



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ESTUDO CINÉTICO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE
CELULOSE DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR**

Mirella Lucas de Carvalho

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Raquel de Lima Camargo Giordano – UFSCar

Co-orientador: Prof. Dr. Ruy de Sousa Jr. – UFSCar

São Carlos

2011

Mirella Lucas de Carvalho

ESTUDO CINÉTICO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE
CELULOSE DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos, como requisito para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Área de concentração: Bioquímica

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Raquel de Lima Camargo Giordano – UFSCar

Co-orientador: Prof. Dr. Ruy de Sousa Jr. – UFSCar

São Carlos

2011

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

C331ec

Carvalho, Mirella Lucas de.

Estudo cinético da hidrólise enzimática de celulose de
bagaço de cana-de-açúcar / Mirella Lucas de Carvalho. --
São Carlos : UFSCar, 2011.
102 f.

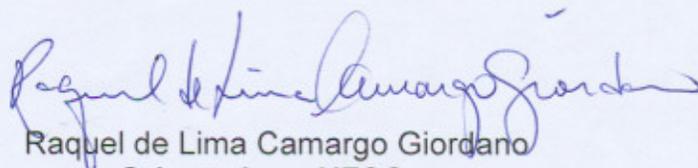
Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2011.

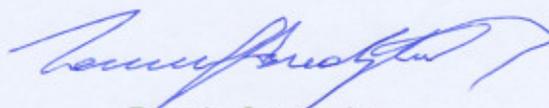
1. Engenharia química. 2. Hidrólise de celulose. 3.
Bagaço de cana. 4. Estudo cinético. I. Título.

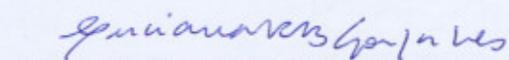
CDD: 660 (20^a)

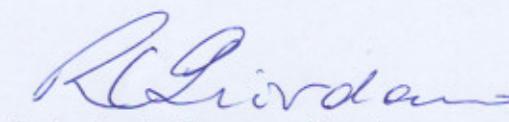
MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE
MIRELLA LUCAS DE CARVALHO APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SÃO CARLOS, EM 28 DE MARÇO DE 2011.

BANCA EXAMINADORA:


Raquel de Lima Camargo Giordano
Orientadora, UFSCar


Ruy de Sousa Jr.
Co-orientador, UFSCar


Luciana Rocha Barros Gonçalves
UFC


Roberto de Campos Giordano
UFSCar

Dedico este trabalho a meus pais e meu irmão:

Amores da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas bênçãos concedidas nestes dois anos de trabalho e em toda minha vida;

À família que Deus me deu e que me faz entender o real sentido da palavra *amor*: meus pais Ailton e Marion que apesar da dor da distância sempre me incentivaram, me apoiaram e acreditaram em meu sucesso, ao meu irmão Juan por sempre me fazer rir e esquecer dos momentos mais difíceis. Minha querida irmã de coração Isabel por estar sempre comigo independente de qualquer obstáculo.

À minha orientadora, professora Raquel, e ao professor Roberto, por enfrentarem junto a mim o desafio da materialização deste trabalho.

Ao amigo e co-orientador, professor Ruy, pelo apoio, estímulo e torcida por meu sucesso, por estar ao meu lado em momentos tão decisivos; sempre disposto a compartilhar das alegrias, tristezas e inseguranças, transmitindo-me segurança e conforto, sempre.

À Claudia, uma amiga fiel, conselheira, dedicada, especial e claro muito justa, não há palavras para descrever a grande pessoa, a qual ficará pra sempre em meu coração.

À Dasciana Rodrigues, uma querida pessoa sem igual, por estar sempre disposta a ajudar e nunca pedir nada em troca.

Ao Diogo, um amigo querido que muito me apoiou nos momentos mais difíceis, mas também que estava sempre presente nos momentos de alegria.

Aos amigos queridos: Lúcia, Sandra, Chanel, Lionete, Gislene, Adilson, Anny e vários outros que moram em meu coração. Serão pra sempre lembrados com carinho.

À UFSCar e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química pela ajuda de custo concedida para publicação de trabalhos em eventos relacionados à área de interesse.

À secretária da Pós-graduação em Engenharia Química (Luciana), por sua prontidão e profissionalismo.

Aos professores participantes da banca avaliadora, pela presença e contribuições para o enriquecimento deste trabalho.

A todos que contribuíram para a realização dessa etapa de minha vida.

Ao CNPq, pela bolsa concedida, e à FAPESP (BIOEN).

Obrigada!

You are more beautiful than you know,
more talented than you think,
and more loved than you can imagine.
(Kandee Johnson)

Universidade Federal de São Carlos - Departamento de Engenharia Química
Estudo Cinético da Hidrólise Enzimática de Celulose de Bagaço de Cana-de-açúcar
Autora: Mirella Lucas de Carvalho
Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Raquel Lima Camargo Giordano – UFSCar
Co-orientador: Prof. Dr. Ruy de Sousa Jr. – UFSCar

RESUMO

Este trabalho apresenta um estudo cinético da hidrólise enzimática de três substratos celulósicos: papel de filtro (PF), usado como um modelo de substrato delignificado; bagaço de cana (BC) explodido a vapor e BC tratado com ácido, os dois últimos tratados com NaOH 4%. Todos os BC foram caracterizados. Experimentos de hidrólise para estudar a influência da agitação e da concentração do substrato foram realizados em shaker, usando Accellerase[®] 1500, Genencor, em pH 4,8, em tampão citrato de sódio 50mM. Para verificar o efeito da concentração do substrato, a carga de celulose (m / m) foi de 0,5% -13% (para PF) e 0,99% - 9,09% (para o BC). Para o PF, o papel da resistência externa ao transporte de massa não foi significativo quando a velocidade de agitação foi na faixa de 150-300 rpm, em shaker. Foi possível ajustar um modelo pseudo-homogêneo de Michaelis-Menten para concentrações de substrato até 13% (m / m). Testes preliminares através do ajuste do modelo proposto por Chrastil (CHRASIL J. Enzymic product formation curves with the normal or diffusion limited reaction mechanism and in the presence of substrate receptors, **Int. J. Biochem.**, v. 20, No. 7, p. 683, 1988) indicaram que o papel da difusão através da película externa era uma característica mais relevante para o BC explodido a vapor que para o PF, em altas concentrações de substrato. Foi possível ajustar um modelo pseudo-homogêneo para o BC explodido a vapor, dentro de uma faixa de concentrações de celulose de 0,99% a 3,85% (m / m). Inibição pelo produto teve de ser considerada pelo modelo. Para cargas maiores de BC explodido a vapor, um modelo modificado de Michaelis-Menten, adequado para sistemas heterogêneos, com alta resistência à difusão, foi ajustado. Finalmente, para BC tratado com ácido (altamente recalcitrante), modelos de Chrastil foram ajustados. Como esperado, a complexidade deste sistema em relação ao substrato para o pool de enzimas agindo em sinergia, torna difícil o uso de um modelo único para todas as condições operacionais de hidrólise.

Palavras-chave: Hidrólise de celulose; bagaço de cana; estudo cinético.

Estudo Cinético da Hidrólise Enzimática de Celulose de Bagaço de Cana-de-açúcar

Autora: Mirella Lucas de Carvalho

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Raquel Lima Camargo Giordano – UFSCar

Co-orientador: Prof. Dr. Ruy de Sousa Jr. – UFSCar

ABSTRACT

This work presents a kinetic study of the enzymatic hydrolysis of three cellulosic substrates: filter paper (FP), used as a de-lignified substrate model; sugarcane bagasse (SB) steam exploded; and acid treated SB, the last two treated with 4% NaOH. All SB were chemically characterized. Hydrolysis experiments to study the influence of agitation and substrate concentration were performed in shaker, using Accellerase® 1500, Genencor, at pH 4.8, in 50mM sodium citrate buffer. To verify the substrate concentration effect, cellulose load ($\text{weight}_{\text{substrate}}/\text{weight}_{\text{total}}$) was 0.5%-13% (for FP) and 0.99%-9.09% (for SB). For FP, the role of the external mass transport resistance was not significant when the agitation speed was in the range 150-300 rpm. It was possible to fit a pseudo-homogeneous Michaelis-Menten model for substrate concentrations up to 13% (w/w). Preliminary tests fitting the model proposed by Chrastil (CHRASIL J. Enzymic product formation curves with the normal or diffusion limited reaction mechanism and in the presence of substrate receptors, *Int. J. Biochem.*, v. 20, No. 7, p. 683, 1988) indicated that the role of diffusion through the external film was a more relevant feature for steam exploded SB than for FP, at higher concentrations of substrate. It was possible to fit a pseudo-homogeneous model for steam exploded SB, within a range of cellulose concentrations from 0.99% to 3.85% (w/w). Product inhibition had to be considered by the model. For higher loads of steam exploded SB, a modified Michaelis-Menten model, appropriate for heterogeneous systems with high diffusion resistance, was fitted. Finally, for the highly recalcitrant acid treated SB, Chrastil models were fitted. As expected, the complexity of this system regarding to the substrate and to the pool of enzymes acting in synergy, makes difficult the use of one single lumped parameter model for all hydrolysis operation conditions.

Keywords: Cellulose hydrolysis; sugarcane bagasse; kinetic study.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 2.1. A cana-de-açúcar.....	17
Figura 2.2. Composição média do bagaço de cana-de-açúcar.....	18
Figura 2.3. Representação da cadeia linear da celulose, formada por várias unidades consecutivas de celobiose.....	19
Figura 2.4. Ligações de hidrogênio na estrutura supramolecular da celulose.....	20
Figura 2.5. Representação esquemática de uma xilana de gramínea. 1,4-d-xilopirranose (1); l-arabinofuranose (2); ácido 4-o-metil- α -d-glucurônico (3); grupo acetil (4).	21
Figura 2.6. Precursores da biossíntese da lignina: (I) álcool p-cumarílico; (II) álcool coniferílico; (III) álcool sinapílico.....	22
Figura 2.7. Estrutura da lignina de <i>Fagus sp</i>	23
Figura 2.9. Representação esquemática de uma celulase.....	28
Figura 2.10. Representação esquemática da hidrólise da celulose e da ação do CBHs, EGs, e β -glicosidases (β -gluc) de <i>Trichoderma reesei</i> . Onde ExosR são as enzimas que atacam os grupos terminais redutores, e ExosNR os não redutores (ZHANG <i>et al</i> , 2006).....	30
Figura 3.1 Fluxograma das etapas de caracterização do bagaço tratado com ácido e explodido ambos pré-tratados (com NaOH 4%).....	55
Figura 3.2 Reação para quantificação de açúcares redutores totais com ácido dinitro-3,5-salicílico.....	59
Figura 4.1 Gráfico semi-logarítmico da concentração de enzima em função da massa de glicose liberada por 0,5 mL da enzima celulase diluída.....	63
Figura 4.2 Hidrólise enzimática de celulose 10% ($m_{\text{papel}}/m_{\text{total}}$) sob diferentes regimes de temperatura, 20 FPU/gsubstrato, 250rpm.....	68
Figura 4.3 Velocidades iniciais em função de diferentes regimes de agitação,.....	70
Figura 4.4 (a) Gráfico de Lineweaver-Burk e (b) Comportamento de Michaelis Menten para hidrólise enzimática da celulose em 50°C, pH 4.8, substrato 0,5 a 13% ($m_{\text{papel}}/m_{\text{total}}$) e enzima Accellerase® 1500 (0,5FPU.mL ⁻¹ _{solução}).....	72
Figura 4.5 Modelos ajustados de acordo com Chrastil para as concentrações (a) 0,99% (b) 3,85% (c) 6,54% (d) 9,09% ($m_{\text{celulose}}/m_{\text{total}}$).....	74
Figura 4.6 Modelo ajustado de acordo com Chrastil para a concentração de 2,9% ($m_{\text{celulose}}/m_{\text{total}}$) onde $k' = 0,25E^{-3}$ e $n = 0,89$	75

Figura 4.7 Evolução temporal da concentração de produto em ensaio de hidrólise, a 50°C, pH 4,8, carga de substrato no erlenmeyer de 2,9% ($m_{\text{celulose}}/m_{\text{tampão}}$), 0,85FPU/ $mL_{\text{tampão}}$ de Accellerase® 1500.	76
Figura 4.8 Diagrama de Lineweaver-Burk para hidrólise enzimática de celulose a 50°C, pH 4,8, carga de substrato no erlenmeyer de 0,99 a 3,85% ($m_{\text{celulose}}/m_{\text{tampão}}$), correspondente a 11,11 $g_{\text{glicose}}/L_{\text{tampão}}$ a 44,44 $g_{\text{glicose}}/L_{\text{tampão}}$ e 0,85FPU/ $mL_{\text{tampão}}$ de Accellerase® 1500.....	77
Figura 4.9 Comportamento de Michaelis Menten para hidrólise enzimática de celulose a 50°C, pH 4,8, carga de substrato no erlenmeyer de 0,99 a 3,85% ($m_{\text{celulose}}/m_{\text{tampão}}$), correspondente a 11,11 $g_{\text{glicose}}/L_{\text{tampão}}$ a 44,44 $g_{\text{glicose}}/L_{\text{tampão}}$ e 0,85FPU/ $mL_{\text{tampão}}$ de Accellerase®.	78
Figura 4.10 Efeito de inibição na evolução temporal da concentração de glicose em ensaio de hidrólise, a 50°C, pH 4,8, carga de substrato no erlenmeyer de 2,9% ($m_{\text{celulose}}/m_{\text{tampão}}$), 0,85FPU/ $mL_{\text{tampão}}$ de Accellerase® 1500.....	79
Figura 4.11 Evolução temporal da concentração de glicose em ensaio de hidrólise, modelo de MM com inibição (software Matlab) a 50°C, pH 4,8, carga de substrato no erlenmeyer de 2,9% ($m_{\text{celulose}}/m_{\text{total}}$), 0,85FPU/ $mL_{\text{tampão}}$ de Accellerase® 1500.....	80
Figura 4.12 Região de confiança ($K_m/V_{\text{máx}}$) com forma restringida à elíptica	81
Figura 4.13 Região de confiança ($K_i/V_{\text{máx}}$) com forma restringida à elíptica.	81
Figura 4.14 Região de confiança (K_i/K_m) com forma restringida à elíptica	82
Figura 4.15 Região de confiança ($K_m/v_{\text{máx}}$), segundo critério de Beale (forma não restringida à elíptica)	82
Figura 4.16 Região de confiança ($K_i/v_{\text{máx}}$), segundo critério de Beale (forma não restringida à elíptica).	83
Figura 4.17 Região de confiança (K_i/K_m), segundo critério de Beale (forma não restringida à elíptica).	83
Figura 4.18 Diagrama de Lineweaver-Burk para hidrólise enzimática de celulose a 50°C, pH 4,8, carga de substrato no erlenmeyer de 0,99 a 3,85% ($m_{\text{celulose}}/m_{\text{tampão}}$), correspondente a 11,11 $g_{\text{glicose}}/L_{\text{tampão}}$ a 44,44 $g_{\text{glicose}}/L_{\text{tampão}}$ e 0,85FPU/ $mL_{\text{tampão}}$ de Accellerase® 1500.....	85
Figura 4.19 Comportamento de Michaelis Menten para hidrólise enzimática de celulose a 50°C, pH 4,8, carga de substrato no erlenmeyer de 0,99 a 3,85% ($m_{\text{celulose}}/m_{\text{tampão}}$), correspondente a 11,11 $g_{\text{glicose}}/L_{\text{tampão}}$ a 44,44 $g_{\text{glicose}}/L_{\text{tampão}}$ e 0,85FPU/ $mL_{\text{tampão}}$ de Accellerase®.	86

Figura 4.20 Efeito de inibição na evolução temporal da concentração de glicose em ensaio de hidrólise, a 50°C, pH 4,8, carga de substrato no erlenmeyer de 2,9% ($m_{\text{celulose}}/m_{\text{tampão}}$), 0,85FPU/mL _{tampão} de Accellerase® 1500.....	87
Figura 4.21 Evolução temporal da concentração de glicose em ensaio de hidrólise, modelo de MM com inibição (software Matlab) a 50°C, pH 4,8, carga de substrato no erlenmeyer de 6,54% ($m_{\text{celulose}}/m_{\text{total}}$), 20 FPU.g ⁻¹ _{substrato} de Accellerase® 1500.....	88
Figura 4.22 Região de confiança (Km/Vmáx) com forma restringida à elíptica.	89
Figura 4.23 Região de confiança (Ki/Vmáx) com forma restringida à elíptica	89
Figura 4.24 Região de confiança (Ki/Km) com forma restringida à elíptica	90
Figura 4.25 Região de confiança (Km/vmáx), segundo critério de Beale (forma não restringida à elíptica)	90
Figura 4.26 Região de confiança (Ki/vmáx), segundo critério de Beale (forma não restringida à elíptica)	91
Figura 4.27 Região de confiança (Ki/Km), segundo critério de Beale (forma não restringida à elíptica)	91
Figura 4.28 Modelo ajustado de acordo com Chrastil para a concentração de 2,9% ($m_{\text{celulose}}/m_{\text{total}}$) onde $k' = 2,49E^{-7}$ (L.g ⁻¹ .min ⁻¹) e $n = 0,33$	93
Figura 4.29 Modelo ajustado de acordo com Chrastil para a concentração de 6,54% ($m_{\text{celulose}}/m_{\text{total}}$) onde $k' = 4,96E^{-8}$ (L.g ⁻¹ .min ⁻¹) e $n = 0,30$	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Exemplo dos métodos de pré-tratamentos mais utilizados.....	25
Tabela 2.2. Grau máximo de sinergismo exo/endo para diferentes substratos.....	31
Tabela 4.1 – Valores de diluições de enzima, suas respectivas concentrações e glicose liberada.	62
Tabela 4.2 – Caracterização dos diferentes bagaços de cana-de-açúcar pré-tratados.	64
Tabela 4.3 – Valores hipotéticos para um ensaio de hidrólise enzimática.	66
Tabela 4.4 – Velocidades iniciais de hidrólise enzimática da celulose obtidas para diferentes temperaturas com concentração de substrato fixada em 10% ($m_{\text{papel}}/m_{\text{total}}$), agitação 250 rpm, 20 FPU/g _{substrato} . Os intervalos correspondem a desvios padrão de triplicatas.	68
Tabela 4.5 - Velocidades iniciais de hidrólise enzimática obtidas para diferentes velocidades de agitação em shaker.....	70
Tabela 4.6 - Parâmetros do modelo de Chrastil.	74
Tabela 4.7 - Parâmetros obtidos por diferentes ajustes, sendo LB chute inicial para MM.	78
Tabela 4.8 - Parâmetros obtidos por diferentes ajustes, sendo LB chute inicial para MM (modificado).	86

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 A cana-de-açúcar.....	17
2.2 Composição química dos materiais lignocelulósicos.....	18
2.2.1 Celulose.....	18
2.2.2 Hemicelulose.....	20
2.2.3 Lignina.....	22
2.2.4 Outros componentes: extrativos.....	23
2.3 Pré-tratamento de materiais lignocelulósicos.....	24
2.3.1 Tipos de pré-tratamento.....	25
2.4 Hidrólise de Lignocelulósicos.....	26
2.4.1 Hidrólise enzimática.....	26
2.4.2 Celulases produzidas pelo fungo <i>Trichoderma reesei</i>	27
2.4.3. Sinergismo, modo de ação das celulases.....	28
2.5 Modelagem da hidrólise da celulose.....	32
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	51
3.1 Enzima.....	51
3.2 Substratos.....	51
3.3 Determinação da Atividade Total das Celulases.....	52
3.4 Pré-tratamento do Bagaço de Cana-de-açúcar.....	53
3.5 Caracterização do Bagaço de Cana-de-açúcar.....	54
3.6 Hidrólises Enzimáticas.....	56
3.6.1 Hidrólise Enzimática do Papel de Filtro.....	56
3.6.1.1 Influência da Temperatura.....	56

3.6.1.2 Influência da Agitação.....	56
3.6.1.3 Efeito da Concentração do Substrato	57
3.6.2 Hidrólise Enzimática do Bagaço de Cana-de-açúcar	57
3.6.2.1 Bagaço de Cana-de-açúcar Explodido Tratado com NaOH 4%.....	57
3.6.2.2 Bagaço de Cana-de-açúcar pré-tratado com H ₂ SO ₄ 1% Tratado com NaOH 4%.....	58
3.6.3 Quantificação de Açúcares Redutores (AR).....	58
3.6.4 Quantificação de Glicose.....	59
3.6.5 Quantificação de Carboidratos e Ácidos Orgânicos.....	60
3.7 Modelagem.....	61
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
4.1 Determinação da Atividade Total das Celulases	62
4.2 Caracterização do Bagaço de Cana-de-açúcar.....	64
4.3 Hidrólises Enzimáticas	65
4.3.1 Hidrólise Enzimática do Papel de Filtro.....	67
4.3.1.1 Influência da Temperatura.....	67
4.3.1.2 Influência da Agitação.....	69
4.3.1.3 Efeito da Concentração do Substrato	71
4.3.2 Hidrólise Enzimática do Bagaço de Cana-de-açúcar	73
4.3.2.1 Hidrólise do Bagaço de Cana-de-açúcar Explodido Tratado com NaOH 4%.....	73
4.3.2.2 Hidrólise do Bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com H ₂ SO ₄ 1% tratado com NaOH 4%	92
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos vem se observando no mundo um grande interesse pela utilização de resíduos agrícolas na obtenção de combustíveis renováveis, tais como o bioetanol. A reutilização e reciclagem destes resíduos podem minimizar os problemas ambientais ligados ao seu acúmulo e diminuir o uso de combustíveis fósseis, além de resultar em uma melhora no aproveitamento da matéria-prima, que é de grande interesse na atualidade. No Brasil, apesar da grande produção de etanol a partir da sacarose de cana de açúcar, a produção de álcool a partir de fontes alternativas de substrato pode ser interessante, principalmente se associada à indústria já existente. A utilização do bagaço de cana certamente ocupa uma posição de grande destaque, sendo economicamente viável para a produção de combustíveis ambientalmente corretos.

Para tornar a celulose mais acessível às enzimas celulolíticas, os materiais lignocelulosicos requerem um pré-tratamento para aumentar sua digestibilidade, pois são resistentes à bioconversão.

A biomassa lignocelulósica pode ser convertida para etanol. Uma das etapas para a obtenção do produto final é a hidrólise da celulose, ácida ou enzimática, onde celulose é convertida em glicose, que é posteriormente fermentada a etanol (GRANDA *et al.*, 2007). A hidrólise ácida de celulose ocorre em velocidade muito mais rápida, mas pode gerar subprodutos tóxicos ao microrganismo produtor de etanol, por degradação da glicose. A hidrólise enzimática embora mais cara, pelo alto custo das enzimas, pode ser operada sob condições mais brandas de trabalho, evitando formação de subprodutos e conduzindo a maiores rendimentos (GRANDA *et al.*, 2007).

São necessários, contudo, estudos cuidados das condições de hidrólise para se conseguir o funcionamento satisfatório dos processos de sacarificação, pois o rendimento da hidrólise é influenciado por vários fatores, sendo a heterogeneidade do processo um deles, já que celulose, o substrato, é sólido (INGESSON *et al.*, 2001).

Em reator de batelada agitado, a velocidade de reação global é determinada pelas velocidades de três eventos em sequência: (i) velocidade de transferência de massa de enzima, (ii) velocidade de adsorção da enzima na superfície do substrato e (iii) velocidade de catálise da celulase (GAN *et al.*, 2003). Assim, um estudo criterioso da cinética de hidrólise enzimática de celulose deve ser antecedido da determinação da velocidade de agitação

adequada ao sistema estudado, ou seja, da mínima velocidade de agitação que naquele sistema conduz a uma velocidade de difusão mais alta que a das etapas subseqüentes, evitando que o processo seja limitado pela primeira etapa.

A hidrólise de celulose por celulasas envolve ainda ação sinérgica de vários tipos de celulasas. As enzimas que hidrolisam a celulose são divididas em três grupos principais: endoglicanase, celobiohidrolase e β -glicosidase. Sinergismo é geralmente definido como o aumento da atividade exibido por uma mistura de enzimas comparada com a soma das atividades das enzimas individuais (AL-ZUHAIR, 2008). As endoglicanases atuam randomicamente ao longo da molécula de celulose, gerando um decréscimo significativo de seu grau de polimerização. As exoglicanases ou celobiohidrolases iniciam a hidrólise nas extremidades da cadeia, quebrando as unidades de celobiose das extremidades redutora e não redutora do polímero. Logo, as exoglicanases liberam a celobiose rompendo as ligações β -(1-4)-glicosídicas. As celobiasas ou β -glicosidases completam o trabalho, catalisando a hidrólise da celobiose a glicose.

Este trabalho faz parte do projeto temático FAPESP BIOENERGY PROGRAM - BIOEN, o qual visa a integração da pesquisa em bagaço de cana-de-açúcar e outras plantas que podem ser utilizadas como fontes de biocombustível, assegurando assim a posição do Brasil entre os líderes na área de Bioenergia. Nesse contexto o objetivo deste trabalho é estudar a cinética da hidrólise enzimática da celulose de bagaço de cana-de-açúcar, contribuindo para o melhor entendimento das dificuldades e limitações envolvidas no processo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar, *Saccharum officinarum*, é uma gramínea originária da Índia e introduzida no Brasil na época colonial, sendo hoje muito cultivada em regiões tropicais e subtropicais do país (Figura 2.1). É uma das mais ricas fontes de carboidrato na natureza.



Figura 2.1. A cana-de-açúcar

Assim como outros materiais lignocelulósicos, o bagaço de cana-de-açúcar é constituído principalmente por celulose, hemicelulose e lignina, podendo ser utilizado como fonte para produção de bioetanol.

No Brasil a previsão do total de cana que será moída é de aproximadamente 625 milhões de toneladas, segundo dados do terceiro levantamento de safra de 2010/2011. Desse total, 46,2% serão destinadas à produção de açúcar, o que deve gerar 38,7 milhões de toneladas do produto, enquanto 53,8% serão destinadas à produção de etanol, gerando um volume total de 27.669,55 milhões de litros (CONAB, 2011).

2.2 Composição química dos materiais lignocelulósicos

A dificuldade de converter o bagaço de cana e outros materiais lignocelulósicos sem insumos químicos é atribuída às características morfológicas existentes entre os três principais componentes da parede celular de plantas superiores, celulose (38 a 50%), hemicelulose (25 a 27%) e lignina (20 a 30%). Estruturas microfibrilares de celulose encontram-se embebidas em uma matrix composta por hemicelulose e lignina, cuja função estrutural é de agir como barreira natural à degradação enzimática e/ou microbiana (PITARELO, 2007; FENGEL e WEGENER, 1989). A Figura 2.2 mostra a composição média do bagaço de cana-de-açúcar.

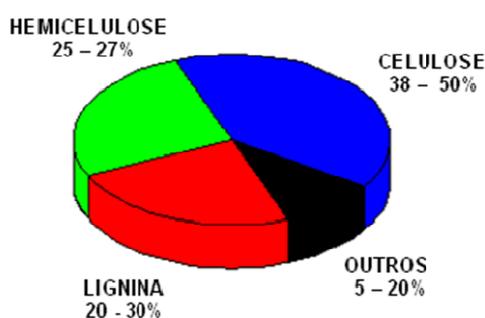


Figura 2.2. Composição média do bagaço de cana-de-açúcar.

2.2.1 Celulose

Celulose é o polímero de carboidrato existente mais abundante na natureza e tem sido utilizada por muito tempo como uma fonte de fornecimento de recursos de alimento e de energia (AL-ZUHAIR, 2007).

Respondendo isoladamente por aproximadamente 40% de toda reserva de carbono disponível na biosfera, a celulose é a fonte mais abundante deste elemento base dos componentes orgânicos (ZHANG *et al*, 2006). Está presente na natureza quase que exclusivamente nas plantas, embora seja produzida por alguns animais (ex. tunicados) e poucas bactérias. Apesar das grandes diferenças na composição e na estrutura anatômica da parede celular das plantas, uma alta concentração de celulose (geralmente na faixa aproximada de 35 a 50% da matéria seca da planta) é uma característica unificadora. Em

poucos casos a celulose está presente quase que pura (algodão). No entanto, na maioria dos casos, a celulose está embebida em uma matrix de outros biopolímeros estruturais, hemicelulose e lignina (LYND *et al*, 2002).

A estrutura química da celulose, que é um polímero linear constituído por unidades de anidroglucopirranose (β -D-glicopirranose) ligadas entre si por ligações glicosídicas do tipo β -(1,4), é de fato simples (Figura 2.3). Normalmente, as cadeias de celulose na parede celular vegetal têm graus de polimerização (GP) (números de unidades de D-glicoses unidas por ligações β -(1,4)) na faixa de 5000 a 7500 unidades de monômero de glicose, sendo esse grau de aproximadamente 10000 para madeira e 15000 para o algodão. Essas cadeias são constituídas por camadas, unidas por forças de van der Waals com ligações de hidrogênio intra e inter moleculares estando presentes (GAN *et al* 2003; WYMAN *et al*, 2005).

A unidade básica de repetição da celulose é a celobiose (duas unidades adjacentes formam uma ligação glicosídica através da eliminação de uma molécula de água, que envolve os grupos hidroxílicos dos carbonos 1 e 4). Na temperatura ambiente, os anéis de glicose, relativamente rígidos são encontradas em seu nível mais baixo de energia (WYMAN *et al*, 2005).

