



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR:
ESTUDO CINÉTICO E MODELAGEM MATEMÁTICA SEMI-
MECANÍSTICA**

Bruna Pratto

**São Carlos
2015**

BRUNA PRATTO

HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR: ESTUDO CINÉTICO
E MODELAGEM MATEMÁTICA SEMI-MECANÍSTICA

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 em Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos

Orientadores: Prof. Dr. Antonio José Gonçalves da Cruz
Prof. Dr. Ruy de Sousa Jr

São Carlos
2015

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

P913he Pratto, Bruna.
Hidrólise enzimática da palha de cana-de-açúcar : estudo cinético e modelagem matemática semi-mecanística / Bruna Pratto. -- São Carlos : UFSCar, 2015.
130 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2015.

1. Engenharia química. 2. Palha de cana-de-açúcar. 3. Etanol. 4. Hidrólise enzimática. 5. Estudo cinético. 6. Modelagem matemática. I. Título.

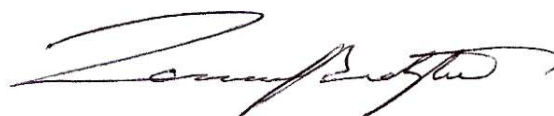
CDD: 660 (20^a)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE BRUNA PRATTO APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM 06 DE MARÇO DE 2015.

BANCA EXAMINADORA:



Antonio José Gonçalves da Cruz
Orientador, UFSCar



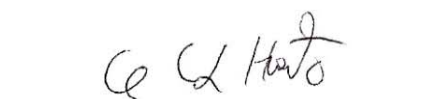
Ruy de Sousa Júnior
Coorientador, UFSCar



Charles Dayan Farias de Jesus
CTBE



Cristiane Sanchez Farinas
EMBRAPA/UFSCar



Antonio Carlos Luperni Horta
UFSCar

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Desenvolvimento e Automação de Bioprocessos (LaDABio) do Departamento de Engenharia Química (DEQ) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) e contou com o apoio financeiro do Programa de Recursos Humanos da Agência Nacional do Petróleo, Gás natural e Biocombustíveis (PRH-ANP/MCT Nº 44).



anp
Agência Nacional
do Petróleo,
Gás Natural e Biocombustíveis



*Dedico este trabalho ao meu bem mais precioso:
Meus pais, Edson e Elizete, e meus irmãos Isabella, Pedro e Matheus.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me proteger, guiar meus passos e iluminar meu caminho. Sem Ele eu nada seria.

Aos meus pais Edson e Elizete, que nunca me desampararam em momento algum da minha vida e que, apesar da distância, sempre estiveram apoiando-me e incentivando-me. Obrigada pelo amor incondicional concedido todos os dias da minha vida.

Aos meus irmãos que eu tanto amo e morro de saudades, Isabella, Pedro e Matheus.

Aos meus queridos orientadores, Prof. Dr. Antonio José Gonçalves da Cruz e Prof. Dr. Ruy de Sousa Jr. pela oportunidade e acolhimento, preciosos ensinamentos, amizade, confiança, apoio, paciência e dedicação.

À Renata, minha amiga fiel e mãezinha de coração. Agradeço imensamente por todos os ensinamentos, conselhos, apoio, paciência, companheirismo e ajudas imensuráveis ao longo desta jornada.

À Cíntia, minha querida amiga, sempre prestativa e de bom humor. A principal responsável por organizar confraternizações no grupo, proporcionando momentos de alegria e descontração a toda equipe.

Aos meus colegas de trabalho, que sempre me ajudaram quando eu precisava: Mayerlenis, Vitor, Luciano, Martha, Murilo, Gilson e Rafael.

Ao meu amor, Felipe, que mesmo a milhares de quilômetros de distância sempre me deu carinho, amor, apoio, conselhos e soube ser paciente nas horas difíceis.

À minha amiga e colega de mestrado, Ana Cláudia (Preta), pelos momentos de estudos e diversão e, principalmente, por me aguentar todos os dias na mesma casa.

Aos técnicos de laboratório, Amadeus, Thaís, Alyne e Thiago pela ajuda prestada.

À Evelyn, secretária do DEQ, pelos favores concedidos inúmeras vezes.

Aos meus professores de mestrado pelos grandes ensinamentos.

A toda equipe do grupo Bioquímica DEQ/UFSCar que contribuíram, seja ela direta ou indiretamente, através de conselhos, amizade e ajudas.

Ao PPGEQ - UFSCar pela infraestrutura concedida para a realização deste trabalho.

Ao PRH-ANP pelo apoio financeiro.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para este trabalho...

Meus sinceros agradecimentos!

“Quem triunfa sem risco, sobe ao pódio sem glória”

(Augusto Cury)

RESUMO

O aproveitamento de resíduos lignocelulósicos é visto como uma alternativa promissora, tanto do ponto de vista ambiental quanto econômico, para produção de biocombustíveis. Dentre as biomassas lignocelulósicas de maior importância no território nacional, a palha de cana-de-açúcar ocupa posição de destaque no que se refere à produção de etanol de segunda geração (E2G) por apresentar grande disponibilidade no campo. Um dos principais desafios que envolvem a produção de E2G é obter altas conversões de polissacarídeos em açúcares fermentescíveis, durante a etapa de hidrólise enzimática, de maneira que otimizar esta etapa requer um bom conhecimento da cinética de reação. Neste contexto, este trabalho teve por objetivo realizar o estudo cinético da etapa de hidrólise enzimática da fração celulósica da palha de cana-de-açúcar, pré-tratada hidrotermicamente (PTH) (195°C, 10 min e 200 rpm) e pré-tratada hidrotermicamente, seguida de pré-tratamento alcalino (PA) (NaOH 4% m/v, 30 min, 121°C). Neste estudo, foi analisada a influência das seguintes variáveis de processo: velocidade de agitação, pH, temperatura e concentrações de enzima e substrato. Experimentos empregando palha PTH foram realizados em Erlenmeyers (50°C, pH 5, 5 FPU.g_{celulose}⁻¹ e 10% sólidos m/v) com agitações de 0 a 300 rpm. Em seguida, foram analisadas as influências do pH e da temperatura. Inicialmente, o pH foi variado de 3 a 7 e, posteriormente, a temperatura foi variada de 40 a 60°C. Após determinadas e fixadas as condições ótimas de agitação, pH e temperatura, estudaram-se os efeitos da concentração de substrato e enzima para ambas as biomassas (PTH e PTH com PTA). Para verificar o efeito da concentração de substrato, a carga de sólidos variou de 2,5 a 10% (m/v), em ensaios de velocidade inicial e de longa duração. A concentração de enzima (Cellic[®]CTec2 – Novozymes S/A) variou de 275 a 5000 FPU.L_{solução}⁻¹ (5 a 80 FPU.g_{celulose}⁻¹), com carga de sólidos fixada em 10% (m/v). Finalmente, foi possível ajustar os modelos de Michaelis-Menten (MM) pseudo-homogêneo e MM modificado, com e sem inibição competitiva por glicose, e o modelo de Chrastil. Para a palha PTH um modelo de MM modificado com inibição (adequado para sistemas heterogêneos, com alta resistência à difusão) mostrou-se mais apropriado do que o MM pseudo-homogêneo. Para a palha PTH seguida de PTA, o modelo de MM modificado com inibição também foi mais adequado do que o MM pseudo-homogêneo. O modelo de Chrastil também foi aplicável na

modelagem de ambas as biomassas pré-tratadas. Os modelos foram capazes de identificar características essenciais do processo de hidrólise, sendo, úteis dentro da perspectiva da engenharia de biorreatores.

Palavras-chave: Palha de cana-de-açúcar; hidrólise enzimática; estudo cinético; modelagem matemática

ABSTRACT

For biofuels production, the recovery of lignocellulosic feedstock is seen as a promising alternative, both from environmental and economic point of views. Among the lignocellulosic biomasses most important in Brazil, sugarcane straw plays a prominent position regarding the production of second generation ethanol (E2G), due to its great availability in the field. One of the main challenges involving the production of second generation ethanol is to obtain high conversion rates of polysaccharides into fermentable sugars, in the hydrolysis step. A solid knowledge is an important prerequisite to optimize the conversion of lignocellulosic biomass into ethanol. In this context, the aim of this work is to study the kinetics of the enzymatic hydrolysis of cellulose from hydrothermally pretreated sugarcane straw (HPS) (195°C, 10 min e 200 rpm) and hydrothermally pretreated followed by alkaline pretreatment (NaOH 4% m/v, 30 min, 121°C). The influence of process variables as stirring speed, pH, temperature and, concentration of substrate and enzyme was evaluated. Experiments using HPS were carried out in Erlenmeyers (50°C, pH 5, 5 FPU.g_{cellulose}⁻¹ e 10% solids m/v) with shaking from 0 to 300 rpm. Then, the influences of pH and temperature were analyzed. Initially, the pH was ranged from 3 to 7 and afterwards, the temperature was varied from 40 to 60°C. After determining and setting the ideal conditions of agitation, pH and temperature, it was studied the effect of substrate and enzyme concentration for both pretreated and delignified biomass. In order to verify the effect of substrate concentration, solid load was varied in a range of 2.5 to 10.0% (m/v), in initial velocity and long term assays. Enzyme concentration (Cellic[®]CTec2 – Novozymes S/A) was varied from 275 to 5,000 FPU.L_{solution}⁻¹ (5 to 80 FPU.g_{cellulose}⁻¹), with solid load settled at 10% (m/v). Finally, it was possible to fit Michaelis-Menten (MM), modified MM, with and without competitive inhibition by glucose, and Chrastil model. For HPS, modified MM model with inhibition (suitable for heterogeneous system, with high resistance to diffusion) was fitted. For alkaline delignified HPS pseudo-homogeneous and modified MM models were fitted. The Chrastil model was also used to fit long term assays for both pretreated biomass. The fitted models were able to identifying key features of the hydrolysis process, and, therefore, useful within the perspective of engineering bioreactors.

Key-words: Straw sugarcane; enzymatic hydrolysis, kinetic study; mathematical modeling.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO	20
1.1 Objetivos específicos.....	21
1.2 Organização do trabalho	21
CAPÍTULO 2 – REVISÃO DA LITERATURA.....	23
2.1 Biocombustíveis – O etanol.....	23
2.2 Biomassas lignocelulósicas	24
2.2.1 Celulose.....	25
2.2.2 Hemicelulose (Polioses)	27
2.2.3 Lignina	28
2.2.4 Outros componentes.....	30
2.3 Palha de cana-de-açúcar.....	31
2.3.1 Possibilidades distintas: campo e/ou indústria.....	32
2.3.2 Potencial da palha de cana-de-açúcar para a produção de E2G .	33
2.4 Etapas da produção de etanol de segunda geração	35
2.4.1 Pré-tratamento	36
2.4.2 Hidrólise da celulose de materiais lignocelulósicos	41
2.4.3 Modelagem matemática da hidrólise enzimática da celulose	55
CAPÍTULO 3 – MATERIAIS E MÉTODOS	65
3.1 Biomassa lignocelulósica – Palha de cana-de-açúcar.....	65
3.2 Enzima.....	65
3.3 Procedimento experimental	65
3.4 Pré-tratamento hidrotérmico da palha de cana-de-açúcar.....	67
3.5 Pré-tratamento alcalino da palha de cana-de-açúcar pré-tratada hidrotermicamente	68
3.6 Caracterização da palha de cana-de-açúcar	68

3.6.1	Determinação de umidade das amostras de palha.....	68
3.6.2	Determinação do teor de extrativos	69
3.6.3	Hidrólise ácida da palha de cana-de-açúcar.....	70
3.6.4	Determinação de lignina solúvel	70
3.6.5	Determinação de carboidratos, ácidos orgânicos, furfural e hidroximetilfurfural.....	71
3.6.6	Determinação de lignina insolúvel	72
3.6.7	Determinação das cinzas da lignina	72
3.6.8	Determinação de cinzas totais.....	73
3.6.9	Determinação de proteínas.....	73
3.7	Determinação da atividade enzimática total das celulasas.....	75
3.8	Quantificação dos açúcares redutores	77
3.9	Hidrólise enzimática da palha de cana-de-açúcar	77
3.9.1	Efeito da agitação	78
3.9.2	Efeito do pH	79
3.9.3	Efeito da temperatura	80
3.9.4	Efeito da concentração de substrato.....	80
3.9.5	Efeito da concentração de enzima.....	81
3.10	Quantificação de glicose.....	81
3.11	Modelagem matemática da hidrólise enzimática da palha de cana-de-açúcar	82
CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO		83
4.1	Caracterização da palha <i>in natura</i>	83
4.2	Caracterização da palha pré-tratada hidrotermicamente seguida ou não de pré-tratamento alcalino com NaOH 4%.....	84
4.3	Determinação da atividade enzimática total das celulasas.....	87
4.4	Hidrólise enzimática.....	89

4.4.1 Hidrólise enzimática da palha de cana-de-açúcar pré-tratada hidrotérmicamente (PTH).....	89
4.4.2 Hidrólise enzimática da palha de cana-de-açúcar pré-tratada hidrotérmicamente e com NaOH 4%.....	105
4.4.3 Comparação dos modelos matemáticos utilizados	111
CAPÍTULO 5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS	116
CAPÍTULO 6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	118

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Estrutura da parede vegetal.....	25
Figura 2.2 – Estrutura molecular da cadeia de celulose.....	26
Figura 2.3 – Representação dos vários níveis morfológicos da celulose: (a) cadeias de moléculas de celulose (b) microfibrila (c) fibrila (d) fibras.	27
Figura 2.4 – Estrutura de uma xilose	28
Figura 2.5 – Esquema da estrutura molecular da lignina e seus álcoois precursores.....	29
Figura 2.6 – Representação da cana-de-açúcar	31
Figura 2.7 – Esquema do potencial de palha de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração.	34
Figura 2.8 – Etapas do processamento de etanol de segunda geração.....	36
Figura 2.9 – Efeito do pré-tratamento na matriz lignocelulósica.	37
Figura 2.10 – Principais monômeros e produtos de degradação formados durante o pré-tratamento.....	38
Figura 2.11 – Representação esquemática da ação das celulasas sobre a celulose.	44
Figura 2.12 – Representação das principais vias de inibição das celulasas: (a) inibição pela glicose (3,4), (b) inibição pela celobiose (5), (c) inibição pelo substrato (6,7).	49
Figura 3.1 – Fluxograma das etapas envolvidas no trabalho experimental	66
Figura 4.1 – Perfil de temperatura em função do tempo de pré-tratamento.	85
Figura 4.2 – Log da concentração da enzima em função da concentração de glicose liberada por 0,5 mL da enzima celulase diluída.	88
Figura 4.3 – Velocidades iniciais de reação em função da velocidade de agitação para palha PTH. Concentração de substrato: 10% de sólidos (m/v), concentração de enzima: 5 FPU·g _{celulose} ⁻¹ , pH 5, 50°C.	90
Figura 4.4 – Efeito do pH do meio reacional na atividade enzimática das celulasas, para 10% sólidos (m/v), 50°C e agitação de 250 rpm.....	92
Figura 4.5 – Efeito da temperatura nas velocidades iniciais de reação para palha PTH. Concentração de substrato: 10% de sólidos (m/v), carga enzimática: 5 FPU·g _{celulose} ⁻¹ , pH 5, agitação: 200 rpm.	93
Figura 4.6 – Efeito da temperatura em longos tempos de reação para PTH. Concentração de substrato: 10% de sólidos (m/v), carga enzimática: 10 FPU·g _{celulose} ⁻¹ , pH 5, agitação: 200 rpm.....	95
Figura 4.7 – Velocidades iniciais de reação em função da concentração de substrato para PTH. Concentração volumétrica de enzima de 290 FPU·L _{solução} ⁻¹ , pH 5, 50°C e agitação 200 rpm.....	97

Figura 4.8 – Modelo de Chrastil ajustado aos dados experimentais para palha PTH em cargas de sólidos de (a) 2,5% (b) 5% (c) 7,5% (d) 10% ($m_{\text{substrato}}/V_{\text{total}}$), concentração volumétrica fixa de enzima de 580 $\text{FPU}\cdot\text{L}_{\text{solução}}^{-1}$, pH 5, 50°C, 200 rpm.	99
Figura 4.9 – Ajuste do modelo de MM com inibição aos dados experimentais para palha PTH em diferentes cargas de sólidos (a) 2,5% (b) 5% (c) 7,5% e (d) 10% ($m_{\text{substrato}}/V_{\text{total}}$). .	101
Figura 4.10 – Ajuste do modelo de MM modificado aos dados experimentais de velocidades iniciais de reação em função da concentração de enzima a pH 5, 50°C, 200 rpm e 10% de sólidos (m/v) para palha PTH.	103
Figura 4.11 – Ajuste do modelo de MM modificado com inibição aos dados experimentais para palha PTH em diferentes cargas de sólidos (a) 2,5% (b) 5% (c) 7,5% e (d) 10% ($m_{\text{substrato}}/V_{\text{total}}$).	104
Figura 4.12 – Velocidades iniciais de reação em função da concentração de substrato para palha PTH e com PTA. Concentração volumétrica de enzima enzimática de 290 $\text{FPU}\cdot\text{L}_{\text{solução}}^{-1}$, pH 5, 50°C e agitação 200 rpm.....	106
Figura 4.13 – Modelo de Chrastil ajustados aos dados experimentais para palha PTH com PTA para carga de sólidos de (a) 2,5% (b) 5% (c) 7,5% e (d) 10% ($m_{\text{substrato}}/V_{\text{total}}$), concentração volumétrica fixa de enzima de 828 $\text{FPU}\cdot\text{L}_{\text{solução}}^{-1}$, pH 5, 50°C, 200 rpm.	107
Figura 4.14 – Ajuste do modelo de MM com inibição aos dados experimentais para palha PTH e com PTA em diferentes cargas de sólidos (a) 2,5% (b) 5% (c) 7,5% e (d) 10% ($m_{\text{substrato}}/V_{\text{total}}$).	108
Figura 4.15 – Ajuste do modelo de MM modificado aos dados experimentais de velocidades iniciais de reação em função da concentração de enzima a pH 5, 50°C, 200 rpm e 10% de sólidos (m/v) para palha PTH e com PTA.....	110
Figura 4.16 – Ajuste do modelo de MM modificado com inibição aos dados experimentais para palha PTH com PTA em diferentes cargas de sólidos (a) 5% (b) 7,5% e (c) 10%.	111
Figura 4.17 – Conversão da celulose em função da concentração de substrato para palha PTH e PTH com PTA.	114

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 – Composição química de diferentes tipos de biomassa lignocelulósica.	24
Tabela 2.2 – Composição química da palha de cana-de-açúcar reportada na literatura.	32
Tabela 4.1 – Composição química da palha <i>in natura</i>	83
Tabela 4.2 – Tabela comparativa dos resultados da composição química da palha de cana-de-açúcar encontrada por diversos autores.	84
Tabela 4.3 – Composição química da palha pré-tratada hidrotermicamente (PTH) seguida ou não de pré-tratamento alcalino (PTA) e suas respectivas remoções em relação a palha <i>in natura</i>	85
Tabela 4.4 – Comparação de pré-tratamentos hidrotérmicos.....	86
Tabela 4.5 – Valores da diluição da enzima, suas respectivas concentrações e glicose liberada.	87
Tabela 4.6 – Velocidades iniciais de hidrólise enzimática da palha de cana-de-açúcar para diferentes agitações.	90
Tabela 4.7 – Valores da atividade enzimática e suas respectivas atividades relativas na hidrólise da celulose, obtidas para diferentes valores de pH.	91
Tabela 4.8 – Velocidades iniciais de hidrólise enzimática da palha de cana-de-açúcar para diferentes temperaturas.	94
Tabela 4.9 – Velocidades iniciais de hidrólise enzimática da palha de cana-de-açúcar para diferentes concentrações de substrato.	97
Tabela 4.10 – Parâmetros do modelo de Chrastil para cada carga de sólidos, obtidos no ajuste aos dados experimentais da hidrólise enzimática da palha PTH.....	99
Tabela 4.11 – Constante de inibição do modelo de MM com inibição competitiva por glicose.	101
Tabela 4.12 – Velocidades iniciais de hidrólise enzimática da palha PTH para diferentes concentrações de enzima.	103
Tabela 4.13 – Velocidades iniciais de hidrólise enzimática em função da carga de sólidos para a palha PTH e com PTA.....	105
Tabela 4.14 – Parâmetros do modelo de Chrastil obtidos nos ajustes aos dados experimentais da hidrólise enzimática da palha PTH com PTA.....	107
Tabela 4.15 – Constante de inibição competitiva por glicose obtida através do ajuste do modelo de MM, para experimentos de hidrólise enzimática da palha PTH com PTA.	109
Tabela 4.16 – Velocidades iniciais de hidrólise enzimática da palha PTH com PTA para diferentes concentrações de enzima.	110

Tabela 4.17 – Comparação dos parâmetros cinéticos de hidrólise enzimática obtidos dos ajustes do modelo de MM com e sem inibição, pseudo-homogêneo ou modificado, para diferentes substratos com contração de 5 a 10% de sólidos.	113
Tabela 4.18 – Parâmetros do Modelo de Chrastil para a palha PTH e PTH seguida de PA em concentrações de substrato de 5 a 10% m/v.....	113
Tabela 4.19 – Parâmetros do modelo de Chrastil obtidos nos ajustes dos ensaios de hidrólise enzimática de Carvalho et al. (2013).....	115

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

Preocupações ambientais e possíveis instabilidades no preço do petróleo têm despertado grande interesse e motivado a busca por combustíveis oriundos de fontes renováveis. Diante deste cenário, muitos pesquisadores têm estudado alternativas de como produzir energias limpas e renováveis para minimizar os impactos ambientais gerados pelo uso de combustíveis fósseis, bem como suprir a demanda energética mundial (LIMAYEM; RICKE, 2012).

A biomassa é vista como uma fonte interessante de matéria-prima para produzir biocombustíveis, devido a várias razões: aproveitamento de resíduos agroindustriais para a geração de produtos com valor agregado, não compete com a produção de alimentos, além de contribuir na redução das emissões de gases do efeito estufa (LIMAYEM; RICKE, 2012). O Brasil ocupa posição privilegiada para liderar a produção de etanol a partir de biomassas, por possuir ampla biodiversidade de matérias-primas renováveis e culturas agrícolas de grande extensão, com solo e condições climáticas adequadas (PEREIRA JUNIOR, 2010).

As matérias-primas lignocelulósicas são as fontes renováveis mais abundantemente encontradas na natureza (PEREIRA JUNIOR, 2010). São constituídas por três principais frações poliméricas: celulose, hemicelulose e lignina. Celulose e hemicelulose são fontes para a produção de açúcares, que por sua vez podem ser transformados em etanol. A lignina, por sua vez, não é um polímero de carboidrato, sendo incapaz de ser convertida a etanol (MOOD et al., 2013).

Dentre os diferentes tipos de biomassa lignocelulósica, a palha de cana-de-açúcar tem se destacado como fonte de matéria-prima para a produção de E2G, devido à sua grande disponibilidade no campo e por representar, aproximadamente, um terço da energia total da cana-de-açúcar (LEAL et al., 2013).

O processo de conversão de biomassa lignocelulósica em etanol pela rota bioquímica envolve basicamente quatro etapas principais: pré-tratamento, hidrólise dos polissacarídeos em açúcares fermentescíveis, fermentação dos açúcares a etanol e, finalmente, destilação do etanol.

A etapa mais desafiadora na produção de etanol de segunda geração e que, geralmente, determina a eficiência global do processo, é a hidrólise enzimática. A

obtenção de altas taxas de conversão dos polissacarídeos em açúcares fermentescíveis envolve muitos fatores, que tornam esta etapa difícil de ser totalmente compreendida (BANSAL et al., 2009). Modelos matemáticos fornecem informações a respeito dos mecanismos de reação e, portanto, ajudam na melhor compreensão fenomenológica do processo. Eles também são úteis no projeto, otimização e controle dos biorreatores.

Diante de tal contexto, este trabalho objetiva estudar as principais variáveis envolvidas no processo de hidrólise enzimática da fração celulósica da palha de cana-de-açúcar, a correlação de dados experimentais e a aplicação de modelos que descrevam a cinética de reação e permitam a identificação de características essenciais do processo de hidrólise. Os modelos obtidos poderão ser utilizados, por exemplo, para a simulação de diferentes estratégias de operação dos reatores enzimáticos e estudo de viabilidade técnica em escala industrial.

1.1 Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste trabalho são:

- a) Caracterizar quimicamente a palha de cana-de-açúcar *in natura*;
- b) Realizar o pré-tratamento hidrotérmico da palha de cana-de-açúcar *in natura*;
- c) Realizar pré-tratamento alcalino da palha pré-tratada hidrotérmicamente;
- d) Caracterizar a palha pré-tratada hidrotérmicamente e com pré-tratamento alcalino.
- e) Realizar experimentos de hidrólise enzimática com a palha pré-tratada, avaliando todas as condições operacionais: pH, temperatura, velocidade de agitação, concentração de substrato e concentração de enzima;
- f) Determinar as melhores condições de hidrólise da fração celulósica da palha de cana-de-açúcar;
- g) Ajustar modelos cinéticos aos dados experimentais.

1.2 Organização do trabalho

Esta dissertação foi dividida em 5 capítulos:

No primeiro capítulo é apresentada, de maneira resumida, uma contextualização do tema pertinente a este trabalho, assim como o objetivo geral da pesquisa.

No segundo capítulo, é apresentada uma revisão bibliográfica, abordando as características das biomassas lignocelulósicas, uma explicação detalhada sobre pré-tratamento, focando principalmente no pré-tratamento hidrotérmico e alcalino, assim como uma revisão sobre os principais conceitos de hidrólise enzimática: fatores que afetam o rendimento e forma de atuação das enzimas. Foram apresentados alguns modelos matemáticos utilizados no estudo cinético da hidrólise enzimática da celulose, bem como os modelos aplicados neste trabalho.

No terceiro capítulo, são apresentados os procedimentos utilizados para a realização dos experimentos, condições experimentais de cada ensaio, análises envolvidas em cada etapa experimental e softwares utilizados na análise dos dados.

No quarto capítulo são apresentados e discutidos os resultados da caracterização química da palha *in natura* e pré-tratada. Também, foram apresentados os resultados obtidos durante a etapa de hidrólise enzimática da palha pré-tratada seguida ou não de pré-tratamento alcalino. Nesta etapa foram avaliadas as condições operacionais através do estudo cinético do efeito do pH, velocidade de agitação, temperatura, concentração de substrato e concentração de enzima.

Por fim, no capítulo cinco são apresentadas as principais conclusões e considerações do trabalho, baseadas nas análises dos dados experimentais realizadas.

CAPÍTULO 2 – REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Biocombustíveis – O etanol

É crescente a demanda mundial por combustíveis, seja para transporte, atividades industriais ou geração de energia elétrica. De acordo com a Agência Internacional de Energia (AIE), os combustíveis fósseis continuam a satisfazer a maior parte das demandas energéticas mundiais, no entanto, essa dependência dos combustíveis não renováveis está ameaçando o clima e o ecossistema terrestre, resultando em um rápido aumento da poluição e, conseqüentemente, aquecimento global (IEA, 2013). Nesse contexto, os biocombustíveis podem desempenhar um papel importante no sentido de promover reduções significativas nas emissões de dióxido de carbono e reduzir a dependência de recursos não-renováveis, a preços competitivos em relação à gasolina e ao diesel.

Dentre os biocombustíveis existentes, o etanol é uma alternativa promissora no que se diz respeito à diminuição de impactos ambientais gerados pelos combustíveis fósseis. Sua produção é dividida em dois tipos: primeira geração, etanol obtido a partir de matérias-primas sacarídeas ou amiláceas, e segunda geração, obtido a partir de matérias-primas lignocelulósicas (PEREIRA JUNIOR, 2010).

O Brasil encontra-se em posição favorável no que se refere à produção de etanol, sendo o maior produtor mundial de etanol a partir da cana-de-açúcar. Segundo a União da Indústria da Cana de Açúcar, o Brasil produziu aproximadamente 27,5 bilhões de litros de etanol na safra de 2013/2014 (UNICA, 2014). Além disso, o processamento da cana-de-açúcar gera grandes quantidades de resíduos, cerca de 140 kg_{base seca} de bagaço (MACEDO, 2001; CONAB, 2011) e 140 kg_{base seca} de palha (MACEDO, 2001; SAAD et al, 2008) por tonelada de cana.

Frente a esta situação, e para evitar a expansão desmedida das áreas plantadas de cana de açúcar, inúmeras pesquisas têm sido estudadas a fim de desenvolver processos biotecnológicos que viabilizem a produção de etanol de segunda geração através de biomassas residuais, oriundas do cultivo e processamento da cana-de-açúcar.

2.2 Biomassas lignocelulósicas

De maneira geral, biomassa lignocelulósica é o termo utilizado para se referir à matéria prima renovável e de origem vegetal. Apresentam-se como uma fonte promissora, de baixo custo e de grande disponibilidade para a produção de etanol (KOOTSTRA et al., 2009; SARKAR et al., 2012). Esses materiais são constituídos principalmente por três componentes: celulose (30~50%), hemicelulose (15~35%) e lignina (10~25%), que somadas totalizam em torno de 90% da biomassa seca (LIMAYEM; RICKE, 2012). A distribuição desses constituintes varia de acordo com a espécie vegetal, solo onde foi cultivada e aspectos climáticos (ODEGA; PETRI, 2010; GAN; ALLEN; TAYLOR, 2003).

Materiais lignocelulósicos incluem resíduos agrícolas (bagaço da cana-de-açúcar, palha de cana-de-açúcar, casca de soja, palha de trigo), resíduos florestais (madeira, eucalipto) e resíduos industriais (indústria de papel) (PALONEN, 2004).

Na Tabela 2.1 estão listados alguns materiais lignocelulósicos e sua composição química.

Tabela 2.1 – Composição química de diferentes tipos de biomassa lignocelulósica.

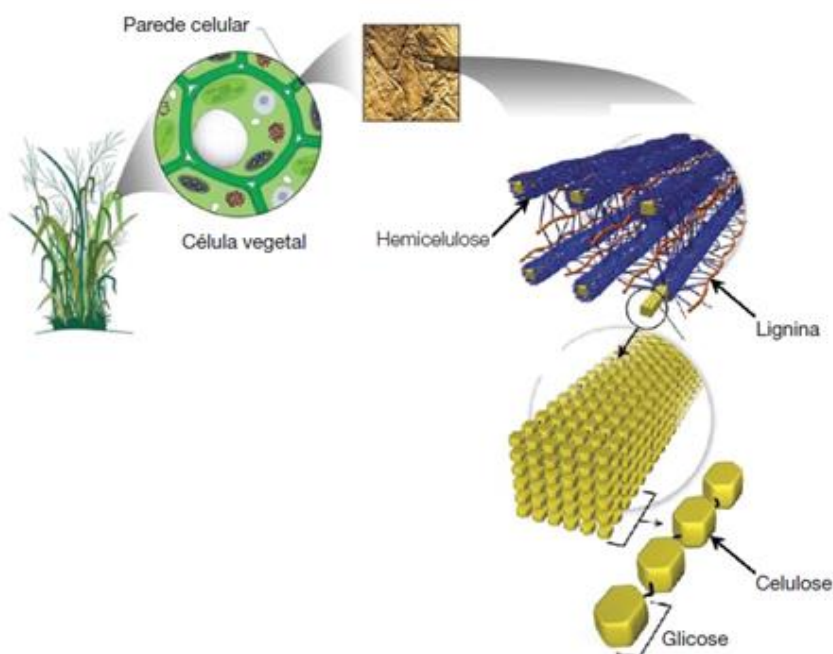
Biomassa lignocelulósica	Composição química (%)		
	Celulose	Hemicelulose	Lignina
Palha de cana-de-açúcar	40-44	30-32	22-25
Bagaço de cana	32-48	19-24	23-32
Fibra de coco	36-43	0,15-0,25	41-45
Casca de soja	29-51	10-20	2-8
Sabugo de milho	36-46	40	7-14
Algodão	85-95	5-15	0

Fonte: Adaptado de MENON; RAO, 2012 e SANTOS et al., 2012

Basicamente, celulose e hemicelulose são polissacarídeos, enquanto que a lignina é uma macromolécula aromática constituída de fenil-propano, que garante rigidez à parede celular do vegetal (GAN; ALLEN; TAYLOR, 2003). Esses três componentes, quando unidos, formam uma matriz lignocelulósica bem estruturada (SILVA et al., 2009).

Um esquema de como estão configurados a celulose, hemicelulose e lignina é mostrado na Figura 2.1.

Figura 2.1 – Estrutura da parede vegetal

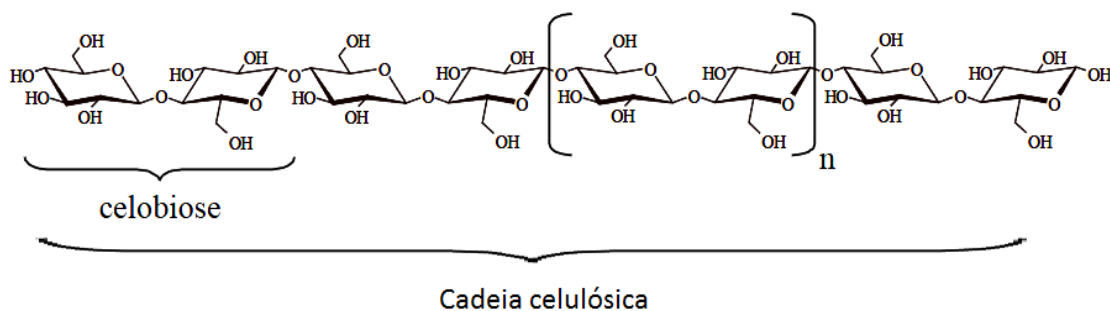


Fonte: CANILHA et al., 2009

2.2.1 Celulose

A celulose é o principal componente da parede celular das plantas. Quimicamente é considerado um polissacarídeo, formado por monômeros de glicose unidos entre si por ligações glicosídicas $\beta(1-4)$, os quais se ligam pelos seus grupos hidroxilas através da eliminação de uma molécula de água (FENGEL; WEGENER, 1989). Cada ligação glicosídica forma um dímero de glicose, chamado também de celobiose, que é definida como a unidade conformacional da celulose (PITARELO, 2007). A Figura 2.2 mostra a representação esquemática de uma cadeia de celulose.

