

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA**  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO:  
**DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS QUÍMICOS**

**MODELAGEM MATEMÁTICA DO PROCESSO DE HIDRÓLISE  
ENZIMÁTICA DO BAGAÇO DE CANA-DE- AÇÚCAR SUBMETIDO  
A DIFERENTES PRÉ-TRATAMENTOS**

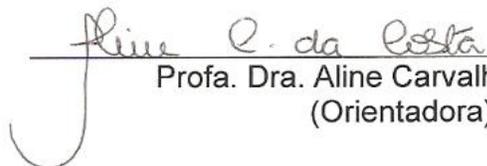
Autor: João Moreira Neto  
Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Aline Carvalho da Costa

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

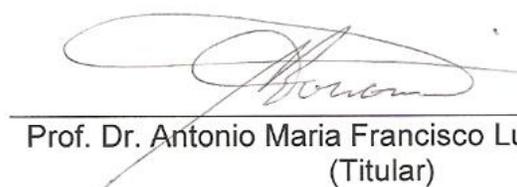
Campinas - São Paulo  
Maio de 2011



Dissertação de Mestrado defendida por João Moreira Neto e aprovada em 16 de maio de 2011 pela banca examinadora constituída pelos doutores:

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Aline Carvalho da Costa  
(Orientadora)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Carlos Eduardo Vaz Rossell  
(Titular)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Antonio Maria Francisco Luiz José Bonomi  
(Titular)



Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado em Engenharia Química defendida por João Moreira Neto.

*Aline C. da Costa*

---

Prof. Dra. Aline Carvalho da Costa  
(Orientadora)



*Dedico este trabalho a meus pais, Renato e Rita,  
a meus irmãos, Renato e Caio, pela amizade e  
apoio. À Deus por sempre colocar as pessoas  
certas na hora certa em minha vida.*



## AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me ajudado a vencer mais uma etapa e sem ele nada seria possível e nunca encontraria forças para enfrentar as adversidades em minha vida.

Aos meus pais, Renato e Rita, pela educação, amor, carinho e apoio nas minhas escolhas. Mesmo com tantas dificuldades sempre buscaram o melhor para mim e aos meus irmãos.

Agradeço também aos meus irmãos, Renato e Caio, pela paciência durante todos esses anos de convivência e pelo incentivo durante todos os anos longe. Os amo muito.

A minha orientadora, Profa. Dra. Aline Carvalho da Costa, pela orientação, confiança, entusiasmo durante todo o trabalho e imensa colaboração na elaboração dessa dissertação.

Aos meus amigos do Laboratório de Otimização, Projeto e Controle Avançado (LOPCA), Igor, Elmer, Edvaldo, Cristiano, Nadson, Arturo e todos os outros companheiros que me ajudaram sempre que podiam tanto no aspecto profissional e acadêmico como nas relações de amizade.

As alunas do Laboratório de Engenharia de Processos Fermentativos e Enzimáticos (LEPFE) que me forneceram os dados experimentais para desenvolver essa dissertação.

Aos meus companheiros de república Gustavo Ponce, conhecido como Sabão, e Moisés Alves pelo companherismo e por serem bons amigos. São pessoas que tenho muita estima e apreço.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro, sem o qual a realização desse trabalho seria impossível.



## RESUMO

Este trabalho teve como objetivo estudar a modelagem matemática da hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar submetido a três tipos de pré-tratamentos (peróxido de hidrogênio alcalino, ácido fosfórico + hidróxido de sódio e hidróxido de cálcio). O modelo cinético de sacarificação e fermentação simultâneas desenvolvido por PHILIPPIDIS *et al.* (1992, 1993) e PHILIPPIDIS e HATZIS (1997) foi adaptado para representar os dados experimentais do processo de hidrólise enzimática em batelada com 3% de bagaço de cana seco pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino. A partir do modelo desenvolvido foi possível obter perfis de concentração dos principais componentes do processo. A estimativa simultânea dos parâmetros cinéticos do modelo matemático foi realizada pelo algoritmo genético (AG) Pikaia. Os dados utilizados no procedimento de estimação descrevem os perfis de glicose em função da concentração de enzimas (1,67 – 30 FPU/g de biomassa seca pré-tratada e 7,33 – 50 CBU/g de biomassa seca pré-tratada) e tempo de residência (0 – 72 h) durante a hidrólise. A metodologia de planejamento Plackett-Burman (PB) foi aplicada para identificar os parâmetros cinéticos que mais influenciam o comportamento dinâmico das variáveis de processo. Na etapa de re-estimação de parâmetros foram considerados dados experimentais de glicose para bagaço pré-tratado com ácido fosfórico + hidróxido de sódio e bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio (cal). A metodologia de estimação de parâmetros usando algoritmo foi capaz de prever de forma satisfatória o conjunto de dados experimentais de glicose para bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino. Para o bagaço pré-tratado com ácido fosfórico + hidróxido de sódio o modelo atualizado conseguiu reproduzir de forma acurada tanto o conjunto de dados utilizados no procedimento de estimação de parâmetros como os usados na validação do modelo. Já para os dados de bagaço pré-tratado com cal o modelo não conseguiu descrever alguns dados experimentais.

Palavras-chave: Bagaço de cana, Hidrólise enzimática, Modelagem de processos, Estimativa de parâmetro.



