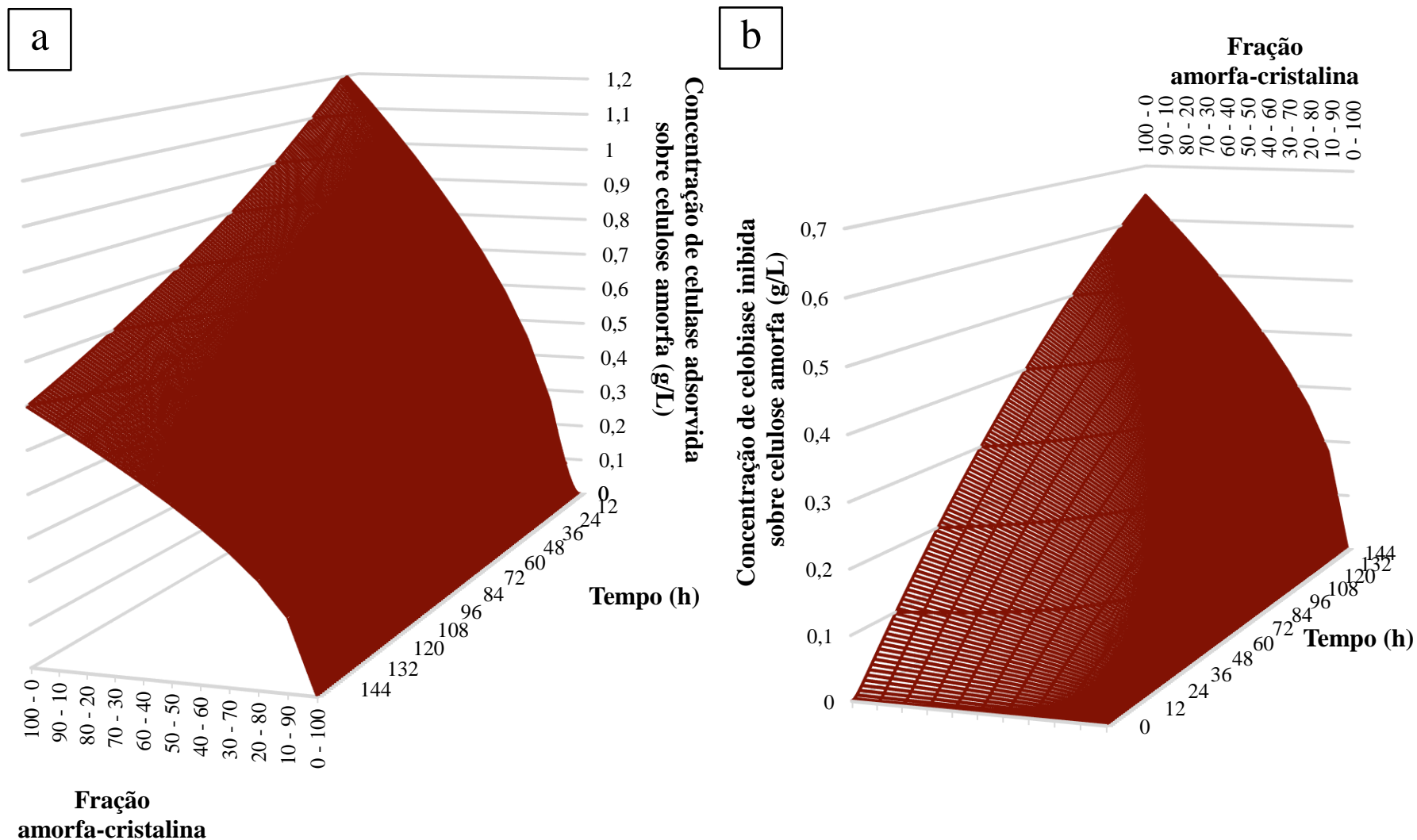


Figura 58 – Simulação do modelo cinético com dados de celulase adsorvida (a) e inibida (b) sobre celulose amorfa. Parâmetros de Tsai *et al.*, 2014. $S_{(0)} = 100 \text{ g.L}^{-1}$, sendo $S_{a(0)} = 50 \text{ g.L}^{-1}$; $S_{c(0)} = 50 \text{ g.L}^{-1}$; $G_{2(0)} = 0 \text{ g.L}^{-1}$; $G_{(0)} = 0 \text{ g.L}^{-1}$, $EfCelC_{(0)} = 1,58 \text{ g.L}^{-1}$, $Efn188_{(0)} = 0,59 \text{ g.L}^{-1}$, $EbCelCa_{(0)} = 0 \text{ g.L}^{-1}$, $EbCelCc1_{(0)} = 0 \text{ g.L}^{-1}$, $ExCelCc1_{(0)} = 0 \text{ g.L}^{-1}$, $EbN188_{(0)} = 0 \text{ g.L}^{-1}$, $t=168 \text{ h}$.

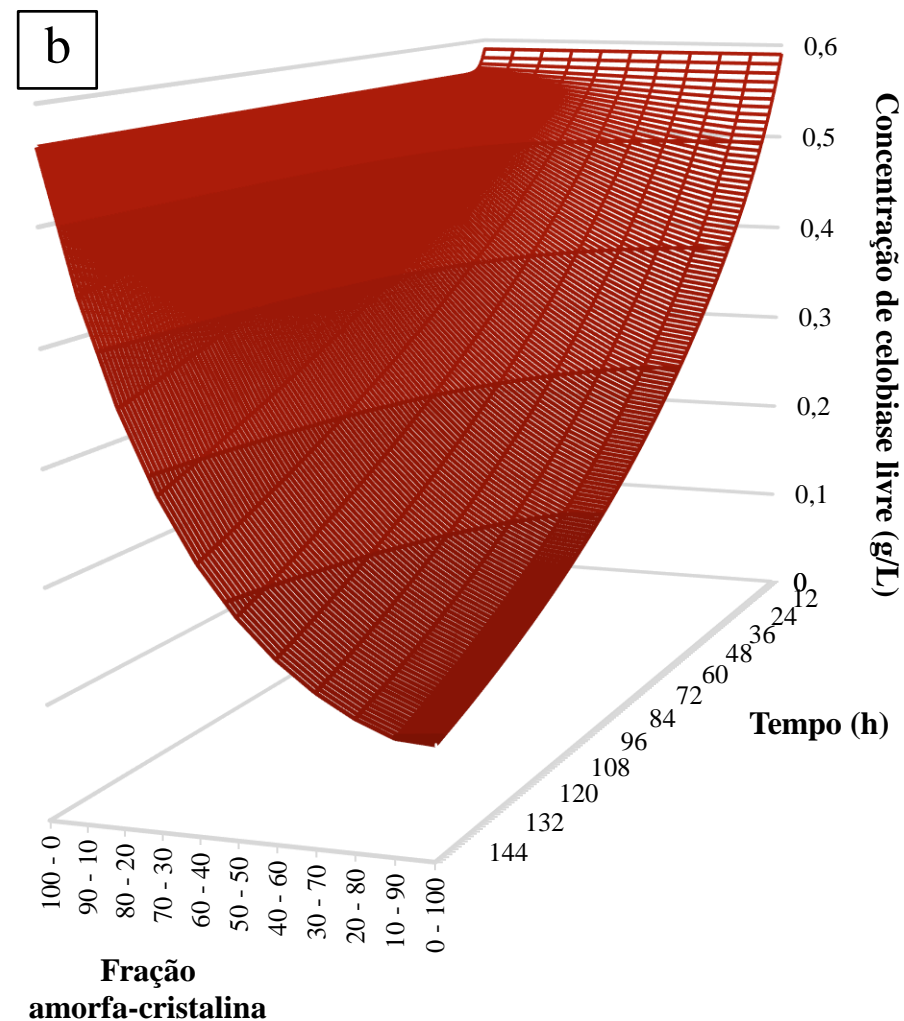
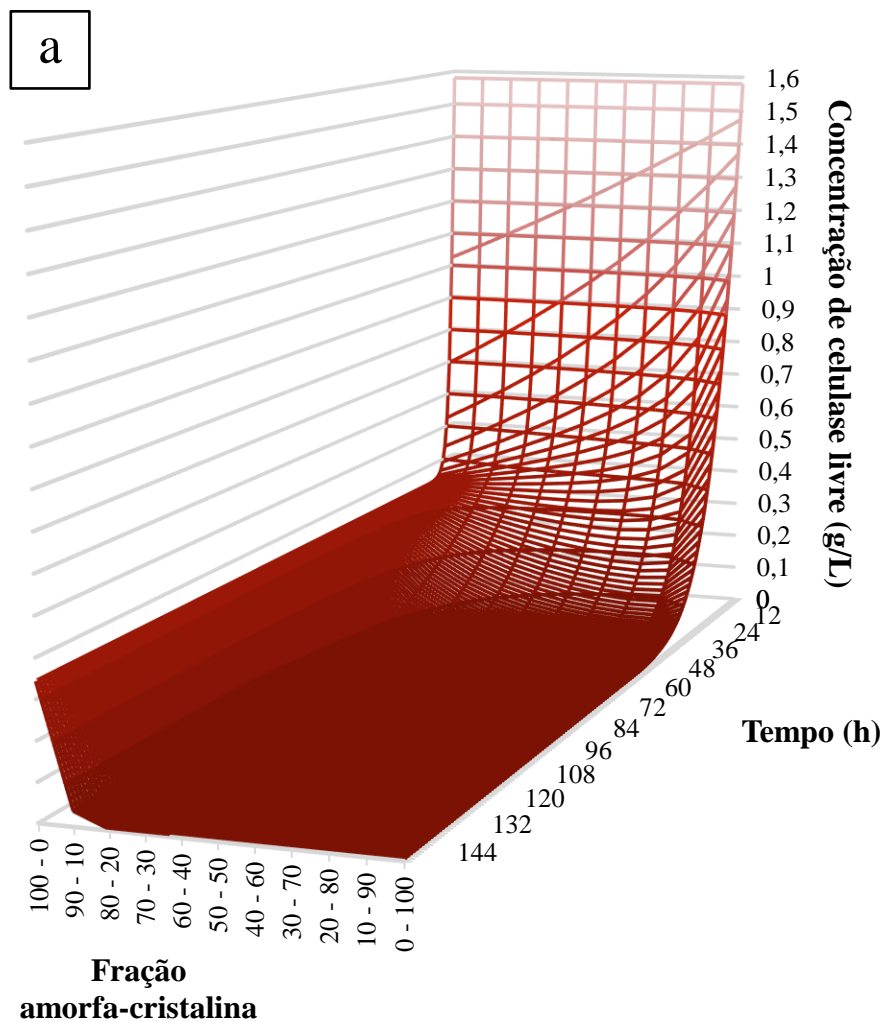


Figura 59 – Simulação do modelo cinético com dados de celulase adsorvida (a) e inibida (b) sobre celulose amorfa. Parâmetros de Tsai *et al.*, 2014. $S_{(0)} = 100 \text{ g.L}^{-1}$, sendo $S_{a(0)} = 50 \text{ g.L}^{-1}$; $S_{c(0)} = 50 \text{ g.L}^{-1}$; $G_{2(0)} = 0 \text{ g.L}^{-1}$; $G_{(0)} = 0 \text{ g.L}^{-1}$, $EfCelC_{(0)} = 1,58 \text{ g.L}^{-1}$, $EfN188_{(0)} = 0,59 \text{ g.L}^{-1}$, $EbCelCa_{(0)} = 0 \text{ g.L}^{-1}$, $EbCelCc1_{(0)} = 0 \text{ g.L}^{-1}$, $ExCelCc1_{(0)} = 0 \text{ g.L}^{-1}$, $EbN188_{(0)} = 0 \text{ g.L}^{-1}$, $t=168 \text{ h}$.

Anexo IV – Dados experimentais utilizados em estimação

Tabela 21- Concentrações experimentais de glicose do trabalho de Tsai *et al.*, 2014

Caso de Tsai <i>et al.</i> , 2014		A1		A2		A3		A5		B1		B2		B3	
caso		1		2		3		4		5		6		7	
(* celulase adicionada (g) *)	EtCeIC	1,5800		1,5800		1,5800		1,5800		1,0500		1,0500		1,0500	
(* β-glicosidase adicionada (g) *)	EtN188	0,5900		0,5900		0,5900		0,5900		0		0		0	
(* celulase adsorvida (g) *)	EbCeIC	0,0000		0,0000		0,0000		0,0000		0,0000		0,0000		0,0000	
(* celulase inibida (g) *)	ExCeIC	0,0000		0,0000		0,0000		0,0000		0,0000		0,0000		0,0000	
(* β-glicosidase adsorvida (g) *)	EbN188	0,0000		0,0000		0,0000		0,0000		0,0000		0,0000		0,0000	
(* Conc. inic. de celulose – g/L *)	C10	100		100		100		100		100		100		100	
(* Conc.inic. de celobiose – g/L *)	C20	0		0		30		0		0		0		0	
(* Conc.inic. de glicose – g/L *)	C30	0		50		0		0		0		25		50	
(* Conc.inic. de xilose – g/L *)	C40	0		0		0		80		0		0		0	
	hr	média	s ²	média	s ²	média	s ²	média	s ²	média	s ²	média	s ²	média	s ²
	0	0	0	50	0	0	0	0	0	0	0	25	0	50	0
	3	24,642	0,478	62,939	3,197	43,142	2,168	14,771	0,807	5,0525	1,207	28,136	0,733	54,646	0,627
	6	33,629	2,155	69,221	2,223	51,758	2,338	21,042	0,007	8,6477	0,312	29,63	1,921	54,95	0,516
	12	42,622	2,34	74,918	1,193	60,739	2,519	28,456	1,237	13,934	0,637	33,185	0,659	57,725	1,127
	24	52,734	2,097	82,096	0,871	70,069	2,325	37,476	2,003	21,044	0,291	37,915	0,276	60,957	0,224
	48	65,37	2,474	91,034	0,926	80,594	0,064	48,207	3,098	29,879	0,261	45,972	2,044	65,635	1,135
	72	72,58	1,861	96,491	3,243	85,462	1,835	55,174	3,765	36,376	0,658	51,321	1,043	69,898	1,055
	120	80,953	0,301	104,76	4,628	94,983	3,6	64,496	1,938	45,909	1,308	59,904	0,654	76,673	0,379
	168	86,373	1,123	109,22	6,556	100,54	5,558	67,465	2,429	52,129	0,488	65,289	2,937	81,466	0,709
		GLICOSE (mg/mL)													

Tabela 21 (continuação) – Concentrações experimentais de glicose do trabalho de Tsai *et al.*, 2014

B4		B5		B6		B7		C1		C2		C3		C4		C5		C6	
8		9		10		11		12		13		14		15		16		17	
1,0500		1,0500		1,0500		1,0500		2,1100		2,1100		2,1100		2,1100		2,1100		2,1100	
0		0		0		0		0		0		0		0		0		0	
0,0000		0,0000		0,0000		0,0000		0,0000		0,0000		0,0000		0,0000		0,0000		0,0000	
0,0000		0,0000		0,0000		0,0000		0,0000		0,0000		0,0000		0,0000		0,0000		0,0000	
0,0000		0,0000		0,0000		0,0000		0,0000		0,0000		0,0000		0,0000		0,0000		0,0000	
100		100		100		100		100		100		100		100		100		100	
15		30		0		0		0		0		0		15		30		0	
0		0		0		0		0		25		50		0		0		0	
0		0		40		80		0		0		0		0		0		40	
média	s ²	média	s ²	média	s ²	média	s ²	média	s ²	média	s ²	média	s ²	média	s ²	média	s ²	média	s ²
0	0	0	0	0	0	0,00	0	0	0	25	0	50	0	0	0	0	0	0	0
6,4502	0,121	7,8044	1,15	3,5985	0,608	3,04	0,33	8,069	0,656	29,665	0,198	56,463	0,579	10,674	0,38	12,964	0,513	6,0814	0,949
10,509	1,096	12,681	0,574	6,2615	0,122	4,98	1,08	13,283	0,249	32,01	0,281	57,834	0,595	16,602	0,557	20,246	0,661	10,194	0,59
17,119	0,539	20,879	0,365	10,441	0,876	8,48	1,05	20,215	0,388	37,086	0,43	61,411	0,653	24,376	0,456	29,893	0,199	14,98	0,99
25,355	1,124	30,361	0,43	15,579	0,658	12,99	1,11	28,595	0,454	44,851	0,726	66,506	0,465	33,673	0,992	40,665	0,538	21,723	0,541
35,086	1,061	41,617	0,332	22,883	0,725	19,24	1,24	38,134	0,033	52,121	0,755	72,576	1,191	44,024	0,437	51,934	0,784	30,056	1,003
42,242	1,114	48,521	0,178	28,288	0,317	24,24	0,11	45,663	0,883	58,428	0,666	77,532	0,701	51,353	0,575	58,554	0,289	36,293	0,53
52,794	0,531	60,729	0,834	37,527	0,798	30,41	1,43	55,48	0,728	67,726	0,529	84,786	0,21	63,102	1,133	70,758	0,576	46,025	1,281
59,062	0,305	66,897	0,201	43,176	0,455	35,26	0,35	60,632	0,393	73,128	0,398	90,126	0,745	68,866	0,979	75,69	0,709	52,424	1,281

Tabela 21 (continuação) – Concentrações experimentais de glicose do trabalho de Tsai *et al.*, 2014

C7		F		G		H		K		D1		D2		D3		D4		D5	
18		19		20		21		22		23		24		25		26		27	
2,1100		1,5800		1,5800		3,16		0,79		0		0		0		0		0	
0		0,3		0,1		0,59		0,295		0,0731		0,0731		0,0731		0,0731		0,0731	
0,0000		0,0000		0,0000		0,0000		0,0000		0,0000		0,0000		0,0000		0,0000		0,0000	
0,0000		0,0000		0,0000		0,0000		0,0000		0,0000		0,0000		0,0000		0,0000		0,0000	
0,0000		0,0000		0,0000		0,0000		0,0000		0,0000		0,0000		0,0000		0,0000		0,0000	
100		100		100		100		50		0		0		0		0		0	
0		0		0		0		0		37,5		37,5		37,5		37,5		37,5	
0		0		0		0		0		0		25		50		0		0	
80		40		40		40		0		0		0		0		40		80	
média	s ²	média	s ²	média	s ²	média	s ²	média	s ²	média	s ²	média	s ²	média	s ²	média	s ²	média	s ²
0,00	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	0	0	25	0	50	0	0	0	0	0
5,11	0,45	17,33	0,238	13,499	0,163	21,36	0,442	14,3	0,1	7,5735	0,176	30,858	0,473	57,653	0,332	8,6226	0,349	7,9777	0,151
8,23	0,87	23,847	0,64	18,844	0,27	28,138	0,11	19,2	0,0	20,532	0,212	37,212	0,177	61,128	0,323	20,101	0,385	17,981	0,065
12,82	0,47	28,593	0,344	24,081	0,141	33,863	0,181	22,9	0,1	29,444	0,37	43,439	0,334	66,301	0,623	27,526	0,121	24,923	0,121
18,40	0,55	41,153	0,76	35,152	0,147	46,789	1,244	30,8	0,4	36,192	0,355	50,688	0,574	70,126	1,253	34,287	0,355	30,843	1,296
25,16	0,56	52,83	1,137	46,665	0,051	58,499	0,38	37,8	0,4	39,828	0,346	58,175	0,058	77,179	0,704	38,614	0,655	36,53	0,263
30,63	0,44	60,866	0,723	53,99	1,231	66,297	1,391	42,8	0,7	40,905	0,018	62,706	0,185	82,543	0,783	39,751	0,928	39,355	0,311
38,17	0,54	73,498	2,209	67,267	1,656	80,369	0,686	46,0	0,0	41,144	0,1	62,881	0,185	83,219	0,882	40,5	0,695	39,702	0,116
43,76	0,84	77,582	1,453	73,75	2,679	80,43	1,68	46,6	0,2										

Tabela 21 (continuação) – Concentrações experimentais de glicose do trabalho de Tsai *et al.*, 2014

E1a		E2		E3a		E4		E5		E1b		E3b	
28		29		30		31		32		33		34	
0		0		0		0		0		0		0	
0,1463		0,1463		0,1463		0,1463		0,1463		0,2925		0,2925	
0,0000		0,0000		0,0000		0,0000		0,0000		0,0000		0,0000	
0,0000		0,0000		0,0000		0,0000		0,0000		0,0000		0,0000	
0,0000		0,0000		0,0000		0,0000		0,0000		0,0000		0,0000	
0		0		0		0		0		0		0	
37,5		37,5		37,5		37,5		37,5		37,5		37,5	
0		25		50		0		0		0		50	
0		0		0		40		80		0		0	
média	s ²	média	s ²	média	s ²	média	s ²	média	s ²	média	s ²	média	s ²
0	0	25	0	50	0	0	0	0	0	0	0	50	0
15,314	0,14	34,542	0,729	60,059	0,544	16,211	0,134	14,439	0,103	15,233	0,555	58,508	0,3
28,728	0,146	43,942	0,736	64,856	0,619	27,904	0,067	25,37	0,067	28,258	0,084	66,14	0,434
35,788	0,282	50,548	0,392	70,807	0,47	34,261	0,185	31,539	0,175	34,904	0,193	71,958	0,74
39,68	0,088	57,5	0,946	75,638	0,568	38,595	0,306	36,616	0,329	38,504	0,356	78,42	0,544
40,573	0,276	61,458	0,997	80,278	1,008	40,266	0,012	39,259	0,3	39,343	0,313	83,886	0,232
40,787	0,082	61,619	0,228	83,139	0,609	40,416	0,261	39,602	0,484	39,174	0,288	86,01	0,204
40,847	0,124	62,19	0,367	84,754	0,469	40,626	0,473	39,818	0,047	39,116	0,288	86,395	0,612

Anexo V – Tabela de valores de correlação paramétrica

Tabela 22–Matriz de correlação paramétrica para o modelo do Caso 1

	K_{1r}^*	K_{2r}^*	K_{3r}	K_{3M}	K_{6r}^*	K_{7r}^*	K_{8r}^*	K_{aCelC}	E_{maxCe}	K_{aN188}	E_{maxN1}	K_{1IG}^*	K_{1IG2}^*	K_{1IX}^*	K_{2IG}^*	K_{2IG2}^*	K_{2IX}^*	K_{3iG}	K_{3iX}
K_{1r}^*	1,000	-0,891	-0,798	0,257	0,603	-0,105	-0,084	0,134	0,057	-0,105	0,096	-0,064	0,029	0,033	-0,016	0,004	0,002	0,010	0,011
K_{2r}^*	-0,891	1,000	0,454	-0,179	-0,338	0,060	0,055	-0,084	-0,045	0,082	-0,069	0,036	-0,011	-0,023	0,010	-0,002	-0,001	-0,007	-0,010
K_{3r}	-0,798	0,454	1,000	-0,456	-0,720	0,127	0,091	-0,152	-0,052	0,097	-0,097	0,078	-0,042	-0,035	0,018	-0,004	-0,002	-0,010	-0,007
K_{3M}	0,257	-0,179	-0,456	1,000	0,144	-0,044	-0,027	0,047	0,015	-0,030	0,031	-0,025	0,014	0,011	-0,006	0,001	0,001	0,003	0,002
K_{6r}^*	0,603	-0,338	-0,720	0,144	1,000	-0,481	-0,067	0,306	-0,013	-0,103	0,233	-0,257	0,198	0,065	-0,045	0,008	0,006	0,029	-0,013
K_{7r}^*	-0,105	0,060	0,127	-0,044	-0,481	1,000	-0,377	-0,144	0,342	-0,113	-0,349	0,450	-0,448	-0,016	0,049	0,001	-0,015	-0,051	0,067
K_{8r}^*	-0,084	0,055	0,091	-0,027	-0,067	-0,377	1,000	-0,777	-0,594	0,508	-0,057	-0,003	0,200	-0,215	0,074	-0,036	0,010	0,010	-0,074
K_{aCelC}	0,134	-0,084	-0,152	0,047	0,306	-0,144	-0,777	1,000	0,191	-0,413	0,421	-0,485	0,213	0,416	-0,232	0,059	0,015	0,021	0,035
$E_{maxCelC}$	0,057	-0,045	-0,052	0,015	-0,013	0,342	-0,594	0,191	1,000	-0,661	-0,191	0,582	-0,584	-0,273	0,250	-0,035	-0,039	-0,034	0,125
K_{aN188}	-0,105	0,082	0,097	-0,030	-0,103	-0,113	0,508	-0,413	-0,661	1,000	-0,512	-0,100	0,319	-0,174	0,040	-0,024	0,008	0,059	-0,248
$E_{maxN188}$	0,096	-0,069	-0,097	0,031	0,233	-0,349	-0,057	0,421	-0,191	-0,512	1,000	-0,690	0,537	0,161	-0,122	0,016	0,022	0,036	0,077
K_{1IG}^*	-0,064	0,036	0,078	-0,025	-0,257	0,450	-0,003	-0,485	0,582	-0,100	-0,690	1,000	-0,909	-0,256	0,240	-0,034	-0,037	-0,085	0,136
K_{1IG2}^*	0,029	-0,011	-0,042	0,014	0,198	-0,448	0,200	0,213	-0,584	0,319	0,537	-0,909	1,000	-0,123	-0,026	-0,020	0,022	0,125	-0,229
K_{1IX}^*	0,033	-0,023	-0,035	0,011	0,065	-0,016	-0,215	0,416	-0,273	-0,174	0,161	-0,256	-0,123	1,000	-0,680	0,164	0,046	-0,096	0,145
K_{2IG}^*	-0,016	0,010	0,018	-0,006	-0,045	0,049	0,074	-0,232	0,250	0,040	-0,122	0,240	-0,026	-0,680	1,000	-0,247	-0,034	0,056	-0,066
K_{2IG2}^*	0,004	-0,002	-0,004	0,001	0,008	0,001	-0,036	0,059	-0,035	-0,024	0,016	-0,034	-0,020	0,164	-0,247	1,000	-0,928	-0,082	0,073
K_{2IX}^*	0,002	-0,001	-0,002	0,001	0,006	-0,015	0,010	0,015	-0,039	0,008	0,022	-0,037	0,022	0,046	-0,034	-0,928	1,000	0,067	-0,052
K_{3iG}	0,010	-0,007	-0,010	0,003	0,029	-0,051	0,010	0,021	-0,034	0,059	0,036	-0,085	0,125	-0,096	0,056	-0,082	0,067	1,000	-0,610
K_{3iX}	0,011	-0,010	-0,007	0,002	-0,013	0,067	-0,074	0,035	0,125	-0,248	0,077	0,136	-0,229	0,145	-0,066	0,073	-0,052	-0,610	1,000

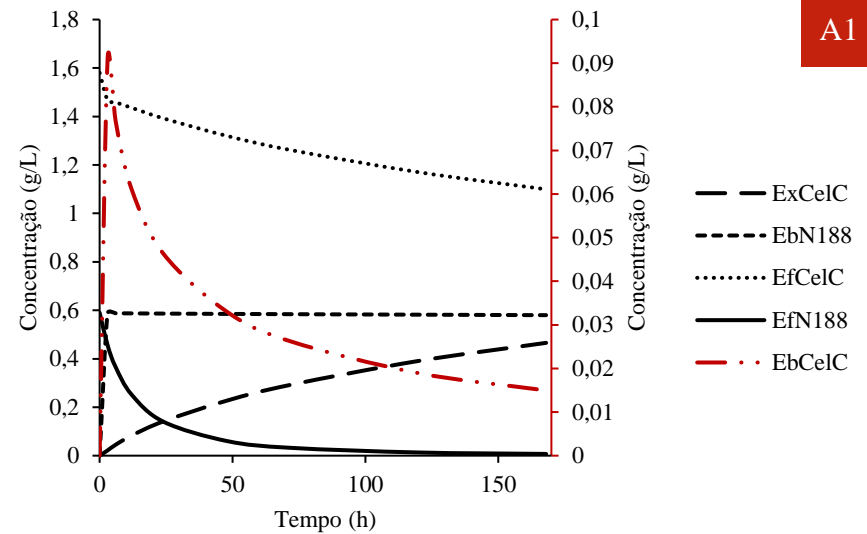
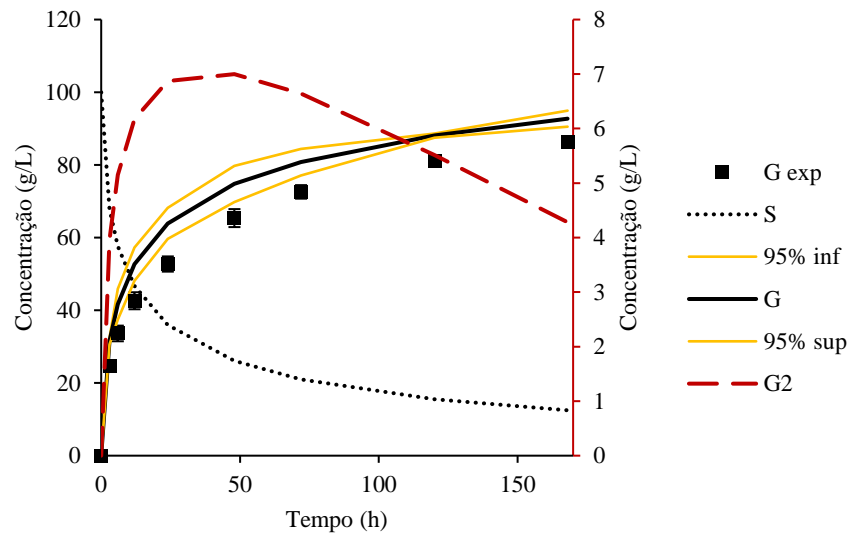
Tabela 23 – Matriz de correlação paramétrica para o modelo do Caso 2