Figura 2.2 – Estrutura molecular da cadeia de celulose



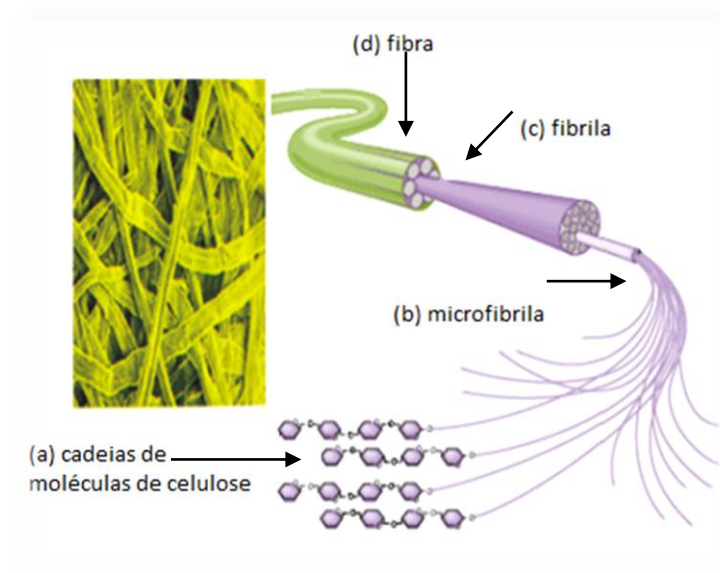
Fonte: Adaptado de PITARELO, 2007

Cadeias de celulose (Figura 2.3 a) se ajustam uma as outras para formar as microfibrilas (Figura 2.3 b) celulósicas, as quais formam as fibrilas (Figura 2.3 c), que por sua vez se ligam formando as fibras de celulose (Figura 2.3 d) (VIEIRA, 2012; MENG; RAGAUSKAS, 2014). Essas estruturas são formadas devido à presença de ligações covalentes, pontes de hidrogênio intra e intermolecular e forças de Van der Waals (WYMAN, 1994; MANSFIELD; MOONEY; SADDLER, 1999). As ligações intramoleculares são responsáveis por conferir uma estrutura retilínea e certa rigidez às cadeias unitárias, enquanto que as intermoleculares são responsáveis pela resistência à degradação microbiana (DING; HIMMEL, 2006; CANILHA et al, 2009).

Grande parte da estrutura das fibrilas apresenta-se altamente ordenada, sendo chamada de região cristalina. Regiões menos ordenadas, ou seja, interligadas de maneira caótica, recebem o nome de regiões amorfas. De maneira geral, toda matriz celulósica apresenta regiões amorfas e cristalinas. Este estado intermediário é definido pelo grau de cristalinidade, que varia de acordo com o tipo de biomassa vegetal e grau de maturação da parede celular (FENGEL; WEGENER, 1989). Quanto maior o grau de cristalinidade, maior é a organização da celulose e menos solúvel em água e solventes orgânicos. Da mesma forma, a solubilidade da celulose diminui com o aumento do grau de polimerização (ZHANG; LYND, 2004). Celuloses de algodão possuem cadeias mais ordenadas, apresentando cristalinidade em torno de 70%, enquanto a cristalinidade da celulose de árvores é menor, aproximadamente 40% (SILVA et al., 2009).

Celuloses exibem alto grau de polimerização (DP), que é representado pelo tamanho ou extensão da cadeia de celulose, podendo variar de 100 a 14000 unidades de glicose (SILVA, 2010).

Figura 2.3 – Representação dos vários níveis morfológicos da celulose: (a) cadeias de moléculas de celulose (b) microfibrila (c) fibrila (d) fibras.



Fonte: Adaptado de CRUZ, 2011

2.2.2 Hemicelulose (Polioses)

As hemiceluloses, ao contrário das celuloses, são formadas pela combinação de vários tipos de monossacarídeos. As unidades de açúcares que compõem as polioses podem ser divididas em pentoses (*D*-xilose, *L*-arabinose) e hexoses (*D*-glicose, *D*-galactose, *D*-manose), com algumas quantidades de ácido *D*-glucurônico e ácido 4-*O*-metil-glucurônico (FENGEL; WEGENER, 1989).

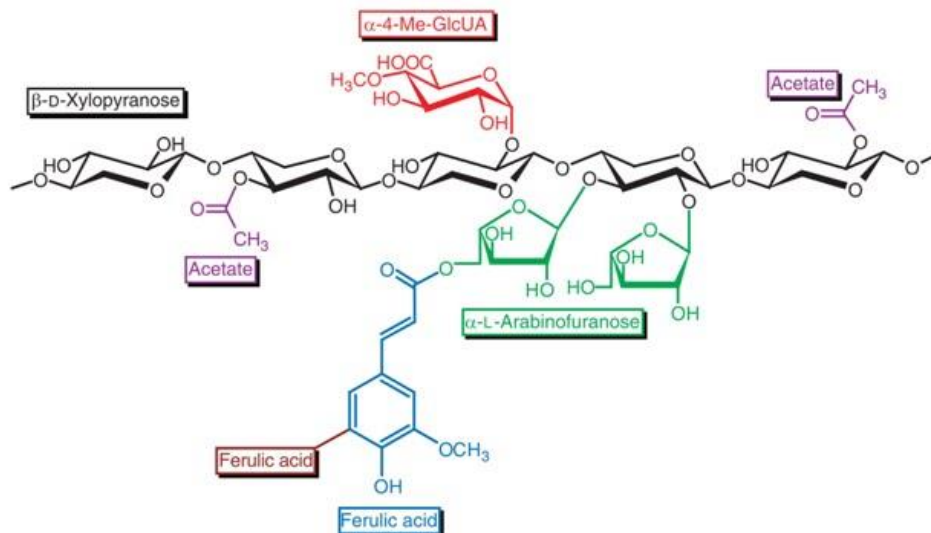
Geralmente são classificadas de acordo com o principal açúcar presente na cadeia, podendo ser formada por um único monômero (xilanas, galactanas, arabinanas ou mananas) ou por dois ou mais tipos de monômeros (glicomanas, xiloglicanas, arabinoxilanas ou arabinoglucuronoxilanas) (PALONEN, 2004; GÍRIO et al, 2010).

As xilanas são os polissacarídeos mais abundantes encontrados nas hemiceluloses. Apresentam grau de polimerização que varia de 100 a 200 unidades

de repetição, que em conjunto atingem uma massa molecular bem menor que a da celulose (FENGEL; WEGENER, 1989), perfazendo em torno de 20-30% da biomassa vegetal (GÍRIO et al., 2010). São constituídas por uma cadeia principal de unidades de β -D-xilopirranose unidas por ligações $\beta(1-4)$, com ramificações de ácido 4-O-metilglucurônico, acetato, ácido ferulínico e α -L-arabinofuranose. Um exemplo de xilana pode ser observado na Figura 2.4.

Em relação à celulose, as hemiceluloses apresentam maior solubilidade em água. Isso se deve à presença de grupamentos acetil na cadeia hemicelulósica, que são facilmente degradados a ácido acético, que por sua vez atua como catalisador, decompondo-se a hemicelulose em xilose, arabinose, ácido urônico e furfural (FENGEL; WEGENER, 1989). Além disso, pode-se dizer que a hemicelulose atua como um agente ligante entre as frações de celulose e de lignina (DUFF; MURRAY, 1996).

Figura 2.4 – Estrutura de uma xilose



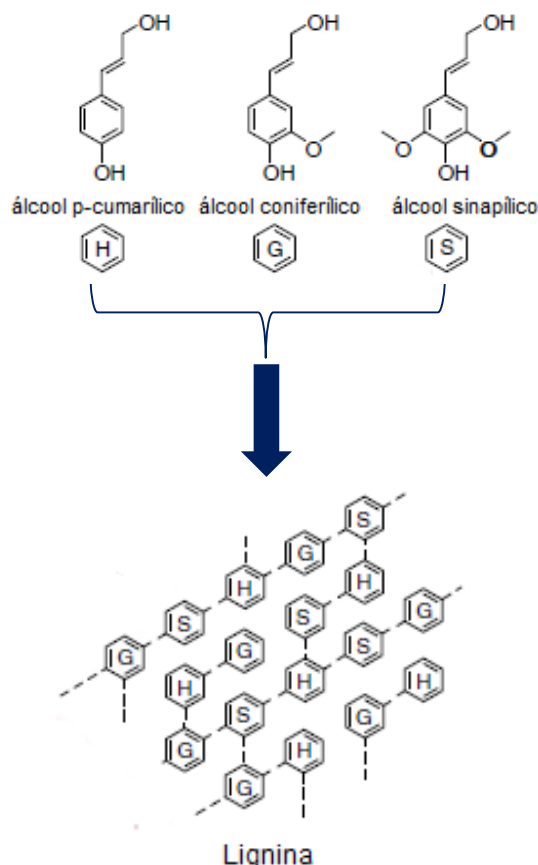
Fonte: DODD; CANNAN, 2009

2.2.3 Lignina

A lignina é o segundo polímero mais abundante na terra, tendo como função atribuir resistência para a biomassa vegetal, proteção aos ataques microbiológicos e mecânicos, além de rigidez e impermeabilidade. É formada pela polimerização

radicalar de três unidades diferentes de fenil-propano: álcool *p*-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico, conferindo a ela uma estrutura tridimensional, amorfa e difícil de ser desestruturada (FENGEL; WEGENER, 1989; ZENG et al., 2014).

Figura 2.5 – Esquema da estrutura molecular da lignina e seus álcoois precursores.



Fonte: Adaptado de RUBIN (2008).

As ligninas presentes nos vegetais diferem entre si de acordo com o grau de metoxilação dos monômeros e pelo grau de ligação carbono-carbono (EMMEL, 1999), podendo ser classificadas de acordo com a abundância dos seus precursores: 1) lignina guaiacil, produzida pela polimerização do álcool coniferílico – grande ocorrência nas madeiras moles (softwoods); 2) lignina guaiacil-siringil, copolímero dos álcoois sinapílico e coniferílico – típica de madeiras duras (hardwood); 3) lignina siringil-guaiacil-*p*-cumaril, formada a partir dos álcoois sinapílico, coniferílico e *p*-hidroxi-cumarílico – comumente encontrada em gramíneas como a cana-de-açúcar

(FENGEL; WEGENER, 1989). Um esquema da estrutura da lignina proveniente de gramínea é mostrado na Figura 2.5.

Pode ser feita a analogia de que a lignina se comporta como uma cola que une os diferentes componentes presentes na matriz lignocelulósica, conferindo uma maior coesão entre eles e tornando a biomassa impermeável (FENGEL; WEGENER, 1989). Devido a essa característica recalcitrante, a principal dificuldade na produção de etanol de segunda geração a partir de resíduos lignocelulósicos é remover a lignina, pois ela atua como uma barreira física para o acesso das enzimas aos polissacarídeos, dificultando o processo de hidrólise enzimática (MANSFIELD; MOONEY; SADDLER, 1999).

Diante do fato, é de extrema importância eliminar ou remover grande parte da lignina para obter rendimentos satisfatórios na etapa de hidrólise enzimática.

2.2.4 Outros componentes

Além dos principais compostos encontrados na biomassa lignocelulósica (celulose, hemicelulose e lignina), são encontradas também uma quantidade de substâncias extrativas e não-extrativas.

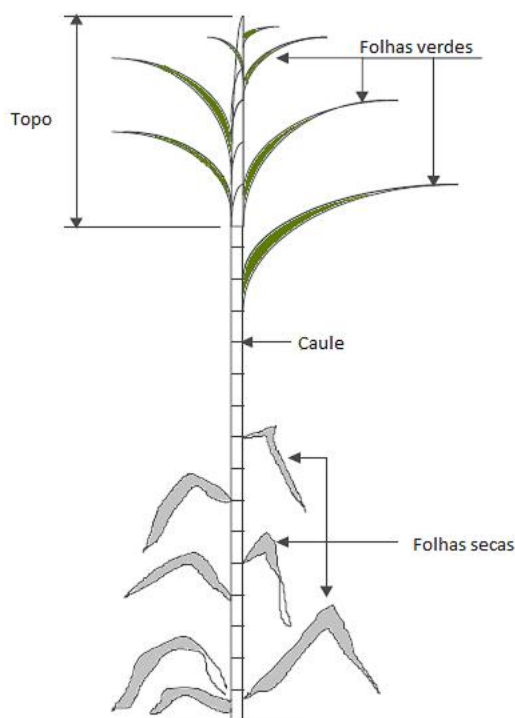
Materiais extraíveis são considerados aqueles que são solúveis em água ou solventes, tais como: ceras, ácidos graxos, terpenos, álcoois, esteróides e compostos fenólicos de baixo peso molecular, que podem variar muito (1-20%) de espécie para espécie, localização geográfica, estação do ano, entre outros fatores (FENGEL; WEGENER, 1989). Os extrativos são concentrados em sua grande maioria na raiz, caule e folhas, sendo responsáveis por determinadas características das plantas, como cor, cheiro e resistência natural ao apodrecimento.

Materiais não extrativos são principalmente componentes inorgânicos como cinzas, pectinas e proteínas (KLINKE; THOMSEN; AHRING, 2004).

2.3 Palha de cana-de-açúcar

A palha de cana-de-açúcar é um resíduo agrícola encontrado nos canaviais, composto por folhas verdes, secas e ponteiros, sendo gerada a partir do desfolhamento da cana durante o processo de colheita mecanizada (CANILHA et al., 2012). Cerca de 25% de toda a massa vegetal da cana-de-açúcar é composta por folhas verdes, secas e ponteiros (RIPOLI et al., 2000). Uma representação esquemática da palha de cana-de-açúcar pode ser vista na Figura 2.6.

Figura 2.6 – Representação da cana-de-açúcar



Fonte: Adaptado de MANECHINI; RICCI JÚNIOR; DONZELLI, 2005.

Vários trabalhos apresentam a composição química da palha de cana-de-açúcar, que pode variar consideravelmente dependendo da espécie da palha, solo onde foi cultivada, fatores climáticos, bem como a metodologia utilizada para a caracterização. Na Tabela 2.2 é apresentada a composição química da palha de cana-de-açúcar reportada em diversos trabalhos.

Tabela 2.2 – Composição química da palha de cana-de-açúcar reportada na literatura.

Composição química (%)					Referência
Celulose	Hemicelulose	Lignina	Cinzas	Extrativos	
40,80	26,00	24,79	4,92	ND	Barros et al., 2013
33,50	27,10	25,80	2,50	ND	Costa et al., 2013
39,80	28,60	22,50	2,40	6,20	Oliveira, F et al, 2013
38,10	29,20	24,20	2,50	5,90	Oliveira, L et al., 2014
44,26	31,10	19,01	4,86	16,68	Santos et al., 2014
33,77	27,38	21,28	6,23	7,02	Szczerbowski et al., 2014

ND: Não determinado

Fonte: Acervo pessoal

A queima da palha de cana-de-açúcar era uma prática muito comum há uma década atrás. Tem como objetivo facilitar o corte manual da cana, e eliminar os seus resíduos (LEAL et al., 2013). No entanto, essa prática tem ocasionado sérios problemas ao meio ambiente e à saúde pública, além do desperdício energético, visto que a palha pode ser utilizada como matéria-prima para a produção de etanol 2G, geração de energia e/ou deixada no campo para proteção do solo.

Com o aumento da mecanização da colheita de cana-de-açúcar e a diminuição gradativa de sua queima (Decreto Federal nº 2.661/98), houve um crescimento significativo da quantidade de palha disponível no campo.

2.3.1 Possibilidades distintas: campo e/ou indústria

Devido às diferentes aplicabilidades da palha de cana-de-açúcar há um grande questionamento do setor agrícola e industrial sobre o quanto de palha deverá permanecer no solo e quanto será destinado para a indústria.

Do ponto de vista agrônômico, a manutenção da palha no campo traz muitos benefícios, como a retenção de umidade do solo, controle de plantas daninhas, proteção contra erosão, reciclagem de nutrientes e estoques de carbono no solo (ROSSETTO et al., 2008; CERRI et al., 2011). Por outro lado, a cobertura em excesso

do solo com palha pode prejudicar as plantas em desenvolvimento, favorecer a propagação de parasitas e aumentar o risco de incêndios (ROSSETTO et al., 2008).

Urquiaga et al. (1991) realizaram um estudo comparativo da colheita da cana-de-açúcar com e sem queima durante mais de 6 anos. Neste trabalho, concluíram que para uma mesma área plantada houve uma produção de 15 a 20% a mais de cana onde o solo era protegido com a palha. Isso significa grandes ganhos em qualidade de solo por meio da preservação da biomassa no campo.

Manechini, Ricci Júnior e Donzelli (2005) sugerem que a palha de cana-de-açúcar deve ser totalmente removida após colheita da cana em áreas ou estradas com riscos de acidentes, próximo a áreas habitadas ou sob a ocorrência de tempestades elétricas onde pode-se ocasionar incêndios. Outras situações nas quais a palha deve ser removida são em regiões muito úmidas, com grande frequência de chuvas no período de colheita, e antes de replantio de cana em áreas infestadas por pragas do solo, cujo controle exige a remoção completa.

Pesquisas mais recentes sobre o aproveitamento da palha de cana indicaram que mesmo retirando 50% do material disposto no campo a palha remanescente continuará suprimindo as necessidades do solo (PROTEC, 2008).

Levando-se em conta todas as considerações sobre deixar ou não palha sobre a superfície do solo, pode-se concluir que a escolha da quantidade a ser removida depende das condições agronômicas envolvidas, custos no processo de recolhimento e transporte da palha, bem como do interesse da indústria em gerar energia ou etanol 2G.

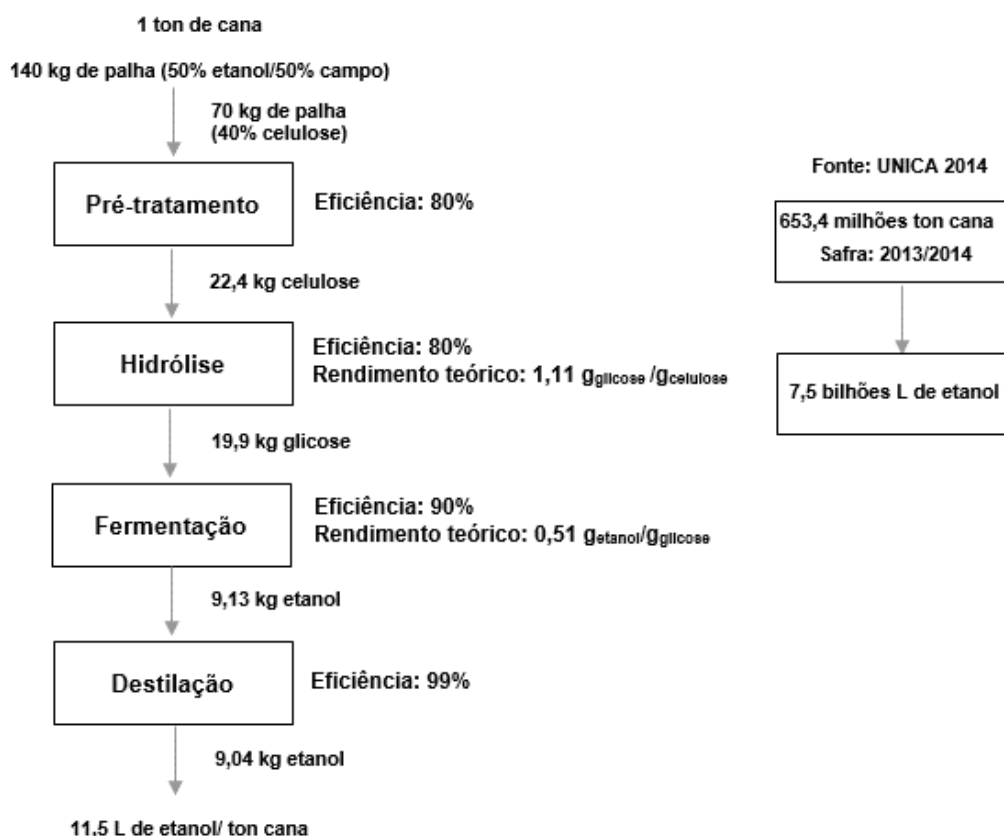
2.3.2 Potencial da palha de cana-de-açúcar para a produção de E2G

De acordo com dados da UNICA, na safra de 2013/2014 foram processadas 653,4 milhões de toneladas de cana-de-açúcar. Geralmente, cada tonelada de cana gera em torno de 140 kg de palha (MACEDO, 2001; SAAD et al., 2008). Considerando que metade da palha gerada fique no campo para proteção do solo e que o restante seja destinado à produção de etanol, estima-se uma produção de 7,5 bilhões de litros de etanol, ou seja, 25% da produção anual de etanol no Brasil. Todas as

considerações feitas para o cálculo do potencial de produção de etanol a partir da palha de cana-de-açúcar estão apresentadas na Figura 2.7.

Diante do fato, torna-se evidente que a palha de cana-de-açúcar é uma biomassa muito promissora e com grande potencial no desenvolvimento de etanol de segunda geração.

Figura 2.7 – Esquema do potencial de palha de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração.



Fonte: Acervo pessoal

Apesar do grande potencial que a palha de cana-de-açúcar representa para o setor de bioetanol, existem ainda poucos trabalhos na literatura estudando esta biomassa quando comparado com o bagaço de cana.

Dentre estes trabalhos, cita-se o de Oliveira et al. (2013), que estudaram o pré-tratamento por explosão a vapor, deslignificação e hidrólise enzimática da palha de cana. Nas melhores condições (pré-tratamento a 180°C/15min, seguido de deslignificação com NaOH 1,5% durante 1h e hidrólise enzimática com 10% sólidos,

utilizando Celluclast 1.5 L (Novozymes) a 15 FPU.mL⁻¹ e Novozymes 188 a 10 IU.g⁻¹), os autores conseguiram obter uma conversão de 85,1% durante a etapa de hidrólise enzimática.

Oliveira et al. (2014) estudaram o efeito de diferentes temperaturas (180, 190 e 195°C) e tempos de reação (10 e 15 min) durante o pré-tratamento hidrotérmico da palha de cana, seguido ou não de pré-tratamento alcalino com NaOH 1% (100°C e 1h) e posterior hidrólise enzimática (10% sólidos, celulasas a 15 FPU.g_{substrato}⁻¹ e β-glicosidase a 10 IU.g⁻¹). A melhor conversão global (considerando as perdas em todas as etapas do processo) de celulose a glicose foi 53%, nas condições de 195°C/10 min, sem deslignificação alcalina.

Moutta; Ferreira-Leitão; Da Silva Bon (2014) avaliaram a mistura de bagaço e palha de cana-de-açúcar pré-tratados com ácido diluído, na etapa de hidrólise enzimática. Os autores concluíram que a palha é mais susceptível a sacarificação enzimática em relação ao bagaço, de maneira que misturas que contenham uma proporção maior palha: bagaço exibem maiores conversões.

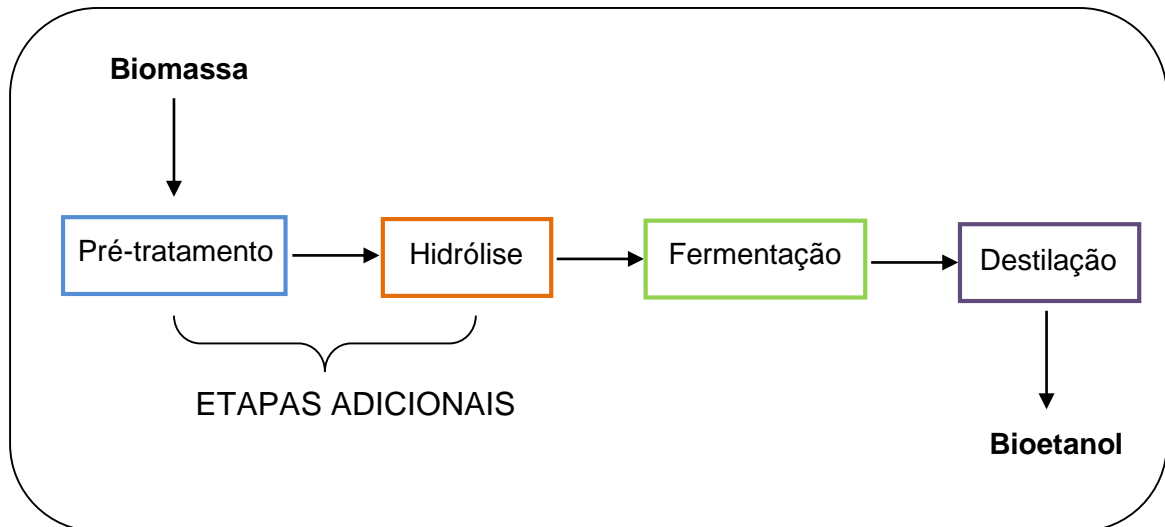
2.4 Etapas da produção de etanol de segunda geração

Um dos principais obstáculos envolvidos no processo de produção de etanol de segunda geração é desestruturar a lignina da biomassa, liberando os polissacarídeos como fonte de açúcares fermentescíveis, de forma eficiente e economicamente viável (SANTOS et al., 2012).

Para superar essas limitações, torna-se necessária uma etapa de pré-tratamento, que remova a estrutura recalcitrante da lignina e reduza a cristalinidade da celulose, bem como uma etapa de sacarificação enzimática, que transforme os oligômeros e dímeros em monômeros de glicose.

Desta forma, pode-se dizer que, a obtenção de etanol (por rota bioquímica) a partir de biomassa lignocelulósica envolve duas etapas adicionais em relação ao processo de produção de etanol de primeira geração: o pré-tratamento e a hidrólise enzimática. As etapas do processo de etanol de segunda geração podem ser visualizadas, de maneira simplificada, na Figura 2.8.

Figura 2.8 – Etapas do processamento de etanol de segunda geração.



Fonte: Acervo pessoal

2.4.1 Pré-tratamento

O pré-tratamento geralmente refere-se a um processo que rompe e desestrutura a fibra lignocelulósica. Tem por finalidade remover a lignina e a hemicelulose, aumentar a área superficial da biomassa e diminuir o grau de polimerização e cristalinidade da celulose, de maneira que a enzima tenha maior acesso aos polissacarídeos na etapa de hidrólise (WYMAN et al., 2005; ZHANG; LYND, 2004).

Existem inúmeros tipos de pré-tratamento, que podem ser classificados em quatro grandes grupos: pré-tratamento físico (moagem, extrusão e etc), físico-químico (explosão a vapor, hidrotérmico, explosão com amônia e etc), químico (alcalino, ácidos, organosolv, ozonólise, líquidos iônicos e etc) ou biológico (MOOD et al., 2013).

Pré-tratamento ácido geralmente remove grande parte da hemicelulose, podendo chegar até 90% de solubilização, embora pouca lignina seja dissolvida (WYMAN et al., 2005). Durante o pré-tratamento ácido são lançados íons hidrônios, que promovem a reação catalítica, a qual é favorecida em altas temperaturas. Todavia, altas temperaturas podem catalisar a degradação dos açúcares (YANG; WYMAN, 2008). Além disso, pré-tratamentos ácidos necessitam de equipamentos resistentes à corrosão e lavagens exaustivas da biomassa, para neutralização antes da etapa de hidrólise enzimática.

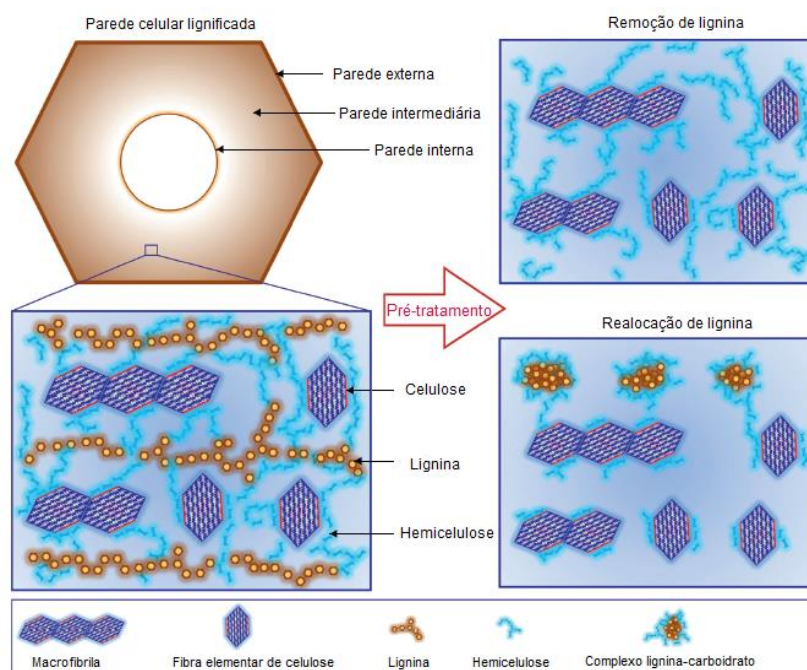
Por outro lado, os pré-tratamentos básicos removem lignina, deixando a biomassa, em sua grande maioria, composta por celulose e hemicelulose. No entanto, hidróxido de sódio e outras bases são caros e difíceis de recuperar (WYMAN et al., 2005).

Pré-tratamentos biológicos são utilizados para deslignificação da biomassa. Em geral, são processos com baixo custo de capital, operam em condições brandas e não requerem o uso de produtos químicos. Entretanto, longos tempos de reação são necessários para obter resultados satisfatórios, além da considerável perda de carboidratos durante esse processo (SUN; CHENG, 2002; KUMAR et al., 2009).

Uma alternativa recente são os métodos de pré-tratamento combinado, que surgem para aumentar a eficiência da produção de açúcar, diminuir a formação de inibidores e reduzir o tempo de processo (MOOD et al., 2013; ZENG et al., 2014).

A Figura 2.9 mostra o efeito do pré-tratamento nas mudanças conformacionais da matriz lignocelulósica.

Figura 2.9 – Efeito do pré-tratamento na matriz lignocelulósica.



Fonte: Adaptado de ZENG et al., 2014

Várias revisões têm sido publicadas descrevendo e comparando diversos pré-tratamentos em diferentes biomassas lignocelulósicas (SUN; CHENG, 2002; ALVIRA et al., 2010; GAO et al., 2013; MOOD et al., 2013; TOQUERO; BOLADO, 2014).

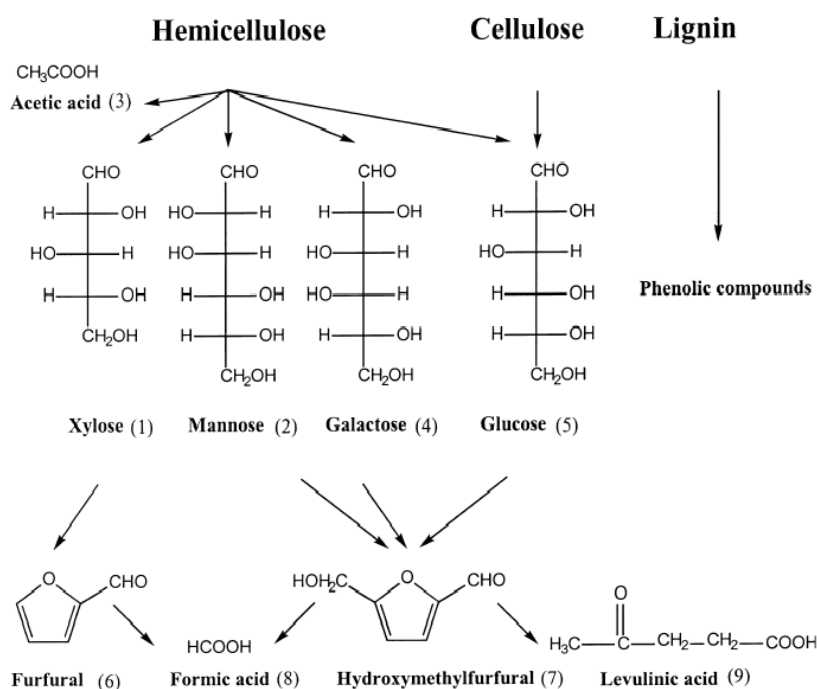
Yang e Wyman (2008) mostraram que a hidrólise enzimática de palha de milho *in natura* conduziu a rendimentos em torno de 23%, enquanto que se uma etapa de pré-tratamento for utilizada previamente, o rendimento pode alcançar mais de 90%.

Geralmente, pré-tratamentos formam produtos de degradação, os quais têm efeito negativo durante a etapa de hidrólise enzimática e fermentação. A composição e concentração dos produtos de degradação variam de acordo com o tipo de pré-tratamento utilizado, temperatura, pressão, tempo do pré-tratamento e a origem da biomassa lignocelulósica.

Inibidores gerados durante o pré-tratamento são classificados em três grandes grupos: derivados do furano (furfural e 5-hidroximetilfurfural), ácidos levulínicos (ácido acético e ácido fórmico) e compostos fenólicos (MOOD et al., 2013). Furfural é formado a partir da degradação de pentoses (xilose e arabinose), e pode ser degradado a ácido fórmico e ácido acético. As hexoses quando degradadas formam 5-hidroximetilfurfural, que por sua vez pode ser degradado a ácido fórmico e ácido levulínico (PALMQVIST; HAHN-HAGERDAL, 2000).