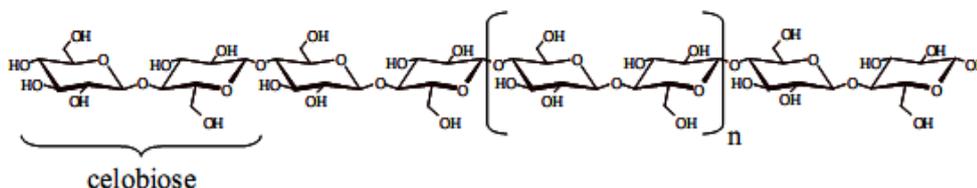


Figura 2.3. Representação da cadeia linear da celulose, formada por várias unidades consecutivas de celobiose (TÍMÁR-BALÁZSY E EASTOP, 1998).

A liberdade rotacional da cadeia linear da D-glicose permite que o carbono 1 seja atacado pela hidroxila do carbono 5, em reação intramolecular que resulta na formação de um hemiacetal. Após a reação de fechamento do anel, as hidroxilas do carbono anomérico (quiral) podem assumir duas possíveis orientações, axial ou equatorial, donde resultam os anômeros α e β . Em solução aquosa, as formas α e β se interconvertem por abertura e fechamento do anel (mutarrotação) até o momento em que se estabelece um equilíbrio, onde a β -D-glicopirranose corresponde a 62%, a α -D-glicopirranose a 38% e a forma aberta, a menos de 0,5%. Há a formação de uma cadeia redutora e outra não redutora, a cada quebra da ligação β -D (1,4) glicosídica. O grupo C1-OH terminal da cadeia redutora é um grupo aldeído hidratado, derivado da formação do anel piranose por ligação intramolecular hemiacetal. Este

grupo tem poder redutor, ao contrário do grupo alcoólico C4–OH terminal (grupo não redutor) (LEHNINGER *et al.*, 1995).

Muitos estudos sobre a hidrólise enzimática consideram a existência da celulose nativa em duas formas extremas: amorfas ou cristalinas. A celulose cristalina existe na forma de microfibrilas, as quais são conjuntos paracristalinos de várias cadeias de ligações β -D (1,4) glicosídica unidas por ligações de hidrogênio intra e intermoleculares. (LAUREANO-PEREZ *et al* 2005). O primeiro tipo de interação é responsável por certa rigidez das cadeias unitárias e o segundo pela formação da fibra vegetal (FENGEL e WEGENER, 1989).

Devido às suas fortes ligações de hidrogênio, a celulose é praticamente insolúvel em água e em solventes orgânicos comuns (HON, 1996). A Figura 2.4 mostra as ligações de hidrogênio na estrutura da celulose (PITARELO, 2007).

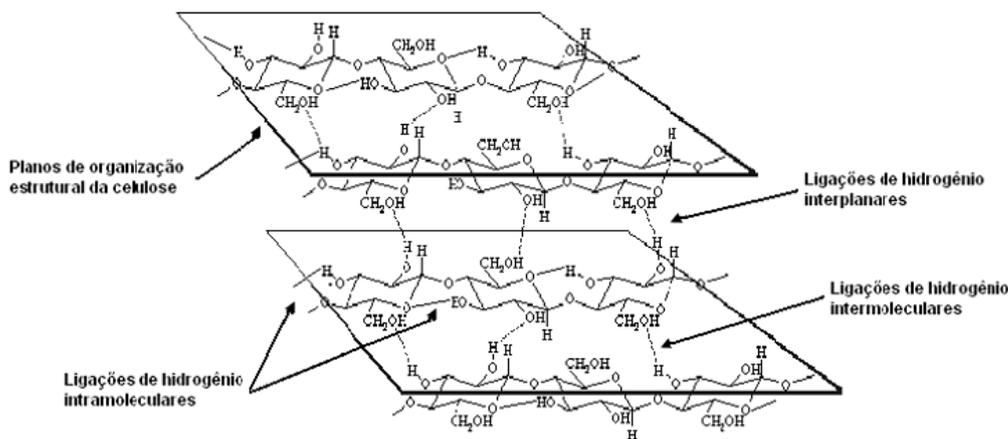


Figura 2.4. Ligações de hidrogênio na estrutura supramolecular da celulose.

2.2.2 Hemicelulose

As hemiceluloses são polímeros heterogêneos de pentoses (xilose, arabinose), hexoses (glicose, manose, galactose) e ácidos de açúcar. Ao contrário da celulose, hemiceluloses não são quimicamente homogêneas. As hemiceluloses de madeira dura contêm

principalmente xilanas, enquanto as hemiceluloses de coníferas contêm principalmente glicomananas (SAHA, 2003).

Estas diferentes unidades de açúcares são compostas por glicose, manose e galactose (hexoses) além da xilose e arabinose (pentoses), podendo ainda apresentar quantidades variáveis de ácidos urônicos e desoxi-hexoses em alguns tipos de vegetais. São estruturalmente mais parecidas com a celulose do que com a lignina e são depositadas na parede celular em um estágio anterior à lignificação. Sua estrutura apresenta ramificações e cadeias laterais que interagem facilmente com a celulose, dando estabilidade e flexibilidade ao agregado (RAMOS, 2003).

As hemiceluloses se encontram no bagaço de cana-de-açúcar na proporção de 25 a 27% e quando sofrem hidrólise ácida podem ser decompostas em xilose, arabinose, ácido urônico e furfural (PATURAU, 1989). O principal açúcar encontrado nas hemiceluloses do bagaço é a xilose (FENGEL e WEGENER, 1989).

Comparada à celulose, as hemiceluloses apresentam maior susceptibilidade à hidrólise ácida, pois oferecem uma maior acessibilidade aos ácidos minerais comumente utilizados como catalisadores. Esta reatividade é usualmente atribuída ao caráter relativamente amorfo destes polissacarídeos, que apresentam grande polidispersidade e GP bastante inferior ao da celulose nativa, geralmente não ultrapassando o valor médio de 200 unidades de anidroaçúcar. A Figura 2.5 mostra a representação esquemática de uma xilana típica de gramíneas (PITARELO, 2007)

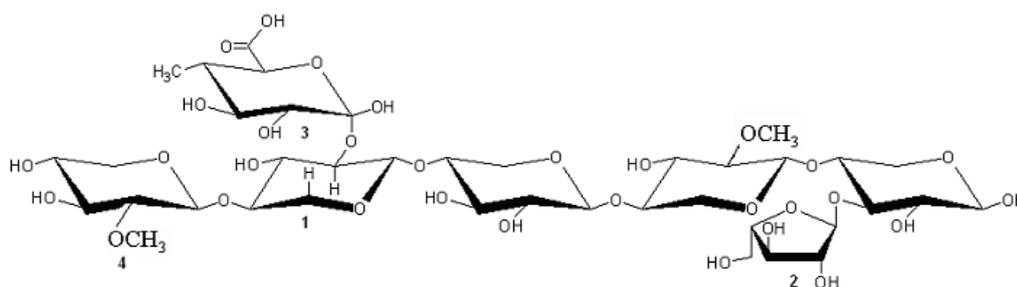


Figura 2.5. Representação esquemática de uma xilana de gramínea. 1,4-d-xilopiranosose (1); 1-arabinofuranose (2); ácido 4-o-metil- α -d-glucurônico (3); grupo acetil (4).

2.2.3 Lignina

A macromolécula orgânica mais abundante dentre os materiais lignocelulósicos depois da celulose é a lignina, e representa de 20 a 30% da massa total do material lignocelulósico. A lignina age como material adesivo, como agente de enrijecimento e como barreira contra degradação enzimática e/ou microbiana da parede celular (FENGEL e WEGENER, 1989).

A lignina é um polímero que possui uma estrutura polifenólica complexa, uma substância que vai sendo incorporada durante o crescimento do vegetal, sendo composta basicamente de unidades fenilpropano; pode ser definida como um material polifenólico amorfo com estrutura tridimensional baseada em três precursores monoméricos: os alcoóis p-cumarílico, coniferílico e sinapílico (Figura 2.6) (DENCE e LIN, 1992) que geram unidades p-hidroxibenzílicas, guaiacílicas e siringílicas, respectivamente.

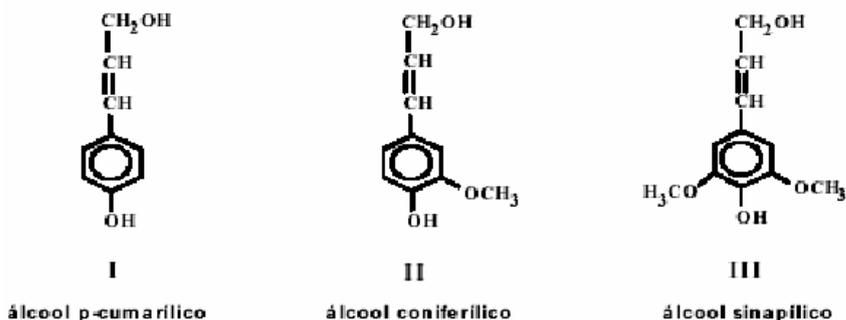


Figura 2.6. Precursores da biossíntese da lignina: (I) álcool p-cumarílico; (II) álcool coniferílico; (III) álcool sinapílico (FENGEL e WEGENER, 1989).

A lignificação é uma das etapas finais da diferenciação de células do xilema, onde a lignina é depositada juntamente com os carboidratos, formando ligações covalentes com unidades monossacarídicas das hemiceluloses.

Um modelo proposto para lignina de *Fagus sp* é mostrado na Figura 2.7

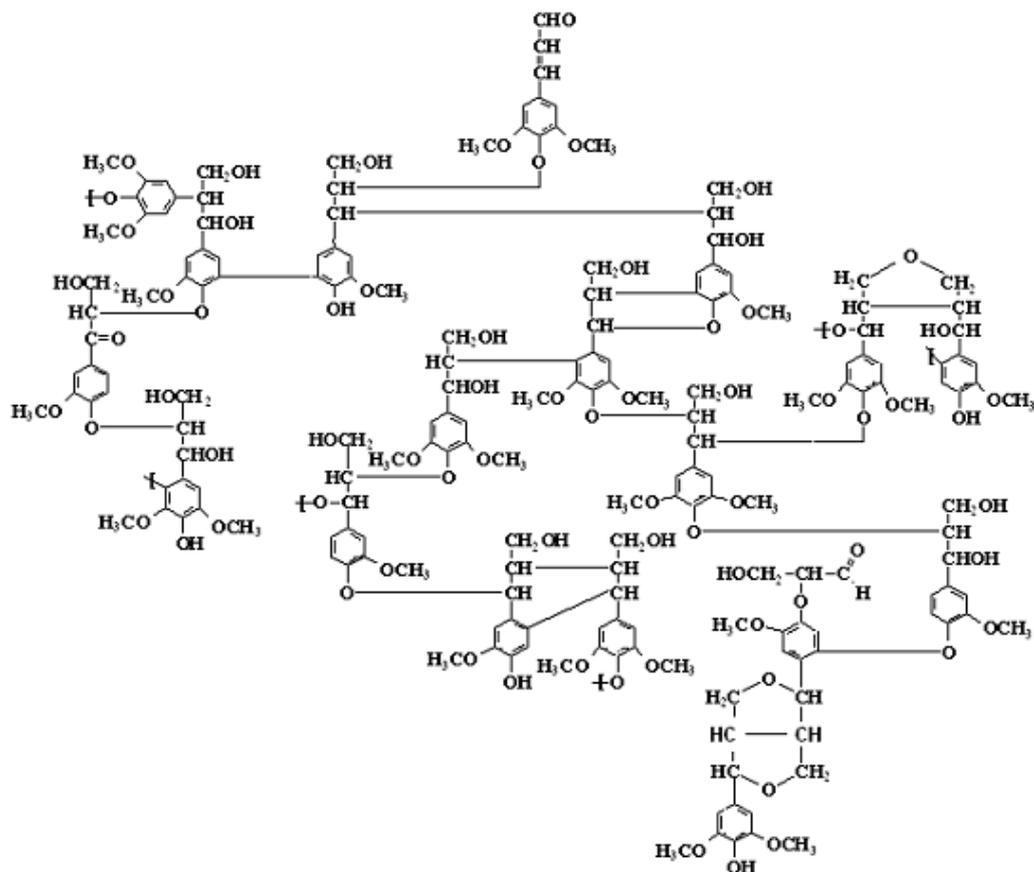


Figura 2.7. Estrutura da lignina de *Fagus sp* (FENGEL e WEGENER, 1989)

2.2.4 Outros componentes: extrativos

Os extrativos do bagaço compreendem uma grande variedade de substâncias químicas, entre elas: terpenos/terpenóides, gorduras/ceras, vários tipos de compostos fenólicos, assim como proteínas e cinzas. Essas substâncias podem ser extraídas utilizando solventes polares e apolares (RABELO, 2007).

A soma desses componentes varia em cada espécie de matéria lignocelulósica e representa aproximadamente 5 a 20% de todo material. Esses constituintes são freqüentemente responsáveis por determinadas características da planta, como cor, cheiro, resistência natural ao apodrecimento, sabor e propriedades abrasivas (FENGEL e WEGENER, 1989; D'ALMEIDA, 1988).

2.3 Pré-tratamento de materiais lignocelulósicos

A presença de lignina e hemicelulose dificultam o acesso das enzimas celulases à celulose, reduzindo a eficiência da hidrólise. Por isso existe a necessidade do emprego de um método de pré-tratamento que amenize a interação entre os principais componentes da fitobiomassa e os tornem susceptíveis à conversão em biocombustíveis.

O pré-tratamento consiste em quebrar o elo da lignina e romper a estrutura cristalina da celulose (Figura 2.8). Resulta na ampliação da área superficial interna das partículas do substrato, realizada através da solubilização e/ou pela degradação parcial da hemicelulose e da lignina. Isto leva a quebra dos três componentes e leva à abertura da estrutura da celulose (PANDEY *et al.*, 2000). Um pré-tratamento eficaz deve atender aos seguintes requisitos: evitar a necessidade de reduzir o tamanho das partículas da biomassa, limitar a formação dos produtos da degradação que inibem o crescimento dos microrganismos fermentativos, minimizar a demanda de energia. Diversos tipos de processos têm sido usados para o pré-tratamento dos materiais lignocelulósicos (SUN e CHENG, 2002).

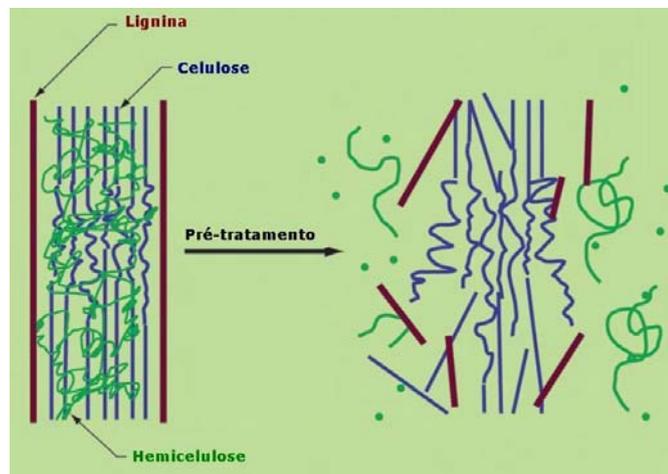


Figura 2.8. Função do pré-tratamento da biomassa para conversão em combustível. (HSU *et al.*,1980).

2.3.1 Tipos de pré-tratamento

Vários métodos de pré-tratamento têm sido propostos na literatura para separação e aproveitamento de materiais lignocelulósicos. Tais técnicas são baseadas em processos físicos, químicos, biológicos ou na combinação destes.

Dos vários processos descritos na literatura, (Tabela 2.1) os mais comuns são baseados no emprego de álcali, hidrólise ácida, explosão a vapor, água quente, fluido supercrítico, amônia líquida e hidróxido de sódio, todos com o propósito de desagregar a estrutura associativa da lignocelulose para produzir combustíveis renováveis ou insumos químicos a partir da biomassa (GÁMEZ *et al.*, 2006; LASER *et al.*, 2002; CUNHA *et al.*, 2001;).

Tabela 2.1. Exemplo dos métodos de pré-tratamentos mais utilizados (HAMELINCK *et al.*, 2005 *apud* RABELO, 2007).

Processo	Descrição
Físico	
Explosão á vapor	A biomassa triturada é tratada com vapor (saturado, 160 a 260 C) seguida de uma rápida descompressão.
Termohidrólise	Utiliza água quente e alta pressão (pressões acima do ponto de saturação) para hidrolisar a hemicelulose
Químicos	
Hidrólise ácida	Por meio do uso de ácidos sulfúrico, clorídrico ou nítrico, concentrados ou diluídos
Hidrólise alcalina	Pelo uso de bases como hidróxido de sódio ou cálcio
Organosolv	Uma mistura de um solvente orgânico (metanol, bioetanol e acetona, por exemplo) com um catalisador ácido (H ₂ SO ₄ , HCl) é usada para quebrar as ligações internas da lignina e da hemicelulose
Biológicos	Utilização de fungos para solubilizar a lignina. Geralmente é utilizado em combinação com outros processos.
Combinados	
Explosão de vapor catalisada	Adição de H ₂ SO ₄ (ou SO ₄) ou CO ₂ na explosão de vapor pode aumentar a eficiência da hidrólise enzimática, diminuir a produção de compostos inibidores e promover uma remoção mais completa da hemicelulose
Afex (ammonia fibre explosion)	Exposição à amônia líquida a alta temperatura e pressão por um certo período de tempo, seguida de uma rápida descompressão
Explosão de CO ₂	Similar à explosão de vapor

2.4 Hidrólise de Lignocelulósicos

Duas técnicas têm sido amplamente empregadas para a obtenção de açúcares fermentescíveis provenientes de materiais lignocelulósicos. São elas a hidrólise com ácido diluído ou concentrado e hidrólise enzimática.

Embora os ácidos concentrados sejam fortes agentes na hidrólise da celulose, eles são tóxicos, corrosivos e requerem reatores que sejam resistentes a essa corrosão. É necessário também recuperar esse ácido no fim do processo para que essa hidrólise seja economicamente viável. Normalmente quando se utilizam esses ácidos, a fração de hemicelulose hidrolisa-se mais rapidamente que a fração de celulose, e são expostos no meio reacional, por muito tempo, os monossacarídeos liberados da hemicelulose, o que leva à degradação e perda desses açúcares. No uso de ácido diluído, devido às altas temperaturas empregadas, uma quantidade considerável de açúcares e lignina solúvel é degradada levando a uma inibição durante o processo de fermentação (SUN e CHENG, 2002).

Para a hidrólise enzimática, primeiramente a biomassa lignocelulósica precisa ser pré-tratada, fazendo com que haja um aumento na acessibilidade ao ataque enzimático. Na hidrólise enzimática, a celulose é quebrada através das enzimas celulasas, e não há formação de subprodutos devido à especificidade das enzimas, resultando em um alto rendimento de açúcares fermentescíveis. Entretanto, é necessário altas concentrações de enzima para atingir uma alta conversão da celulose, aumentando o custo de produção (EKLUND *et al.*, 1990).

2.4.1. Hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática da celulose é realizada pelas enzimas celulasas, as quais são altamente específicas em relação ao substrato, reduzindo subprodutos indesejáveis obtidos na reação, conseqüentemente levando a uma diminuição dos custos de separação dos produtos (SEGEL, 1975). Essa especificidade da enzima evita que ocorra degradação da glicose, o que pode ocorrer na hidrólise ácida (CONTIERO, 1992).

Para uma hidrólise efetiva é necessário aperfeiçoar as condições de hidrólise, pois o rendimento da hidrólise é governado por alguns fatores como o tipo de pré-tratamento

do substrato, inibição da atividade enzimática pelos produtos finais da biodegradação, termoestabilidade das enzimas, concentração e adsorção do substrato, tempo de duração da hidrólise, pH do meio, concentração de substrato no meio e velocidade de agitação (VALLANDER e ERIKSSON,1985).

Segundo Gan *et al.* (2003), na hidrólise enzimática ocorre a transferência de massa das moléculas de enzima através da camada estagnada de filme líquido que cerca as partículas sólidas de celulose e depois a difusão interna das moléculas de enzima na matriz sólida. Estas resistências à transferência de massa podem influenciar a velocidade de reação global. No começo da hidrólise, no caso de reação em reator batelada agitado, a taxa de reação global é determinada pelas taxas de três eventos em seqüência: (1) a taxa de transferência de massa da enzima, (2) a taxa de adsorção da enzima na superfície do substrato e (3) a taxa de catálise da celulase. Com a continuação da hidrólise após a primeira fase de reação rápida, a taxa de reação global começa a depender da maior penetração da enzima e difusão dentro do substrato sólido. A grande maioria dos autores, no entanto, ignora a resistência à transferência de massa externa, que supõem insignificante em comparação com a catálise, mais lenta. São considerados passos críticos na hidrólise enzimática da celulose, a adsorção das enzimas celulases e a formação do complexo enzima-substrato. A adsorção de celulase na celulose insolúvel já foi descrita como reversível, irreversível e semi-reversível, não se tendo chegado a um consenso em relação a este ponto.

2.4.2 Celulases produzidas pelo fungo *Trichoderma reesei*

Celulases de fungos aeróbios receberam mais estudo do que qualquer outro grupo fisiológico, e as celulases provenientes de fungos dominam atualmente as aplicações industriais das celulases. Em particular, o sistema da celulase de *T.reesei* foi foco de pesquisas por 50 anos. *T.reesei* produz pelo menos duas exoglicanases (celobiohidrolases) (CBHI e CBHII), seis endoglicanases (EGI, EGII, EGIII, EGIV, EGV e EGVI) e duas β -glicosidases (BGLI e BGLII) (SALOHEIMO *et al.*, 1997; SALOHEIMO *et al.*, 2002; SRISODSUK, 1994).

A necessidade de duas exoglicanases é atribuída a suas preferências particulares por finais de cadeias redutoras (CBHI) e não redutoras (CBHII), da celulose

cristalina. Atividade da celobiohidrolase é essencial para a hidrólise da celulose microcristalina. CBHI e CBHII são os principais componentes do sistema de celulase do *T. reesei*, representando 60 e 20%, respectivamente, do total de proteína de celulase produzida por fungos numa base de massa. (LYND *et al*, 2002).

A maioria das celulases dos fungos e todas aquelas produzidas pelo *T. reesei* são constituídas por dois domínios funcionais e estruturalmente distintos. O primeiro, designado domínio catalítico, constitui a maior parte da proteína. Já o segundo domínio é responsável pela ligação da enzima ao substrato designado por “Core Binding Domain” (CBD). Os dois domínios estão ligados por uma seqüência altamente glicosídica (“linker”) como mostra a Figura 2.9. Das celulases identificadas até hoje, apenas EGIII não possui CBD e o “linker” (SALOHEIMO *et al.*, 1997; SRISODSUK, 1994).

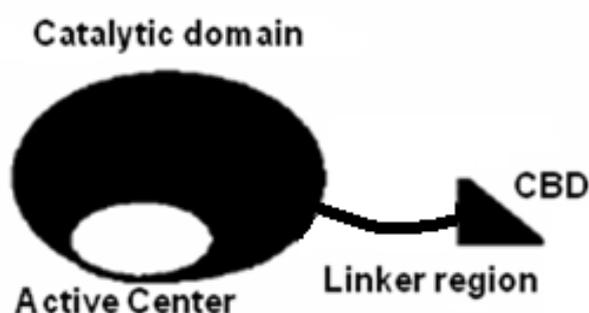


Figura 2.9. Representação esquemática de uma celulase (BANSAL *et al*, 2009).

2.4.3. Sinergismo, modo de ação das celulases

Hidrólise de celulose requer ações de sinergismo de várias celulases em um sistema de reação heterogênea, e esse fato determina que o mecanismo dessa reação seja altamente complexo dificultando a modelagem matemática. Sinergismo é geralmente definido como o aumento da atividade exibido por uma mistura de enzimas comparada com a soma das atividades das enzimas individuais (GAN *et al*, 2003; ZHANG e LYND, 2004).

Como apresentado no tópico 2.2.1 a celulose é composta por partes cristalinas e amorfas. A parte amorfa, devido a sua maior área superficial é mais suscetível à hidrólise enzimática do que a forma ordenada ou cristalina. A celulose cristalina, por ser uma região

bastante organizada apresentando grandes quantidades de ligações de hidrogênio, dificulta bastante o processo de hidrólise. Cada tipo de celulase acaba atacando preferencialmente uma região específica da celulose (O'DWYER *et al.*, 2007).

Em estudos com celulose pura, as regiões amorfas apresentaram degradação por enzimas fúngicas, de 5 a 10 vezes mais rápida do que as celulosas altamente cristalinas. Isto sugere que as altas velocidades iniciais são devidas à hidrólise preferencial das regiões amorfas, mais facilmente degradadas, e essa velocidade diminui assim que essas enzimas encontram regiões cristalinas mais recalcitrantes (O'DWYER *et al.*, 2007).

As endoglicanases atuam randomicamente ao longo da molécula de celulose, gerando um decréscimo significativo de seu grau de polimerização. Logo as exoglicanases ou celobiohidrolases CBHI e CBHII iniciam a hidrólise nas extremidades da cadeia, quebrando as unidades de celobiose das extremidades redutora e não redutora do polímero, respectivamente. As exoglicanases liberam a celobiose rompendo as ligações β -(1-4)-glicosídicas. As celobiasas ou β -glicosidasas completam a hidrólise catalisando a hidrólise da celobiose a glicose. Portanto, as celobiasas hidrolisam a celobiose e as celodextrinas solúveis em água a glicose. O máximo sinergismo é obtido com uma elevada quantidade de exoglicanases na mistura e depende do tipo de substrato usado (NIDETZKY *et al.*, 1993). A Figura 2.10 mostra uma representação esquemática da hidrólise da celulose e a ação das endoglicanases, exoglicanases e β -glicosidasas de *Trichoderma reesei*.

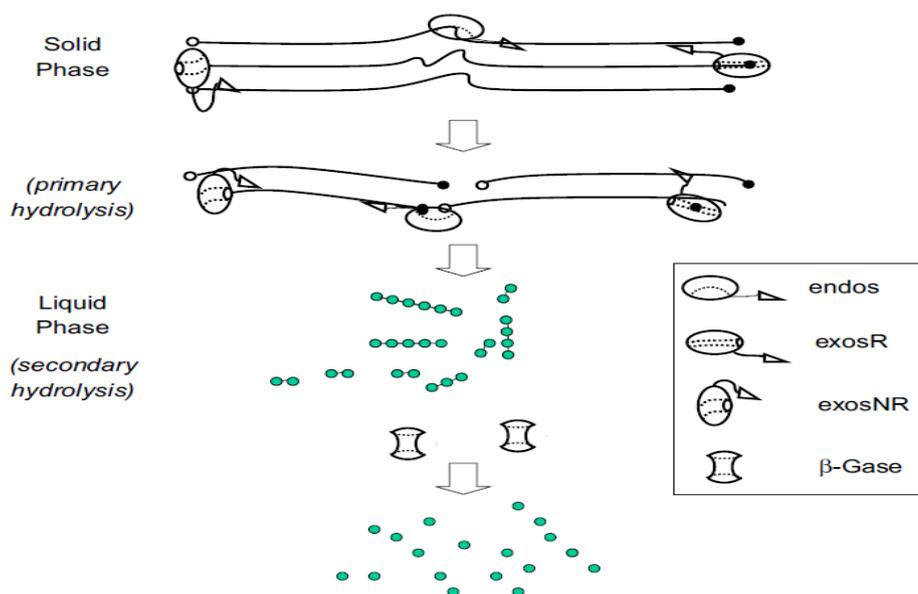


Figura 2.10. Representação esquemática da hidrólise da celulose e da ação do CBHs, EGs, e β -glicosidasas (β -gluc) de *Trichoderma reesei*. Onde ExosR são as enzimas que atacam os grupos terminais redutores, e ExosNR os não redutores (ZHANG *et al*, 2006).

O sinergismo entre endoglicanases e exoglicanases é o tipo de sinergismo mais amplamente estudado e está entre os mais importantes para a hidrólise de celulose cristalina. Representação quantitativa do grau de sinergismo é normalmente expressa em termos de grau de sinergismo (GS), igual à razão entre a atividade de misturas de enzimas e a soma das atividades das enzimas separadas. A Tabela 2.2 apresenta o grau máximo de sinergismo exo/endo para diferentes substratos (ZHANG e LYND, 2004).

Este sistema complexo de enzimas necessita ser mantido estável para a atividade celulolítica elevada. A partir da ação dessas enzimas na celulose, a celobiose e a glicose são obtidas, e enquanto a concentração dos respectivos produtos aumenta gradualmente no meio reacional, as atividades dessas enzimas são inibidas por estes produtos, tendo por resultado uma diminuição final na taxa e no rendimento do processo de sacarificação. (ZHANG e LYND, 2004; GAN *et al*, 2003).

Sabe-se que enzimas celulases são inibidas por celobiose, glicose ou ambos produtos. O padrão dessa inibição tem sido objeto de pesquisa por um longo tempo, com muitas diferentes visões na natureza dessa inibição. De acordo com Kastel'yanos *et al.*(1995) glicose inibe a celobiase, celobiose inibe as endoglicanases e/ou as exoglicanases (GAN *et al*, 2003).

Tabela 2.2. Grau máximo de sinergismo exo/endo para diferentes substratos (adaptado de ZHANG e LYND, 2004).