	K_{1r}^\dagger	K_{2r}^\dagger	K_{3r}	K_{3M}	K_{5r}^\dagger	K_{7r}^\dagger	K_{8r}^\dagger	K_{9r}^\dagger	K_{10r}^\dagger	K_{10M}^\dagger	K_{aCelCa}	$E_{maxCelCa}$	K_{aCelCc}	$E_{maxCelCc}$	K_{aN188}	$E_{maxN188}$
K_{1r}^\dagger	1,000	-0,856	0,524	0,234	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000
K_{2r}^\dagger	-0,856	1,000	-0,647	-0,213	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
K_{3r}	0,524	-0,647	1,000	-0,542	0,001	-0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	-0,001	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000
K_{3M}	0,234	-0,213	-0,542	1,000	-0,001	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000
K_{5r}^\dagger	0,000	0,000	0,001	-0,001	1,000	-0,880	-0,160	-0,065	0,234	-0,016	-0,503	0,141	0,169	-0,285	0,030	-0,037
K_{7r}^\dagger	0,000	0,000	-0,001	0,001	-0,880	1,000	0,101	-0,005	-0,117	0,041	0,326	-0,121	-0,065	0,266	-0,005	0,020
K_{8r}^\dagger	0,000	0,000	0,000	0,000	-0,160	0,101	1,000	-0,648	-0,679	-0,384	0,533	0,315	-0,790	-0,434	-0,013	-0,071
K_{9r}^\dagger	0,000	0,000	0,000	0,000	-0,065	-0,005	-0,648	1,000	0,253	0,492	-0,239	-0,276	0,653	0,281	-0,003	0,042
K_{10r}^\dagger	0,000	0,000	0,000	0,000	0,234	-0,117	-0,679	0,253	1,000	-0,263	-0,629	0,152	0,354	0,022	0,072	0,004
K_{10M}^\dagger	0,000	0,000	0,000	0,000	-0,016	0,041	-0,384	0,492	-0,263	1,000	-0,251	-0,403	0,695	0,380	-0,025	0,012
K_{aCelCa}	0,000	0,000	-0,001	0,000	-0,503	0,326	0,533	-0,239	-0,629	-0,251	1,000	-0,305	-0,537	0,024	-0,075	0,087
$E_{maxCelCa}$	0,000	0,000	0,001	0,000	0,141	-0,121	0,315	-0,276	0,152	-0,403	-0,305	1,000	-0,399	-0,680	0,108	-0,215
K_{aCelCc}	0,000	0,000	0,000	0,000	0,169	-0,065	-0,790	0,653	0,354	0,695	-0,537	-0,399	1,000	0,345	0,006	0,052
$E_{maxCelCc}$	0,001	0,000	0,000	0,001	-0,285	0,266	-0,434	0,281	0,022	0,380	0,024	-0,680	0,345	1,000	-0,106	0,171
K_{aN188}	0,000	0,000	0,000	0,000	0,030	-0,005	-0,013	-0,003	0,072	-0,025	-0,075	0,108	0,006	-0,106	1,000	-0,785
$E_{maxN188}$	0,000	0,000	0,000	0,000	-0,037	0,020	-0,071	0,042	0,004	0,012	0,087	-0,215	0,052	0,171	-0,785	1,000
K_{1iG}^\dagger	0,001	-0,001	0,001	0,000	0,056	-0,046	-0,435	0,213	0,037	0,378	-0,296	-0,068	0,272	0,486	-0,030	0,012
K_{1iG2}^\dagger	-0,001	0,001	-0,001	0,000	-0,061	0,056	0,436	-0,170	-0,043	-0,373	0,321	0,071	-0,221	-0,505	0,030	-0,012
K_{1iX}^\dagger	0,000	-0,001	0,001	0,000	0,105	-0,081	0,019	-0,074	0,095	-0,121	-0,309	0,708	-0,280	-0,248	0,063	-0,153
K_{2iG}^\dagger	0,000	0,000	-0,001	0,000	0,094	-0,064	-0,086	0,043	-0,236	0,295	0,274	-0,833	0,325	0,451	-0,092	0,174
K_{2iG2}^\dagger	0,001	0,000	0,000	0,001	-0,363	0,251	-0,561	0,297	0,191	0,375	-0,107	-0,597	0,476	0,696	-0,064	0,137
K_{2iX}^\dagger	-0,001	0,000	0,000	0,000	0,368	-0,332	-0,050	0,264	0,388	-0,143	-0,416	0,535	0,124	-0,545	0,094	-0,121
K_{3iG}	0,000	0,000	0,000	0,000	-0,245	0,185	0,676	-0,713	-0,619	-0,377	0,683	-0,117	-0,683	-0,022	-0,071	0,051
K_{3iX}	0,000	0,000	0,000	0,000	0,182	-0,112	-0,734	0,650	0,605	0,455	-0,565	-0,179	0,780	0,164	0,049	0,012
K_{10iG}	0,000	0,000	0,000	0,000	-0,223	0,102	-0,245	0,776	-0,229	0,469	0,145	-0,468	0,394	0,292	-0,056	0,079
K_{10iX}	0,000	0,000	0,000	0,000	-0,089	0,031	0,891	-0,739	-0,429	-0,679	0,473	0,506	-0,930	-0,488	0,008	-0,084

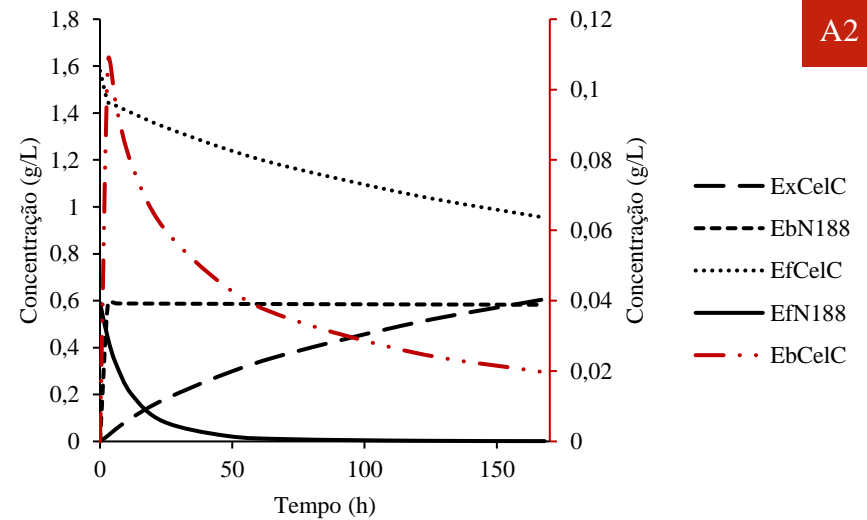
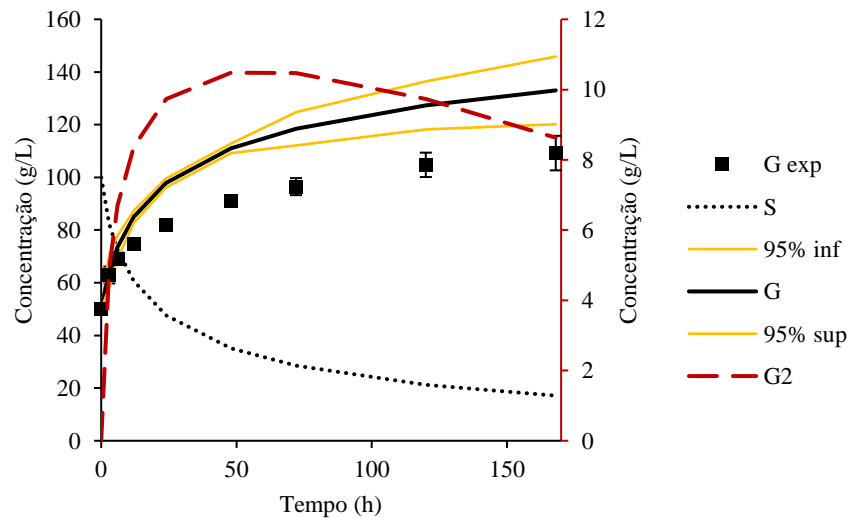
Tabela 23 – (continuação) –Matriz de correlação paramétrica para o modelo do Caso 2

	K_{1iG}^\dagger	K_{1iG2}^\dagger	K_{1iX}^\dagger	K_{2iG}^\dagger	K_{2iG2}^\dagger	K_{2iX}^\dagger	K_{3iG}	K_{3iX}	K_{10iG}	K_{10iX}
K_{1r}^\dagger	0,001	-0,001	0,000	0,000	0,001	-0,001	0,000	0,000	0,000	0,000
K_{2r}^\dagger	-0,001	0,001	-0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
K_{3r}	0,001	-0,001	0,001	-0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
K_{3M}	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
K_{5r}^\dagger	0,056	-0,061	0,105	0,094	-0,363	0,368	-0,245	0,182	-0,223	-0,089
K_{7r}^\dagger	-0,046	0,056	-0,081	-0,064	0,251	-0,332	0,185	-0,112	0,102	0,031
K_{8r}^\dagger	-0,435	0,436	0,019	-0,086	-0,561	-0,050	0,676	-0,734	-0,245	0,891
K_{9r}^\dagger	0,213	-0,170	-0,074	0,043	0,297	0,264	-0,713	0,650	0,776	-0,739
K_{10r}^\dagger	0,037	-0,043	0,095	-0,236	0,191	0,388	-0,619	0,605	-0,229	-0,429
K_{10M}^\dagger	0,378	-0,373	-0,121	0,295	0,375	-0,143	-0,377	0,455	0,469	-0,679
K_{aCelCa}	-0,296	0,321	-0,309	0,274	-0,107	-0,416	0,683	-0,565	0,145	0,473
$E_{maxCelCa}$	-0,068	0,071	0,708	-0,833	-0,597	0,535	-0,117	-0,179	-0,468	0,506
K_{aCelCc}	0,272	-0,221	-0,280	0,325	0,476	0,124	-0,683	0,780	0,394	-0,930
$E_{maxCelCc}$	0,486	-0,505	-0,248	0,451	0,696	-0,545	-0,022	0,164	0,292	-0,488
K_{aN188}	-0,030	0,030	0,063	-0,092	-0,064	0,094	-0,071	0,049	-0,056	0,008
$E_{maxN188}$	0,012	-0,012	-0,153	0,174	0,137	-0,121	0,051	0,012	0,079	-0,084
K_{1iG}^\dagger	1,000	-0,841	0,496	-0,213	0,412	-0,388	-0,094	0,052	0,014	-0,341
K_{1iG2}^\dagger	-0,841	1,000	-0,552	0,178	-0,451	0,440	0,069	0,011	-0,050	0,300
K_{1iX}^\dagger	0,496	-0,552	1,000	-0,868	-0,280	0,123	-0,062	-0,233	-0,265	0,264
K_{2iG}^\dagger	-0,213	0,178	-0,868	1,000	0,307	-0,330	0,138	0,146	0,263	-0,313
K_{2iG2}^\dagger	0,412	-0,451	-0,280	0,307	1,000	-0,610	-0,057	0,281	0,252	-0,586
K_{2iX}^\dagger	-0,388	0,440	0,123	-0,330	-0,610	1,000	-0,643	0,389	0,026	-0,049
K_{3iG}	-0,094	0,069	-0,062	0,138	-0,057	-0,643	1,000	-0,894	-0,231	0,694
K_{3iX}	0,052	0,011	-0,233	0,146	0,281	0,389	-0,894	1,000	0,160	-0,797
K_{10iG}	0,014	-0,050	-0,265	0,263	0,252	0,026	-0,231	0,160	1,000	-0,475
K_{10iX}	-0,341	0,300	0,264	-0,313	-0,586	-0,049	0,694	-0,797	-0,475	1,000

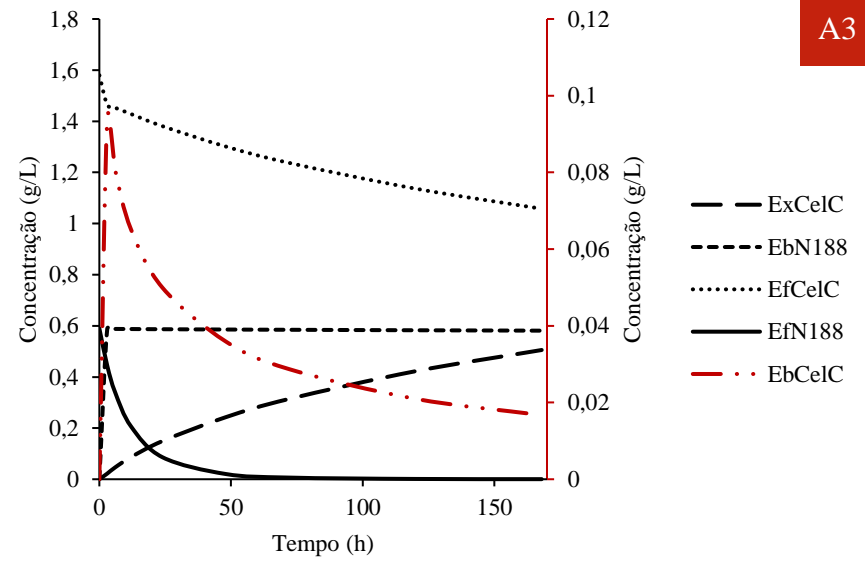
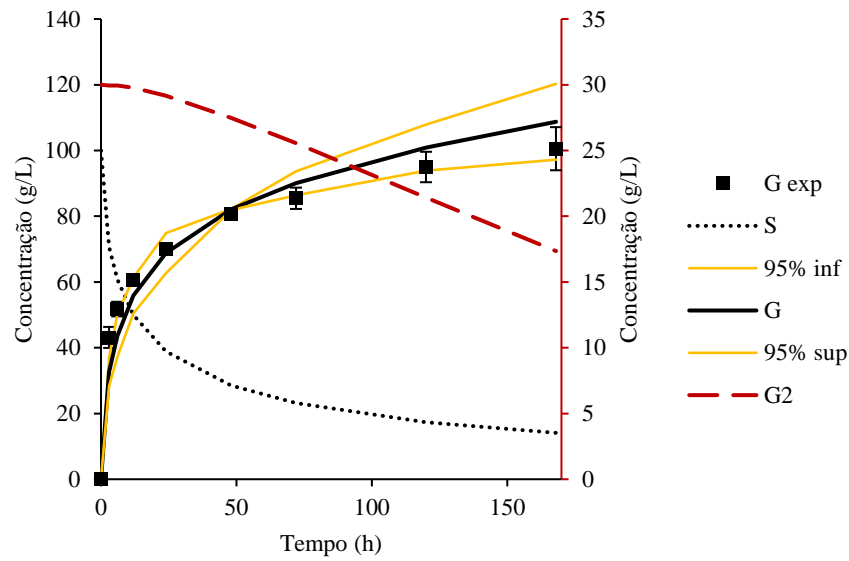
Anexo VI – Resultados da estimação do modelo do Caso 1



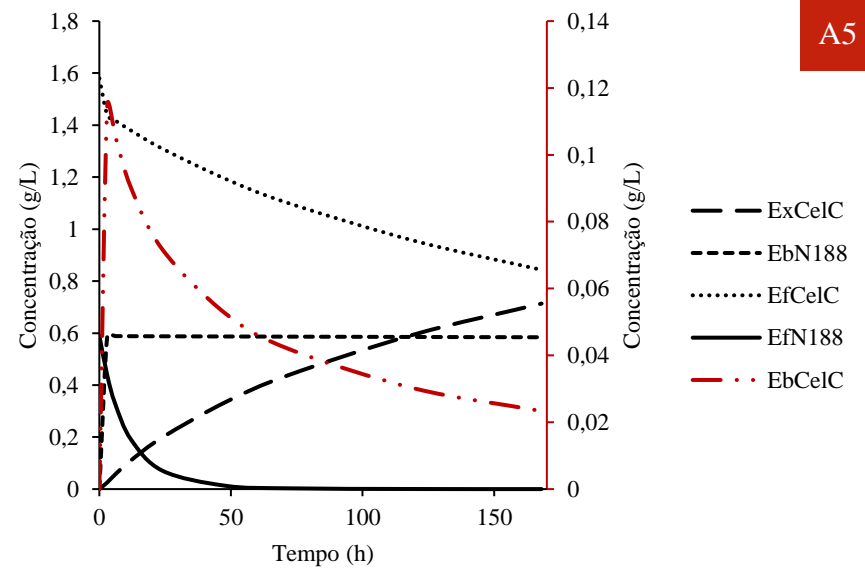
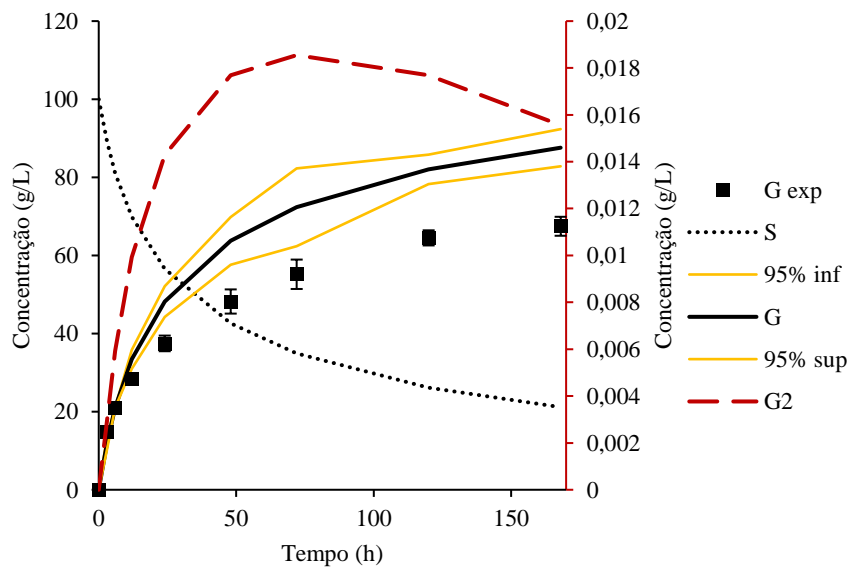
A1



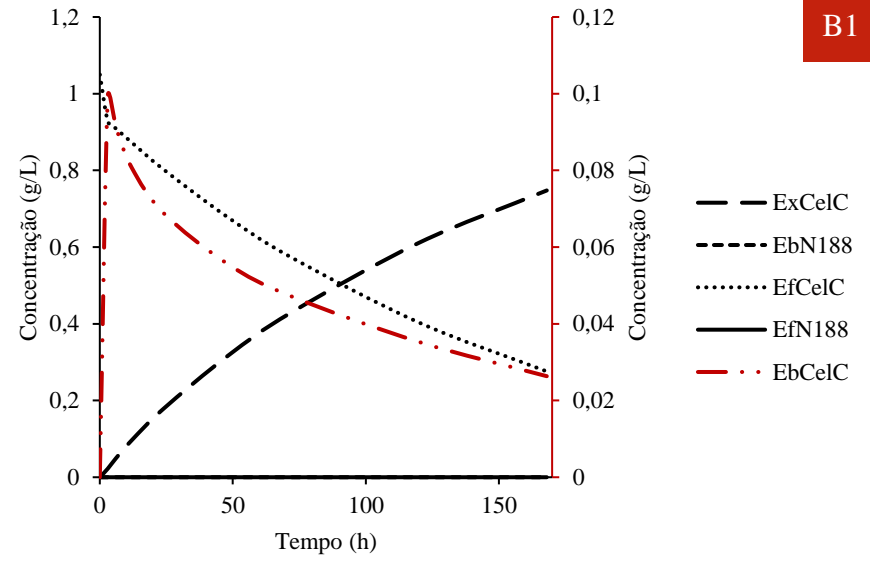
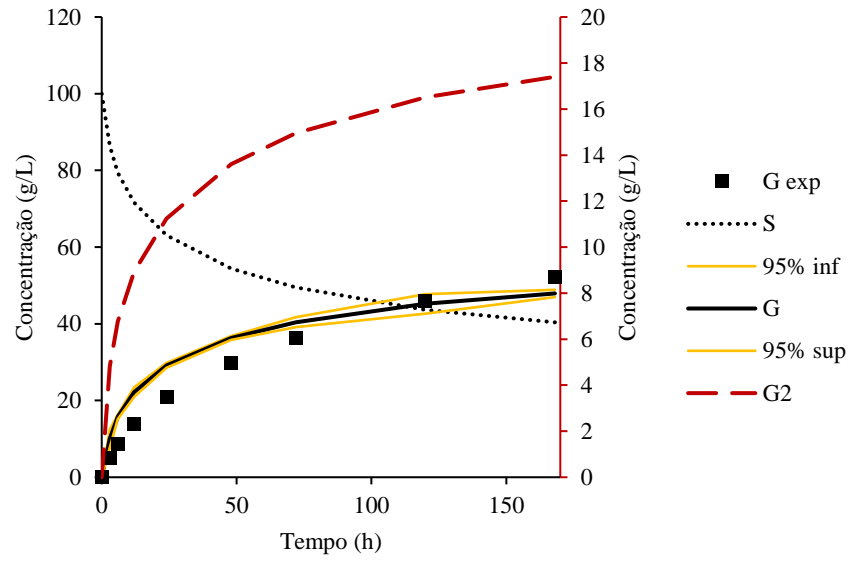
A2



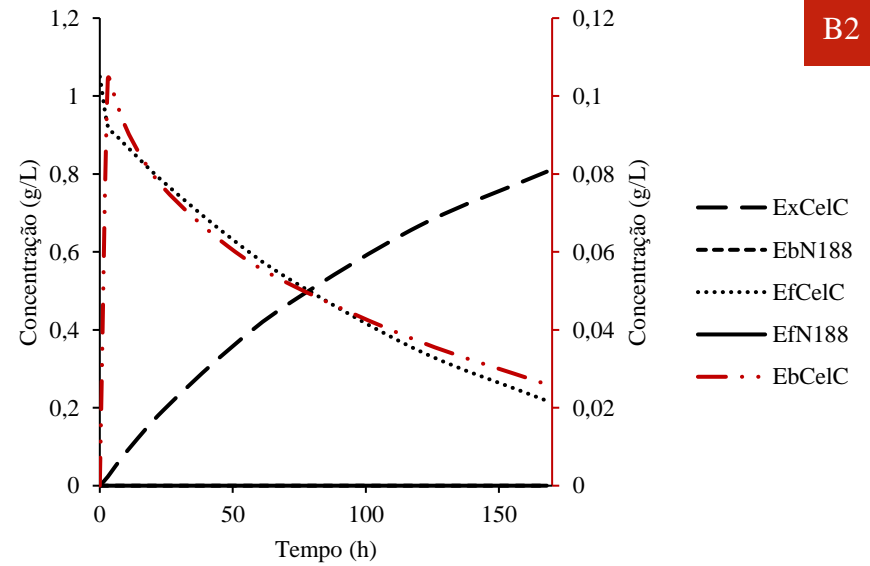
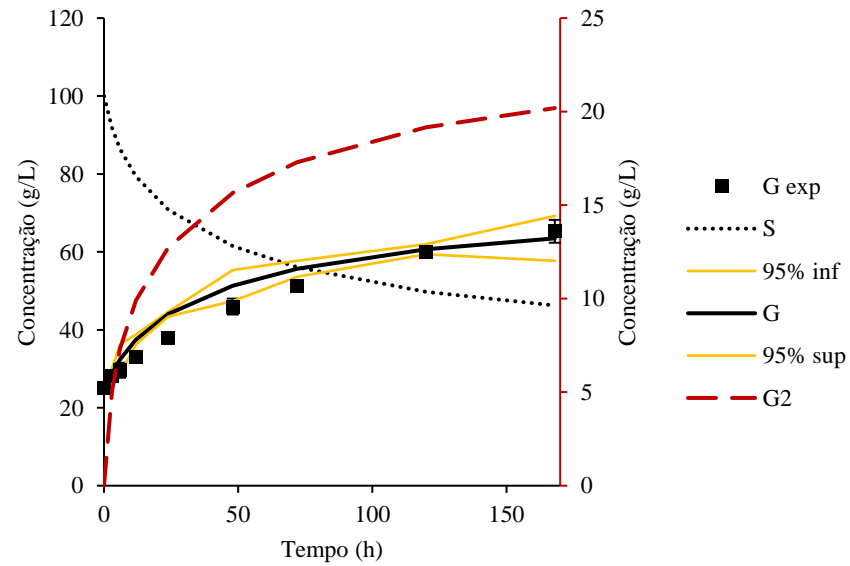
A3



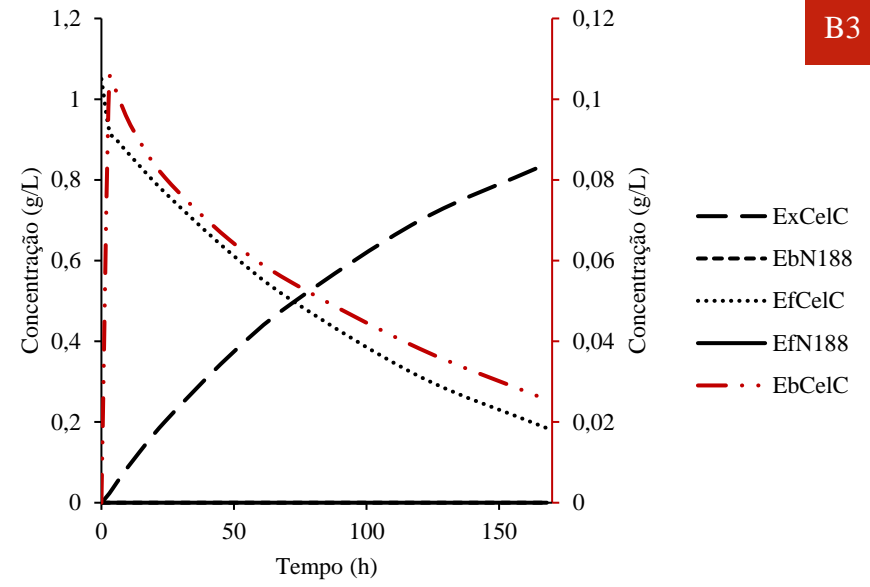
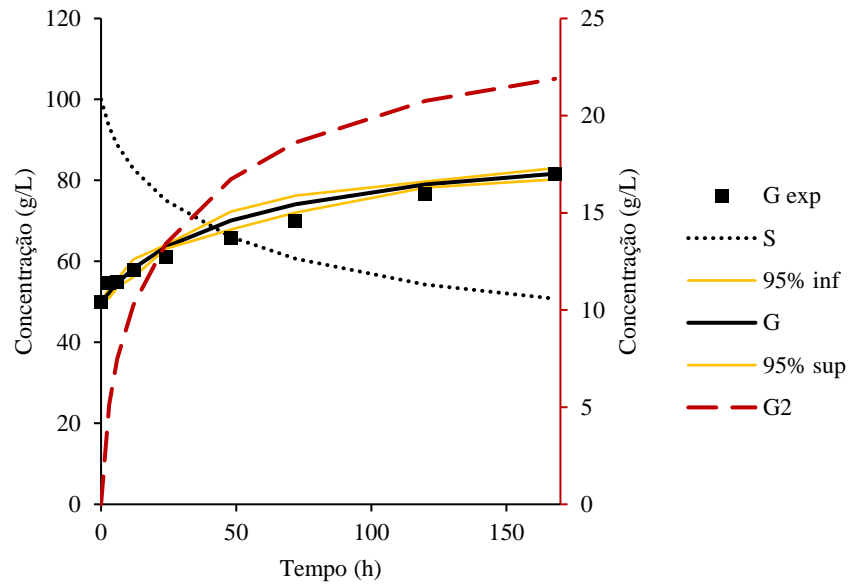
A5



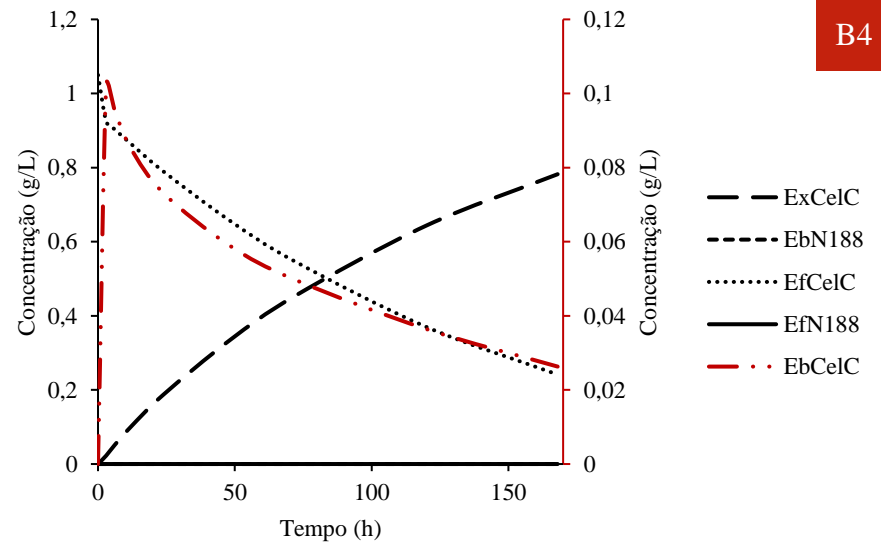
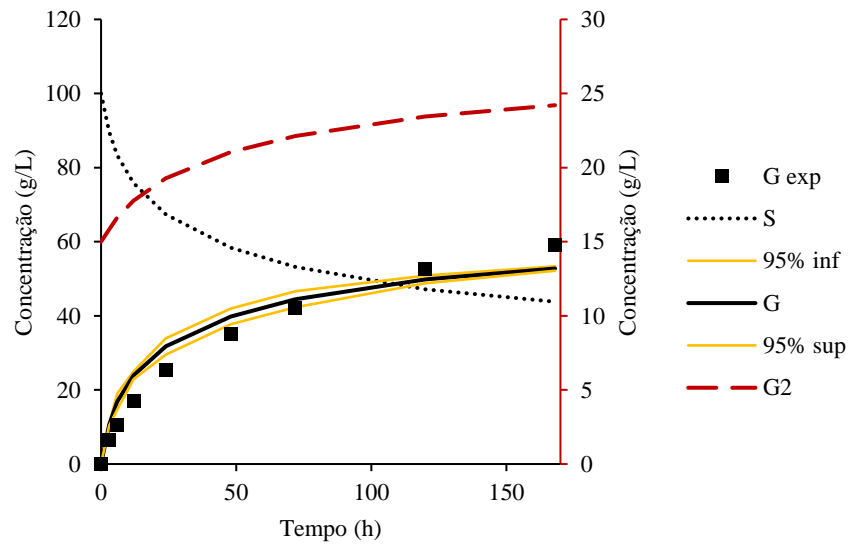
B1



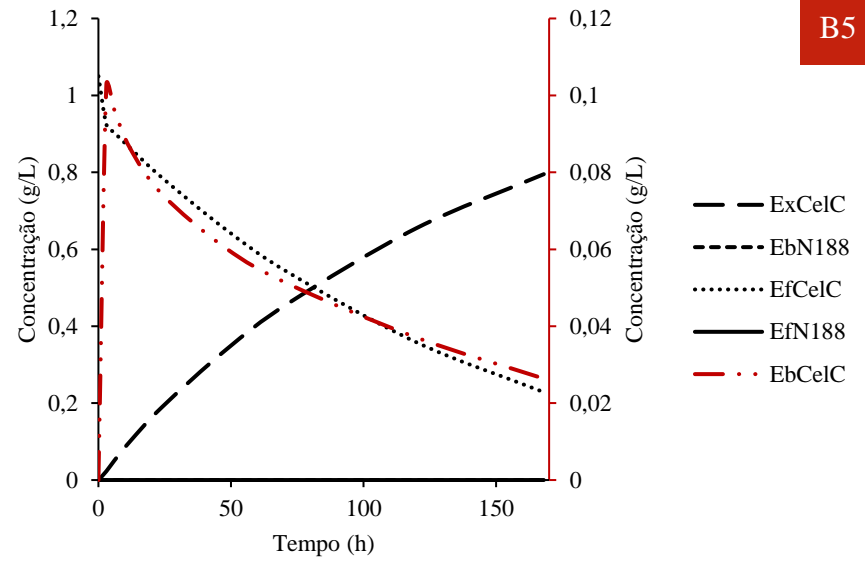
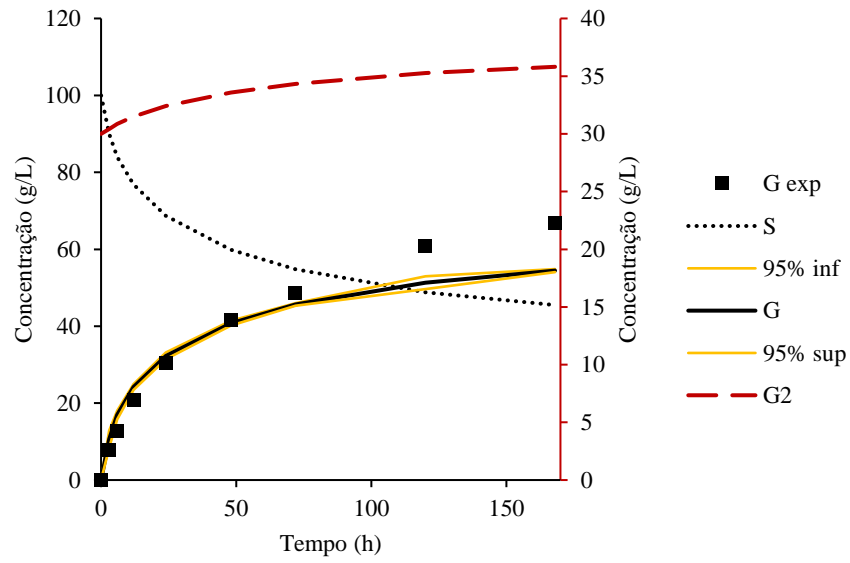
B2