## ABSTRACT

This work aimed to study the mathematical modeling of enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse subjected to three types of pretreatments (alkaline hydrogen peroxide, phosphoric acid + sodium hydroxide and calcium hydroxide). The kinetic model of simultaneous saccharification and fermentation developed by PHILIPPIDIS *et al.* (1992, 1993) and PHILIPPIDIS and HATZIS (1997) was adapted to represent the experimental data of the batch process of enzymatic hydrolysis of 3% of dry sugarcane bagasse pretreated with alkaline hydrogen peroxide. From the model developed was possible to obtain concentration profiles of the main components of the process. The simultaneous estimation of kinetic parameters of the mathematical model was performed using the Pikaia genetic algorithm (GA). The data used in the estimation procedure describe the profiles of glucose as function of enzymes concentration (1.67 – 30 FPU/g dry pretreated biomass and 7.33 – 50 CBU/g dry pretreated biomass) and residence time (0–72 h) during hydrolysis. Plackett-Burman (PB) designs were used to identify the kinetic parameters with the higher influence on the dynamic behavior of the process variables. In the step of re-estimation of parameters experimental data of glucose for bagasse pretreated with phosphoric acid + sodium hydroxide and bagasse pretreated with calcium hydroxide (lime) were considered. The methodology of parameter estimation using genetic algorithm was able to predict accurately the experimental data set of glucose for bagasse pretreated with alkaline hydrogen peroxide. For bagasse pretreated with phosphoric acid + sodium hydroxide the updated model was able to reproduce accurately both the data set used in the parameter estimation procedure and the data used for model validation. As for the data of bagasse pretreated with lime the model failed to describe some experimental data.

Key-words: Sugarcane bagasse, Enzymatic hydrolysis, Process modeling, Parameter estimation.



## SUMÁRIO

RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xii
LISTA DE FIGURAS .....	xxviii
LISTA DE TABELAS.....	xxxivi
CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Objetivo .....	4
1.2. Organização do trabalho.....	4
CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
2.1. A Cana-de-Açúcar .....	6
2.2. Biomassa Lignocelulósica .....	7
2.2.1. Celulose .....	9
2.2.2. Hemicelulose .....	12
2.2.3. Lignina.....	13
2.2.4. Outras Substâncias.....	15
2.3. Pré-tratamento .....	16
2.3.1. Pré-tratamentos Físicos.....	22
2.3.2. Pré-tratamentos Físico-Químicos .....	22
2.3.3. Pré-tratamentos Biológicos.....	22
2.3.4. Pré-tratamento Químico .....	23
2.3.4.1. Pré-tratamento com Hidróxido de Cálcio (cal).....	23
2.3.4.2. Pré-tratamento com Peróxido de Hidrogênio Alcalino .....	25
2.4. Hidrólise de biomassa lignocelulósica .....	27
2.4.1. Hidrólise ácida.....	27
2.4.1.1. Hidrólise com ácido diluído .....	27
2.4.1.2. Hidrólise com ácido concentrado .....	28
2.4.2. Hidrólise enzimática .....	29
2.5. As Enzimas Celulolíticas.....	30
2.5.1. Mecanismos da atividade celulolítica.....	32
2.5.2. Constituição Estrutural das celulases .....	33
2.5.3. Endoglicanase (EGs) .....	35
2.5.4. Celobiohidrolases (CBs).....	36

2.5.5. $\beta$ -glicosidases (BGs).....	39
2.5.6. Sinergismo entre as Enzimas Celulolíticas.....	39
2.6. Fatores que afetam a hidrólise enzimática.....	40
2.7. Mecanismos de reação de hidrólise enzimática.....	42
2.8. Modelagem da hidrólise enzimática em biomassa lignocelulósica .....	43
2.9. Classe de modelos .....	45
2.9.1. Modelos Empíricos.....	45
2.9.2. Modelos baseados em Michaelis – Menten.....	48
2.9.3. Adsorção nos modelos de hidrólise de celulose .....	54
2.10. Otimização global e local .....	56
2.10.1. Algoritmo genético .....	57
2.10.1.1. Terminologia .....	60
2.10.1.2. Codificação.....	61
2.10.1.3. Geração da população inicial.....	62
2.10.1.4. Mecanismos de seleção .....	63
2.10.1.5. Operadores genéticos.....	64
2.10.1.5.1. Recombinação ( <i>crossover</i> ) .....	65
2.10.1.5.2. Mutação .....	67
2.10.1.6. Critério de parada .....	69
2.10.1.7. Parâmetros genéticos .....	70
2.11. Planejamento de Experimentos .....	71
2.11.1. Planejamento de Plackett e Burman .....	71
CAPÍTULO 3 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	73
3.1. Parte 1: Dados Experimentais .....	73
3.1.1. Substrato .....	73
3.1.2. Pré-tratamento do bagaço de cana .....	73
3.1.2.1. Pré-tratamento com peróxido de hidrogênio .....	74
3.1.2.2. Pré-tratamento com hidróxido de cálcio .....	74
3.1.2.3. Pré-tratamento com ácido fosfórico + hidróxido de sódio .....	74
3.1.3. Atividade Enzimática .....	75
3.1.4. Hidrólise Enzimática .....	75
3.2. Parte 2: Métodos matemáticos .....	76
3.2.1. Tratamento dos dados experimentais .....	76