Fonte	Combinação	Grau máximo de sinergismo			Referência
		<2	2 a 5	>5	
<i>T. reesei</i>	CBH1/EG1		1.3–1.4(Av)		Medve <i>et al</i> ,1998
<i>T. reesei</i>	(CBH1+ CBH2)/EG1		1.5–2 ² (Av)		Woodward <i>et al</i> ,1988a
<i>T. reesei</i>	CBH1, CBH2/EG1		≈2(Av)		Baker <i>et al</i> ,1998
<i>T. reesei</i>	CBH1/EG1		1.5–2(b)		Srisodsuk <i>et al</i> , 1998
<i>T. reesei</i>	CBH1/EG1	1.7 (c)	4.1(c)	7.8(B C)	Valjamae <i>et al</i> , 1999
<i>T. reesei</i>	CBH1/EG2	1.5 (AC)	2.1(Av)	3.2 (ct)	Hoshino <i>et al</i> , 1997
<i>T. reesei</i>	CBH1/EG2			≈6(B C)	Valjamae <i>et al</i> , 1999
<i>T. reesei</i>	CBH1/EG1	2.2(Av) , 2.5(d)	2.2(Av), 2.5(d)	3 (FP) 5 (BC)	Henrissat <i>et al</i> , 1985

*Av, Avicel; FP, papel filtro; ct, algodão; BC, celulose bacteriana; AC, celulose amorfa; a, Avicel tratado com ácido; b, algodão tratado com ácido; c, celulose bacteriana tratada com ácido; d, Avicel homogenizado.

2.5 Modelagem da hidrólise da celulose

A modelagem da hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos é provavelmente um dos temas mais desafiadores em engenharia de (bio) reatores até o presente, e o número substancial de publicações e revisões sobre este tema reflete esta situação.

Zhang e Lynd (2004) revisaram a hidrólise enzimática de celulose a partir da perspectiva do desenvolvimento de uma compreensão global da ação do pool enzimático. O ponto chave desta abordagem é incorporar dentro do modelo, informações referentes a outras propriedades do substrato além da sua concentração no meio. Assim, um esquema de classificação foi proposto para os modelos, com base no grau de detalhamento da descrição das variáveis de estado do substrato e/ou das atividades das diferentes enzimas que estão atuando. Os modelos foram classificados pelos autores nas seguintes categorias: não-mecanísticos, semi-mecanísticos, funcionais e estruturais.

Modelos não-mecanísticos, os quais não são baseados em um modelo de interação enzima/ substrato defensível, podem ser muito úteis para correlação de dados, apesar de não melhorarem a compreensão fenomenológica do sistema.

Modelos semi-mecanísticos são baseados em um modelo defensível de interação enzima/substrato, mas usando apenas concentração como a variável de estado do substrato e / ou com apenas uma atividade enzimática global. Além de sua utilidade para a correlação de dados, modelos semi-mecanísticos também podem ser úteis para a identificação de algumas características essenciais do mecanismo de hidrólise.

Modelos funcionais vão além, incluindo variáveis adicionais de estado do substrato, tal como cristalinidade, e considerando a ação de várias enzimas. No entanto, os modelos funcionais podem levar a um grande número de parâmetros, exigindo uma grande quantidade de dados experimentais para um ajuste adequado do modelo, o que pode desencorajar a sua aplicação.

Finalmente, os modelos estruturais, que usam informações estruturais da matriz lignocelulósica, podem ser úteis para fornecer informações sobre a relação entre estrutura e função. O desenvolvimento de modelos cinéticos significativos com base em informações estruturais, entretanto, ainda é um grande desafio.

Wang *et al.* (2004) propuseram um modelo cinético empírico para a degradação enzimática de fibras de algodão. Um modelo de regressão multivariável e não-linear (equação 1) é usado para postular a interação entre três variáveis independentes (X1 X2 e X3) para prever a conversão de substrato em açúcares redutores totais (ART), a saída do modelo (\hat{Y}). X1, X2 e X3 representam os efeitos da celobiohidrolase, endoglicanase e β -glicosidase, respectivamente; X4, X5, X6 e X7 representam os efeitos sinérgicos entre eles.

$$\hat{Y} = b_0 + b_1 X_1 + b_2 X_2 + b_3 X_3 + b_4 X_4 + b_5 X_5 + b_6 X_6 + b_7 X_7 \quad (1)$$

A análise sugere que a degradação enzimática da fibra de algodão é um processo progressivo. As fibras de celulose foram inicialmente despolimerizadas ou solubilizadas pelo sinergismo entre celobiohidrolase I e endoglicanase I e, em seguida, os oligômeros obtidos foram aleatoriamente hidrolisados em glicose pela endoglicanase I e β -glicosidase. Este é um exemplo de como um modelo pode fornecer informações sobre o mecanismo catalítico, uma vez que o significado dos efeitos cruzados indicou a tendência da ação do pool enzimático. Os autores argumentam que o modelo pode ser aplicado para a estimativa quantitativa dos efeitos dos três componentes da celulase, celobiohidrolase I, endoglicanase I e β -glicosidase, separadamente ou em combinação, durante todo o processo de degradação da celulose. Naturalmente, essa afirmação deve ser posta em perspectiva, uma vez que tal modelo de dados dificilmente seria útil quando o substrato ou pool enzimático é alterado.

Li *et al.* (2004) examinaram a hidrólise enzimática de várias polpas celulósicas em Erlenmeyers agitados. Para aumentar a sacarificação, a reação também foi realizada em um reator tanque agitado com irradiação ultra-sônica contínua. Uma equação pseudo-homogênea de Michaelis-Menten com inibição (por açúcares totais) foi então ajustada. Os açúcares seriam produzidos a partir de um substrato solúvel hipotético cuja concentração inicial corresponderia à conversão final do substrato (equação 2). Esta abordagem reflete uma dificuldade que muitas vezes não recebe atenção nos modelos publicados: como quantificar a concentração de substrato, para um polímero que é inicialmente sólido e gradualmente tornado solúvel? De fato, o "substrato" são as ligações glicosídicas hidrolisáveis, mas como quantificar com rigor a sua molaridade ou concentração em massa? É muito importante que as suposições feitas pelo modelador sobre este ponto estejam claramente definidas.

$$\frac{dT}{dt} = \frac{kE_0(T_\infty - T)}{K_m[1 + (1/K_I)T] + 0.9(T_\infty - T)} \quad (2)$$

Na equação 2, T_∞ indica o valor máximo da concentração de açúcares totais, T . Assim, $0,9 (T_\infty - T)$ é a concentração hipotética de substrato no mecanismo pseudo-homogêneo de Michaelis-Menten (o fator 0,9 leva em conta uma média estequiometria da hidrólise); k é a constante de velocidade aparente, K_M é a constante aparente de Michaelis e K_I é proposto para ser a constante de inibição competitiva aparente entre açúcares totais e celulase. E_0 é a concentração inicial da enzima; t é o tempo. O modelo foi validado contra os dados de açúcar redutor total e liberação de glicose durante a sacarificação com ou sem irradiação ultra-sônica. Os autores descobriram que a variação nas propriedades da polpa e da intensidade da irradiação ultra-sônica mudou a constante de velocidade aparente k , mas não teve efeito sobre as constantes aparentes de Michaelis e de inibição competitiva pelo produto.

Bezerra e Dias (2004) investigaram a cinética de uma exoglucanase (Cel7A, do fungo *Trichoderma reesei*) na presença de celobiose, com diferentes proporções de enzima/substrato (Avicel), a fim de determinar qual de oito modelos de Michaelis-Menten modificados de hidrólise explicaria melhor o comportamento observado. Os parâmetros cinéticos foram estimados por mínimos quadrados não-linear, empregando formas integradas de equações de Michaelis-Menten. Verificou-se que a velocidade de hidrólise da celulose, v , seguiu um modelo que leva em conta inibição competitiva por celobiose (como na equação 3).

$$v = \frac{V_{\max} S_0}{K_m [1 + (P / K_{ic})] + S_0} \quad (3)$$

V_{\max} é a velocidade máxima, S é a celulose (transformada em celobiose potencial), P (produto) é a celobiose, o índice 0 é a concentração inicial em $t = 0$. K_m é a constante de Michaelis-Menten e K_{IC} é a constante de inibição (competitiva). Outros modelos, incorporando inibições mistas e melhorias como a inibição pelo substrato, aumentaram apenas ligeiramente o desempenho do modelo.

Em outro trabalho, Bezerra e Dias (2005) estudaram o efeito de inibição por etanol em celulasas de *Trichoderma reesei*. Para determinar os parâmetros de inibição para celulase bruta e para uma exoglucanase purificada (Cel7A), (novamente) equações integradas de Michaelis-Menten foram utilizadas, considerando a presença de dois inibidores: celobiose, como um produto de hidrólise, e etanol. Hidrólise da celulose por Cel7A purificada

apresentou inibição competitiva por ambos, celobiose e etanol. A hidrólise da celulose pela enzima bruta seguiu um modelo que considerou também a inibição não-competitiva (como na equação 4).

$$v = \frac{V_{\max} S_0}{K_m [1 + (I / K_{ic})] + S_0 [1 + (I / K_{iu})]} \quad (4)$$

Na equação (4), I representa a concentração de etanol mais a concentração de celobiose e K_{iu} é uma constante de inibição (não competitiva). O etanol foi um inibidor mais efetivo para enzima bruta do que para a exoglucanase Cel7A, mas a inibição da celobiose era muito mais importante do que a inibição do etanol em ambos os casos.

Carrillo *et al.* (2005) estudaram a cinética da hidrólise da palha de trigo pré-tratada (hidróxido de sódio), com diferentes concentrações de celulase comercial. Em comparação com a palha de trigo não tratada, o pré-tratamento de deslignificação aumentou a hidrólise. A influência da concentração de enzimas na produção de açúcares redutores foi estudada considerando duas diferentes abordagens teóricas: Na primeira, o modelo de hidrólise e seus parâmetros cinéticos foram determinados a partir de velocidades iniciais assumindo um mecanismo de Michaelis-Menten, mas com um substrato sólido e enzima solúvel. Isto implica que as concentrações de enzima e substrato são trocados nas equações de Michaelis, a enzima, em vez do produto, sendo liberada ao meio, no final da seqüência de reação. Assim, a velocidade inicial de hidrólise pode ser expressa como uma função da concentração inicial da enzima (como na equação 5).

$$v_0 = \frac{V_{e\max} E_0}{K_e + E_0} \quad (5)$$

v_0 é a velocidade inicial de hidrólise, $V_{E\max}$ é a velocidade máxima e K_e é a constante correspondente de meia-saturação.

Na segunda estratégia, a abordagem de Chrastil (1988 e 1988b, como na equação 6) foi utilizada. Todas as constantes de tempo da velocidade de formação do produto são classificadas, levando em conta que em um sistema heterogêneo as curvas de tempo dependem fortemente das estruturas heterogêneas limitantes do sistema enzima-substrato, incluindo a resistência de difusão da enzima. Com essa análise, características cinéticas e estruturais adicionais podem ser inferidas, as quais não podem ser reveladas a partir da análise

da velocidade inicial, tal como proposto por Henri-Michaelis-Menten. Os parâmetros n e k' oferecem informação quantitativa sobre a estrutura estérica geral do sistema de difusão e propriedades catalíticas, respectivamente, e podem ser úteis para acompanhar as mudanças que necessariamente ocorrem no sistema enzima-substrato, enquanto a solubilização da celulose avança.

$$P = P_{\infty} [1 - \exp(-k' E_0 t)]^n \quad (6)$$

P e P_{∞} são os produtos que difundem no tempo t e no equilíbrio, respectivamente, k' é uma constante de velocidade proporcional ao coeficiente de difusão e n é uma constante de resistência difusional estrutural dependente da estrutura estérica do sistema. Quando a resistência de difusão é pequena, n tende a 1. Se o sistema é fortemente limitado pela resistência de difusão, n é pequeno, da ordem de 0,6. Pode-se concluir deste trabalho que abordagens distintas para a modelagem cinética podem ser complementares, ajudando na compreensão das mudanças na dinâmica do sistema, enquanto a reação se processa. Na verdade, essa é uma dificuldade, muitas vezes presente quando se tenta encaixar equações pseudohomogêneas simples de Michaelis-Menten para experimentos de longa duração de hidrólise da celulose.

Kadam *et al.* (2004) desenvolveram um modelo cinético semi-mecanístico multireacional em que três reações de hidrólise foram modeladas, uma reação heterogênea para a quebra da celulose para a celobiose, outra reação heterogênea para a formação de glicose a partir de celulose e uma reação homogênea para hidrolisar celobiose a glicose. A adsorção da celulase na lignocelulose foi modelada por uma isoterma de Langmuir (como na equação 7).

$$E_{iB} = \frac{E_{i\max} K_{iad} E_{iF} S}{1 + K_{iad} E_{iF}} \quad (7)$$

E_{iB} é a concentração de enzima adsorvida, E_{iF} é a concentração de enzima livre, $E_{i\max}$ é a massa máxima de enzima que pode ser adsorvida em uma unidade de massa de substrato, e K_{iad} é a constante de dissociação para a reação de adsorção/dessorção da enzima. Os produtos da hidrólise, celobiose, glicose e também xilose foram considerados como inibidores competitivos para as reações enzimáticas (ver equações 8a-8c).

$$r_1 = \frac{k_{1r} E_{1B} R_S S}{1 + \frac{G_2}{K_{1G2}} + \frac{G}{K_{1IG}} + \frac{X}{K_{1IX}}} \quad (8a)$$

$$r_2 = \frac{k_{2r} (E_{1B} + E_{2B}) R_S S}{1 + \frac{G_2}{K_{2IG2}} + \frac{G}{K_{2IG}} + \frac{X}{K_{2IX}}} \quad (8b)$$

$$r_3 = \frac{k_{3r} E_{2F} G_2}{K_{3M} \left(1 + \frac{G}{K_{3IG}} + \frac{X}{K_{3IX}}\right) + G_2} \quad (8c)$$

r_1 é a reação de hidrólise de celulose a celobiose com inibição competitiva por glicose, celobiose e xilose; r_2 é a reação de celulose a glicose com inibição competitiva por glicose, celobiose e inibição da xilose; r_3 é a reação de celobiose a glicose com inibição competitiva de glicose e xilose. S é a concentração de celulose em um determinado momento, G é a concentração de glicose, G_2 é a concentração de celobiose, X é a concentração de xilose, K_{iIG} são constantes de inibição de glicose nas enzimas, K_{iIG2} são constantes de inibição de celobiose nas enzimas, K_{iIX} são constantes de inibição de xilose nas enzimas, K_{3M} é a constante de saturação do substrato (celobiose), R_S é a reatividade do substrato (adimensional). Em uma tentativa de representar todas as transformações do substrato durante a hidrólise enzimática, elas foram reunidas em um único parâmetro, R_S , que foi correlacionado com a concentração de substrato normalizada ($R_S = S/S_0$). Estes parâmetros do modelo foram estimados a partir de dados experimentais para a palha de milho pré-tratado, e sua correspondência com os dados experimentais foi boa.

Zhang e Lynd (2006) apresentaram um modelo cinético funcional para a hidrólise enzimática da celulose por celulasas de *Trichoderma reesei*. O modelo representa as ações de endoglicanase I (EG1) e celobiohidrolases (CBH) I e II. Ele também incorpora dois parâmetros do substrato: o grau de polimerização e da fração de ligações β -glicosídicas acessíveis a celulase.

A ação de endoglicanase é consistente com um mecanismo postulado que EG1 livre adsorve a uma molécula de celulose para formar um complexo enzima-celulose. A adsorção ocorre aleatoriamente em relação ao comprimento da cadeia, e a constante de equilíbrio de adsorção (equação 9) descreve a distribuição com relação a moléculas de celulose de todos os comprimentos.

$$K_{dis}^{EG1} = \frac{EG1_f \sum_{i=n} [F_a (i-1)G_i]}{\sum_{i=n} EG1G_i} \quad (9)$$

A quantidade $(i-1)G_i$ denota a concentração total de ligações β -glicosídicas em cadeias de celulose de DP_i . Multiplicando pela fração de ligações acessíveis a celulase, F_a , tem-se a concentração de ligações acessíveis nas cadeias de DP_i . Na segunda etapa do mecanismo, a hidrólise das moléculas de celulose de DP_i para produtos menores é considerada. A equação 10 é uma equação para a velocidade global de formação de G_i , devido à ação de EG1.

$$r_{Gi}^{EG1} = \frac{k_{EG1} EG1_i (2 \sum_{k=i+1} F_a G_k - F_a (i-1)G_i)}{K_{dis}^{EG1} + \sum_{i=n} F_a (i-1)G_i} \quad (10)$$

G_i e G_k são moléculas de celulose com um comprimento de cadeia (DP) de i e k , respectivamente, k_{EG1} é a constante de velocidade das ligações β -glicosídicas clivadas de EG1, t é enzima total, enquanto que f é a enzima livre.

Hidrólise de celulose por celobiohidrolases tiveram equações de velocidade em função do grau de polimerização e da fração de ligações β -glicosídicas acessível a celulase.

Esta é uma tentativa de uma abordagem racional e fenomenológica, que incorpora informações sobre a estrutura do substrato. No entanto, sua aplicação é limitada pela falta de informações para estimar alguns parâmetros necessários. Portanto, os autores fizeram uso das equações de velocidade para CBH propostas em um trabalho anterior (Okazaki e Moo-Young, 1978). Velocidades iniciais de reação simuladas pelo modelo foram consistentes com os comportamentos reportados na literatura em geral, como os efeitos das características do substrato, do grau de sinergia endo/exoglucanase e da quantidade de enzimas sobre as velocidades de reação para diferentes substratos.

Num trabalho mais recente, Zhou *et al.* (2009) desenvolveram um formalismo geral de superfície, que pode ser reduzido matematicamente aos modelos de Zhang e Lynd (2006) e Okazaki e Moo-Young (1978). No entanto, os autores declaram [Zhou *et al.* 2009b] que vários ensaios experimentais são exigidos para fornecer uma validação quantitativa mais detalhada da sua abordagem morfológica e ajudar a correlacionar cinéticas de hidrólises observadas com a morfologia mesoscópica do substrato. Resultados dependentes do tempo

para a fração de acessibilidade F_a e DP poderiam ser diretamente comparados com previsões do modelo e seriam um teste mais rigoroso do mesmo.

No trabalho por O'Dwyer *et al.* (2007), os padrões de inibição por glicose para celulases de *Trichoderma reesei* e palha de milho pré-tratada foram identificados. Os intervalos de concentrações de substrato e cargas enzimáticas em que a forma linear de um modelo simplificado HCH-1 é válida também foram identificados. HCH-1 é uma modificação do modelo de Michaelis-Menten com inibição não-competitiva e uma fração de substrato insolúvel disponível para se ligar com a enzima (como na equação 11)

$$-\frac{dG_x}{dt} = \frac{kG_x E i}{\alpha + \phi G_x + \varepsilon E} \quad (11)$$

G_x é a concentração de celulose, E é a concentração da enzima, ϕ é a fração da superfície de celulose que está livre para ser hidrolisada, e k , α e ε são parâmetros que descrevem o grau de reatividade do substrato e, portanto, estão relacionados com as características estruturais da biomassa. Para múltiplos inibidores, o parâmetro de inibição i , que é a fração da enzima total não inibida pelo produto, é dada como

$$i = \frac{1}{1 + \beta_1 G_1 + \beta_2 G_2} \quad (12)$$

β_1 e β_2 são constantes de ligação de glicose(G_1) e celobiose(G_2), respectivamente. Com uma alta carga de enzima, o modelo HCH-1 pode ser integrado e simplificado de modo que a conversão em açúcar seja linear com o logaritmo da carga de enzimas (como na equação 13).

$$x = B \ln(E_0) + A \quad (13)$$

x é a conversão do açúcar.

Experimentos foram realizados com um excesso de celobiase para garantir que os resultados não fossem influenciados pela inibição da celobiose. Um padrão de inibição não-competitiva foi identificado para o sistema de celulase e palha de milho, validando as hipóteses do modelo HCH-1.

Em outro trabalho de O'Dwyer *et al.* (2008), o fato de que os gráficos de digestibilidade da biomassa podem ser lineares com o logaritmo da carga enzimática, foi mais explorado, assumindo que a inclinação e a interseção desses gráficos mono-log podem caracterizar a reatividade da biomassa. Redes Neurais não-mecanísticas backpropagation feed-forward (Annema, 1995; Hagan *et al.*, 1996) foram projetadas para prever a digestibilidade da biomassa, simulando a 1, 6, e 72 horas as inclinações e intersecções de glicana, xilana e açúcares totais para a hidrólise de 147 amostras de madeira de álamo (choupo) com uma variedade de conteúdo de lignina, teor de acetil e índices de cristalinidade.

Uma rede neural artificial é uma ferramenta eficaz para representar as relações não-lineares entre as variáveis de entrada e saída. São modelos caixa-preta, não necessitando de uma descrição fenomenológica de como a saída depende da entrada. Em vez disso, eles aprendem a partir de conjuntos de dados de entrada-saída. Uma rede neural é um conjunto de nós (neurônios) ligados por conexões. A topologia utilizada em O'Dwyer *et al.* (2008), foi o perceptron multicamadas - uma arquitetura muito popular para modelos preditivos. Dois ou mais neurônios deste tipo de rede neural podem ser combinados em uma camada, e eles estão interligados. Cada conexão tem um peso escalar a ela associado, que modifica a intensidade do sinal. A função do neurônio é somar as entradas ponderadas e passar o somatório para os neurônios na camada posterior, através de uma função de transferência não-linear. Neste caso, redes neurais feedforward foram utilizadas, onde a informação flui através da rede em apenas um caminho. O treinamento supervisionado da rede neural é simplesmente a estimativa dos pesos, os parâmetros do modelo, a partir de uma série de entradas e saídas associadas.

O'Dwyer *et al.* (2008) demonstraram o potencial das redes neurais para prever a digestibilidade da biomassa. De acordo com Bansal *et al.* (2009), modelos que interpolam sobre uma ampla gama de variáveis independentes podem ser úteis para projetar processos sob várias condições. Naturalmente, esta abordagem é muito sensível à qualidade do banco de dados empíricos utilizados para o treinamento.

Em sistemas catalíticos heterogêneos, a interação entre reagentes e catalisador pode ser diferente da situação homogênea correspondente, devido à peculiaridade da difusão e de processos de colisão molecular envolvidos. A teoria fractal, desenvolvida para processos com irregularidade e complexidade inerentes, pode ser aplicada à catálise heterogênea. Para compreender melhor as reações enzimáticas heterogêneas, um modelo de Michaelis-Menten fractal foi apresentado por Xu e Ding (2007), aplicando o formalismo fractal ao modelo clássico de reações enzimáticas homogêneas, acoplado a um “congestionamento” cinético

causado pela “superpopulação” de enzimas no substrato em espaço confinado (como na teoria de tráfego de veículos); ver equação 14.

$$\left(1 - \frac{E}{jS}\right) \frac{V_{\max} t^{1-f}}{1-f} = P - K_m \ln\left(1 - \frac{P}{S}\right) \quad (14)$$

j é um fator de “congestionamento” e f é uma "dimensão fractal". Quando $E \ll jS$, o efeito de congestionamento torna-se insignificante; quando $f \rightarrow 0$, o efeito fractal torna-se insignificante. Este modelo cinético foi aplicado por Xu e Ding (2007) à hidrólise de celulose por celobiohidrolase.

No trabalho de Bommarius *et al.* (2008), Avicel foi submetido a três pré-tratamentos diferentes (ácido, alcalino, e organosolv) e posteriormente exposto a uma mistura de celulases. Realizou-se a adição de β -glicosidase, a fim de evitar a inibição das celulases por celobiose. Todos os pré-tratamentos de Avicel aumentaram ligeiramente o seu grau de cristalinidade em comparação com o material não tratado. Adsorção de celulase sobre a celulose e cinética de Michaelis-Menten fractal (com “congestionamento”) foram consideradas. Adsorção de celulase e β -glicosidase na celulose foi significativa. Os comportamentos de Conversão vs tempo de Avicel (pré-tratado e não tratado) foram considerados semelhantes. Congestionamento das enzimas celulases adjacentes quando adsorvidas sobre a superfície microcristalina da celulose foi evidente nas concentrações mais elevadas de enzima.

No trabalho de Zuhair Al-(2008), um modelo semi-mechanístico foi derivado, com base em um trabalho anterior, de Gan *et al.* (2003), para prever a velocidade de produção de açúcares redutores, utilizando celulase de *Aspergillus niger*, pela hidrólise de dois tipos de celulose: carboximetilcelulose amorfa e aparas de madeira cristalina. Os resultados experimentais foram utilizados para estimar os parâmetros cinéticos. No modelo, a complexa estrutura da celulose é dividida em regiões hidrolisáveis [Sc] e não hidrolisáveis [Sx]. Assumiu-se que as regiões não-hidrolisáveis inibem reversivelmente a reação, de uma forma competitiva. As frações dos materiais ativos e inativos são definidas pelas duas equações a seguir:

$$\varphi = \frac{[Sx]_0}{[St]} \quad (15a)$$

$$(1 - \varphi) = \frac{[Sc]_0}{[St]} \quad (15b)$$

[St] é a concentração superficial total de celulose e φ é o coeficiente de fração inerte, que assume-se ser constante para cada tipo de celulose (baixo para carboximetilcelulose, mas alto para aparas de madeira). O coeficiente de fração inerte, φ , representa o índice de cristalinidade do substrato utilizado por Fan e Lee (1980). Houve uma boa concordância entre resultados experimentais e previsões do modelo.

No trabalho de Liao *et al.* (2008), um modelo cinético incorporando adsorção, hidrólise enzimática, e inibição por produto, foi desenvolvido para a hidrólise enzimática de fibras pré-tratadas de formas diferentes. A adsorção da enzima foi modelada com base em um tipo de isoterma de Langmuir (com uma mudança na constante de adsorção, representada por uma expressão empírica). A atividade da enzima, em vez da concentração da proteína, foi utilizado para descrever a hidrólise enzimática, a fim de evitar o efeito da proteína das fibras na análise das proteínas da enzima. Uma velocidade de reação de primeira ordem, r , foi aplicada para modelar a hidrólise, com inibição por glicose (como na equação 16).

$$r = \frac{kC_{eff}EC}{1 + \frac{G}{K_{IG}}} \quad (16)$$

C_{eff} é a concentração de celulose disponível para a enzima, $C_{eff} = \left(\frac{C}{C_0}\right)^\lambda C$ C é a concentração de celulose, C_0 é a concentração de celulose original, λ é a constante que relaciona o percentual de celulose disponível para a enzima, EC é a concentração de enzima absorvida pela celulose, $EC = \frac{E_{ad}}{C + L + H} C$, E_{AD} é a atividade da enzima adsorvida por fibra, L é a concentração de lignina, H é a concentração de hemicelulose, G é a concentração de glicose, K_{IG} é a constante de inibição para a glicose.

O modelo previu de maneira satisfatória o comportamento da adsorção da enzima, a hidrólise, e inibição do produto para todas as amostras de fibras.

Em seu trabalho, Zheng *et al.* (2009) apresentaram um modelo cinético semi-mecanístico (baseado em Kadam *et al.*, 2004) para descrever a hidrólise enzimática de *Leymus triticoides* (creeping wild ryegrass). Este modelo incorpora duas reações heterogêneas da celulose a celobiose e celulose a glicose e uma reação homogênea de celobiose a glicose.

Adsorção de celulase em pré-tratados de *Leymus triticoides* foi modelada por uma isoterma de adsorção de Langmuir. O modelo também incorporou o papel negativo da lignina (adsorção não-produtiva), utilizando (novamente) uma isotérmica de adsorção de Langmuir, de celulase em lignina. O modelo também considerou as inibições (competitivas) de celulase por glicose e celobiose. O modelo mostrou alta precisão para prever as tendências de hidrólise da celulose.

Hodge *et al.* (2009) desenvolveram uma estratégia de otimização para a hidrólise da celulose em percentuais de sólidos superiores a 15%, quando agitação e mistura ineficazes em reatores tanque podem se tornar um problema. Partindo de um modelo desenvolvido anteriormente [Kadam *et al.*, 2004] para a operação em batelada, e considerando modificações para contabilizar os efeitos da alimentação em uma operação em batelada alimentada, um perfil de alimentação foi desenvolvido para manter a concentração de sólidos insolúveis em um nível gerenciável durante todo o curso da reação.

No trabalho de Morales-Rodríguez *et al.* (2010), a otimização de reatores em batelada alimentada para a hidrólise da celulose foi estudada. Para este fim, três diferentes estratégias de controle feedback (PI) foram desenvolvidas e avaliadas através de um modelo fenomenológico do processo de hidrólise. Um modelo (re-calibrado) de Kadam *et al.* (2004) foi usado para testar o desempenho de três estratégias de controle: (1) controle de sólidos insolúveis; (2) controle 1 + controle de enzima classe I (CBH + EG), (3) controlador 1 + 2 + controle de enzima classe II (BGD). A estratégia de controle 3 apresentou resultados promissores em relação ao desempenho (grau de conversão de celulose) e à quantidade/custo de enzimas adicionadas. Verificou-se que a quantidade de enzima utilizada na hidrólise enzimática pode ser reduzida de 107% em relação à operação do caso base, o qual usa uma estratégia de alimentação pré-definida em batelada alimentada (Hodge *et al.*, 2009). Mas este é um resultado simulado, não validado experimentalmente. O modelo re-calibrado pode não ser completamente válido para todas as condições simuladas.