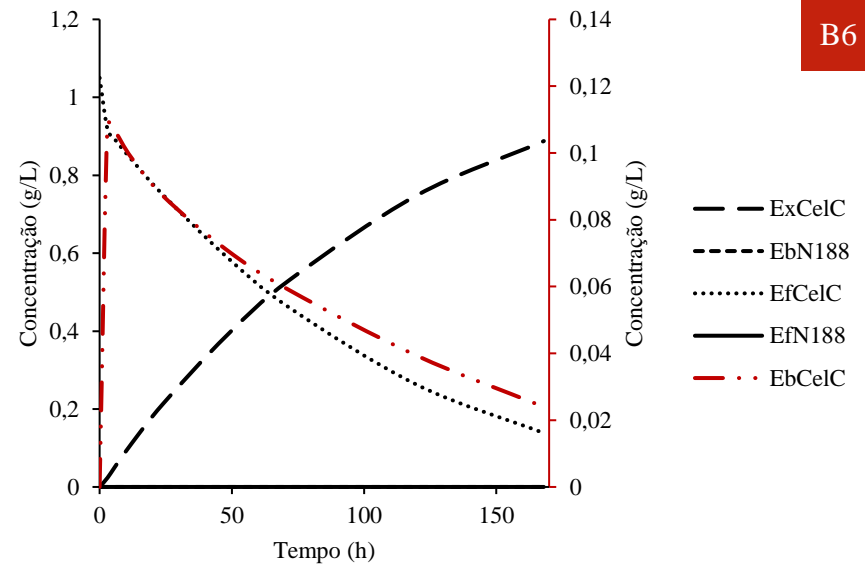
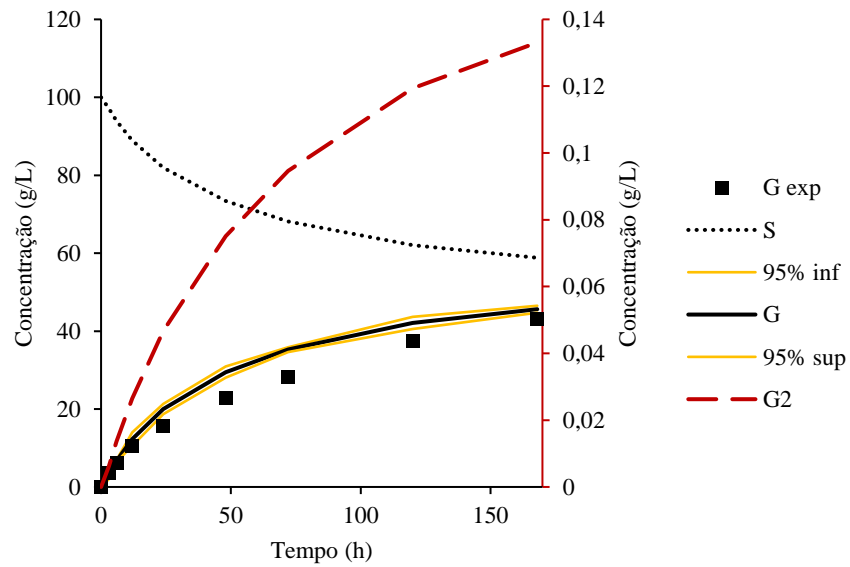
B3



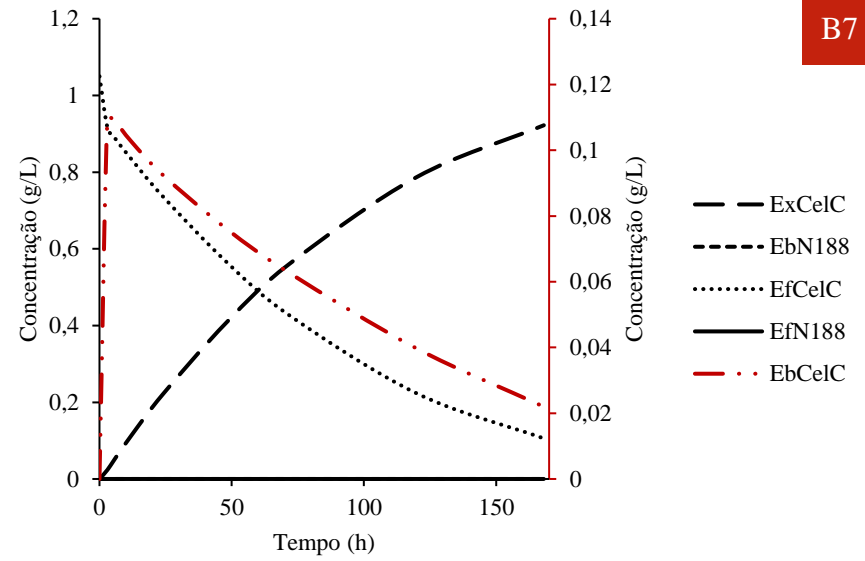
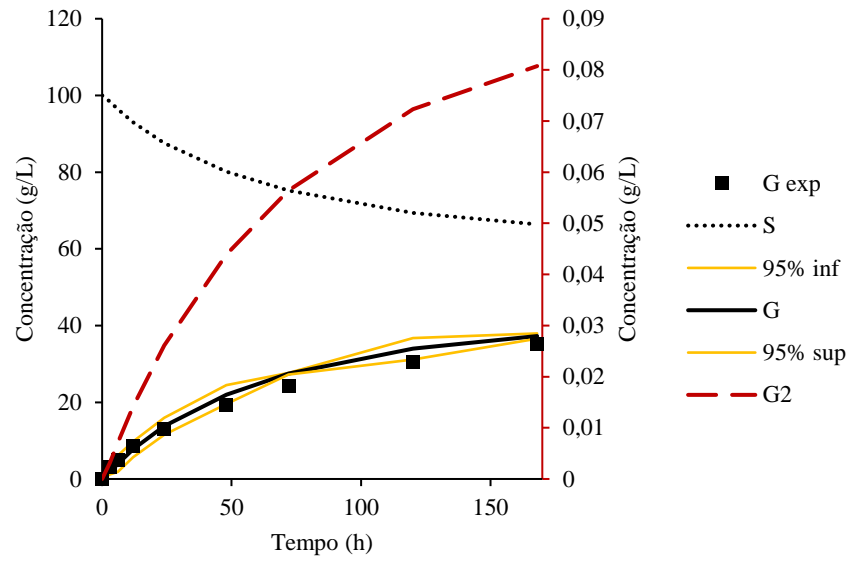
B4



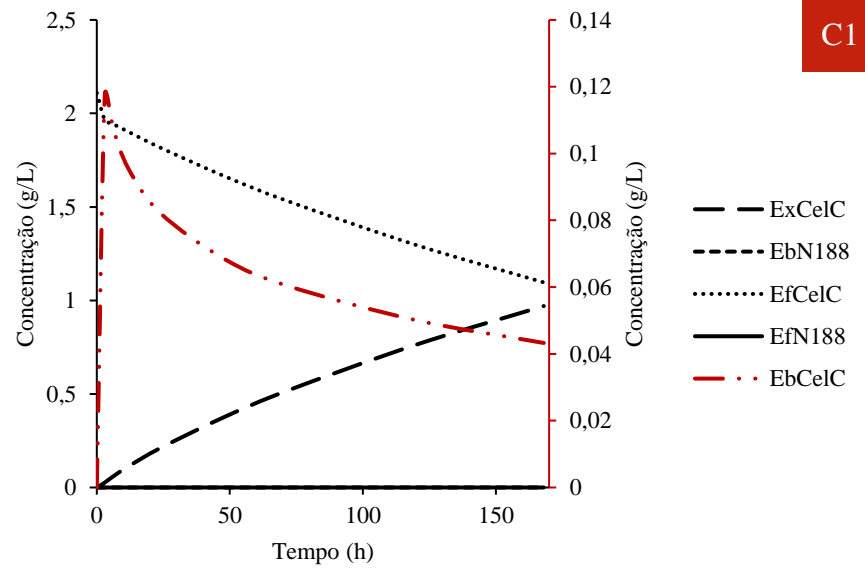
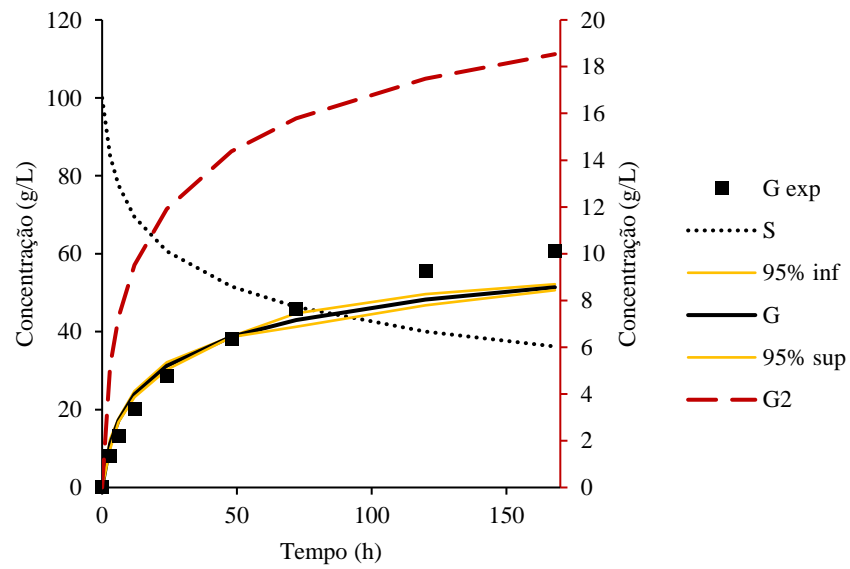
B5



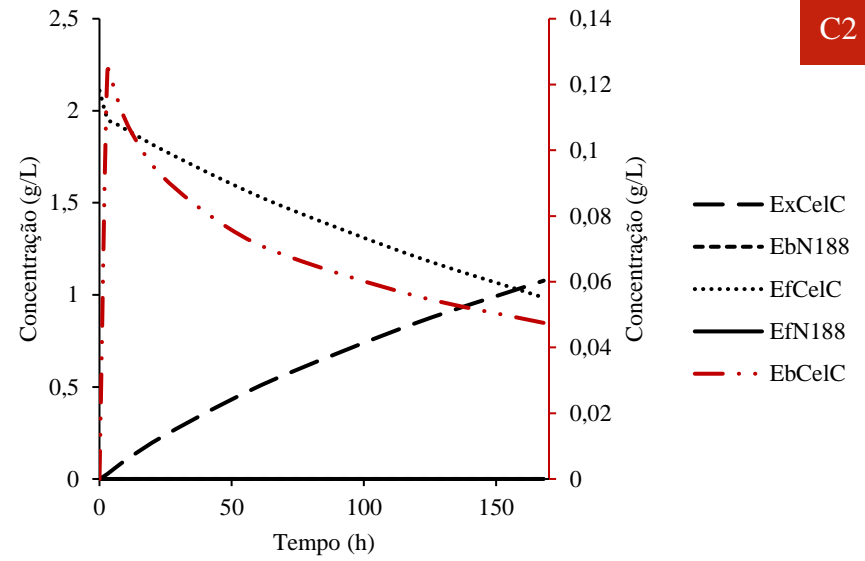
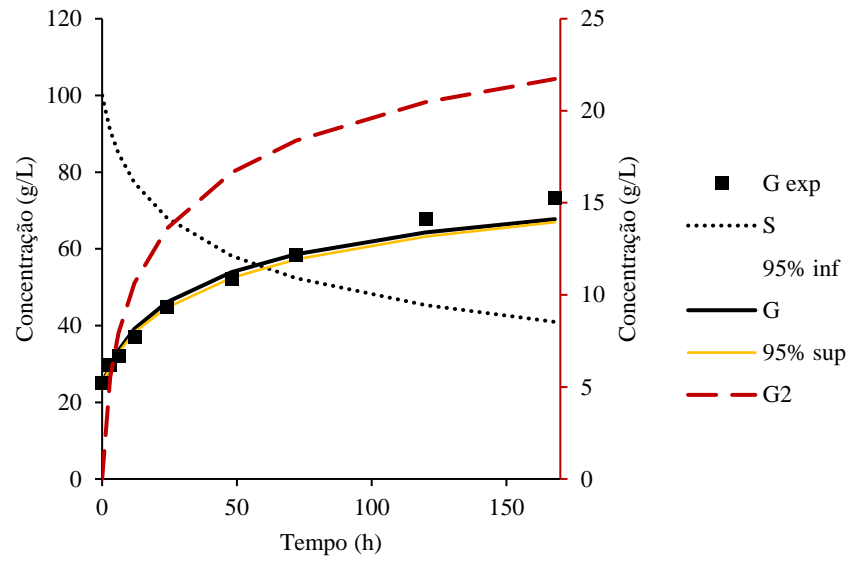
B6



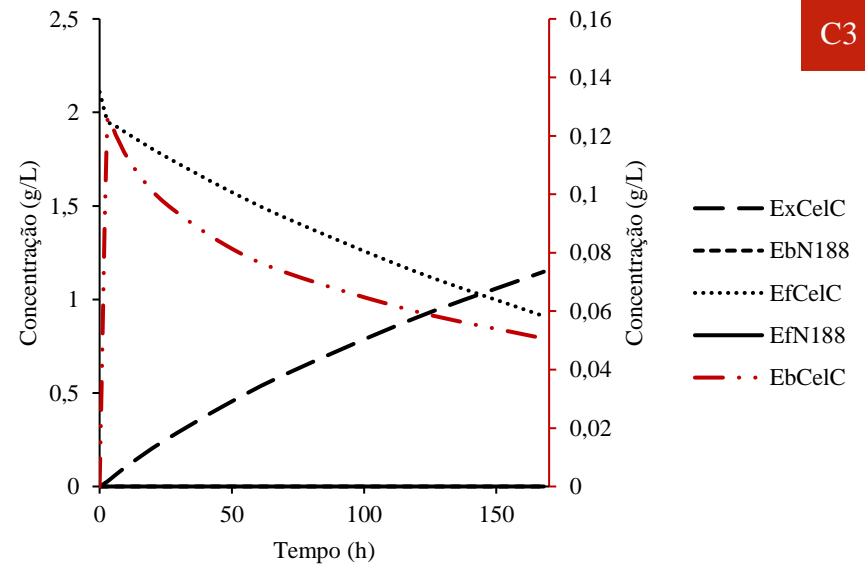
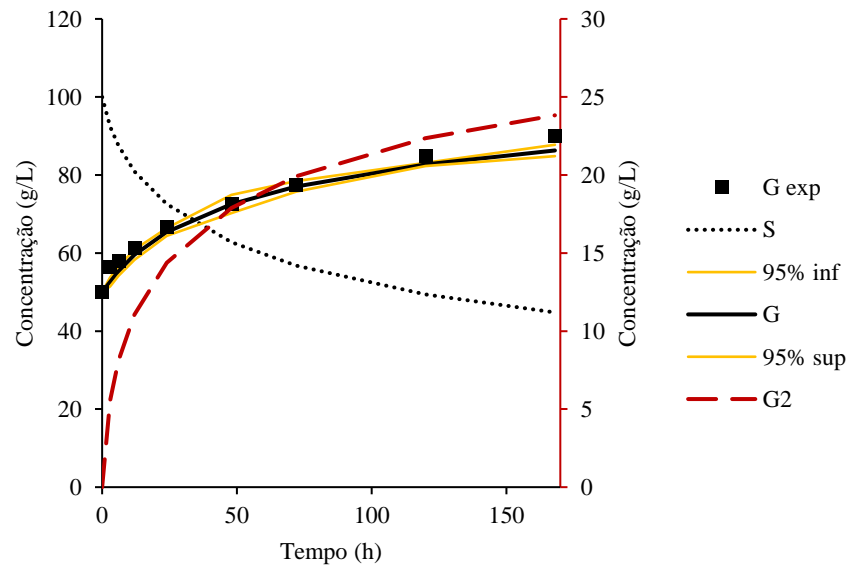
B7



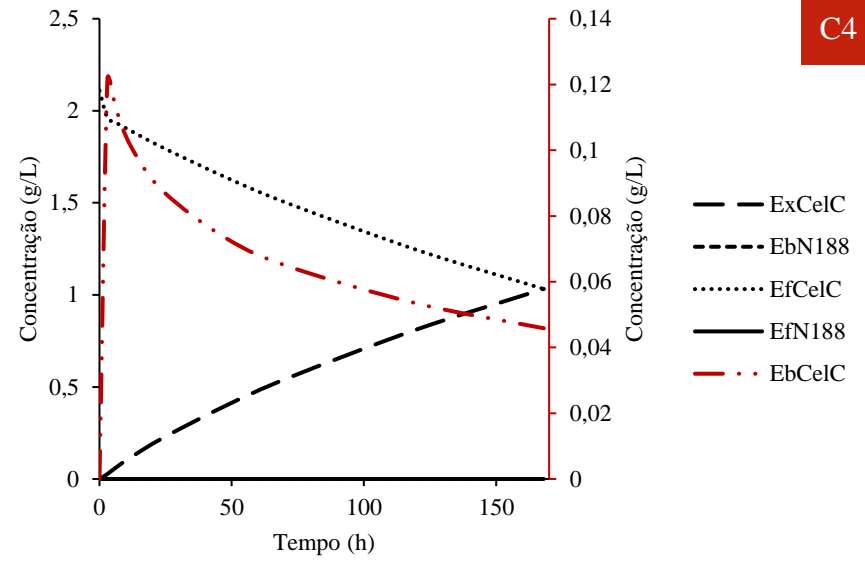
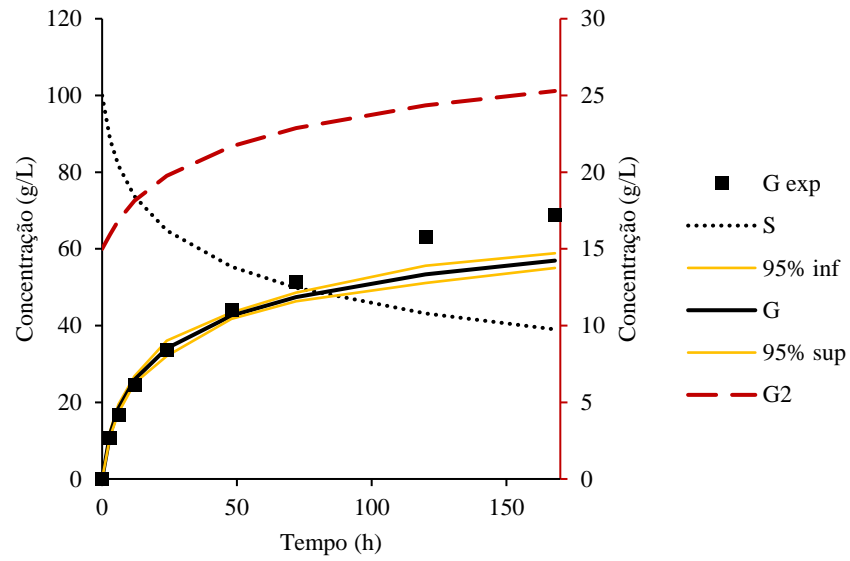
C1



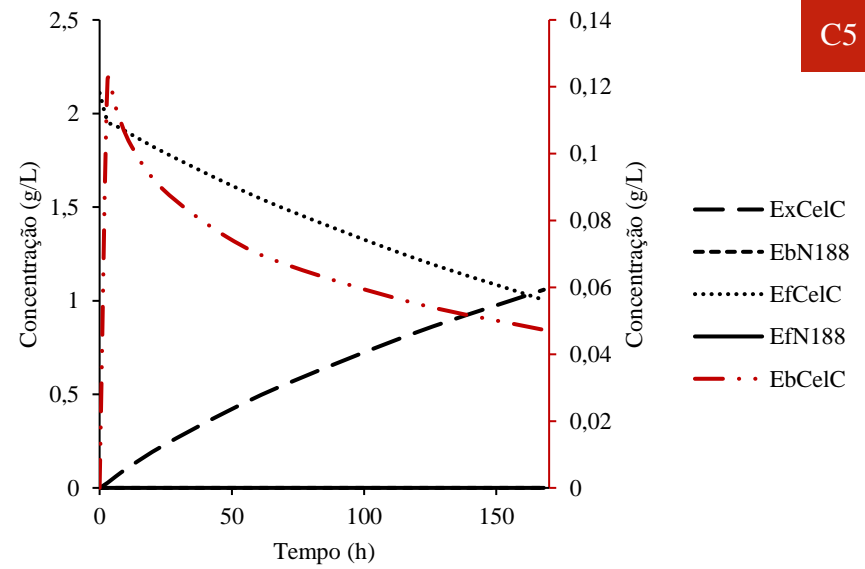
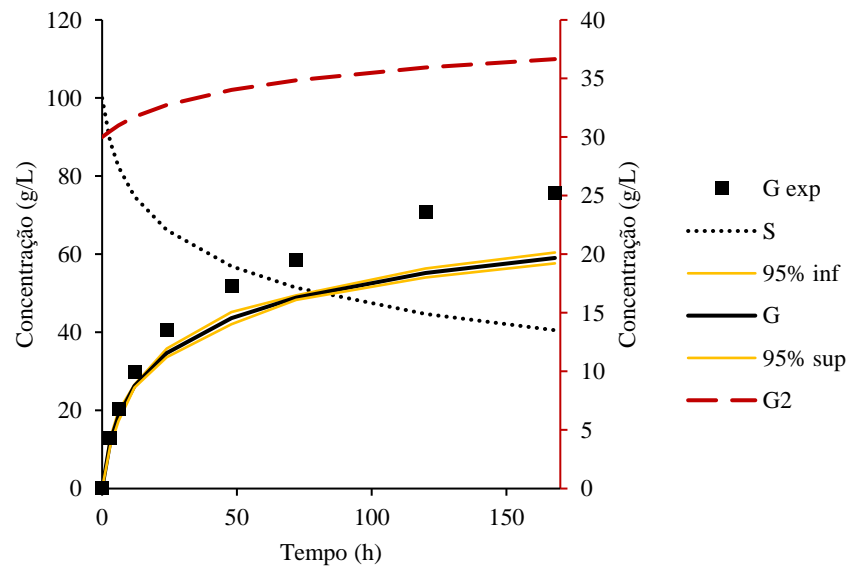
C2



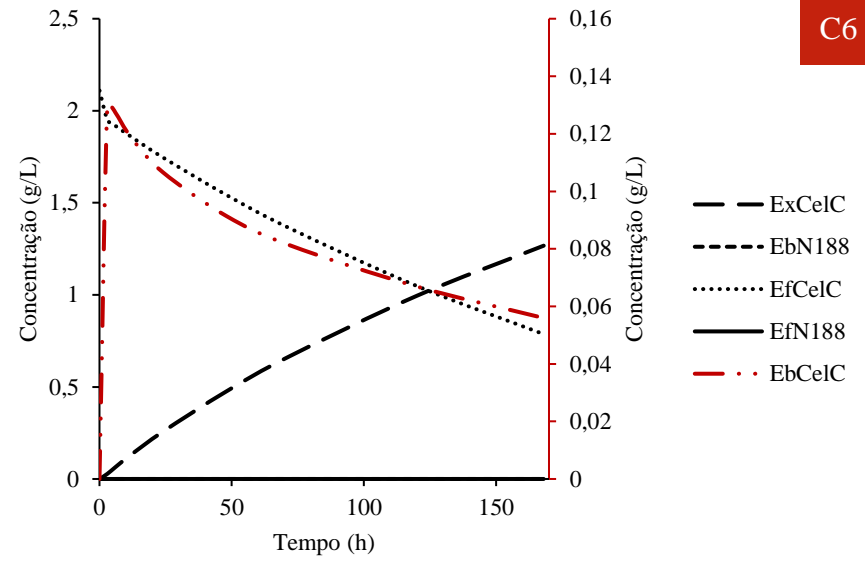
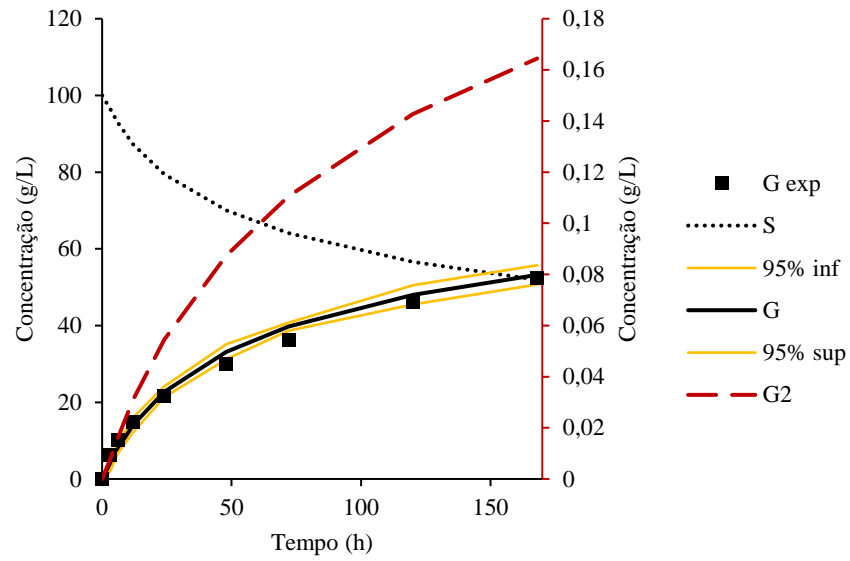
C3



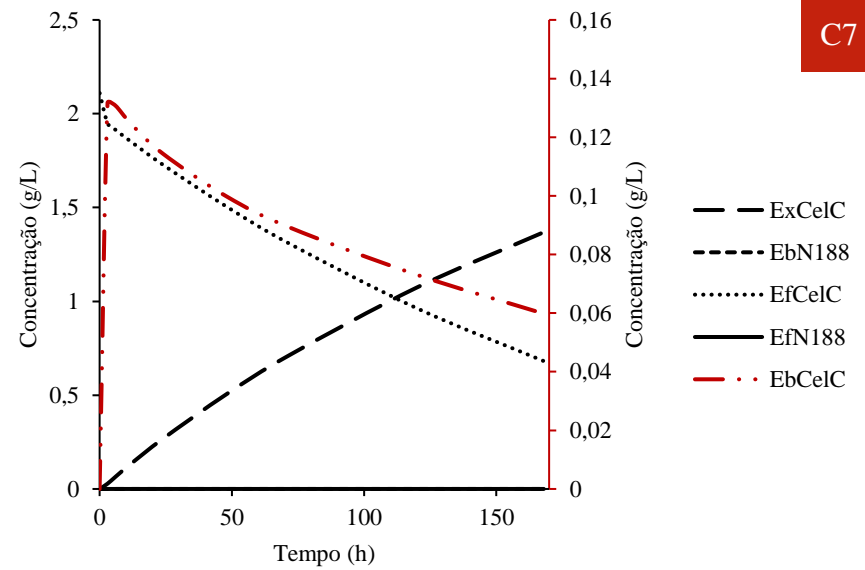
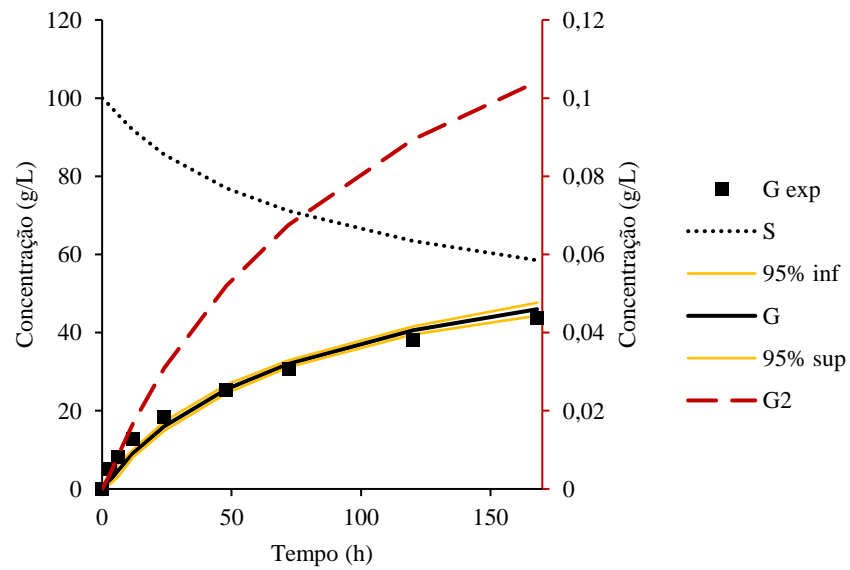
C4



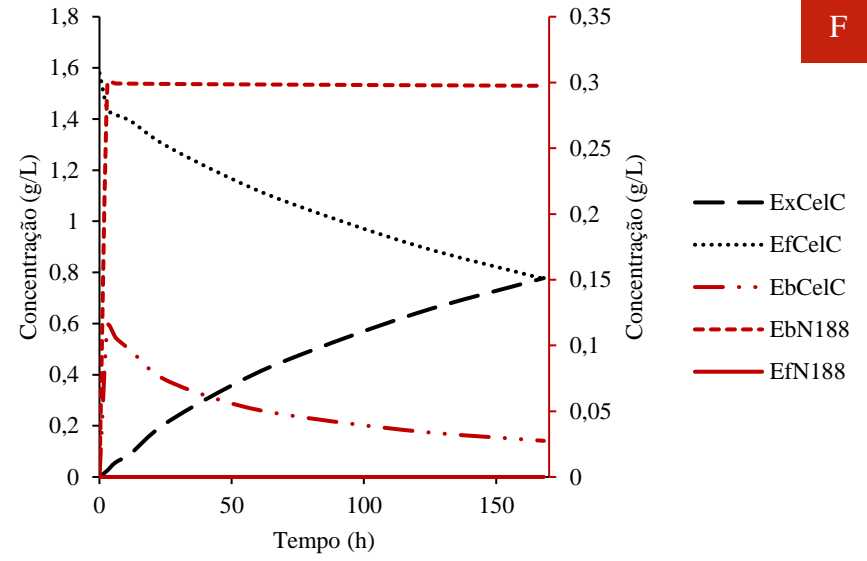
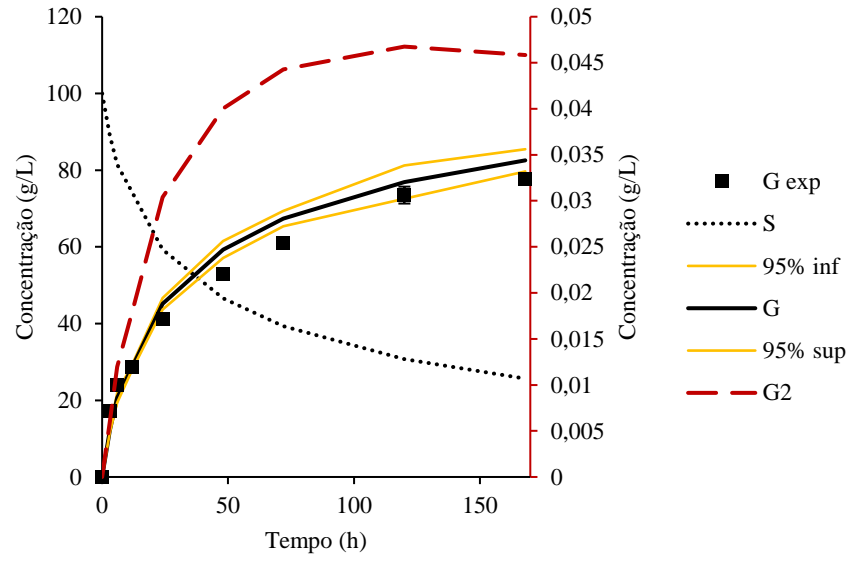
C5