3.2.2. Critério de otimização .....	77
3.2.3. Otimização dos parâmetros cinéticos por algoritmo genético .....	77
3.2.4. Re-estimação dos parâmetros mais sensíveis .....	80
CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	82
4.1. Desenvolvimento do modelo de hidrólise enzimática .....	82
4.2. Estimação dos parâmetros cinéticos para bagaço de cana pré-tratado com peróxido de hidrogênio .....	85
4.2.1. Desvios do modelo em relação aos dados experimentais.....	91
4.3. Metodologia de Plackett-Burman (PB) para a seleção dos parâmetros significativos para o problema de reestimação.....	94
4.4. Estimação dos parâmetros cinéticos para bagaço de cana pré-tratado com ácido fosfórico + hidróxido de sódio.....	101
4.5. Estimação dos parâmetros cinéticos para bagaço de cana pré-tratado com hidróxido de cálcio (cal).....	116
CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES.....	125
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	127
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	128
APÊNDICE A.....	160
APÊNDICE B.....	163
APÊNDICE C.....	172

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Fluxograma simplificado para a produção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica (adaptado de KRISTENSEN, 2009).....	2
Figura 2.1: Estrutura típica da biomassa de cana-de-açúcar (BNDES, 2008).....	6
Figura 2.2: Estrutura da parede celular de materiais lignocelulósicos (CANILHA <i>et al.</i> , 2010).....	8
Figura 2.3: Estrutura da cadeia linear da celulose, formada por várias unidades consecutivas de celobiose (TÌMÁR-BALÁZSC e EASTOP, 1998).....	9
Figura 2.4: Representação das ligações de hidrogênio na estrutura supramolecular da celulose (PITARELO, 2007). ....	10
Figura 2.5: Diferentes visões do modo de distribuição da celulose cristalina e amorfa na microfibrila. A: Celulose cristalina está no centro da microfibrila e é envolta pelo substrato amorfo. B: As regiões cristalinas e amorfas são repetidas ao longo da dimensão horizontal.....	11
Figura 2.6: Estrutura dos monossacarídeos que formam as hemiceluloses (FENGEL e WEGENER, 1989). ....	12
Figura 2.7: Estrutura da lignina de <i>Fagus sp</i> (FENGEL e WEGENER, 1989). ....	14
Figura 2.8: Estrutura dos álcoois precursores da lignina (SJÖSTRÖM, 1992).....	14
Figura 2.9: Pré-tratamento nos materiais lignocelulósicos (adaptado de TAHERZADEH <i>et. al.</i> , 2008).....	17
Figura 2.10: Celulase de <i>Trichoderma reesei</i> (SANDGREN <i>et al.</i> , 2005).....	30
Figura 2.11: Representação esquemática dos mecanismos de inversão (A) e retenção (B) da hidrólise enzimática das ligações glicosídicas (DAVIES e HENRISSAT, 1995).....	33
Figura 2.12: Representação esquemática de uma celulase (CAVACO-PAULO, 1995).....	34
Figura 2.13: Sítio ativo (SA) em forma de chave das endoglicanases, que permite o acesso ao longo de uma cadeia de celulose (MARTINS, 2005).....	36
Figura 2.14: Representação do sítio ativo (SA) e do domínio de ligação ao substrato (CBD) da CBH I de <i>Trichoderma reesei</i> (ROCHA DO MONTE, 2009). ..	37

Figura 2.15: Representação do modo de ação da celobiohidrolase I (CBHI) e da celobiohidrolase II (CBH II) de <i>Trichoderma reesei</i> (ROCHA DO MONTE, 2009).....	38
Figura 2.16: Modo de ação das enzimas do complexo celulolítico (CASTRO e PEREIRA, 2010). .....	40
Figura 2.17: Visão simplificada dos principais fatores que limitam a eficiência da hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica (simbolizados por linhas retas) (JØRGENSEN <i>et al.</i> , 2007). .....	41
Figura 2.18: Etapa 1 a 4 para uma celobiohidrolase atuando sobre um substrato celulósico (não em escala). Para endoglicanase, etapas 2 e 3 são diferentes, pois não exigem cadeia terminal para agir. Etapa 1 — Adsorção, etapa 2 — posição no final da cadeia, etapa 3 — formação de um complexo enzima-substrato, etapa 4 — hidrólise da ligação $\beta$ -glicosídica (BANSAL <i>et al.</i> , 2009).....	43
Figura 2.19: Esquema de reação para a modelagem da hidrólise de biomassa lignocelulósica (Adaptado de ZHENG <i>et al.</i> , 2009b).....	44
Figura 2.20: Algoritmo de busca local (RENÓ, 2007).....	57
Figura 2.21: Algoritmo de busca global (RENÓ, 2007).....	57
Figura 2.22: Esquema de um algoritmo genético típico (KONDAGESKI, 2008). .....	59
Figura 2.23: Exemplo do método de roleta para uma população de 4 indivíduos (RIVERA, 2006).....	63
Figura 2.24: Representação da forma de cruzamento em um ponto (VICTORINO, 2005).....	65
Figura 2.25: Representação da forma de cruzamento em dois pontos (VICTORINO, 2005).....	66
Figura 2.26: Representação da forma de cruzamento uniforme (VICTORINO, 2005). .....	66
Figura 2.27: Exemplo de mutação binária onde apenas o 4° bit sofreu mutação (adaptado de VICTORINO, 2005). .....	68
Figura 3.1: Fluxograma para estimação de parâmetros cinéticos utilizando o algoritmo genético Pikaia.....	78