A Figura 2.10 apresenta um esquema dos produtos de degradação que podem ser gerados durante o pré-tratamento.

Figura 2.10 – Principais monômeros e produtos de degradação formados durante o pré-tratamento.



Fonte: PALMQVIST; HAHN-HAGERDAL, 2000

2.4.1.1 Pré-tratamento hidrotérmico

O pré-tratamento hidrotérmico apresenta-se como uma técnica muito interessante dos pontos de vista ambiental e econômico, por não fazer uso de solventes químicos e de reatores altamente resistentes a corrosão, além de remover grande parte da fração hemicelulósica, aumentar a susceptibilidade da celulose durante a hidrólise enzimática e levar à mínima formação de produtos de degradação (MOSIER et al., 2005b; PEREZ et al., 2008). No entanto, o pré-tratamento hidrotérmico não é suficiente para remover grandes quantidades de lignina.

De maneira geral, o pré-tratamento hidrotérmico utiliza água sob elevada pressão (1,2 MPa) e temperatura (180-230°C) por aproximadamente 15 minutos. A água penetra na biomassa, clivando os grupos acetil da cadeia de hemicelulose a ácido acético, que por sua vez atua como catalisador da reação (processo autocatalítico), promovendo assim a solubilização das hemiceluloses (PITARELO et al., 2012) e o rompimento das ligações glicosídicas dos polissacarídeos.

Inúmeros trabalhos avaliam o efeito do pré-tratamento hidrotérmico em diferentes materiais lignocelulósicos, tais como: palha de trigo (PEREZ et al., 2008), serragem de árvore de tulipa (KIM et al., 2013), bagaço da cana (YU et al., 2013), lascas de madeira (KIM et al., 2014), palha de milho (LI et al., 2014) e palha de cana-de-açúcar (SANTOS et al., 2014). Todos os autores mostraram que houve uma alta recuperação de hemicelulose (>80%) e baixa remoção de lignina.

O efeito da temperatura e tempo durante a etapa de pré-tratamento hidrotérmico é medido através do fator de severidade, que indica o quão severo é o pré-tratamento para a biomassa (HEITZ et al., 1991; KIM et al., 2013).

O cálculo do fator de severidade é definido por Overend, Chornet e Gascoigne (1987), e dado pela equação 01:

$$\log(r_0) = \log \sum_{i=1}^n \left[t * \exp \left(\frac{T_i - T_{ref}}{14,75} \right) \right] \quad (01)$$

Onde $\log(r_0)$ é o fator de severidade, n é o número de intervalos entre uma medida e outra durante a etapa de pré-tratamento, t é o tempo reacional (min), T é a temperatura (°C) medida em cada instante de tempo e $T_{ref} = 100$ °C.

Kim et al (2013) avaliaram o efeito do pré-tratamento hidrotérmico da serragem de árvore de tulipa em diferentes condições de temperatura e tempo reacional. Os resultados obtidos revelaram que a eficiência do pré-tratamento é mais influenciada pela temperatura do que pelo tempo reacional. Além disso, foi encontrada uma dependência linear do fator de severidade com a remoção de hemicelulose, ou seja, quanto maior a temperatura, maior a solubilização da hemicelulose. A degradação da lignina aumentou ligeiramente até 200°C: temperaturas acima desse valor indicaram uma menor solubilização da lignina. Essa tendência sugere claramente a geração de pseudo-lignina durante o pré-tratamento, ocasionada pela precipitação de lignina em altas temperaturas.

De modo geral, um aumento na temperatura e no tempo reacional aumenta o fator de severidade. Isso também reflete em um aumento da área superficial acessível ao ataque enzimático, favorecendo as reações de solubilização. Entretanto, quanto maior a severidade do pré-tratamento, maior é a formação de produtos de degradação: ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural (VARGA; RECZEY; ZACCHI, 2004).

2.4.1.2 Pré-tratamento alcalino

Pré-tratamentos alcalinos são baseados na utilização de reagentes químicos com caráter básico, tais como: NaOH, Ca(OH)₂, KOH e amônia. São mais eficazes na remoção de lignina (deslignificação), exibindo menor solubilização de celulose e hemicelulose em relação aos processos ácidos e hidrotérmicos (CARVALHEIRO; DUARTE; GÍRIO, 2008; ALVIRA et al., 2010).

Este pré-tratamento causa o inchaço das fibras lignocelulósicas e o rompimento da estrutura da lignina, levando a um aumento da área superficial total, diminuição do grau de polimerização e da cristalinidade da biomassa, além da separação das ligações estruturais entre lignina e carboidratos (SUN; CHENG, 2002; CARVALHEIRO; DUARTE; GÍRIO, 2008; MOOD et al., 2013).

Em relação a outros pré-tratamentos, o alcalino opera em temperaturas e pressões mais baixas e não requer reatores muito complexos ou resistentes a corrosão. Entretanto, uma das desvantagens é a necessidade da neutralização do

material deslignificado (MOOD et al., 2013), além do inconveniente de alguns reagentes alcalinos serem convertidos em sais não recuperáveis ou incorporados como sais na biomassa (MOSIER et al., 2005a).

A utilização de pré-tratamento alcalino é uma boa escolha quando se objetiva a maior remoção de lignina possível. Gao et al. (2013) conseguiram obter uma remoção de 78% de lignina no pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar com NaOH 1% (1:20 $m_{\text{biomassa}}/V_{\text{NaOH}}$) a 80°C por 3h. Rocha et al. (2012) também encontraram resultados similares para a remoção de lignina (aprox. 73%) de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor seguido de deslignificação alcalina com NaOH 1% (1:10 $m_{\text{biomassa}}/V_{\text{NaOH}}$) a 100°C por 1h.

2.4.2 Hidrólise da celulose de materiais lignocelulósicos

Como etapa subsequente do pré-tratamento faz-se necessário uma etapa que converta os polissacarídeos (celulose e hemicelulose) da biomassa em açúcares fermentescíveis (glicose e xilose). Esta etapa é denominada hidrólise, e tem como função “quebrar” as moléculas de carboidratos em unidades menores de açúcares.

Dois processos são frequentemente empregados na sacarificação dos polissacarídeos: hidrólise com ácido concentrado ou diluído e hidrólise enzimática.

Reações catalisadas por ácidos ocorrem em velocidades mais rápidas do que as reações enzimáticas. No entanto, hidrólises ácidas apresentam vários inconvenientes, tais como: necessidade da utilização de reatores altamente resistentes à corrosão, recuperação do ácido e geração de compostos tóxicos e inibidores, os quais são prejudiciais às leveduras durante o processo de fermentação (SUN; CHENG, 2002).

Por outro lado, a hidrólise enzimática apresenta elevada especificidade, eliminando a possibilidade de formação de subprodutos tóxicos e inibitórios aos micro-organismos da fermentação, opera em condições mais brandas de pH e temperatura, além de não necessitar de equipamentos caros e resistentes a corrosão (SUN; CHENG, 2005; DE CASTRO; PEREIRA JR, 2010).

2.4.2.1 Hidrólise enzimática da celulose

Muitos autores relatam que dentre as etapas envolvidas no processo de produção de etanol de segunda geração, a hidrólise enzimática é a etapa chave de todo o custo do processo, devido ao alto preço do coquetel enzimático (KADAM; RYDHOLM; McMILLAN, 2004; HIMMEL et al., 2007; LYND et al., 2008; BANSAL et al., 2009). Sendo assim, torna-se evidente a importância do estudo detalhado dessa etapa a fim de obter altos rendimentos de glicose, com uma quantidade mínima possível de enzimas, tornando o processo economicamente viável.

O fator chave que distingue as reações enzimáticas das demais reações catalíticas é a formação do complexo enzima-substrato. Nesse caso, o substrato liga-se a um sítio ativo específico da enzima para formar esse complexo (FOGLER, 2009).

A hidrólise enzimática da celulose é realizada mediante a presença de enzimas altamente específicas, chamadas celulasas, que operam em condições brandas de pH (4-5) e temperatura (40°-60°C). Basicamente, as enzimas atuam como catalisadoras da reação, hidrolisando as cadeias de celulose em monômeros de glicose (DE CASTRO; PEREIRA JUNIOR, 2010).

2.4.2.2 Ação das celulasas

Embora a celulose seja um homopolímero, é necessário um complexo enzimático, para degradá-la (KRISTENSEN, 2009). O complexo enzimático trata-se de um conjunto de pelo menos três grandes grupos de celulasas: endoglicanases, também chamadas de (endo $\beta(1-4)$ D-glicanases, EC 3.2.1.4), exoglicanases ou celobiohidrolases (exo $\beta(1-4)$ D-glicanases, EC 3.2.1.91) e β -glicosidases (celobiase, EC 3.2.1.21). Além dos três grandes grupos de celulasas, há também um número de enzimas auxiliares que atacam a hemicelulose, tais como: glucoronidase, acetilesterase, xilanase, β -xilosidase, galactomananase e glucomananase (DUFF; MURRAY, 1996).

Em sua grande maioria, celulasas comerciais são produzidas pelo fungo *Trichoderma reesei*, e uma pequena quantidade produzida por *Aspergillus niger*, *Fusarium solani* e *Trichoderma viride* (GAN; ALLEN; TAYLOR, 2003).

T. reesei produz pelo menos duas celobiohidrolases (CBH I E CBH II), cinco endoglicanases (EG I, EG II, EG III, EG IV e EG V) e duas β -glicosidases (ZHANG; LYND, 2004).

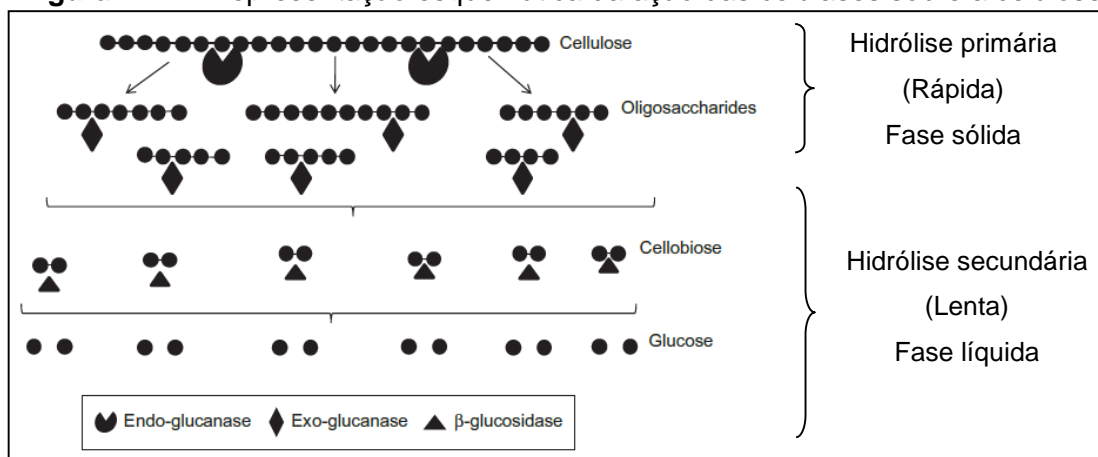
O modo de ação das celulases na biodegradação da celulose pode ser dividido em duas etapas principais: a hidrólise primária, envolvendo a ação da endo e exoglicanases, que ocorre na superfície sólida do substrato, promovendo a liberação de oligômeros (DP até 6), e a hidrólise secundária, que ocorre na fase líquida, envolvendo a quebra dos oligômeros em glicose, realizada pela exoglicanase e β -glicosidase (MOSIER; LADISCH; LADISCH, 2002; YANG et al., 2011). A primeira etapa, por ser uma reação heterogênea, é considerada a etapa limitante do processo, pois a velocidade de reação é muito menor quando comparada com a hidrólise secundária, a qual ocorre em meio homogêneo (LI et al., 2004).

De forma mais detalhada, as três classes de celulases atuam da seguinte maneira:

- Endoglicanases: são responsáveis por iniciar a reação, atacando de modo aleatório as regiões de baixa cristalinidade da fibra celulósica, liberando oligossacarídeos com extremidades redutoras e não-redutoras. Sua principal função é a diminuição do grau de polimerização das cadeias celulósicas sem resultar em solubilização dos oligômeros, disponibilizando novos pontos de ataques realizados pelas exoglicanases. As regiões de menor organização estrutural, amorfas, são mais facilmente atacadas por essas enzimas (LYND et al., 2002).
- Exoglicanases: são responsáveis por degradar os oligômeros, removendo unidades de celobiose. São subdivididas em celobiohidrolases I, celobiohidrolases II e glicanohidrolases, a primeira responsável pela hidrólise dos terminais redutores da celulose cristalina, a segunda pelas pontas não redutoras e a última liberando moléculas de glicose (ROUVINEN et al., 1990).
- β -glicosidases: são encarregadas de hidrolisar celobiose e celooligossacarídeos solúveis a glicose. A celobiose atua como um forte inibidor da atividade das exoglicanases. Logo, é indicado adicionar uma pequena quantidade de β -glicosidase pura no meio reacional, a fim de que

haja uma diminuição na concentração de celobiose, prevenindo assim o acúmulo desse dissacarídeo (SUN; CHENG, 2002).

Figura 2.11 – Representação esquemática da ação das celulases sobre a celulose.



Fonte: Adaptado de BINOD et al., 2011

Na Figura 2.11 é possível visualizar, de maneira simplificada, um esquema do mecanismo de ação das celulases na cadeia de celulose.

As três classes de enzimas do complexo celulásico, quando atuam individualmente, não hidrolisam a celulose de maneira eficiente, sendo necessária a ação simultânea das celulases. Esse fenômeno da ação conjunta das enzimas celulolíticas é denominado sinergismo, que é geralmente definido como um aumento da atividade enzimática exibida por uma mistura de enzimas quando comparada com a soma da atividade individual de cada enzima (GAN; ALLEN; TAYLOR, 2003). A representação quantitativa de sinergismo pode ser expressa em termos de grau de sinergismo, que é igual à razão entre a atividade da ação simultânea das enzimas e a soma das atividades individuais de cada uma delas (ZHANG; LYND, 2004).

Diferentes tipos de sinergismos têm sido reportados na literatura, mas os mais importantes para a hidrólise da celulose são: (1) sinergismo endo-exo, as endoglicanases atuam nas regiões amorfas, liberando terminais redutores e não redutores, nos quais atuarão as celobiohidrolases I e II, respectivamente, (2) sinergismo exo-exo, as duas exoglicanases atuam simultaneamente nas regiões redutoras e não redutoras da celulose, (3) exo-β glicosidases, que removem celobiose e oligossacarídeos (LYND et al., 2002).

A hidrólise da celulose cristalina requer uma ação sinérgica maior do que a celulose amorfa. Isso é explicado pelo fato de que a estrutura amorfa, devido à sua maior área superficial, é mais susceptível à hidrólise enzimática do que a celulose cristalina, que por sua vez apresenta uma estrutura bastante organizada, com grandes quantidades de ligações de hidrogênio difíceis de serem desestruturadas (YANG et al., 2011).

2.4.2.3 Fatores que afetam a hidrólise enzimática

Devido à complexidade da celulose e do sistema enzimático, o mecanismo de reação da hidrólise enzimática da celulose ainda não é totalmente compreendido. A reação ocorre em meio heterogêneo, no qual as enzimas estão dissolvidas na fase líquida e a celulose presente na fase sólida (GAN; ALLEN; TAYLOR, 2003). Como consequência dessa natureza heterogênea, a hidrólise enzimática da celulose envolve muito mais etapas do que uma cinética enzimática clássica (BANSAL et al., 2009), podendo ser dividida nas seguintes etapas (LEE; FAN, 1982):

1. Transferência de massa das enzimas desde o seio da fase fluida até a superfície externa do substrato;
2. Adsorção das celulasas e formação do complexo enzima-substrato;
3. Reação na superfície do substrato (hidrólise propriamente dita);
4. Dessorção das celulasas da superfície do substrato;
5. Difusão dos produtos do interior da partícula do substrato até a entrada do poro na superfície externa;
6. Transferência de massa de glicose e celobiose da superfície externa das partículas de celulose até o seio da fase fluida;
7. Hidrólise da celobiose à glicose pelas β -glicosidases.

O mecanismo de reação enzimática é extremamente influenciado pelas características estruturais do substrato, da natureza das celulasas e das condições do meio reacional (MAEDA et al., 2011). Dessa maneira, muitos pesquisadores têm relatado que os fatores que afetam a hidrólise enzimática da biomassa podem ser

divididos em dois grupos: aqueles relacionados com as características estruturais do substrato e aqueles relacionados com o mecanismo do complexo enzimático (MANSFIELD; MOONEY; SADDLER, 1999). Vale ressaltar que muitos fatores estão correlacionados, de forma que se torna difícil quantificar a influência de cada um isoladamente. A eficiência de hidrólise de materiais lignocelulósicos está intimamente ligada com a interação entre substrato e enzima (MANSFIELD; MOONEY; SADDLER, 1999; YANG et al., 2011).

2.4.2.3.1 Fatores relacionados às enzimas

Inúmeras causas associadas à natureza do extrato enzimático afetam o desempenho da sacarificação enzimática. Entre os fatores, incluem: efeito da temperatura e do pH, adsorção, inibição pelo produto, desativação mecânica e transferência de massa (MANSFIELD; MOONEY; SADDLER, 1999; GAN; ALLEN; TAYLOR, 2003).

Efeito da temperatura

Muito do poder catalítico de uma enzima é atribuído à energia de ligação do substrato com a enzima, que se dá através de ligações de hidrogênio, iônicas e de Van der Waals, as quais estabilizam o complexo enzima-substrato. A enzima pode se desarranjar, se for submetida a temperaturas elevadas ou pH extremo, perdendo, em decorrência, seus sítios ativos.

O efeito da temperatura em reações enzimáticas é muito complexo. Se a estrutura da enzima não sofrer modificações com o aumento da temperatura, a velocidade deve provavelmente seguir uma dependência com a temperatura do tipo lei de Arrhenius. No entanto, com o aumento da temperatura os átomos da molécula da enzima adquirem uma energia muito grande, e essa excitação das moléculas é suficiente para romper as ligações mais fracas do complexo enzimático, diminuindo a atividade das enzimas, ou até mesmo, desnaturando-as (BAILEY; OLLIS, 1986)

O efeito da temperatura também exerce influência na adsorção das enzimas ao substrato. Temperaturas abaixo de 60°C promoveram uma relação positiva entre a adsorção e a sacarificação da celulose, enquanto temperaturas acima de 60°C causaram uma diminuição da adsorção, possivelmente devido à perda da configuração estrutural da enzima, levando a uma desnaturação (BINOD et al, 2011).

Efeito do pH

A influência do pH na atividade enzimática é geralmente descrita em termos de perturbações da distribuição da enzima entre diferentes formas protonadas (FIDALEO; LAVECCHIA, 2003). As enzimas possuem em sua estrutura grupos funcionais neutros, básicos e ácidos, podendo estar carregados negativamente ou positivamente em um determinado pH. Para que uma catálise ácida ou básica aconteça, os grupos ionizáveis no sítio ativo devem possuir uma carga em particular, ou seja, a enzima é cataliticamente ativa somente em um estado de ionização definido. Mudanças no pH afetam a capacidade de ligação do substrato ao sítio ativo da enzima (BAILEY; OLLIS, 1986).

Adsorção

Muitos pesquisadores (OOSHIMA; SAKATA; HARANO, 1983; SINGH; KUMAR; SCHUGERL, 1991; KIM et al., 1992) observaram que a adsorção de celulasas no substrato é uma etapa muito rápida, alcançando o estado estacionário dentro de 30 minutos. No entanto, outros autores relatam que a adsorção e a formação do complexo enzima-substrato são passos críticos da reação de hidrólise celulolítica (WALKER; WILSON, 1991; GAN; ALLEN; TAYLOR, 2003), devido ao fato de estar intimamente ligada com as características estruturais da biomassa, o modo de interação entre as celulasas e a fibra celulósica, e a natureza das enzimas empregadas (FAN; LEE; BEARDMORE, 1982; WALKER; WILSON, 1991).

Adsorção de celulasas pode ser descrita como reversível (MOONEY et al., 1999, irreversível (KRAULIS et al., 1989) ou semi-reversível (DEEBLE; LEE, 1985

apud GAN; ALLEN; TAYLOR, 2003). Além disso, a adsorção pode ser classificada como produtiva ou não-produtiva (ZHENG et al., 2007). Adsorções produtivas são aquelas em que a enzima se liga ao substrato. Por outro lado, adsorção não-produtiva se refere à ligação da enzima em outros componentes que não sejam o substrato, e que são cataliticamente inativos. Um exemplo clássico disso é a adsorção da celulase em lignina. Essa ligação enzima-lignina é ineficaz, pois não participa da reação de hidrólise. Desta forma, uma menor quantidade de enzimas estará disponível no meio reacional e, conseqüentemente, maiores dosagens de celulasas serão necessárias para alcançar uma eficiência de sacarificação desejável (ZHENG et al., 2007).

Ooshima, Sakata e Harano (1986); Sun; Cheng (2002) e Lou et al. (2013) relatam que uma maneira de evitar ligações não-produtivas é através da adição de surfactantes no meio reacional. Esses compostos, quando entram em contato com a biomassa, causam uma modificação estrutural na superfície da fibra lignocelulósica, minimizando ligações enzima-lignina e ligações irreversíveis da celulase na celulose. Surfactantes utilizados na hidrólise enzimática incluem os não iônicos (Emulgen 147, Tween 20, Tween 81), catiônicos (Q-86W) e anfóteros (Anhitole 20 BS).

Kristensen et al. (2007) mostraram que a adição de surfactantes não iônicos aumentou a conversão de biomassas lignocelulósicas pré-tratadas, devido a uma maior adsorção da enzima ao substrato. Em substratos lignocelulósicos o efeito da adição de surfactante é bastante significativo, resultando em quase uma duplicação da produção de açúcares (BINOD et al., 2011).

Inibição pelo produto

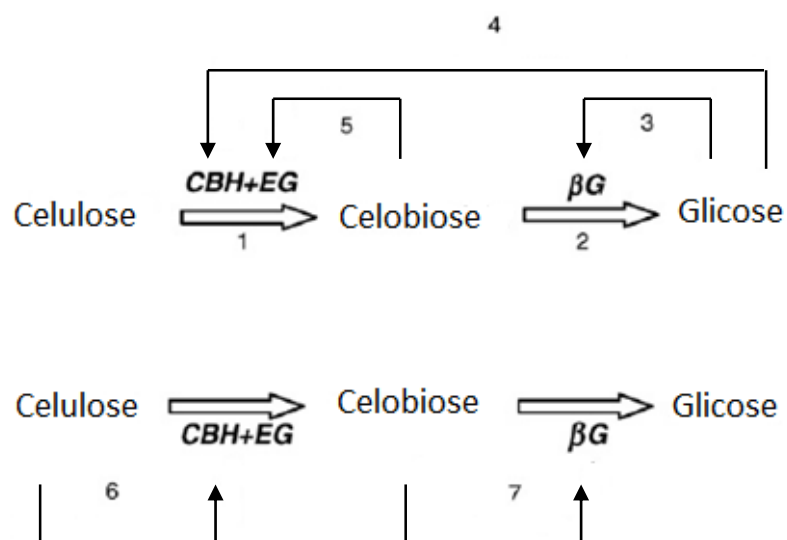
Outro fator que influencia fortemente as velocidades de reações enzimáticas é a presença de um inibidor (BEZERRA; DIAS, 2004). Estes constituem um dos principais obstáculos para alcançar uma sacarificação da celulose de forma eficiente (ANDRIĆ et al., 2010).

Inibidores são espécies que interagem com as enzimas, tornando-as incapazes de catalisar a reação. Os dois tipos mais usuais de ocorrências de inibição reversível são: competitiva e não-competitiva. Destas, a inibição competitiva é a mais comumente reportada na literatura (ZHENG et al., 2009).

O modo competitivo de inibição assume que os inibidores são análogos ao substrato, ligando-se competitivamente ao sítio ativo da enzima para formar um complexo inibidor-enzima. No modo inibição não-competitiva, inibidores não têm afinidade com a enzima, mas se ligam ao complexo enzima-substrato formando um novo complexo inibidor-enzima-substrato, que é inativo (FOGLER, 2009).

Celulases são geralmente inibidas pelos produtos formados durante a hidrólise: celobiose e glicose. Celobiose, produto resultante da ação da celobiohidrolase e da ação parcial da endoglicanase, inibe as celobiohidrolases, endoglicanases e β -glicosidases (Figura 2.12, vias 5 e 7). Glicose inibe as celobiohidrolases, endoglicanases (Figura 2.12, via 4) e β -glicosidases (Figura 2.12, via 3). Como a concentração de glicose aumenta no decorrer da reação, a inibição da endoglicanase e β -glicosidase também aumenta. No entanto, muitos autores relatam que a celobiose (quando presente em grandes quantidades) pode ser um agente inibidor ainda mais forte que a glicose (GHOSE, 1969; LEE; FAN, 1982; WALKER; WILSON, 1991; KADAM; RYDHOLM; McMILLAN, 2004). Celuloses também exercem inibição em celobiohidrolases e endoglicanases (Figura 2.12, via 6) (ANDRIĆ et al., 2010).

Figura 2.12 – Representação das principais vias de inibição das celulases: (a) inibição pela glicose (3,4), (b) inibição pela celobiose (5), (c) inibição pelo substrato (6,7).



Fonte: Adaptado de ANDRIĆ et al., 2010a

Os tipos de inibição ocorrentes na hidrólise enzimática têm sido objeto de muito estudo. Para a hidrólise de celulose pura, Lee e Fan (1982) observaram inibição por glicose e por celobiose. A velocidade de hidrólise diminuiu de $9,1 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ para $3,6 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ com adição de 30 g de glicose no início da reação, enquanto que adição de 30 g de celobiose promoveu uma diminuição na velocidade de reação de $9,1 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ para $1,5 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

Em trabalho mais recente, Bezerra e Dias (2004) estudaram a inibição competitiva de enzima exoglicanase por celobiose em substrato de celulose pura. Kadam, Rydholm e McMillan (2004) desenvolveram um modelo cinético da hidrólise da palha de trigo considerando inibição competitiva da celobiose, xilose e glicose. Os resultados obtidos mostraram que concentrações de glicose acima de 20 g/L promoveram uma inibição de β -glicosidase por glicose. Quando glicose foi adicionada no início da hidrólise enzimática, a conversão de celobiose em glicose foi mais baixa ainda, indicando um aumento na inibição da β -glicosidase por glicose.

Em outro trabalho, Bezerra e Dias (2005) estudaram o efeito da inibição do etanol nas endo e exoglicanases de *T. reesei*. Os resultados indicaram uma maior inibição por celobiose (em relação ao etanol).

Vários métodos têm sido desenvolvidos para minimizar o efeito inibitório de celobiose e glicose. Uma alternativa muito utilizada para minimizar a inibição por celobiose é a suplementação do complexo enzimático com β -glicosidase, a fim de promover um maior consumo de celobiose no meio reacional. Outra alternativa é a remoção dos açúcares durante a hidrólise por meio da estratégia SSF (do inglês, Simultaneous Saccharification and Fermentation). Enquanto as enzimas hidrolisam as celuloses em glicose, as leveduras consomem glicose e transformam em etanol, o que reduz significativamente a inibição das enzimas por glicose (SUN; CHENG, 2002). Em muitos casos, inibição da celulase por etanol também ocorre, entretanto de forma menos agressiva quando comparada com inibição por celobiose e glicose (BINOD et al., 2011).

Concentração de enzima

Em geral, um aumento na concentração de enzima promove um aumento na conversão final do substrato. Todavia, esse comportamento não é linear para toda

faixa de concentração de enzimas. A relação é linear apenas quando são tomadas medidas de velocidades iniciais da reação, ou seja, quando a velocidade de formação do produto é constante durante um determinado intervalo de tempo. Desta forma, é de grande importância estabelecer, em estudos cinéticos, os limites de linearidade definindo a concentração máxima de produto que pode ser acumulada no meio reacional antes que este iniba as enzimas, tornando as velocidades de reação não-lineares.

Mussatto et al. (2008) observaram durante a hidrólise enzimática de resíduos de malte um aumento de 50% na produção de glicose ao aumentar a carga enzimática de 15 para 45 FPU.g_{substrato}⁻¹, após 96h de hidrólise. No entanto, cargas enzimáticas entre 45 e 85 FPU.g_{substrato}⁻¹ indicaram um índice de sacarificação praticamente constante. É provável que tenha ocorrido inibição pelo produto nesses casos, afetando a atividade enzimática e conversão da celulose em glicose.

Transferência de massa

A eficiência da hidrólise enzimática está associada à velocidade de reação, que por sua vez depende da transferência de massa das moléculas de enzima através da camada de fluido estagnado ao redor das partículas de celulose.

A velocidade global de reação é governada por três eventos em sequência: (1) velocidade de transferência de massa externa da enzima até a superfície do substrato, (2) velocidade de adsorção da enzima na superfície do substrato e (3) velocidade de reação enzimática (GAN; ALLEN; TAYLOR, 2003). Quanto maior a velocidade do fluido, menor a espessura do filme estagnado e maior o coeficiente de transferência de massa no filme, portanto, mais alta a velocidade de difusão externa.

Agitações adequadas são necessárias para garantir um maior contato entre a enzima e o substrato, de forma a garantir que o processo não seja limitado pela transferência de massa externa (INGESSON et al., 2001). Entretanto, muitos estudos indicam que a transferência de massa externa pode ser ignorada, supondo que a reação na superfície é a etapa limitante global do processo (GAN; ALLEN; TAYLOR, 2003).

Ingesson et al. (2001) observaram que 35% das enzimas adicionadas na hidrólise da celulose foram adsorvidas ao substrato nas primeiras 4h de reação, em

agitação de 150 rpm. Em agitação de 25 rpm, a adsorção ocorreu em uma velocidade menor, e a máxima adsorção das enzimas (37%) foi atingida em 24h de reação.

Em trabalhos mais recentes, Mussatto et al. (2008) demonstraram que para uma mesma carga de enzima (5 FPU/g_{substrato}) e substrato (2% m/v) em diferentes agitações (100 e 200 rpm) promoveram uma conversão de celulose de 66% e 51,6%, respectivamente. O mesmo comportamento foi encontrado para cargas de substrato maiores (8% m/v), indicando que menores agitações promoveram uma maior conversão do substrato. Esse comportamento é justificado pelo fato de que agitações excessivas podem desativar as enzimas e reduzir o rendimento de conversão, efeito atribuído à força de cisalhamento gerado pelo agitador e pelo aprisionamento de bolhas de ar entre a superfície ar-líquido (INGESSON et al., 2001).

As enzimas estão susceptíveis à desativação quando estão expostas à tensão de cisalhamento muito grande (GAN; ALLEN; TAYLOR, 2003). Diante do fato, é de fundamental importância encontrar a agitação que conduz a uma alta velocidade de difusão, sem desativar a enzima.

2.4.2.3.2 Fatores relacionados ao substrato

Além dos fatores relacionados à enzima, fatores relacionados ao substrato também podem impactar na eficiência de hidrólise enzimática, tais como: índice de cristalinidade da celulose, grau de polimerização, área superficial, concentração de substrato e presença da lignina (ZHANG; LYND, 2004). As características do substrato sólido variam conforme a hidrólise se processa, podendo ser consideradas: mudanças no número de extremidades da cadeia e mudanças na acessibilidade da celulose.

Índice de cristalinidade

O índice de cristalinidade (Crl) mede a quantidade relativa da celulose cristalina em toda a fibra celulósica. Conforme a cristalinidade aumenta, a celulose se torna cada vez mais resistente ao ataque enzimático (LEE; FAN, 1982).

Lynd et al. (2002) relataram que reações enzimáticas com celulose pura degradaram as estruturas amorfas da celulose de 5 a 10 vezes mais rápidas do que as celuloses altamente cristalinas. Isso indica que as altas velocidades iniciais de reação são devidas à hidrólise preferencial das regiões amorfas, mais facilmente degradadas, de forma que as velocidades vão diminuindo conforme as enzimas encontram regiões mais recalcitrantes (MANSFIELD; MOONEY; SADDLER, 1999).

Biomassas lignocelulósicas que são submetidas à pré-tratamentos apresentam menor grau de cristalinidade, bem como uma maior área superficial. Essas mudanças refletem em um efeito positivo durante a hidrólise enzimática. Dessa forma, não se pode afirmar que somente a cristalinidade exerce um efeito negativo na hidrólise, e sim uma associação de fatores (MANSFIELD; MOONEY; SADDLER, 1999).

Grau de polimerização

Grau de polimerização (DP) é o número de unidades monoméricas que se agrupam para formar uma macromolécula. A solubilidade depende da interação das moléculas do soluto com o solvente, ou seja, quanto mais monômeros interligados, mais ligações de hidrogênio estão presentes na molécula, conferindo uma maior estabilidade e impermeabilidade à fibra polimérica, de maneira que o ataque enzimático se torna mais dificultoso.

Área superficial

A área superficial está relacionada com a forma e tamanho da partícula. Reduções no tamanho da partícula refletem em uma maior área superficial total, que pode significar mais sítios de adsorção para o ataque enzimático. (LEE; FAN, 1982). Os autores observaram um aumento linear da adsorção da enzima ao substrato com o aumento da área superficial específica.

Dasari e Berson (2007) mostraram que o tamanho da partícula do substrato tem um impacto significativo nas velocidades de formação de glicose. A redução de

590 para 33 μm resultou em um aumento de 55% na produção de glicose, em 72h de reação.