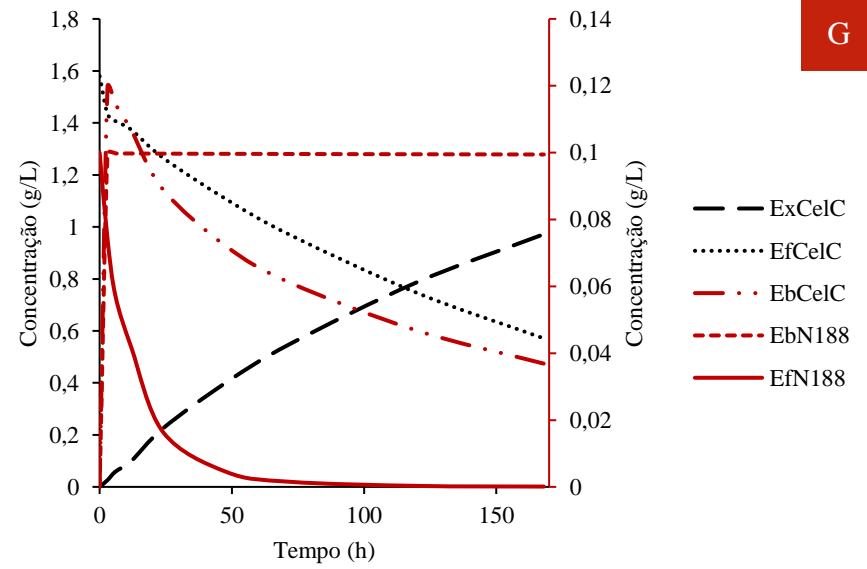
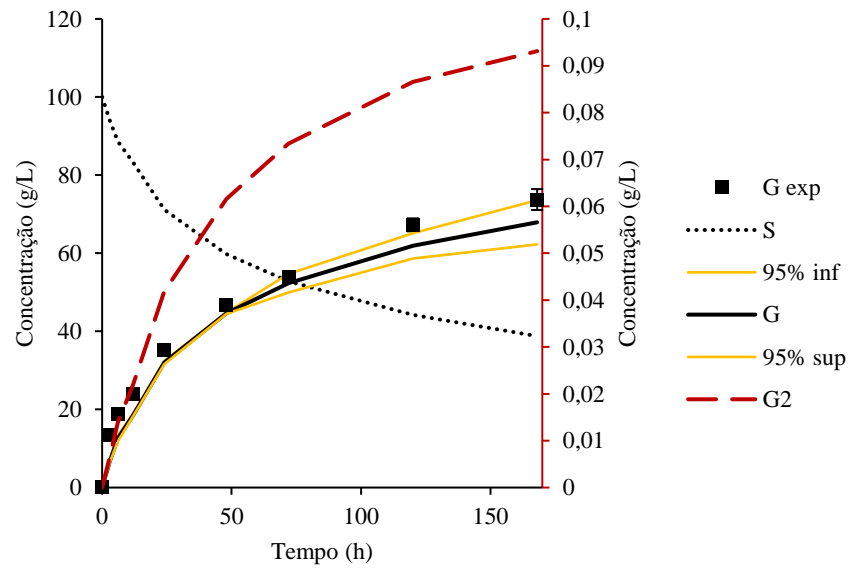
C6



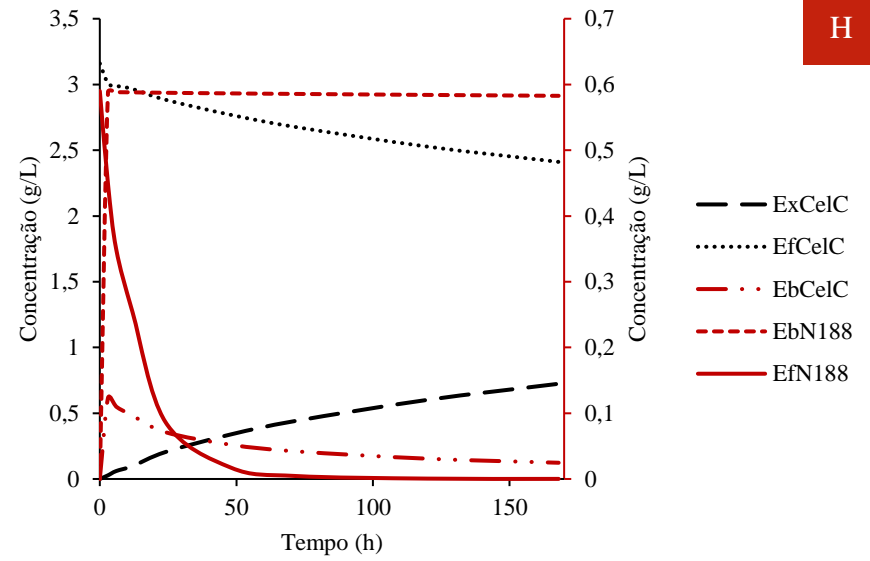
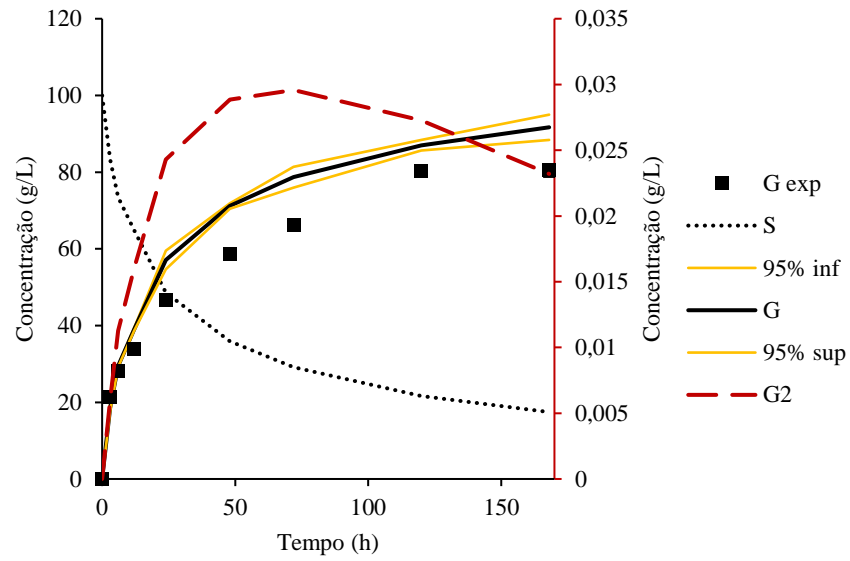
C7



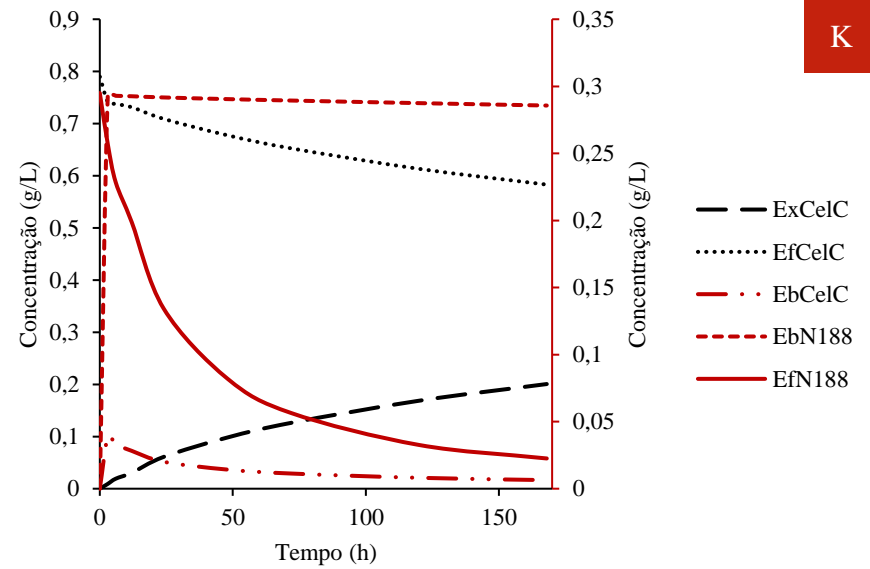
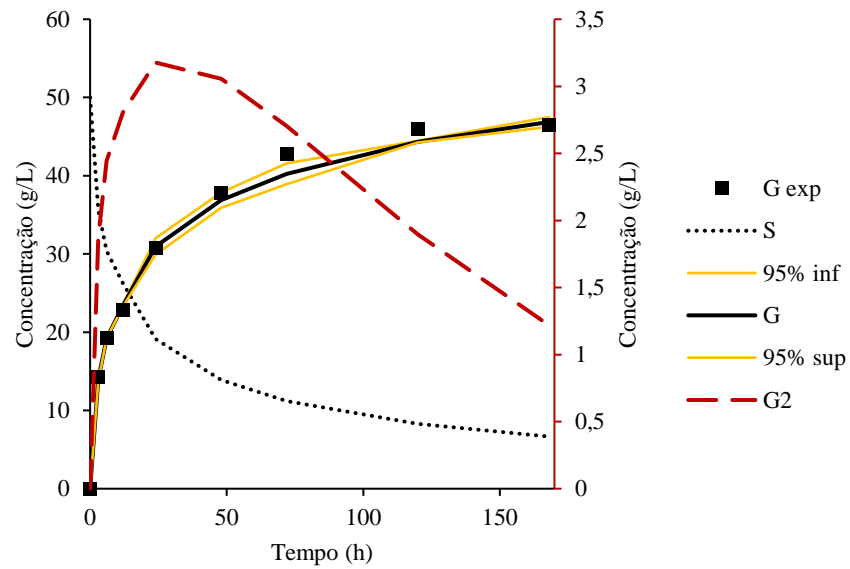
F



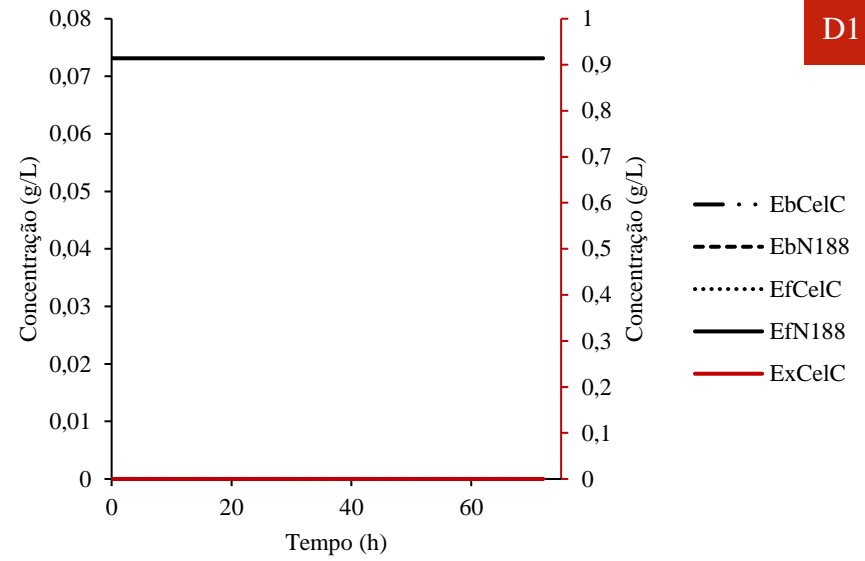
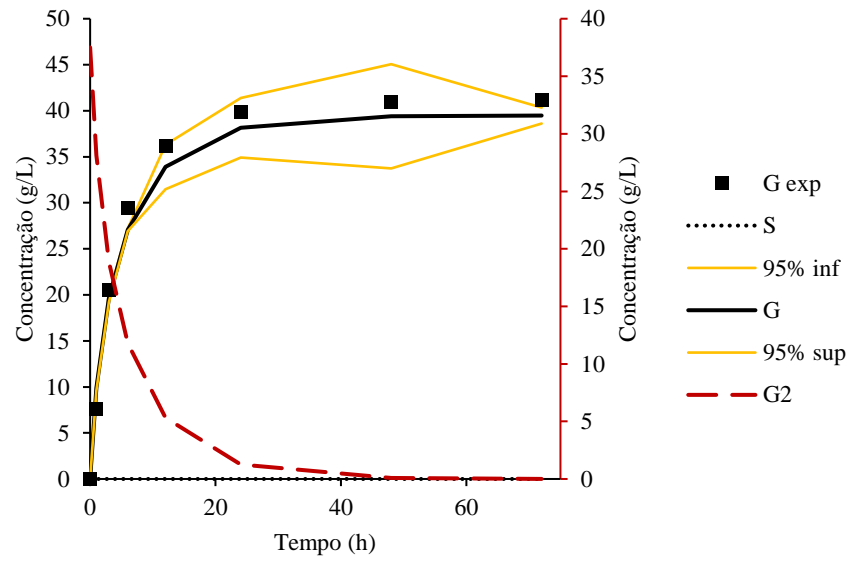
G



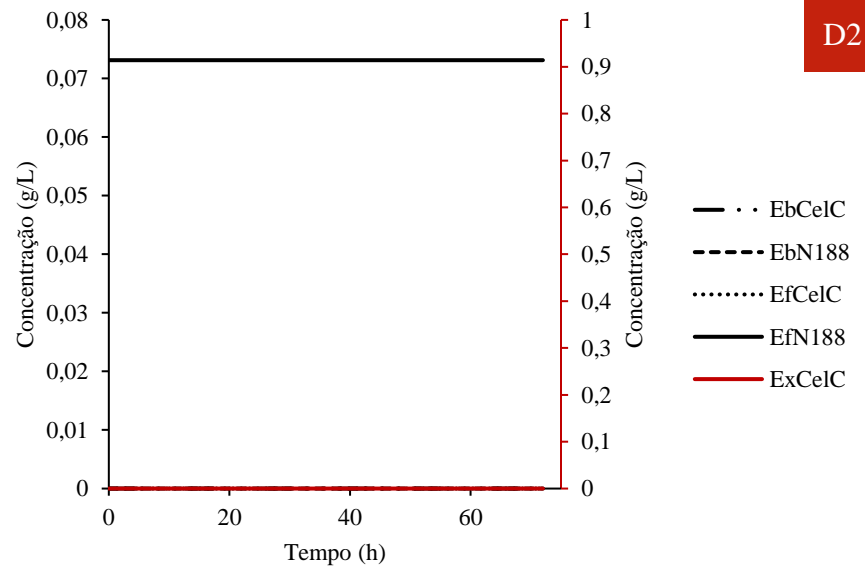
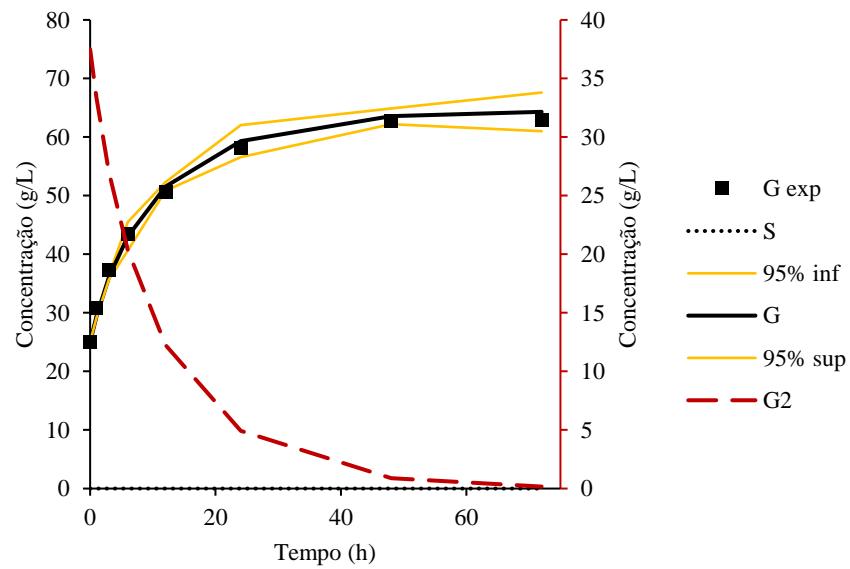
H



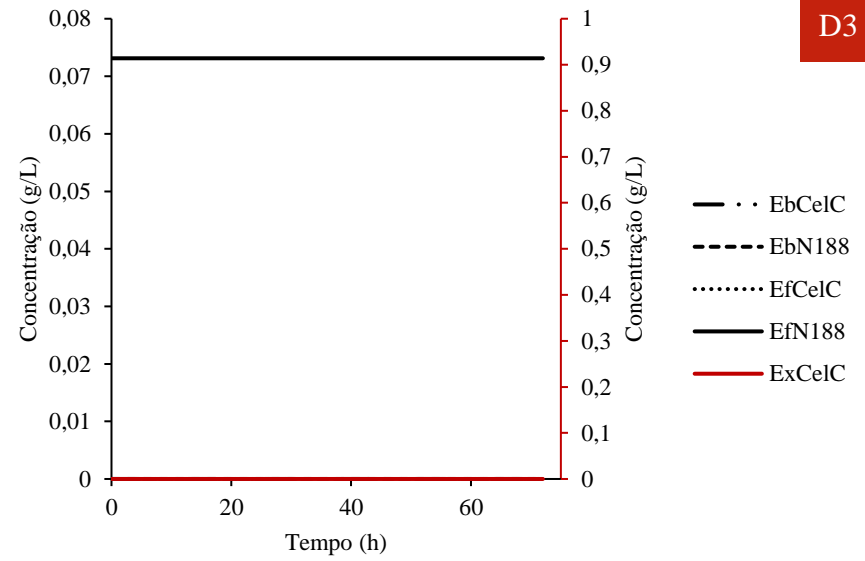
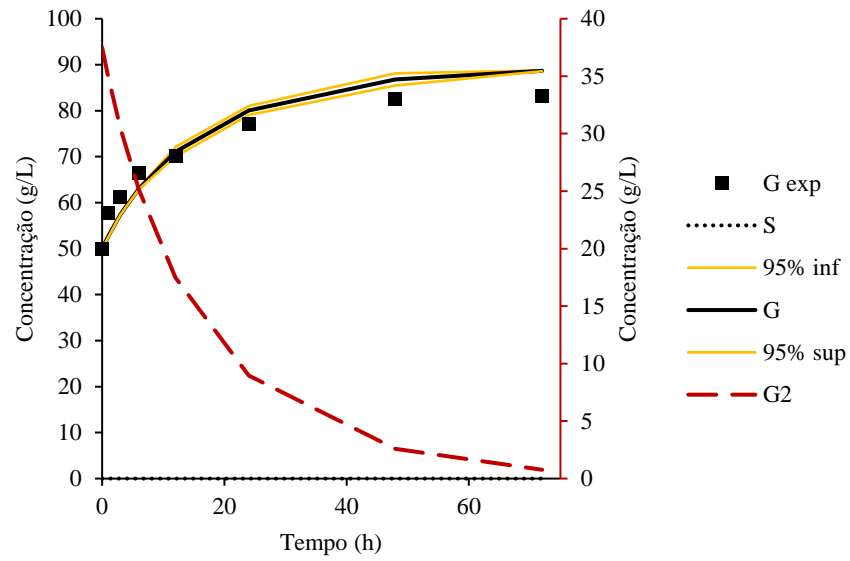
K



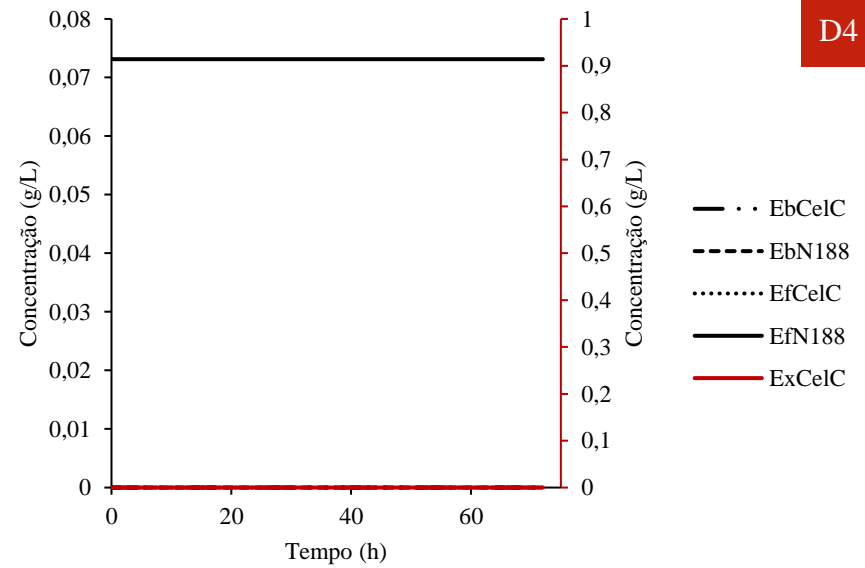
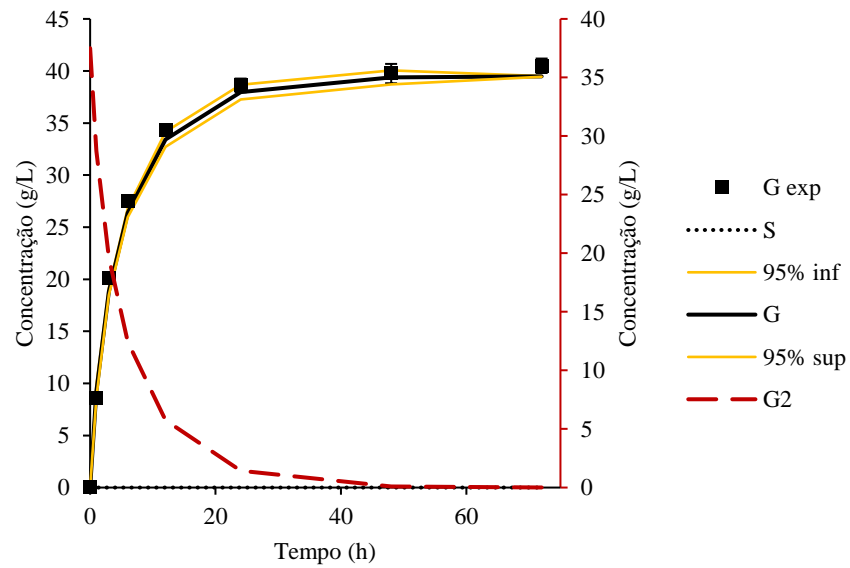
D1



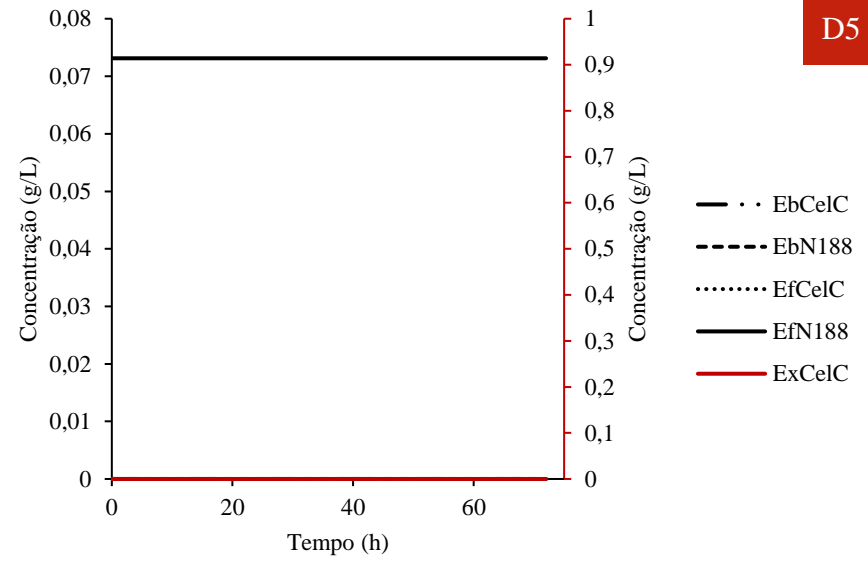
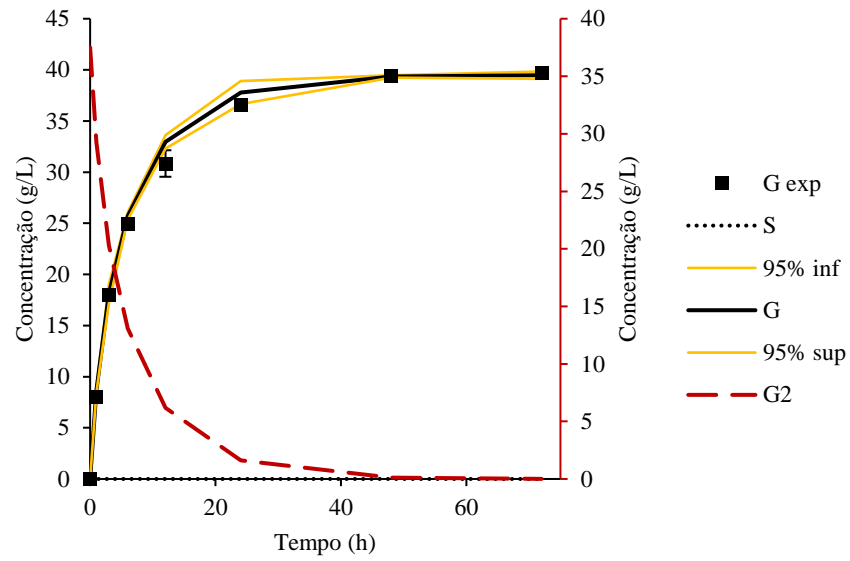
D2



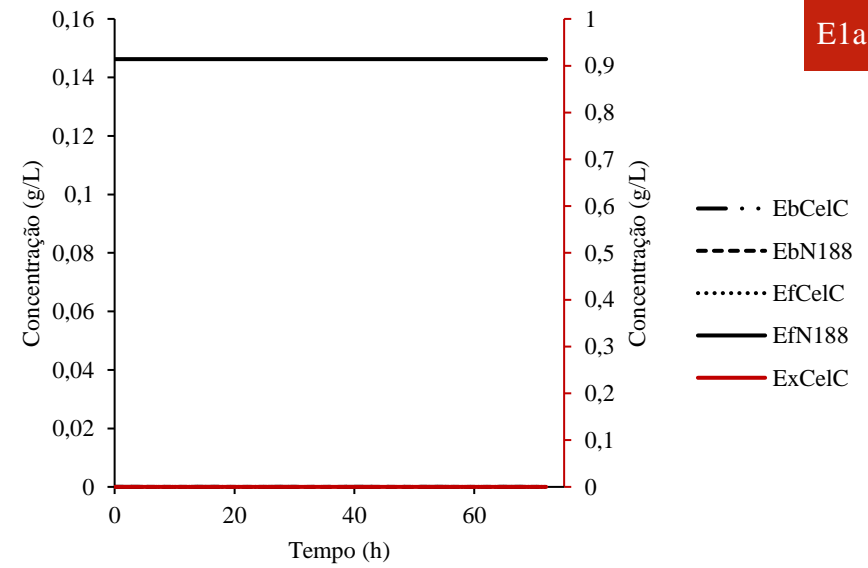
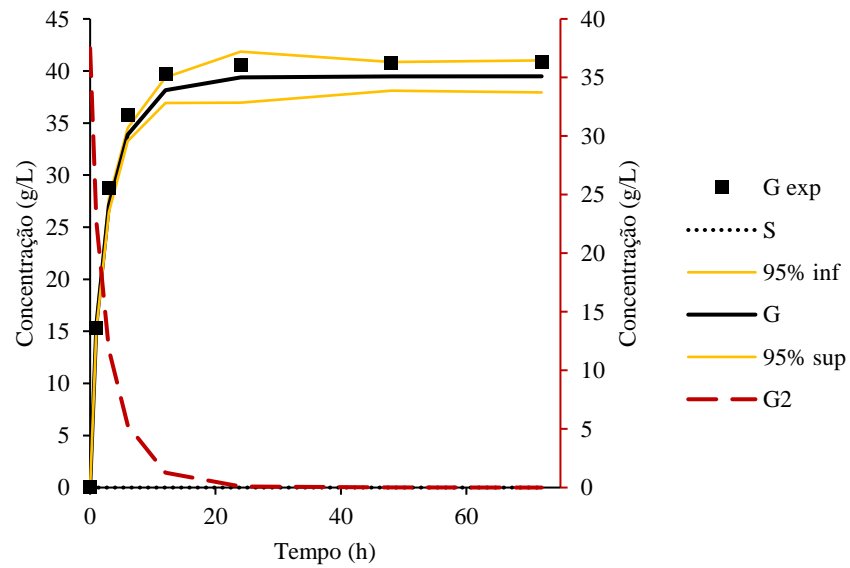
D3



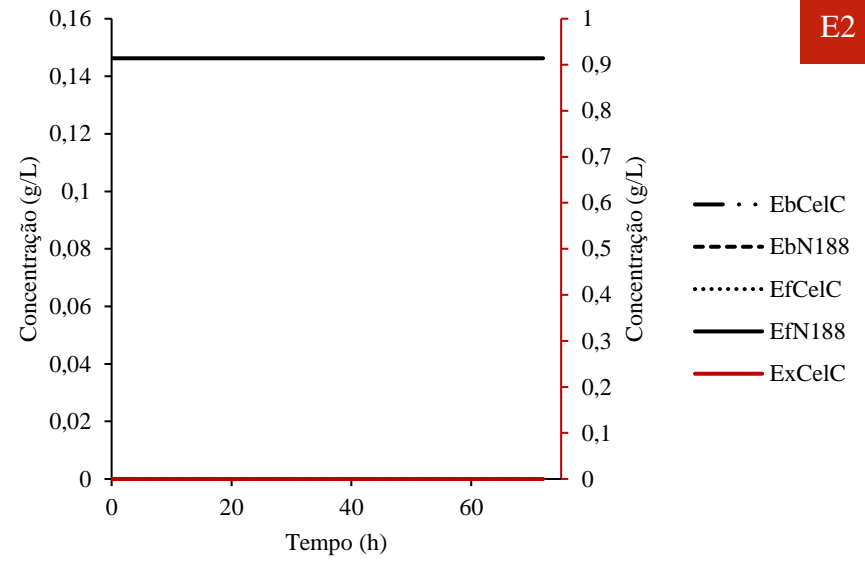
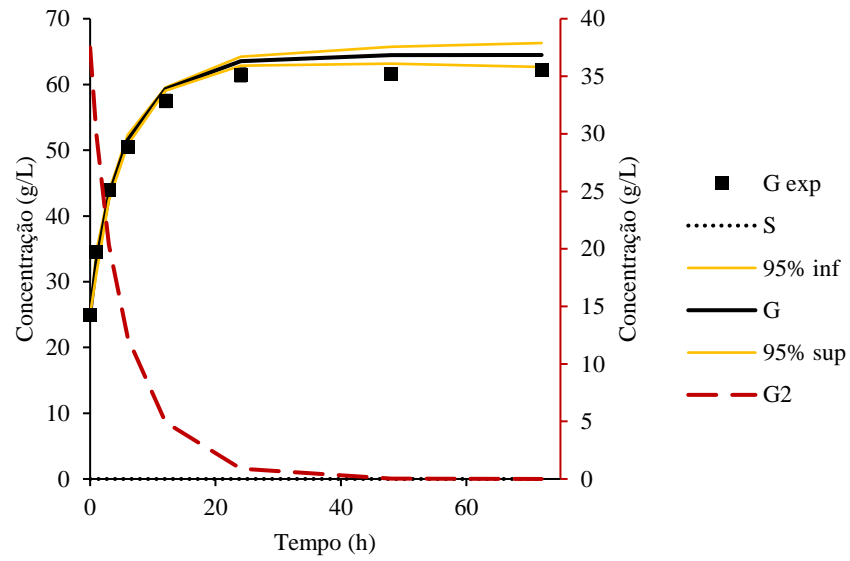
D4