Figura 3.2: Fluxograma geral das etapas de seleção e re-estimação dos parâmetros mais sensíveis na modelagem da cinética de hidrólise de bagaço de cana sob diferentes pré-tratamentos (adaptado de ANDRADE <i>et al.</i> 2009).....	81
Figura 4.1: Mecanismo de hidrólise enzimática de biomassa lignocelulósica contendo duas reações. ....	82
Figura 4.2: Fluxograma para resolução do modelo para cinética de hidrólise enzimática .....	84
Figura 4.3: Dados experimentais e simulados para ensaio 1 (9,652 FPU/g celulose e 12,204 CBU/g celulose). Dados experimentais são para concentração de glicose (■). Curvas simuladas nas concentrações de celobiose (.....), celulose (---) e glicose (—) .....	87
Figura 4.4: Dados experimentais e simulados para ensaio 3 (42,991 FPU/g celulose e 12,204 CBU/g celulose). Dados experimentais são para concentração de glicose (■). Curvas simuladas nas concentrações de celobiose (.....), celulose (---) e glicose (—) .....	87
Figura 4.5: Dados experimentais e simulados para ensaio 4 (42,991 FPU/g celulose e 71,005 CBU/g celulose). Dados experimentais são para concentração de glicose (■). Curvas simuladas nas concentrações de celobiose (.....), celulose (---) e glicose (—). ....	88
Figura 4.6: Dados experimentais e simulados para ensaio 5 (2,774 FPU/g celulose e 41,604 CBU/g celulose). Dados experimentais são para concentração de glicose (■). Curvas simuladas nas concentrações de celobiose (.....), celulose (---) e glicose (—).. ....	88
Figura 4.7: Dados experimentais e simulados para ensaio 6 (49,925 FPU/g celulose e 41,604 CBU/g celulose). Dados experimentais são para concentração de glicose (■). Curvas simuladas nas concentrações de celobiose (.....), celulose (---) e glicose (—)... .....	89
Figura 4.8: Dados experimentais e simulados para ensaio 9 (26,349 FPU/g celulose e 41,604 CBU/g celulose). Dados experimentais são para concentração de glicose (■). Curvas simuladas nas concentrações de celobiose (.....), celulose (---) e glicose (—)... .....	89

Figura 4.9: Validação do modelo. Dados experimentais e simulados para ensaio 2 (9,652 FPU/g celulose e 71,005 CBU/g celulose). Dados experimentais são para concentração de glicose (■). Curvas simuladas nas concentrações de celobiose (.....), celulose (-.-) e glicose (—).....	90
Figura 4.10: Validação do modelo. Dados experimentais e simulados para ensaio 8 (26,349 FPU/g celulose e 83,209 CBU/g celulose). Dados experimentais são para concentração de glicose (■). Curvas simuladas nas concentrações de celobiose (.....), celulose (-.-) e glicose (—).....	90
Figura 4.11: Efeito dos parâmetros cinéticos na concentração de celulose.....	97
Figura 4.12: Efeito dos parâmetros cinéticos na concentração de celobiose.....	97
Figura 4.13: Efeito dos parâmetros cinéticos na concentração de glicose.....	98
Figura 4.14: Predição das condições experimentais do ensaio 1 (11,404 FPU/g celulose e 14,419 CBU/g celulose). Dados experimentais são para concentração de glicose (■). Curvas simuladas nas concentrações de celobiose (.....), celulose (-.-) e glicose (—). <b>a)</b> Simulação sem re-estimação. <b>b)</b> Simulação com re-estimação.....	103
Figura 4.15: Predição das condições experimentais do ensaio 3 (50,793 FPU/g celulose e 14,419 CBU/g celulose). Dados experimentais são para concentração de glicose (■). Curvas simuladas nas concentrações de celobiose (.....), celulose (-.-) e glicose (—). <b>a)</b> Simulação sem re-estimação. <b>b)</b> Simulação com re-estimação.....	104
Figura 4.16: Predição das condições experimentais do ensaio 4 (50,793 FPU/g celulose e 83,890 CBU/g celulose). Dados experimentais são para concentração de glicose (■). Curvas simuladas nas concentrações de celobiose (.....), celulose (-.-) e glicose (—). <b>a)</b> Simulação sem re-estimação. <b>b)</b> Simulação com re-estimação.....	105
Figura 4.17: Predição das condições experimentais do ensaio 5 (3,277 FPU/g celulose e 49,155 CBU/g celulose). Dados experimentais são para concentração de glicose (■). Curvas simuladas nas concentrações de celobiose (.....), celulose (-.-) e glicose (—). <b>a)</b> Simulação sem re-estimação. <b>b)</b> Simulação com re-estimação.....	106

Figura 4.18: Predição das condições experimentais do ensaio 6 (58,985 FPU/g celulose e 49,155 CBU/g celulose). Dados experimentais são para concentração de glicose (■). Curvas simuladas nas concentrações de celobiose (.....), celulose (---) e glicose (—). **a)** Simulação sem re-estimação. **b)** Simulação com re-estimação..... 107

Figura 4.19: Predição das condições experimentais do ensaio 9 (31,131 FPU/g celulose e 49,155 CBU/g celulose). Dados experimentais são para concentração de glicose (■). Curvas simuladas nas concentrações de celobiose (.....), celulose (---) e glicose (—). **a)** Simulação sem re-estimação. **b)** Simulação com re-estimação..... 108

Figura 4.20: Predição das condições experimentais do ensaio 2 (11,404 FPU/g celulose e 83,890 CBU/g celulose). Dados experimentais são para concentração de glicose (■). Curvas simuladas nas concentrações de celobiose (.....), celulose (---) e glicose (—). **a)** Simulação sem re-estimação. **b)** Simulação com re-estimação..... 109

Figura 4.21: Predição das condições experimentais do ensaio 8 (31,131 FPU/g celulose e 98,309 CBU/g celulose). Dados experimentais são para concentração de glicose (■). Curvas simuladas nas concentrações de celobiose (.....), celulose (---) e glicose (—). **a)** Simulação sem re-estimação. **b)** Simulação com re-estimação..... 110