Yeh, Huang e Chen (2010) observaram que com uma redução de partícula de 25,52 para 0,78 μm a produção de açúcar aumentou de 50 para 90%, em 80 h de reação. Os dados demonstraram que uma redução no tamanho da partícula é uma técnica atrativa para melhorar a eficiência de hidrólise. Entretanto, moagem é uma operação que demanda energia intensa. Para compensar isso, utilizam-se pré-tratamentos químicos, físicos ou térmicos, que além de remover lignina e hemicelulose, também reduzem o tamanho da partícula.

Presença de lignina

A presença de lignina na biomassa é provavelmente uma das causas que mais afetam a acessibilidade das enzimas à celulose (MANSFIELD; MOONEY; SADDLER, 1999). Lignina atua como barreira física, evitando o acesso das enzimas ao substrato. Além disso, celulasas tendem a se ligar irreversivelmente à lignina através de interações hidrofóbicas, causando uma redução na quantidade de celulasas disponíveis para a hidrólise da celulose, de modo que a formação de açúcares durante a hidrólise enzimática é reduzida (OOSHIMA; BURNS; CONVERSE, 1990).

Remoção da lignina tem surtido efeitos positivos na velocidade de sacarificação enzimática. Gao et al (2013) avaliaram diferentes tipos de pré-tratamentos na composição química das biomassas lignocelulósicas, bem como a eficiência da hidrólise enzimática. Resultados mostraram que pré-tratamentos que removeram em torno de 84% de lignina promoveram uma conversão de celulose de 95%. Já pré-tratamentos que removeram cerca de 42% de lignina resultaram em uma conversão 55%. Além disso, a digestibilidade enzimática da celulose foi mais sensível à remoção de lignina do que de hemicelulose.

Concentração de substrato

A concentração de substrato também é um fator de grande influência sobre a hidrólise enzimática, não só por razões cinéticas, mas também por que altas cargas de sólidos atuam sobre a eficiência de mistura, bem como sobre as resistências à transferência de massa.

Manter altas concentrações de sólidos ao longo do processo de produção de bioetanol é importante do ponto de vista econômico e energético (BINOD et al., 2011). No entanto, à medida que a reação prossegue, a concentração de produto aumenta e este passa a inibir a reação. Muitos estudos mostram que altas concentrações de sólidos promoveram um aumento na concentração final de glicose. Entretanto, a conversão da celulose diminuiu com o aumento da carga de biomassa. Limitações de transferência massa, devido à alta viscosidade do meio reacional, adsorção não produtiva e inibição pelo produto podem ser uma das causas desse efeito.

Kristensen, Felby e Jorgensen (2009) avaliaram o efeito de altas concentrações de sólidos na hidrólise enzimática de papel filtro. Insuficiências no grau de mistura, teor de lignina e inibidores advindos da hemicelulose não foram responsáveis pela redução na conversão. Inibição por glicose e particularmente por celobiose influenciaram a reação, mas não foram responsáveis pela diminuição do rendimento de sacarificação. Houve uma forte correlação entre o decréscimo da adsorção e a conversão, indicando que a inibição da adsorção da celulase em celulose foi a principal causa da redução do rendimento de sacarificação.

2.4.3 Modelagem matemática da hidrólise enzimática da celulose

Otimizar o processo de bioconversão de biomassas lignocelulósicas em etanol requer um bom conhecimento da cinética de reação. O sistema de reação de hidrólise enzimática é heterogêneo, envolvendo substratos insolúveis e enzimas solúveis. Essa característica indica que os mecanismos de reação são altamente complexos, tornando-os difíceis de serem totalmente compreendidos (GAN; ALLEN; TAYLOR, 2003).

Modelos matemáticos são fundamentais na correlação de dados cinéticos envolvidos durante a hidrólise enzimática, além de fornecerem informações a respeito

dos mecanismos de reação e melhorarem a compreensão fenomenológica do processo (MANSFIELD; MOONEY; SADDLER, 1999).

Cada modelo tem sua característica particular, eles diferem entre si nas hipóteses formuladas em relação às características do substrato, sinergismo das celulases, inibição pelo produto, adsorção não-produtiva e resistências difusionais (LIAO et al, 2008). É importante que uma representação matemática da cinética enzimática incorpore informações vitais sobre o entendimento do sistema catalítico em situações diferentes, mas que ao mesmo tempo não seja complexo na tentativa de abranger todos os fenômenos envolvidos, mesmo porque alguns deles podem não ter tanta influência nas análises (GAN; ALLEN; TAYLOR, 2003).

Os modelos podem ser divididos em quatro categorias: (1) não-mecanísticos, (2) semi-mecanísticos, (3) funcionais e (4) estruturais.

Modelos não-mecanísticos: ajudam na quantificação dos efeitos das propriedades da enzima e do substrato no processo de hidrólise. São úteis na correlação de dados experimentais, mas pouco confiáveis em condições diferentes daquelas para as quais foram desenvolvidos, além de não melhorarem a compreensão fenomenológica do sistema (ZHANG; LYND, 2004).

Modelos semi-mecanísticos: são baseados em um modelo de interação enzima/substrato. Podem ser considerados semi-mecanísticos em relação ao substrato, usando apenas concentração como variável de estado ou semi-mecanísticos em relação à enzima, considerando apenas uma atividade enzimática. São úteis para a correlação de dados, identificação de algumas características essenciais do mecanismo de hidrólise, além de serem utilizados no desenvolvimento de projetos de biorreatores. Modelos semi-mecanísticos são considerados sofisticados o suficiente para descrever as complexidades da hidrólise enzimática de biomassas lignocelulósicas sem necessitar de inúmeros experimentos e análises estruturais da fibra celulósica (ZHENG et al., 2009)

Modelos funcionais: incluem também variáveis adicionais de estado do substrato, tais como: cristalinidade e grau de polimerização, além de considerarem a ação de várias enzimas. São particularmente úteis na compreensão de características

do substrato bem como no mecanismo de ação de múltiplas enzimas. Estes modelos podem ser utilizados no projeto de biorreatores, mas podem levar a um grande número de parâmetros, exigindo uma grande quantidade de informações experimentais, o que pode desencorajar sua aplicação (ZHANG; LYND, 2004)

Modelos estruturais: estes modelos são baseados nas características estruturais da matriz lignocelulósica e das celulasas, bem como nas interações entre o complexo enzima-substrato. Melhoram a compreensão fenomenológica a nível molecular, mas a validação de tais modelos é ainda um grande desafio a ser enfrentado (ZHANG; LYND, 2004).

Zhang e Lynd (2004) descrevem o potencial do uso de vários modelos descritos na literatura, baseados no número de variáveis relacionadas ao substrato e à enzima. Os autores concluíram que para alcançar um modelo mais detalhado e com melhor compreensão fenomenológica do processo, mais propriedades da enzima e do substrato devem ser consideradas no modelo. Entretanto, nem todas as complexidades do sistema precisam ser incorporadas para desenvolver um modelo efetivo. De maneira geral, é preferível um modelo que minimize o número de parâmetros, mas que descrevam bem o processo (KADAM; RYDHOLM; McMILLAN, 2004).

Uma variedade de modelos é descrito na literatura (LEE; FAN, 1982; CHRASTIL, 1998; GAN; ALLEN; TAYLOR, 2003; BEZERRA; DIAS, 2004; KADAM; RYDHOLM; McMILLAN, 2004; ZHANG; LYND, 2004; CARRILLO et al., 2005; BANSAL et al., 2009; ZHENG et al., 2009). Sousa Jr et al, 2011 fornecem uma revisão sobre tendências atuais na modelagem matemática da hidrólise enzimática da celulose, apresentando modelos mecanísticos, semi-mecanísticos, estruturais e funcionais aplicados a diferentes enzimas e biomassas.

2.4.3.1 Modelos semi-mecanísticos

A maioria dos modelos cinéticos proposto na literatura sobre a hidrólise enzimática e desenvolvimento de biorreatores se enquadram na categoria de modelos

semi-mecanísticos. Estes modelos motivam sua aplicação devido à simplicidade e informações mínimas necessárias para descrever processos de hidrólise enzimática.

Muitos modelos assumem hipóteses de adsorção da celulase na celulose através de isothermas do tipo Langmuir. Um exemplo de modelo cinético da hidrólise enzimática da celulose que emprega isoterma de adsorção do tipo Langmuir é o modelo de Kadam, Rydholm e McMillan (2004). Este modelo cinético é multireacional, em que três reações de hidrólise foram modeladas: duas reações heterogêneas para a quebra da celulose em celobiose e glicose, e uma reação homogênea para a hidrólise da celobiose em glicose. A adsorção da celulase na biomassa lignocelulósica foi modelada pela isoterma de Langmuir, mostrada na equação 02:

Isoterma de Langmuir:

$$E_{iB} = \frac{E_{imax} K_{iad} E_{iF} S}{1 + K_{iad} E_{iF}} \quad (02)$$

Onde: E_{iB} é a concentração de enzima adsorvida, E_{iF} é a concentração de enzima livre, E_{imax} é a concentração 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 e S é a concentração de substrato em um determinado instante de tempo.

Foi considerado neste modelo o efeito de inibição dos produtos oriundos da hidrólise da celulose: celobiose, glicose e xilose. Assumiu-se inibição competitiva.

A reação de hidrólise da celulose a celobiose com inibição competitiva por glicose, celobiose e xilose é mostrada na equação 03.

$$r_1 = \frac{k_{1r} E_{1B} R_S S}{1 + \frac{G_2}{K_{11G2}} + \frac{G}{K_{11G}} + \frac{X}{K_{11X}}} \quad (03)$$

A reação de hidrólise da celulose a glicose com inibição competitiva por glicose, celobiose e xilose é mostrada na equação 04:

$$r_2 = \frac{k_{2r}(E_{1B}+E_{2B})R_S S}{1 + \frac{G_2}{K_{2IG2}} + \frac{G}{K_{2IG}} + \frac{X}{K_{2IX}}} \quad (04)$$

A reação de hidrólise da celobiose a glicose com inibição competitiva por glicose e xilose pode ser visualizada na equação 05:

$$r_3 = \frac{k_{3r}E_{2F}G_2}{K_{3M} \left(1 + \frac{G}{K_{3IG}} + \frac{X}{K_{3IX}}\right) + G_2} \quad (05)$$

Onde: k_{ir} é a velocidade específica de cada reação (r_1 , r_2 ou r_3), G é a concentração de glicose, G_2 é a concentração de celobiose, X é a concentração de xilose, K_{iIG} são as constantes de inibição de glicose nas enzimas, K_{iIG2} são as constantes de inibição de celobiose nas enzimas, K_{iIX} são constantes de inibição de xilose nas enzimas, K_{3M} é a constante de saturação da 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 ($R_S = S/S_0$).

Kadam, Rydholm e McMillan (2004) realizam experimentos de hidrólise enzimática da palha de trigo pré-tratada com ácido diluído tanto em frascos de Erlenmeyers quanto em reator de tanque agitado. Os resultados mostraram que o modelo foi bastante positivo na previsão de produção de glicose tanto em experimentos em Erlenmeyers quanto em reator de tanque agitado, indicando que o modelo é aplicável para diferentes estratégias de operação.

Alguns trabalhos (ZHENG et al., 2009; HODGE et al., 2009; MORALES-RODRÍGUEZ et al., 2010) aplicaram o modelo de Kadam, Rydholm e McMillan (2004) na modelagem matemática da hidrólise enzimática da celulose.

O modelo utilizado por ZHENG et al., 2009 além de seguir as hipóteses de Kadam, Rydholm e McMillan (2004) também incorporou o efeito negativo da lignina

(adsorção não-produtiva) usando uma isoterma de adsorção da celulose em lignina do tipo Langmuir.

O modelo utilizado por Hodge et al. (2009) incorpora no modelo de Kadam, Rydholm e McMillan (2004) os efeitos de altas concentrações de sólidos ao longo do processo de hidrólise em sistemas de batelada alimentada e sistema contínuo.

2.4.3.1.1 Modelo de Michaelis- Menten

Um dos modelos cinéticos utilizados neste trabalho é o modelo clássico de Michaelis-Menten (MM). Esse modelo é o mais utilizado para descrever o consumo de substratos em processos que envolvem reações enzimáticas.

A modelagem de MM assume várias hipóteses para a reação de hidrólise enzimática:

- Utilização de um único substrato;
- Sistema reacional homogêneo;
- Concentração de enzima constante;
- Enzima não é adsorvida irreversivelmente em lignina e/ou substrato.
- Complexo enzima-substrato é formado rapidamente;
- A quebra do complexo-enzima-substrato para a formação de produtos é a etapa limitante da reação global;
- Formação de produtos é uma reação irreversível.

Além disso, o modelo sugere que não existem inibições impostas pelo substrato ou produto, de forma que o modelo de MM é mais adequado para concentrações baixas de substratos, quando inibição pelo produto não exerce influências muito grandes (SHULER; KARGI 1992).

A velocidade de hidrólise enzimática pode ser expressa como uma função da concentração de substrato, conforme a equação 06.

$$V = \frac{k_{cat} \cdot E_0 \cdot S}{K_m + S} = \frac{V_{m\acute{a}x} \cdot S}{K_m + S} \quad (06)$$

Onde: V é a velocidade de consumo de substrato. O parâmetro k_{cat} é chamado de velocidade específica de reação. K_m é a constante de Michaelis-Menten e, para sistemas simples, é uma medida da atração da enzima pelo substrato (por isso, é também chamada de constante de afinidade). Quanto maior é o K_m , menor é a afinidade entre a enzima e o substrato. $V_{m\acute{a}x}$ representa a velocidade máxima de reação para uma dada concentração de enzima total, ou seja, quanto maior a concentração da enzima, maior é a velocidade máxima de reação (que não é afetada pela concentração de substrato). E_0 é a concentração de enzima inicial e S é a concentração de substrato em determinado instante de tempo.

O modelo clássico de MM é muito útil na determinação de velocidades iniciais de reação e muitos trabalhos confirmam um bom ajuste dos dados experimentais com o modelo (GAN; ALLEN; TAYLOR, 2003).

Entretanto, ao longo do tempo de reação aumenta-se a concentração de produto, ao passo que também aumenta a inibição das enzimas pelo produto. Sendo assim, deve-se considerar o modelo de MM com inibição. Assumindo que a hidrólise da celulose ocorre em um sistema pseudo-homogêneo, que o complexo enzimático leva em consideração apenas uma atividade enzimática global e que produtos de inibição seguem um mecanismo de inibição competitiva, a velocidade de reação enzimática pode ser expressa de acordo com a equação 07:

$$V = \frac{V_{m\acute{a}x} \cdot S}{K_m \left[1 + \frac{P}{K_{ic}} \right] + S} \quad (07)$$

Onde P é a concentração de produto em determinado instante de tempo e K_{ic} é a constante de inibição da enzima pelo produto.

Bezerra e Dias (2004) testaram oito diferentes modelos de Michaelis-Menten na hidrólise enzimática de Avicel por exoglicanase em diferentes concentrações de enzima e substrato. Um modelo com inibição competitiva por celobiose foi encontrado para o melhor ajuste dos dados. Razões para o decréscimo da velocidade de reação, tais como ligação não-produtiva da celulase, inibição parabólica, mista e não competitiva mostraram ser insignificantes em comparação com a inibição competitiva.

Li et al. (2004) estudaram a hidrólise enzimática de polpas celulósicas em reatores de tanque agitado. Um modelo pseudo-homogêneo de Michaelis-Menten com inibição foi ajustado, conforme mostrado na equação 08. Foi considerado que açúcares poderiam ser produzidos a partir do substrato solúvel hipotético, cuja concentração inicial corresponde à conversão final do substrato.

$$\frac{dP}{dt} = \frac{kE_o (P_\infty - P)}{K_m \left[1 + \left(\frac{1}{K_i} \right) P \right] + 0,9(P_\infty - P)} \quad (08)$$

Onde P e P_∞ são as concentrações de produto no tempo e o último valor da concentração de açúcar, respectivamente; K_i é a constante de inibição competitiva aparente entre os açúcares totais e a celulase; K_m é a constante de Michaelis-Menten e k é a constante de velocidade aparente. A constante 0,9 é a relação entre o peso molecular da glicose e da celulose.

Miao et al. (2012) estudaram a inibição por produto da hidrólise enzimática da palha de arroz pré-tratada por processo integrado moagem úmida/alcalino. No trabalho foi constatado que os açúcares redutores (glicose, xilose e arabinose) gerados durante a sacarificação enzimática exercem fortes efeitos de inibição competitiva.

Todos os modelos com inibição reportados neste tópico levaram em consideração inibição competitiva. No entanto, deve-se lembrar que inibição competitiva é o mecanismo mais comum reportado na literatura, mas inibições não-competitiva, mista e parabólica também têm sido propostas na literatura.

2.4.3.1.2 Modelo de Michaelis-Menten modificado

A equação de Michaelis-Menten considera reações enzimáticas em sistemas homogêneos, entretanto a hidrólise da celulose ocorre em um sistema heterogêneo, no qual as enzimas estão dissolvidas em uma fase aquosa, enquanto que a celulose se apresenta no estado sólido. Dessa forma, essa abordagem pode não ser

totalmente adequada para sistemas heterogêneos, especialmente quando a reação é fortemente limitada pela transferência de massa interna.

Uma abordagem alternativa sugere que a velocidade inicial de hidrólise, v_o , deve ser expressa como função da concentração inicial de enzima, E_o . Isto implica que as concentrações de enzima e substrato são trocadas na equação de MM. A velocidade inicial de hidrólise pode ser expressa da seguinte forma:

$$v_o = \frac{V_{em\acute{a}x} \cdot E_o}{K_e + E_o} \quad (09)$$

Onde: v_o é a velocidade inicial de reação, $V_{em\acute{a}x}$ é a velocidade máxima e K_e é a constante de saturação.

Carrillo et al. (2005) estudaram a cinética da hidrólise enzimática da palha de trigo pré-tratada com hidróxido de sódio, e concluíram que embora desconsideradas as propriedades estruturais do sistema enzimático, o modelo de MM modificado apresentou boa correlação com os dados experimentais para velocidades iniciais de reação, incluindo alta e baixa concentração de enzima. Os parâmetros K_e e $V_{em\acute{a}x}$ foram determinados com alta precisão.

Para experimentos de longos tempos de duração, deve-se considerar o modelo de MM modificado com inibição, podendo ser expressa de acordo com a equação 10:

$$v = \frac{V_{em\acute{a}x} \cdot E_o}{K_e \left(1 + \frac{P}{K_{ic}'}\right) + E_o} \quad (10)$$

2.4.3.1.3 Modelo de Chrastil

Outro modelo utilizado nesse trabalho é a abordagem de Chrastil (1988). Todas as constantes de tempo para a formação de produto são consideradas levando em conta que, em um sistema heterogêneo, as curvas de tempo dependem fortemente das estruturas heterogêneas que limitam a velocidade de hidrólise, incluindo as

resistências internas à difusão da enzima (SOUSA Jr et al., 2011). Diante de tal contexto, o modelo de Chrastil foi desenvolvido como uma alternativa ao modelo de MM a fim de melhorar a compreensão fenomenológica do sistema, a qual não é possível de ser entendida através da análise de velocidades iniciais proposta por MM.

O modelo proposto por Chrastil (1988) pode ser visto na equação 11.

$$P = P_{\infty}[1 - \exp(-k'E_0t)]^n \quad (11)$$

Onde: P e P_{∞} são os produtos que se difundem no tempo e no equilíbrio, respectivamente, k' é a constante de velocidade proporcional ao coeficiente de difusão, E_0 é a concentração de enzima inicial e n é a constante estrutural de resistência difusional dependente da estrutura estérica do sistema.

Quando a resistência difusional é baixa, n tende a 1. Se o sistema é fortemente limitado pela difusão, n é pequeno (0,5-0,6).

Carrillo et al. (2005), além de utilizarem o modelo de MM modificado, também aplicaram o modelo de Chrastil. Os parâmetros obtidos permitiram identificar características importantes a respeito da adsorção e difusão interna das enzimas no substrato sólido.

Carvalho et al. (2013) avaliaram também a aplicação do modelo de Chrastil na modelagem da hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar explodido a vapor ou pré-tratado com H_2SO_4 1%, seguido de deslignificação com NaOH 4%. Em relação ao bagaço explodido a vapor, concentrações de substrato abaixo de 3,85% ($m_{\text{celulose}}/V_{\text{reação}}$) fizeram com que a resistência difusional interna não limitasse a velocidade global de reação: valores do parâmetro n próximos de 1. Para concentrações maiores, o efeito da resistência à adsorção e à difusão interna foram mais pronunciados.

CAPÍTULO 3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Biomassa lignocelulósica – Palha de cana-de-açúcar

A palha de cana-de-açúcar *in natura* utilizada neste trabalho foi proveniente da Usina Itapira, localizada na cidade de Catanduva, SP. O material, depois de seco em temperatura ambiente, foi moído a 5 mesh, separado em sacos plásticos e armazenado em freezer para evitar possíveis contaminações.

Neste trabalho considera-se palha como sendo uma mistura de folhas verdes, secas e ponteiras.

3.2 Enzima

Para a realização dos experimentos de hidrólise enzimática utilizou-se o complexo enzimático comercial Cellic[®]CTec2, doado pela Novozymes[®]. De acordo com o catálogo do fabricante, o complexo enzimático é formado por uma mistura de celulases, com alta carga de β -glicosidase, além de apresentar hemicelulases.

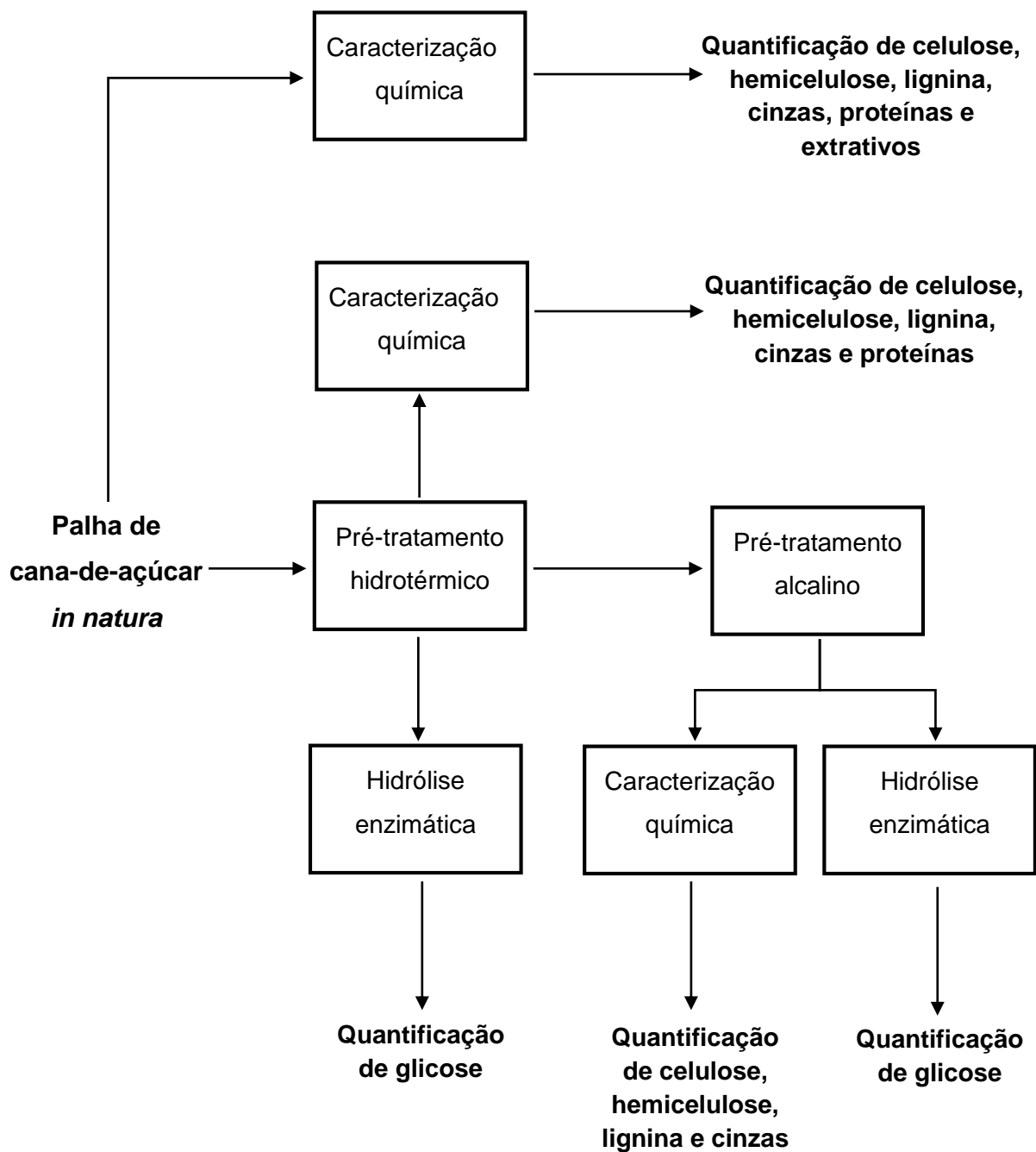
Esse complexo enzimático possui melhor estabilidade operacional em uma faixa térmica de 45 a 50°C e pH 5,0 a 5,5.

3.3 Procedimento experimental

Neste trabalho foi realizado pré-tratamento hidrotérmico da palha de cana-de-açúcar seguida ou não de pré-tratamento alcalino. Após essa etapa, as amostras de palha pré-tratadas foram submetidas à hidrólise enzimática sob diversas condições operacionais.

A Figura 3.1 sintetiza, em um fluxograma, todas as etapas envolvidas na parte experimental do trabalho.

Figura 3.1 – Fluxograma das etapas envolvidas no trabalho experimental



Fonte: Acervo pessoal

3.4 Pré-tratamento hidrotérmico da palha de cana-de-açúcar

A palha de cana-de-açúcar *in natura* foi inicialmente pré-tratada para a remoção de hemicelulose e lignina.

Para a aplicação do pré-tratamento hidrotérmico foi utilizado o reator modelo 4532 (Parr Instrument Company, Moline, Illinois, EUA). Antes de iniciar o pré-tratamento, a palha de cana-de-açúcar *in-natura* foi moída a 18 mesh e a sua umidade determinada. Em seguida, foi adicionada ao reator e misturada com água na proporção 1:10 ($m_{\text{palha seca}}/m_{\text{água}}$), sendo submetida a 195°C/10 minutos e 200 rpm. As condições operacionais utilizadas para a realização do pré-tratamento foram determinadas previamente pelo grupo de pesquisa em Engenharia Bioquímica do DEQ/UFSCar, sendo elas consideradas como as melhores condições de trabalho para o pré-tratamento hidrotérmico da palha de cana-de-açúcar (SOUZA; CRUZ, 2013).

Ao final da reação a fração sólida foi separada por filtração e lavada com água, para remoção dos componentes solubilizados.

Para determinar a porcentagem de massa que foi solubilizada após o pré-tratamento, calculou-se o rendimento mássico através da equação 12:

$$R = \left(\frac{m_{\text{final}}}{m_{\text{inicial}}} \right) \cdot 100 \quad (12)$$

Onde: m_{inicial} é a massa inicial seca de material lignocelulósico, em (g);

m_{final} : é a massa final seca de material lignocelulósico, em (g);

R: rendimento mássico (%)

Depois de realizado o pré-tratamento, coletaram-se amostras de palha pré-tratada para a caracterização química.

3.5 Pré-tratamento alcalino da palha de cana-de-açúcar pré-tratada hidrotermicamente

Amostras de palha de cana-de-açúcar pré-tratada foram submetidas a pré-tratamento alcalino com NaOH 4% (m/v) a fim de promover uma maior remoção de lignina da biomassa (deslignificação).

A condição de reação empregada foi a seguinte: 75 g de palha pré-tratada hidrotermicamente (base seca) misturadas com 1,5 L de NaOH 4%, sempre mantendo a razão sólido/líquido 1:20 ($m_{\text{palha seca}}:V_{\text{NaOH 4\%}}$). A suspensão foi adicionada em frascos de Erlenmeyers de 2L e autoclavada por 30 minutos a 121°C e 1 atm.

Após o término da reação, a palha foi lavada com água (temperatura ambiente) até obter pH próximo ao pH utilizado na etapa de hidrólise.

3.6 Caracterização da palha de cana-de-açúcar

Amostras de palha *in natura*, pré-tratada e deslignificada foram caracterizadas quanto a sua composição química de acordo com os procedimentos analíticos descritos por Rocha et al. (1997) e Gouveia et al. (2009). Foram determinados os teores de umidade, cinzas, extrativos, carboidratos, ácidos orgânicos, furfural, hidroximetilfurfural, lignina solúvel e insolúvel.

Para determinação de proteínas, utilizou-se o método de nitrogênio Kjeldahl total.

3.6.1 Determinação de umidade das amostras de palha

A umidade das amostras de palha foi determinada através do medidor de umidade modelo ID50 (Marte Balanças e Aparelhos de Precisão Ltda), a 100°C, em modo automático.

3.6.2 Determinação do teor de extrativos

A determinação do teor de extrativos foi realizada somente para amostras de palha *in natura*, visto que durante o pré-tratamento os extrativos são solubilizados.

O procedimento de determinação de extrativos foi baseado no protocolo proposto pelo National Renewable Energy Laboratory (NREL), “Determination of Extractives in Biomass” (SLUITER et al., 2008). Além da quantificação dos extrativos, esta etapa tem como finalidade remover os componentes não estruturais (ceras, clorofila, nitratos / nitritos e proteínas) da biomassa antes da quantificação de lignina e dos carboidratos, para que não haja interferência nestas etapas analíticas.

Uma quantidade conhecida de palha *in natura* foi adicionada em um cartucho e colocada em um sistema de extração (Soxhlet – Diogolab). Em um balão extrator foram adicionados 400 mL de etanol 95%. Os balões foram colocados no extrator e o aquecimento foi ajustado para fornecer um ciclo mínimo de 6 sifões por hora. O sistema de extração ficou ligado até que não houvesse mais extração (líquido incolor). O álcool contendo os extrativos foi colocado em um rotaevaporador na temperatura de 50°C, até evaporação total do solvente.

A massa de palha remanescente no cartucho foi colocada em uma placa de Petri, previamente tarada, e deixada em capela ligada até se obter massa constante.

O percentual de extrativos contidos na biomassa pode ser calculado de duas maneiras: por diferença de massa do balão extrator com extrativos e sem extrativos e por diferença de massa do cartucho antes e depois de realizada a extração, conforme equações 13 e 14, respectivamente.

$$\% \text{ Extrativos} = \left(\frac{m_{\text{balão com extrativo}} - m_{\text{balão sem extrativo}}}{m_{\text{palha seca adicionada}}} \right) \cdot 100 \quad (13)$$

Ou

$$\% \text{ Extrativos} = \left(\frac{m_{\text{cartucho com extrativo}} - m_{\text{cartucho sem extrativo}}}{m_{\text{palha seca adicionada}}} \right) \cdot 100 \quad (14)$$

3.6.3 Hidrólise ácida da palha de cana-de-açúcar

Inicialmente, em um tubo de ensaio foram adicionados 10 mL de ácido sulfúrico 72% (v/v) e este colocado em banho termostaticado a 45°C.

Amostras de 1 g (massa seca) de palha *in natura* sem extrativos e palha pré-tratada (moídas a 20 mesh) foram transferidas para béqueres de 100 mL. O ácido sulfúrico contido no tubo de ensaio foi transferido para o béquer contendo a amostra. Em seguida, macerou-se vigorosamente, em um banho termostaticado a 45°C, a mistura de palha com ácido, durante 7 minutos. Adicionaram-se 50 mL de água destilada ao béquer a fim de diminuir a velocidade de reação. O conteúdo foi transferido para um Erlenmeyer de 500 mL e, por fim, adicionou-se 225 mL de água destilada para se obter a concentração de H₂SO₄ a 3%. Os Erlenmeyers foram fechados com papel alumínio e autoclavados por 30 min a 121°C.

Após a descompressão da autoclave, os Erlenmeyers foram retirados e resfriados a temperatura ambiente. O conteúdo foi filtrado em papel de filtro qualitativo (previamente, pesado e seco em estufa a 100°C) diretamente em um balão volumétrico de 500 mL, o qual teve o seu volume completado com água de lavagem do material retido no filtro.

A solução contida no balão volumétrico foi armazenada para posteriores análises de carboidratos, ácidos orgânicos, furfural, hidroximetilfurfural e lignina solúvel. A fração sólida retida no papel filtro foi lavada com 2,0 L de água destilada, tomando-se o cuidado de lavar bem as bordas do papel para posterior determinação de lignina insolúvel e cinzas da lignina.

3.6.4 Determinação de lignina solúvel

Uma alíquota de 5 mL da fração líquida do material hidrolisado com ácido sulfúrico 72% foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL e adicionado 1,5 mL de NaOH 6,5 N, completando-se o volume com água destilada. A lignina foi quantificada por espectroscopia na região do UV em espectrofotômetro UV-visível Ultrospec-2000, através da medida de absorbância a 280 nm utilizando cubeta de quartzo.

O cálculo da lignina solúvel foi determinado conforme a equação 15:

$$C_{lig} = 4,187 \cdot 10^{-2}(A_T - A_{pd}) - 3,279 \cdot 10^{-4} \quad (15)$$

Onde: C_{lig} : concentração de lignina solúvel (g/L); A_T : absorvância da solução de lignina junto com os produtos de degradação.

$A_{pd} = c_1 \cdot \epsilon_1 + c_2 \cdot \epsilon_2$ – absorvância dos produtos de decomposição dos açúcares (furfural e HMF), cujas concentrações c_1 e c_2 foram determinadas previamente por CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) e ϵ_1 e ϵ_2 são as absorvâncias e valem, respectivamente, 146,85 e 114,00 L g⁻¹.cm⁻¹.