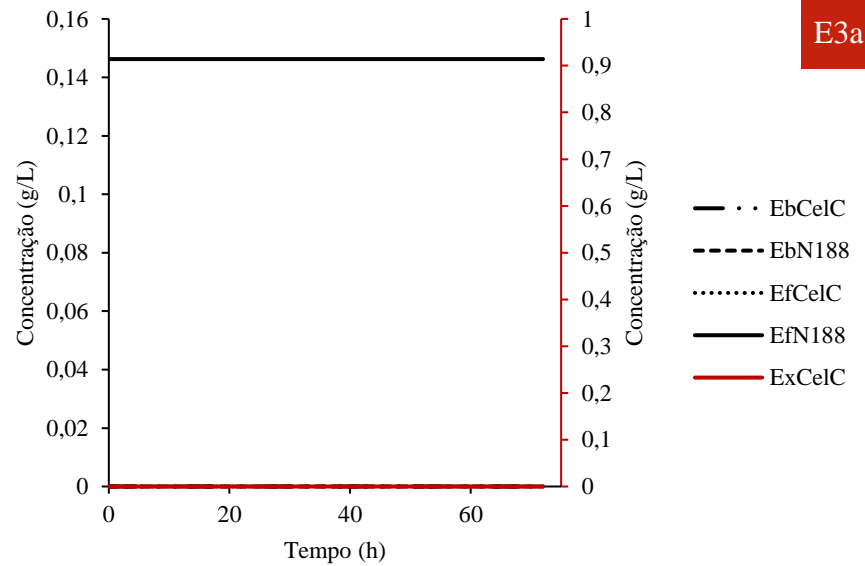
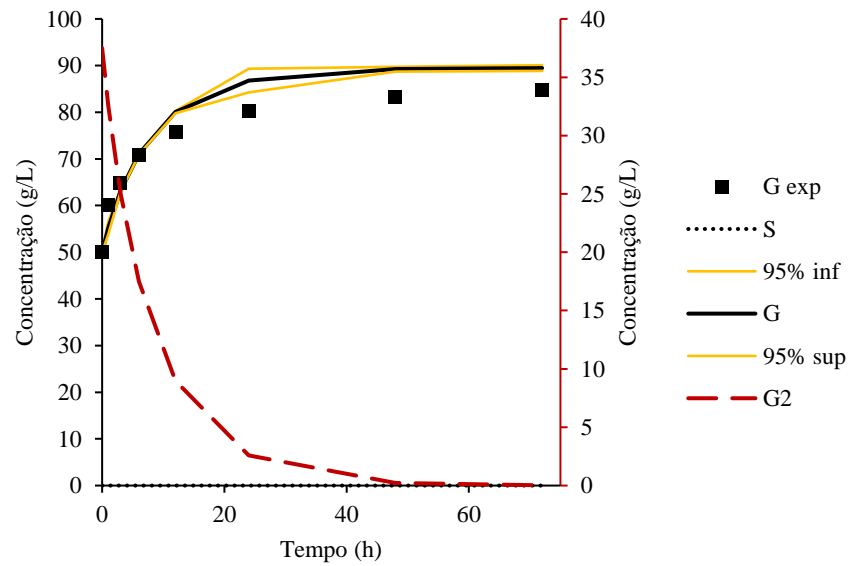
D5



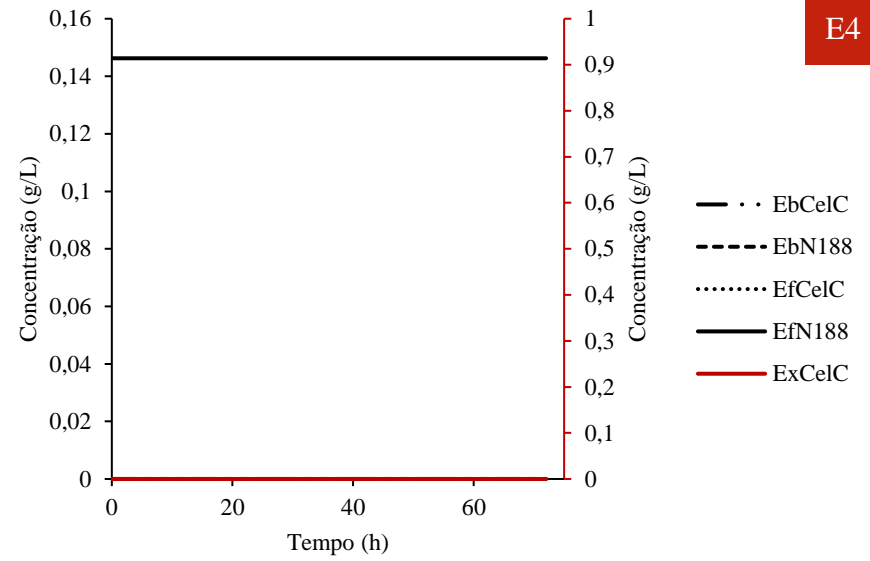
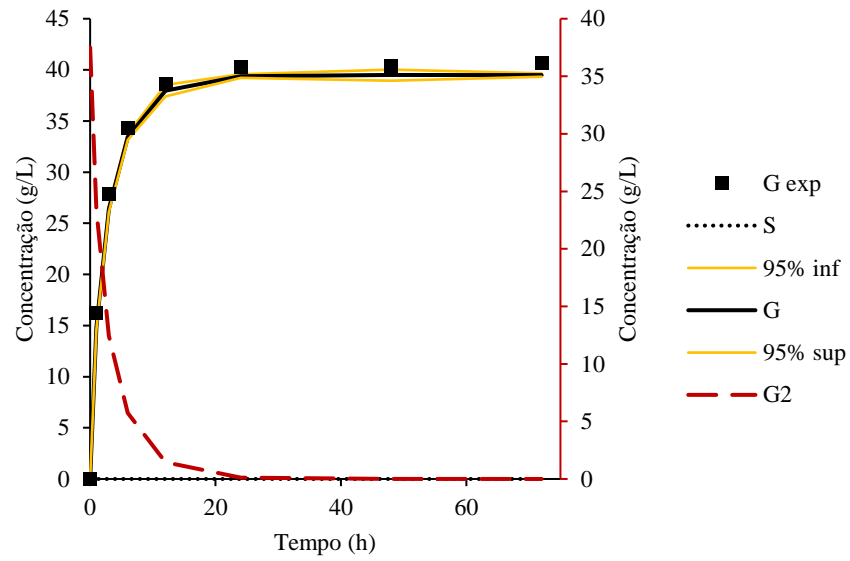
E1a



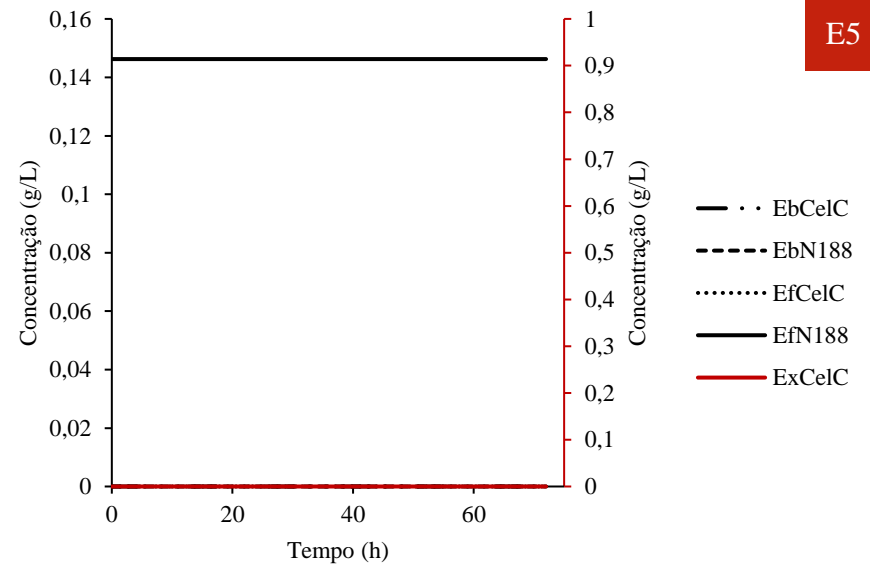
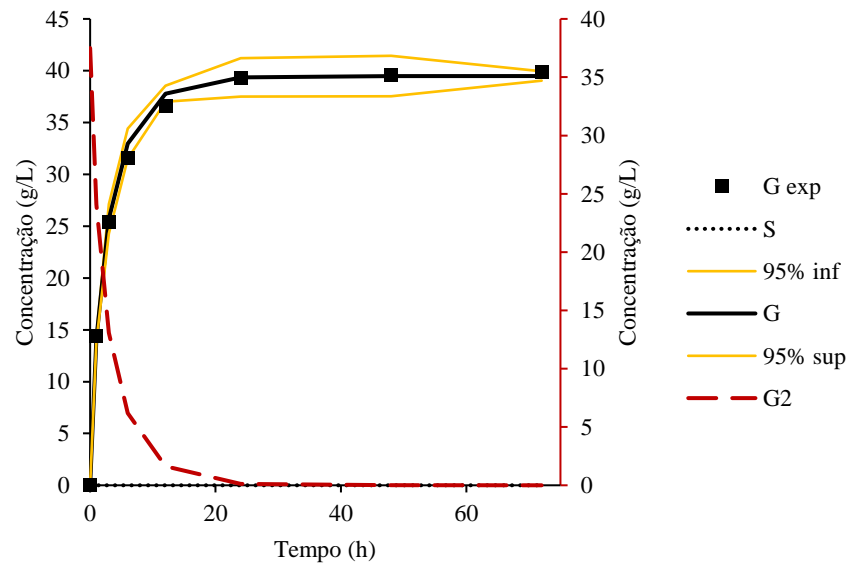
E2



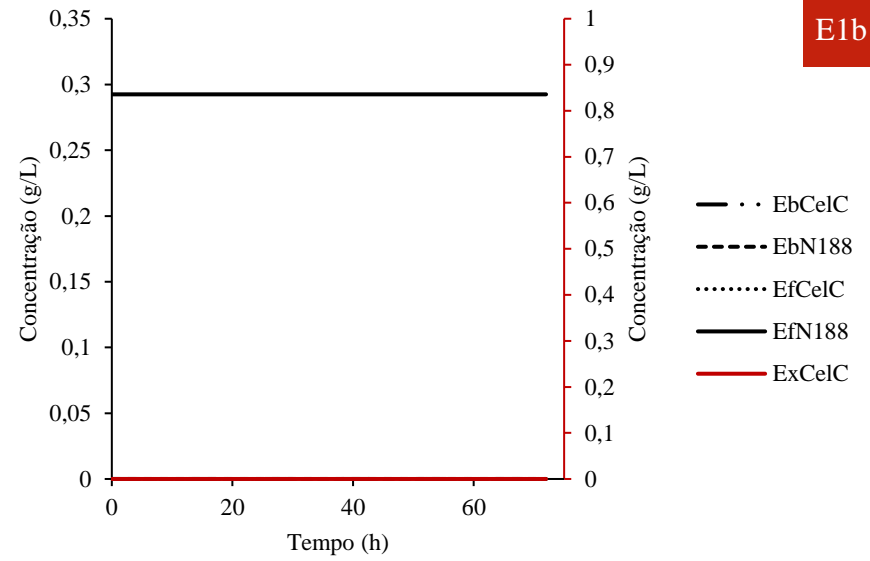
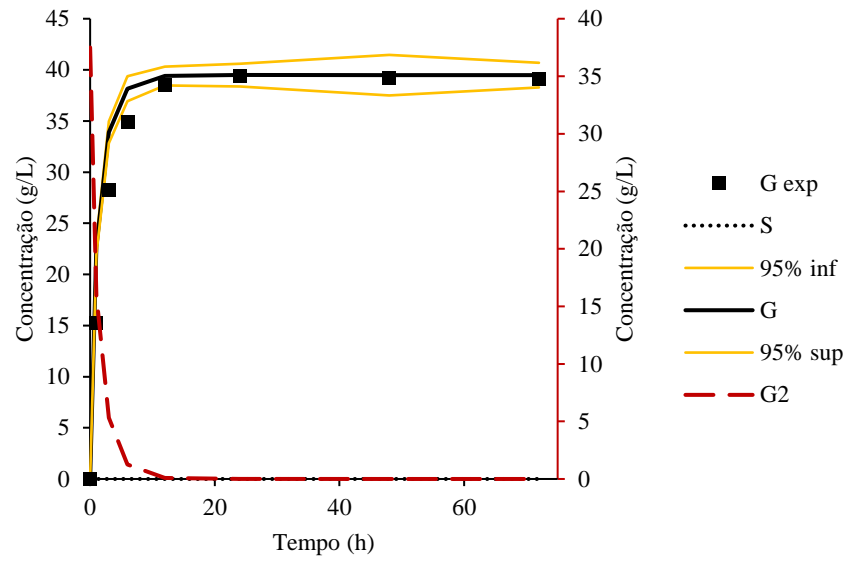
E3a



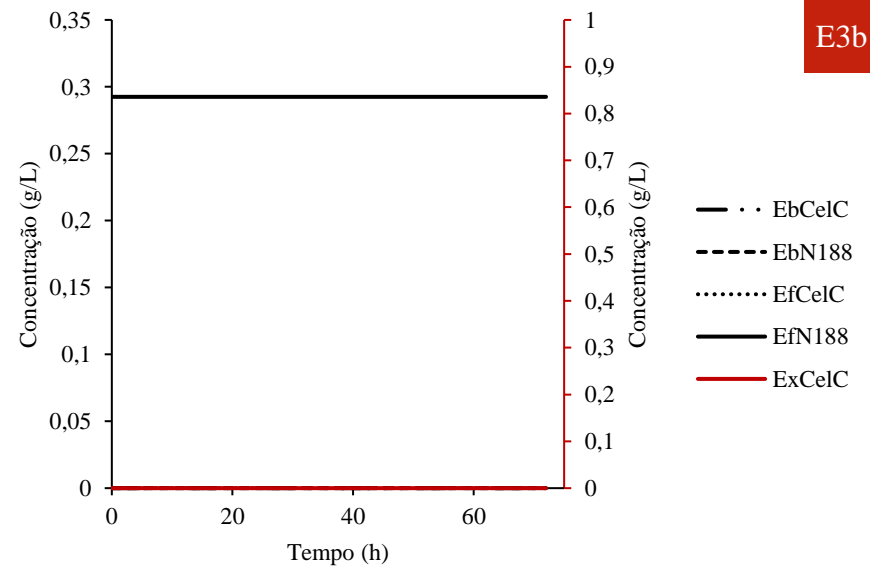
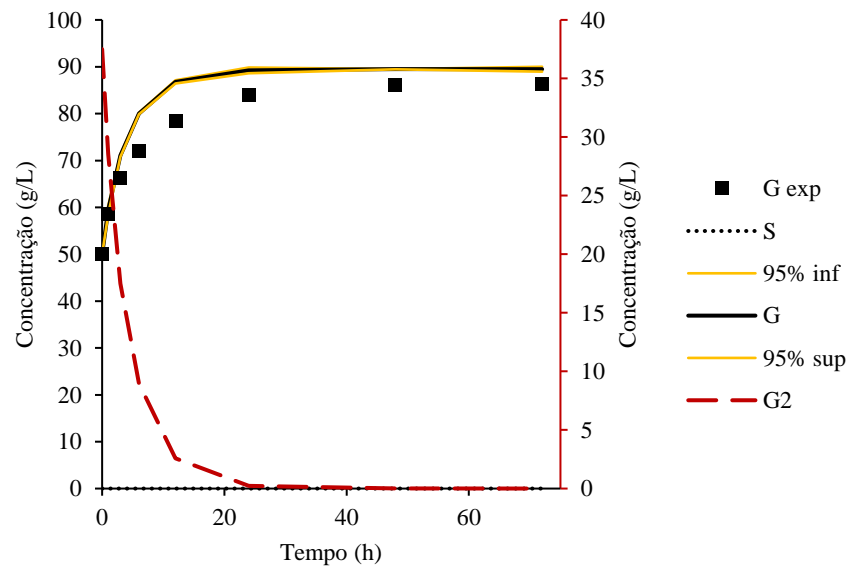
E4



E5

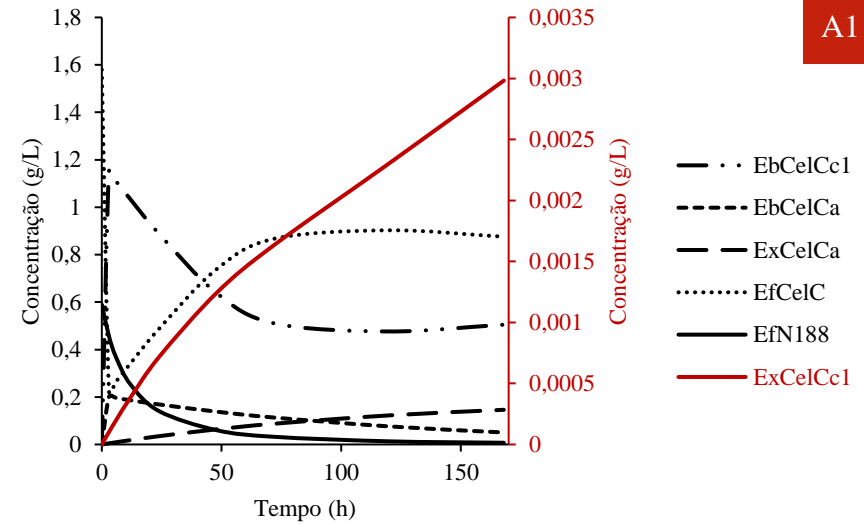
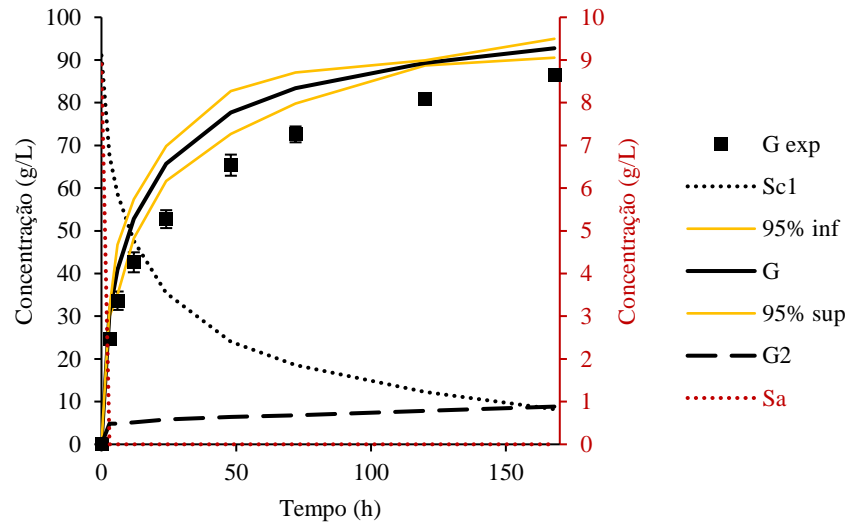


E1b

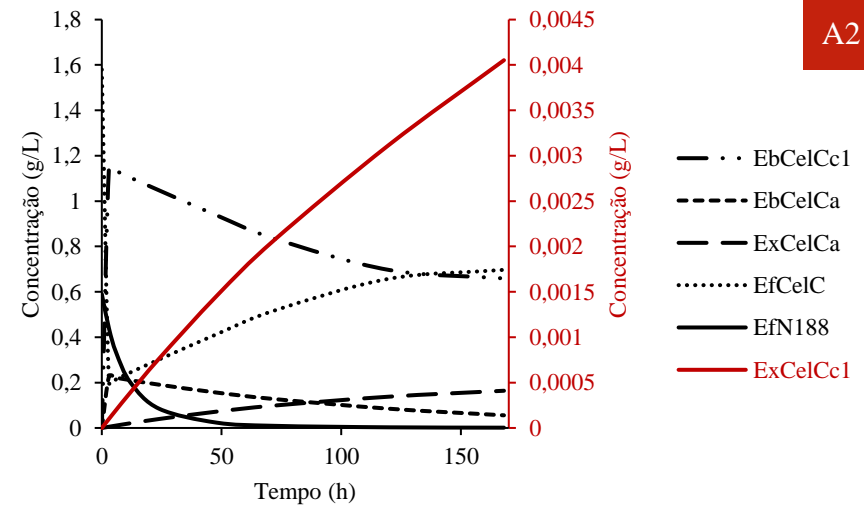
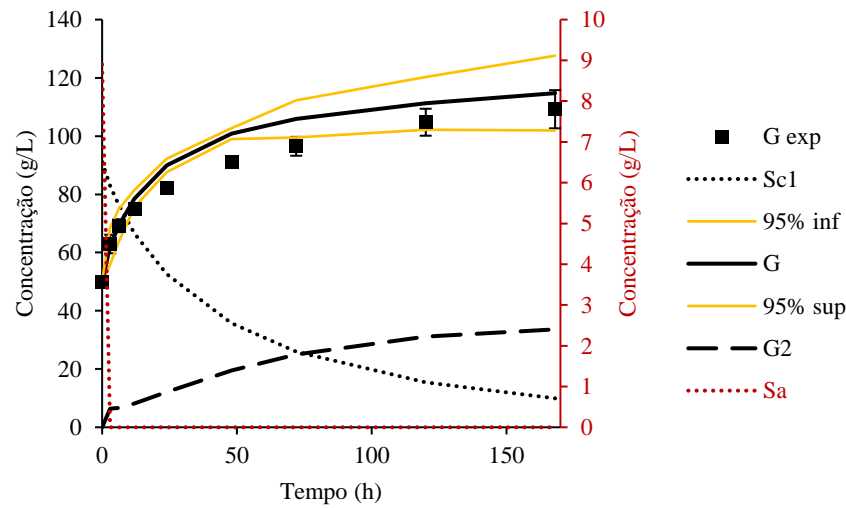


E3b

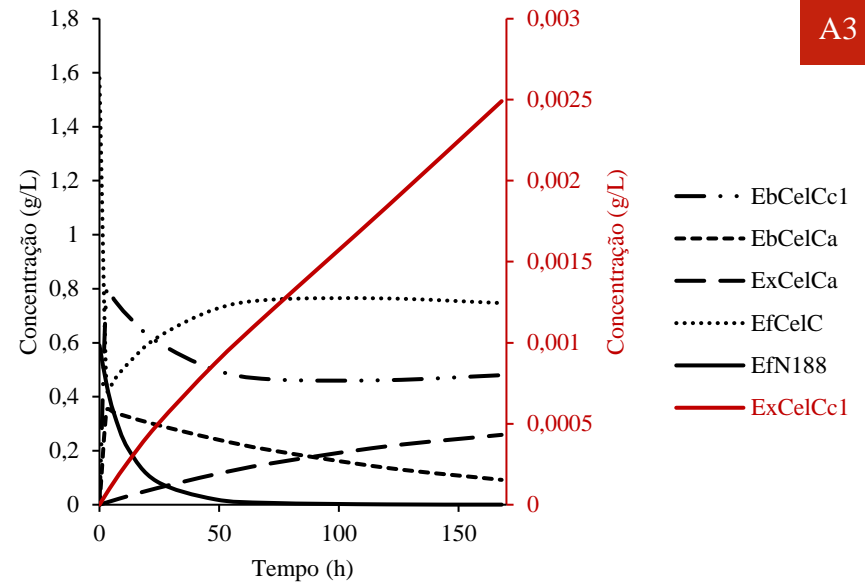
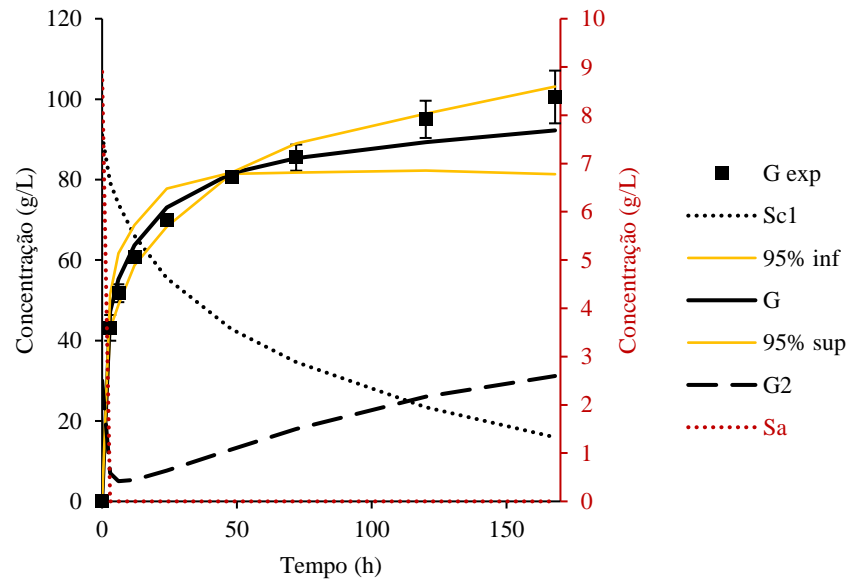
Anexo VII – Resultados da estimação do modelo do Caso 2



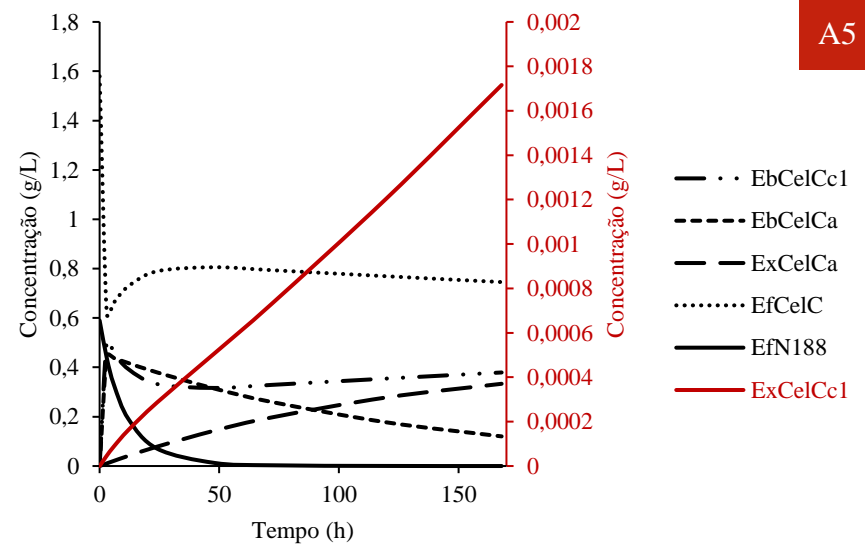
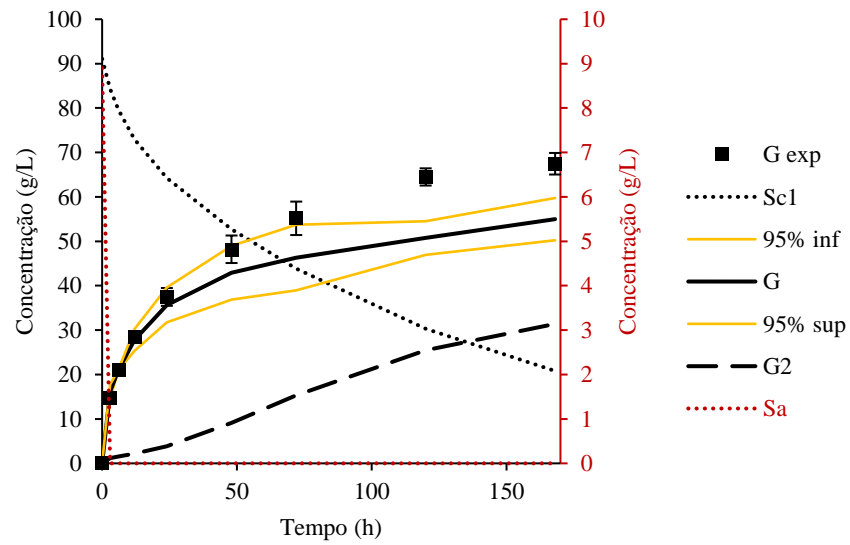
A1



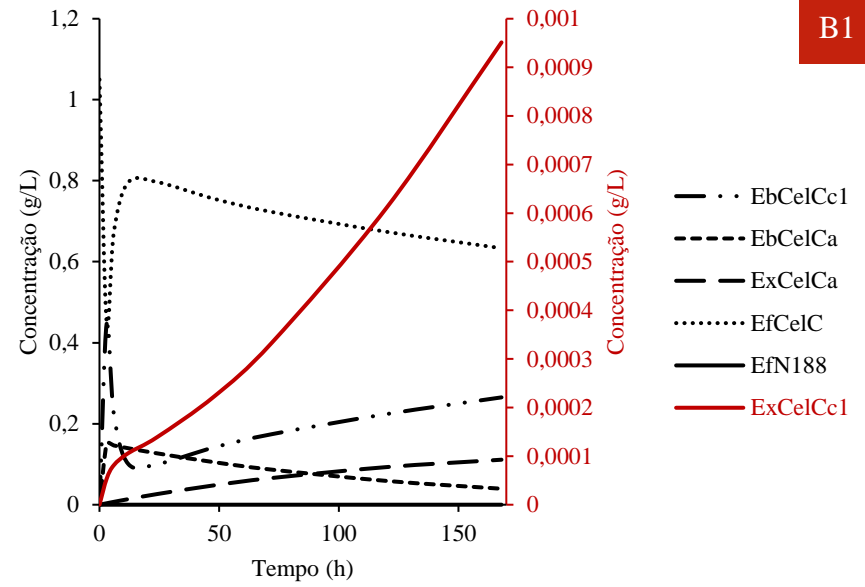
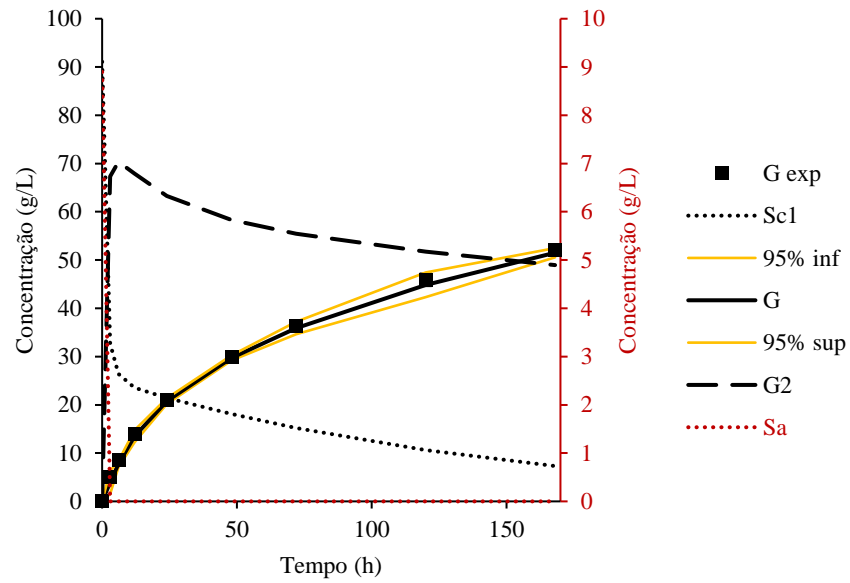
A2