Figura 4.22: Dados experimentais e simulados para ensaio 1 (9,595 FPU/g celulose e 12,131 CBU/g celulose). Dados experimentais são para concentração de glicose (■). Curvas simuladas nas concentrações de celobiose (.....), celulose (---) e glicose (—).. 117

Figura 4.23: Dados experimentais e simulados para ensaio 2 (9,595 FPU/g celulose e 70,582 CBU/g celulose). Dados experimentais são para concentração de glicose (■). Curvas simuladas nas concentrações de celobiose (.....), celulose (---) e glicose (—).. 118

Figura 4.24: Dados experimentais e simulados para ensaio 3 (42,735 FPU/g celulose e 12,131 CBU/g celulose). Dados experimentais são para concentração de glicose (■). Curvas simuladas nas concentrações de celobiose (.....), celulose (---) e glicose (—).. 118

Figura 4.25: Dados experimentais e simulados para ensaio 4 (42,735 FPU/g celulose e 70,582 CBU/g celulose). Dados experimentais são para concentração de glicose (■). Curvas simuladas nas concentrações de celobiose (.....), celulose (---) e glicose (—)..	119
Figura 4.26: Dados experimentais e simulados para ensaio 5 (2,757 FPU/g celulose e 41,356 CBU/g celulose). Dados experimentais são para concentração de glicose (■). Curvas simuladas nas concentrações de celobiose (.....), celulose (---) e glicose (—)..	119
Figura 4.27: Dados experimentais e simulados para ensaio 6 (49,628 FPU/g celulose e 41,356 CBU/g celulose). Dados experimentais são para concentração de glicose (■). Curvas simuladas nas concentrações de celobiose (.....), celulose (---) e glicose (—)..	120
Figura 4.28: Dados experimentais e simulados para ensaio 8 (26,192 FPU/g celulose e 82,713 CBU/g celulose). Dados experimentais são para concentração de glicose (■). Curvas simuladas nas concentrações de celobiose (.....), celulose (---) e glicose (—)..	120
Figura 4.29: Dados experimentais e simulados para ensaio 9 (26,192 FPU/g celulose e 41,356 CBU/g celulose). Dados experimentais são para concentração de glicose (■). Curvas simuladas nas concentrações de celobiose (.....), celulose (---) e glicose (—)..	121
Figura 4.30: Dados experimentais para concentração de glicose ao final da hidrólise enzimática (72 horas de reação) para bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio.....	122
Figura 4.31: Gráfico Pareto dos efeitos padronizados das concentrações de celulase e $\beta$ -glicosidase para a concentração de glicose final..	124

## LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1: Composição Química dos materiais lignocelulósicos (CASTRO e PEREIRA, 2010)..	7
Tabela 2.2: Resumo dos métodos de pré-tratamentos para biomassa lignocelulósica (TAHERZADEH <i>et. al</i> , 2008 ).....	19
Tabela 2.3: Distribuição das enzimas que compõem o complexo celulásico nas cepas de <i>Trichoderma</i> , <i>Humicola</i> e <i>Penicillium</i> (ANDERSEN, 2007). .....	32
Tabela 2.4: Principais características de algumas enzimas celulolíticas utilizadas na hidrólise da biomassa lignocelulósica (ANDERSEN, 2007). .....	35
Tabela 2.5: Modelos Empíricos (BG – $\beta$ -glicosidase) (BANSAL <i>et al.</i> , 2009).....	46
Tabela 2.6: Modelos baseados em Michaelis – Menten e Adorção. (M-M: Michaelis – Menten, PI — Inibição por produto, QSS — Suposição de Estado Pseudo-Estacionário, Ads — Abordagem de adsorção, BG – $\beta$ -glicosidase) (Adaptado de BANSAL <i>et al.</i> , 2009). .....	49
Tabela 3.1: Composição química do bagaço sem pré-tratamento e submetido a diferentes pré-tratamentos.....	74
Tabela 3.2: Matriz de planejamento para os ensaios destinados à variação das concentrações das enzimas celulase e $\beta$ -glicosidase. ....	76
Tabela 4.1: Principais características técnicas usadas pelo algoritmo genético Pikaia.....	85
Tabela 4.2: Parâmetros estimados pelo AG Pikaia para dados de bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino.....	86
Tabela 4.3: Comparação entre o desvio padrão residual, RSD(%), e o coeficiente de correlação, COR(%), para caracterizar a qualidade da predição do modelo cinético para bagaço de cana pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino.....	93
Tabela 4.4: Nível inferior (-) e superior (+) dos parâmetros utilizados no planejamento Plackett – Burman.....	95
Tabela 4.5: Matriz de planejamento Plackett – Burman contendo 9 parâmetros cinéticos .....	96
Tabela 4.6: Efeito dos parâmetros cinéticos nas variáveis no início da hidrólise (até 10 h).....	99

Tabela 4.7: Efeito dos parâmetros cinéticos nas variáveis ao final da hidrólise.....	99
Tabela 4.8: Parâmetros estimados pelo AG Pikaia para dados de bagaço pré-tratado com ácido fosfórico + hidróxido de sódio.....	102
Tabela 4.9: Desvio padrão residual, RSD(%), usado para caracterizar a qualidade da predição do modelo cinético com parâmetros re-estimados para bagaço de cana pré-tratado com ácido fosfórico + hidróxido de sódio.....	111
Tabela 4.10: Rendimento em glicose para os ensaios simulados de bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio e bagaço pré-tratado com ácido fosfórico + hidróxido de sódio .....	112
Tabela 4.11: Parâmetros cinéticos estimados por AG Pikaia para dados de bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio e bagaço pré-tratado com ácido fosfórico + hidróxido de sódio.....	112
Tabela 4.12: Parâmetros estimados pelo AG Pikaia para dados de bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio (cal).....	116