Na produção de etanol de celulose, a hidrólise enzimática e a fermentação podem ser realizadas seqüencialmente, em um processo seqüencial de hidrólise e de fermentação (do inglês, SHF), ou em um processo de sacarificação e fermentação simultâneas (do inglês, SSF). Drissen *et al.* (2009) afirmam que a escolha entre um dos dois processos é uma solução de compromisso entre temperaturas ótimas da enzima e concentrações inibitórias de glicose, de um lado (SHF), *versus* temperaturas sub-ótimas e hidrólise de celulose inibida por etanol, do outro (SSF). Um modelo anterior para a cinética da hidrólise enzimática da

celulose foi estendido para considerar inibição da enzima por etanol, permitindo assim a avaliação de SSF e SHF por Drissen *et al.* (2009). O modelo assume três reações catalisadas por enzimas para a hidrólise da celulose: Celulose a celobiose (reação 1), celobiose a glicose (reação 2) e celulose a glicose (reação 3). Para as reações com a celulose como substrato, a quantidade de enzima ativa foi suposta ser determinada por adsorção da enzima na superfície do substrato de celulose (constante de adsorção K_L). Para as reações com a produção de glicose, assumiu-se a inibição pelo produto (constantes de inibição $K_{i,G}$ e $K_{i,2}$). Além disso, assumiu-se que toda a atividade da enzima foi sujeita a inativação térmica (constante K_D). A natureza do substrato de celulose foi assumida como sendo dependente da conversão; com esse objetivo, um parâmetro recalitrante foi utilizado (constante K_{REC}). Finalmente, assumiu-se que a inibição por etanol afeta as velocidades das reações 1 e 3 (constante de inibição $K_{i,EtOH}$).

$$v_1 = \frac{k_{\max,1} C_E e^{-E_a/(RT)}}{K_L + C_E e^{-E_a/(313R)}} e^{-K_D t} C_C \cdot \frac{K_{i,G}}{K_{i,G} + C_G} e^{-K_{REC} \left(1 - \frac{C_C}{C_{C0}}\right)} \cdot \frac{K_{i,EtOH}}{K_{i,EtOH} + C_{EtOH}} \quad (17a)$$

$$v_2 = k_{\max,2} e_g e_{total} \frac{e^{-E_a/(RT)}}{e^{-E_a/(313R)}} e^{-K_D t} \cdot \frac{C_{Cb}}{K_m (1 + C_G / K_{i,2}) + C_{Cb}} \quad (17b)$$

$$v_3 = \frac{k_{\max,3} C_E e^{-E_a/(RT)}}{K_L + C_E e^{-E_a/(313R)}} e^{-K_D t} C_C \cdot \frac{K_{i,G}}{K_{i,G} + C_G} e^{-K_{REC} \left(1 - \frac{C_C}{C_{C0}}\right)} \cdot \frac{K_{i,EtOH}}{K_{i,EtOH} + C_{EtOH}} \quad (17c)$$

C_C é a concentração de celulose, C_{Cb} é a concentração de celobiose, C_E é a concentração da enzima, C_{EtOH} é a concentração de etanol, C_G é a concentração de glicose, e_g é a atividade de β -glicosidase por grama de proteína no preparado enzimática, e_{total} é a concentração de proteína (enzima) por L de reação, $k_{\max,i}$ é a constante de velocidade específica máxima, K_m é constante de Michaelis para β -glicosidase, R é a constante dos gases, T é a temperatura absoluta, E_a é a energia de ativação.

Para modelar o consumo de glicose e a formação de biomassa, a cinética padrão de Monod foi assumida, expandida para incluir a inibição por etanol. Segundo Drissen *et al.* (2009) o modelo previu o processo SSF como sendo superior. A superioridade de SSF sobre SHF foi confirmada experimentalmente, tanto em relação ao rendimento de etanol quanto à velocidade de produção do mesmo.

Um modelo cinético foi apresentado por Zhang *et al.* (2009) para prever sacarificação simultânea e co-fermentação (SSCF) de lodo de papel por uma preparação de celulase comercial e levedura *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada (consumidora de xilose). O modelo desenvolvido usa uma equação de velocidades semi-mecanística para a hidrólise de celulose, tal como proposto pela South *et al.* (1995), com os parâmetros para lodo de papel com base em dados de Shao (2007). Os parâmetros apresentados no modelo de Shao foram baseados na hidrólise de celulose apenas, mas a hidrólise de hemicelulose foi de interesse para o estudo de Zhang *et al.* (2009). Portanto, a adsorção e alguns parâmetros da hidrólise foram recalculados a partir de dados de Shao. Fenômenos representados pelo modelo de South incluem a adsorção de celulase, a hidrólise de glicanos a celobiose com inibição por celobiose e etanol, e hidrólise da celobiose a glicose com inibição por glicose (como nas quatro equações a seguir).

$$K_s = \frac{CE}{E_f(Gn + Xn - CE)C_s} \quad (18a)$$

$$E_t = E_f + CE \quad (18b)$$

$$r_{Gn} = \frac{dGn}{dt} = -[k\left(\frac{Gn}{Gn_0}\right)^m + c]\left[\frac{CE}{C_s}\right]\left[\frac{k_{SC}}{C_b + K_{SC}}\right]\left[\frac{k_{SP}}{Eth + K_{SP}}\right] \quad (18c)$$

$$r_{C_b} = \frac{dC_b}{dt} = -1.056r_{Gn} - \left[\frac{K_C C_b BG}{K_m \left(1 + \frac{Gl}{K_{CG}}\right) + C_b}\right] \quad (18d)$$

Para estender o modelo pré-existente para SSCF, foi necessário abordar a hidrólise de xilana (considerando-se um modelo de correlação simples, como na equação 18e).

$$r_{Xn} = \frac{Xn_0}{Gn_0} r_{Gn} \quad (18e)$$

BG é concentração de β -glicosidase na solução, c é componente de celulose independente da conversão na função da velocidade, CE é concentração do complexo carboidratos/enzima, C_b

é concentração de celobiose, E_f é concentração de celulase livre, E_t é concentração de celulase total, E_{th} é concentração de etanol, Gl é concentração de glicose, Gn é componente de celulose do substrato remanescente, k é constante de velocidade de hidrólise da celulose, K_C é constante da velocidade de hidrólise da celobiose a glicose, K_{CG} é inibição da hidrólise de celobiose pela glicose, K_S é constante de afinidade de Langmuir, K_{SC} é inibição de hidrólise de celulose por celobiose, K_{SP} é inibição da hidrólise da celulose por etanol, m é expoente de declínio de reatividade de glicana, Xn é xilana do substrato remanescente.

A velocidade global de formação de glicose foi determinada pela velocidade de formação por hidrólise enzimática e a velocidade de consumo por fermentação. A fermentação da glicose foi computada através de uma equação de Monod, com um termo adicional para representar a inibição competitiva da absorção de açúcar por xilose e outro termo adicional para representar a inibição por etanol. A velocidade de formação de xilose foi descrita por uma abordagem semelhante à utilizada para a glicose. A velocidade global de formação de massa celular foi determinada a partir do crescimento celular previsto devido ao consumo de glicose e xilose, e à morte celular devido ao metabolismo endógeno e à toxicidade do etanol. A velocidade de produção de etanol foi calculada com base em açúcares consumidos.

Os resultados experimentais mostraram que as hidrólises enzimáticas de glicanas e xilanas foram altamente correlacionadas, e que as baixas concentrações de xilose encontradas durante o processo SSCF não tiveram um efeito inibitório significativo sobre a hidrólise enzimática. O etanol inibiu a velocidade específica de crescimento e acelerou a morte celular. A capacidade de adsorção de celulose e as constantes de velocidade de hidrólise da celulose tiveram o maior impacto na produção de etanol (para uma carga fixa de substrato, enzima e tempo de fermentação), entre as constantes relacionadas à hidrólise enzimática. Rendimento de etanol e tolerância máxima ao etanol tiveram maior impacto entre as constantes relacionadas à fermentação.

Em um outro trabalho, Zhang *et al.* (2009b) observaram que o modelo cinético deles poderia prever fermentações em batelada e batelada alimentada com concentrações de sólidos de até 62,4 g. L⁻¹ de celulose de lodo de papel, mas não em fermentação em batelada a 82,0 g .L-1 de celulose de lodo de papel. Algumas hipóteses para a discrepância entre as observações e as previsões do modelo em altas concentrações de sólidos foram examinadas. Os autores concluíram que a limitação por transferência de massa foi responsável pela discrepância entre as previsões do modelo e os dados experimentais.

No trabalho de Shao *et al.* (2009), o modelo do South *et al.* (1995) para sacarificação e fermentação simultâneas de biomassa celulósica foi ampliado e modificado para acomodar alimentação intermitente de substrato e enzima, as configurações do reator, e ser computacionalmente mais eficiente.

Zhang *et al.* (2009) usou redes neurais artificiais (Annema, 1995; Hagan *et al.*, 1996), para descrever a cinética da hidrólise enzimática de celulose, e comparou com um polinômio quadrático (equação de regressão, 19).

$$Y = b'_1 X'_1 + b'_2 X'_2 + b'_3 X'_3 + b'_4 X'_1 X'_2 + b'_5 X'_1 X'_3 + b'_6 X'_2 X'_3 + b'_7 X'^2_1 + b'_8 X'^2_2 + b'_9 X'^2_3 \quad (19)$$

Y é o valor de resposta da concentração de glicose, X₁' é a atividade da celulase, X₂' é concentração do substrato e X₃' é o tempo. Três parâmetros de hidrólise serviram como entrada do modelo de rede neural: atividade da celulase, concentração de substrato e tempo. A saída foi o teor de glicose. Dados experimentais foram utilizados para treinar a rede neural, utilizando o algoritmo de retropropagação clássica. A predição da rede neural artificial apresentou melhor concordância com os resultados experimentais do que o polinômio quadrático.

O modelo de Levine *et al.* (2010) é baseado em uma descrição mecanística, que inclui etapas distintas de adsorção e complexação da enzima. Celulases individuais de uma bem definida mistura de enzimas são explicitamente acompanhadas; a concentração do substrato e o grau de polimerização da celulose são monitorados, e as concentrações superficiais de cada cadeia de celulose são individualmente descritas. A representação do substrato é focada em captar a evolução temporal da área superficial da celulose; ao passo que as partículas de celulose “encolhem”, novas cadeias são expostas, e a superfície total de celulose é reduzida. As partículas são compostas de cadeias de celulose de comprimento variável. As partículas de celulose “encolhem” de acordo com a liberação de celooligossacarídeos solúveis a partir da superfície. Um balanço material descreve a velocidade com que muda o raio das partículas com o tempo.

O mecanismo pelo qual celulases catalisam a hidrólise de celulose foi assumido como seguindo três etapas: (1) adsorção, (2) complexação e (3) reação. Adsorção e complexação foram tratadas como passos reversíveis, enquanto que a etapa de reação era irreversível. Adsorção e dessorção de celulases foram descritas por meio de balanços que fornecem as concentrações de sítios da superfície da celulose e enzimas em solução. Todas as

celulases são permitidas adsorver em sítios livres idênticos sobre a superfície da celulose. Adsorção e dessorção são tratadas como “reações” elementares. Assume-se que a etapa de catálise é considerada lenta em comparação com as outras, permitindo que o passo de complexação/descomplexação seja considerado próximo ao equilíbrio. A diferença na relação de equilíbrio para as enzimas endoglucanase e celobiohidrolases decorre da capacidade da endoglucanase quebrar qualquer ligação glicosídica na cadeia de celulose, enquanto as celobiohidrolases só quebram as pontas específicas (reduzora ou não reduzora) da cadeia. Celo-oligossacarídeos solúveis são formados por enzimas atuando em ambos, açúcares de cadeia curta solúveis quanto nos insolúveis. As equações que descrevem a produção de açúcares de cadeia curta solúveis assumem um mecanismo de Michaelis-Menten, e se baseiam em pressupostos semelhantes àqueles para os termos de reação em fase sólida. O conjunto completo de equações de balanço de massa pode ser encontrado no Apêndice A de Levine *et al.* (2010). O modelo requer uma variedade de parâmetros de adsorção, cinéticos e físicos. Conjuntos de valores experimentais foram determinados, ou valores da literatura foram utilizados. Na falta de parâmetros confiáveis determinados experimentalmente, estimativas foram feitas através do ajuste do modelo a dados experimentais. Cenários de hidrólise enzimática individual (EG2 ou CBHI) e hidrólise enzimática mista foram utilizados para comparar os resultados do modelo com dados experimentais da literatura. Os resultados do modelo não foram consistentes com todos os dados experimentais.

O coquetel enzimático de celulases secretadas por *Trichoderma reesei* tem sido intensamente investigado, com relação a sua cinética de hidrólise da celulose. No entanto, β -glicosidase é muito pouco secretada pelos fungos de *T. reesei*, e completa hidrólise da celulose muitas vezes exige a suplementação com uma β -glicosidase comercial, como as de *Aspergillus niger*. As possíveis diferenças entre β -glicosidases nativas de *T. reesei* e suplementadas, geralmente não são levadas em consideração. No trabalho de Chauve *et al.* (2010), uma análise cinética comparativa entre β -glicosidase de *A. niger* e β -glucosidase de *T. reesei* foi realizada. β -glicosidase de *A. niger* mostrou uma menor atividade específica em comparação com a β -glicosidase de *T. reesei* e também foi mais sensível à inibição da glicose. Um modelo de Michaelis-Menten considerando inibição competitiva por glicose, foi validado e foi capaz de prever a atividade de β -glicosidase de ambas as enzimas.

No trabalho de Rivera *et al.* (2010), uma técnica baseada em redes neurais artificiais e planejamento de experimentos foi aplicada a fim de identificar combinações ótimas de enzima. Esta técnica foi utilizada para criar um modelo de efeitos combinados de

celulase e cargas de β -glicosidase na produção de glicose por hidrólise enzimática. Os autores afirmam que o modelo dinâmico pode ser usado não só para a predição dos perfis de concentração de glicose para diferentes cargas enzimáticas, mas também para obter a otimização da carga enzimática, que leva à alta produção de glicose alta.

Um dos propósitos do estudo de Brown *et al.* (2010) foi comparar modelos para a hidrólise enzimática de biomassa pré-tratada. Dados experimentais de hidrólise enzimática de palha de trigo tratada com AFEX (explosão das fibras com amônia) foram modelados com modelos da literatura de dois e três parâmetros. Para avaliar os modelos, dados de velocidade inicial de reação a 49°C foram considerados. Para os modelos com três parâmetros, o modelo HCH-1 foi o que melhor se ajustou aos dados experimentais, para os modelos de dois parâmetros, Michaelis-Menten resultou em melhores resultados. Como esperado, os modelos de três parâmetros ajustaram-se melhor aos dados experimentais do que os modelos de dois parâmetros. Os três melhores modelos de 49°C foram comparados com dados de velocidade inicial a três temperaturas (35°C, 42°C e 49°C). O modelo HCH-1 forneceu o melhor ajuste.

Em seus trabalhos, Andric *et al.* (2010 e 2010b) estabeleceram que novas estratégias de design de biorreator são necessárias para aliviar a inibição por produto (quantificada pelos autores, utilizando o modelo de Michaelis-Menten incorporando inibição não-competitiva pelo produto), aumentando assim a eficiência da hidrólise enzimática da celulose. Executando as hidrólises enzimáticas com concentrações médias de substrato, em reatores distintos que permitam a remoção contínua da glicose, foi a solução proposta pelos autores. Reatores de membrana permitindo remoção contínua e completa da glicose são sugeridos para oferecer maiores velocidades de hidrólise e maiores eficiências no uso de enzimas. Segundo os autores, os reatores de membrana atuais ainda não são adequados para a operação em grande escala. Ressalta-se que a produção industrial de etanol por celulose exige mais foco sobre a viabilidade operacional de diferentes projetos de reatores de hidrólise, especialmente para os reatores de membrana.

Podemos observar que os modelos semi-mecanísticos, considerando Langmuir e/ou Michaelis-Menten para as interações enzima/substrato são ainda largamente aplicados. A inclusão de outras variáveis de estado para o substrato, além de concentração, e múltiplas atividades de solubilização pode ser considerada em modelos funcionais. Infelizmente, os modelos funcionais podem levar a um elevado número de parâmetros fenomenológicos para ajustar os dados experimentais. Devido ao aumento do número de parâmetros, tais modelos

devem ser validados com dados experimentais adicionais aos dos perfis de conversão no tempo. Muitas vezes, não há ainda nenhuma base racional para estimar alguns parâmetros necessários. Abordagens não-mecanísticas, tais como redes neurais artificiais que realizam correlações sem a necessidade de uma descrição fenomenológica de como o resultado depende das entradas, são uma alternativa atraente. Alguns estudos demonstraram o potencial das redes neurais. Finalmente, a combinação dos atributos de diferentes modelos pode também ser considerada.

A parte de revisão bibliográfica referente à modelagem matemática da hidrólise enzimática da celulose, acima descrita, foi redigida na forma de um artigo, aceito para publicação no *Brazilian Journal of Chemical Engineering*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

No capítulo três estão descritos os materiais utilizados no presente trabalho, bem como os métodos empregados. Neste capítulo descrevem-se os procedimentos para a realização dos ensaios de hidrólise enzimática para diferentes substratos celulósicos para obtenção de açúcares fermentescíveis. Também, a enzima empregada no processo, sua atividade, substratos utilizados e os pré-tratamentos para esses substratos. Por fim, apresentam-se os softwares utilizados para a modelagem cinética a partir dos dados experimentais obtidos.

3.1 Enzima

Para a realização dos experimentos de hidrólise enzimática utilizou-se o complexo comercial de celulasas Accellerase[®] 1500 de *Trichoderma reesei* doado pela Genencor[®] (Palo Alto, CA). De acordo com o fabricante este complexo contém atividades enzimáticas múltiplas, várias exoglicanases, endoglicanases, beta-glicosidase e ainda hemicelulase. Esse complexo possui sua melhor estabilidade operacional numa faixa térmica de 50 a 65°C, e numa faixa de pH de 4,0 a 5,0. Todavia, em ensaios longos considera-se que 50°C é uma melhor escolha visto que a temperaturas mais altas o tempo de eficiência (devido à inativação) desse complexo fica comprometido.

3.2 Substratos

Duas fontes de materiais celulósicos foram utilizadas nos experimentos de hidrólise: papel de filtro qualitativo (SATELIT) utilizado para definir a metodologia do trabalho e também para fins comparativos, e bagaço de cana-de-açúcar *in natura* (*Saccharum officinarum*) e explodido a vapor, doado pelo Centro de Tecnologia Canavieira (CTC) - Piracicaba - SP oriundo da usina Iracema (Iracemópolis, SP).

3.3 Determinação da Atividade Total das Celulases

Para determinação da atividade celulósica total das enzimas, utilizou-se o método de açúcares redutores totais (ART), fazendo-se uso do ácido dinitro-3,5-salicílico (DNS) e papel de filtro Whatman No. 1 (MILLER, 1959; GHOSE, 1987; ADNEY e BAKER, 1996).

Em diferentes tubos de Folin Wu, foram adicionados 1,0 mL de tampão citrato 50mM pH 4,8. Em seguida foram adicionados 0,5 mL de diferentes diluições de enzima (previamente diluídas em tampão citrato), onde pelo menos uma dessas diluições deveria produzir um pouco mais (um pouco menos) que 2,0 mg de glicose absoluta, nas condições da reação. A seguir os tubos foram temperados a 50°C em uma incubadora (Marconi MA-832) e adicionou-se a cada tubo uma tira de papel (1,0 x 6,0 cm) de uma maneira que o papel ficasse completamente submerso; incubou-se a 50°C por 60 min. Após o tempo indicado, adicionaram-se 3,0 mL do reagente DNS a cada tubo, agitou-se e colocou-se cada tubo em banho fervente por 5 min. Em seguida colocou-se tudo em um banho de gelo até a temperatura ambiente. Adicionaram-se 20 mL de água destilada e agitou-se de maneira que a solução ficasse bem homogênea. Após alguns minutos, até que o papel tivesse decantado, leu-se a absorbância em espectrofotômetro (Biospectro SP-22) a $\lambda = 540$ nm.

Para o branco do espectro foi adicionado ao tubo 1,5 mL de tampão citrato e para o branco da enzima adicionou-se 1,0 mL de tampão citrato e 0,5 mL da diluição de enzima; o restante do procedimento foi o mesmo utilizado para as amostras.

Para quantificação dos açúcares redutores (AR) construiu-se uma curva padrão de glicose usando valores absolutos de glicose (mg/0,5mL) vs absorbância. Inicialmente preparou-se uma solução mãe de glicose de 10 mg.mL⁻¹, e a partir daí diferentes diluições (utilizando tampão citrato) de glicose foram feitas: 6,7; 5,0; 3,3 e 2,0 mg.mL⁻¹. Em diferentes tubos de Folin Wu, adicionou-se 1,0 mL de tampão citrato 50mM pH 4,8 e 0,5 mL do padrão de glicose preparado, e a partir desse ponto seguiu-se o mesmo procedimento utilizado para as amostras. Usando este padrão as absorbâncias obtidas para as amostras (diluições de enzima) foram convertidas em concentração de glicose. Em seguida converteu-se as diluições de enzima em concentrações, de acordo com Ghose, 1959 pela equação 20

$$\text{concentração} = \frac{1}{\text{Diluição}} \left(= \frac{\text{volume de enzima na diluição}}{\text{volume total de diluição}} \right) \quad (20)$$

A partir daí estimou-se a concentração de enzima que produziria exatamente 2,0 mg de glicose, plotando-se glicose liberada vs. concentração de enzima em um gráfico semi-logarítmico. Em seguida, com valor de concentração de enzima obtido, calcularam-se as unidades da seguinte maneira equação 21)

$$FPU = \frac{0,37}{\text{concentração de enzima que realiza 2,0 mg de glicose}} \text{ unidades mL}^{-1} \quad (21)$$

Onde:

1 UI = 1 $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$ de substrato convertido

1 UI = 1 $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$ de “glicose” (açúcar redutor como glicose) convertido

1 UI = 0,18 mg $\cdot \text{min}^{-1}$ quando o produto é glicose

A quantidade absoluta de glicose utilizada para os cálculos é 2,0 mg:

$$2 \text{ mg glicose} = 2,0 / 0,18 \mu\text{mol}$$

Esta quantidade de glicose foi produzida por 0,5 mL de enzima em 60 minutos isto é, na reação de FPU:

$$\begin{aligned} 2 \text{ mg glicose} &= 2 / (0,18 \times 0,5 \times 60 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}) \\ &= 0,37 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \text{mL}^{-1} \text{ (UI mL}^{-1}\text{)} \end{aligned}$$

3.4 Pré-tratamento do Bagaço de Cana-de-açúcar

O bagaço *in natura* foi inicialmente pré-tratado para a remoção da hemicelulose, e para isso utilizou-se uma razão sólido líquido 1:20 (bagaço seco : solução H₂SO₄ 1%); a suspensão contendo bagaço foi autoclavada por 30 min, em 1 atm e a 121°C. Após esse processo, o bagaço foi lavado com água até a neutralização. A seguir iniciou-se a etapa de deslignificação, e para isso utilizou-se uma razão sólido líquido 1:20 (bagaço seco : solução NaOH 4%); a suspensão contendo bagaço foi autoclavada por 30 min, em 1 atm e a 121°C. Após a remoção da lignina o sólido remanescente foi exaustivamente lavado com água

quente, sendo a última lavagem feita com solução tampão citrato pH 4,8 50 mM, deixando o material tratado no pH da etapa de hidrólise.

O bagaço explodido a vapor foi lavado utilizando-se uma razão sólido líquido 1:20 (bagaço seco : H₂O fervente). A deslignificação foi feita como citado anteriormente.

3.5 Caracterização do Bagaço de Cana-de-açúcar

Amostras do bagaço pré-tratado (com ácido e NaOH) e explodido pré-tratado (com NaOH) foram caracterizadas quanto sua composição química de acordo com a metodologia analítica para bagaço de cana desenvolvida por Rocha *et al.* (1997) e validada por Gouveia *et al.* (2009). A Figura 3.1 mostra o fluxograma das etapas de caracterização do bagaço.

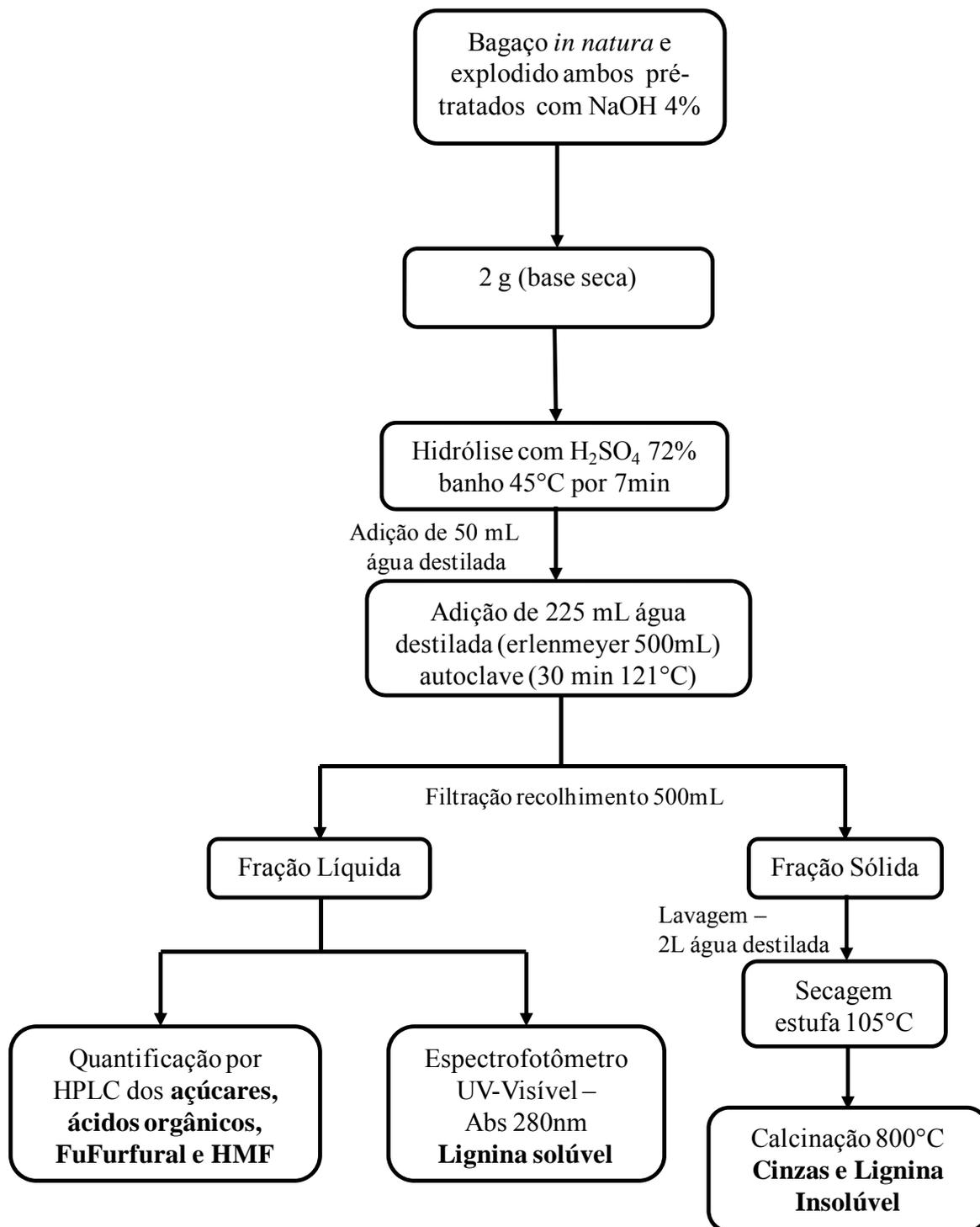


Figura 3.1 Fluxograma das etapas de caracterização do bagaço tratado com ácido e explodido ambos pré-tratados (com NaOH 4%).

3.6 Hidrólises Enzimáticas

3.6.1 Hidrólise Enzimática do Papel de Filtro

Inicialmente, estudou-se a influência da temperatura na hidrólise, assim como a influência da agitação do meio e a da concentração de substrato, utilizando-se como fonte celulósica papel filtro citado no tópico 3.2.

3.6.1.1 Influência da Temperatura

Para estudar a influência da temperatura os experimentos de hidrólise foram realizados em triplicata em reator de 50 mL, com um volume total de reação de 20mL, adicionados $20 \text{ FPU} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{substrato}}$ de Accellerase[®] 1500 que correspondem a $2,3 \text{ FPU} \cdot \text{mL}^{-1}_{\text{tampão}}$, a pH 4,8, tampão citrato de sódio 50mM. Os experimentos foram rodados por 270 minutos usando reator com impelidor mecânico (IKA[®] RW 20 Digital), com agitação fixa em 250 rpm, em banho termostatzado (Polyscience), fixando a concentração de substrato em 10% m/m, correspondente a um potencial de $123,46 \text{ g}_{\text{AR}} \cdot \text{L}^{-1}_{\text{solução}}$, e variando a temperatura de 30 a 50°C. As alíquotas foram coletadas em NaOH 0,2 M para inativação da enzima.

3.6.1.2 Influência da Agitação

Para estudar a influência da agitação os experimentos de hidrólise foram realizados em triplicata em erlenmeyers de 250 mL, com um volume total de reação de 20 mL, adicionados $8,5 \text{ FPU} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{substrato}}$ de Accellerase[®] 1500 que correspondem a $0,85 \text{ FPU} \cdot \text{mL}^{-1}_{\text{tampão}}$, a pH 4,8, tampão citrato de sódio 50mM. Os experimentos foram rodados por aproximadamente 30 minutos usando incubadora refrigerada (Marconi MA-832), com uma faixa de agitação de 0 a 300 rpm a 50°C, fixando a concentração de substrato em 9,1% (m/m), correspondente a um potencial de $111,11 \text{ g}_{\text{AR}} \cdot \text{L}^{-1}_{\text{solução}}$. As alíquotas foram coletadas em NaOH 0,2 M para inativação da enzima.

3.6.1.3 Efeito da Concentração do Substrato

Para verificar o efeito da concentração do substrato os experimentos de hidrólise foram realizados em triplicata em erlenmeyers de 250 mL, com um volume total de reação de 20 mL, adicionados 0,85 FPU.mL⁻¹_{tampão} de Accellerase[®] 1500, a pH 4,8, tampão citrato de sódio 50mM. Os experimentos foram rodados por aproximadamente 30 minutos utilizando incubadora refrigerada (Marconi MA-832) com agitação fixada em 250 rpm a 50°C, variando a concentração de substrato em uma faixa de 0,5 a 13% (m/m) correspondente a um potencial de 5,55 a 166,67 g_{AR}.L⁻¹_{solução}. As alíquotas foram coletadas em NaOH 0,2 M para inativação da enzima.