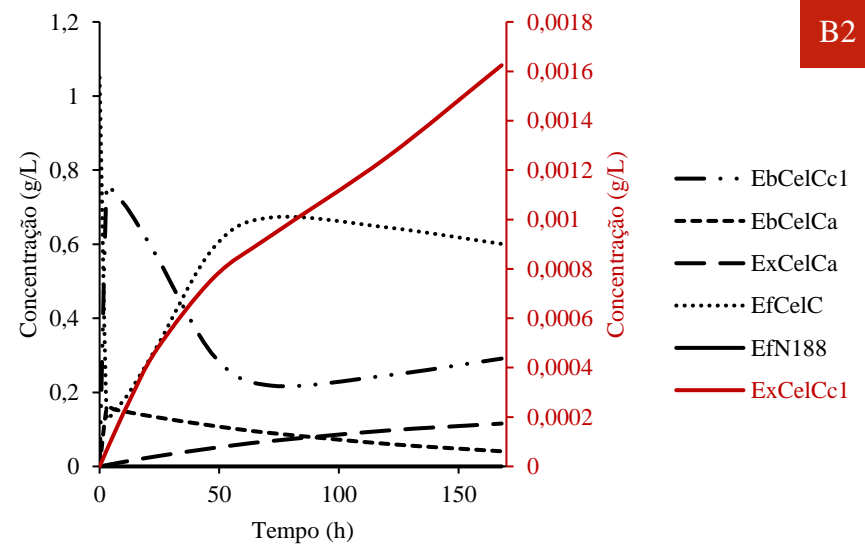
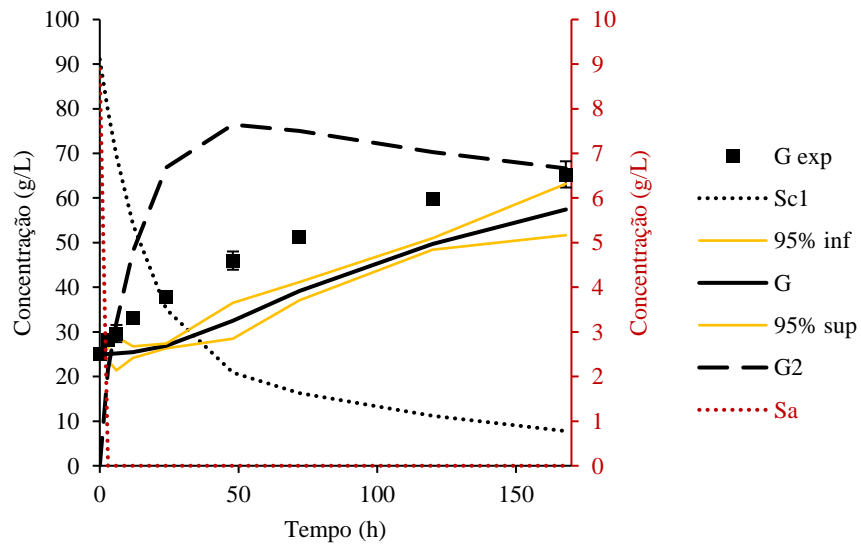
A3



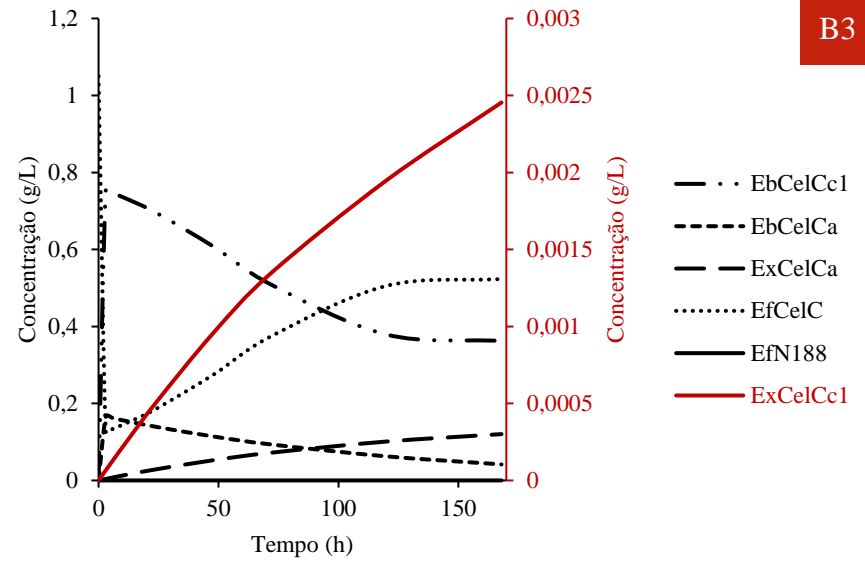
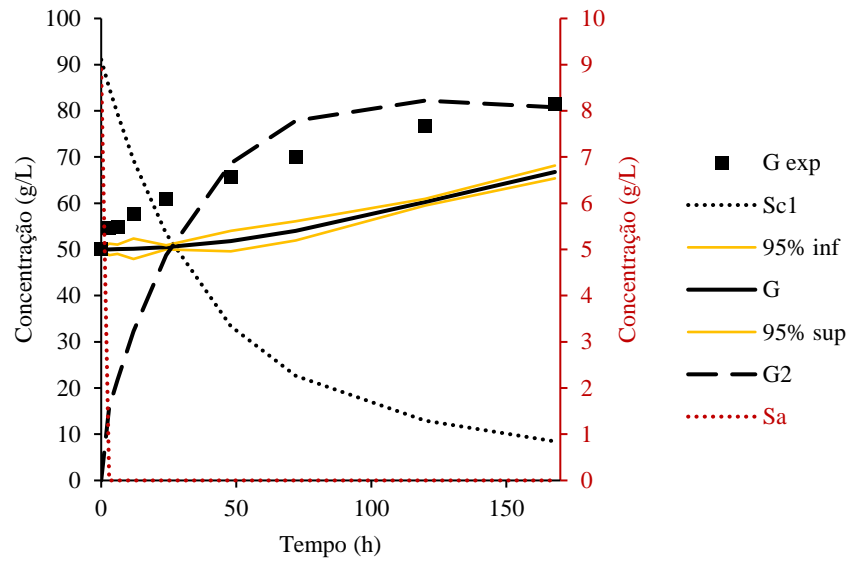
A5



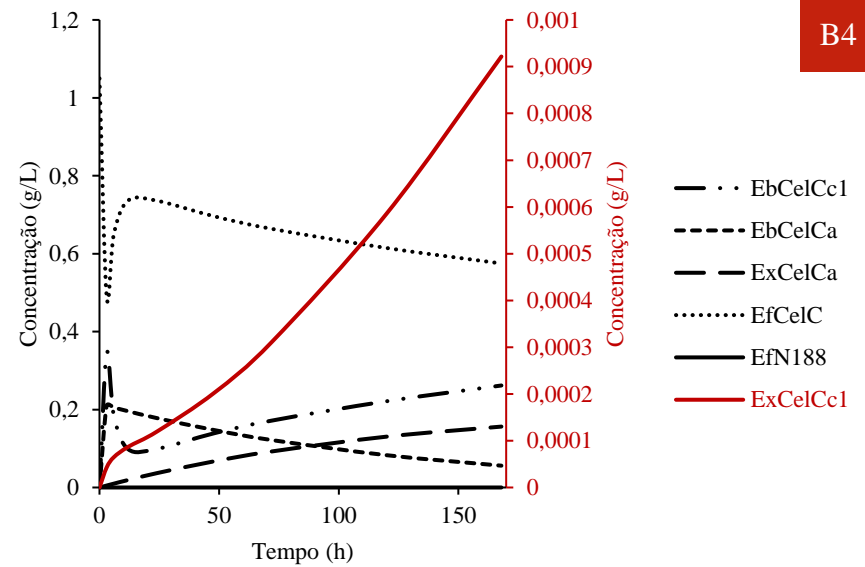
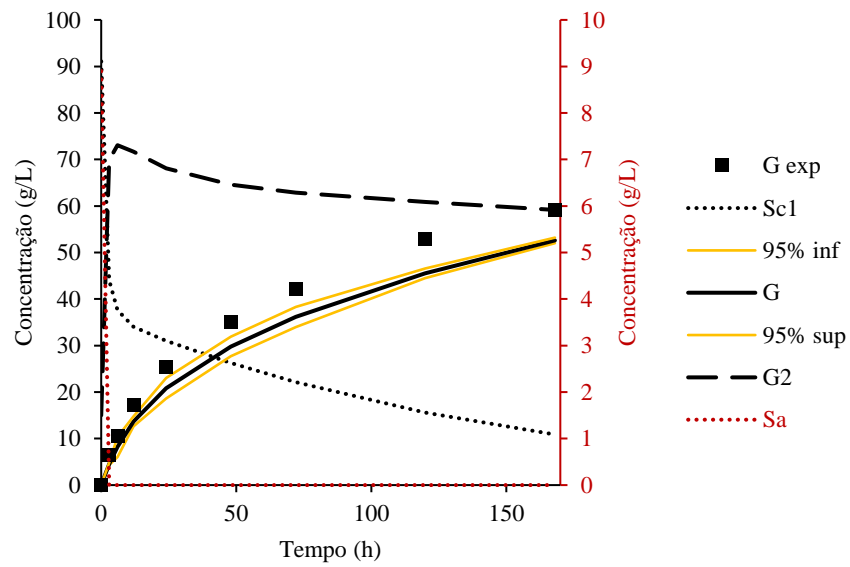
B1



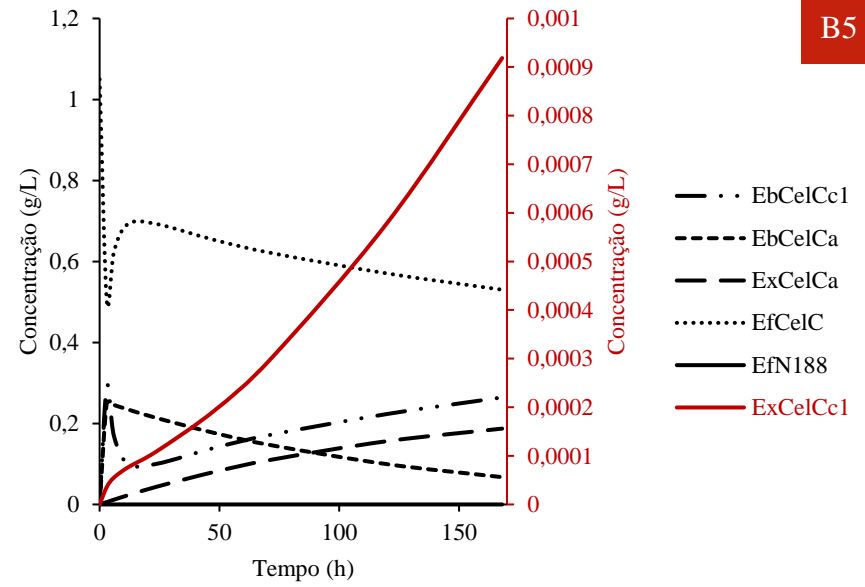
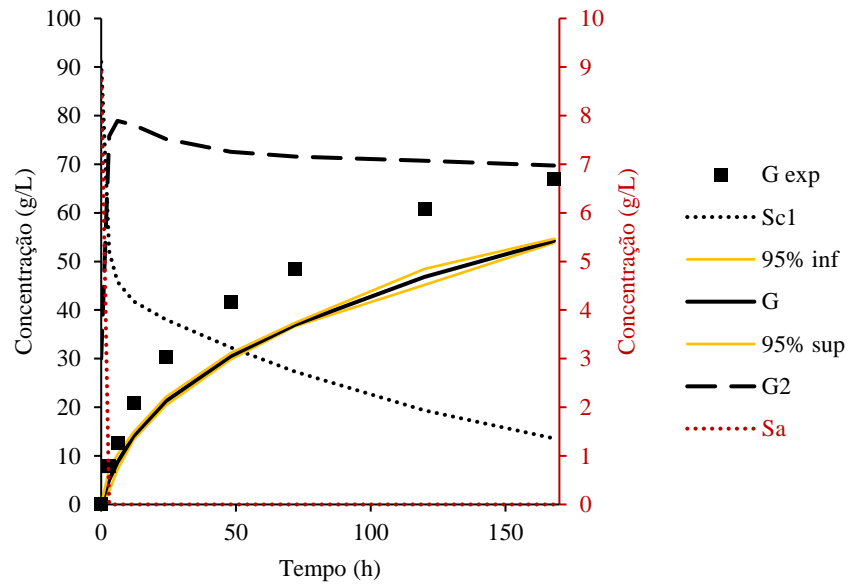
B2



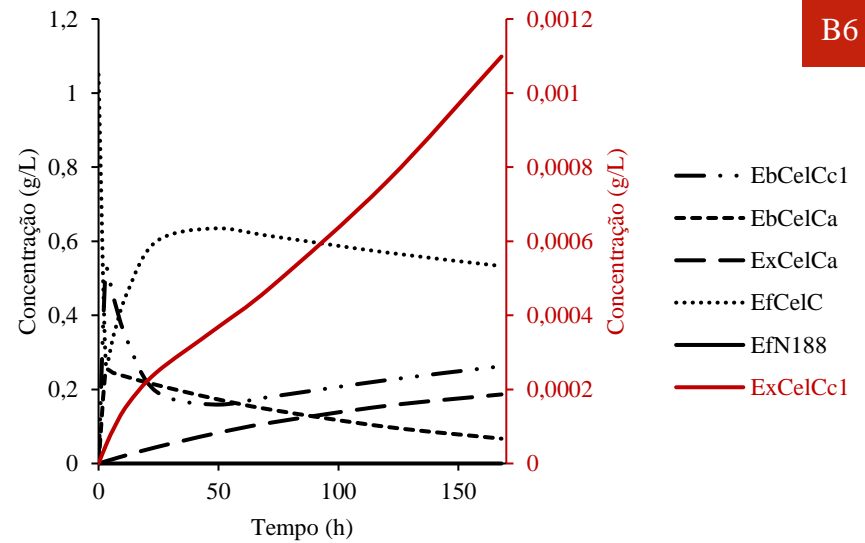
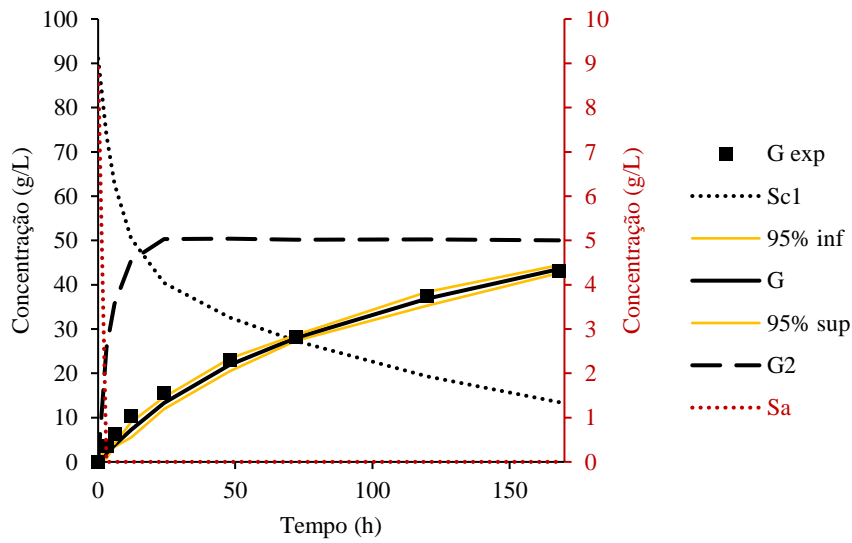
B3



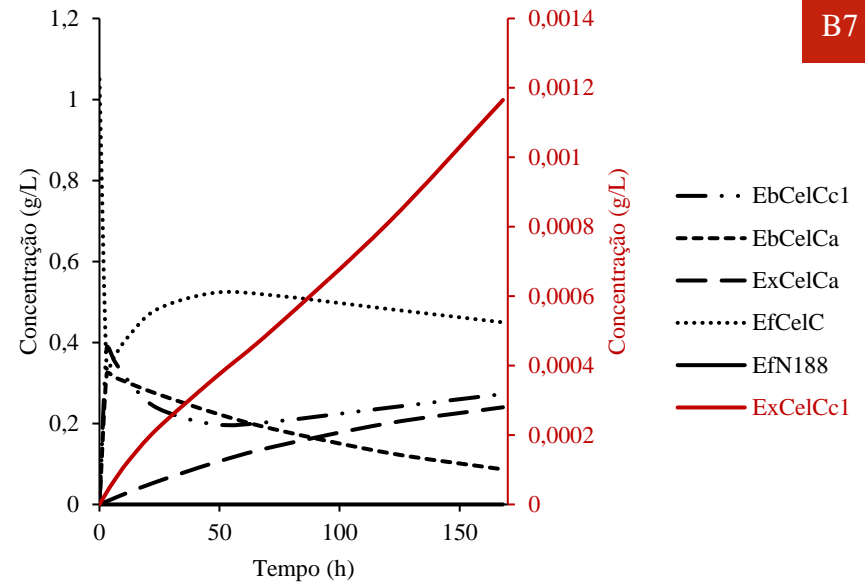
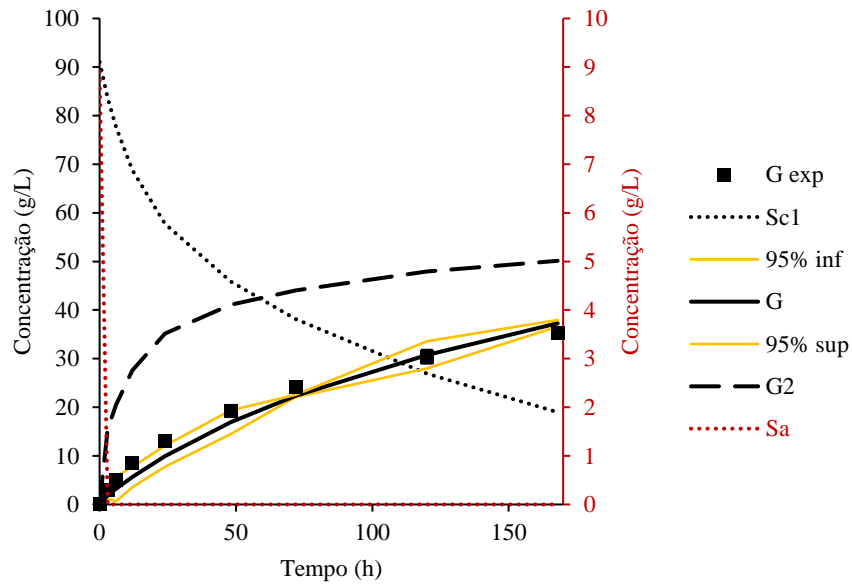
B4



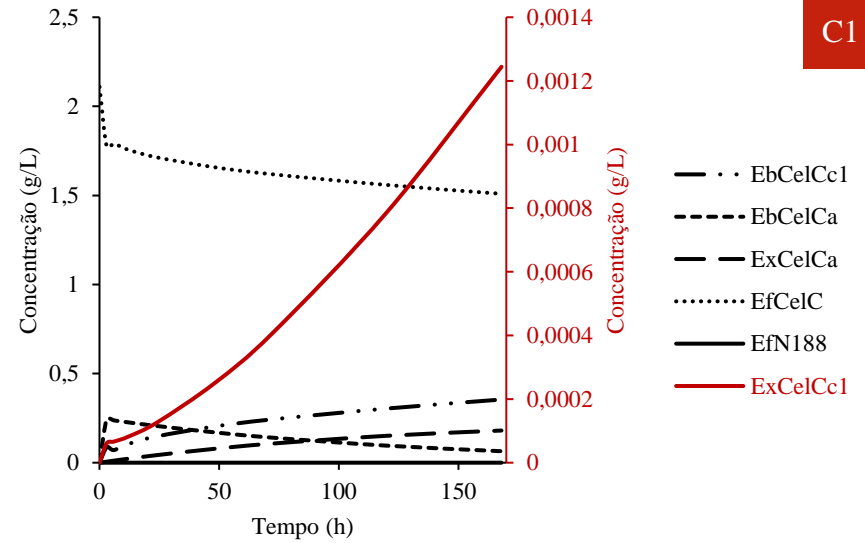
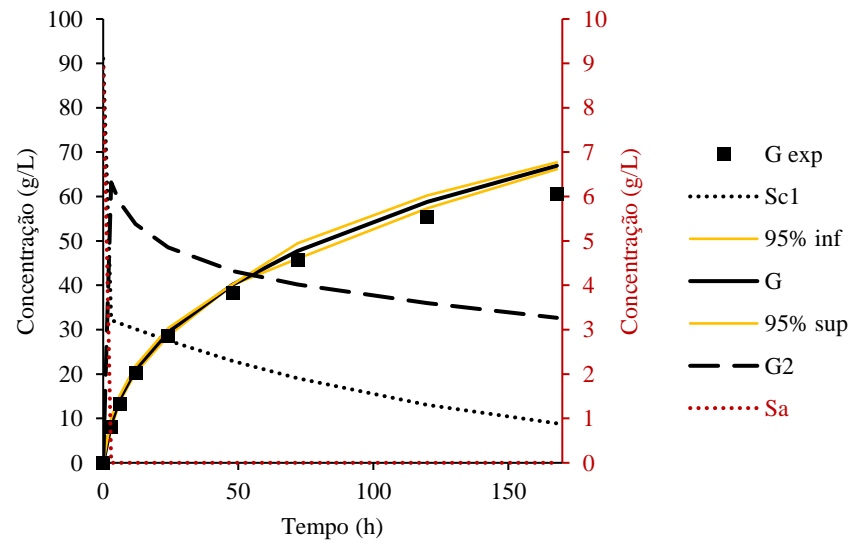
B5



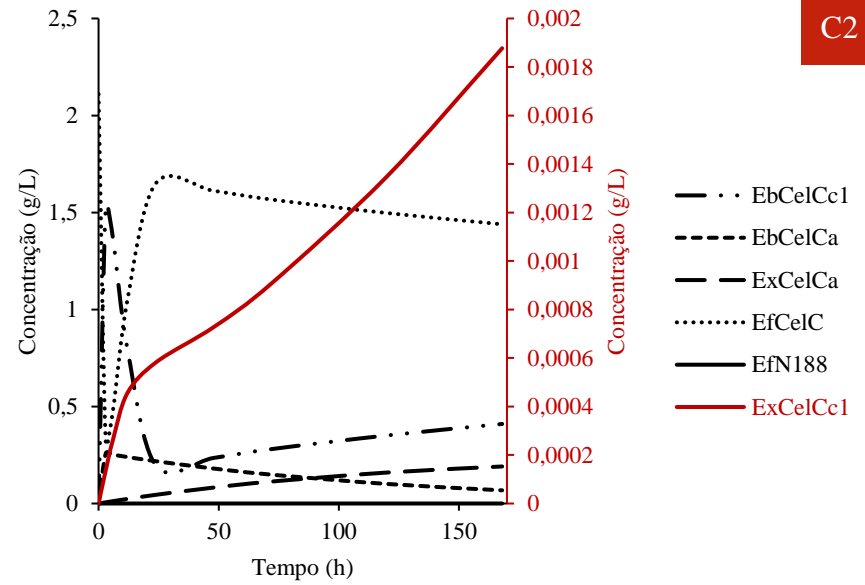
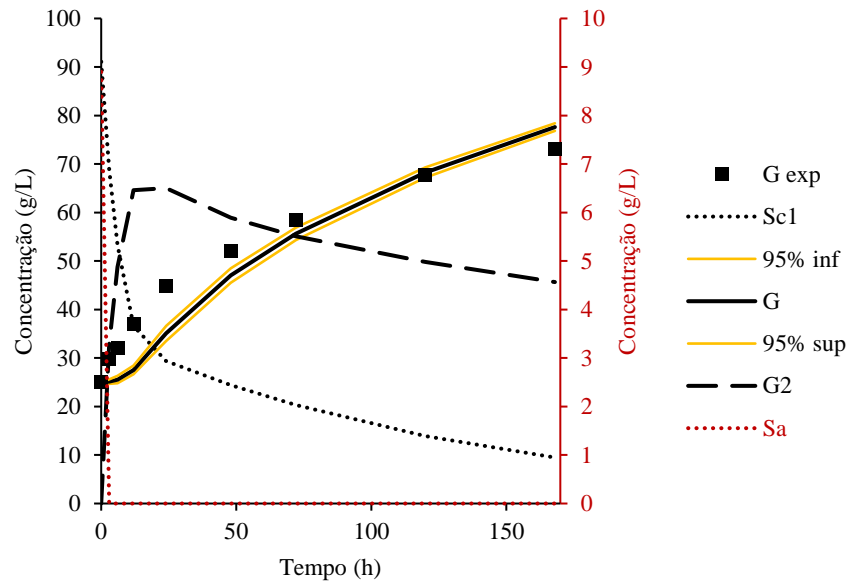
B6



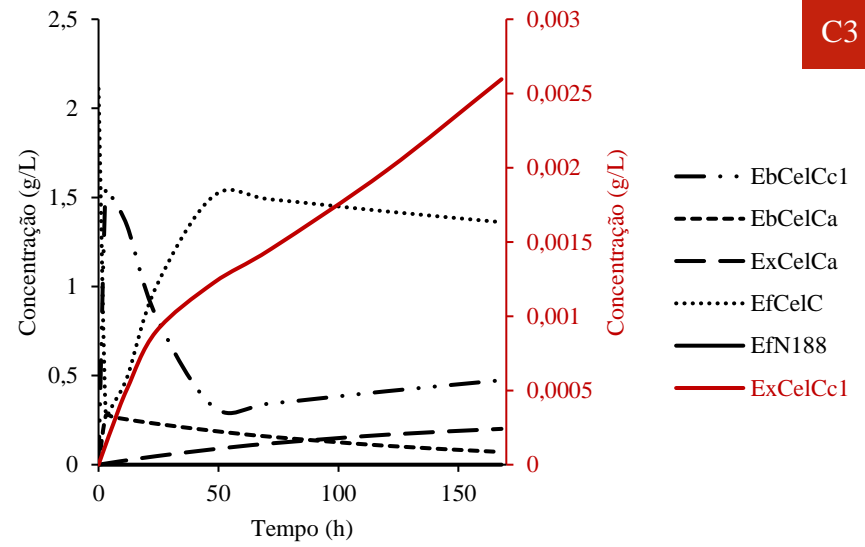
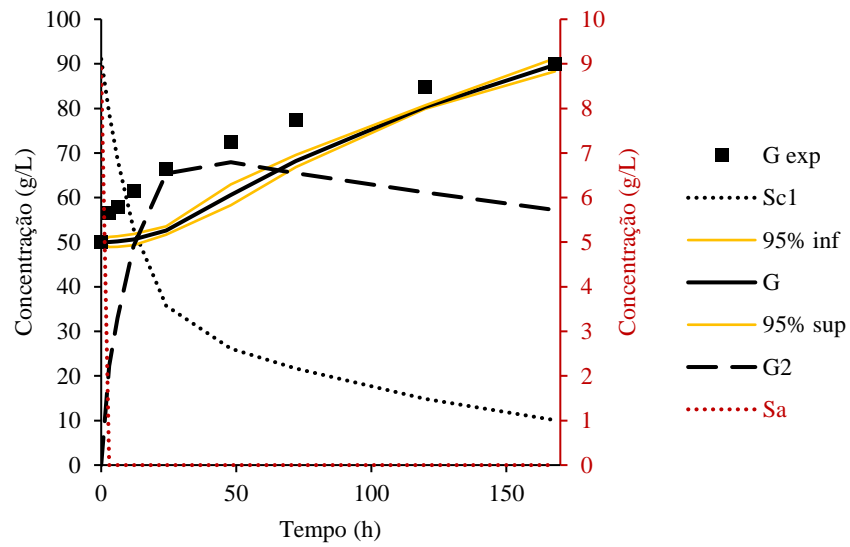
B7



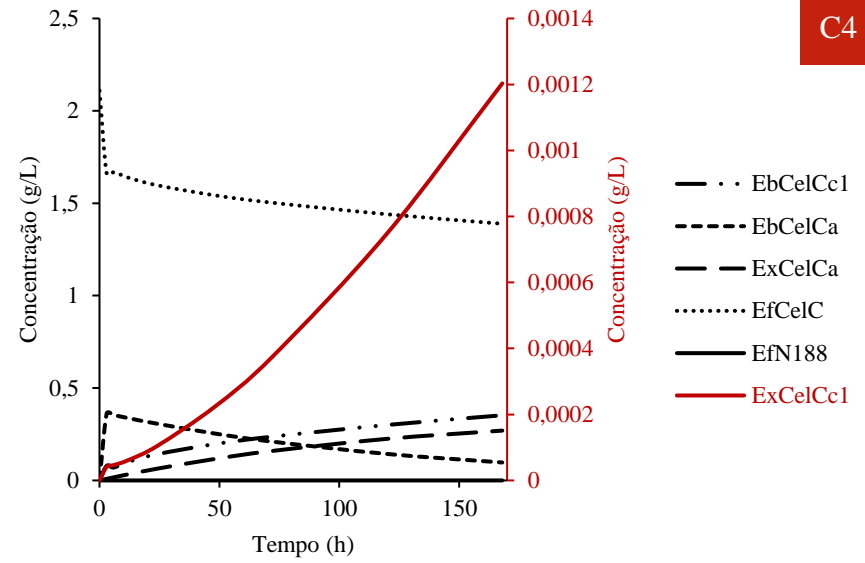
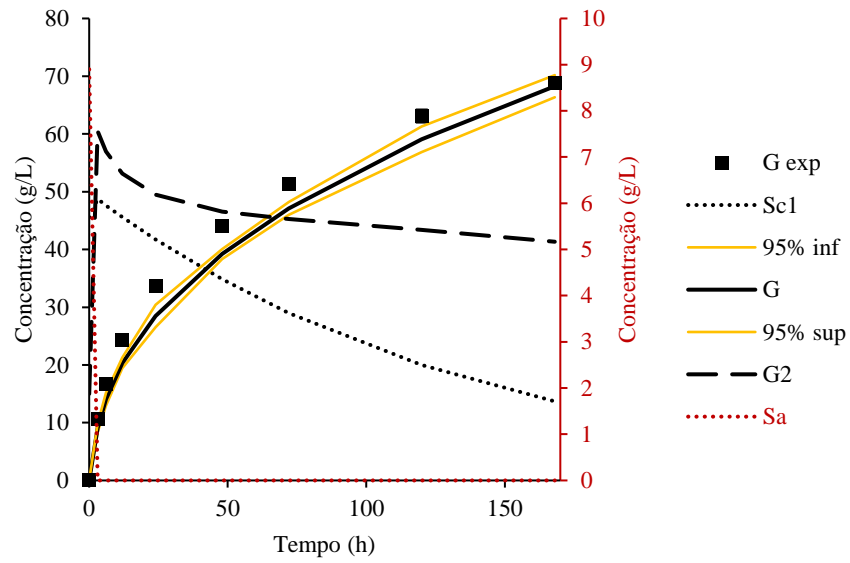
C1