## NOMENCLATURA

### Letras latinas

$B$	concentração de celobiose (g/L)
$C$	concentração de celulose (g/L)
$E$	função objetivo
$enzc$	atividade da enzima celulase (FPU/g celulose)
$enzg$	atividade da enzima $\beta$ -glicosidase (FPU/g celulose)
$G_e$	concentração de glicose (g/L)
$k_1$	máxima taxa específica de hidrólise de celulose à celobiose ( $h^{-1}$ )
$k_2$	taxa específica de hidrólise de celobiose à glicose (g/(CBU·h))
$K_1$	taxa específica concentrada de hidrólise da celulose à celobiose ( $h^{-1}$ )
$K_2$	taxa específica concentrada de hidrólise da celobiose à glicose (g/(L·h))
$K_{eq}$	constante de saturação para adsorção da enzima celulase (g/L)
$K_L$	constante de adsorção da enzima $\beta$ -glicosidase à lignina (L/g)
$K_m$	constante de saturação da celobiose a $\beta$ -glicosidase (g/L)
$K_{1B}$	constante de inibição da enzima celulase por celobiose (g/L)
$K_{1G}$	constante de inibição da enzima celulase por glicose (g/L)
$K_{2G}$	constante de inibição da enzima $\beta$ -glicosidase por glicose (g/L)
$L$	concentração de lignina (g/L)
$r_1$	taxa volumétrica de hidrólise de celulose a celobiose (g/(L·h))
$r_2$	taxa volumétrica de hidrólise de celobiose a glicose (g/(L·h))
$t$	tempo (h)
$X$	conversão da celulose

### Letras gregas

$\theta$	vetor com os parâmetros cinéticos a serem otimizados
$\lambda$	taxa de diminuição na área superficial específica de celulose ( $h^{-1}$ )

## Abreviaturas

<i>Ads</i>	abordagem de adsorção
<i>BG</i>	$\beta$ -glicosidase
<i>CrI</i>	índice de cristalinidade
<i>CBH</i>	celobiohidrolase
<i>EG</i>	endoglicanase
<i>FPU</i>	unidades de papel de filtro
<i>g.b.s</i>	grama de bagaço seco
<i>M-M</i>	Michaelis – Menten
<i>QSS</i>	suposição de estado pseudo-estacionário
<i>rpm</i>	rotações por minuto

## Siglas

<i>AG</i>	algoritmo genético
<i>BET</i>	Brunauer-Emmett-Teller
<i>CBD</i>	cellulose binding domain
<i>CBM</i>	cellulose binding module
<i>DC</i>	domínio catalítico
<i>DLS</i>	domínio de ligação ao substrato
<i>ETBE</i>	etil terc-butil éter
<i>GEE</i>	gases de efeito estufa
<i>GP</i>	grau de polimerização
<i>LEPFE</i>	Laboratório de Processo Fermentativos e Enzimáticos
<i>HPLC</i>	High Performance Liquid Chromatography
<i>HSF</i>	hidrólise separada da fermentação
<i>MTBE</i>	metil terc-butil éter
<i>SA</i>	sítio ativo
<i>SSF</i>	sacarificação simultânea à fermentação
<i>UNICAMP</i>	Universidade Estadual de Campinas



# CAPÍTULO 1

## INTRODUÇÃO

Atualmente os derivados de petróleo compõem cerca de 95% dos combustíveis utilizados no setor de transportes no mundo, mas as desvantagens de seu uso (emissão de Gases de Efeito Estufa (GEE), poluição, depleção de recursos e desequilíbrio nas relações de oferta e demanda) vêm exigindo a busca por alternativas. Nas próximas décadas os biocombustíveis têm potencial para substituir parcelas significativas de petróleo em todo o mundo, e uma tendência clara nesta direção já pode ser vista (SEABRA, 2008).

O Bioetanol é uma fonte de combustível renovável e limpa, que tem sido identificada como uma importante alternativa ao petróleo por uma variedade de razões econômicas, ambientais e estratégicas (HSU, 1996).

Como combustível, as características do etanol quanto a emissões derivam de: possuir baixa toxicidade, comparado com o diesel e gasolina; ter 34,7% de oxigênio, exigindo menor relação ar/combustível, gerando emissões menores; não ter enxofre; ter menor reatividade fotoquímica que os hidrocarbonetos no diesel e gasolina, reduzindo as emissões de precursores de “*smog*” fotoquímico; como molécula única, com menor teor de carbono, quase não forma particulados; ser biodegradável. Finalmente, como elevador de octanagem, substitui aditivos como o metil terc-butil éter (MTBE), etil terc-butil éter (ETBE), chumbo, e outros com emissões indesejáveis (MACEDO e NOGUEIRA, 2005).

A cana-de-açúcar apresenta uma das maiores taxas de conversão fotossintética entre as culturas comerciais de grande escala, e sua produção atual é superior a 1,4 bilhão de tonelada (colmos), em mais de 100 países no mundo (SEABRA, 2008). O Brasil, hoje, é o mais competitivo entre todos, tanto na produção de cana quanto na de seus derivados (açúcar e etanol). Isto é conseguido sem irrigação, sendo feito em condições muito favoráveis de sustentabilidade nos aspectos ambientais.