3.6.2 Hidrólise Enzimática do Bagaço de Cana-de-açúcar

Com a metodologia do trabalho fixada, estudou-se o efeito da concentração do substrato tanto para o bagaço explodido tratado com NaOH 4% quanto para o bagaço tratado com ácido e NaOH 4%.

3.6.2.1 Bagaço de Cana-de-açúcar Explodido Tratado com NaOH 4%

Para estudar a influência da concentração de substrato, os experimentos de hidrólise foram realizados em erlenmeyers de 250 ml, com um volume líquido de 30 mL, adicionando-se 0,85FPU/mL_{tampão} de enzima Accellerase[®] 1500, em solução tampão citrato de sódio 50mM, pH 4,8, com velocidade de agitação regulada para 250 rpm (em incubadora refrigerada Marconi MA-832) e pela variação percentual de 0,99% a 9,09% ($m_{\text{celulose}}/m_{\text{total}}$), correspondente a uma concentração de glicose potencial de 11,11 a 111,11 g_{Glicose}.L⁻¹_{solução}. As amostras foram coletadas no sobrenadante.

Foram também realizados experimentos em erlenmeyers de 250 ml, com um volume líquido de 30 mL, em solução tampão citrato de sódio 50mM, pH 4,8, com velocidade de agitação regulada para 250 rpm (em incubadora refrigerada Marconi MA-832). Variou-se a quantidade de enzima utilizada em uma faixa de 6 a 90 FPU.g⁻¹_{substrato} de Accellerase[®] 1500 correspondente a 3,9 a 60 g_{enzima}.L⁻¹_{solução}, e manteve-se fixo o valor de substrato de 6,54% ($m_{\text{celulose}}/m_{\text{total}}$) correspondente a uma concentração de glicose potencial de 77,77 g_{Glicose}.L⁻¹_{solução}.

3.6.2.2 Bagaço de Cana-de-açúcar pré-tratado com H₂SO₄ 1% Tratado com NaOH 4%

Para o bagaço tratado com H₂SO₄ 1% deslignificado com NaOH 4%, repetiu-se o último procedimento para o bagaço explodido (variação da quantidade de enzima, mantendo-se fixo o valor de substrato de 6,54% ($m_{\text{celulose}}/m_{\text{total}}$)). Foi realizado também um ensaio fixando o substrato em 2,9% ($m_{\text{celulose}}/m_{\text{total}}$), correspondente a uma concentração de glicose potencial de 33,33 g_{Glicose}.L⁻¹_{solução}, adicionando-se 0,85FPU/mL_{tampão} de enzima Accellerase[®] 1500. Este último experimento foi realizado para confirmar a existência de resistência difusional no meio reacional (mesmo com concentração moderada de substrato) para o bagaço tratado com H₂SO₄ 1% deslignificado com NaOH 4%.

3.6.3 Quantificação de Açúcares Redutores (AR)

Para os experimentos utilizando o papel de filtro como substrato, utilizou-se o método de açúcares redutores totais, fazendo-se uso de uma modificação do reagente do método do ácido dinitro-3,5-salicílico (DNS) originalmente proposto por Miller (1959) com procedimento já descrito no item 3.3, onde no lugar de tampão citrato e enzima, utiliza-se 1,5 mL de amostra. De acordo com esse método o DNS sofre redução de um de seus grupos nitro ao mesmo tempo em que o grupo aldeído do açúcar é oxidado a grupo carboxílico, com a formação de um composto (ácido 3-amino-5-nitrosalicílico) de uma coloração cor de tijolo com forte absorção em 540 nm (Figura 3.2).

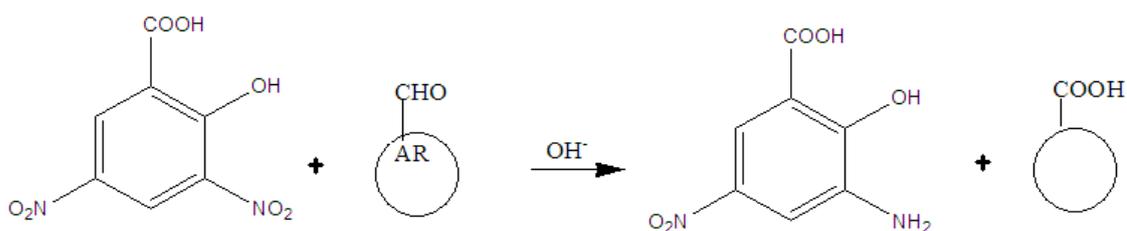


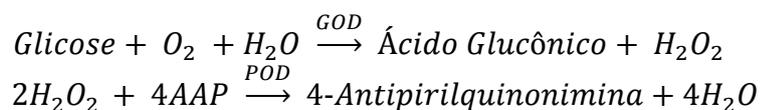
Figura 3.2 Reação para quantificação de açúcares redutores totais com ácido dinitro-3,5-salicílico

O reagente DNS foi preparado, dissolvendo-se em 600 mL de água: 10 g de hidróxido de sódio, 192 g de potássio e sódio tartarato duplo de sódio e potássio (Sal de Rochele) e 10 g de ácido dinitro-3,5-salicílico (e completou-se com água destilada o volume para 1 litro).

Para a quantificação dos açúcares redutores (AR) construiu-se uma curva padrão de glicose vs absorvância, onde inicialmente preparou-se uma solução mãe de glicose de 5 mg.mL⁻¹; a partir daí diferentes diluições (utilizando tampão citrato) de glicose foram feitas, 2,5; 1,25; 0,625 e 0,3125 mg.mL⁻¹ e leu-se em espectrofotômetro a 540 nm. A partir da equação da reta calcularam-se os valores de glicose de cada amostra.

3.6.4 Quantificação de Glicose

Para a determinação de glicose das amostras colhidas das hidrólises com os bagaços, utilizou-se um kit enzimático contendo um reagente pronto para uso, e também uma solução padrão de glicose 100 mg.dL⁻¹. Segundo o fabricante, ao adicionar-se glicose no reativo que é composto por uma solução tampão de fosfatos, contendo p-Hidroxibenzoato, 4-Aminoantipirina (4-AAP), Glicose Oxidase (GOD) e Peroxidase (POD), processam-se as seguintes reações:



O método baseia-se na oxidação enzimática da glicose através da enzima Glicose Oxidase (GOD), resultando em ác. Glucônico e peróxido de hidrogênio. Este é somado a 4-Aminoantipirina (4AAP) em contato com a enzima Peroxidase formando 4-Antipirilquinonimina e 4 moléculas de água. O produto formado (4-Antipirilquinonimina) pela oxidação de 4-AAP é de coloração rósea e sua intensidade diretamente proporcional à concentração de glicose na solução. A cor rósea, obtida pela reação, é medida em espectrofotômetro com absorção máxima em 510 nm.

Para a quantificação de glicose adicionaram-se 10 µL de cada uma das amostras em eppendorfs previamente identificados e 1,0 mL de reativo. Os eppendorfs permaneceram em banho termostático a 37°C por 5 minutos para que houvesse o desenvolvimento da coloração rosada. Passados os 5 minutos leu-se em espectrofotômetro em 510 nm. Para as amostras que equivalem ao branco adicionou-se 10 µL de água e 1,0 mL de reativo. Juntamente com as amostras, construiu-se uma curva de calibração de glicose, onde inicialmente preparou-se uma solução mãe de glicose de 5 mg.mL⁻¹; a partir daí diferentes diluições (utilizando tampão citrato) de glicose foram feitas, 2,5; 1,25; 0,625 e 0,3125 mg.mL⁻¹. Em seguida, o mesmo procedimento realizado para as amostras foi empregado, tendo-se construído então uma curva de glicose mg.mL⁻¹ vs absorbância (e a partir da equação da reta calcularam-se os valores de glicose de cada amostra).

3.6.5 Quantificação de Carboidratos e Ácidos Orgânicos

Os açúcares e ácidos orgânicos foram determinados por High Performance Liquid Chromatography (HPLC) utilizando cromatógrafo Shimadzu SCL-10A com detecção por índice de refração Shimadzu RID-10A. A coluna de separação utilizada foi a Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm, Bio-Rad) com H₂SO₄ 0,005mol.L⁻¹ como fase móvel à vazão de 0,6 mL.min⁻¹ e temperatura do forno a 45 °C. Para a construção das curvas de calibração dos açúcares e ácidos orgânicos, foram injetadas amostras contendo glicose, xilose, celobiose, arabinose, ácido glucurônico, ácido acético e ácido fórmico. As amostras da fração líquida foram filtradas em cartuchos de extração em fase sólida Sep-Pak C-18 (Waters) antes de serem injetadas, para reter a lignina solúvel e produtos de degradação. Os cromatogramas foram analisados e quantificados com base nas curvas de calibração determinadas para cada composto.

Os compostos furfural e hidroximetilfurfural (HMF) foram determinados por Cromatografia Líquida de Alta eficiência (CLAE), em uma coluna C-18 (Beckman) com detector UV-visível 486-Waters a 274 nm, utilizando uma solução de acetonitrila/água 1:8 com 1% de ácido acético como fase móvel, a uma vazão de 0,8 mL.min⁻¹ e temperatura de 25°C. Foram construídas curvas de calibração preparadas com padrões de grau analítico para determinar a concentração de furfural e HMF nas amostras.

3.7 Modelagem

Para a modelagem cinética a partir dos resultados experimentos obtidos, foram utilizados três diferentes softwares: Origin pro 7, in-house software em Fortran e in-house software em Matlab. O Origin pro 7 foi utilizado para ajuste de dados experimentais aos modelos de Chirstil, Lineweaver-Burk (LB) e Michaelis-Menten (MM), fazendo uso da ferramenta de ajuste de curvas (Advanced fitting tool). Para ajuste de parâmetros de inibição dos modelos tipo Michaelis-Menten utilizou-se o software in-house para compilador Fortran, onde está implementado o algoritmo clássico de Marquardt. Foram também realizados procedimentos finais de ajuste dos parâmetros de Michaelis-Menten e das constantes de inibição fazendo uso de um algoritmo de busca global (Simulated Annealing), implementado no software in-house para compilador Matlab.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Determinação da Atividade Total das Celulases

Para determinar a atividade enzimática do complexo, partiu-se de uma solução mãe de diluição 1:50, o equivalente a 0,02 (v/v) de enzima. A partir dessa solução, efetuou-se 3 novas diluições em tampão citrato 50 mM, pH 4,8.

Para determinar a concentração de glicose realizada por cada diluição de enzima, utilizou-se o método descrito no tópico 3.3. A Tabela 4.1 relaciona as diluições de enzima, suas respectivas concentrações, assim como a glicose liberada.

Tabela 4.1 – Valores de diluições de enzima, suas respectivas concentrações e glicose liberada.

Diluição enzima	1/Diluição enzima	Glicose Liberada (mg)
500	0,00200	1,377
250	0,00400	2,120
150	0,00667	2,848

Com os dados obtidos, construiu-se um gráfico onde se relaciona a concentração de enzima em função da massa de glicose liberada durante a reação, como mostra a Figura 4.1, (ADNEY e BAKER, 1996).

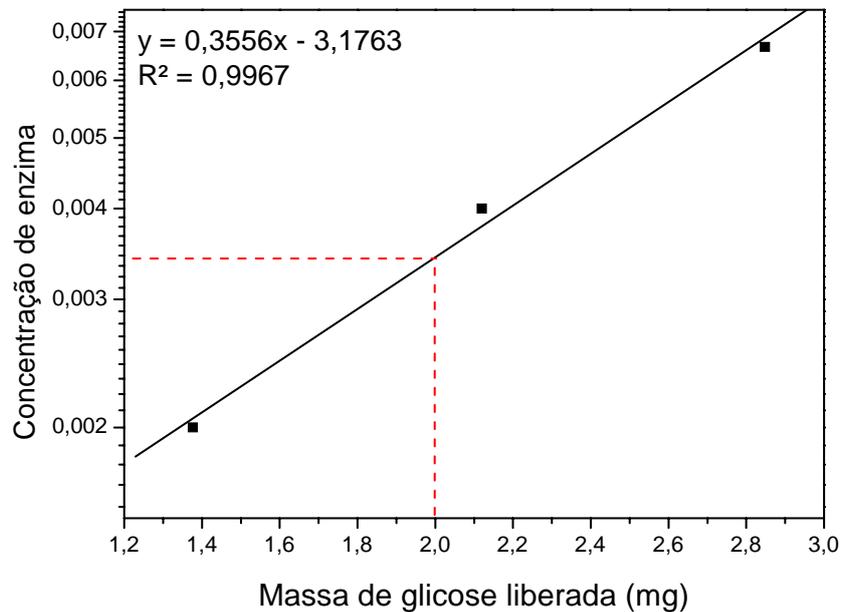


Figura 4.1 Gráfico semi-logarítmico da concentração de enzima em função da massa de glicose liberada por 0,5 mL da enzima celulase diluída.

A partir da equação da reta obtida, determinou-se a concentração de enzima necessária para liberar exatamente 2,0 mg de glicose, como ilustrado na Figura 4.1:

$$y = 0,3556x - 3,1763$$

$$\text{Log}[\text{Concentração enzima}] = 0,3556 \cdot (2,0 \text{ mg glicose}) - 3,1763$$

$$\text{Log}[\text{Concentração enzima}] = -2,4651$$

$$10^{\text{Log}[\text{Concentração enzima}]} = 10^{-2,4651}$$

$$\text{Concentração enzima} = 0,003426$$

Com o valor da concentração determinada, pode-se calcular a atividade enzimática do complexo enzimático através da Equação 3.2

$$FPU = \frac{0,37}{0,003426} \text{ unidades mL}^{-1} = 108 \text{ FPU} \cdot \text{mL}^{-1}$$

O valor da atividade do complexo enzimático obtido (108 FPU.mL-1) foi utilizado para os cálculos de volume de enzima necessário para os ensaios de hidrólise.

4.2 Caracterização do Bagaço de Cana-de-açúcar

Para a determinação da composição química, os bagaços tratados foram hidrolisados em ácido concentrado. Os valores obtidos nessa caracterização estão apresentados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 – Caracterização dos diferentes bagaços de cana-de-açúcar pré-tratados.

Amostras	Celulose %	Lignina %	Hemicelulose %	Cinzas %
Bagaço <i>in natura</i>	38,80	21,70	29,40	5,10
Bagaço explodido tratado com NaOH 4%	88,20	5,37	-	0,70
Bagaço pré-tratado com H ₂ SO ₄ 1% tratado com NaOH 4%	73,30	17,00	7,00	2,00

Os resultados apresentados na Tabela 4.2 indicam que o tratamento do bagaço com explosão a vapor seguido por deslignificação com NaOH 4%, foi capaz de remover toda hemicelulose. Além disso, um baixo teor de lignina foi verificado. Por outro lado, o pré-tratamento do bagaço com H₂SO₄ 1% seguido por deslignificação com NaOH 4%, resultou no material com hemicelulose remanescente e 17% de lignina. Após o tratamento a concentração de celulose aumentou nos dois casos. O percentual de celulose foi de aproximadamente de 88 e 73% para os tratamentos, explosão seguido com NaOH 4% e tratado com H₂SO₄ 1% seguido com NaOH 4%, respectivamente .

4.3 Hidrólises Enzimáticas

Os cálculos realizados para obtenção dos dados dos tópicos a seguir estão ilustrados abaixo.

Exemplo para um ensaio utilizando bagaço explodido tratado com NaOH 4%, o qual continha 88% de celulose e umidade aproximada de 83,26% fazendo-se o uso de $100 \text{ g}_{\text{celulose}} \cdot \text{L}^{-1}_{\text{tampão}}$ (3g em 0,030 L de líquido).

$$\begin{aligned} 1 \text{ g bagaço seco} &- 0,88 \text{ g de celulose} \\ x - 3 \text{ g de celulose a serem utilizadas} \\ x &= 3,41 \text{ g de bagaço seco} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} 1 \text{ g de bagaço úmido} &- 0,1674 \text{ g de bagaço} \\ x - 3,41 \text{ g de bagaço seco} \\ x &= 20,36 \text{ g de bagaço úmido a ser pesado} \end{aligned}$$

Para calcular o quanto de líquido havia no bagaço úmido e descontar do líquido a ser adicionado (tampão citrato + enzima):

$$\begin{aligned} 1 \text{ g de bagaço úmido} &- 0,8326 \text{ g de H}_2\text{O} \\ 20,36 \text{ g de bagaço úmido pesado} &- x \\ x &= 16,95 \text{ g de H}_2\text{O contido no bagaço} \end{aligned}$$

A seguir foi descontado o valor obtido (16,95mL de H₂O), do valor de solução tampão citrato mais enzima. No caso do substrato papel, o mesmo era considerado como celulose pura, e sem umidade, visto que o mesmo era mantido em estufa antes de começar o ensaio.

Então, dentro de um erlenmeyer de 250 mL foram adicionados, 20,36 g de bagaço úmido (contendo 16,95 de H₂O) e 13,05 de líquido (tampão citrato + enzima), resultando em uma concentração de $100 \text{ g}_{\text{celulose}} \cdot \text{L}^{-1}_{\text{tampão}}$ ou 9,1% ($\frac{m_{\text{celulose}}}{m_{\text{total}}}$, em que m_{total} corresponde à massa de celulose somada à massa de fase líquida).

Para os cálculos de açúcar redutor (papel de filtro) ou glicose, calculava-se da seguinte maneira (dados na Tabela 4.3):

Tabela 4.3 – Valores hipotéticos para um ensaio de hidrólise enzimática.

Tempo (min)	Amostra (µL)	Soda (µL)	Diluição	Abs
0	-	-	-	-
15	200	200	2	0,163
30	200	200	2	0,322
60	200	200	2	0,640

Com a equação da reta obtida na curva padrão, era possível determinar quanto de AR ou glicose obteve-se:

$$Glicose \text{ g/L} = [(Abs + 0,0006)/0,2756] \times Diluição$$

Exemplo para o tempo de 15 minutos:

$$Glicose \text{ g/L} = [(0,163 + 0,0006)/0,2756] \times 2$$

$$Glicose = 1,19 \text{ g/L}$$

A conversão era calculada da seguinte maneira:

$$162 \text{ g/mol de Celulose} - 180 \text{ g/mol de Glicose}$$

$$100 \text{ g}_{celulose}/L - x$$

$$x = 111,11 \text{ g}_{glicose}/L$$

$$111,11 \text{ g}_{glicose}/L - 100\%$$

$$1,19 \text{ g}_{glicose}/L - x$$

$$x = 1,07\%$$

Para determinar as velocidades iniciais de cada ensaio, foram construídos gráficos de concentração de AR ou glicose em função do tempo, e até 5 a 10% de conversão (linear), onde eram obtidas essas velocidades sendo o coeficiente angular da reta.

4.3.1 Hidrólise Enzimática do Papel de Filtro

4.3.1.1 Influência da Temperatura

Deve-se ressaltar que o aumento da temperatura de trabalho de sistemas onde ocorrem reações enzimáticas tem dois efeitos opostos: de um lado o incremento da temperatura, até certo limite, aumenta a atividade da enzima, em geral segundo a lei de Arrhenius – e, portanto, a conversão de substrato em produtos. Temperaturas acima deste limite, entretanto, reduzem gradativamente a atividade, pela distorção do centro ativo da enzima, até inativá-la completamente, devido à sua desnaturação térmica. Assim, o conhecimento da faixa ótima de trabalho é importante para definição da metodologia dos ensaios cinéticos.

A Figura 4.2 mostra as hidrólises enzimáticas de celulose a substrato 10% ($m_{\text{papel}}/m_{\text{total}}$) sob diferentes regimes de temperatura, com uma carga enzimática de 20 FPU.g⁻¹_{substrato}, e agitação fixada em 250rpm.

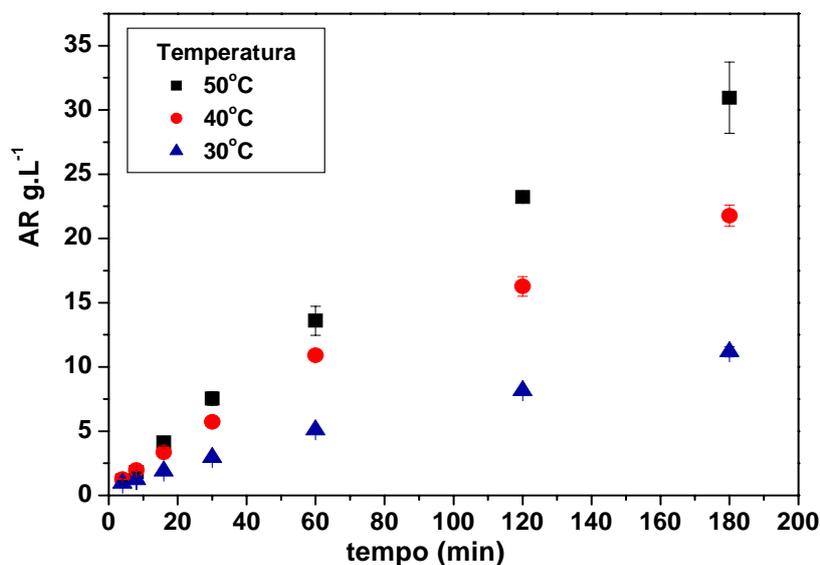


Figura 4.2 Hidrólise enzimática de celulose 10% ($m_{\text{papel}}/m_{\text{total}}$) sob diferentes regimes de temperatura, 20 FPU/gsubstrato, 250rpm.

No presente caso, nota-se na Figura 4.2 que as velocidades de reação sempre aumentam com a temperatura. Observa-se, assim, que o efeito de desnaturação térmica ainda não é perceptível, na faixa de 30-50° C, ao menos para os tempos de reação utilizados nestes ensaios. Não foram realizados ensaios para valores maiores do que 50° C para evitar a desnaturação das enzimas. A Tabela 4.4 ilustra esse comportamento, apresentando as velocidades iniciais de reação de hidrólise tomando pontos de até 5 a 10% de conversão do substrato (na região linear).

Tabela 4.4 – Velocidades iniciais de hidrólise enzimática da celulose, obtidas para diferentes temperaturas com concentração de substrato fixada em 10% ($m_{\text{papel}}/m_{\text{total}}$), agitação 250 rpm, 20 FPU/g_{substrato}. Os intervalos correspondem a desvios padrão de triplicatas.

Temperatura (°C)	Velocidade (g _{AR} /L.min)
30	0,07 ± 0,01
40	0,17 ± 0,01
50	0,25 ± 0,02

Para os estudos posteriores a temperatura de 50°C foi a escolhida visto que a velocidade da reação de hidrólise para essa temperatura apresentou maior desempenho sem apresentar indicações de desnaturação da enzima.

4.3.1.2 Influência da Agitação

Um dos principais fatores na determinação da velocidade aparente da reação é a relação entre a velocidade de difusão da enzima, uma proteína de alto peso molecular, no filme líquido em torno do substrato e a velocidade intrínseca de reação, que ocorrerá quando a enzima alcançar a superfície sólida do substrato, celulose.

Há que se considerar também que para a reação intrínseca ocorrer, além de se transportar para a superfície do substrato a enzima deverá ainda se adsorver fisicamente a ele. Assim, em reator de batelada agitado, a taxa de reação global é determinada pelas taxas de três eventos em sequência: (i) velocidade de transferência de massa de enzima, (ii) velocidade de adsorção da enzima na superfície do substrato e (iii) velocidade de catálise da celulase (Gan *et al.*, 2003). Quanto maior a velocidade do fluido, menor a espessura do filme estagnado, portanto maior o coeficiente de transferência de massa no filme e, conseqüentemente, mais alta a velocidade de difusão.

Assim, um estudo criterioso da cinética de hidrólise enzimática de celulose deve ser antecedido da determinação da velocidade de agitação adequada ao sistema estudado, ou seja, da mínima velocidade de agitação que naquele sistema conduz a uma velocidade de difusão mais alta que a das etapas subseqüentes, evitando que o processo seja limitado pela primeira etapa. Foi observado, entretanto, que agitação excessiva pode desativar as enzimas e reduzir o rendimento de conversão. Este efeito é atribuído à força de cisalhamento gerada pelo agitador e pelo aprisionamento de bolhas de ar entre a superfície ar-líquido (INGESSON *et al.*, 2001).

A Figura 4.3 mostra as velocidades de reação de hidrólise para 9,1% (m/m) de substrato em diferentes agitações. As velocidades iniciais de reação de hidrólise tomando pontos até 5% de conversão do substrato (na região linear), variaram de 0,044 a 0,065 $\text{g}_{\text{AR}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ e estão apresentadas na Tabela 4.5. Pode-se observar que há uma variação

significativa na velocidade de hidrólise com o aumento da agitação de até 150 rpm, quando se torna aproximadamente constante.

Tabela 4.5 - Velocidades iniciais de hidrólise enzimática obtidas para diferentes velocidades de agitação em shaker.

Agitação (rpm)	Velocidades Iniciais ($\text{g}_{\text{AR}} \cdot \text{L}^{-1} \text{solução} \cdot \text{min}^{-1}$)
-	$0.044 \pm 0.19 \times 10^{-2}$
50	$0.051 \pm 0.15 \times 10^{-2}$
150	$0.061 \pm 0.29 \times 10^{-2}$
250	$0.061 \pm 0.19 \times 10^{-2}$
300	$0.065 \pm 0.29 \times 10^{-2}$

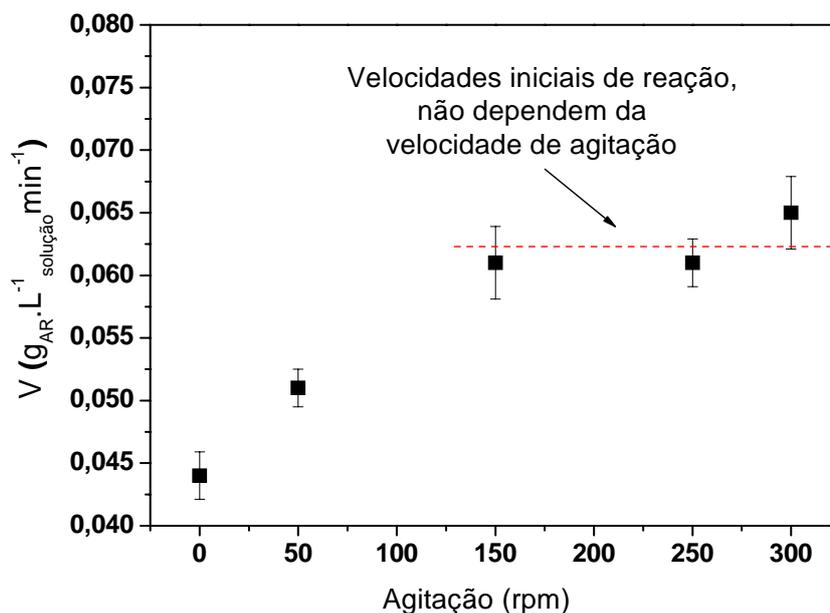


Figura 4.3 Velocidades iniciais em função de diferentes regimes de agitação, para substrato 9,1% ($m_{\text{papel}}/m_{\text{total}}$) em 50°C, pH 4,8, enzima Accellerase® 1500 5FPU/g substrato ($0,5\text{FPU} \cdot \text{mL}^{-1} \text{solução}$).

A influência da velocidade de agitação depende do substrato estudado e, possivelmente, do esquema experimental utilizado, pois essas características irão alterar a resistência ao transporte de massa no filme externo ao substrato sólido em cada caso. Estudos

conduzidos por Tengborg (2000) mostraram que, enquanto velocidades de agitação de até 340 rpm aumentaram a conversão de madeira pré-tratada (explosão a vapor), maiores velocidades de agitação, como 340 a 510 rpm, apenas aumentaram as velocidades iniciais de hidrólise, e não a conversão final. Já estudos com casca de soja mostraram que o aumento da velocidade de agitação, entre 380 e 1500 rpm, conduziu sistematicamente a mais altas conversões finais do substrato (ENAYATI E PARULEKAR, 1995).

Uma vez que os resultados aqui obtidos não mostraram ganho significativo na conversão após 30 min com o aumento da agitação, para estudos posteriores escolheu-se 250 rpm como velocidade de agitação. Dessa forma, haverá menor risco de inativação da enzima devido ao menor cisalhamento da mistura de reação, oferecendo uma condição mais branda de trabalho durante os ensaios cinéticos.

4.3.1.3 Efeito da Concentração do Substrato

A concentração de substrato é um fator de grande influência sobre a velocidade de hidrólise, não só por razões cinéticas, mas também porque altas concentrações de sólidos agem sobre a eficácia de mistura e sobre as resistências ao transporte de massa. Estes efeitos podem ser significativos para cargas mais altas do substrato.

Para se analisar qualitativamente a aderência dos dados experimentais a uma forma funcional do tipo hiperbólica, como a equação de Michaelis-Menten (MM, Equação 22), é conveniente inicialmente trabalhar com sua forma linearizada, de Lineweaver-Burk (LB, Equação 23).

$$V = \frac{V_{\max} S}{K_m + S} \quad (22)$$

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (23)$$

Onde: V = velocidade de hidrólise (g/L.min), V_{\max} = velocidade máxima de hidrólise (g/L.min), S = concentração de substrato (g/L), K_m = constante de MM (g/L).