3.6.5 Determinação de carboidratos, ácidos orgânicos, furfural e hidroximetilfurfural

Para a determinação de carboidratos e ácidos orgânicos, o hidrolisado foi previamente filtrado em filtros Sep-Pak C₁₈ (Waters) a fim de remover compostos fenólicos que pudessem interferir na análise. Os produtos foram quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em um cromatógrafo Shimadzu LC-10AD, empregando um detector de índice de refração modelo RID-10A. A separação dos carboidratos e ácidos orgânicos foi realizada em uma coluna Aminex HPX87H (300 x 7,8 mm, Bio-Rad Laboratories Ltda), utilizando como fase móvel ácido sulfúrico 5 mM a uma vazão de 0,6 mL.min⁻¹ e temperatura do forno de 45°C.

Para a construção das curvas de calibração dos carboidratos e ácidos orgânicos, foram injetadas no cromatógrafo líquido padrão de celobiose, glicose, xilose, arabinose, ácido acético, ácido fórmico e ácido glucurônico.

Na determinação de furfural e hidroximetilfurfural foi utilizada uma coluna μ -Bondapack C-18 (5 μ m) de 125 x 4 mm (Hewlett-Packard), empregando como fase móvel solução de acetonitrila com água na proporção de 1:8 e 1% de ácido acético, em vazão de 0,8 mL.min⁻¹ e temperatura do forno de 25°C. Os compostos foram detectados em comprimento de onda de 276 nm, por um detector UV-visível Shimadzu SPD-10.

Os compostos detectados nas análises de carboidratos, ácidos orgânicos, furfural e hidroximetilfurfural são:

- glicose, ácido fórmico, celobiose, hidroximetilfurfural (provenientes da fração hidrolisada de celulose).
- xilose, arabinose, ácido glucurônico, ácido acético e furfural (provenientes da fração de hemicelulose).

3.6.6 Determinação de lignina insolúvel

A lignina insolúvel foi determinada de acordo com o método Klason, modificado por Rocha et al. (1997). O papel filtro contendo a fração sólida foi transferido para um pesa filtro previamente tarado e colocado em estufa a 105°C até massa constante.

A porcentagem de lignina insolúvel foi calculada em relação à massa de amostra seca conforme a equação 16:

$$\% Lig_{insol} = \frac{M_{lig\ insol} - M_{cinzas}}{M_{amostra\ seca}} \quad (16)$$

Onde: $M_{lig\ insol}$: massa de lignina insolúvel seca; M_{cinzas} : massa de cinzas; $M_{amostra\ seca}$: massa da amostra seca.

3.6.7 Determinação das cinzas da lignina

Os materiais resultantes da etapa de determinação da lignina insolúvel foram colocados em cadinhos de porcelana previamente calcinados e tarados. A amostra foi calcinada a 300°C por 30 minutos e, em seguida, a 800°C por 2 horas. Por diferença de massa, o teor de cinzas da lignina insolúvel foi determinado conforme a equação 17:

$$\% Cinzas = \frac{M_{cinzas}}{M_a} \quad (17)$$

Onde: % cinzas: percentual em massa de cinzas na lignina; M_{cinzas} : massa de cinzas (diferença entre a massa do cadinho com cinzas e a massa do cadinho vazio); M_a : massa da amostra seca.

3.6.8 Determinação de cinzas totais

Na determinação das cinzas totais, pesaram-se aproximadamente 2 g de palha em cadinho de porcelana previamente tarado. A amostra foi calcinada a 300°C por 30 minutos e, em seguida, a 800°C por 2 horas. Por diferença de massa, o teor de cinzas totais foi determinado conforme a equação 18:

$$\% \text{ Cinzas}_{\text{totais}} = \frac{M_{\text{cinzas totais}}}{M_a} \quad (18)$$

Onde: $M_{\text{cinzas totais}}$: diferença entre a massa do cadinho com cinzas e a massa do cadinho vazio; M_a : massa da amostra seca.

3.6.9 Determinação de proteínas

O teor de proteínas na palha de cana-de-açúcar *in natura* e pré-tratada foi determinado de acordo com o método de nitrogênio Kjeldahl total (GALVANI; GAERTNER, 2006). Essa técnica possibilita a determinação indireta de proteínas.

O método de Kjeldahl consiste nas seguintes etapas:

- Primeira etapa – digestão da amostra: esta etapa consiste na digestão completa das amostras com ácido sulfúrico concentrado na presença de catalisadores (sulfato de cobre e sulfato de potássio) que aceleram a oxidação da matéria orgânica. Em tubos de digestão foi adicionado 1g de catalisador (CuSO_4 : K_2SO_4 1:10 m/m) e aproximadamente 400 mg de palha. Em seguida, foram adicionados 10 mL de H_2SO_4 concentrado “P.A.”. Os tubos de digestão foram colocados em um bloco digestor, permanecendo por 2,5 h a 250°C.

- Segunda etapa – destilação: Após a digestão e resfriamento da amostra inicia-se o processo de destilação. Os tubos contendo as amostras digeridas foram colocados em um destilador (BUCHI 323). Em seguida, adicionaram-se NaOH 10 mol.L⁻¹ até que a amostra ficasse com a coloração preta. Durante o processo de destilação ocorre um desprendimento de amônia que é então coletada em um frasco de Erlenmeyer contendo 100 mL de ácido bórico 20 g.L⁻¹ e 3 gotas de indicador misto. Este processo termina quando toda a amônia já se despreendeu da amostra digerida (aproximadamente 6 minutos). À medida que a amônia entra em contato com a solução de ácido bórico, que antes se apresentava com coloração rósea, vai se formando borato de amônio, de coloração azulada (NH₄H₂BO₃).
- Terceira etapa – titulação: a última etapa corresponde à titulação. A solução de borato de amônio é titulada com uma solução padronizada de HCl 0,01 mol.L⁻¹ até a viragem do indicador (coloração roxa). O volume gasto na titulação foi utilizado para o cálculo do nitrogênio total das amostras.
- Quarta etapa – Quantificação de nitrogênio total e proteínas: Para a determinação de nitrogênio total foi utilizada a equação 19:

$$C_{NT} = \frac{V_{HCl} \cdot C_{HCl} \cdot 14}{m_{amostra}} \quad (19)$$

Onde:

C_{NT}: teor de nitrogênio total na amostra (g/g);

V_a: volume de HCl gasto na titulação da amostra (mL);

14: massa molecular do nitrogênio (g/mol);

m_{amostra}: massa da amostra (g)

Na determinação da proteína bruta, multiplica-se o valor do nitrogênio total encontrado pelo método de Kjeldahl por um fator que converte o nitrogênio em proteína, como mostrado na equação 20:

$$Proteína (\%) = C_{NT} \cdot 6,25 \quad (20)$$

Onde:

6,25: Fator de conversão de nitrogênio total para nitrogênio proteico.

3.7 Determinação da atividade enzimática total das celulases

Antes de iniciar o estudo empregando a enzima Cellic[®]CTec2, fez-se necessário uma análise de determinação da atividade enzimática desta enzima.

O procedimento de determinação da atividade enzimática das celulases seguiu as diretrizes da IUPAC, descrita por Ghose (1987), o qual se baseia em encontrar a concentração de uma solução de enzima de interesse que libere 2,0 mg de açúcares redutores a partir da hidrólise de 50 mg de papel filtro Whatman nº 1, durante 60 minutos de reação. A atividade enzimática das celulases é medida como atividade em papel filtro de celulose e expressa em unidades de papel filtro – FPU (Filter Paper Units) por volume de enzima.

Primeiramente, preparou-se uma solução estoque de enzima diluída (1:50 – v/v) em tampão citrato 50 mM, pH 4,8. Partindo desta solução, efetuou-se 4 novas diluições de enzima. Para o branco do espectro, destinado ao controle da análise espectrofotométrica, adicionou-se em um tubo 1,5 mL de tampão citrato, e para o branco da enzima, destinado a identificar interferências advindas da enzima, adicionou-se 1,0 mL de tampão de citrato e 0,5 mL da enzima diluída. Para cada diluição de enzima foi preparado um branco de enzima com sua respectiva diluição.

Em diferentes tubos de Folin Wu, adicionou-se 1,0 mL de tampão citrato 50 mM, pH 4,8. Na sequência, foram adicionados 0,5 mL da solução de enzima previamente diluída. Em seguida, todos os tubos foram colocados em um shaker agitado (Marconi MA-832) sob temperatura de 50°C. Depois de atingida a temperatura, adicionou-se a cada tubo (exceto branco do espectro e branco da enzima) uma tira de papel filtro Whatman nº 1, de dimensão equivalente a 50 mg (aproximadamente 1,0 x 6,0 cm), de forma que a tira de papel ficasse totalmente submersa pela solução tampão + enzima.

Em resumo, os conjuntos de tubos foram preparados da seguinte maneira:

- Branco do espectro: 1,5 mL de tampão citrato
- Branco da enzima: 1,0 mL de tampão citrato + 0,5 mL de enzima diluída
- Amostra: 1,0 mL de tampão citrato + 0,5 mL de enzima diluída + papel filtro

Após o término do tempo de incubação, cada tubo foi removido do shaker. Adicionaram-se 3,0 mL de reagente de DNS (ver item 3.8), agitou-se e colocou os tubos em um banho fervente por 5 minutos, para desativação da enzima. Em seguida, os tubos foram inseridos em um banho de gelo até temperatura ambiente. Por fim, adicionou-se água destilada até o menisco de 25 mL dos tubos e agitou-se de maneira que a solução ficasse bem homogênea. As amostras foram conduzidas para medida de absorbância em espectrofotômetro a 540 nm (modelo 2000, Pharmacia Biotech).

Pedaços de papel filtro podem ficar suspensos na solução e interferir na leitura de absorbância. Nestas situações, aconselha-se centrifugar a amostra até que o papel fique totalmente decantado.

Para a quantificação dos açúcares redutores liberados durante a reação construiu-se uma curva padrão de glicose vs. absorbância. Foi preparada uma solução estoque de glicose de 10 g.L⁻¹ e então diferentes diluições de glicose foram feitas: 6,7; 5,0; 3,3 e 2,0 g.L⁻¹. Em diferentes tubos adicionaram-se 1,0 mL de tampão citrato e 0,5 mL do padrão de glicose. A partir desse ponto, seguiu-se o mesmo procedimento utilizado para as amostras. Com a equação da reta ajustada, determinaram-se os valores de glicose liberada em cada amostra.

Em seguida, estimou-se a concentração de enzima necessária para liberar exatamente 2,0 mg de glicose, plotando-se a quantidade de glicose liberada em 0,5 mL vs. logaritmo da concentração de enzima $\left(\frac{1}{\text{diluição da enzima}}\right)$. Com o valor de concentração de enzima obtido, calculou-se a atividade enzimática de acordo com a equação 21:

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

A unidade de FPU é baseada na Unidade Internacional (IU):

1 IU = 1 μmol.min⁻¹ de substrato convertido = 0,18 mg.min⁻¹ quando o produto for glicose.

A quantidade de glicose liberada (2 mg) por 0,5 mL de enzima em 60 minutos é correspondente a uma atividade enzimática em FPU de:

$$2 \text{ mg glicose} = \frac{2}{0,18.0,5.60 (\mu\text{mol min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1})} = 0,37 \mu\text{mol min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1} (\text{IU mL}^{-1})$$

3.8 Quantificação dos açúcares redutores

Açúcares redutores são aqueles que possuem grupos carbonílicos e cetônicos livres, que em solução básica formam algum aldeído. Exemplos de açúcares redutores são a glicose, maltose, frutose e lactose.

Para a determinação dos açúcares redutores totais, utilizou-se a metodologia proposta originalmente por Miller (1959), fazendo o uso do reagente DNS.

O método baseia-se na redução, em meio alcalino, do ácido dinitro 3,5 salicílico a ácido amino 3,5 nitrosalicílico, ao mesmo tempo em que o grupo aldeído do açúcar é oxidado a grupo carboxílico. O reagente DNS apresenta uma coloração laranjada, que ao se misturar com uma solução contendo açúcares redutores produz diferentes tonalidades de vermelho-alaranjado, com absorvância em comprimento de onda de 540 nm.

O reagente DNS foi preparado dissolvendo-se 5 g de ácido 3,5 dinitrosalicílico em 100 mL de NaOH (2M). Misturou-se 150 g de tartarato duplo de sódio e potássio com 250 mL, sendo essa mistura aquecida até completa dissolução. Em seguida, as duas soluções foram misturadas e completou-se com água destilada o volume para 500 mL. Por fim, aqueceu-se a solução de DNS em banho Maria a 40°C até que houvesse completa dissolução dos reagentes.

A quantificação dos açúcares redutores totais foi realizada de acordo com o procedimento descrito no item 3.7.

3.9 Hidrólise enzimática da palha de cana-de-açúcar

Amostras de palha pré-tratada hidrotermicamente, seguida ou não de pré-tratamento alcalino, foram submetidas à hidrólise enzimática para a conversão de

celulose em monômeros de glicose. Todos os experimentos foram realizados em frascos de Erlenmeyers de 250 mL, com volume total de reação de 50 mL, colocados em shaker agitado (modelo 832, Marconi). Durante cada ensaio experimental foram retiradas alíquotas armazenadas em NaOH 0,2 M, na proporção 300 μ L NaOH:400 μ L amostra, para inativação da enzima. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

A fim de otimizar as condições operacionais da hidrólise e estudar a cinética da reação, foi feito o estudo da influência da velocidade de agitação do meio reacional, pH, temperatura, concentração de substrato e concentração de enzima.

Para a palha pré-tratada hidrotermicamente realizou-se o estudo das variáveis operacionais pH, temperatura, velocidade de agitação, concentração de substrato e de enzima. Já para a palha deslignificada estudou-se somente o efeito da concentração de enzima e substrato.

3.9.1 Efeito da agitação

Para avaliar a influência da agitação foram realizados experimentos em triplicata nas seguintes condições operacionais: temperatura de 50°C, pH 5 (tampão citrato de sódio 50 mM), concentração de substrato de 10% de sólidos ($m_{\text{palha seca}}/V_{\text{reação}}$) e concentração de enzima de 5 FPU.g_{celulose}⁻¹, variando a agitação em 0, 50, 150, 200, 250 e 300 rpm. A hidrólise enzimática foi avaliada nos tempos de velocidades iniciais de reação.

3.9.1.1 Determinação das velocidades iniciais de reação

As velocidades iniciais foram obtidas a partir do coeficiente angular da reta ajustada aos valores experimentais dos gráficos construídos com as concentrações de glicose em função do tempo. Vale ressaltar que tais velocidades eram determinadas considerando-se a região linear da formação de produto em função do tempo, ou seja, um máximo de 5 a 10 % de conversão do substrato inicialmente adicionado ao meio reacional.

Para que fosse possível determinar o tempo necessário de conversão dentro da região linear de formação de produto, foram utilizados kits enzimáticos colorimétricos para determinação de glicose. O método de quantificação de glicose está descrito detalhadamente no item 3.10.

3.9.2 Efeito do pH

Para avaliar o efeito do pH na atividade enzimática da Cellic[®]CTec2 durante a hidrólise enzimática da palha de cana-de-açúcar, foram preparadas soluções tampão em diferentes pH: 3, 4, 5, 6 e 7. Para pH de 3 a 6 utilizou-se tampão citrato de sódio 50 mM e para pH 7 utilizou-se tampão fosfato de sódio.

Os ensaios foram conduzidos a 50°C em shaker agitado a 250 rpm e 10% de carga de sólidos (m/v). O pH foi avaliado em 3, 4, 5, 6 e 7 e os experimentos conduzidos até o instante em que aproximadamente 10% do substrato fosse convertido em glicose.

3.9.2.1 Determinação da atividade enzimática em diferentes pH's

A atividade da Cellic[®]CTec2 foi determinada medindo-se a velocidade inicial da hidrólise da celulose à glicose. Os experimentos foram conduzidos até o instante em que 10% do substrato fossem convertidos em glicose, ou seja, considerou-se somente a região linear da formação de glicose. A quantificação de glicose formada e a determinação da velocidade inicial de reação foram realizadas conforme descrito nos itens 3.10 e 3.9.1.1, respectivamente.

Uma unidade internacional (UI) é definida como a quantidade de enzima capaz de catalisar a formação de 1 µmol de glicose por minuto.

A atividade enzimática foi determinada a partir da equação 22:

$$A = \frac{\frac{\Delta P}{\Delta t} \cdot V_{reação}}{MM_{glicose} \cdot V_{enzima}} \quad (22)$$

Onde: A é a atividade enzimática em UI/mL de enzima, $\frac{\Delta P}{\Delta t}$ é a velocidade inicial em g/L.min, V_{enzima} é o volume de enzima adicionado ao meio reacional em ml, $V_{reação}$ é o volume reacional em ml e $MM_{glicose}$ é a massa molar de glicose.

3.9.3 Efeito da temperatura

Foram avaliadas três diferentes temperaturas: 40, 50 e 60°C. A agitação e o pH do meio reacional foram escolhidos de acordo com os melhores resultados obtidos nos estudos da influência da agitação e do pH.

Para o estudo das velocidades iniciais de reação, utilizou-se uma carga enzimática de 5 FPU.g_{celulose}⁻¹ e uma carga de sólidos de 10% (m_{palha seca}/v_{reação}). Já para o estudo em longos tempos de reação, a carga enzimática foi dobrada para 10 FPU.g_{substrato}⁻¹, mantendo-se a mesma concentração de substrato. Alíquotas foram coletadas em tempos de reação de 1 a 96 horas.

3.9.4 Efeito da concentração de substrato

O efeito da concentração de substrato foi avaliado variando a concentração de sólidos em 2,5; 5; 7,5 e 10% (m_{palha seca}/v_{reação}). Manteve-se constante a concentração volumétrica de enzima em 290 FPU.L_{solução}⁻¹, para ensaios de velocidade inicial. Em ensaios de longos tempos de reação a concentração volumétrica de enzima foi de 580 FPU.L_{solução}⁻¹ para palha pré-tratada hidrotermicamente e 828 FPU.L_{solução}⁻¹ para a palha deslignificada. A quantidade de enzima foi aumentada em ensaios de longa duração a fim de fornecer um perfil de hidrólise com elevados níveis de produção de glicose em um tempo razoável de reação.

Os valores para agitação, pH e temperatura foram estipulados de acordo com a melhor resposta obtida nos estudos da influência da agitação, pH e temperatura, respectivamente.

3.9.5 Efeito da concentração de enzima

O estudo da influência da concentração da enzima na conversão de celulose foi avaliado variando a carga de enzima de 5 a 80 FPU.g_{celulose}⁻¹, correspondendo a 1,64 a 29,52 g_{enzima}.L_{solução}⁻¹, mantendo-se uma carga fixa de sólidos de 10% (m_{palha seca}/V_{reação}).

As outras variáveis fixadas para esse processo foram: pH, velocidade de agitação e temperatura, tomando como base os valores que obtiverem a maior produção de glicose para o estudo de cada variável.

3.10 Quantificação de glicose

A variável resposta para determinar as melhores condições operacionais é a concentração de glicose produzida durante a hidrólise.

Para a quantificação de glicose das amostras colhidas na etapa de hidrólise, utilizou-se um kit enzimático (GOD-PAP) pronto para uso e também uma solução padrão de glicose 100 mg.dL⁻¹.

Em Eppendorfs, foram adicionados 10 µL de amostra e 1 mL do reagente. A mistura foi aquecida em banho termostático a 37 °C durante 10 minutos, para que houvesse a completa reação de oxidação enzimática da glicose. Em seguida, as absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro a 505 nm (modelo 2000, Pharmacia Biotech).

Para a construção da curva de calibração, foi preparada uma solução padrão de glicose de 2,00 g·L⁻¹ e a partir daí diferentes diluições de glicose foram realizadas: 0,25; 0,50; 1,00 e 2,00 g·L⁻¹. A partir da equação da reta ajustada, calculou-se a concentração de glicose em cada amostra.

Quando necessário, foram feitas diluições nas amostras para possibilitar a leitura, visto que a absorbância é linear, segundo o fabricante, até 500 mg/dL.

3.11 Modelagem matemática da hidrólise enzimática da palha de cana-de-açúcar

O ajuste de modelos aos dados experimentais de hidrólise enzimática da palha de cana-de-açúcar foi possível através da utilização de dois diferentes softwares: OriginPro 8.0 e Fortran.

O OriginPro 8.0 foi utilizado para os ajustes não lineares dos dados experimentais aos modelos de Michaelis-Menten e Chrastil. Enquanto que o Fortran foi utilizado para ajuste do parâmetro de inibição do modelo de Michaelis-Menten com inibição competitiva pelo produto. A ferramenta de ajustes não lineares do OriginPro 8.0 faz uso do algoritmo clássico de Levenberg Marquardt aplicável ao ajuste de equações algébricas (LEVENBERG, 1944). Já o programa em Fortran, além do algoritmo de Marquardt, também faz uso de integração de equações diferenciais ordinárias pelo método de Runge- Kutta.

CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização da palha *in natura*

Inicialmente, a palha *in natura* foi caracterizada quanto à sua composição química, de acordo com o procedimento descrito no item 3.6.

Os valores obtidos na caracterização química da palha *in natura* estão apresentados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Composição química da palha *in natura*.

Componente	Palha <i>in natura</i> (%)
Celulose	34,7 ± 0,5
Hemicelulose	24,3 ± 0,7
Lignina	20,2 ± 0,4
Cinzas	8,7 ± 0,3
Proteínas	2,68 ± 0,03
Extrativos	10,3 ± 0,3

A fim de comparação, a Tabela 4.2 reúne os resultados obtidos para a quantificação química da palha neste trabalho e por outros autores.

Resultados elevados para o teor de extrativos também foram obtidos por De Carvalho et al. (2014) e Santos et al. (2014), que realizaram extração com álcool: tolueno (1:2), álcool 95% e água quente nesta ordem de polaridade, enquanto que neste trabalho a extração foi realizada somente com álcool 95%.

De Carvalho et al. (2014) também encontraram um valor elevado de cinzas (7,91%). Grande parte do percentual de cinzas provém das sílicas presentes na biomassa e, geralmente, a palha localizada próxima ao solo apresenta concentração de cinzas em torno de 7 a 8%. Por outro lado, palhas oriundas do meio da cana apresentam quantidade de cinzas em torno de 2 a 3% (SANTOS et al., 2014).

De modo geral, a composição química da palha obtida no presente estudo apresentou-se bastante similar aos valores reportados por Szczerbowski et al., (2014).

Tabela 4.2 – Tabela comparativa dos resultados da composição química da palha de cana-de-açúcar encontrada por diversos autores.

Composição química (%)					Referência
Celulose	Hemicelulose	Lignina	Cinzas	Extrativos	
34,75	24,32	20,17	8,75	10,33	Este estudo
40,80	26,00	24,79	4,92	-	Barros et al., 2013
33,50	27,10	25,80	2,50	-	Costa et al., 2013
41,40	34,08	16,20	7,91	12,20	De Carvalho et al., 2014
29,25	30,34	29,90	2,67	8,41	Moutta et al., 2014
38,10	29,20	24,20	2,50	5,90	Oliveira et al., 2014
44,26	31,10	19,01	4,86	16,68	Santos et al., 2014
33,77	27,38	21,28	6,23	7,02	Szczerbowski et al., 2014

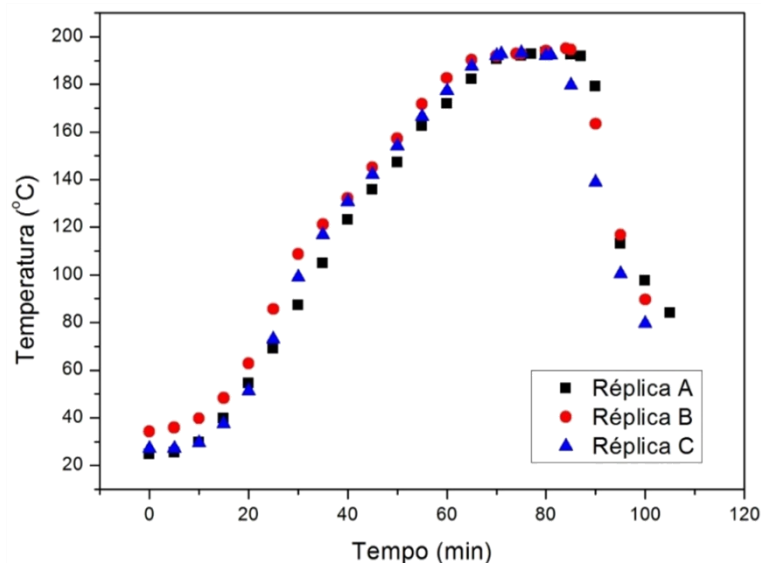
Deve-se lembrar que tanto os resultados obtidos neste trabalho quanto os reportados na literatura não podem ser considerados errôneos. São verificadas variações na composição química para a mesma espécie vegetal devido a diversos fatores, tais como: idade da biomassa, características do solo onde a cana foi cultivada, condições climáticas, modo e local de armazenamento. Além disso, metodologias diferentes podem ser empregadas na caracterização química da biomassa, as quais podem resultar em valores com alguma divergência para celulose, hemicelulose, lignina, cinzas e extrativos.

4.2 Caracterização da palha pré-tratada hidrotêrmicamente seguida ou não de pré-tratamento alcalino com NaOH 4%

Amostras de palha *in natura* foram submetidas ao pré-tratamento hidrotérmico a 195 °C/10 minutos e 200 rpm. Parte da palha pré-tratada foi submetida a pré-tratamento alcalino com NaOH 4% (m/v) a 121°C por 30 min.

Na Figura 4.1 é possível observar o perfil de temperatura em função do tempo reacional do pré-tratamento hidrotérmico.

Figura 4.1 – Perfil de temperatura em função do tempo de pré-tratamento.



A partir da equação 01 descrita no item 2.4.1.1. foi possível calcular o fator de severidade (ver Tabela 4.3) do pré-tratamento.

$$\log(r_0) = \log \sum_{i=1}^n \left[t * \exp \left(\frac{T_i - T_{ref}}{14,75} \right) \right] \quad (01)$$

A Tabela 4.3 apresenta a composição química da palha *in natura*, pré-tratada hidrotermicamente, com e sem pré-tratamento alcalino, bem como suas remoções em relação a palha *in natura*.

Tabela 4.3 – Composição química da palha pré-tratada hidrotermicamente (PTH) seguida ou não de pré-tratamento alcalino (PTA) e suas respectivas remoções em relação a palha *in natura*.

Componente	Palha PTH (%)	Remoção (%)	Palha PTH + PTA (%)	Remoção (%)
Celulose	58,04	15,65	82,78	31,67
Hemicelulose	8,23	82,91	0,46	99,46
Lignina	24,98	37,46	5,71	91,88
Cinzas	5,54	31,97	8,09	73,48
Extrativos	-	100,00	-	100,00
Rendimento	50,50*	-	56,80*	-
Fator de severidade	4,15**	-	-	-

*Calculado de acordo com a equação 12

**Calculado de acordo com a equação 01

Os resultados indicam que o pré-tratamento hidrotérmico foi eficiente na remoção da hemicelulose (82,91%), com uma remoção pequena, mas considerável, de lignina (37,46%). A grande remoção de hemicelulose é um efeito característico de pré-tratamentos hidrotérmicos. A água penetra na biomassa atacando principalmente as ligações acetil, que por sua vez se degradam a ácido acético, aumentando a acidez do meio reacional bem como a própria degradação da hemicelulose.

Resultados semelhantes também foram encontrados por Oliveira et al. (2014) que realizaram pré-tratamento hidrotérmico na palha de cana-de-açúcar em 195°C/10 minutos alcançando uma remoção de 94,30% de hemicelulose, 36,34% de lignina e 22,13% de celulose, como pode ser visto na Tabela 4.4.

Tabela 4.4 – Comparação de pré-tratamentos hidrotérmicos.

Componente Perda/remoção (%)	Biomassa/Condições operacionais		
	Palha de cana (195°C/10 min) Este estudo	Palha de cana (195°C/10 min) Oliveira et al., 2014	Serragem de folha de tulipa (180-220°C/5-30 min) Kim et al., 2013
Celulose	15,65	22,13	Máx: 20,00
Hemicelulose	82,91	94,30	> 80,00
Lignina	37,46	36,34	Máx: 40,00

Kim et al. (2013) avaliaram o efeito de diferentes fatores de severidade (3,05-5,01) no pré-tratamento hidrotérmico de árvore de tulipa. Severidades entre 4,0 e 5,0 promoveram uma remoção de hemicelulose > 80%. A máxima remoção encontrada para a celulose não excedeu 20%, independente da severidade do pré-tratamento. Esta constante remoção de celulose em toda faixa de severidade pode ser devido ao fato de que partes das estruturas de celulose são amorfas, que são mais fáceis de serem degradadas. Isso levou à dissolução da celulose amorfa em temperaturas mais baixas. A severidade do pré-tratamento pode reduzir o índice de cristalinidade da celulose, porém sem promover sua solubilidade. Valores máximos de degradação de lignina (40%) foram obtidos em fatores de severidades entre 4,0 e 4,5.

Os resultados apresentados neste trabalho (Tabela 4.4) mostram grande coerência com os obtidos por Kim et al. (2013), tanto no fator de severidade, quanto na remoção de celulose, hemicelulose e lignina.

Para a palha deslignificada os resultados foram ainda mais satisfatórios. Praticamente toda a hemicelulose (99,5%) foi solubilizada, e grande parte da lignina também (91,88%), resultando em uma biomassa com aproximadamente 83% de celulose. Esses números são bastante atrativos quando se trata de hidrólise enzimática da celulose, visto que quase não há presença de outros componentes que possam impedir o acesso da enzima a celulose.

Oliveira et al. (2014) também realizaram deslignificação com NaOH 1% (m/v) a 100°C por 1h da palha pré-tratada hidrotermicamente (195°C/10 min). Os resultados obtidos foram: 27% de perda de celulose; 95% de remoção de hemicelulose e 74% de lignina. É notório que a deslignificação realizada por Oliveira et al. (2014) promoveu uma menor remoção de hemicelulose e lignina, em relação ao presente trabalho. Isso, provavelmente, se deve ao fato do NaOH estar menos concentrado (diferença de 3% m/v). Da mesma forma, para a celulose, o pré-tratamento com NaOH 1% (m/v) promoveu uma perda 5% menor em relação ao pré-tratamento com NaOH 4% (m/v).

4.3 Determinação da atividade enzimática total das celulasas

Antes de iniciar o estudo da hidrólise enzimática é necessário determinar a atividade enzimática das celulasas. O procedimento de determinação da atividade enzimática está descrito no item 3.7.

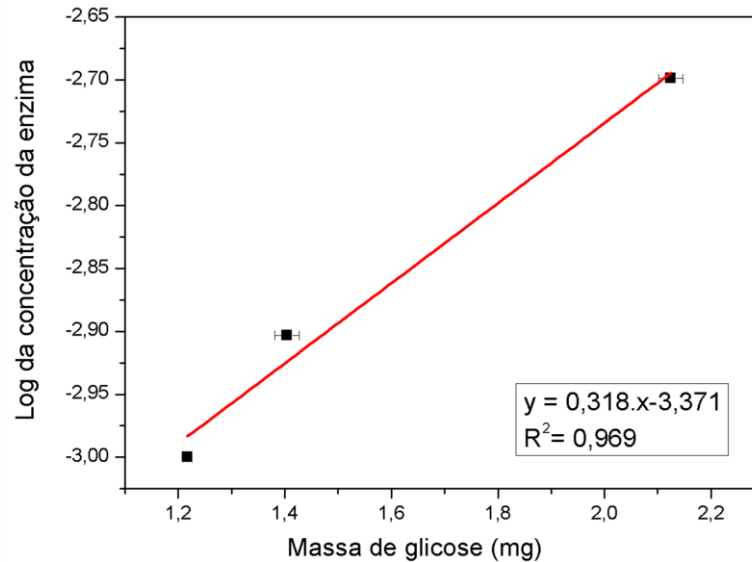
A Tabela 4.5 relaciona as diluições de enzima, suas respectivas concentrações, assim como a massa de glicose liberada durante a reação.

Tabela 4.5 – Valores da diluição da enzima, suas respectivas concentrações e glicose liberada.

Diluição da enzima	Concentração da enzima (mL _{enzima} /mL _{total})	Massa de glicose (mg)
1000	0,00100	1,22 ± 0,01
800	0,00125	1,40 ± 0,02
500	0,00200	2,12 ± 0,02

Com base nos dados da Tabela 4.5, construiu-se um gráfico (Figura 4.2) que relaciona a concentração da enzima em função da massa de glicose liberada.

Figura 4.2 – Log da concentração da enzima em função da concentração de glicose liberada por 0,5 mL da enzima celulase diluída.



Segundo Ghose (1987), uma unidade da atividade total das celulases (FPU), baseia-se na liberação de exatamente 2,0 mg de glicose, ou seja:

$$\text{Log [Concentração da enzima]} = 0,318 \cdot (2,0 \text{ mg glicose}) - 3,371$$

$$\text{Log [Concentração da enzima]} = -2,735$$

$$\text{Concentração da enzima} = 0,00184077$$

Finalmente, com o valor da concentração da enzima que libera exatamente 2,0 mg de glicose em 60 minutos de reação, a atividade do complexo enzimático é calculada a partir da equação 21:

$$FPU = \frac{0,37}{0,00184077} \text{ unidades mL}^{-1} = 201 \text{ FPU} \cdot \text{mL}^{-1}$$

O resultado está coerente com o valor reportado por Mendes; Rocha e Carvalho (2014), que encontraram uma atividade enzimática de 200 FPU.mL⁻¹ para a Cellic[®]CTec2.

A partir do valor obtido da atividade do complexo enzimático, foi possível calcular o volume necessário de enzima a ser adicionada em cada experimento de hidrólise.