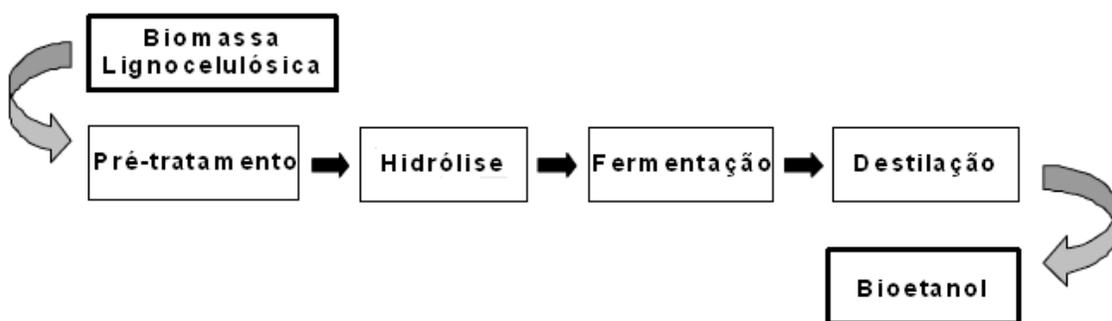
Há algum tempo, o etanol de cana-de-açúcar é alvo de debates relacionando a competição de biocombustíveis e alimentos pelo uso de terras nobres, onde plantações de cana-

de-açúcar estariam ocupando terras destinadas à produção de soja e trigo. Neste contexto o uso de materiais lignocelulósicos para produção de etanol surge como opção de destaque, pois permitiria a utilização de resíduos agrícolas para a produção de etanol.

Para o Brasil a opção mais natural é a utilização dos resíduos da própria cana para a produção de mais etanol nas usinas. O uso do bagaço como matéria prima apresenta uma série de vantagens: está disponível em grandes quantidades, está pronto para uso no local, evitando aumento de custo devido ao transporte (OLIVÉRIO e HILST, 2005) e há a possibilidade de integração com o processo já existente nas usinas de açúcar e destilarias, usando a infra-estrutura existente.

Com o uso do bagaço pode-se conseguir um aumento significativo na produção de etanol sem aumentar a área plantada, sendo possível a redução dos custos de produção, por se tratar de resíduo proveniente das próprias indústrias.

A obtenção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos envolve a hidrólise dos polissacarídeos da biomassa em açúcares fermentescíveis e a sua posterior fermentação para a produção do etanol. As principais etapas envolvidas na produção de etanol celulósico estão apresentadas na Figura 1.1, onde a etapa de pré-tratamento prepara a biomassa para a etapa de hidrólise. Após a hidrólise, os açúcares são fermentados em etanol e por último o etanol pode ser separado através da destilação.



**Figura 1.1:** Fluxograma simplificado para a produção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica (adaptado de KRISTENSEN, 2009).

Em geral, os materiais lignocelulósicos apresentam uma estrutura complexa e compacta sendo necessário submeter esta biomassa à pré-tratamentos físicos e/ou químicos antes da sua hidrólise para produção de etanol. Esta etapa é responsável pela remoção de lignina e hemicelulose, redução da cristalinidade da celulose e aumento da porosidade do material, de maneira a tornar a celulose susceptível à hidrólise.

A utilização de biomassa para a produção de álcool combustível pela rota química e/ou biológica envolve, basicamente, dois processos: hidrólise dos polissacarídeos contidos nos materiais lignocelulósicos em açúcares e a fermentação destes em etanol ou outros combustíveis.

A hidrólise ácida de biomassa é um método rápido e bem conhecido, no entanto para o desenvolvimento do processo são necessários: a utilização de materiais resistentes à corrosão, os quais possuem custo elevado e altas temperaturas que correspondem eventualmente a altas pressões (MARTÍN *et al.*, 2007). Além disso, o processo gera produtos que inibem a fermentação posterior.

Como o processo enzimático é conduzido em condições amenas (pH 4,8 e temperatura entre 45-50 °C), o custo de utilidades é relativamente baixo (SUN e CHENG, 2002), além de permitir maiores rendimentos e apresentar baixo custo de manutenção (não há problema de corrosão) (HAMELINK *et al.*, 2005). Por conta de seu grande potencial de evolução, muitos especialistas veem a hidrólise enzimática como chave para a produção de etanol a um custo competitivo no longo prazo (DIPARDO, 2000; LYND *et al.*, 1996).

A descrição quantitativa da hidrólise enzimática através de modelagem matemática é de grande importância, não só para ajudar no entendimento dos mecanismos envolvidos, mas também para auxiliar nas várias etapas de implementação de um processo, podendo ser usado para projeto de reatores, como simulador e para projeto de otimizadores e controladores. No entanto, a modelagem da hidrólise enzimática da celulose é bastante complexa, já que há múltiplas enzimas envolvidas, a reação é heterogênea (o substrato é insolúvel) e as características estruturais do substrato são modificadas durante a hidrólise.

Muitos modelos matemáticos para a hidrólise enzimática da celulose foram desenvolvidos para substratos modelo como Avicel (ANDERSEN, 2007) ou Solka Floc (HOLTZAPPLE *et al.*, 1984). No entanto, o efeito da lignina é omitido nestes modelos. Além da escassez de modelos matemáticos considerando o bagaço de cana como matéria-prima, não se

encontra na literatura uma discussão sobre o que ocorre com os parâmetros cinéticos do modelo quando diferentes tipos de pré-tratamentos são utilizados.