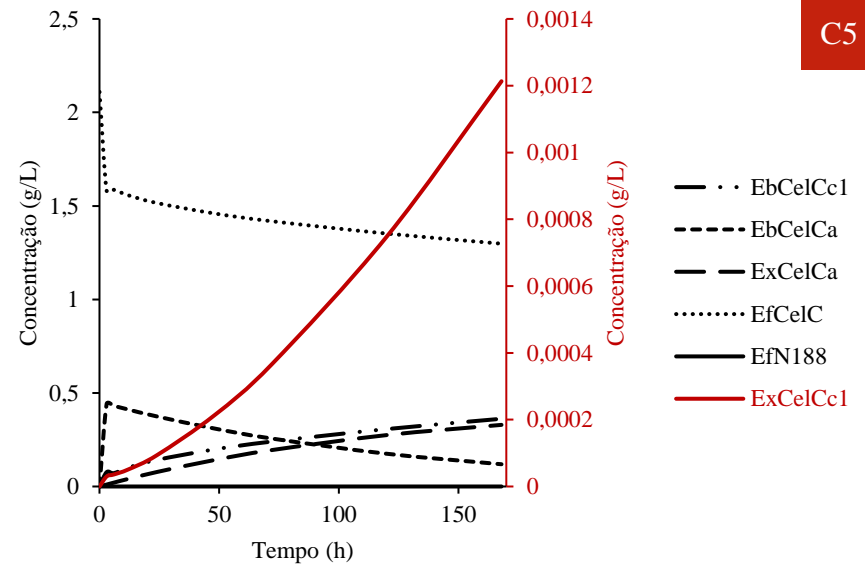
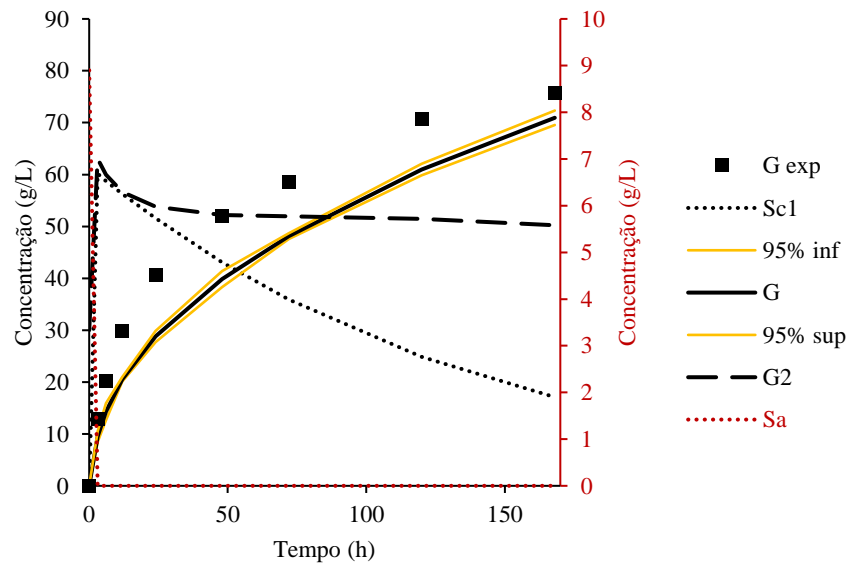
C2



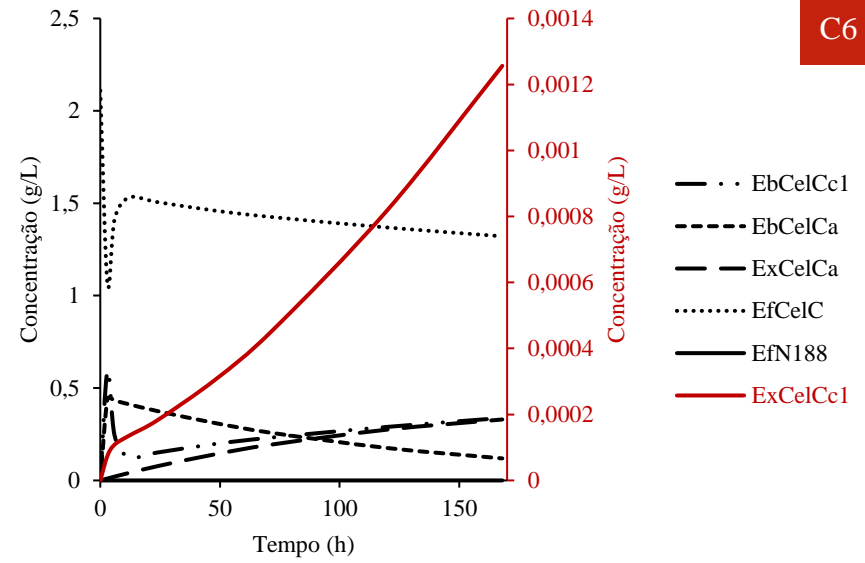
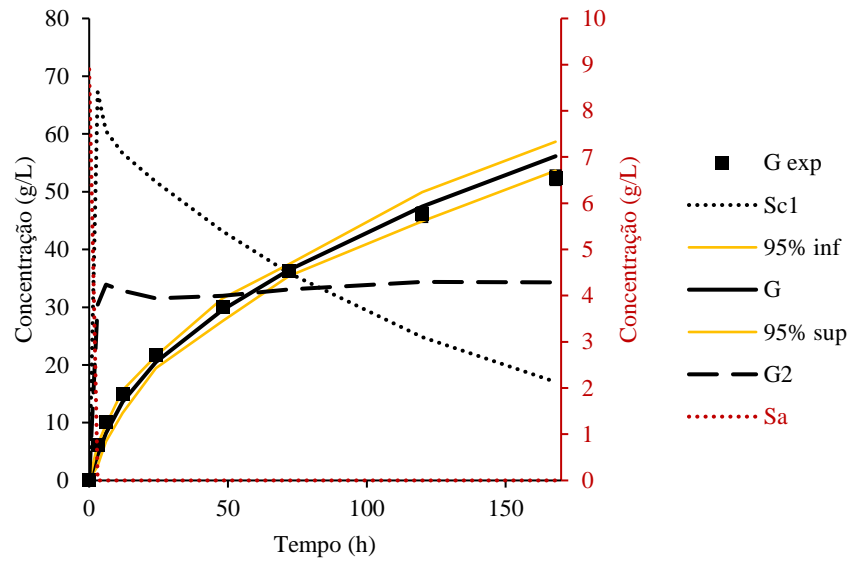
C3



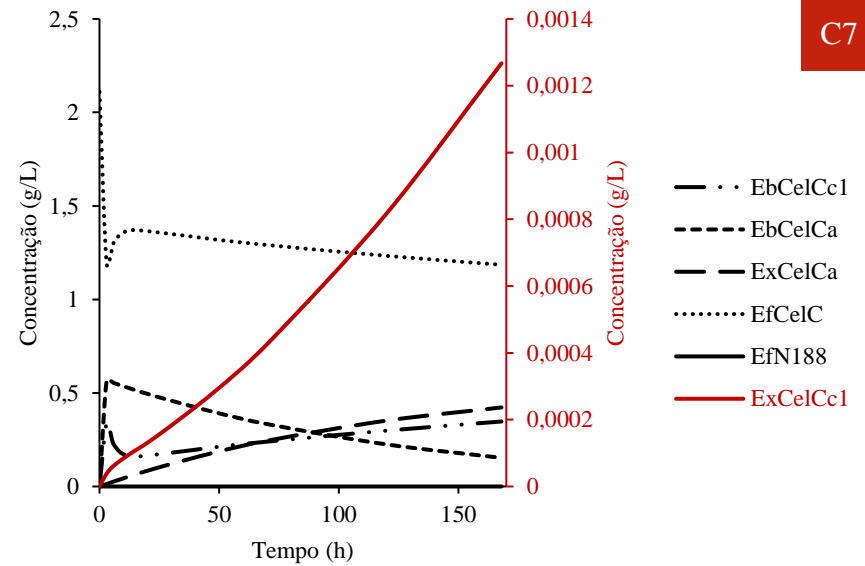
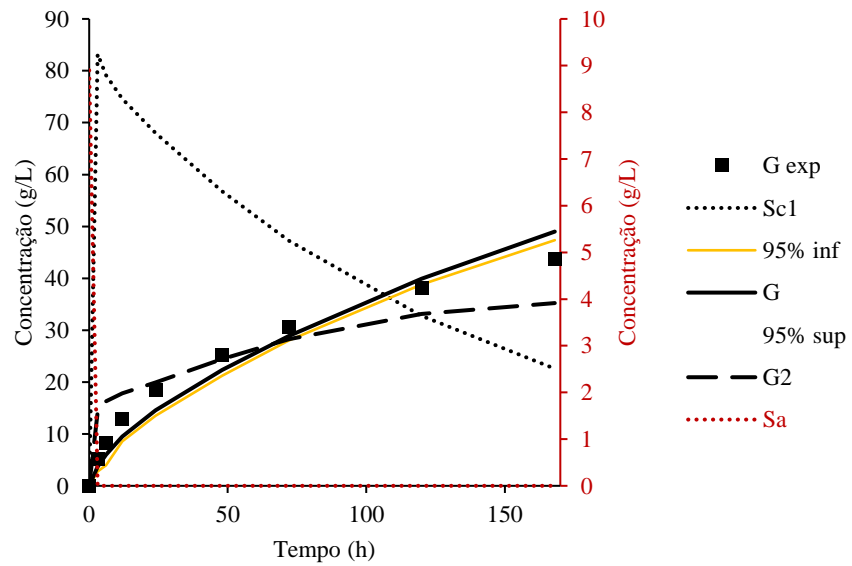
C4



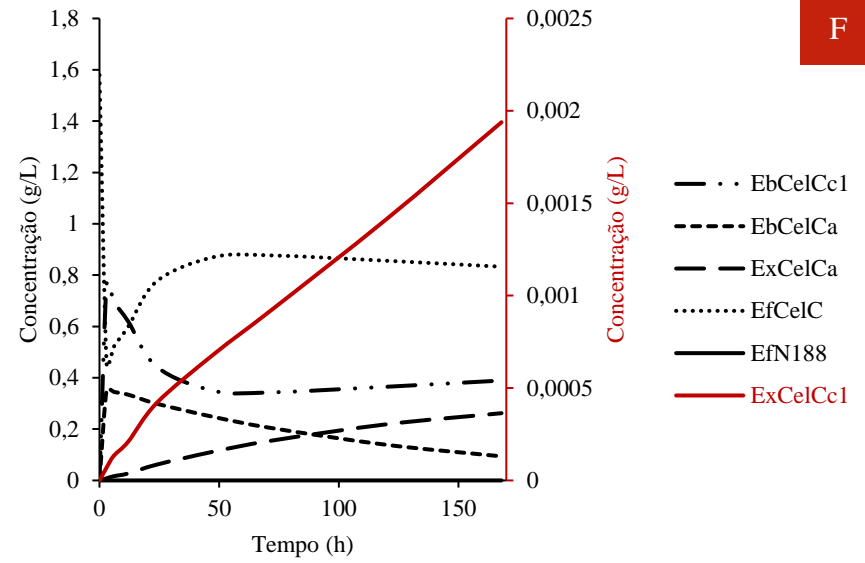
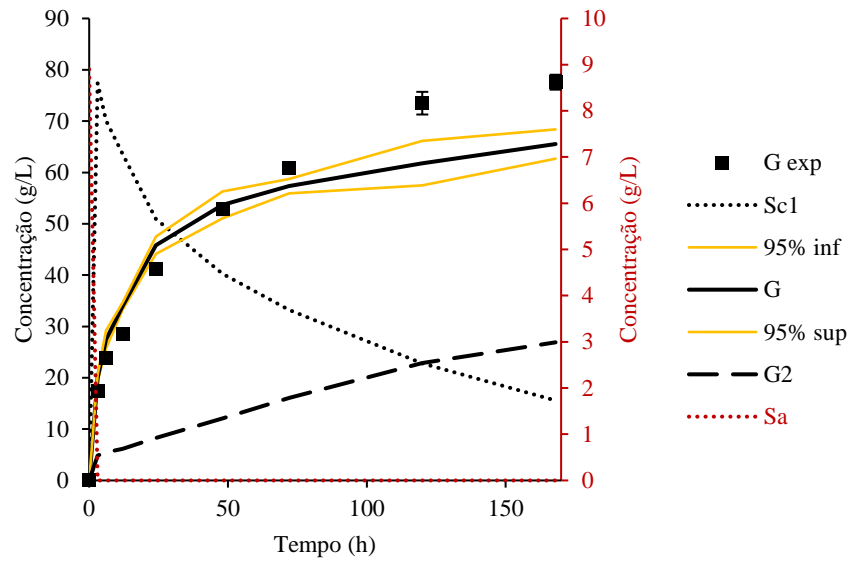
C5



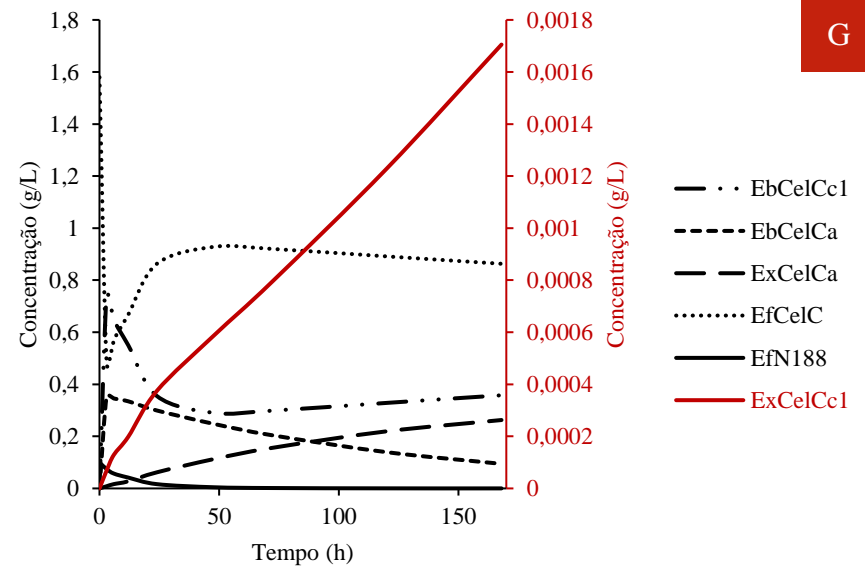
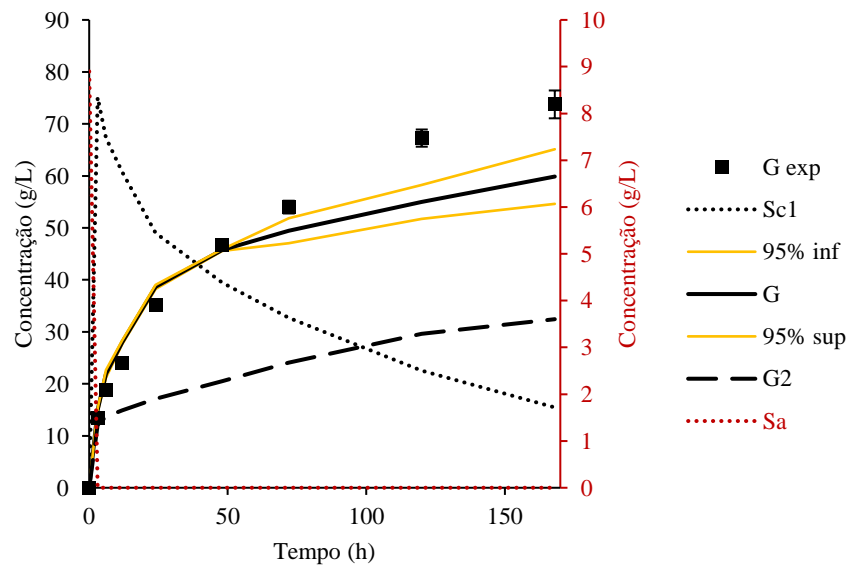
C6



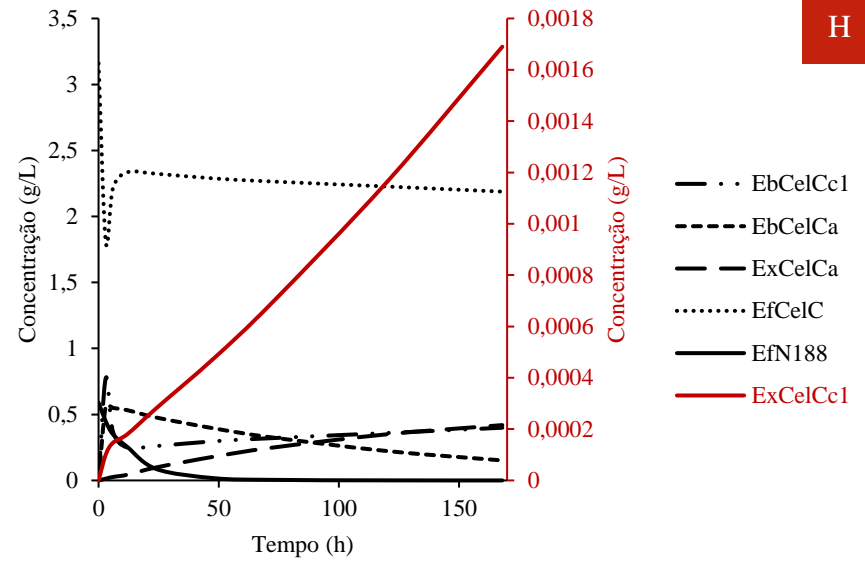
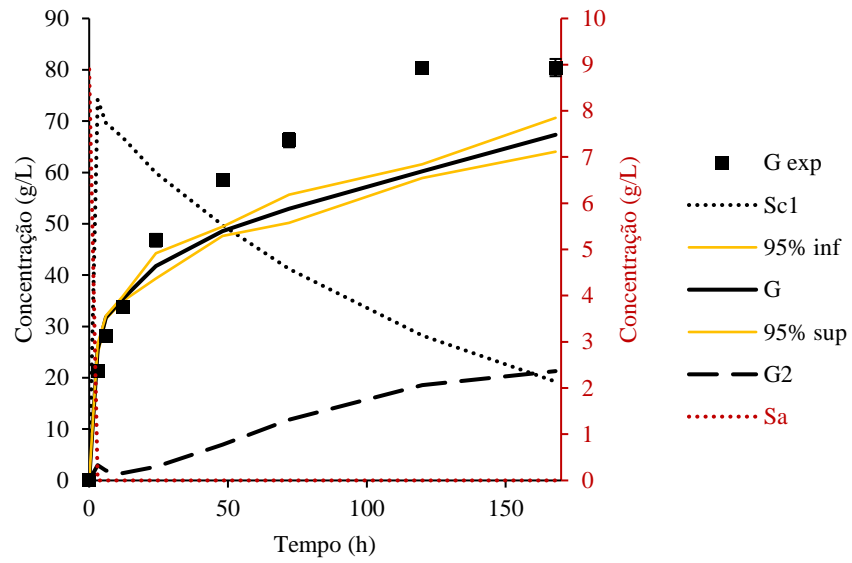
C7



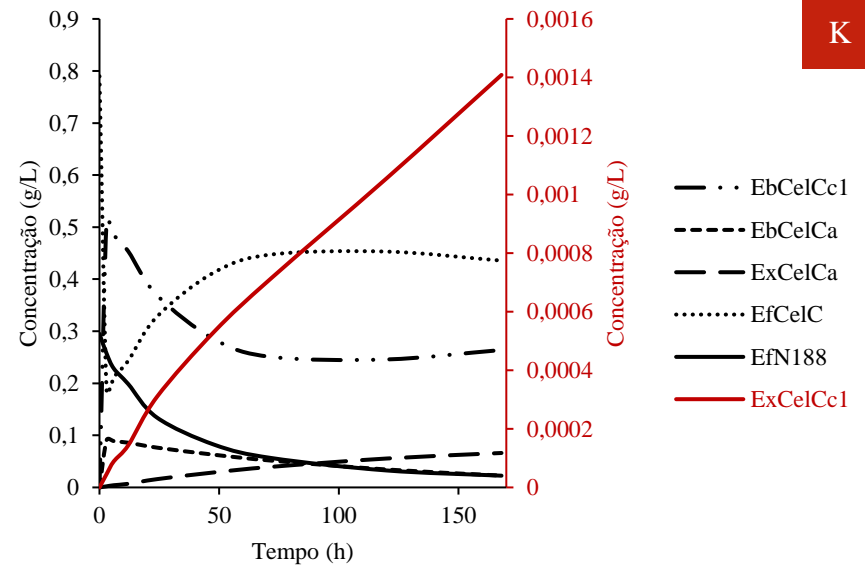
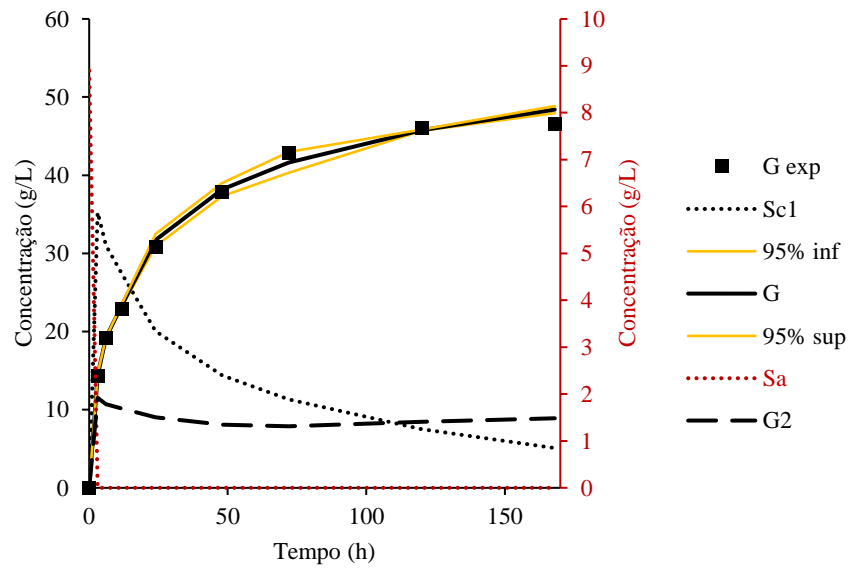
F



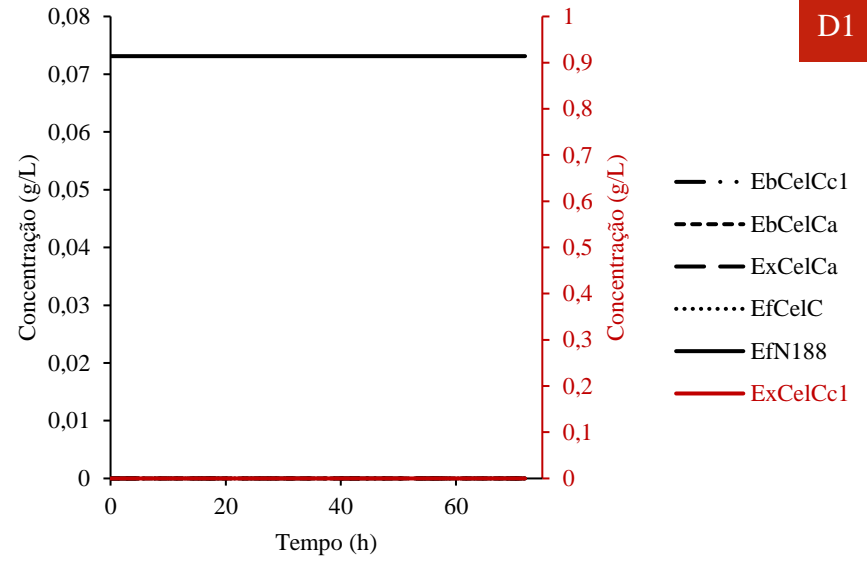
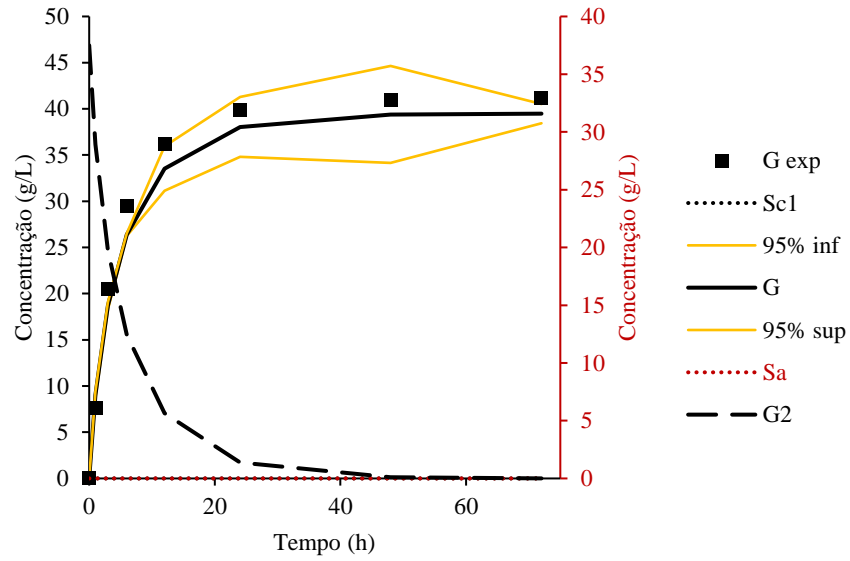
G



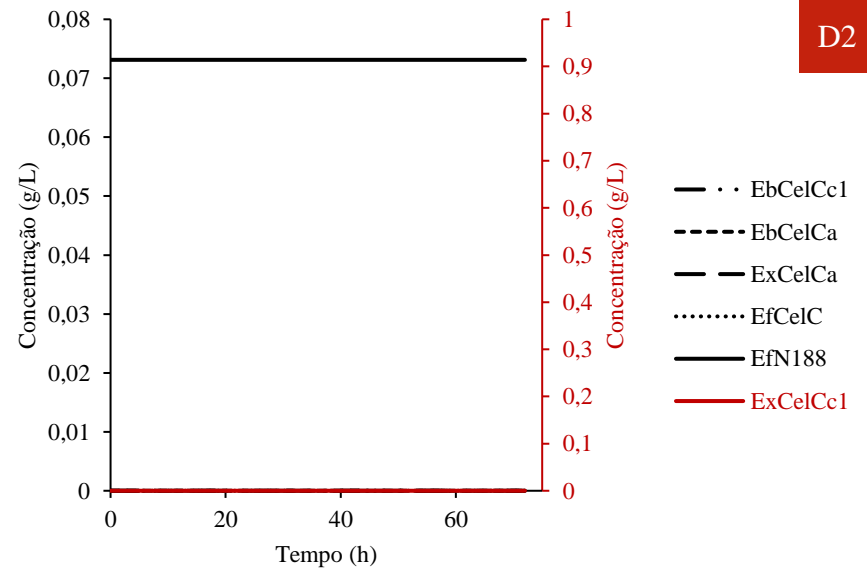
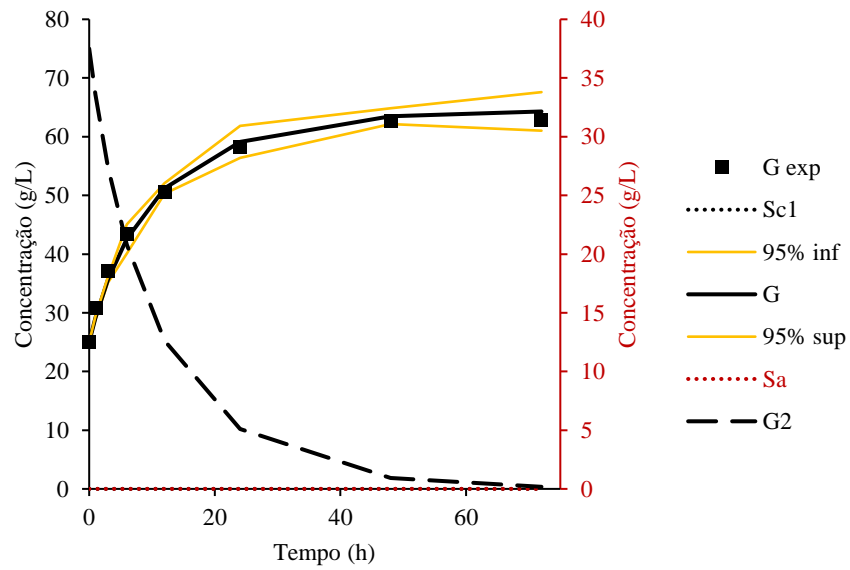
H



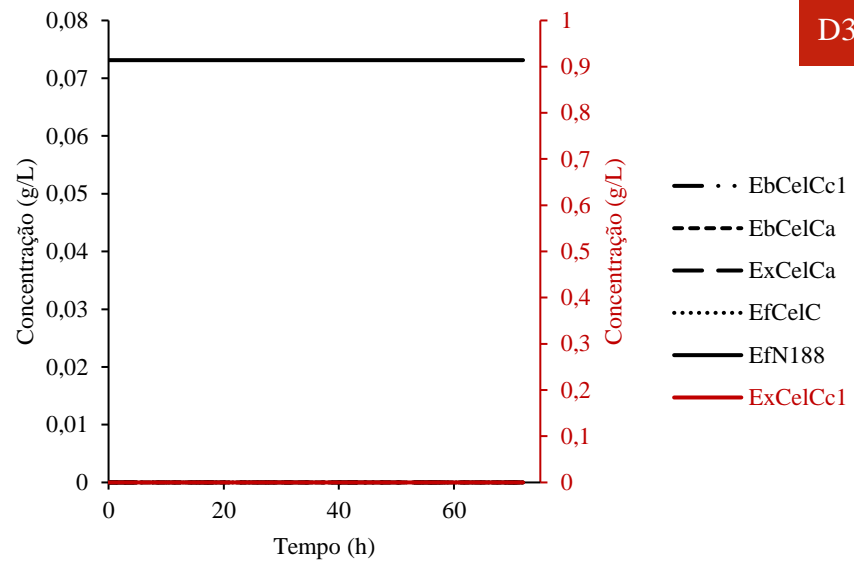
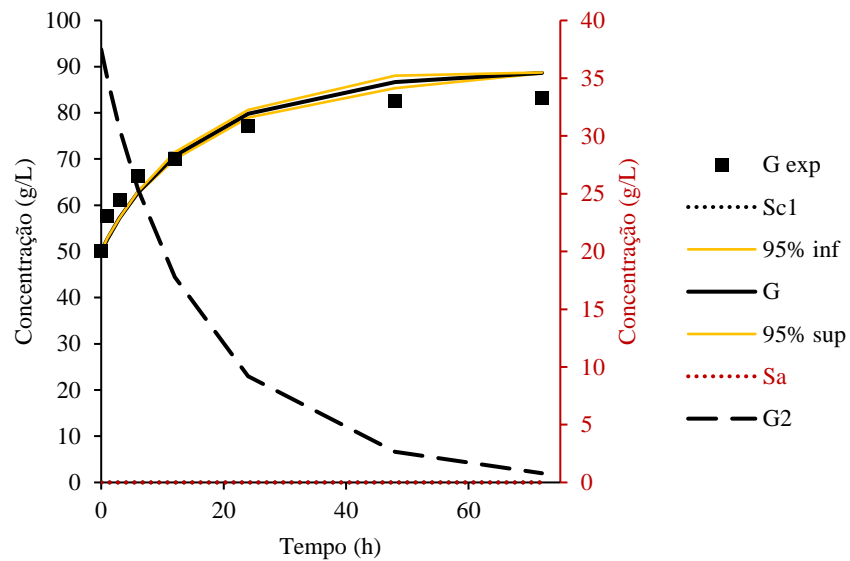
K