Se o sistema obedece à cinética de MM, há uma relação linear entre $1/V$ e $1/S$. A Figura 4.4 mostra o gráfico de Lineweaver-Burk e o comportamento de Michaelis Menten para hidrólise enzimática da celulose variando o substrato de 0,5 a 13% (m/m).

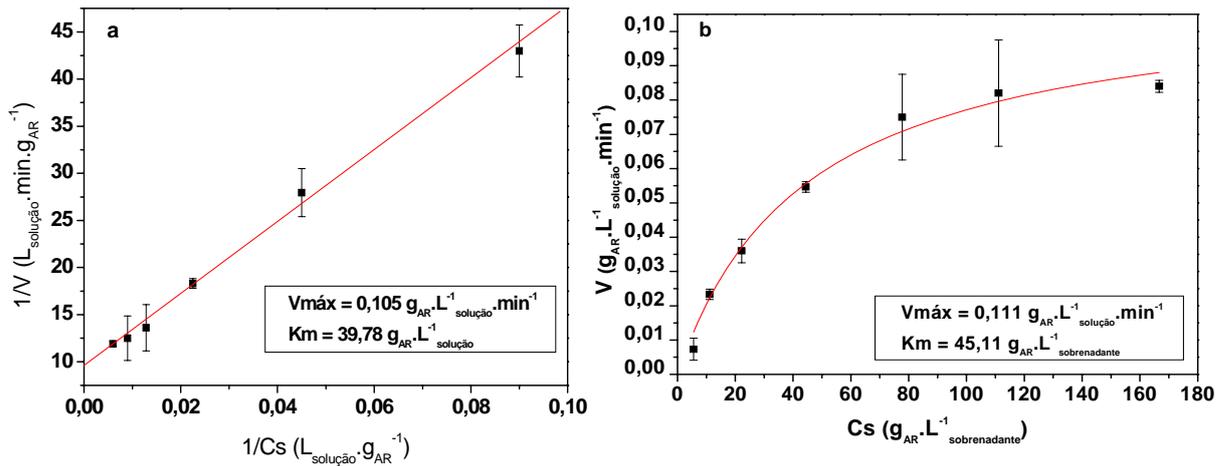


Figura 4.4 (a) Gráfico de Lineweaver-Burk e (b) Comportamento de Michaelis Menten para hidrólise enzimática da celulose em 50°C, pH 4.8, substrato 0,5 a 13% ($m_{\text{papel}}/m_{\text{total}}$) e enzima Accellerase® 1500 ($0,5\text{FPU}\cdot\text{mL}^{-1}$ solução).

Os valores dos parâmetros obtidos ilustrados no gráfico de Lineweaver-Burk ($V_{\text{max}} = 0,105 \text{ g}_{\text{AR}}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{solução}\cdot\text{min}^{-1}$ e $K_m = 39,78 \text{ g}_{\text{AR}}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{solução}$) foram usados como estimativas iniciais, quando o modelo de Michaelis-Menten foi ajustado. Os valores finais dos parâmetros obtidos para o modelo de MM foram: $V_{\text{max}} = 0,111 \text{ g}_{\text{AR}}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{solução}\cdot\text{min}^{-1}$ e $K_m = 45,11 \text{ g}_{\text{AR}}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{solução}$. Pode-se observar que o modelo de MM (pseudo-homogêneo) se ajustou muito bem aos dados experimentais.

A parte de resultados referentes ao papel filtro, acima descrita, foi redigida na forma de um trabalho apresentado no 1º Workshop do Projeto Temático BIOEN.

4.3.2 Hidrólise Enzimática do Bagaço de Cana-de-açúcar

4.3.2.1 Hidrólise do Bagaço de Cana-de-açúcar Explodido Tratado com NaOH 4%

Ensaio iniciais, para as concentrações de 0,99%, 3,85%, 6,54% e 9,09% ($m_{\text{celulose}}/m_{\text{total}}$), correspondendo a 11,11 $\text{g}_{\text{glicose}}/\text{L}_{\text{tampão}}$, 44,44 $\text{g}_{\text{glicose}}/\text{L}_{\text{tampão}}$, 77,77 $\text{g}_{\text{glicose}}/\text{L}_{\text{tampão}}$, 111,11 $\text{g}_{\text{glicose}}/\text{L}_{\text{tampão}}$ (glicose potencial) foram realizados para se fazer uma análise prévia se o modelo de Michaelis-Menten (pseudo-homogêneo) seria realmente uma boa opção para toda a faixa de concentrações de substrato considerada, devido à possibilidade da presença de atrasos difusionais (principalmente para cargas mais altas de substrato). Estes ensaios então permitiram quantificar o efeito da difusão sobre as taxas de hidrólise, através da análise dos parâmetros do modelo de Chrastil (citado no tópico 2.5). A Figura 4.5 mostra os ajustes do modelo de Chrastil aos dados experimentais.

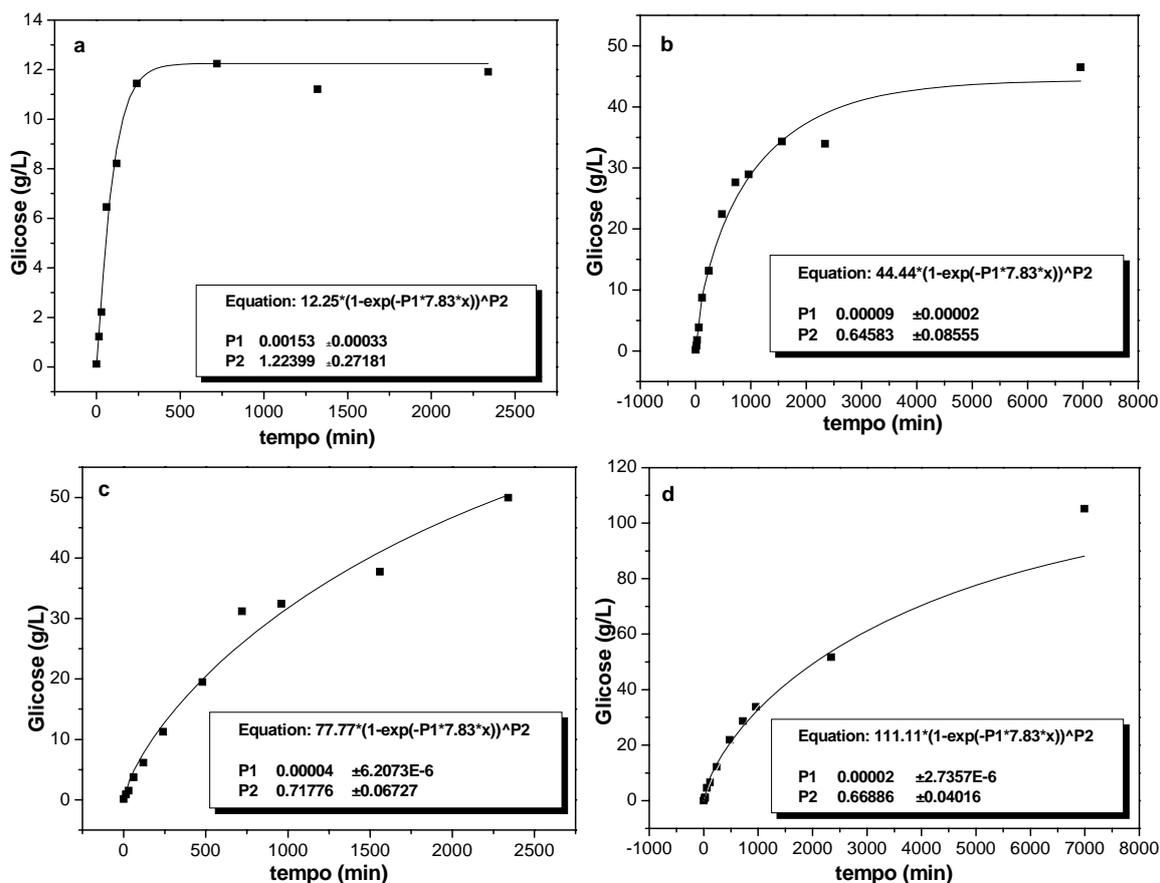


Figura 4.5 Modelos ajustados de acordo com Chrastil para BC explodido a vapor tratado com NaOH 4%, para as concentrações (a) 0,99% (b) 3,85% (c) 6,54% (d) 9,09% ($m_{\text{celulose}}/m_{\text{total}}$).

A tabela 4.6 sintetiza a análise dos parâmetros do modelo de Chrastil para os ajustes apresentados na Figura 4.5.

Tabela 4.6 - Parâmetros do modelo de Chrastil.

	k'	n	
($m_{\text{celulose}}/m_{\text{total}}$)	proporcional ao coeficiente de difusão ($L \cdot g^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)	constante estrutural de resistência difusional	Resistência difusiva
0,99%	$1,53 \times 10^{-3} \pm 0,33 \times 10^{-3}$	$1,22 \pm 0,27$	↓
3,85%	$9,00 \times 10^{-5} \pm 2,00 \times 10^{-5}$	$0,65 \pm 0,08$	↑
6,54%	$4,00 \times 10^{-5} \pm 0,62 \times 10^{-5}$	$0,72 \pm 0,07$	↑
9,09%	$2,00 \times 10^{-5} \pm 0,27 \times 10^{-5}$	$0,67 \pm 0,04$	↑

Como se pode observar na Tabela 4.6, para concentrações abaixo de 3,85%, o efeito da resistência difusional diminui, de modo que pôde-se pensar no ajuste do modelo de Michaelis-Menten (MM) clássico (hipótese de sistema-pseudo homogêneo) para uma faixa de concentração de 0,99 a 3,85% (aqui, incluiu-se a concentração de 3,85% pelo fato de o bagaço BC explodido a vapor tratado com NaOH 4% ter sido desumidificado nesta concentração, para os ensaios subseqüentes, o que pode diminuir a resistência difusional).

A partir desta hipótese, foram realizados outros ensaios onde as velocidades iniciais eram obtidas em até 10% de conversão (portanto, na região linear de trabalho), em 50°C, a 250 rpm e mantendo-se a concentração de enzima constante, igual a 0,85 FPU/mL_{tampão}, variando-se a de carga de celulose na faixa de 0,99 a 3,85%, para o ajuste do modelo de MM. Pode-se confirmar que não havia efeitos difusionais consideráveis na faixa apresentada, através da análise dos parâmetros do modelo de Chrastil utilizando como referência um ensaio com 2,9% de carga de celulose, onde o valor de n e k' foram 0,89 e 0,25E⁻³ (L.g⁻¹.min⁻¹), respectivamente (Figura 4.6).

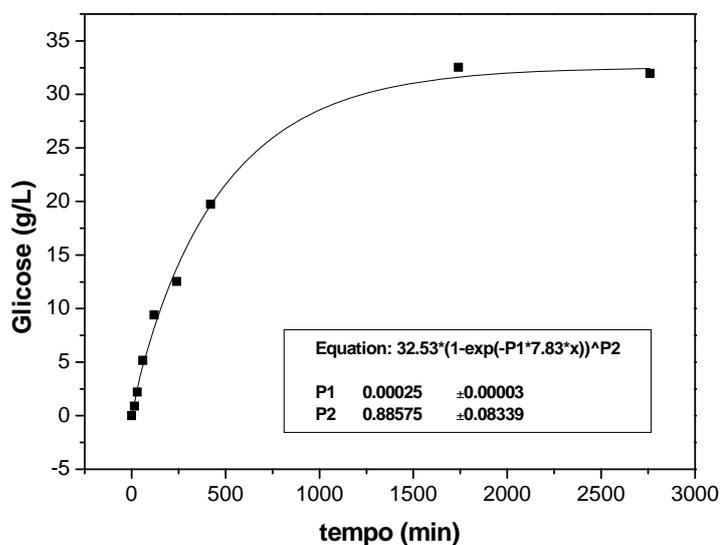


Figura 4.6 Modelo ajustado de acordo com Chrastil para a concentração de 2,9% ($m_{\text{celulose}}/m_{\text{total}}$) onde $k' = 0,25E^{-3}$ (L.g⁻¹.min⁻¹) e $n = 0,89$.

Já pensando em termos da modelagem através de Michaelis-Menten, a Figura 4.7 mostra um resultado experimental (ilustrativo) típico, para o perfil da concentração de glicose ao longo do tempo (com região linear associada aos dados correspondentes aos instantes de tempo iniciais).

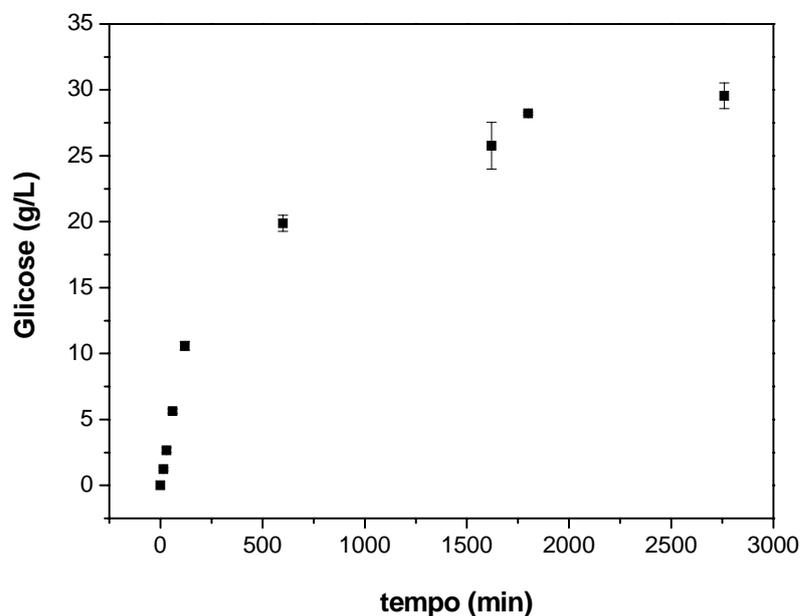


Figura 4.7 Evolução temporal da concentração de produto em ensaio de hidrólise, a 50°C, pH 4,8, carga de substrato no erlenmeyer de 2,9% ($m_{\text{celulose}}/m_{\text{total}}$), 0,85FPU/mL_{tampão} de Accellerase® 1500.

Antecedendo o ajuste dos dados ao modelo de MM, utilizou-se o modelo de LB, como citado no tópico 4.3.1.3. A Figura 4.8 mostra os resultados obtidos em diagrama de Lineweaver-Burk para hidrólise enzimática de celulose a 50°C, pH 4,8, carga de substrato no erlenmeyer de 0,99 a 3,85% (m/m).

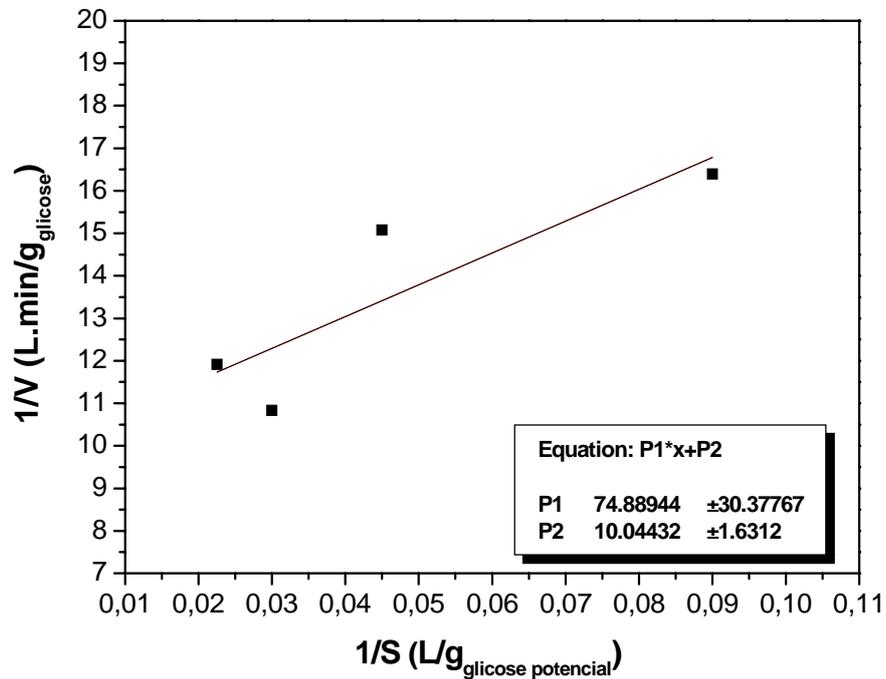


Figura 4.8 Diagrama de Lineweaver-Burk para hidrólise enzimática de celulose a 50°C, pH 4,8, carga de substrato no erlenmeyer de 0,99 a 3,85% ($m_{\text{celulose}}/m_{\text{total}}$), correspondente a 11,11 $\text{g}_{\text{glicose}}/\text{L}_{\text{tampão}}$ a 44,44 $\text{g}_{\text{glicose}}/\text{L}_{\text{tampão}}$ e 0,85FPU/ $\text{mL}_{\text{tampão}}$ de Accellerase® 1500.

A Figura 4.9 mostra o ajuste de MM obtido utilizando como chute inicial os parâmetros obtidos ($V_{\text{máx}} = 0,099 \text{ g}_{\text{glicose}}/\text{L}_{\text{tampão}} \cdot \text{min}$ e $K_m = 7,45 \text{ g}_{\text{glicose}}/\text{L}_{\text{tampão}}$) com o diagrama de Lineweaver-Burk (Figura 4.8) para hidrólise enzimática de celulose a 50°C, pH 4,8, carga de substrato de 0,99 a 3,85% ($m_{\text{celulose}}/m_{\text{total}}$).

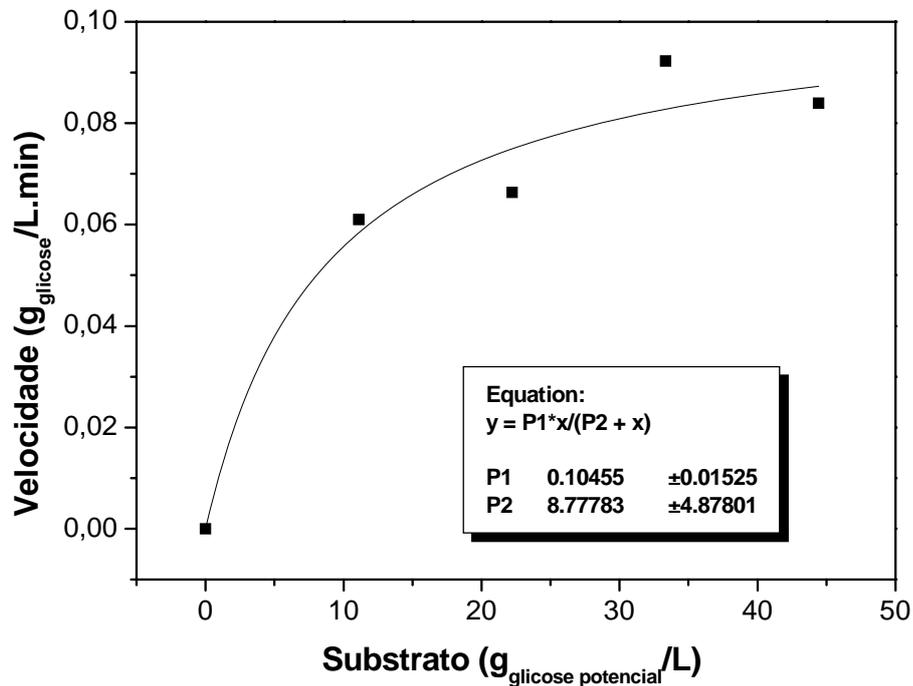


Figura 4.9 Comportamento de Michaelis Menten para hidrólise enzimática de celulose a 50°C, pH 4,8, carga de substrato no erlenmeyer de 0,99 a 3,85% ($m_{\text{celulose}}/m_{\text{total}}$), correspondente a 11,11 $\text{g}_{\text{glicose}}/\text{L}_{\text{tampão}}$ a 44,44 $\text{g}_{\text{glicose}}/\text{L}_{\text{tampão}}$ e 0,85FPU/ $\text{mL}_{\text{tampão}}$ de Accellerase®.

A Tabela 4.7 mostra os parâmetros obtidos para os diferentes ajustes, lembrando que o ajuste de Lineweaver-Burk só é utilizado como chute inicial para obtenção dos parâmetros através de MM, visto que Lineweaver-Burk relaciona o inverso dos dados estudados e o erro pode-se tornar muito grande (LEHNINGER *et al.*, 1995).

Tabela 4.7 - Parâmetros obtidos por diferentes ajustes, sendo LB chute inicial para MM.

Modelo	Km	Vmáx
	($\text{g}_{\text{glicose}}/\text{L}_{\text{tampão}}$)	($\text{g}_{\text{glicose}}/\text{L}_{\text{tampão}} \cdot \text{min}$)
LB	$7,45 \pm 3,02$	$0,099 \pm 0,61$
MM	$8,77 \pm 4,87$	$0,104 \pm 0,15 \times 10^{-1}$

A partir de dados obtidos da evolução temporal da concentração de glicose em experimentos de longa duração, em ensaios de hidrólise com concentração máxima de substrato dentro do intervalo de 0,99% a 3,85%, foi possível também analisar efeitos de inibição. Neste ponto, cabe mencionar que devido ao fato de a atividade da β -glicosidase no complexo enzimático utilizado ser alta, considerou-se inibição (competitiva) apenas por glicose. Pode-se considerar o não acúmulo (significativo) de celobiose no meio (conforme indicado pelo próprio fabricante, Genencor[®], em seus catálogos).

A Figura 4.10 mostra o ajuste do modelo de MM com inibição competitiva por glicose para ensaio de hidrólise enzimática obtido para concentração máxima de substrato dentro do intervalo de 0,99 a 3,85% ($m_{\text{celulose}}/m_{\text{total}}$).

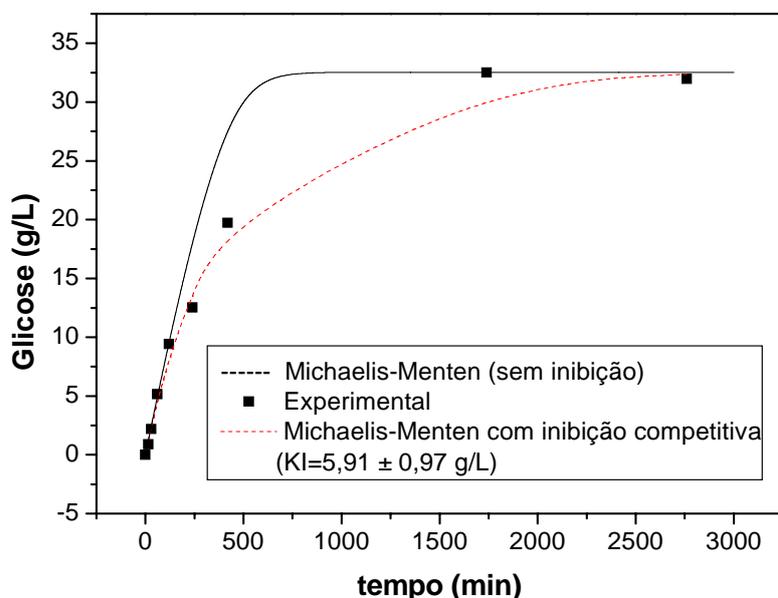


Figura 4.10 Efeito de inibição na evolução temporal da concentração de glicose em ensaio de hidrólise, a 50°C, pH 4,8, carga de substrato no erlenmeyer de 2,9% ($m_{\text{celulose}}/m_{\text{total}}$), 0,85FPU/mL_{tampão} de Accellerase[®] 1500.

Pode-se observar quão importante é o efeito do termo de inibição (com $K_i = 5,91 \pm 0,97 \text{ g.L}^{-1}$) na representação da hidrólise enzimática do bagaço através de modelo do tipo de MM.

Foram também realizados testes finais de análise dos parâmetros de Michaelis-Menten e das constantes de inibição fazendo uso de um algoritmo de busca global, Simulated Annealing (KIRKPATRICK *et al.*, 1983) implementado no software in-house para compilador Matlab.

Os resultados obtidos para o ajuste simultâneo de K_m , $V_{m\acute{a}x}$ e K_i , considerando como estimativa inicial os valores até aqui obtidos para os supracitados parâmetros, confirmaram os resultados inicialmente obtidos (pouca discrepância), isto é:

$K_m = 8,77 \text{ g}_{\text{glicose}} \cdot \text{L}^{-1} \text{ tampão}$, $V_{m\acute{a}x} = 0,104 \text{ g}_{\text{glicose}} \cdot \text{L}^{-1} \text{ tampão} \cdot \text{min}^{-1}$ e $K_i = 5,91 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (Origin + Fortran, algoritmos Marquardt);

$K_m = 9,68 \text{ g}_{\text{glicose}} \cdot \text{L}^{-1} \text{ tampão}$, $V_{m\acute{a}x} = 0,113 \text{ g}_{\text{glicose}} \cdot \text{L}^{-1} \text{ tampão} \cdot \text{min}^{-1}$ e $K_i = 5,69 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (Matlab, algoritmo SA);

Além disso, a ferramenta no Matlab também fornece os intervalos de confiança para os parâmetros cinéticos (planos, correspondendo a combinações dos parâmetros dois a dois). As figuras 4.11 a 4.17 mostram os resultados obtidos.

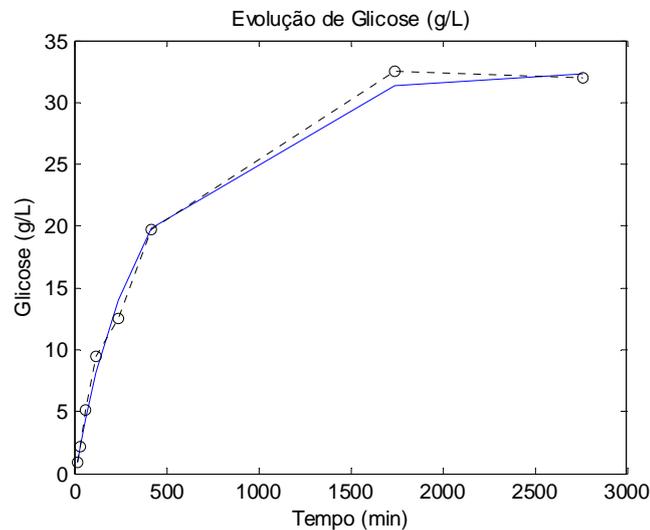


Figura 4.11 Evolução temporal da concentração de glicose em ensaio de hidrólise, modelo (linha azul) de MM com inibição (software Matlab) a 50°C, pH 4,8, carga de substrato no erlenmeyer de 2,9% ($m_{\text{celulose}}/m_{\text{total}}$), 0,85FPU/mL_{tampão} de Accellerase® 1500.

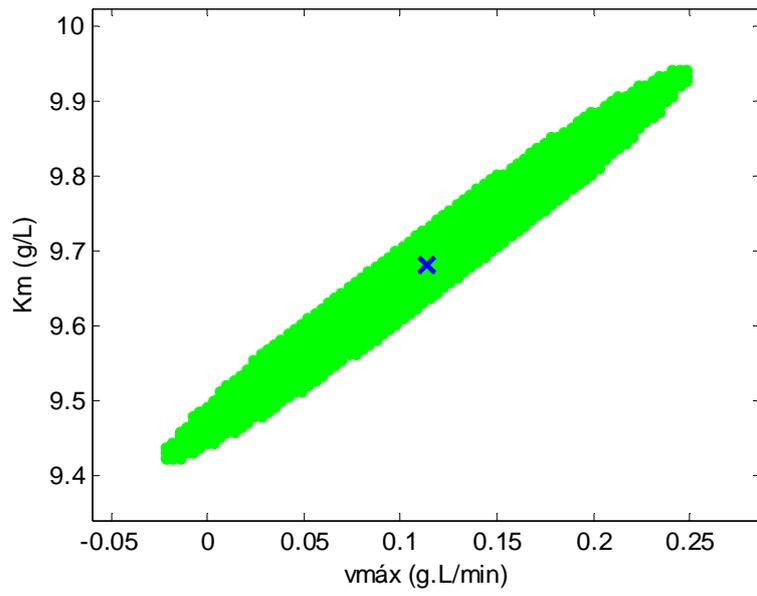


Figura 4.12 Região de confiança ($K_m/V_{máx}$) com forma restringida à elíptica.

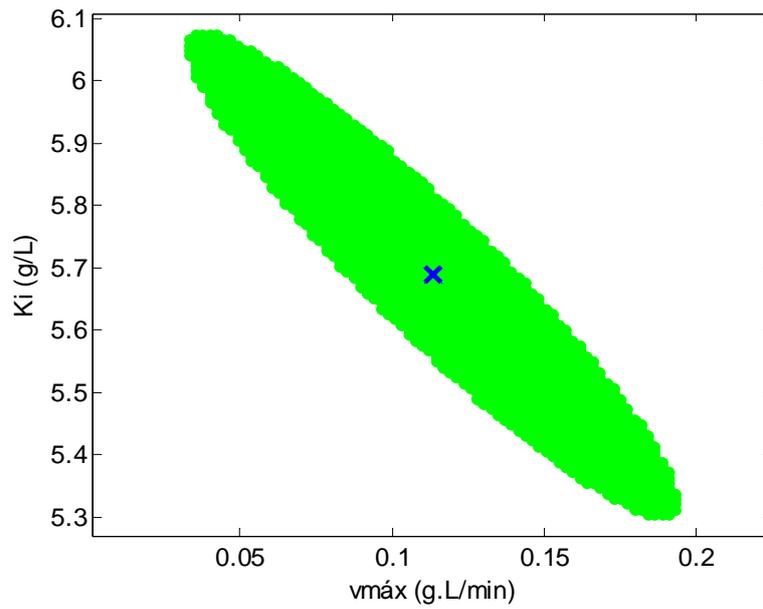


Figura 4.13 Região de confiança ($K_i/V_{máx}$) com forma restringida à elíptica.