4.4 Hidrólise enzimática

Neste item foi realizado o estudo de diversas variáveis envolvidas na reação de hidrólise enzimática da palha de cana-de-açúcar.

Os resultados obtidos foram úteis na identificação das melhores condições operacionais e na determinação de parâmetros cinéticos do modelo clássico de Michaelis-Menten e modificado, além do modelo de Chrastil.

4.4.1 Hidrólise enzimática da palha de cana-de-açúcar pré-tratada hidrotermicamente (PTH)

4.4.1.1 Efeito da agitação

Um estudo detalhado da influência da velocidade de agitação na cinética da hidrólise enzimática deve anteceder os de todas as outras variáveis operacionais, a fim de determinar a mínima velocidade de agitação que conduz a uma alta velocidade de difusão, evitando que o processo seja limitado pelos efeitos difusionais externos.

Na Tabela 4.6 encontram-se os valores de velocidades iniciais de reação de hidrólise para uma concentração de sólidos de 10% (m/v), concentração de enzima de 5 FPU.g_{celulose}⁻¹, pH 5, temperatura de 50°C, em agitações de 0, 50, 150, 200, 250 e 300 rpm. A Figura 4.3 reúne todos os valores da Tabela 4.6.

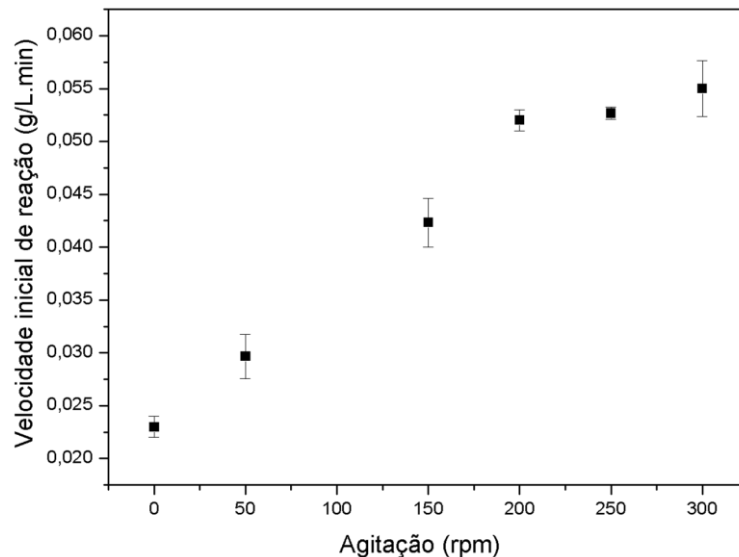
Todos os experimentos foram realizados em triplicata. As velocidades iniciais foram determinadas a partir do coeficiente angular da reta ajustada aos dados experimentais de concentração de glicose em função do tempo reacional,

considerando somente a região linear da formação de glicose, ou seja, até 10% de conversão do substrato. O procedimento de cálculo está descrito no item 3.9.1.1.

Tabela 4.6 – Velocidades iniciais de hidrólise enzimática da palha de cana-de-açúcar para diferentes agitações.

Agitação (rpm)	Velocidades iniciais ($\text{g}_{\text{glicose}} \cdot \text{L}_{\text{solução}}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)
0	$0,023 \pm 0,001$
50	$0,030 \pm 0,002$
150	$0,042 \pm 0,002$
200	$0,052 \pm 0,001$
250	$0,053 \pm 0,001$
300	$0,055 \pm 0,003$

Figura 4.3 – Velocidades iniciais de reação em função da velocidade de agitação para palha PTH. Concentração de substrato: 10% de sólidos (m/v), concentração de enzima: 5 $\text{FPU} \cdot \text{g}_{\text{celulose}}^{-1}$, pH 5, 50°C.



Através da Figura 4.3, observa-se que houve um aumento significativo na velocidade de reação com o aumento de agitação até 200 rpm, variando de 0,023 a 0,052 $\text{g}_{\text{glicose}} \cdot \text{L}_{\text{solução}}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, indicando que havia resistência ao transporte de massa externo, o qual foi minimizado com o aumento da velocidade de agitação.

Agitações acima de 200 rpm resultaram em velocidades de reação praticamente invariantes, podendo considerar a hipótese de que as limitações difusionais externas são desprezíveis face ao fenômeno de adsorção e reação na superfície do substrato, e que a partir dessa velocidade de agitação atingiu-se a velocidade máxima de reação ($V_{m\acute{a}x}$).

Desta forma, com o objetivo de minimizar gasto energético, efeitos difusionais externos e ocorrências de inativação da enzima devido ao cisalhamento, escolheu-se 200 rpm como a melhor velocidade de agitação, naquelas condições testadas, para dar sequência ao estudo cinético da hidrólise enzimática. Estudos realizados por Carvalho et al. (2013) mostraram que velocidades acima de 150 rpm resultaram em velocidades iniciais de reação praticamente iguais para a hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar em concentração de substrato de 9,1% ($m_{celulose} \cdot m_{total}^{-1}$).

4.4.1.2 Efeito do pH

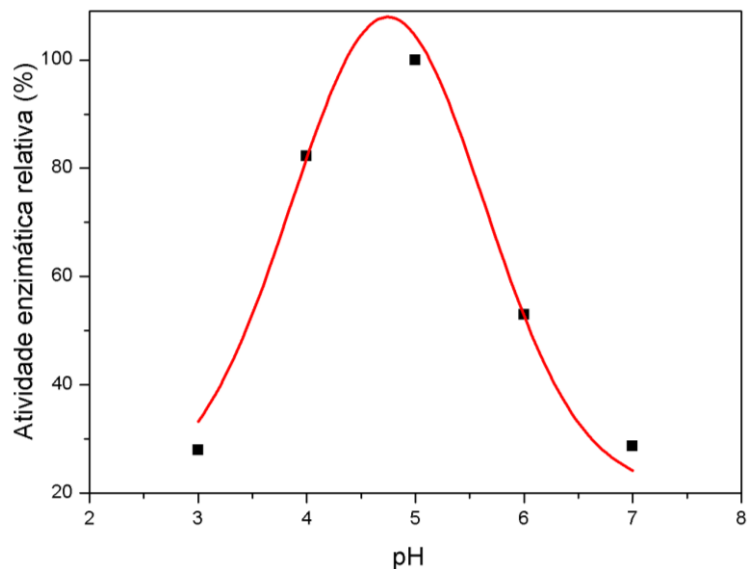
As atividades enzimáticas da Cellic[®]CTec2, bem como suas respectivas atividades relativas em diferentes valores de pH foram determinadas conforme descrito no item 3.9.2.1. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 4.7.

Com os valores dados da tabela acima, foi possível construir o gráfico que relaciona atividade enzimática relativa em função do pH (Figura 4.4).

Tabela 4.7 – Valores da atividade enzimática e suas respectivas atividades relativas na hidrólise da celulose, obtidas para diferentes valores de pH.

pH	Atividade enzimática (U.L ⁻¹)	Atividade relativa (%)
3	247,50	27,91
4	353,33	82,17
5	430,00	100
6	227,77	52,9
7	123,33	28,7

Figura 4.4 – Efeito do pH do meio reacional na atividade enzimática das celulases, para 10% sólidos (m/v), 50°C e agitação de 250 rpm.



De acordo com a Figura 4.4, observa-se um aumento gradual na atividade catalítica da enzima até um valor máximo (pH 4,5-5), seguido de um decréscimo. Sendo assim, adotou-se pH 5 como pH ideal da enzima para a realização de experimentos posteriores.

Lan; Lou e Zhu (2012) também estudaram o efeito do pH na atividade enzimática da Cellic[®]CTec2 em papel filtro de celulose. Os resultados mostraram que a sacarificação máxima obtida foi em pH de 4,75, valor muito próximo ao encontrado nessa pesquisa.

A fabricante da enzima Cellic[®]CTec2 estabelece que o pH ideal desta enzima está entre 5,0 e 5,5. Os resultados foram obtidos através da hidrólise enzimática da palha de milho pré-tratada com ácido diluído.

Outro resultado encontrado por Lan, Lou e Zhu (2012) foi que, para biomassas lenhosas submetidas à diferentes pré-tratamentos (ácido diluído e alcalino), o pH ótimo da Cellic[®]CTec2 está entre 5,5-6,2.

De maneira geral, o pH ótimo da enzima pode variar dependendo da biomassa e do pré-tratamento pela qual foi submetida. Diferentes biomassas apresentam grupos funcionais com diferentes formas iônicas, que por sua vez podem produzir diferentes interações eletrostáticas entre a enzima e a celulose.

4.4.1.3 Efeito da temperatura

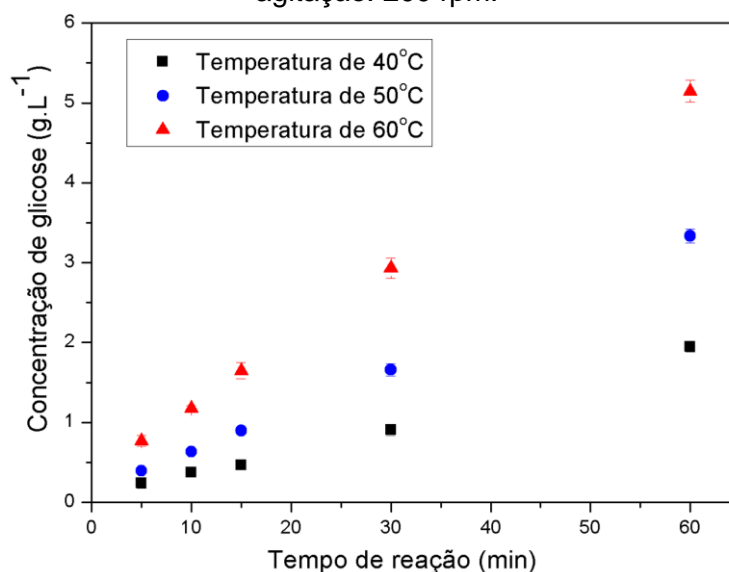
O efeito da temperatura do meio reacional afeta profundamente a efetividade da hidrólise enzimática, de maneira que pode aumentar a atividade catalítica (ativação pela temperatura), bem como diminuir (inativação ou desnaturação térmica das enzimas).

4.4.1.3.1 Estudo das velocidades iniciais de reação

A Figura 4.5 apresenta os valores de concentração de glicose no decorrer da reação de hidrólise enzimática para as temperaturas de 40, 50 e 60°C, em concentração de substrato de 10% de sólidos (m/v), carga enzimática de 5 FPU.g_{celulose}⁻¹, pH 5 e agitação de 200 rpm.

As velocidades iniciais da reação de hidrólise da celulose para as temperaturas de 40, 50 e 60°C foram determinadas, conforme descrito no item 3.9.1.1, tomando pontos de até aproximadamente 10% de conversão do substrato (região linear).

Figura 4.5 – Efeito da temperatura nas velocidades iniciais de reação para palha PTH. Concentração de substrato: 10% de sólidos (m/v), carga enzimática: 5 FPU.g_{celulose}⁻¹, pH 5, agitação: 200 rpm.



A partir da Figura 4.5 observa-se que a velocidade inicial de reação aumenta com o aumento da temperatura e o efeito de desnaturação térmica ainda não é perceptível na faixa de 40-60°C.

A Tabela 4.8 mostra os resultados de velocidades iniciais para cada temperatura.

Tabela 4.8 – Velocidades iniciais de hidrólise enzimática da palha de cana-de-açúcar para diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	Velocidades iniciais ($\text{g}_{\text{glicose}} \cdot \text{L}_{\text{solução}}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)
40	0,031 ± 0,001
50	0,053 ± 0,001
60	0,081 ± 0,002

A princípio, pode-se dizer que a temperatura de 60°C é a melhor opção para reação de hidrólise enzimática da celulose, devido ao maior valor de velocidade inicial de reação. No entanto, é de fundamental importância avaliar se existem efeitos de desativação térmica em longos tempos de reação.

4.4.1.3.2 Efeito da temperatura em longos tempos de reação

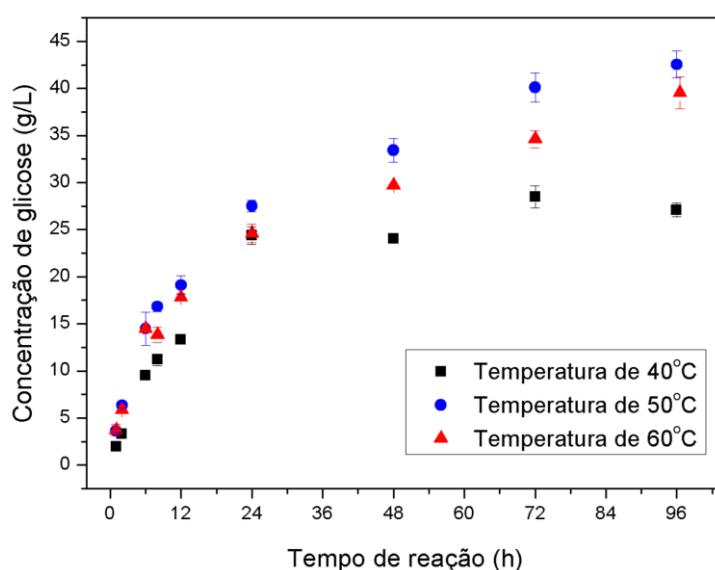
A hidrólise enzimática conduzida em temperaturas maiores que o ideal exibe uma maior velocidade inicial de reação. No entanto, altas temperaturas aplicadas durante longos tempos reacionais acarretam na diminuição da atividade enzimática devido à desnaturação da enzima.

Para avaliar se nas três temperaturas há efeitos de desativação térmica da enzima, realizaram-se experimentos de hidrólise com longos tempos de reação. Em experimentos de longa duração dobrou-se a carga inicial de enzima para 10 $\text{FPU} \cdot \text{g}_{\text{celulose}}^{-1}$ a fim de garantir o término da reação de hidrólise em tempos suficientes de hidrólise.

Os resultados obtidos para a hidrólise da palha, em concentração de substrato de 10% de sólidos (m/v), carga enzimática de $10 \text{ FPU} \cdot \text{g}_{\text{celulose}}^{-1}$, pH 5 e agitação de 200 rpm em tempos de reação de até 96 h, estão apresentados na Figura 4.6.

Pode-se dizer que a temperatura de 50°C promoveu uma maior conversão de celulose, indicando que esta é a temperatura na qual há um melhor rendimento da sacarificação enzimática, e não a temperatura de 60°C , como mostrado na Figura 4.5.

Figura 4.6 – Efeito da temperatura em longos tempos de reação para PTH. Concentração de substrato: 10% de sólidos (m/v), carga enzimática: $10 \text{ FPU} \cdot \text{g}_{\text{celulose}}^{-1}$, pH 5, agitação: 200 rpm.



A temperatura ótima depende do tempo escolhido para a realização das medidas. A verdadeira temperatura ótima para uma reação é a temperatura máxima na qual a enzima possui uma atividade constante por um longo período de tempo.

4.4.1.4 Efeito da concentração de substrato [S]

Um dos principais fatores que afetam a velocidade de hidrólise enzimática é a concentração de substrato. Entretanto, estudar os efeitos da concentração de substrato é complicado uma vez que sua concentração se altera à medida que a reação avança. Uma abordagem simplificada em experimentos cinéticos é medir a

velocidade inicial da reação, quando a [S] é muito maior que a concentração de enzima [E]. Assim, em tempos curtos de reação as mudanças de [S] são desprezíveis, podendo ser considerada constante.

4.4.1.4.1 Estudo das velocidades iniciais de reação

Para vários sistemas enzimáticos, a velocidade inicial varia hiperbolicamente com a concentração do substrato. No caso da hidrólise enzimática de palha de cana-de-açúcar por Cellic[®]CTec2, o comportamento observado foi o mesmo.

A expressão matemática que relaciona valores de velocidades iniciais e a concentração de substrato é mostrada na equação 06 descrita no item 2.4.3.1.1.

$$V = \frac{V_{m\acute{a}x} \cdot S}{K_m + S} \quad (06)$$

Neste estudo, V é a velocidade de consumo de substrato em $\text{g}_{\text{glicose}} \cdot \text{L}_{\text{solução}}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, $V_{m\acute{a}x}$ é a velocidade máxima de consumo do substrato em $\text{g}_{\text{glicose}} \cdot \text{L}_{\text{solução}}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$; S é a concentração de substrato em $\text{g}_{\text{glicose potencial}} \cdot \text{L}_{\text{solução}}^{-1}$ e K_m a constante de Michaelis-Menten em $\text{g}_{\text{glicose potencial}} \cdot \text{L}_{\text{solução}}^{-1}$.

Na Tabela 4.9 encontram-se os valores de velocidades iniciais de reação de hidrólise para diferentes cargas de sólidos com concentração volumétrica de enzima fixada em $290 \text{ FPU} \cdot \text{L}_{\text{solução}}^{-1}$, pH 5, 50°C e agitação de 200 rpm.

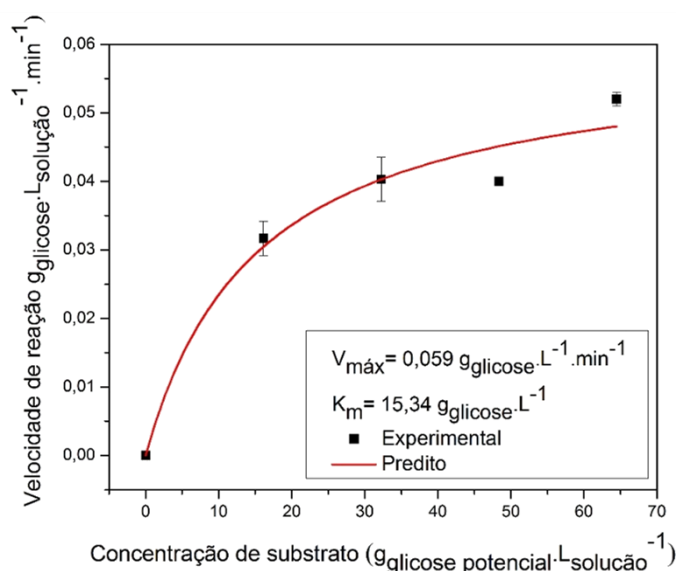
A concentração de palha adicionada em cada ensaio experimental variou de 2,5% a 10% ($m_{\text{palha seca}}/V_{\text{reação}}$), correspondendo a uma concentração de glicose potencial de 16,12 a 64,48 $\text{g}_{\text{glicose potencial}} \cdot \text{L}_{\text{solução}}^{-1}$. A concentração volumétrica de enzima adicionada em todos os ensaios foi de $290 \text{ FPU} \cdot \text{L}_{\text{solução}}^{-1}$, que corresponde a 0,072 mL de enzima adicionada no meio reacional.

Tabela 4.9 – Velocidades iniciais de hidrólise enzimática da palha de cana-de-açúcar para diferentes concentrações de substrato.

Carga de sólidos (% m/v)	Velocidades iniciais ($\text{g}_{\text{glicose}} \cdot \text{L}_{\text{solução}}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)
2,5	$0,032 \pm 0,003$
5,0	$0,040 \pm 0,003$
7,5	$0,040 \pm 0,001$
10,0	$0,052 \pm 0,001$

Na Figura 4.7 foram plotados os valores de velocidades iniciais de reação em função da concentração de substrato. É possível estimar os parâmetros cinéticos do modelo de Michaelis-Menten, $V_{\text{máx}}$ e K_m , ajustando-o a dados experimentais de velocidades iniciais para diferentes concentrações de substrato. Para isso, utilizou-se a ferramenta de ajuste não-linear do software OriginPro 8.0. Os valores obtidos dos parâmetros cinéticos foram: $V_{\text{máx}}=0,059 \text{ g}_{\text{glicose}} \cdot \text{L}_{\text{solução}}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ e $K_m=15,34 \text{ g}_{\text{glicose}} \cdot \text{L}_{\text{solução}}^{-1}$.

Figura 4.7 – Velocidades iniciais de reação em função da concentração de substrato para PTH. Concentração volumétrica de enzima de $290 \text{ FPU} \cdot \text{L}_{\text{solução}}^{-1}$, pH 5, 50°C e agitação 200 rpm.



O valor encontrado de $V_{\text{máx}}$ condiz com os valores de velocidades iniciais para agitações acima de 200 rpm (Tabela 4.6), indicando que o modelo de Michaelis-

Menten se ajustou bem aos dados experimentais quando as concentrações de produto ainda são baixas. Além disso, observa-se, a partir da Figura 4.7, que para concentrações baixas de substratos, até aproximadamente $16 \text{ g}_{\text{glicose potencial}} \cdot \text{L}_{\text{solução}}^{-1}$, a velocidade de reação varia quase que linearmente com o aumento de concentração de substrato. Já para concentrações maiores de substrato, a velocidade aumenta por incrementos menores em resposta ao aumento da concentração de substrato, até que se alcança um ponto acima do qual o aumento de velocidade é insignificante, sendo esse ponto chamado de velocidade máxima ($V_{\text{máx}} = k \cdot E$).

A partir de $V_{\text{máx}}$ é possível calcular a constante de velocidade k , sendo a concentração volumétrica de atividade enzimática de $290 \text{ FPU} \cdot \text{L}_{\text{solução}}^{-1}$ ($1,64 \text{ g}_{\text{enzima}} \cdot \text{L}_{\text{solução}}^{-1}$), o valor encontrado foi $k=0,036 \text{ min}^{-1}$.

Os valores de $V_{\text{máx}}$ e K_m foram utilizados como dados de entrada no ajuste de ensaios de longa duração para a determinação da constante de inibição K_i , considerando o modelo de Michaelis-Menten com inibição.

4.4.1.4.2 Estudo da hidrólise enzimática em longos tempos de reação

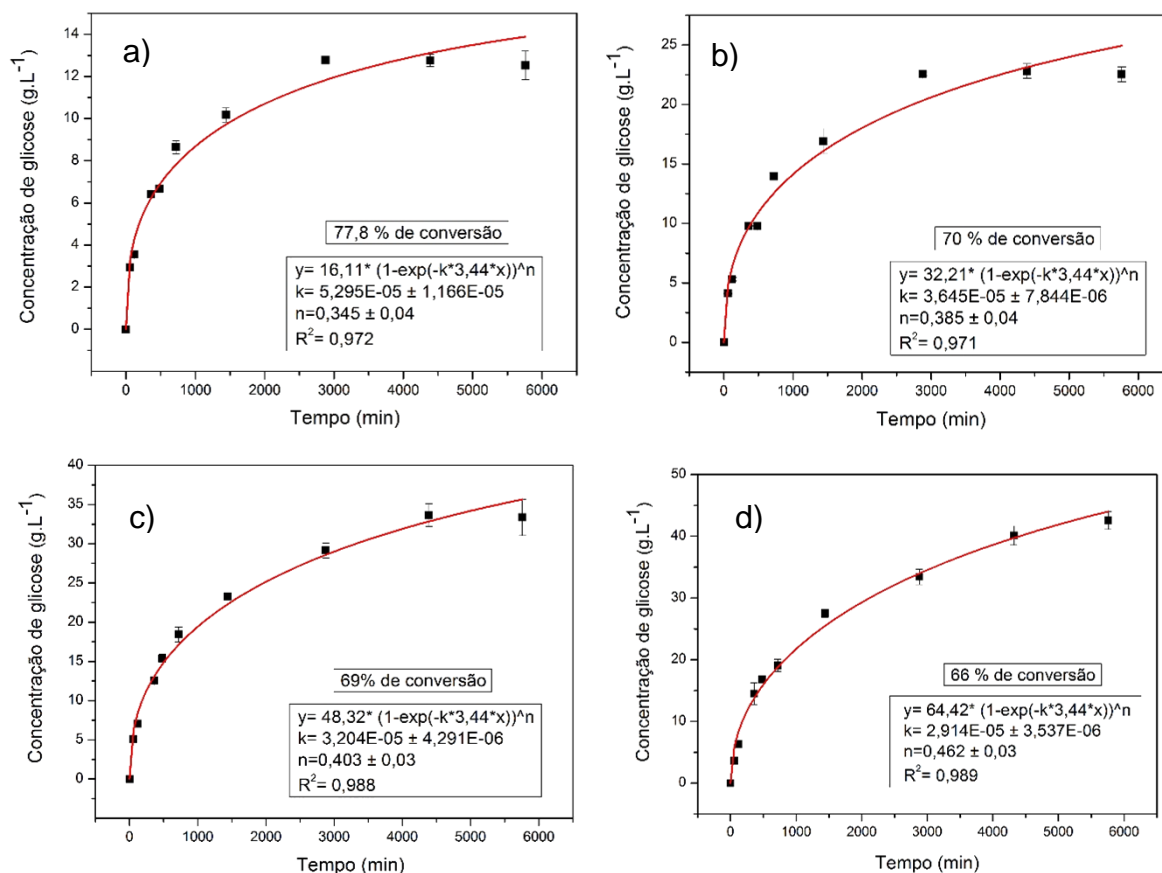
Ensaio de longa duração foram realizados para cargas de sólidos 2,5%, 5%, 7,5% e 10%, correspondendo respectivamente a $16,11 \text{ g}_{\text{glicose potencial}} \cdot \text{L}_{\text{tampão}}^{-1}$, $32,21 \text{ g}_{\text{glicose potencial}} \cdot \text{L}_{\text{tampão}}^{-1}$, $48,32 \text{ g}_{\text{glicose potencial}} \cdot \text{L}_{\text{tampão}}^{-1}$ e $64,42 \text{ g}_{\text{glicose potencial}} \cdot \text{L}_{\text{tampão}}^{-1}$, em uma concentração volumétrica fixa de enzima de $580 \text{ FPU} \cdot \text{L}_{\text{solução}}^{-1}$, pH 5, temperatura de 50°C e agitação de 200 rpm.

É importante dizer aqui que a concentração de enzima dobrou de $290 \text{ FPU} \cdot \text{L}_{\text{solução}}^{-1}$ (ensaio de velocidade inicial de reação) para $580 \text{ FPU} \cdot \text{L}_{\text{solução}}^{-1}$ e, conseqüentemente, $V_{\text{máx}}$ também dobra de $0,059 \text{ g}_{\text{glicose}} \cdot \text{L}_{\text{solução}}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ para $0,118 \text{ g}_{\text{glicose}} \cdot \text{L}_{\text{solução}}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.

Inicialmente, o modelo de Chrastil foi aplicado no ajuste aos dados experimentais, como uma análise prévia ao modelo de Michaelis-Menten (pseudo-homogêneo).

A Figura 4.8 mostra os ajustes do modelo de Chrastil aos dados experimentais obtidos e a Tabela 4.10 reúne os parâmetros obtidos em cada concentração de substrato.

Figura 4.8 – Modelo de Chrastil ajustado aos dados experimentais para palha PTH em cargas de sólidos de (a) 2,5% (b) 5% (c) 7,5% (d) 10% ($m_{\text{substrato}}/V_{\text{total}}$), concentração volumétrica fixa de enzima de 580 FPU.L⁻¹, pH 5, 50°C, 200 rpm.



Estes ensaios permitiram quantificar o efeito da difusão interna sobre as velocidades de reação de hidrólise, através do ajuste dos dados ao modelo de Chrastil, como descrito no item 2.4.3.1.3.

Tabela 4.10 – Parâmetros do modelo de Chrastil para cada carga de sólidos, obtidos no ajuste aos dados experimentais da hidrólise enzimática da palha PTH.

Carga de sólidos (% m/v)	k'	
	Constante de velocidade proporcional ao coef. de difusão (L.g ⁻¹ .min ⁻¹)	n Constante estrutural de resistência difusional
2,5	5,29E-05 ± 1,17E-05	0,34 ± 0,04
5,0	3,64E-05 ± 0,78E-05	0,38 ± 0,04
7,5	3,20E-05 ± 0,43E-05	0,40 ± 0,03
10,0	2,91E-05 ± 0,35E-05	0,46 ± 0,03

A magnitude de n (variando de 0 a 1) indica a importância relativa das limitações de difusão interna. Quando a resistência difusional é muito pequena, ou até mesmo sem resistência, n tende a 1. Se o sistema é limitado pela resistência difusional, n é pequeno (0,5 - 0,6). Em sistemas altamente recalcitrantes, n é em torno de 0,3.

Como se pode observar na Tabela 4.10, o efeito estérico dos átomos no substrato (parâmetro n) é bastante significativo indicando alta recalcitrância do meio reacional (para todos os ensaios). Além disso, percebe-se que com o aumento da concentração de substrato a constante k' diminui. Em altas concentrações de substrato há uma maior formação de produtos, estes dificultando a adsorção e difusão da enzima sobre o substrato sólido, tendo como consequência a diminuição da eficiência da hidrólise enzimática (como pode ser visto nos valores de conversão apresentados na Figura 4.8, para cada experimento). As enzimas se difundem através da estrutura do substrato até chegar aos centros ativos. Em seguida, o produto se difunde para o meio reacional, mas as moléculas de produto ainda presentes nos sítios de adsorção podem atuar como inibidoras do transporte de enzima para outros centros ativos (CARRILLO et al., 2005; CARVALHO et al., 2013).

Na sequência do trabalho, foi possível também analisar os efeitos de inibição através do ajuste do modelo de Michaelis-Menten com inibição, conforme descrito no item 2.4.3.1.1. Deve-se ressaltar que devido ao fato de haver uma alta carga de β -glicosidase no complexo enzimático utilizado, conforme indicado pela fabricante (Novozymes) da Cellic[®]CTec2, considerou-se a simplificação de haver somente inibição competitiva por glicose.

Os resultados foram obtidos através de software "in-house" para compilador Fortran, onde está implementado o algoritmo clássico de Levenberg Marquardt.

A Figura 4.9 (a), (b), (c) e (d) mostra o ajuste do modelo de Michaelis-Menten com inibição competitiva por glicose para as concentrações de 2,5; 5,0; 7,5 e 10% de carga de sólidos, respectivamente. A Tabela 4.11, reúne os valores mostrados na Figura 4.9.

Figura 4.9 – Ajuste do modelo de MM com inibição aos dados experimentais para palha PTH em diferentes cargas de sólidos (a) 2,5% (b) 5% (c) 7,5% e (d) 10% ($m_{\text{substrato}}/V_{\text{total}}$).

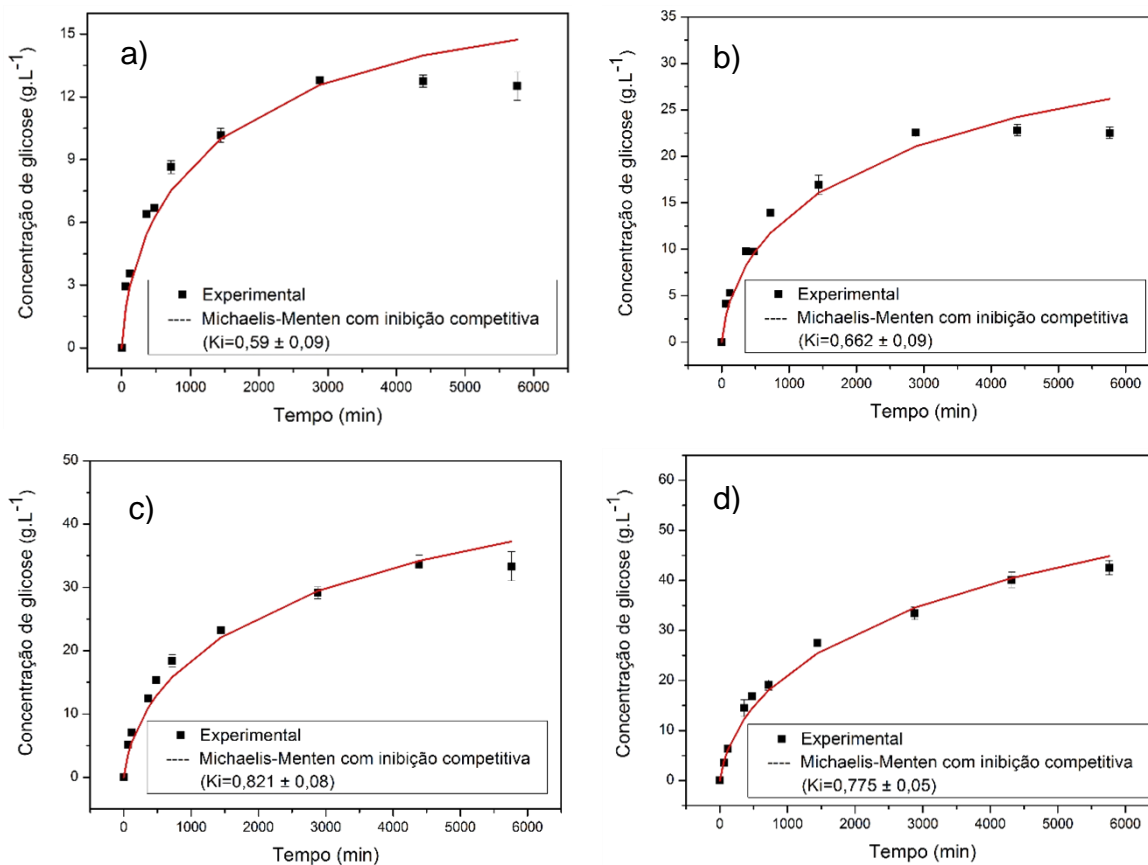


Tabela 4.11 – Constante de inibição do modelo de MM com inibição competitiva por glicose.

Carga de sólidos (% m/v)	K_i Constante de inibição (g.L ⁻¹)
2,5	$0,59 \pm 0,09$
5,0	$0,66 \pm 0,09$
7,5	$0,82 \pm 0,08$
10,0	$0,78 \pm 0,05$

Valores muito pequenos de K_i (próximos de zero) indicam efeitos significativos de inibição. Por outro lado, valores muito grandes de K_i (tendendo ao ∞) mostram que o sistema reacional não sofre inibição pelo produto.