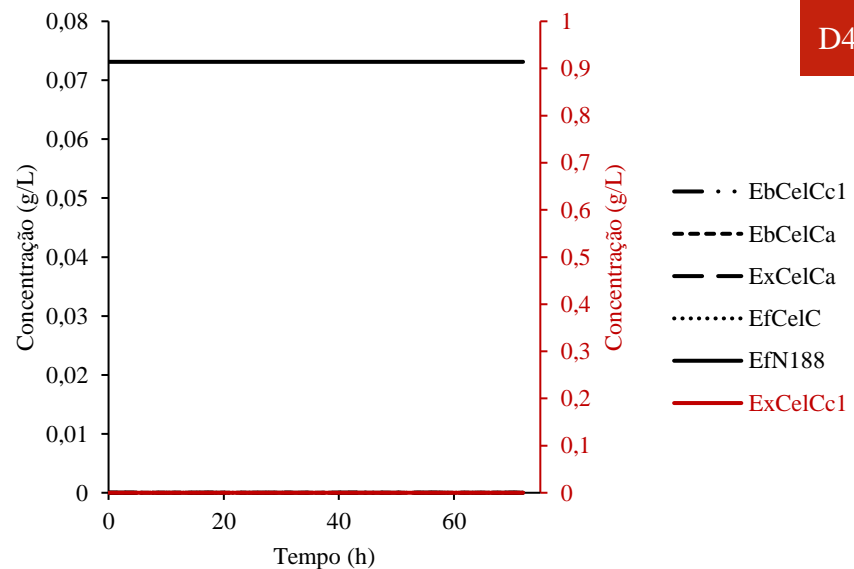
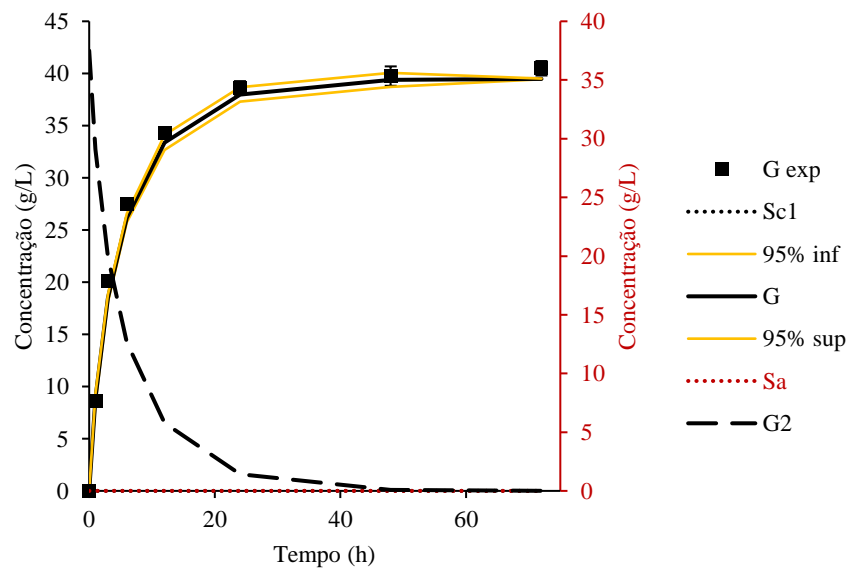
D1



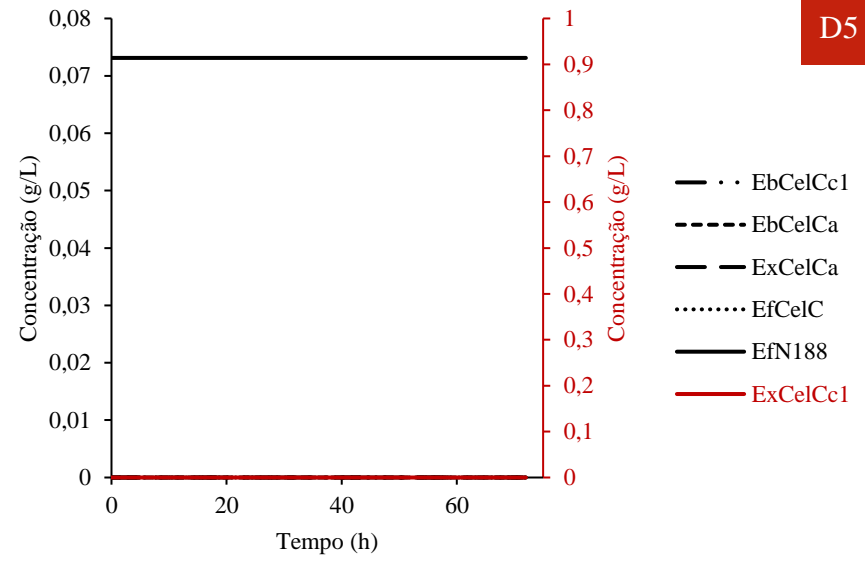
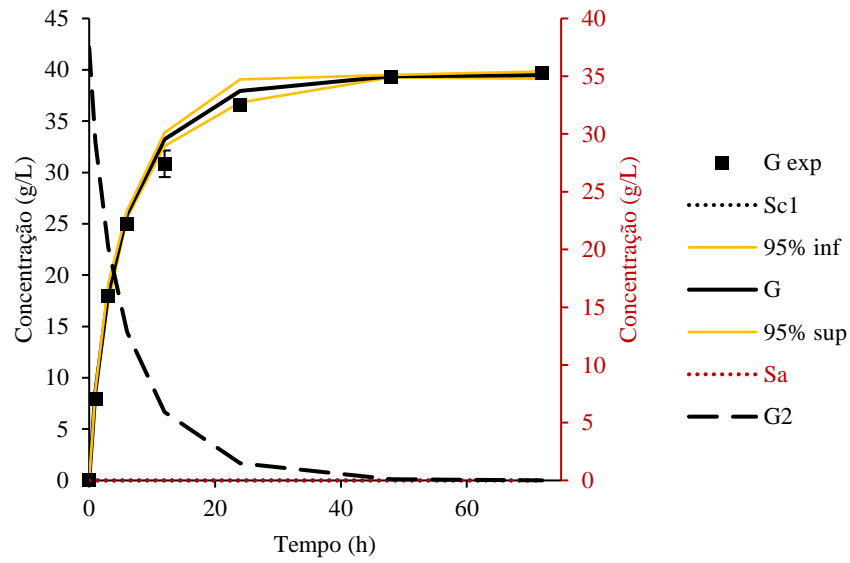
D2



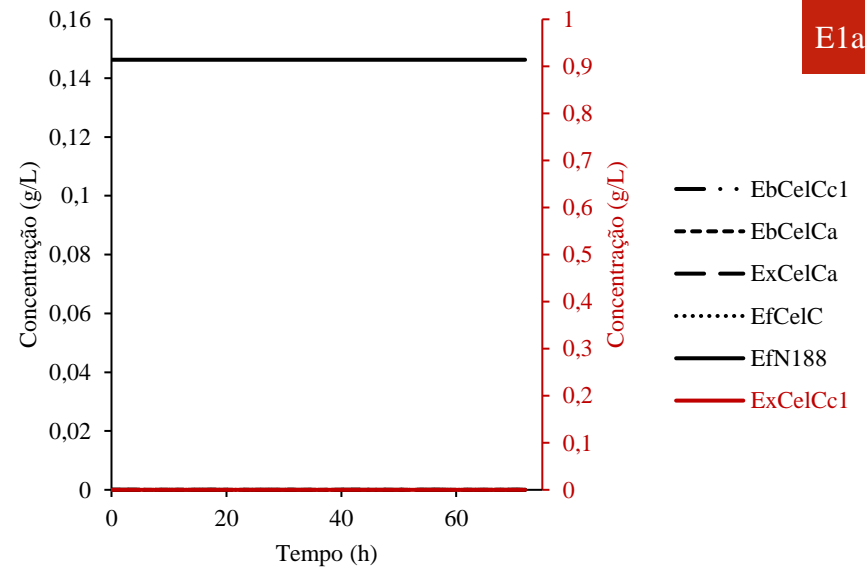
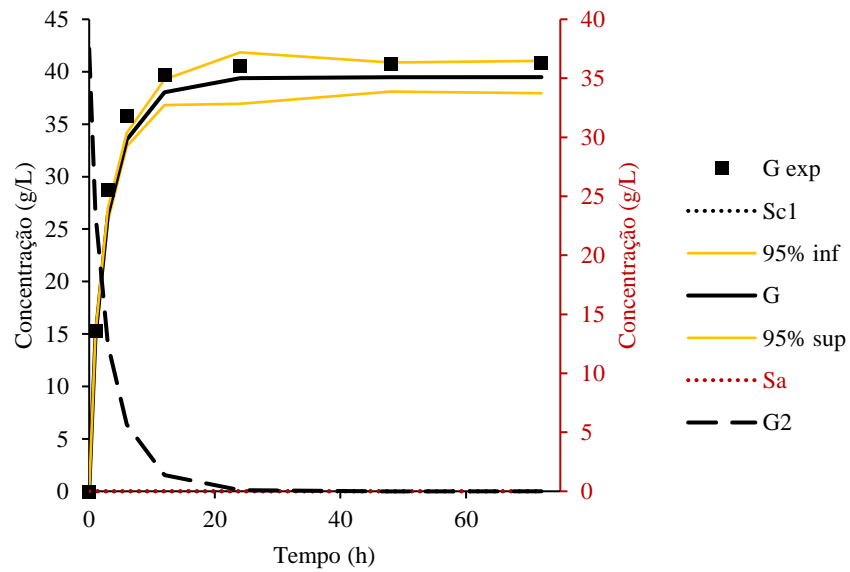
D3



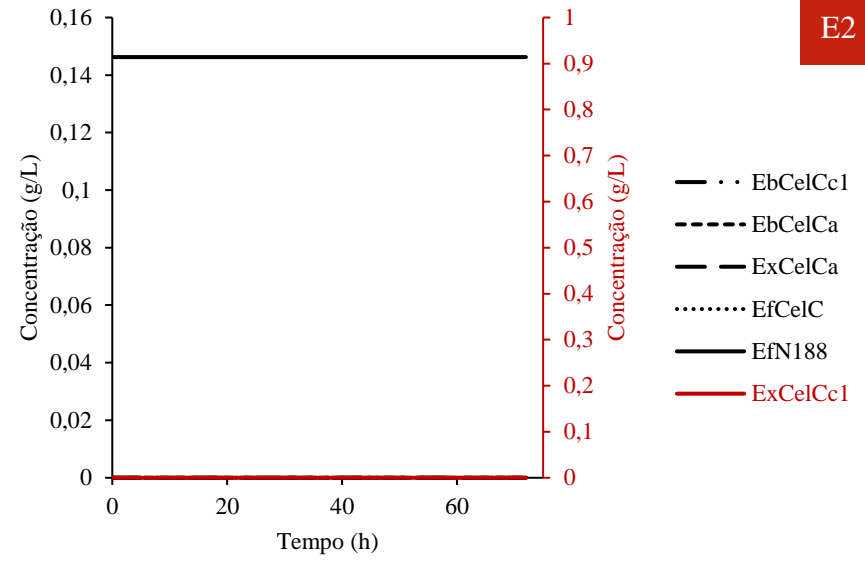
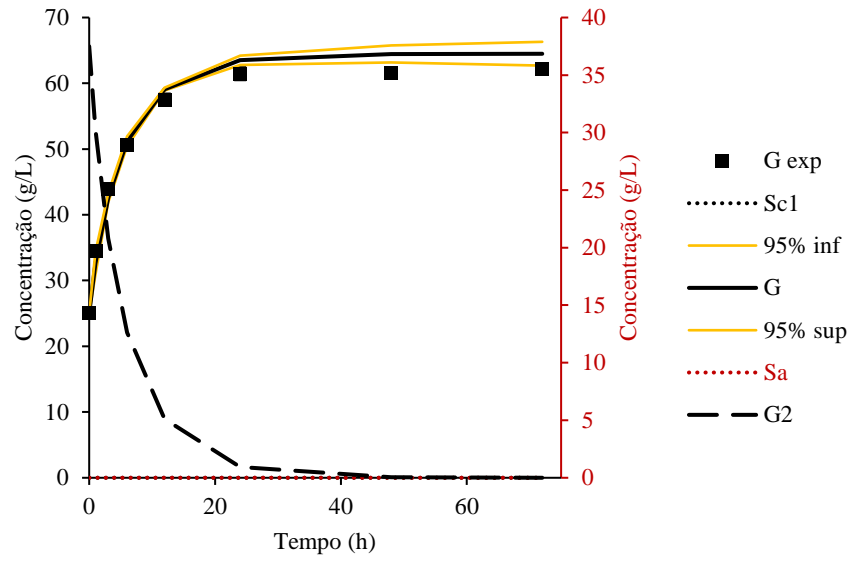
D4



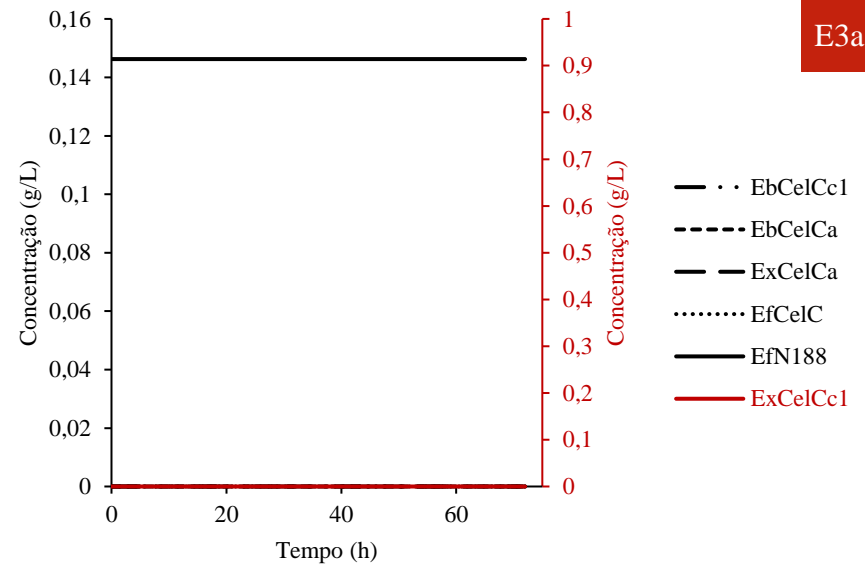
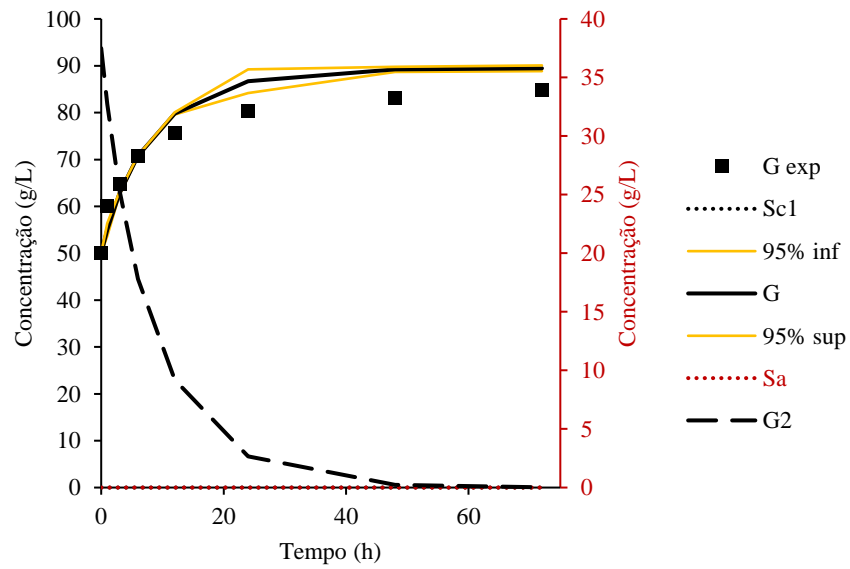
D5



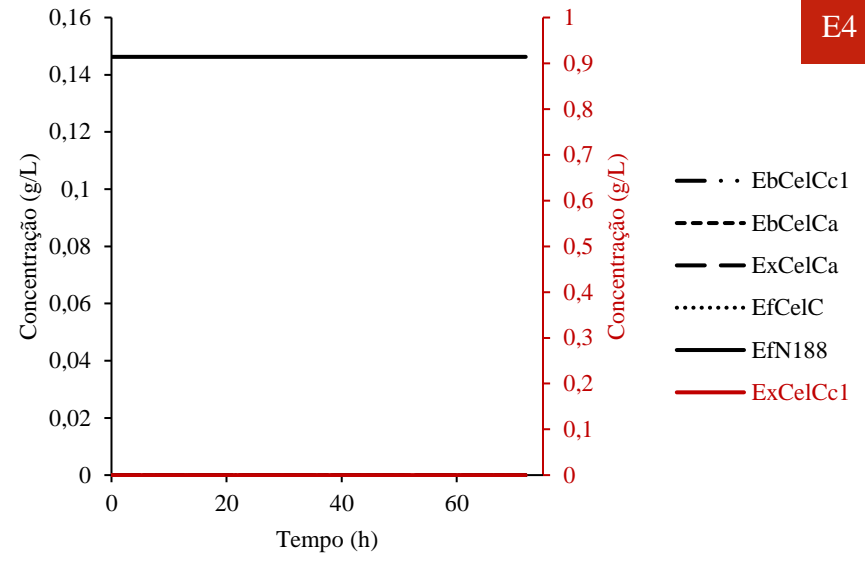
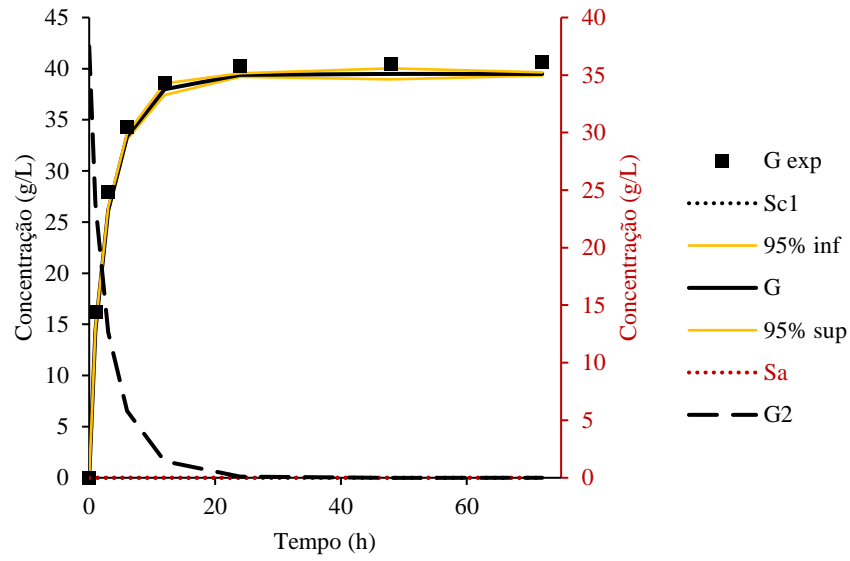
E1a



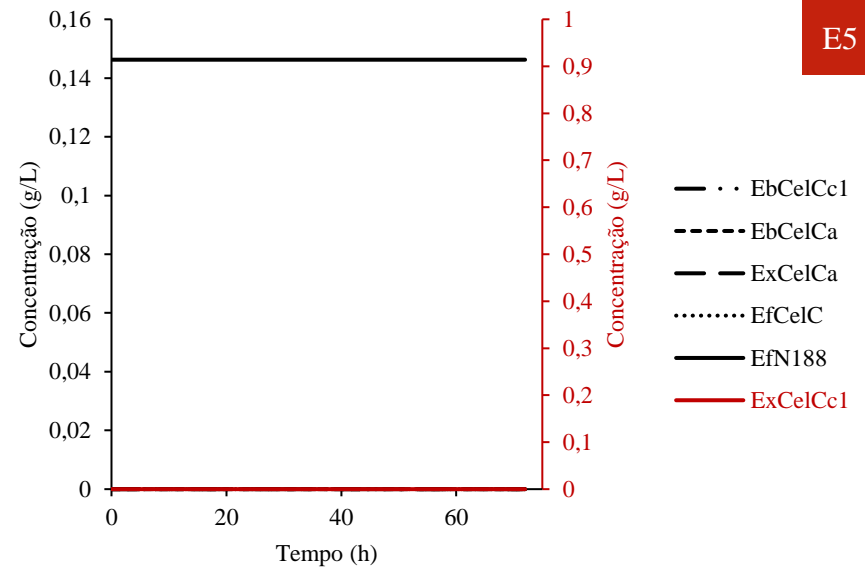
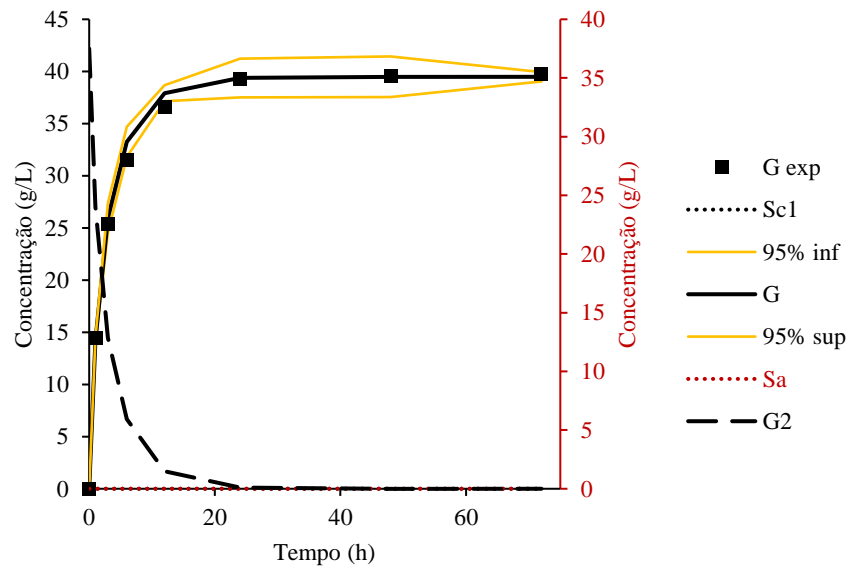
E2



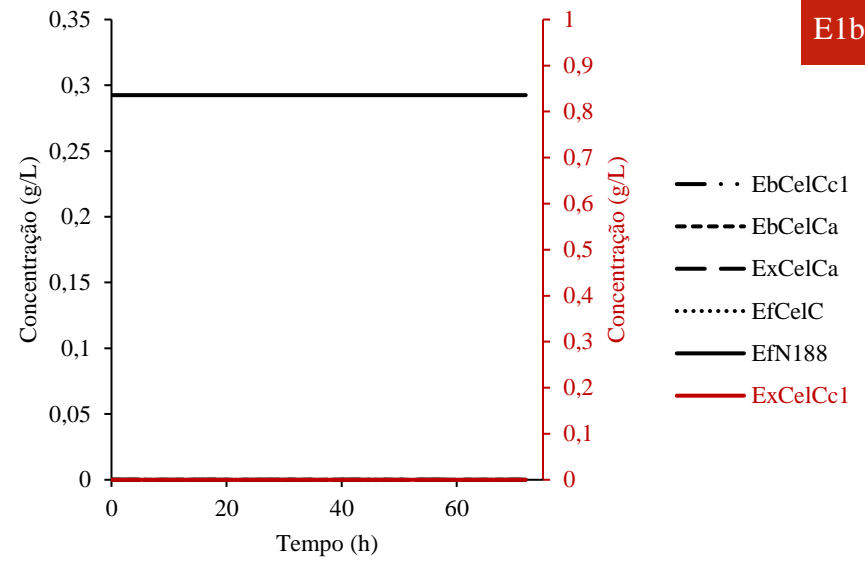
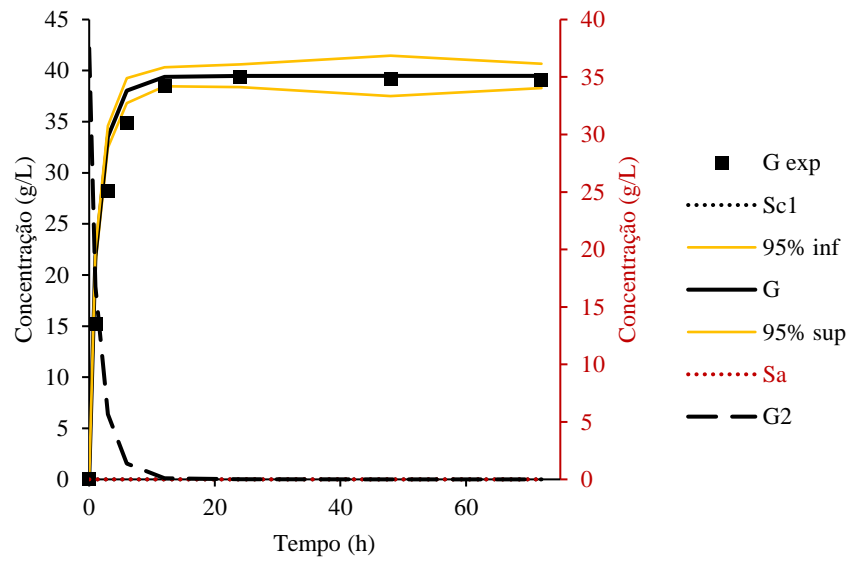
E3a



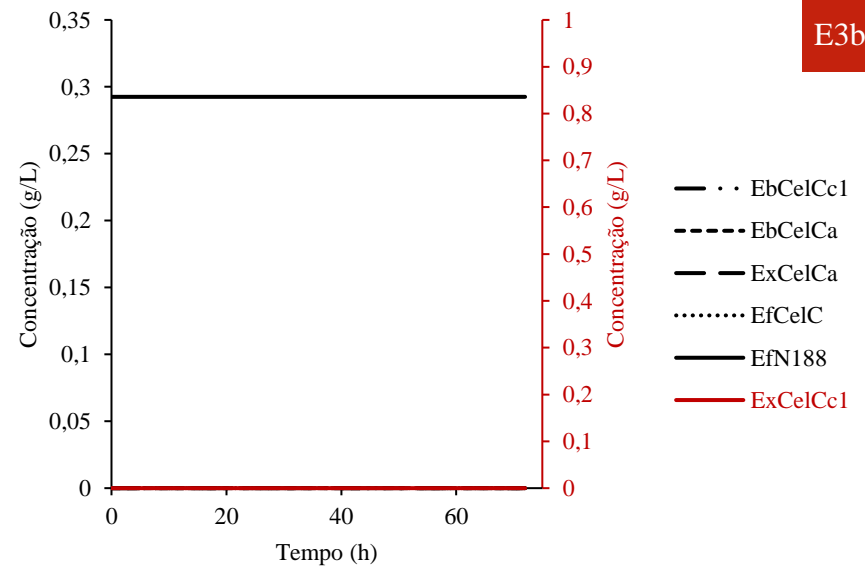
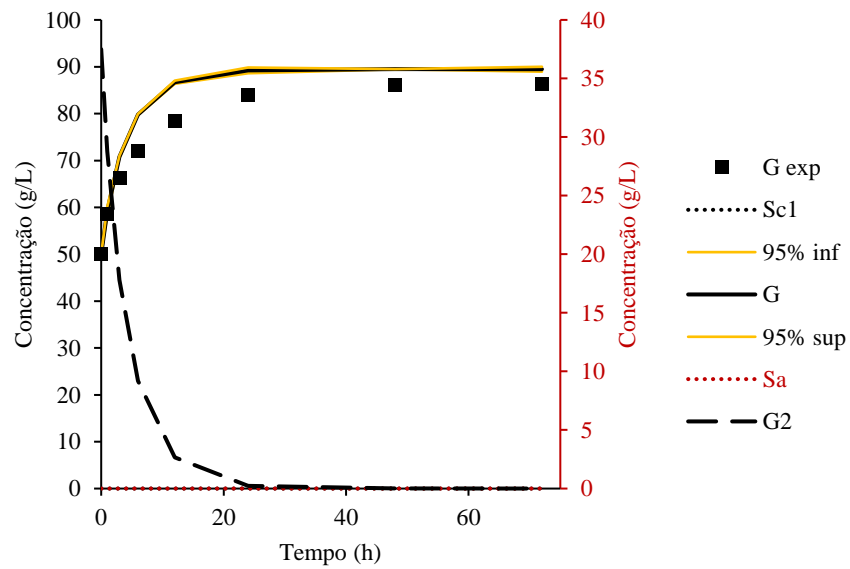
E4



E5



E1b



E3b

Anexo VIII – Dados adicionais utilizados na estimação do Caso 2

Tabela 24- Concentrações experimentais de glicose dessa tese para pré-tratados de celulose com moínho de bolas e LI

Caso de Tsai <i>et al.</i> , 2014		MB		NT		IL90_10		IL120_10		IL120_30		IL120_120	
caso		35		36		37		38		39		40	
(* celulase adicionada (g) *)	EtCeIC	0,3110		0,3110		0,3110		0,3110		0,3110		0,3110	
(* β-glicosidase adicionada (g) *)	EtN188	0,036		0,036		0,036		0,036		0,036		0,036	
(* celulase adsorvida (g) *)	EbCeIC	0,0000		0,0000		0,0000		0,0000		0,0000		0,0000	
(* celulase inibida (g) *)	ExCeIC	0,0000		0,0000		0,0000		0,0000		0,0000		0,0000	
(* β-glicosidase adsorvida (g) *)	EbN188	0,0000		0,0000		0,0000		0,0000		0,0000		0,0000	
(* Conc. inic. de cel. am – g/L *)	C10	18,2		6,6		15,5		15,5		14,3		13,2	
(* Conc. inic. de cel. crist – g/L *)	C20	1,78		13,4		4,48		4,48		5,68		6,82	
(* Conc. inic. de celobiose – g/L *)	C30	0		0		0		0		0		0	
(* Conc. inic. de glicose – g/L *)	C40	0		0		0		0		0		0	
(* Conc. inic. de xilose – g/L *)	C50	0		0		0		0		0		0	
	hr	média	s ²	média	s ²	média	s ²	média	s ²	média	s ²	média	s ²
GLICOSE (mg/mL)	0	0	0	0,000	0,000	0,000	0,000	1,633	0,107	1,000	0,066	0,000	0,000
	0,5			0,333	0,082	1,067	0,070	0,933	0,061	1,600	0,105	1,633	0,136
	1	0,000	0,000	0,667	0,327	2,567	0,168	1,833	0,120	3,533	0,232	2,983	0,449
	2	1,089	0,168	1,533	0,191	4,667	0,306	5,467	0,359	5,867	0,385	5,583	0,286
	4	2,278	0,391	3,200	0,395	8,333	0,546	9,767	0,640	9,467	0,621	8,650	0,748
	6	3,778	0,077	4,200	0,163	10,000	0,656	11,433	0,750	11,367	0,745	10,517	1,102
	9	4,933	0,361	4,333	0,354	12,367	0,811	14,233	0,933	15,700	1,030	12,567	0,136
	12	6,400	0,058	4,967	0,422	16,667	1,093	16,100	1,056	15,667	1,027	14,283	0,504
	24	7,544	0,329	6,333	0,340	17,367	1,139	18,400	1,207	18,933	1,242	17,183	1,129
48	10,578	0,462	7,733	0,395	18,400	1,207	21,300	1,397	20,433	1,340	20,183	0,041	

	144	12,000	0,612	9,233	0,000	19,033	1,248	22,100	1,449	21,267	1,395	21,133	0,000
--	-----	--------	-------	-------	-------	--------	-------	--------	-------	--------	-------	--------	-------

Tabela 24 (continuação) – Concentrações experimentais de glicose dessa tese para pré-tratados de celulose com moínho de bolas e LI

Caso de Tsai <i>et al.</i> , 2014		IL120_120 (1)		IL120_120 (4)		IL120_120 (6)	
caso		41		42		43	
(* celulase adicionada (g) *)	EtCelC	0,3110		0,3110		0,3110	
(* β-glicosidase adicionada (g) *)	EtN188	0,036		0,036		0,036	
(* celulase adsorvida (g) *)	EbCelC	0,0000		0,0000		0,0000	
(* celulase inibida (g) *)	ExCelC	0,0000		0,0000		0,0000	
(* β-glicosidase adsorvida (g) *)	EbN188	0,0000		0,0000		0,0000	
(* Conc. inic. de cel. am – g/L *)	C10	58,9		55,1		51,2	
(* Conc. inic. de cel. crist – g/L *)	C20	41,1		44,9		48,8	
(* Conc.inic. de celobiose – g/L *)	C30	0		0		0	
(* Conc.inic. de glicose – g/L *)	C40	0		0		0	
(* Conc.inic. de xilose – g/L *)	C50	0		0		0	
	hr	média	s ²	média	s ²	média	s ²
	0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	0,5	1,067	0,007	1,133	0,011	1,150	0,004
	1	2,500	0,001	2,450	0,005	2,300	0,003
	2			4,050	0,011	3,917	0,001
	4					6,567	0,003
	6						
GLICOSE (mg/mL)							