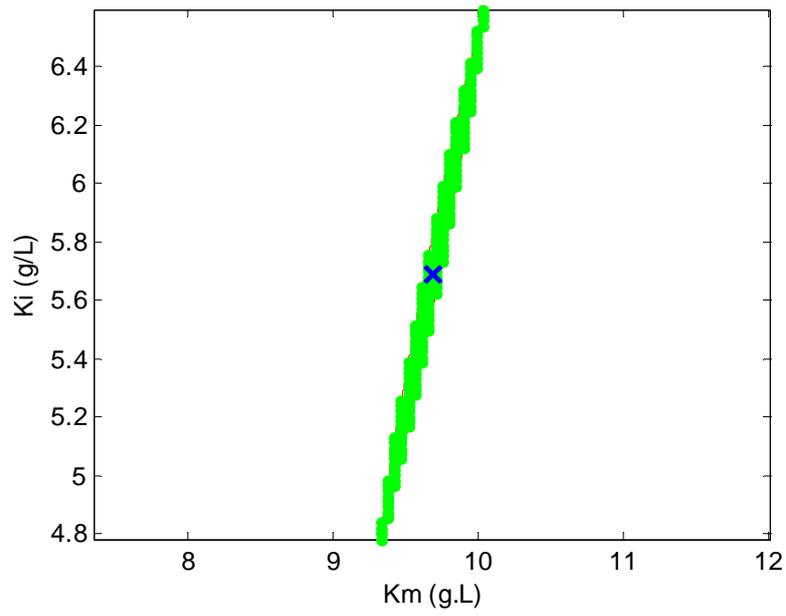


Figura 4.14 Região de confiança (K_i/K_m) com forma restringida à elíptica.

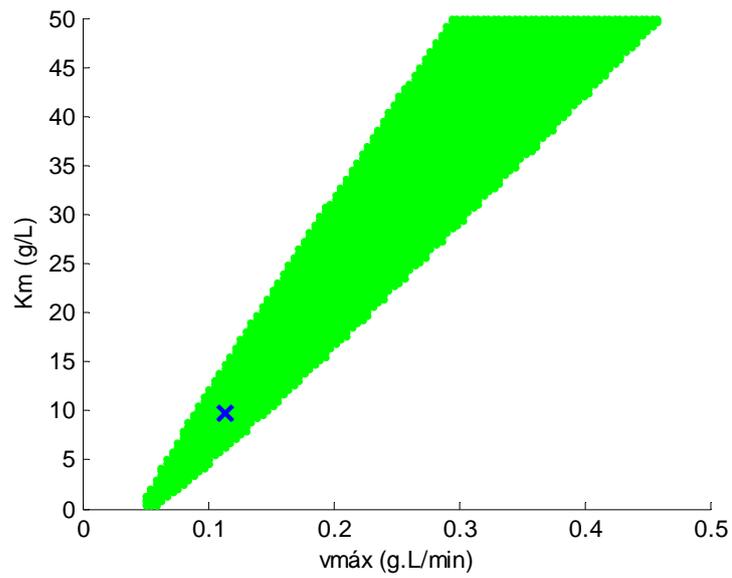


Figura 4.15 Região de confiança ($K_m/v_{máx}$), segundo critério de Beale (forma não restringida à elíptica).

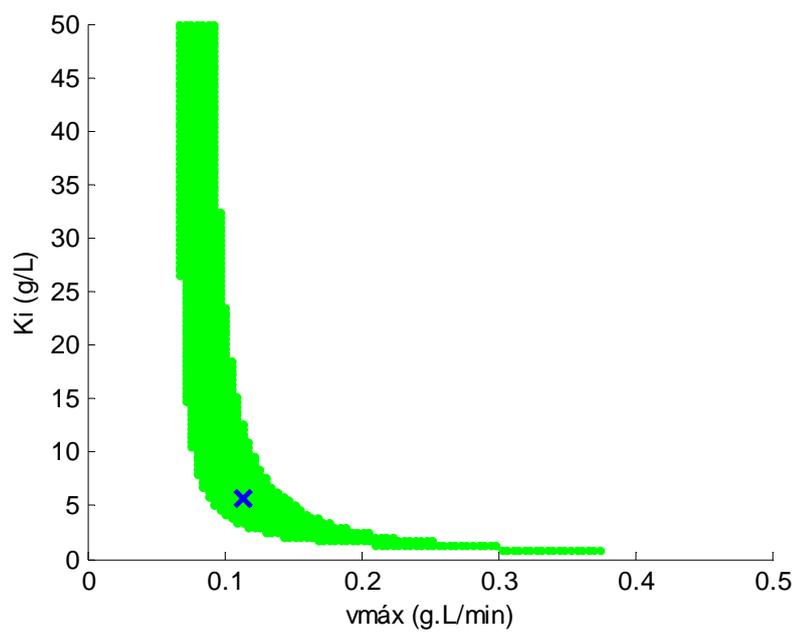


Figura 4.16 Região de confiança (K_i/v_{\max}), segundo critério de Beale (forma não restringida à elíptica).

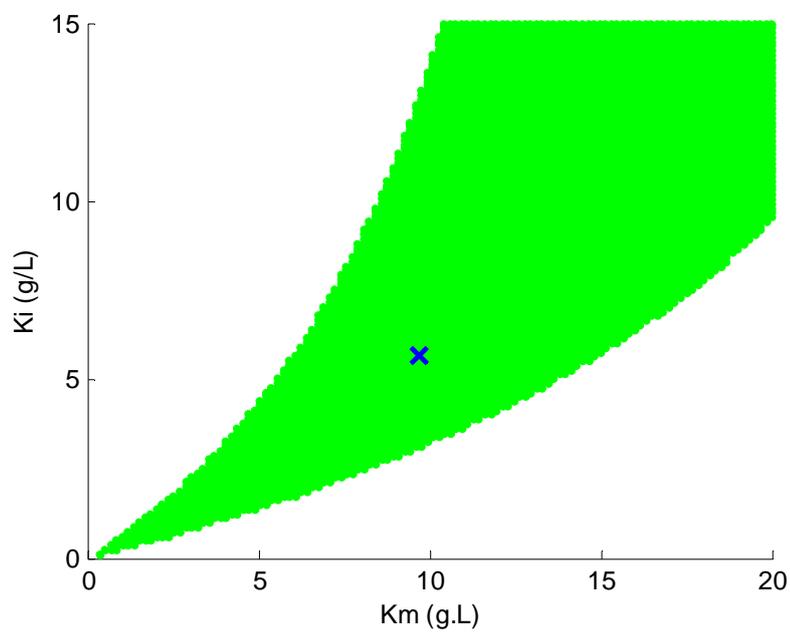


Figura 4.17 Região de confiança (K_i/K_m), segundo critério de Beale (forma não restringida à elíptica).

É importante dizer que os três parâmetros do modelo de MM com inibição são altamente correlacionados, com valores da matriz de correlação paramétrica próximos de 1 (em módulo).

Foram também realizados experimentos em erlenmeyers de 250 ml, com um volume líquido de 30 mL, variando-se a quantidade de enzima utilizada em uma faixa de 6 a 90 FPU.g⁻¹_{substrato} de Accellerase[®] 1500 correspondente a 3,9 a 60 g_{enzima}.L⁻¹_{solução}, e mantendo-se fixo o valor de substrato de 6,54% (m_{celulose}/m_{total}) correspondente a uma concentração de glicose potencial de 77,77 g_{Glicose}.L⁻¹_{solução}. Isto devido ao fato de que para concentrações de substrato acima de 3,85% (m/m) os efeitos difusionais podem ser importantes, de modo que deve-se considerar o modelo de Michaelis-Menten modificado, com um substrato sólido e enzima solúvel. Isto implica que as concentrações de enzima e substrato são trocados nas equações de Michaelis, a enzima, em vez do produto, sendo liberada ao meio, no final da seqüência de reação. Assim, a velocidade inicial de hidrólise pode ser expressa como uma função da concentração inicial da enzima como mostrado anteriormente na equação 5.

Antecedendo o ajuste dos dados ao modelo de MM modificado, utilizou-se o modelo de LB modificado (equação 24). A Figura 4.18 mostra os resultados obtidos em diagrama de Lineweaver-Burk para hidrólise enzimática de celulose a 50°C, pH 4,8, carga de substrato no erlenmeyer de 6,54% (m/m)

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{E} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (24)$$

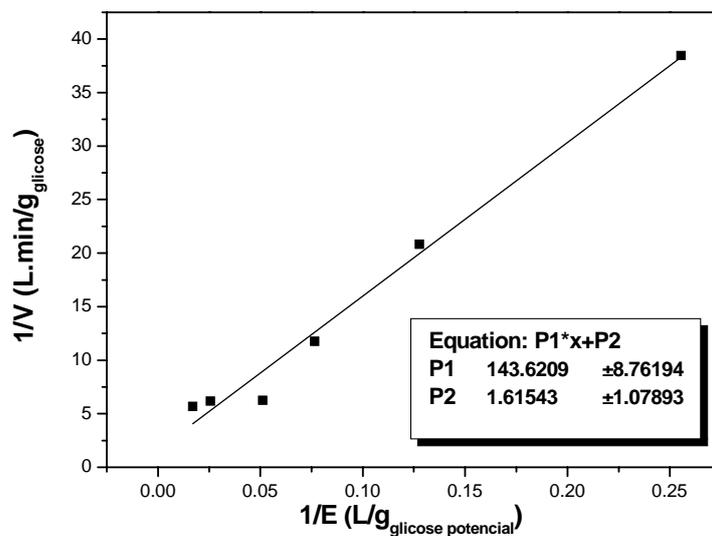


Figura 4.18 Diagrama de Lineweaver-Burk modificado para hidrólise enzimática de celulose a 50°C, pH 4,8, carga de substrato no erlenmeyer de 6,54% ($m_{\text{celulose}}/m_{\text{total}}$), correspondente a 77,77 $\text{g}_{\text{glicose}}/\text{L}_{\text{tampão}}$.

A Figura 4.19 mostra o comportamento de MM modificado (equação 5) obtido utilizando como chute inicial os parâmetros obtidos ($V_{\text{máx}} = V_{\text{emáx}} = 0,619 \text{ g}_{\text{glicose}}/\text{L}_{\text{tampão}}.\text{min}$ e $K_m = K_e = 88,91 \text{ g}_{\text{glicose}}/\text{L}_{\text{tampão}}$) com o diagrama de Lineweaver-Burk (Figura 4.18) para hidrólise enzimática de celulose a 50°C, pH 4,8, carga de substrato de 6,54% ($m_{\text{celulose}}/m_{\text{total}}$).

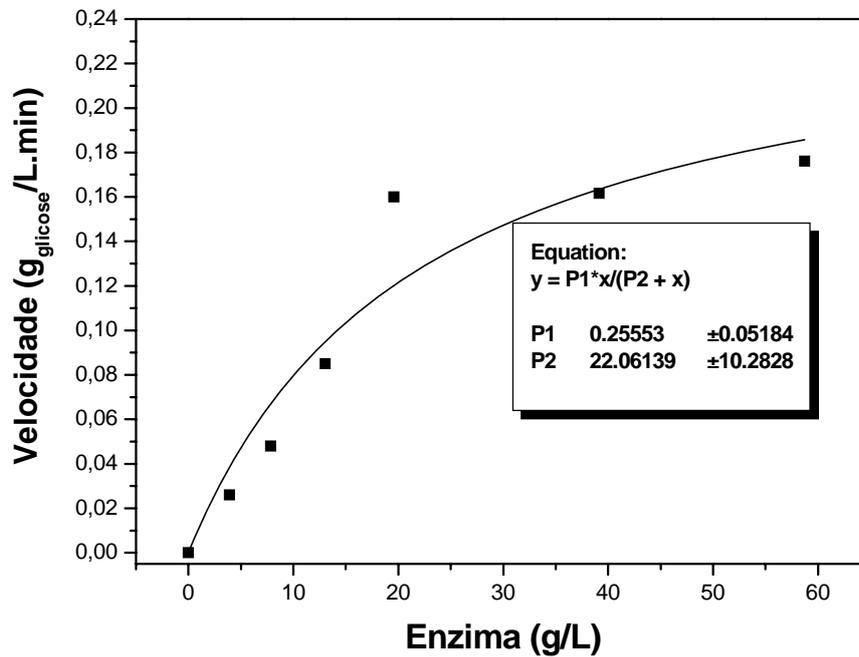


Figura 4.19 Comportamento de Michaelis Menten para hidrólise enzimática de celulose a 50°C, pH 4,8, carga de substrato no erlenmeyer de 6,54% ($m_{\text{celulose}}/m_{\text{total}}$), correspondente a 77,77 $\text{g}_{\text{glicose}}/\text{L}_{\text{tampão}}$.

A Tabela 4.8 mostra os parâmetros obtidos para os diferentes ajustes, lembrando que o ajuste de Lineweaver-Burk só é utilizado como chute inicial para obtenção dos parâmetros através de MM, visto que Lineweaver-Burk relaciona o inverso dos dados estudados e o erro pode-se tornar muito grande.

Tabela 4.8 - Parâmetros obtidos por diferentes ajustes, sendo LB chute inicial para MM (modificado).

Modelo	Km	Vmáx
	($\text{g}_{\text{glicose}}/\text{L}_{\text{tampão}}$)	($\text{g}_{\text{glicose}}/\text{L}_{\text{tampão}} \cdot \text{min}$)
LB	88,91 \pm 8,12	0,619 \pm 0,93
MM	22,06 \pm 10,28	0,256 \pm 0,52x10 ⁻¹

Na Tabela acima, para $V_{\text{máx}} = 0,256 \text{ g}_{\text{glicose}}/\text{L}_{\text{tampão}} \cdot \text{min}$, $k = V_{\text{máx}}/S = 0,256/77,77 = 0,0033 \text{ min}^{-1}$ (lembrando que em se tratando de MM modificado, S fica no lugar de E em $V_{\text{máx}}$ dos ensaios de velocidade inicial).

A partir de dados obtidos da evolução temporal da concentração de glicose em experimentos de longa duração, em ensaios de hidrólise com concentração de substrato de 6,54%, com carga enzimática $13,05 \text{ g}_{\text{enzima}} \cdot \text{L}^{-1} \text{ solução}$ correspondendo a $20 \text{ FPU} \cdot \text{g}^{-1} \text{ substrato}$ foi possível também analisar efeitos de inibição.

A Figura 4.20 mostra o ajuste do modelo de MM (modificado) com inibição competitiva pelo produto (equação 25, considerando $E_{\text{adsorvida}} \ll E_0$) para ensaio de hidrólise enzimática obtido para concentração de substrato de 6,54% ($m_{\text{celulose}}/m_{\text{total}}$).

$$v = \frac{k \cdot S \cdot E_0}{K_m \cdot \left(1 + \frac{I}{K_I}\right) + E_0} \quad (25)$$

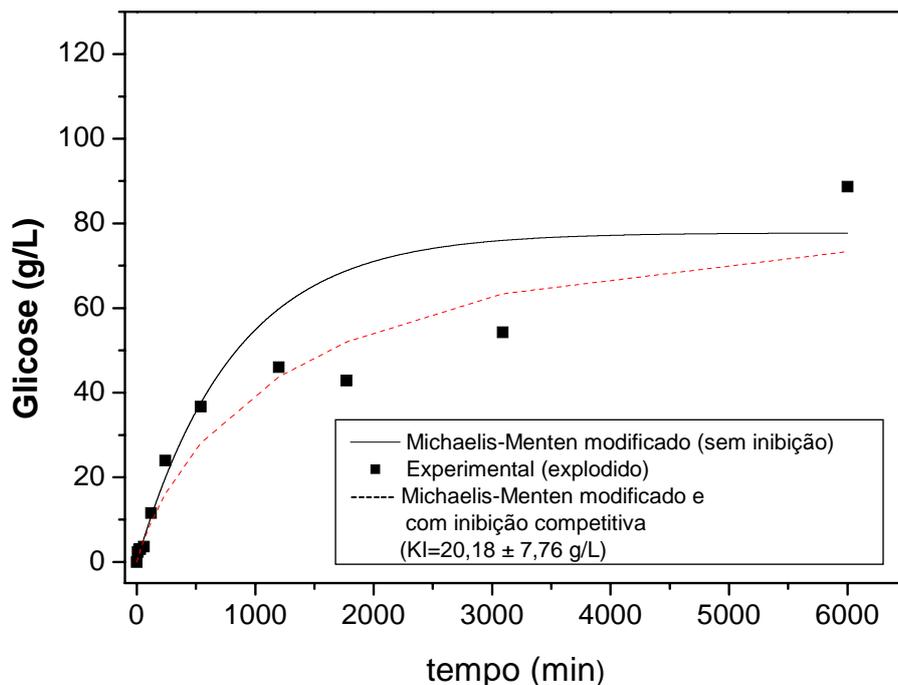


Figura 4.20 Efeito de inibição na evolução temporal da concentração de glicose em ensaio de hidrólise, a 50°C , pH 4,8, carga de substrato no erlenmeyer de 6,54% ($m_{\text{celulose}}/m_{\text{total}}$), $20 \text{ FPU} \cdot \text{g}^{-1} \text{ substrato}$ de Accellerase® 1500.

Pode-se observar novamente o quão importante é o efeito do termo de inibição (com $K_i = 20,18 \pm 7,76 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) na representação da hidrólise enzimática do bagaço através de modelo do tipo de MM.

Foram também realizados testes finais de análise dos parâmetros de Michaelis-Menten modificado e das constantes de inibição fazendo uso de um algoritmo de busca global (Simulated Annealing), implementado no software in-house para compilador Matlab.

Os resultados obtidos para o ajuste simultâneo de K_m , $V_{m\acute{a}x}$ (ou k) e K_i , considerando como estimativa inicial os valores até aqui obtidos para os supracitados parâmetros, confirmaram os resultados inicialmente obtidos (pouca discrepância), isto é:

$K_m = 22,06 \text{ g}_{\text{glicose}} \cdot \text{L}^{-1}_{\text{tamp\~{a}o}}$, $k = 0,0033 \text{ min}^{-1}$ e $K_i = 20,18 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (Origin + Fortran, algoritmos Marquardt);

$K_m = 27,00 \text{ g}_{\text{glicose}} \cdot \text{L}^{-1}_{\text{tamp\~{a}o}}$, $k = 0,0035 \text{ min}^{-1}$ e $K_i = 16,00 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (Matlab, algoritmo SA);

Novamente, a ferramenta no Matlab também forneceu os intervalos de confiança para os parâmetros cinéticos. As figuras 4.21 a 4.27 mostram os resultados obtidos. (OBSERVAÇÃO: nas figuras abaixo, $V_{m\acute{a}x}$ se refere a $k \cdot E = 0,0035 \cdot 13,05 = 0,046 \text{ g}_{\text{glicose}} / \text{L}_{\text{tamp\~{a}o}} \cdot \text{min}$, já que não mais se trata de ensaios de velocidades iniciais, em que se variou E e manteve-se S constante).

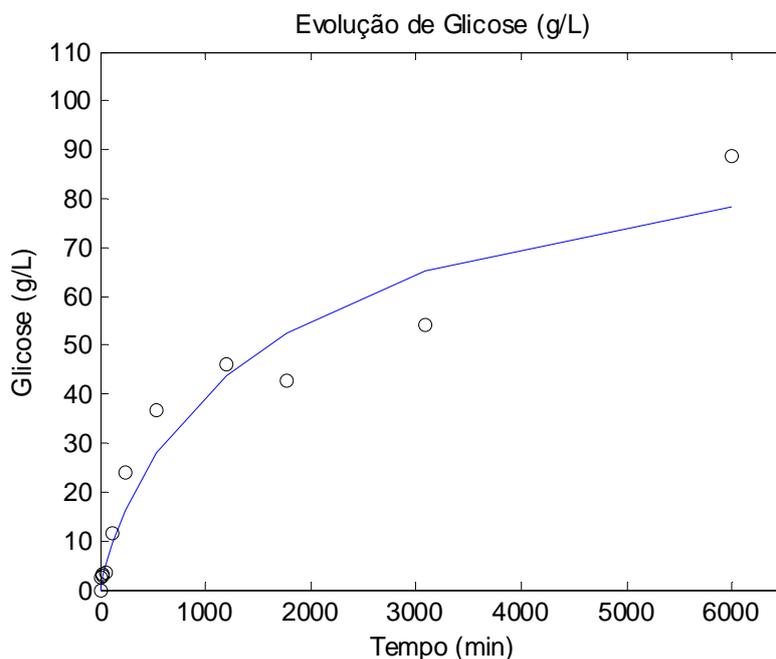


Figura 4.21 Evolução temporal da concentração de glicose em ensaio de hidrólise, modelo de MM com inibição (software Matlab) a 50°C, pH 4,8, carga de substrato no erlenmeyer de 6,54% ($m_{\text{celulose}}/m_{\text{total}}$), 20 FPU. $\text{g}^{-1}_{\text{substrato}}$ de Accellerase[®] 1500

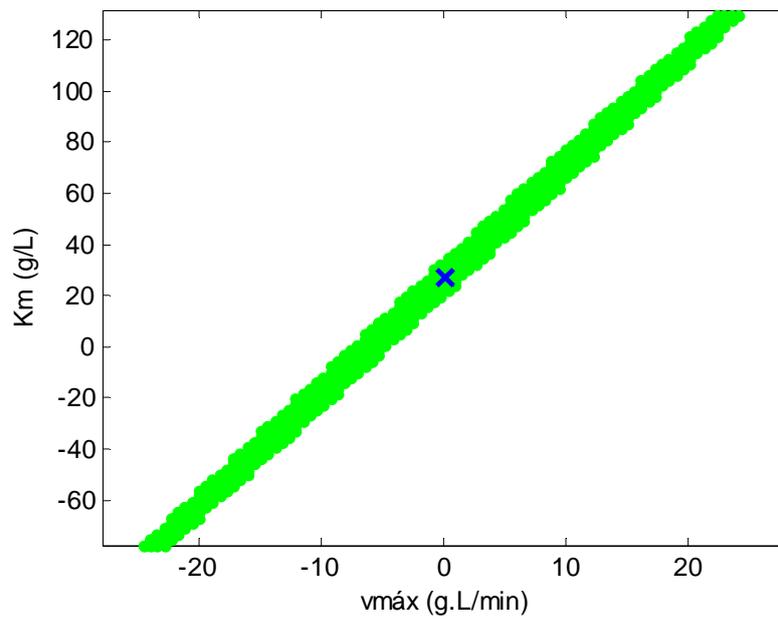


Figura 4.22 Região de confiança ($K_m/V_{máx}$) com forma restringida à elíptica.

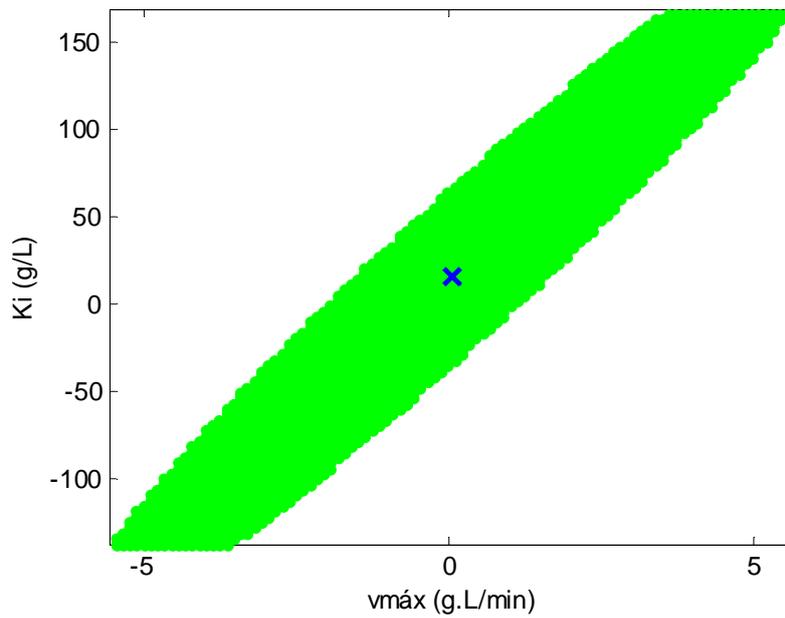


Figura 4.23 Região de confiança ($K_i/V_{máx}$) com forma restringida à elíptica.

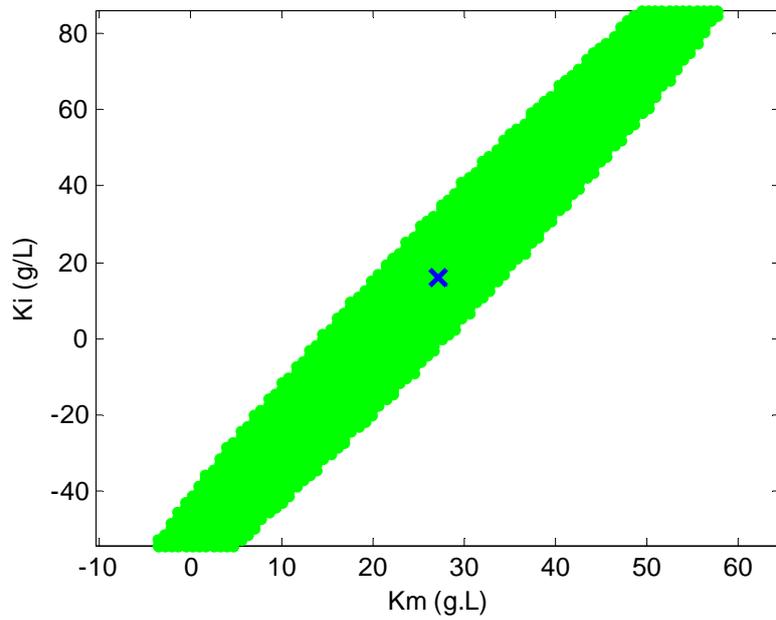


Figura 4.24 Região de confiança (K_i/K_m) com forma restringida à elíptica.

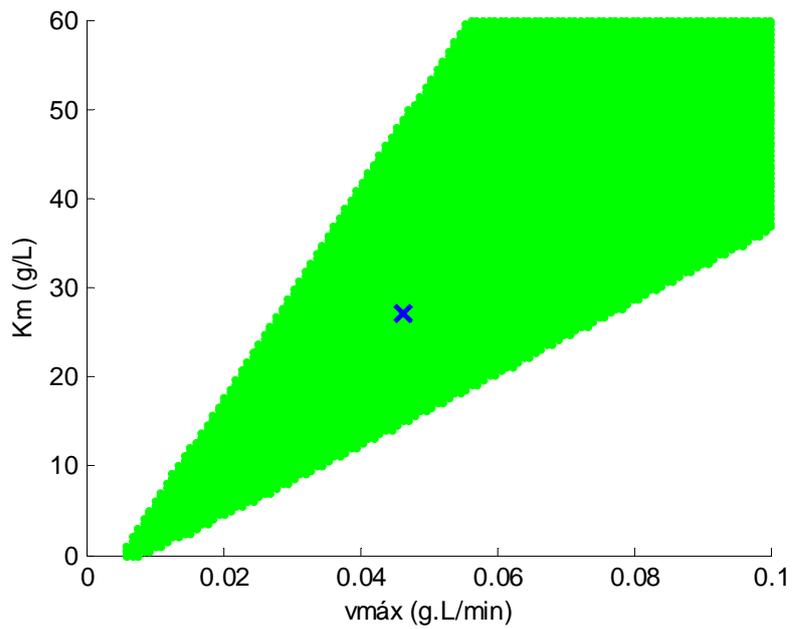


Figura 4.25 Região de confiança ($K_m/v_{máx}$), segundo critério de Beale (forma não restringida à elíptica).

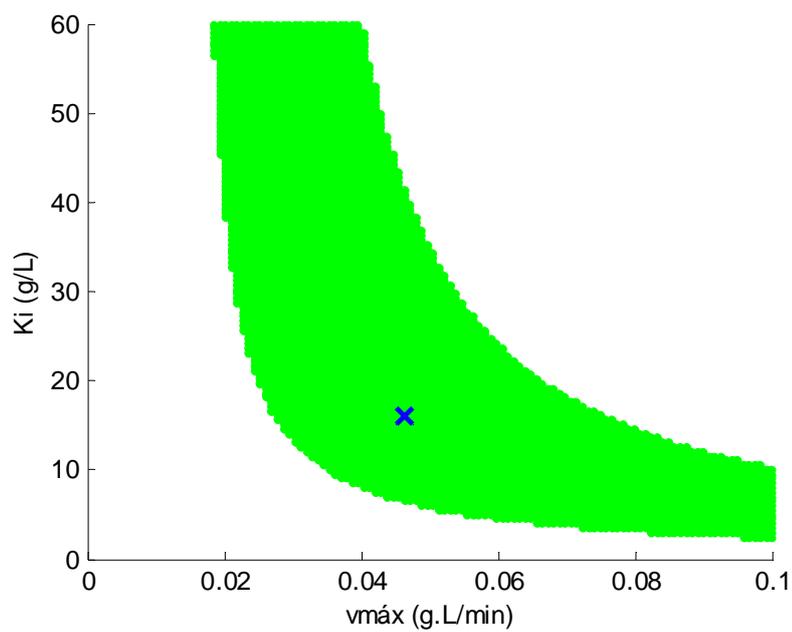


Figura 4.26 Região de confiança (K_i/v_{\max}), segundo critério de Beale (forma não restringida à elíptica).