A partir dos resultados apresentados na Tabela 4.11 fica claro que em todas as concentrações de substrato houve forte inibição da enzima pela glicose.

De maneira geral, pode-se dizer que para o modelo de Chrastil os fatores limitantes da hidrólise da celulose são refletidos na constante de resistência difusional (n), ou seja, quanto mais efeitos negativos estiverem ocorrendo no sistema reacional, menor é a constante. Já para o modelo de Michaelis-Menten com inibição, os efeitos são refletidos na constante de inibição (K_i).

Há de se observar que a palha pré-tratada hidrotermicamente apresenta alta recalcitrância, como mostrado anteriormente através dos dados de coeficiente estrutural de resistência difusional. Desta maneira, embora tenha sido possível ajustar um modelo de MM pseudo-homogêneo para os dados de hidrólise, uma boa opção para sistemas em que há uma forte resistência difusional é utilizar modelos que considerem reações em sistemas heterogêneos, no qual as enzimas estão na fase líquida, enquanto que a celulose se apresenta na fase sólida. A abordagem mais adequada, nestes casos, é a de Michaelis-Menten modificado, como descrito no item 2.4.3.1.2 em que as concentrações de enzima e substrato são trocadas na equação de MM.

4.4.1.5 Efeito da concentração de enzima [E] – MM modificado

Experimentos avaliando a concentração de enzima também foram realizados. Para isso, fixaram-se as seguintes condições: pH 5, 50°C e 200 rpm e 10% de carga de sólidos (m/v), que corresponde a $64,42 \text{ g}_{\text{glicose potencial}} \cdot \text{L}_{\text{tampão}}^{-1}$, variando a concentração de enzima em uma faixa de 5 a 80 $\text{FPU} \cdot \text{g}_{\text{celulose}}^{-1}$ de Cellic®CTec2 correspondendo a $1,64$ a $26,18 \text{ g}_{\text{enzima}} \cdot \text{L}_{\text{solução}}^{-1}$.

Os resultados obtidos para a velocidade inicial de reação em função da concentração de enzima podem ser vistos na Tabela 4.12, sendo plotados na Figura 4.10. A velocidade inicial de reação pode ser calculada de acordo com o procedimento descrito no 3.9.1.1.

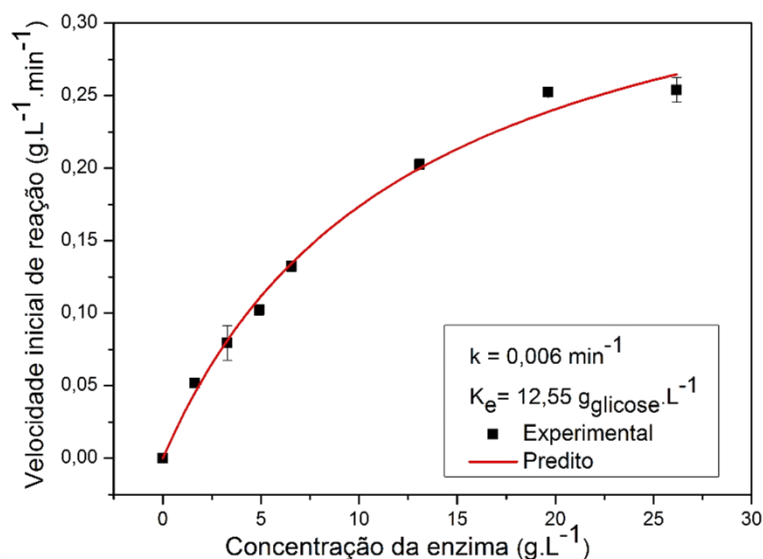
Tabela 4.12 – Velocidades iniciais de hidrólise enzimática da palha PTH para diferentes concentrações de enzima.

Concentração de enzima (FPU.g _{celulose})	Velocidades iniciais (g _{glicose} ·L _{solução} ⁻¹ ·min ⁻¹)
5	0,052 ± 0,001
10	0,080 ± 0,01
15	0,102 ± 0,003
20	0,133 ± 0,003
40	0,203 ± 0,003
60	0,252 ± 0,002
80	0,254 ± 0,008

A velocidade inicial de reação aumenta com o aumento da concentração de enzima inicial. Entretanto, em altas concentrações de enzima (>13,1 g_{enzima}·L_{solução}⁻¹) o substrato torna-se limitante, ou seja, não há substrato suficiente para ocupar os sítios ativos livres da enzima. Este fato explica um aumento da velocidade cada vez menor, aproximando-se assintoticamente de um máximo.

Parâmetros de MM modificado foram determinados sendo $V_{em\acute{a}x}=0,392$ g_{glicose}·L_{solução}⁻¹·min⁻¹ e $K_e=12,55$ g_{glicose}potencial·L_{solução}⁻¹, sendo a velocidade específica de reação calculado por $k= V_{em\acute{a}x}/S=0,392/64,42= 0,006$ min⁻¹.

Figura 4.10 – Ajuste do modelo de MM modificado aos dados experimentais de velocidades iniciais de reação em função da concentração de enzima a pH 5, 50°C, 200 rpm e 10% de sólidos (m/v) para palha PTH.

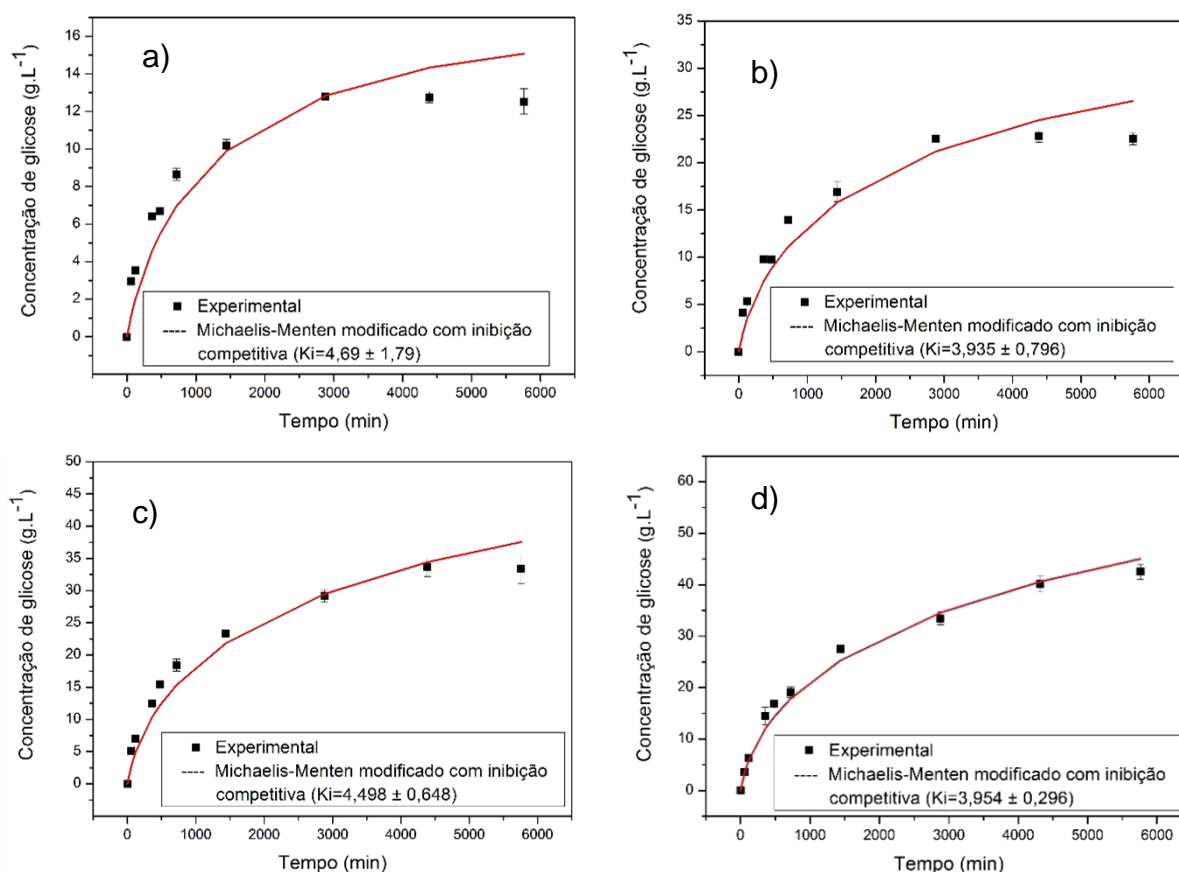


Como observado na Figura 4.10, o modelo se ajustou bem aos dados experimentais. Esta abordagem de MM permite uma predição satisfatória do comportamento de hidrólise enzimática.

Experimentos de longos tempos de duração foram realizados com o objetivo de quantificar o efeito de inibição durante a hidrólise enzimática.

A Figura 4.11 (a), (b), (c) e (d) mostram o ajuste do modelo de Michaelis-Menten modificado com inibição competitiva por glicose para as concentrações de 2,5; 5,0; 7,5 e 10% de carga de sólidos, respectivamente.

Figura 4.11 – Ajuste do modelo de MM modificado com inibição aos dados experimentais para palha PTH em diferentes cargas de sólidos (a) 2,5% (b) 5% (c) 7,5% e (d) 10% ($m_{\text{substrato}}/V_{\text{total}}$).



Pode se observar, novamente, o quão importante é o efeito do termo de inibição na representação da reação de hidrólise enzimática da palha PTH, mas agora aplicado ao modelo de MM modificado.

4.4.2 Hidrólise enzimática da palha de cana-de-açúcar pré-tratada hidrotermicamente e com NaOH 4%

4.4.2.1 Efeito da concentração de substrato [S]

Primeiramente, foi avaliado o efeito da concentração de substrato em experimentos de curta e longa duração. A concentração de substrato variou de 2,5% a 10% de carga de sólidos, correspondendo a uma glicose potencial de 22,97 a 91,88 $\text{g glicose potencial} \cdot \text{L}_{\text{solução}}^{-1}$. Manteve-se fixo o pH em 5, temperatura de reação de 50°C, agitação 200 rpm e concentração volumétrica de enzima de 290 $\text{FPU} \cdot \text{L}_{\text{solução}}^{-1}$. Para ensaios de longos tempos de duração utilizou-se uma carga enzimática maior (828 $\text{FPU} \cdot \text{L}_{\text{solução}}^{-1}$) a fim de garantir que a reação de formação de produto não necessitasse de tempos muito longos de reação para atingir a máxima conversão.

4.4.2.1.1 Estudo das velocidades iniciais de reação

Para determinar as velocidades iniciais de reação alíquotas foram coletadas em tempos curtos de reação de hidrólise enzimática (somente região linear). A

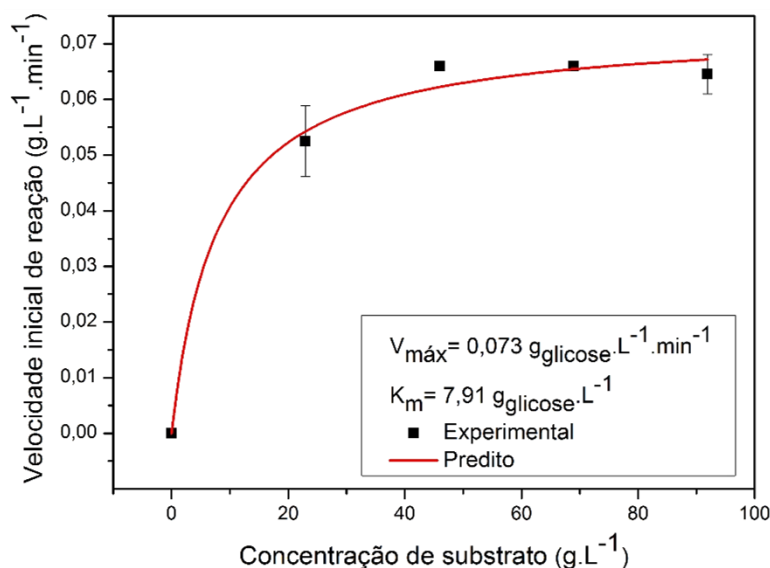
Tabela 4.13 reúne os valores de velocidade inicial para cada concentração de substrato e na Figura 4.12 apresenta-se o ajuste de MM pseudo-homogêneo aos dados experimentais.

Tabela 4.13 – Velocidades iniciais de hidrólise enzimática em função da carga de sólidos para a palha PTH e com PTA.

Carga de sólidos (% m/v)	Velocidades iniciais ($\text{g glicose} \cdot \text{L}_{\text{solução}}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)
2,5	0,053 ± 0,006
5,0	0,066 ± 0,001
7,5	0,066 ± 0,001
10,0	0,065 ± 0,004

O modelo de MM ajustou-se muito bem aos dados experimentais, obtendo-se $V_{\text{máx}}=0,073 \text{ g glicose}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ e $K_m=7,91 \text{ g glicosepotencial}\cdot\text{L}_{\text{solução}}^{-1}$. Com os parâmetros cinéticos de MM foi possível calcular a constante de velocidade k , sendo a concentração volumétrica de atividade enzimática de $290 \text{ FPU}\cdot\text{L}_{\text{solução}}^{-1}$ ($1,64 \text{ g enzima}\cdot\text{L}_{\text{solução}}^{-1}$). O valor encontrado foi $k=0,044 \text{ min}^{-1}$.

Figura 4.12 – Velocidades iniciais de reação em função da concentração de substrato para palha PTH e com PTA. Concentração volumétrica de enzima enzimática de $290 \text{ FPU}\cdot\text{L}_{\text{solução}}^{-1}$, pH 5, 50°C e agitação 200 rpm.



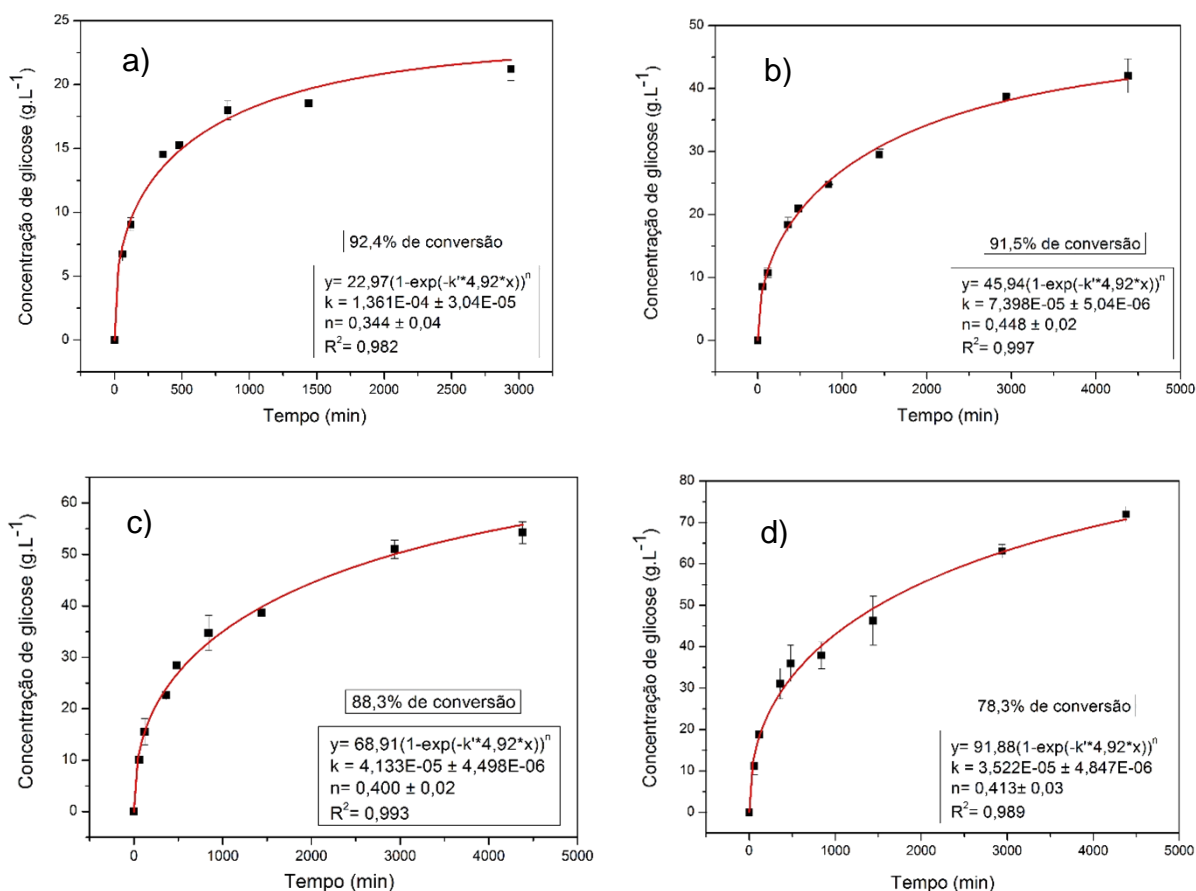
4.4.2.1.2 Estudo da hidrólise enzimática em longos tempos de reação

Experimentos avaliando o efeito da concentração de substrato em longos tempos de reação foram realizados para fazer uma análise prévia se o modelo de MM (pseudo-homogêneo) seria realmente uma boa opção para toda a faixa de concentrações de substrato considerada, devido ao caráter heterogêneo do substrato.

Deve-se ressaltar aqui também que, a concentração de enzima aumentou de $290 \text{ FPU}\cdot\text{L}_{\text{solução}}^{-1}$ (ensaios de velocidades iniciais de reação) para $828 \text{ FPU}\cdot\text{L}_{\text{solução}}^{-1}$ (ensaios de longos tempos de reação), ou seja, $V_{\text{máx}}$ aumentou de $0,073 \text{ g glicose}\cdot\text{L}_{\text{solução}}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ para $0,208 \text{ g glicose}\cdot\text{L}_{\text{solução}}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$.

A Figura 4.13 mostra os ajustes do modelo de Chrastil aos dados experimentais obtidos.

Figura 4.13 – Modelo de Chrastil ajustados aos dados experimentais para palha PTH com PTA para carga de sólidos de (a) 2,5% (b) 5% (c) 7,5% e (d) 10% ($m_{\text{substrato}}/V_{\text{total}}$), concentração volumétrica fixa de enzima de 828 FPU.L⁻¹, pH 5, 50°C, 200 rpm.



A Tabela 4.14 reúne os parâmetros obtidos no ajuste do modelo de Chrastil para cada concentração de substrato de palha PTH com PTA.

Tabela 4.14 – Parâmetros do modelo de Chrastil obtidos nos ajustes aos dados experimentais da hidrólise enzimática da palha PTH com PTA.

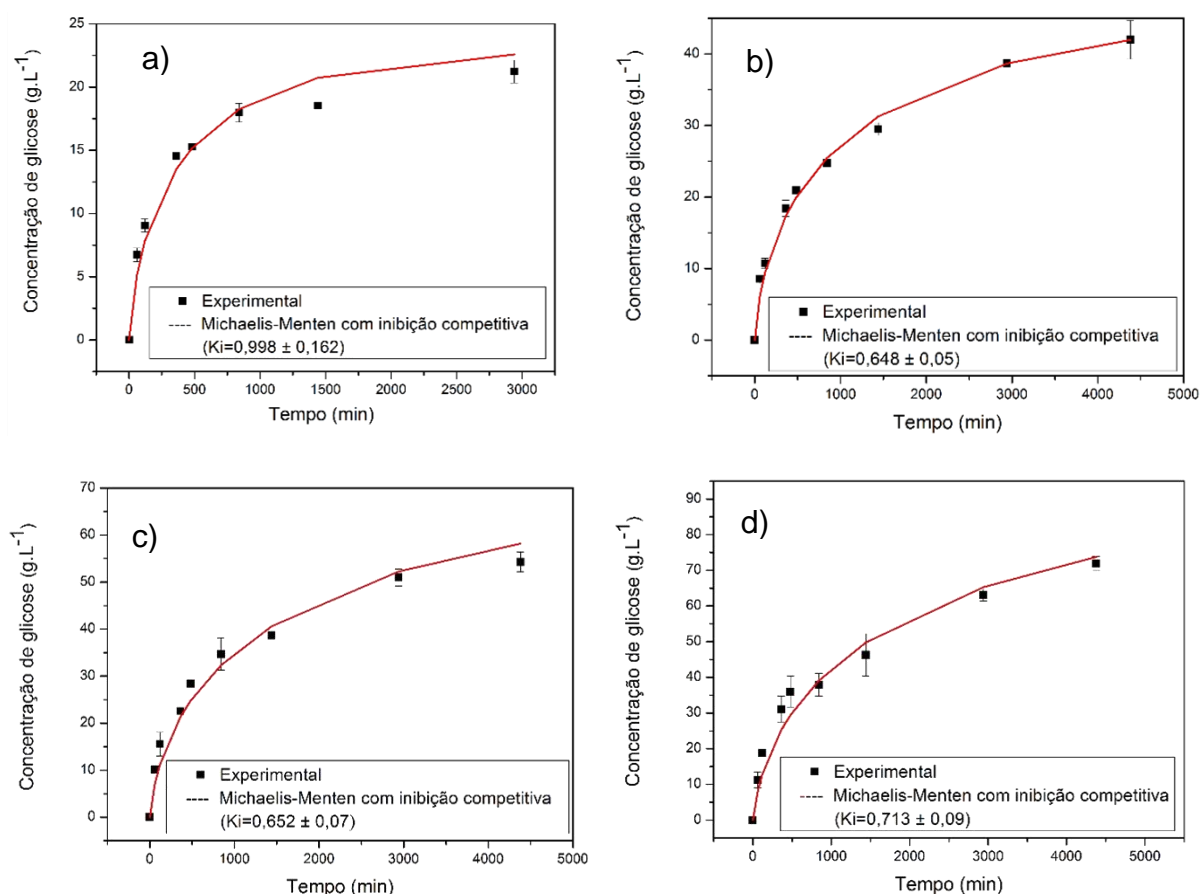
Carga de sólidos (% m/v)	k'	
	Constante de velocidade proporcional ao coef. de difusão (L.g ⁻¹ .min ⁻¹)	n Constante estrutural de resistência difusional
2,5	1,36E-04 ± 0,30E-04	0,34 ± 0,04
5,0	7,40E-05 ± 0,50E-05	0,45 ± 0,02
7,5	4,13E-05 ± 0,45E-05	0,40 ± 0,02
10,0	3,52E-05 ± 0,48E-05	0,41 ± 0,03

Como se pode observar na Tabela 4.14, o efeito da organização espacial dos átomos no substrato (parâmetro n) também é bastante significativo para o substrato submetido ao tratamento alcalino. Com o aumento da concentração de substrato a constante k' diminui.

A partir dos dados de evolução temporal da concentração de glicose em experimentos de longa duração, foi possível analisar também os efeitos de inibição competitiva pelo produto.

A Figura 4.14 mostra o ajuste do modelo de MM com inibição competitiva por glicose para experimentos de hidrólise com concentrações de substrato de 2,5 a 10% de carga de sólidos. A Tabela 4.15 sintetiza as informações da Figura 4.14.

Figura 4.14 – Ajuste do modelo de MM com inibição aos dados experimentais para palha PTH e com PTA em diferentes cargas de sólidos (a) 2,5% (b) 5% (c) 7,5% e (d) 10% ($m_{\text{substrato}}/V_{\text{total}}$).



Da Tabela 4.15 percebe-se que o efeito do termo de inibição é muito importante ao longo da reação. Para a concentração de 2,5% o modelo de MM com inibição não se ajustou muito bem aos dados, indicando que este modelo não foi adequado para essa faixa de concentração.

Novamente, o substrato apresenta alta recalcitrância, como mostrado através dos dados de coeficiente estrutural de resistência difusional (n). Desta maneira, aqui também, embora tenha sido possível ajustar um modelo de MM pseudo-homogêneo para os dados de hidrólise, uma boa opção para sistemas em que há uma forte resistência difusional é utilizar modelos que considerem reações em sistemas heterogêneos.

Tabela 4.15 – Constante de inibição competitiva por glicose obtida através do ajuste do modelo de MM, para experimentos de hidrólise enzimática da palha PTH com PTA.

Carga de sólidos (% m/v)	K_i Constante de inibição (g.L^{-1})
2,5	$1,00 \pm 0,16$
5,0	$0,65 \pm 0,05$
7,5	$0,65 \pm 0,07$
10,0	$0,71 \pm 0,09$

4.4.2.2 Efeito da concentração de enzima [E] – MM modificado

Por fim, realizaram-se experimentos avaliando a carga de enzima. Para isso, fixaram-se as seguintes condições: pH 5, 50°C e 200 rpm e 10% de carga de sólidos (m/v), que corresponde a $91,88 \text{ g}_{\text{glicose potencial}} \cdot \text{L}_{\text{tampão}}^{-1}$, pH 5, 50°C e 200 rpm, variando a concentração de enzima em uma faixa de 5 a 60 $\text{FPU} \cdot \text{g}_{\text{celulose}}^{-1}$ de Cellic®CTec2 correspondendo a $2,46$ a $29,52 \text{ g}_{\text{enzima}} \cdot \text{L}_{\text{solução}}^{-1}$.

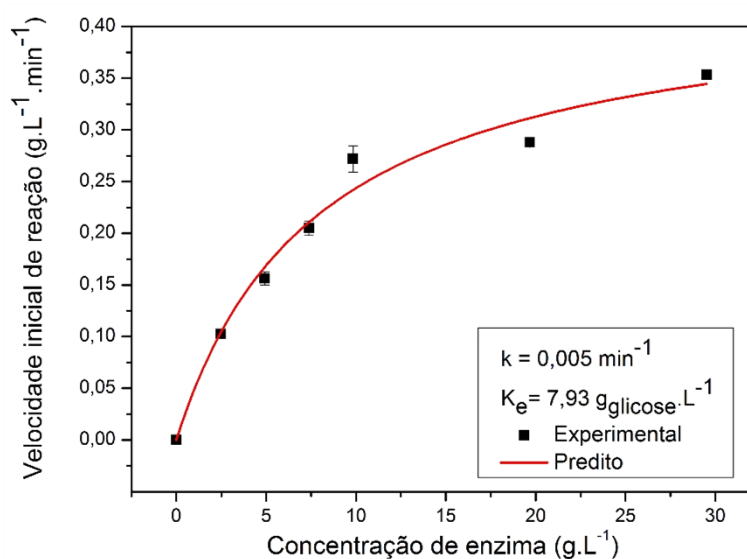
Os resultados obtidos para a velocidade inicial de reação em função da concentração de enzima são ilustrados na Tabela 4.16 e plotados na Figura 4.15.

Tabela 4.16 – Velocidades iniciais de hidrólise enzimática da palha PTH com PTA para diferentes concentrações de enzima.

Concentração de enzima (FPU.g _{celulose})	Velocidades iniciais (g _{glicose} ·L _{solução} ⁻¹ ·min ⁻¹)
5	0,102 ± 0,001
10	0,156 ± 0,006
15	0,205 ± 0,007
20	0,272 ± 0,013
40	0,288 ± 0,004
60	0,352 ± 0,001

O modelo de MM modificado apresentou boa aderência aos dados experimentais, representando bem os dados experimentais. Os parâmetros de MM modificado foram determinados, sendo $V_{em\acute{a}x}=0,437$ g_{glicose}·L_{solução}⁻¹·min⁻¹ e $K_e=7,93$ g_{glicose}potencial·L_{solução}⁻¹, sendo a velocidade específica de reação calculado por $k=V_{em\acute{a}x}/S=0,437/91,88= 0,0047$ min⁻¹.

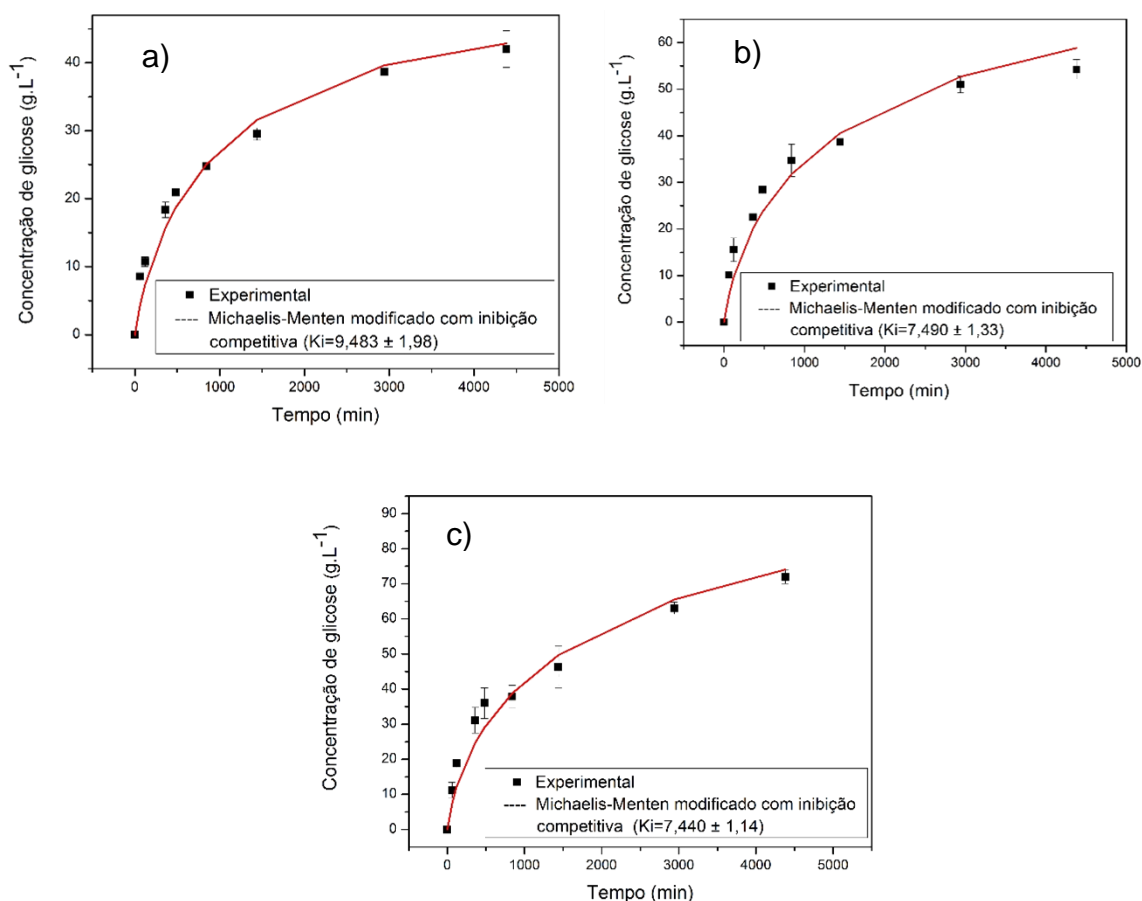
Figura 4.15 – Ajuste do modelo de MM modificado aos dados experimentais de velocidades iniciais de reação em função da concentração de enzima a pH 5, 50°C, 200 rpm e 10% de sólidos (m/v) para palha PTH e com PTA.



Em seguida, ajustou-se o modelo de MM modificado com inibição aos dados experimentais obtidos de ensaios de longa duração. A Figura 4.16 apresenta o ajuste do modelo para diferentes concentrações de substrato.

Para a concentração de 2,5% de carga de sólidos, o modelo de MM modificado com inibição apresentou uma constante de inibição K_i tendendo ao infinito. Desta forma, sugere-se que o modelo de MM modificado sem inibição é mais adequado para concentrações muito baixas de substrato.

Figura 4.16 – Ajuste do modelo de MM modificado com inibição aos dados experimentais para palha PTH com PTA em diferentes cargas de sólidos (a) 5% (b) 7,5% e (c) 10%.



4.4.3 Comparação dos modelos matemáticos utilizados

Os modelos matemáticos foram muito úteis na predição de parâmetros fundamentais envolvidos na hidrólise enzimática. No entanto, nem todos os modelos utilizados foram aplicáveis para todas as situações estudadas.

Para a palha pré-tratada hidrotermicamente foi possível ajustar tanto o modelo de Michaelis-Menten pseudo-homogêneo quanto o MM modificado, para ensaios de longa duração. No entanto, fisicamente, o meio reacional se aproxima mais de um sistema heterogêneo do que de um sistema homogêneo, de maneira que o modelo de MM modificado com inibição é o mais aconselhável.

Para a palha pré-tratada hidrotermicamente seguida de pré-tratamento alcalino, também foram aplicados os modelos de MM pseudo-homogêneo e modificado, com inibição. Os resultados revelaram que, para concentrações muito baixas de substrato (2,5% de carga de sólidos) o modelo de MM pseudo-homogêneo e modificado não se ajustaram, visto que, para o modelo de MM modificado, K_i tendeu ao infinito (sem inibição), e que o K_i obtido pelo ajuste do MM clássico apresentou desvio padrão muito grande, tornando o valor sem precisão e confiabilidade. Sendo assim, para esta faixa de concentração sugere-se o modelo MM modificado sem inibição.

Por outro lado, para concentrações de substrato mais elevadas (5-10% m/v) tanto o modelo de MM pseudo-homogêneo quanto o MM modificado obtiveram boa aderência aos dados, indicando que ambos os modelos podem representar matematicamente o processo. A palha PTH seguida de PTA se apresentou susceptível a efeitos de resistência difusional, de modo que assumir um sistema pseudo-homogêneo é inadequado. Desta forma, aconselha-se utilizar o modelo de MM modificado com inibição.