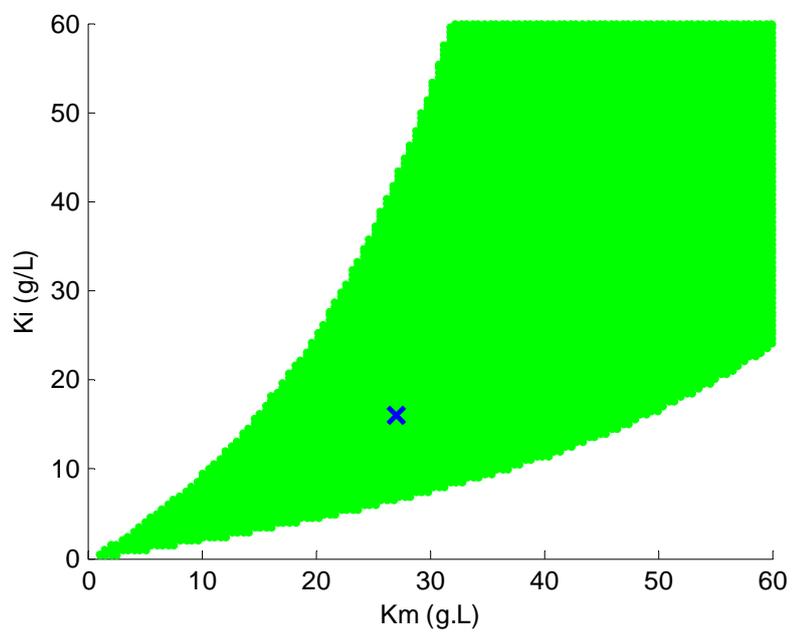


Figura 4.27 Região de confiança (K_i/K_m), segundo critério de Beale (forma não restringida à elíptica).

Comparando-se a figura 4.12 com a 4.22, a 4.13 com a 4.23 e a 4.14 com a 4.24, é possível observar que para o primeiro (4.12/4.22) e para o terceiro caso (4.14/4.24) o comportamento das regiões de confiança são similares. Já para o segundo caso (4.13/4.23), o comportamento das regiões não é similar. Isso já é um indicativo de que restringir-se as regiões de confiança à forma elíptica pode não ser adequado. Por outro lado comparando-se a figura 4.15 com a 4.25, a 4.16 com a 4.26 e a 4.17 com a 4.27, é possível observar que para todos os casos (4.15/4.25; 4.16/4.26; 4.17/4.27) há uma similaridade no comportamento das regiões de confiança. De fato, esperar-se-ia que as regiões de confiança geradas segundo o critério de Beale fornecessem resultados mais coerentes.

4.3.2.2 Hidrólise do Bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com H₂SO₄ 1% tratado com NaOH 4%

Para o bagaço tratado com H₂SO₄ 1% e deslignificado com NaOH 4%, primeiramente foi rodado um ensaio fixando o substrato em 2,9% ($m_{\text{celulose}}/m_{\text{total}}$), correspondente a uma concentração de glicose potencial de 33,33 g_{Glicose}.L⁻¹ solução, adicionando-se 0,85FPU/mL_{tampão} de enzima Accellerase® 1500. Este último experimento foi realizado para analisar a existência de resistência difusional no meio reacional, para se ter conhecimento se haveria a possibilidade de um ajuste de MM (pseudo-homogêneo) para regiões de baixa carga de substrato. Porém, ajustando os dados experimentais obtidos ao modelo de Chrastil, pôde-se observar pelo valor numérico de n, que o meio apresentava grande resistência difusiva (Figura 4.28).

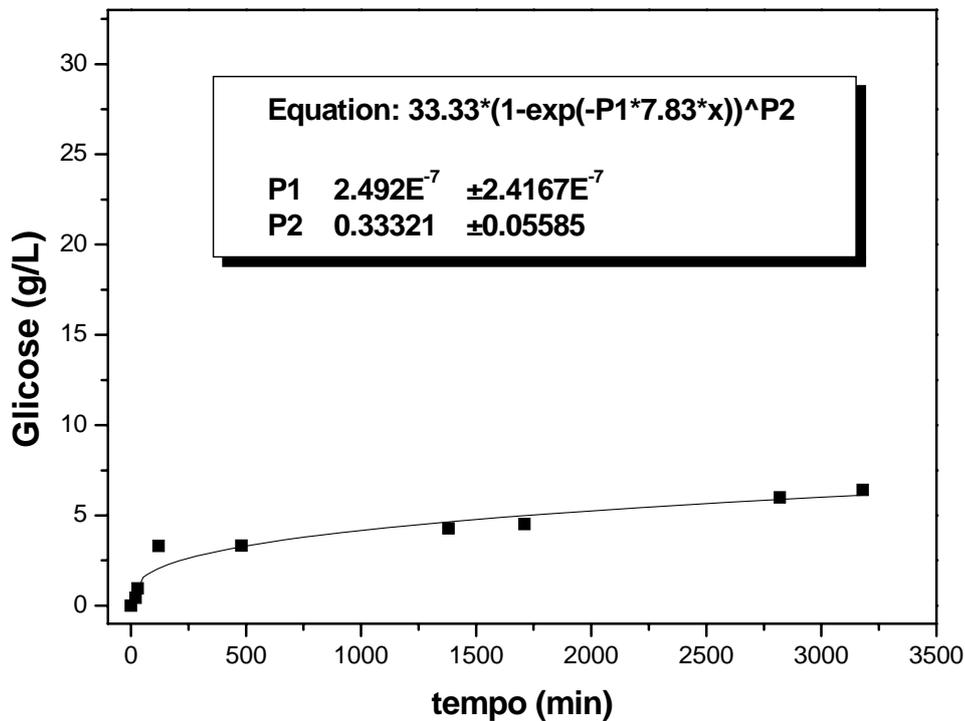


Figura 4.28 Modelo ajustado de acordo com Chrastil para a concentração de 2,9% ($m_{\text{celulose}}/m_{\text{total}}$) onde $k' = 2,49E^{-7}$ ($L \cdot g^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) e $n = 0,33$.

Após confirmada a existência de resistência difusiva, partiu-se para o modelo adequado para mais altas cargas de substrato, MM modificado. Para isso foram realizados experimentos em que se variou a quantidade de enzima utilizada em uma faixa de 6 a 90 $\text{FPU} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{substrato}}$ de Accellerase[®] 1500 correspondente a 3,9 a 60 $\text{g}_{\text{enzima}} \cdot \text{L}^{-1}_{\text{solução}}$, e manteve-se fixo o valor de substrato de 6,54% ($m_{\text{celulose}}/m_{\text{total}}$) correspondente a uma concentração de glicose potencial de 77,77 $\text{g}_{\text{Glicose}} \cdot \text{L}^{-1}_{\text{solução}}$. No entanto, a resistência difusiva nesses casos foi tão efetiva que não seria adequado um ajuste de MM modificado com inibição (pois o modelo não se ajustaria aos dados). Utilizou-se, então, o modelo de Chrastil para o ajuste dos parâmetros (Figura 4.29).

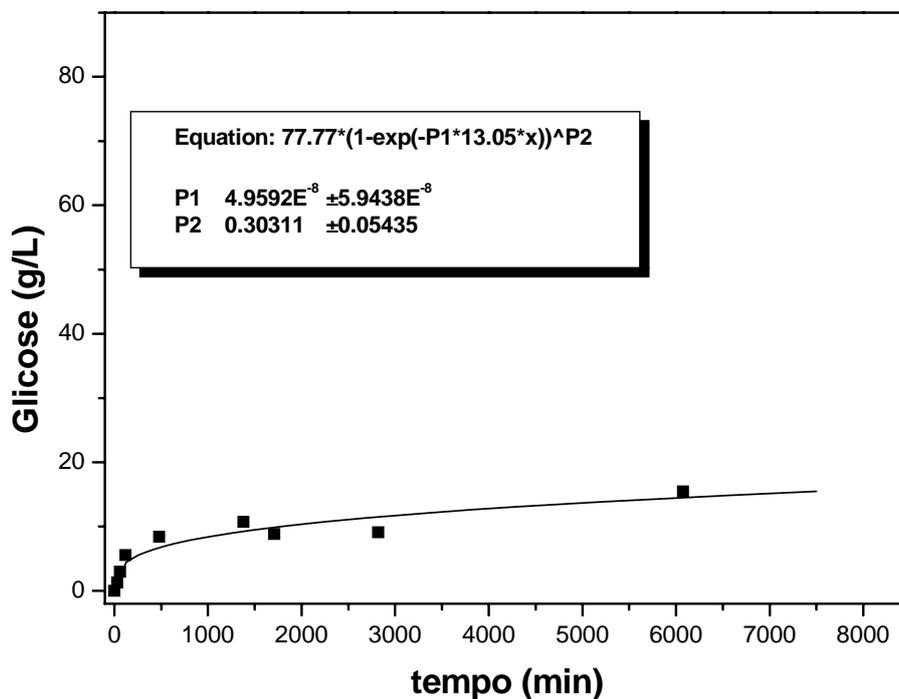


Figura 4.29 Modelo ajustado de acordo com Chrastil para a concentração de 6,54% ($m_{\text{celulose}}/m_{\text{total}}$) onde $k' = 4,96E^{-8} \text{ (L.g}^{-1}.\text{min}^{-1})$ e $n = 0,30$.

Cabe ressaltar, neste ponto, que todos os valores de n do modelo de Chrastil foram condizentes com aqueles apresentados em Carrillo *et al.* 2005, isto é, n próximo de 1 para sistemas sem resistências difusionais, n próximo de 0,6 para sistemas com resistência difusional e n em torno de 0,3 para sistemas altamente recalcitrantes. Por fim, para este último caso, sugerem-se redes neurais para mapearem as velocidades de hidrólise em função da concentração de substrato. Isto porque, na realidade, pode-se pensar que o comportamento altamente recalcitrante observado para o substrato pré-tatado com ácido e deslignificado com NaOH 4% (não explodido) não deve ser atribuído unicamente a efeitos difusivos, mas também outros, como por exemplo adsorção da enzima em lignina (visto que este último pré-tratamento não apresentou eficiência na remoção de lignina em comparação com o bagaço explodido tratado com NaOH 4%).

A parte de resultados referentes ao papel filtro e aos bagaços de cana diferentemente pré-tratados, foi redigida na forma de um trabalho a ser apresentado no 33^o Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals.

5 CONCLUSÕES

Para o papel de filtro qualitativo a resistência no filme externo ao transporte de massa não se mostrou significativa para este sistema quando a velocidade de agitação está na faixa de 150 a 300 rpm. Os estudos indicaram que, na faixa 30-50°C, ocorreu sempre um aumento na velocidade de hidrólise, não se alcançando uma região em que a desnaturação térmica das enzimas do pool fosse determinante. Pôde-se ajustar modelo de Michaelis-Menten pseudo-homogêneo para regiões de velocidades iniciais de hidrólise. Tanto os ajustes iniciais através de Lineweaver-Burk como os próprios ajustes de MM puderam ser considerados para uma faixa de concentrações de substrato de até 13%($m_{\text{papel}}/m_{\text{total}}$).

Para o substrato real (bagaço explodido tratado com NaOH 4%, teor celulose 88%) foi possível ajustar o modelo de MM pseudo-homogêneo, com chutes iniciais obtidos de diagrama de Lineweaver-Burk, para uma faixa de concentrações (0,99% a 3,85%($m_{\text{celulose}}/m_{\text{total}}$) relativamente mais baixa do que para o papel. Isto se deve ao fato de que o substrato real se apresentou mais susceptível a efeitos de resistência difusional. Pôde-se, também, ajustar uma constante de inibição competitiva para completar o modelo de MM, de modo que obtivemos um modelo final de hidrólise enzimática do tipo MM com inibição competitiva que se ajustou perfeitamente aos dados experimentais para ensaios de longa duração (dentro da faixa 0,99% a 3,85%). Para o bagaço explodido tratado com NaOH 4% e considerando concentrações de substrato mais elevadas (6,54 e 9,09%) foram realizados ensaios de hidrólise visando o ajuste de modelo de MM modificado, com inibição. Tal abordagem é (e de fato foi) adequada para o caso em questão, isto é, sistema heterogêneo com alta resistência difusional.

Finalmente, para o bagaço tratado com H₂SO₄ 1% e tratado com NaOH 4%, que se mostrou ainda mais recalcitrante, foi possível ajustar modelos de Chrastil, sugerindo-se ainda o treinamento de redes neurais para mapear as velocidades de hidrólise em função da concentração de substrato.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-ZUHAIR, S. The effect of crystallinity of cellulose on the rate of reducing sugars production by heterogeneous enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technol.**, v. 99, p. 4078-4085, 2007.

ANDRIĆ, P. et al. Reactor design for minimizing product inhibition during enzymatic lignocellulose hydrolysis: I. Significance and mechanism of cellobiose and glucose inhibition on cellulolytic enzymes, **Biotechnol. Adv.**, v. 28, No. 3, p. 308, 2010.

ANDRIĆ, P. et al. Reactor design for minimizing product inhibition during enzymatic lignocellulose hydrolysis: II. Quantification of inhibition and suitability of membrane reactors, **Biotechnol. Adv.**, v. 28, No. 3, p. 407, 2010b.

ANNEMA, A. **Feed-forward neural networks: vector decomposition analysis, modeling and analog implementation.** Boston: Kluwer Academic Publishers, 1995.

AZUMA, J. et al. Effects of microwave irradiation on enzymatic susceptibility of crystalline cellulose. **J. Ferment. Technol.**, v. 63, p. 529-536, 1985.

BAKER J. O. et al. Hydrolysis of cellulose using ternary mixtures of purified cellulases. **Appl. Biochem Biotech.**, v. 70/72, p. 395-403, 1998.

BANSAL, P. et al. Modeling cellulase kinetics on lignocellulosic substrates. **Biotechnol. Adv.**, v. 27, No. 6, p.833, 2009.

BEGUIN, P.; AUBERT, J. P. The biological degradation of cellulose. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 13, p. 25-58, 1994.

BEZERRA, R.M.F.; DIAS, A.A. Discrimination among eight modified Michaelis–Menten kinetics models of cellulose hydrolysis with a large range of substrate/enzyme ratios. **Appl. Biochem. Biotech.**, v. 112, p. 173, 2004.

BEZERRA, R.M.F.; DIAS, A.A. Enzymatic kinetic of cellulose hydrolysis, **Appl. Environ. Microb.**, v. 126, p. 49, 2005.

BOMMARIUS, A.S. et al. Cellulase kinetics as a function of cellulose pretreatment, **Metab. Eng.**, v. 10, p. 370, 2008.

BROWN, R.F. et al. Comparison of mechanistic models in the initial rate enzymatic hydrolysis of AFEX-treated wheat straw. **Biotechnol. Fuels.**, v. 3, p. 6 2010.

CARRASCO, F. Thermo-mechano-chemical pretreatment of wood in a process development unit., **Wood Science Tech.**, v. 26, p. 413-428, 1992.

CARRILLO, F. et al. Effect of alkali pretreatment on cellulase hydrolysis of wheat straw: Kinetic Study. **Process. Biochem.**, v. 40, p. 3360, 2005.

CHANG, V. S. et al. Lime pretreatment of crop residues bagasse and wheat straw. **Applied Biochem. Biotechnol.**, v. 4, p.135–159, 1998.

CHAUVE, M. et al. Comparative kinetic analysis of two fungal β -glucosidases, **Biotechnol. Fuels**, v. 3, p. 3, 2010.

CHRASTIL, J. Enzymic product formation curves with the normal or diffusion limited reaction mechanism and in the presence of substrate receptors, **Int. J. Biochem.**, v. 20, No. 7, p. 683, 1988.

CHRASTIL, J. Determination of the first order consecutive reaction rate constants from final products, **Comput. Chem.**, v. 12, No. 4, p. 289, 1988.

CLAEYSSSENS, M.; TOMME, P. **Structure-activity relationships in cellulolytic enzymes**. In: Enzyme systems for lignocellulose degradation. London: Elsevier, p. 37-49, 1989.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da Safra brasileira: cana-de-açúcar, terceiro levantamento**. Brasília: Conab, janeiro, 2011. 19 p. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253&t=2>>. Acesso em: 08 de fevereiro de 2011.

CLARK, T. A.; MACKELI, K. L. Fermentation inhibitors in wood hydrolysates derived from the softwood *Pinus radiata*. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, v. 34B, p. 101-110, 1984.

CONTIERO, J. **Estudo da produção da enzima invertase extracelular por *Kluyveromyces bulgaricus***. 1992, Tese (Doutorado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Unicamp, Campinas.

CONVERSE, A. O. E.; WARE, W. **On the reactivity of cellulosic substrates in enzymatic hydrolysis**. In: IEA/BIOFOR Workshop on Applications of Biotechnology in Bioenergy Systems, 18 - 20 de Outubro, 1994, Ottawa, Canada.

CUNHA, C. M.; SILVA, F. T. **Characterization of carbohydrates present in hydrolyzate obtained from sugar cane bagasse pretreated by explosion**. In: 6th Brazilian Symposium Chemistry Lignins and other Wood Components, 2001, v. VII, p. 221-226.

D'ALMEIDA, M. H. **Celulose e papel**. 2. ed. São Paulo: Instituto de Pesquisas Tecnológicas do estado de São Paulo; Escola SENAI, 1988.

DENCE, C. W.; LIN, S. Y. **Methods in lignin chemistry**. New York: Springer Verlag, 1992.

DI SERIO, M. et al. Quantitative analysis of the key factors affecting yeast growth. **Ind. Eng. Chem. Res.**, v. 42, p. 5109, 2003.

DRISSEN, R.E.T. et al. Modeling ethanol production from cellulose: separate hydrolysis and fermentation versus simultaneous saccharification and fermentation. **Biocatal. Biotransfor.**, v. 27, No. 1, p. 27, 2009.

EKLUND, R.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Optimization of temperature and enzyme concentration in the enzymatic saccharification of steam-pretreated willow. **Enzyme Microbiol. Technol.**, v. 12, p. 225-228, 1990.

FAN, L. T.; GHARPURAY, M. M.; LEE, Y. H. Cellulose hydrolysis. **New York: Springer-Verlag**, 1987.

FAN, L.T.; LEE, Y.H. Major chemical and physical features of cellulosic materials as substrates for enzymatic hydrolysis. **Adv. Biochem. Eng.**, v. 14, p. 101, 1980.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood chemistry, ultrastructure, reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, 1989.

GAMA, F. M. P. **Mecanismo bioquímico da ação de celulasas de *Trichoderma reesei***. Tese Doutorado - Escola de Engenharia, Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, 1996.

GÁMEZ, S. et al. Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid. **J. of Food Engin.**, v.74, p.78-88, 2006.

GAN, Q.; ALLEN, S. J.; TAYLOR, G. Kinetic dynamics in heterogeneous enzymatic hydrolysis of cellulose: an overview, an experimental study and mathematical modeling. **Process Biochem.**, v. 38, p. 1003-1018, 2003.

GRANDA, C. B. Enzymatic hydrolysis of lime-pretreated corn stover and investigation of the HCH-1 Model: Inhibition pattern, degree of inhibition, validity of simplified HCH-1 Model, **Bioresource Tech.**, v. 98, p. 2969-2977, 2007.

HAGAN, M.; DEMUTH, H.; BEALE, M. **Neural network design**. Boston: PWS Publishing, 1996.

HAMELINCK, C. N.; HOOIJDONK, G. V.; FAAIJ, A. P. C. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. **Biomass and Bioenergy**, v. 28, p. 384-410, 2005.

HODGE, D.B. et al. Model-based fed-batch for high-solids enzymatic cellulose hydrolysis, **Appl. Biochem. Biotech.**, v. 152, p. 88, 2009.

HON, D. N. S. Chemical modification of lignocellulosic materials. Inc. 370p. 1996.

HSU, T. A.; LADISCH, M. R.; TSAO, G. T. Alcohol from cellulose. **Chem. Tech.**,v. 10(5) p. 315-319, 1980.

INGENSSON, H. et al. The effect of shaking regime on the rate and extend of enzymatic hydrolysis of cellulose. **J. of Biotech.**, v. 88, p. 177-182, 2001.

KADAM, K.L.; RYDHOLM, E.C.; MCMILLAN, J.D. Development and validation of a kinetic model for enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass. **Biotechnol. Progr.**, v. 20, p. 698, 2004.

KATZEN, R.; OTHMER, D.F. Wood hydrolysis: a continuous process. **Ind. Eng. Chem. Res.**, v. 34, p. 314, 1942.

KIRKPATRICK, S.; GELATT, C.D.; VECCHI, M. P. Optimization by simulated annealing. **Science**, v. 220, No. 4598, p. 671-680, 1983.

KOULLAS, D. P. et al. Correlating the effect of pretreatment on the enzymatic hydrolysis of straw. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 39, p. 113-116, 1992.

LARSSON, S. et al. The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 24, p.151-159, 1998.

LASER, M. et al. A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. **Biores. Technol.**, v.81, p. 33-44, 2002.

LAUREANO-PEREZ L. et al. Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass. **Appl. Biochem. Biotech.**, v. 124, p. 1081-1099, 2005.

LEE, J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **J. of biotech.**, v. 56, p. 1-24, 1997.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de bioquímica**. SãoPaulo: Sarvier, 1995.

LEVINE, S.E. et al. A mechanistic model of the enzymatic hydrolysis of cellulose, **Biotechnol. Bioeng.**, v. 107, No. 1, p. 37, 2010.

LI, C. et al. A kinetic study on enzymatic hydrolysis of a variety of pulps for its enhancement with continuous ultrasonic irradiation, **J. Biochem. Bioeng.**, v. 19, p. 155, 2004.

LIAO, W. et al. Kinetic modeling of enzymatic hydrolysis of cellulose in differently pretreated fibers from dairy manure. **Biotechnol. Bioeng.**, v.101, No. 3, p. 441, 2008.

LYND, L.; WEIMER, P.; ZYL, W.; PRETORIUS, A. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbio. Molec. Bio. Reviews.**, p. 506–577, 2002.

McDOUGALL, G. J. et al. Plant fibres: botany, chemistry and processing for industrial use. **J. Science Food Agricul.**, v. 62, p. 1-20, 1993.

MCPARLAND, J.J.; GRETHLEIN, H.E.; CONVERSE, A. O. Kinetics of acid hydrolysis of corn stover. **Sol. Energy**, v. 28, p. 55, 1982

MEDVE, J. **Cellulose Hydrolysis by *Trichoderma reesei* cellulases: studies on adsorption, sugar production and synergism of cellobiohydrolase I, II and endoglucanase II**. Tese Doutorado em Bioquímica, Sweden 1997.

MEDVE J. et al. Hydrolysis of microcrystalline cellulose by cellobiohydrolase I and endoglucanase II from *Trichoderma reesei*: adsorption, sugar production pattern, and synergism of enzymes. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 59, p. 621-634, 1998.

MORALES-RODRÍGUEZ, R. **Controlled fed-batch operation for improving cellulose hydrolysis in 2G bioethanol production**, In: 20th European Symposium on Computer Aided Process Engineering – ESCAPE20, 2010.

NIDETZKY, B. et al. Synergism of *Trichoderma reesei* cellulases while degrading different celluloses. **Biotechnol. Lett.**, v.15, n.1, p.71–76, 1993.

O'DWYER, J. et al. Enzymatic hydrolysis of lime-pretreated corn stover and investigation of the HCH-1 Model: Inhibition pattern, degree of inhibition, validity of simplified HCH-1 Model. **Bioresource Technology.**, v. 98, p. 2969–2977, 2007.

O'SULLIVAN, A. C. Cellulose: the structure slowly unravels. **Cellulose**, v. 4, p. 171-207, 1997.

O'DWYER, J.P. et al. Neural network prediction of biomass digestibility based on structural features. **Biotechnol. Progr.**, v. 24, p. 283, 2008.

OKAZAKI, M.; MOO-YOUNG, M. Kinetics of enzymatic hydrolysis of cellulose: Analytical description of a mechanistic model, **Biotechnol. Bioeng.**, v. 20, p. 637, 1978.

PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 69-80, 2000.

PATURAU, J. M. **By-products of the cane sugar industry: an introduction to their industrial utilization**. 3. ed. Amsterdam: Elsevier, 1989.

PITARELO, A. P. **Avaliação da susceptibilidade do bagaço e da palha de cana-de-açúcar à bioconversão via pré-tratamento a vapor e hidrólise enzimática**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Paraná, 2007.

PURI, V. P. Effect of crystallinity and degree of polymerization of cellulose on enzymatic saccharification. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 26, p.1219-1222, 1984.

RABELO S. C. **Avaliação do desempenho do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar**. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Campinas, 2007.

RAMOS, L. P. The chemistry involved in the pretreatment of lignocellulosic materials. **Química Nova**, v.26, p.863-871, 2003.

RAMOS, L. P., NAZHAD, M. M., SADDLER, J. N. Effect of enzymatic hydrolysis on the morphology and fine structure of pretreated cellulosic residues. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 15, p. 821-831, 1993.

RIVERA, E.C. et al. Enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse for bioethanol production: determining optimal enzyme loading using neural networks. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, v. 85, p. 983, 2010.

SAHA, B. C. Hemicelulose bioconversion. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 30, p. 279-291, 2003.

SALOHEIMO, M. et al. Enzymatic properties and intracellular localization of the novel *Trichoderma reesei* β -glucosidase BGII (Cel 1A). **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 68, p.4546-4553, 2002.

SALOHEIMO, M. et al. DNA cloning of a *Trichoderma reesei* cellulase and demonstration of endoglucanase activity by expression in yeast. **Eur. J. Biochem.**, v. 249, p. 584-591, 1997.

SEGEL, I. H. Cap I: Enzymes as biological catalysts. **Enzyme kinetics: behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems**. New York: John Wiley., 1975, p 1-17.

SHAO, X., et al. Kinetic modeling of cellulosic biomass to ethanol via simultaneous saccharification and fermentation: Part I, **Biotechnol. Bioeng.**, v. 102, No. 1, p. 59, 2009.

SHAO, X.J. **Cellulosic biomass to ethanol: kinetic modeling, scale up, and reactor design**. Dissertação de doutorado, Dartmouth College, USA, 2007.

SJÖSTRÖM, E. **Wood chemistry fundamentals and applications**. 2. ed. California, USA: Academic Press. 1992.

SOUTH, C.R.; HOGSETT, D.A.L.; LYND, L.R. Modeling simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulose to ethanol in batch and continuous reactors. **Enzyme. Microb. Technol.**, v. 17, p. 797, 1995.

SRISODSUK, M. **Mode of action of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I on crystalline cellulose**. Dissertação de doutorado. VTT Publications 188, Espoo, Finlândia, 1994.

SRISODSUK, M., et al. Modes of action on cotton and bacterial cellulose of a homologous endoglucanases-exoglucanase pair from *Trichoderma reesei*. **Eur. Jb. Chem.**, v. 251, p. 885-892, 1998.

SUN, Y.; CHENG J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bio. Technol.**, v. 83, p. 1-11, 2002.

TÍMAR-BALÁZSY, A.; EASTOP, D. **Chemical principles of textile conservation**. Oxford, UK: Butterworth-Heinemann, 1998.

VALJAMAE, P. et al. Acid hydrolysis of bacterial cellulose reveals different modes of synergistic action between cellobiohydrolase I and endoglucanase I. **Eur. J. Biochem.** v. 266, p. 327-334, 1999.

VALLANDER, L.; ERIKSSON, K. E. Enzymic saccharification of pretreated wheat straw. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 27, p.650-659, 1985.

WANG, L.S. et al. Quantitative estimate of the effect of cellulase components during degradation of cotton fibers. **Carbohydr. Res.**, v. 339, p. 819, 2004.

WOODWARD, J.; HAYES, M. K.; LEE, N. E. Hydrolysis of cellulose by saturating and non-saturating concentration of cellulose: implications of synergism. **Bio. Technol.**, v. 6, p. 301-304, 1988.

WYMAN, C. E. Ethanol from lignocellulosic biomass: technology, economics, and opportunities. **Bioresour. Technol.**, v. 50, p. 3-16, 1994.

XU, F.; DING, H. A new kinetic model for heterogeneous (or spatially confined) enzymatic catalysis: contributions from the fractal and jamming (overcrowding) effects, **Appl. Catal. A-Gen**, v. 317, p. 70, 2007.

ZHANG, J. et al. Simultaneous saccharification and co-fermentation of paper sludge to ethanol by *Saccharomyces Cerevisiae* RWB222 – Part I, **Biotechnol. Bioeng.**, v. 104, No. 5, p. 920, 2009.

ZHANG J, et al. Simultaneous saccharification and co-fermentation of paper sludge to ethanol by *Saccharomyces Cerevisiae* RWB222 – Part II, **Biotechnol. Bioeng.**, v. 104, No. 5, p. 932, 2009b.

ZHANG, Y.H.P.; LYND, L.R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 88, No. 7, p. 797 2004

ZHANG, Y.H.P.; HIMMEL, M.; MIELENZ, J. Outlook for cellulase improvement Screening and selection strategies. **Biotechnol. Advances**, v. 24, p. 452-481, 2006.

ZHANG, Y.H.P; LYND, L.R. A functionally based model for hydrolysis of cellulose by fungal cellulose. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 94, No. 5, p. 888, 2006.

ZHANG, Y.; XU, J. L.; YUAN, Z. H. **Modeling and prediction in the enzymatic hydrolysis of cellulose using artificial neural network.** In: fifth Intern. Conf. Natural Comput, Tianjin, China , 2009.

ZHENG, Y., et al. Kinetic modeling for enzymatic hydrolysis of pretreated creeping wild ryegrass. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 102, No. 6, p. 1558, 2009.

ZHOU, W. et al. Cellulose hydrolysis in evolving substrate morphologies I, **Biotechnol. Bioeng.**, v.104, No. 2, p. 261, 2009.

ZHOU, W. et al. Cellulose hydrolysis in evolving substrate morphologies II, **Biotechnol. Bioeng.**, v.104, No. 2, p. 275, 2009b.