O modelo de Chrastil também foi utilizado no ajuste de ensaios de longa duração para ambas as biomassas pré-tratadas. Não se esperava que para concentrações baixas de substratos (2,5%) a resistência à difusão se mostrasse mais alta (parâmetro n se apresentando ligeiramente mais baixo). Isso provavelmente se deve ao fato de que os parâmetros do modelo de Chrastil são super correlacionados, de maneira que qualquer alteração no ajuste de um dos parâmetros afeta consideravelmente o outro. Desta forma, não é aconselhável utilizar o modelo de Chrastil para a concentração de 2,5% de sólidos.

A Tabela 4.17 reúne todos os parâmetros obtidos nos ajustes do modelo de MM com e sem inibição, pseudo-homogêneo ou modificado para a faixa de 5 a 10% de carga de sólidos.

Tabela 4.17 – Comparação dos parâmetros cinéticos de hidrólise enzimática obtidos dos ajustes do modelo de MM com e sem inibição, pseudo-homogêneo ou modificado, para diferentes substratos com contração de 5 a 10% de sólidos. $V_{m\acute{a}x}$ and $V_{em\acute{a}x}$ estão em $g.L^{-1}.min^{-1}$; K_m , K_e e K_i em $g.L^{-1}$.

Substrato	Modelos			
	MM (pseudo-homogêneo)	MM com inibição competitiva	MM modificado	MM modificado com inibição competitiva
Palha PTH	$V_m = 0,118 \pm 0,008$ $K_m = 15,34 \pm 7,33$	$K_i = 0,75 \pm 0,07$	$V_{em\acute{a}x} = 0,39 \pm 0,02$ $K_e = 12,5 \pm 1,6$ $k = 0,006$	$K_i = 4,1 \pm 0,6$
Palha PTH com PTA	$V_m = 0,208 \pm 0,004$ $K_m = 7,91 \pm 2,88$	$K_i = 0,67 \pm 0,07$	$V_{em\acute{a}x} = 0,44 \pm 0,03$ $K_e = 7,9 \pm 1,6$ $k = 0,005$	$K_i = 8,1 \pm 1,5$

O pré-tratamento hidrotérmico seguido de pré-tratamento alcalino resultou em melhora no processo de hidrólise enzimática, exibindo maiores valores de $V_{m\acute{a}x}$, menores valores de K_m e maiores valores de K_i . Valores pequenos de K_m e altos de K_i indicam maior afinidade da enzima com o substrato e menor afinidade com o inibidor.

A Tabela 4.18 apresenta os parâmetros obtidos no ajuste do modelo de Chrastil, para a palha PTH e PTH seguida de PTA.

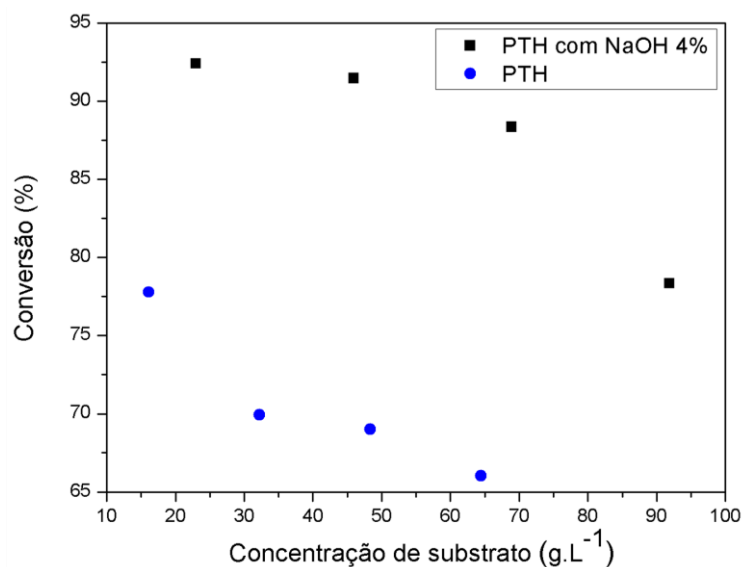
Tabela 4.18 – Parâmetros do Modelo de Chrastil para a palha PTH e PTH seguida de PA em concentrações de substrato de 5 a 10% m/v. k' está em $L.g^{-1}.min^{-1}$; n é adimensional.

Carga de sólidos (% m_{palha}/v_{total})	Modelo de Chrastil	
	Palha PTH	Palha PTH + NaOH 4%
5,0	$n = 0,38 \pm 0,04$ $k' = 3,64E-05 \pm 0,78E-05$	$n = 0,45 \pm 0,02$ $k' = 7,40E-05 \pm 0,5E-05$
7,5	$n = 0,40 \pm 0,03$ $k' = 3,20E-05 \pm 0,43E-05$	$n = 0,40 \pm 0,02$ $k' = 4,13E-05 \pm 0,45E-05$
10,0	$n = 0,46 \pm 0,03$ $k' = 2,91E-05 \pm 0,35E-05$	$n = 0,41 \pm 0,03$ $k' = 3,52E-05 \pm 0,48E-05$

Da Tabela 4.18 percebe-se que para todas as faixas de concentração de substrato a constante de velocidade de reação (k') foi maior para a palha PTH seguida de PTA. Este comportamento pode ser atribuído ao fato de que ligações não-produtivas da enzima em lignina possam estar ocorrendo na palha PTH, visto que foi removido somente 37,46% de lignina com o pré-tratamento hidrotérmico. Por outro lado, a palha submetida ao pré-tratamento hidrotérmico seguida de pré-tratamento alcalino apresentou uma remoção de 91,88% de lignina, fato que se constitui numa possível causa para maiores velocidades de reação.

De maneira geral, a palha PTH com PTA apresentou maiores velocidades de reação, promovendo assim, uma melhora de 15 a 20% na conversão da celulose em glicose, como pode ser visto na Figura 4.17.

Figura 4.17 – Conversão da celulose em função da concentração de substrato para palha PTH e PTH com PTA.



Carvalho et al. (2013) estudaram a cinética de reação da hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar explodido a vapor e pré-tratado com H₂SO₄ 1%, ambos seguidos de deslignificação com NaOH 4%. Os autores ajustaram o modelo de Chrastil aos ensaios de longos tempos de reação. Os parâmetros encontrados pelos autores estão apresentados na Tabela 4.19.

Tabela 4.19 – Parâmetros do modelo de Chrastil obtidos nos ajustes dos ensaios de hidrólise enzimática de Carvalho et al. (2013).

Carga de sólidos (% $m_{\text{celulose}}/m_{\text{total}}$)	Modelo de Chrastil	
	Bagaço pré-tratado com H_2SO_4 + NaOH 4%	Bagaço explodido a vapor + NaOH 4%
6,54	$n = 0,30 \pm 0,05$ $k' = 4,96\text{E-}08 \pm 5,94\text{E-}08$	$n = 0,57 \pm 0,05$ $2,0\text{E-}05 \pm 0,2\text{E-}05$

Fonte: Carvalho et al., (2013)

Comparando os resultados da Tabela 4.18 com os da Tabela 4.19, é possível dizer que o efeito de resistência difusional interna é mais pronunciado para o bagaço pré-tratado com H_2SO_4 + NaOH 4% ($n=0,30$). Em seguida, para a palha pré-tratada hidrotermicamente + NaOH 4% ($n=0,40$), e por último, para o bagaço explodido a vapor + NaOH 4% ($n=0,57$). O pré-tratamento H_2SO_4 1% seguido de deslignificação com NaOH 4% resultou em uma concentração residual de lignina significativa (17%), visto que para as outras duas biomassas a concentração de lignina residual foi aproximadamente 5,5%. Já para o pré-tratamento explosão a vapor, além da remoção eficiente de lignina, pode-se ter promovido um maior rompimento das fibras lignocelulósicas, aumentando a acessibilidade das enzimas à celulose. Perez-Cantu et al. (2013) compararam a eficiência do pré-tratamento hidrotérmico e explosão a vapor na etapa de hidrólise enzimática em amostras de palha de centeio. Resultados muito semelhantes foram encontrados para ambos os pré-tratamentos, no entanto, o pré-tratamento explosão a vapor apresentou-se com uma ligeira vantagem sobre a digestibilidade enzimática.

CAPÍTULO 5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho foi realizado um estudo cinético da hidrólise enzimática da palha de cana-de-açúcar (pré-tratada hidrotérmicamente seguida ou não de pré-tratamento alcalino) através do qual se pôde avaliar a influência do pH, temperatura, agitação, concentração de substrato e enzima.

Os resultados obtidos permitiram identificar as melhores condições de temperatura e pH para o extrato enzimático empregado. A enzima se mostrou mais eficiente em pH's na faixa de 4,5-5,0, sendo pH 5 escolhido como condição ideal para os experimentos subsequentes. Já para a temperatura, os estudos de velocidades iniciais de reação indicaram um aumento gradual na velocidade de hidrólise com o aumento da temperatura. No entanto, em experimentos de longa duração, houve efeitos de desnaturação térmica na temperatura de 60°C, indicando que a temperatura ideal para reação é de 50°C.

Avaliou-se também o efeito da agitação na velocidade inicial de reação e os resultados indicaram que na faixa 0 a 200 rpm ocorreu sempre um aumento na velocidade de reação de hidrólise, indicando que havia resistência externa ao transporte de massa, o qual foi minimizado com o aumento da velocidade de agitação. A partir de 200 rpm, a velocidade de reação foi praticamente invariante, sendo esta selecionada como velocidade ótima de agitação.

Por meio dos estudos do efeito da carga de sólidos (2,5 a 10% m/v) e da concentração de enzima (5-80FPU.g_{celulose}⁻¹), foi possível ajustar os modelos de MM pseudo-homogêneo e modificado para velocidades iniciais de reação, onde efeitos de inibição não eram tão significativos. Em experimentos de longos tempos de reação, pôde-se determinar as constantes de inibição competitiva dos modelos. O modelo de Chrastil também foi útil no estudo cinético, fornecendo informações a respeito da velocidade de reação e resistências difusionais.

Para a concentração de 2,5% de palha pré-tratada hidrotérmicamente, os modelos de MM pseudo-homogêneo e modificado, com inibição, foram ajustados. Para a mesma carga de sólidos, porém com palha pré-tratada hidrotérmicamente seguida de pré-tratamento alcalino, sugere-se a utilização do modelo MM modificado sem inibição.

O modelo de MM modificado e Chrastil são mais apropriados para cargas mais altas de sólidos (5-10% m/v), onde efeitos de inibição e sistemas reacionais recalcitrantes são consideráveis.

De modo geral, os modelos utilizados permitiram a identificação de características essenciais (efeitos de inibição pelo produto, velocidades de reação e resistências difusionais) do processo de hidrólise, podendo ser utilizados para simulação de diferentes estratégias de operação dos reatores enzimáticos, bem como em estudos de viabilidade técnica e econômica dos mesmos.

CAPÍTULO 6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVIRA, P. et al. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4851-4861, 2010.
- 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. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 3, p. 308-324, 2010.
- BAILEY, J. M.; OLLIS, D. F. **Biochemical Engineering Fundamentals**. New York: McGraw-Hill Chemical Engineering Series, 2 Ed., 1986.
- BANSAL, P. et al. Modeling cellulase kinetics on lignocellulosic substrates. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 6, p. 833-848, 2009.
- BARROS, R.D.R. et al. Association of wet disk milling and ozonolysis as pretreatment for enzymatic saccharification of sugarcane bagasse and straw. **Bioresource Technology**, v. 136, p. 288-294, 2013.
- 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. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 112, n. 3, p. 173-184, 2004.
- BEZERRA, R.M.F.; DIAS, A.A. Enzymatic kinetic of cellulose hydrolysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 126, p. 49, 2005.
- BINOD, P. et al. Hydrolysis of lignocellulosic biomass for bioethanol production. In: PANDEY, A. et al. **Biofuels**, Burlington: Academic Press, p. 229-250, 2011.
- CANILHA, L. et al. Sacarificação da biomassa lignocelulósica através de pré-hidrólise ácida seguida por hidrólise enzimática: Uma estratégia de “desconstrução” da Fibra vegetal. **Revista Analytica**, n.44, p-50, 2009.
- CANILHA, L. et al. Bioconversion of Sugarcane Biomass into Ethanol: An Overview about Composition, Pretreatment Methods, Detoxification of Hydrolysates,

- Enzymatic Saccharification, and Ethanol Fermentation. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, 2012.
- CARRILLO, F. et al. Effect of alkali pretreatment on cellulase hydrolysis of wheat straw: Kinetic study. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 10, p. 3360-3364, 2005.
- CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L.C.; GÍRIO, F.M. Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 67, n. 11, p. 849-864, 2008.
- CARVALHO, M.L. et al. Kinetic study of the enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**. v.30, n.3, p.437-447, 2013.
- CERRI, C.C. et al. Effect of sugarcane harvesting systems on soil carbon stocks in Brazil: an examination of existing data. *European Journal of soil Science*, v.62, p.23-28, 2011.
- CHRASTIL, J. Enzymic product formation curves with the normal or diffusion limited reaction-mechanism and in the presence of substrate receptors. **International Journal of Biochemistry**, v. 20, n. 7, p. 683-693, 1988.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **A Geração Termoelétrica com a Queima do Bagaço de Cana-de-Açúcar no Brasil - Análise do Desempenho da Safra 2009-2010**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>. Acesso em 30 de setembro de 2014.
- COSTA, S.M. et al. Use of sugar cane straw as a source of cellulose for textile fiber production. **Industrial Crops and Products**, v. 42, p 189-194, 2013.
- CRUZ, S.F. **Síntese e caracterização de metilcelulose produzida a partir do caroço de manda para aplicação como aditivo em argamassas**. Tese de Doutorado, 2011. Universidade Federal de Uberlândia.
- DASARI, R.K.; BERSON, R. E. The effect of particle size on hydrolysis reaction rates and rheological properties in cellulosic slurries. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 137, p. 289-299, 2007.

- DE CASTRO, A.M.; PEREIRA, N.JR. Production, properties and application of cellulases in the hydrolysis of agroindustrial residues. **Quimica Nova**, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.
- DE CARVALHO, D.M. et al. Ethanol-soda pulping of sugarcane bagasse and straw. **Cellulose Chemistry and Technology**, v. 48, n. 3-4, p. 355-364, 2014.
- DING, S.Y.; HIMMEL, M.E. The maize primary cell wall microfibril: A new model derived from direct visualization. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.54, p.597–606, 2006.
- DODD, D.; CANN, I.K.O. Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. **Bioenergy**. v.1, p. 2-17, 2009.
- DUFF, S.J.B., MURRAY, W.D. Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: a review. **Bioresource Technology**, v.55, p.1–33, 1996.
- EMMEL, A. **Caracterização do efeito da explosão a vapor sobre as propriedades físico-químicas da lignina de Eucalyptus grandis**. 1999. 141f. Dissertação (Mestrado em Química) -Química Orgânica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba,1999.
- FAN, L.T; LEE, Y.H.; BEARDMORE, D. R.The influence of major structural features of cellulose on rate of enzymatic hydrolysis. **Biotechnology and Bioengineering**, v.23, p.419-424, 1982.
- FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood chemistry, ultrastructure, reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, 1989.
- FIDALEO, M.; LAVECCHIA, R. Kinetic study of enzymatic urea hydrolysis in the pH range 4-9. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, v. 17, n. 4, p. 311-318, 2003.
- FOGLER, H.S. **Elementos de Engenharia das Reações Químicas**; tradução Verônica Caldo, Evaristi C. Biscaia Jr.; 4ª Ed. - Rio de Janeiro: LTC, 2009.
- GALVANI, F.; GAERTNER, E. Adequação da Metodologia Kjeldahl para determinação de Nitrogênio Total e Proteína Bruta. Circular Técnica: EMBRAPA-MS, 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 Biochemical**, v. 38, p. 1003-1018, 2003.
- GAO, Y. et al. Effects of different pretreatment methods on chemical composition of sugarcane bagasse and enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 144, p. 396-400, 2013.
- GHOSE, T.K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.
- GHOSE, T.K. Continuous enzymatic saccharification of cellulose with culture filtrates of trichoderma viride qm 6a. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 11, n. 2, p. 239-261, 1969.
- GÍRIO, F.M. et al. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4775-4800, 2010.
- GOUVEIA, E.R. et al. Validação da metodologia para caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1500-1503, 2009.
- HEITZ, M. et al. Fractionation of Populus tremuloides at the pilot plant scale: Optimization of steam pretreatment conditions using the STAKE II technology. **Bioresource Technology**, v. 35, p. 23-32, 1991.
- HIMMEL, M.E. et al. Biomass recalcitrance: Engineering plants and enzymes for biofuels production. **Science**, v.315, p.804-807, 2007.
- HODGE, D.B. et al. Model-Based Fed-Batch for High-Solids Enzymatic Cellulose Hydrolysis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 152, n. 1, p. 88-107, 2009.
- INTERNATIONAL ENERGY AGENCY. World Energy Outlook 2013. França, 2013.
- INGESSON, H. et al. The effect of shaking regime on the rate and extent of enzymatic hydrolysis of cellulose. **Journal of Biotechnology**, v. 88, n. 2, p. 177-182, 2001.
- JÚNIOR, F.P.A.; ROCHA, B.J.A; NERY, T.B.R. Processo de extração e caracterização térmica da lignina Kraft. In: Desafios e Oportunidades para o desenvolvimento

industrial no estado da Bahia. **IV Workshop de Pesquisa, Tecnologia e Inovação PTI**. Bahia: SENAI CIMATEC, 2014.

KADAM, K.L.; RYDHOLM, E.C.; McMILLAN, J. D. Development and validation of a kinetic model for enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass. **Biotechnology Progress**, v. 20, n. 3, p. 698-705, 2004.

KIM, D.W. et al. Adsorption-kinetics and behaviors of cellulase components on microcrystalline cellulose. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 73, n. 6, p. 461-466, 1992.

KIM, D.S. et al. Evaluation of hot compressed water pretreatment and enzymatic saccharification of tulip tree sawdust using severity factors. **Bioresource Technology**, v. 144, p. 460-466, 2013.

KIM, Y. et al. Severity Factor Coefficients for Subcritical Liquid Hot Water Pretreatment of Hardwood Chips. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 111, n. 2, p. 254-263, 2014.

KLINKE H. B.; THOMSEN A. B.; AHRING B. K. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.66, p.10–26, 2004.

KOOTSTRA, A.M.J. et al. Differential effects of mineral and organic acids on the kinetics of arabinose degradation under lignocellulose pretreatment conditions. **Biochemical Engineering Journal**, v. 43, p. 92-97, 2009.

KRAULIS, P. J. et al. Determination of the 3-dimensional solution structure of the c-terminal domain of cellobiohydrolase-i from trichoderma-reesei - a study using nuclear magnetic-resonance and hybrid distance geometry dynamical simulated annealing. **Biochemistry**, v. 28, n. 18, p. 7241-7257, 1989.

KRISTENSEN, J. B. et al. Use of surface active additives in enzymatic hydrolysis of wheat straw lignocellulose. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 4, p. 888-895, 2007.

KRISTENSEN, J.B. Enzymatic hydrolysis of lignocellulose. Substrate interactions and high solids loadings. **Forest & Landscape Research**, n. 42, p. 1-138, Forest & Landscape Denmark. Frederiksberg, 2009.

- KRISTENSEN, J. B.; FELBY, C.; JORGENSEN, H. Yield-determining factors in high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Biotechnology for Biofuels**, v. 2, 2009.
- KUMAR, P; BARRETT, D.M; DELWICHE, M.J; STROEVE, P. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 48, n. 8, p. 3713–3729, 2009.
- LAN, T.Q.; LOU, H.; ZHU, J.Y. Enzymatic Saccharification of Lignocelluloses Should be Conducted at Elevated pH 5.2-6.2. **Bioenergy Research**, v. 6, n. 2, p. 476-485, 2012.
- LEAL, M.R.L.V. et al. Sugarcane straw availability, quality, recovery and energy use: A literature review. **Biomass & Bioenergy**, v. 53, p. 11-19, 2013.
- LEE, Y.H.; FAN, L.T. Kinetic-studies of enzymatic-hydrolysis of insoluble cellulose - analysis of the initial rates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 24, n. 11, p. 2383-2406, 1982.
- LEVENBERG, K. A method for the solution of certain non-linear problems in least squares. **Quarterly Journal of Applied Mathematics**. v.2, n.2, p.164-168, 1944.
- LI, C. Z. et al. A kinetic study on enzymatic hydrolysis of a variety of pulps for its enhancement with continuous ultrasonic irradiation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 19, n. 2, p. 155-164, 2004.
- LI, H.-Q. et al. pH pre-corrected liquid hot water pretreatment on corn stover with high hemicellulose recovery and low inhibitors formation. **Bioresource Technology**, v. 153, p. 292-299, 2014.
- LIAO, W. et al. Kinetic modeling of enzymatic hydrolysis of cellulose in differently pretreated fibers from dairy manure. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 101, n. 3, p. 441-451, 2008.
- LIMAYEM, A.; RICKE, S.C. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 38, n. 4, p. 449-467, 2012.

- LOU, H. et al. Reducing non-productive adsorption of cellulase and enhancing enzymatic hydrolysis of lignocelluloses by noncovalent modification of lignin with lignosulfonate. **Bioresource Technology**, v. 146, p. 478-484, 2013.
- LYND, L.R.; WYMAN, C.E.; GERNGROSS, T.U. Biocommodity engineering. **Biotechnology Progress**, v. 15, n. 5, p. 777-793, 1999.
- LYND, L.R. et al. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v.66, n.3, p. 506-577, 2002.
- LYND, L.R. et al. How biotech can transform biofuels. **Nature Biotechnology**, v.26, p.169-172, 2008.
- MACEDO, I.C. **Geração de energia elétrica a partir de biomassa no Brasil: situação atual, oportunidades e desenvolvimento**. Brasília: Centro de Gestão e Estudos Estratégicos – CGEE, 2001.
- MAEDA, R.N. et al. Enzymatic hydrolysis of pretreated sugar cane bagasse using *Penicillium funiculosum* and *Trichoderma harzianum* cellulases. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 5, p. 1196-1201, 2011.
- MANECHINI, C; RICCI JÚNIOR, A; DONZELLI, J. L. Benefits and problems of trash left in the field. In: HASSUANI, S. J; LEAL, M.R.L.V; MACEDO, I.C. Biomass power generation: sugarcane bagasse and trash. Piracicaba, SP: PNDU-CTC, p.19-23, 2005
- MANSFIELD, S.D., MOONEY, C., SADDLER, J.N. Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis. **Biotechnology Progress**, v. 15, p.804-816, 1999.
- MENDES, C.V.T.; ROCHA, J.M.S.; CARVALHO, M.G.V.S. Valorization of Residual Streams from Pulp and Paper Mills: Pretreatment and Bioconversion of Primary Sludge to Bioethanol. **Industrial and Engineering Chemistry Research**. v. 53, p. 19398–19404, 2014.
- MENG, X; RAGAUSKAS, A. Recent advances in understanding the role of cellulose accessibility in enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates. **Current Opinion in Biotechnology**, v.27, p.150–158, 2014.

- MENON, V.; RAO, M. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 38, n. 4, p. 522-550, 2012.
- MIAO, Y.L. et al. Kinetic Studies on the Product Inhibition of Enzymatic Lignocellulose Hydrolysis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 167, n. 2, p. 358-366, 2012.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- MOOD, S.H. et al. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p. 77-93, 2013.
- MOONEY, C.A. et al. The effect of fiber characteristics on hydrolysis and cellulase accessibility to softwood substrates. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, n. 8-9, p. 644-650, 1999.
- MORALES-RODRÍGUEZ, R. et al. Controlled fed-batch operation for improving cellulose hydrolysis in 2G bioethanol production, In: **20th European Symposium on Computer Aided Process Engineering – ESCAPE20**, 2010.
- MOSIER, N. S.; LADISCH, C. M.; LADISCH, M. R. Characterization of acid catalytic domains for cellulose hydrolysis and glucose degradation. **Biotechnology Bioengineering**, v. 79, p. 610–618, 2002.
- MOSIER, N. et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 6, p. 673-686, 2005a.
- MOSIER, N. et al. Optimization of pH controlled liquid hot water pretreatment of corn stover. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 18, p. 1986-1993, 2005b.
- MOUTTA, R.D.O.; FERREIRA-LEITÃO, V.S.; DA SILVA BON, E.P. Enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse and straw mixtures pretreated with diluted acid. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 32, n. 1, p. 93-100, 2014.

- MUSSATTO, S. I. et al. The effect of agitation speed, enzyme loading and substrate concentration on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain. **Cellulose**, v. 15, n. 5, p. 711-721, 2008.
- NOVACANA, 2013. **Área plantada de cana-de-açúcar diminuiu 14,7% em 2013, até novembro**. Disponível em: <http://www.novacana.com>. Acessado em 20 de setembro de 2014.
- ODEGA, T.L.; PETRI, D.F.S. Hidrólise enzimática de biomassa. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p.1549-1558, 2010.
- OLIVEIRA, F.M.V. et al. Industrial-scale steam explosion pretreatment of sugarcane straw for enzymatic hydrolysis of cellulose for production of second generation ethanol and value-added products. **Bioresource Technology** v.130, p. 168-173, 2013.
- OLIVEIRA, L.R.M. et al. Combined process system for the production of bioethanol from sugarcane straw. **Industrial Crops and Products**, v. 58, p. 1-7, 2014.
- OOSHIMA, H.; SAKATA, M.; HARANO, Y. Adsorption of cellulase from trichoderma-*viride* on cellulose. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 25, n. 12, p. 3103-3114, 1983.
- OOSHIMA, H., SAKATA, M., HARANO, Y. Enhancement of enzymatic hydrolysis of cellulose by surfactant. **Biotechnology and Bioengineering**, v.28, p.1727–1734, 1986.
- OOSHIMA, H.; BURNS, D.S.; CONVERSE, A.O. Adsorption of cellulase from trichoderma-reesei on cellulose and lignocellulosic residue in wood pretreated by dilute sulfuric-acid with explosive decompression. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 36, n. 5, p. 446-452, 1990.
- OVEREND, R.P.; CHORNET, E.; GASCOIGNE, J.A. Fractionation of lignocellulosics by steam-aqueous pretreatments. **Philosophical Transaction of the Royal Society**, v.32, p.523-536, 1987.
- PALMQVIST, E.; HAHN-HAGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 25-33, 2000.

- PALONEN, H. **Role of lignin in the enzymatic hydrolysis of lignocellulose**. Tese de Doutorado. University of Technology. Finland, 2004.
- PEREZ-CANTU, L. et al. Comparison of pretreatment methods for rye straw in the second generation biorefinery: Effect on cellulose, hemicellulose and lignin recovery. **Bioresource Technology**, v. 142, p.428–435, 2013.
- PEREIRA JUNIOR, N. Biorrefinarias – Rota Bioquímica. In: MELO, L.C.P. **Química Verde no Brasil: 2010-2030**. Brasília: Centro de Gestão e Estudos Estratégicos - CGEE, p.19-76, 2010.
- 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**. 2007. 142 f. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.
- PITARELO, A. P. et al. Efeito do teor de umidade sobre o pré-tratamento a vapor e a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v. 35, n. 8, 2012.
- PROTEC, 2008. **Aproveitamento total da palha de cana-de-açúcar**. Disponível em: <http://www.protec.org.br/noticiais/pagina/2485>. Acessado em 25 de setembro de 2014.
- RIPOLI, T.C.; MOLINA Jr, W.F.; RIPOLI, M.L. Energy potential of sugar cane biomass in Brazil. **Scientia Agricola**, v.57, n.4, p.677-681, 2000.
- ROCHA, G.J.M. et al. A fast and accurate method for determination of cellulose and polyoses by HPLC. In: fifth brazilian symposium on the chemistry of lignins and other wood components, 1997, Curitiba. Proceedings...Curitiba: Sépia Editora e Gráfica, 1997.
- ROCHA, G.J.M. et al. Steam explosion pretreatment reproduction and alkaline delignification reactions performed on a pilot scale with sugarcane bagasse for bioethanol production. v.35, p.274– 279, 2012.
- ROSSETTO, R. et al. Manejo conservacionista e reciclagem de nutrientes em cana-de-açúcar tendo em vista a colheita mecânica. **Informações Agronômicas**, p.8-13, 2008.

- ROUVINEN, J. et al. 3-dimensional structure of cellobiohydrolase-ii from trichoderma-reesei. **Science**, v. 249, n. 4967, p. 380-386, 1990.
- RUBIN, E. M. Genomics of cellulosic biofuels. **Nature**, v. 454, p.841-845, 2008.
- SAAD, M.B.W. et al. Preliminary studies on fungal treatment of sugarcane straw for organosolv pulping. **Enzyme and Microbial Technology**, v.43, p.220-225, 2008.
- SANTOS, F.A. et al. Potencial da palha da cana-de-açúcar para a produção de etanol. **Química Nova**. v. 35, n. 5, p. 1004-1010, 2012.
- SANTOS, F.A. et al. Optimization of hydrothermal pretreatment of cane sugar straw for cellulosic ethanol production. **Química Nova**, v. 37, n. 1, p. 56-62, 2014.
- SARKAR, N. et al. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. **Renewable Energy**, v. 37, p.19-27, 2012.
- SHULER, M.L.; KARGI, F. **Bioprocess Engineering – Basic Concepts**. New Jersey: Prentice Hall, 1992.
- SILVA, R. et al. Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p.661-671, 2009.
- SILVA, N.L.C., Produção de bioetanol de segunda geração a partir da biomassa residual da indústria de celulose. 2010. 123 f. Dissertação (Mestrado Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.
- SINGH, A.; KUMAR, P.K.R.; SCHUGERL, K. Adsorption and reuse of cellulases during saccharification of cellulosic materials. **Journal of Biotechnology**, v. 18, n. 3, p. 205-212, 1991.
- SLUITER, A. et al. Determination of extractives in biomass. Laboratory Analytical Procedure. **National Renewable Energy Laboratory**. Golden: Colorado, 2008.
- SOUSA, R. JR. et al. Recent trends in the modeling of cellulose hydrolysis. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 28, n. 4, p. 545-564, 2011.
- SOUZA, R.B.A.; CRUZ, A.J.G. Pré-tratamento, hidrólise enzimática e fermentação da palha de cana-de-açúcar. In: XIX SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS

- X SIMPÓSIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSAS, 2013, Foz do Iguaçu- PR. **Resumo...** Foz do Iguaçu, 2013
- SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, v. 83, p. 1-11, 2002.
- SUN, Y; CHENG, J. Dilute acid pretreatment of rye straw and bermudagrass for ethanol production. **Bioresource Technology**, v.96, p.1599-1606, 2005.
- SZCZERBOWSKI, D. et al. Sugarcane biomass for biorefineries: Comparative composition of carbohydrate and non-carbohydrate components of bagasse and straw. **Carbohydrate Polymers**, v. 114, p. 95-101, 2014.
- TOQUERO, C.; BOLADO, S. Effect of four pretreatments on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation of wheat straw. Influence of inhibitors and washing. **Bioresource Technology**, v. 157, p. 68-76, 2014.
- UNIÃO DA INDÚSTRIA DA CANA-DE-AÇÚCAR, 2014. **Moagem de cana-de-açúcar e produção de açúcar e etanol – safra 2013/2014**. Disponível em: <http://www.unicadata.com.br>. Acesso em 25 de setembro de 2014.
- URQUIAGA, S. et al. A importância de não queimar a palha na cultura de cana-de-açúcar. Comunicado técnico. **Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária e Centro Nacional de Pesquisa de Biologia do Solo - CNPBS**, n.5, p.1-6, 1991.
- VARGA, E.; RECZEY, K.; ZACCHI, G. Optimization of steam pretreatment of corn stover to enhance enzymatic digestibility. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 113, p. 509-523, 2004.
- VIEIRA, J. G. **Produção de metilcelulose a partir de celulose do bagaço de cana-de-açúcar usando dois agentes metilantes: sulfato de dimetila e iodometano, para aplicação como aditivo na formulação de argamassas**. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Uberlândia, 2012.
- WALKER, L.P.; WILSON, D.B. Enzymatic-hydrolysis of cellulose - an overview. **Bioresource Technology**, v. 36, n. 1, p. 3-14,1991.
- WYMAN, C.E. Ethanol from lignocellulosic biomass: technology, economics, and opportunities. **Bioresource Technology**, v. 50, p. 3-16, 1994.

- WYMAN, C.E. et al. Comparative sugar recovery data from laboratory scale application of leading pretreatment technologies to corn stover. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 18, p. 2026-2032, 2005.
- XU, Z.; HUANG, F. Pretreatment Methods for Bioethanol Production. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v.174, p. 43–62, 2014.
- YANG, B.; WYMAN, C.E. Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. **Biofuels Bioproducts & Biorefining-Biofpr**, v. 2, n. 1, p. 26-40, 2008.
- YANG, B. et al. Enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass. **Biofuels**, v.2, n.4, p.421-450, 2011.
- YEH, A.-I.; HUANG, Y.-C.; CHEN, S.H. Effect of particle size on the rate of enzymatic hydrolysis of cellulose. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 1, p. 192-199, 2010.
- YU, Q. et al. Liquid hot water pretreatment of sugarcane bagasse and its comparison with chemical pretreatment methods for the sugar recovery and structural changes. **Bioresource Technology**, v. 129, p. 592-598, 2013.
- ZENG, Y. et al. Lignin plays a negative role in the biochemical process for producing lignocellulosic biofuels. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 27, p. 38-45, 2014.
- ZHANG, Y.H.P.; LYND, L.R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Non complexed systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 88, p.797-824, 2004.
- ZHENG, Y. et al. Adsorption characteristics of cellulose and β -glucosidase to lignin, cellulose and pretreated creeping wild ryegrass. **Annual International Meeting Sponsored by ASABE**, 2007.
- ZHENG, Y. et al. Kinetic Modeling for Enzymatic Hydrolysis of Pretreated Creeping Wild Ryegrass. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, n. 6, p. 1558-1569, 2009.