### **1.1. Objetivo**

O objetivo deste trabalho foi o estudo da modelagem matemática da hidrólise enzimática de bagaço de cana de açúcar e a avaliação da necessidade de re-estimação dos parâmetros cinéticos quando consideramos bagaços submetidos a diferentes pré-tratamentos.

Para isso as seguintes etapas foram seguidas:

- 1- Desenvolvimento do modelo cinético para hidrólise enzimática;
- 2- Estimação dos parâmetros do modelo matemático utilizando perfis experimentais de hidrólise enzimática de bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino;
- 3- Determinação dos parâmetros mais sensíveis do modelo usando planejamento de Plackett-Burman;
- 4- Re-estimação dos parâmetros mais sensíveis para descrição de dados experimentais de hidrólise enzimática utilizando bagaço pré-tratado com ácido fosfórico + hidróxido de sódio e bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio (cal).

### **1.2. Organização do Trabalho**

O relatório está organizado da seguinte forma:

O Capítulo 2, “Revisão Bibliográfica”, apresenta os principais temas a serem abordados neste trabalho de pesquisa, bem como ao estudo e aprofundamento dos fundamentos teóricos e novos avanços relacionados à modelagem matemática da cinética de hidrólise enzimática e técnicas de re-estimação de parâmetros cinéticos.

No Capítulo 3, “Materiais e Métodos”, é apresentada a descrição dos dados experimentais utilizados neste trabalho e a metodologia empregada nas etapas de ajuste de parâmetros e atualização do modelo frente a novas condições de pré-tratamento do bagaço de cana.

No Capítulo 4, “Resultado e Discussões”, foram mostradas as simulações utilizando o modelo com parâmetros ajustados aos dados de bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio, avaliação da influência dos parâmetros cinéticos no modelo através da metodologia de Plackett-

Burman, validação do modelo e estimação dos parâmetros mais significativos para representar dados provenientes de bagaço pré-tratado com ácido fosfórico+hidróxido de sódio e bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio.

No Capítulo 5, “Conclusões”, discutiu-se as vantagens da aplicação do modelo utilizado para representar o processo de hidrólise enzimática, assim como a metodologia baseada em planejamento de Plackett-Burman na identificação dos parâmetros mais relevantes no modelo e posterior re-estimação destes parâmetros na etapa de atualização do modelo.

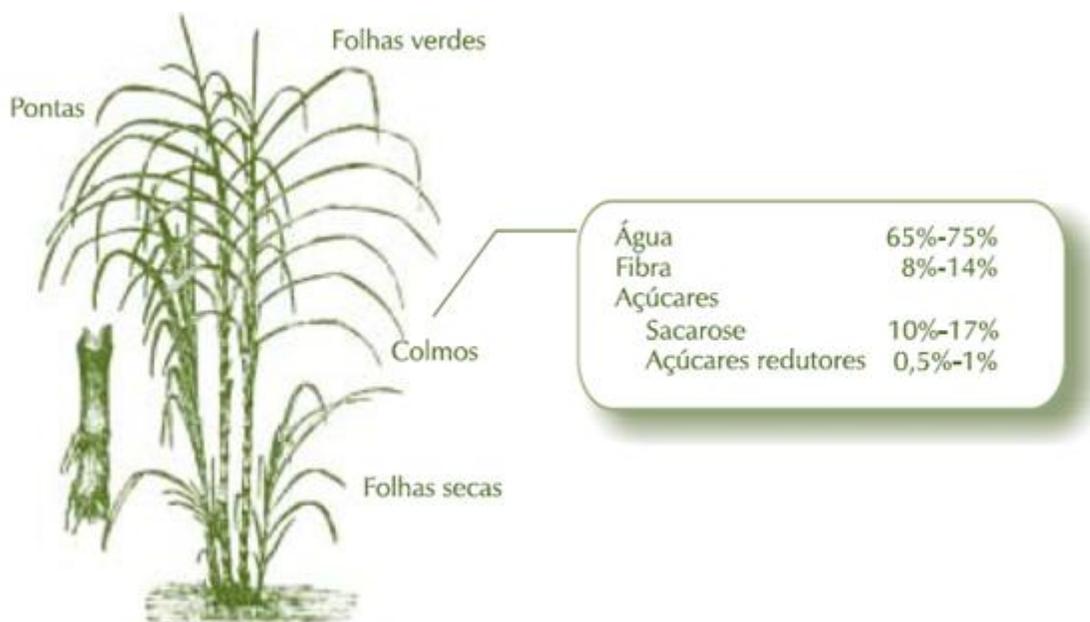
## CAPÍTULO 2

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 2.1. A Cana-de-Açúcar

A cana-de-açúcar, cujo nome científico é *Saccharum officinarum*, é uma das seis espécies do gênero *Saccharum*. Pertencem à imensa família das gramíneas, que contêm mais de 5.000 espécies de plantas (FUENTES, 2009).

A cana é composta por partes subterrâneas e aéreas. Fazem parte da subterrânea as raízes e rizomas. A parte aérea da planta é composta pelos *colmos*, nos quais se concentra a sacarose, e pelas *pontas* e *folhas*, que constituem a palha da cana, como mostrado na Figura 2.1. A sacarose é o produto que determina a qualidade e variedade da cana, já que é a matéria-prima para a produção de açúcar e de álcool. A cana também apresenta uma parte fibrosa (bagaço) que tem importância econômica, já que é utilizado para fins energéticos (REIN, 2007). Na Figura 2.1 temos a composição média da cana-de-açúcar.



**Figura 2.1:** Estrutura típica da biomassa de cana-de-açúcar (BNDES, 2008).

## 2.2 Biomassa Lignocelulósica

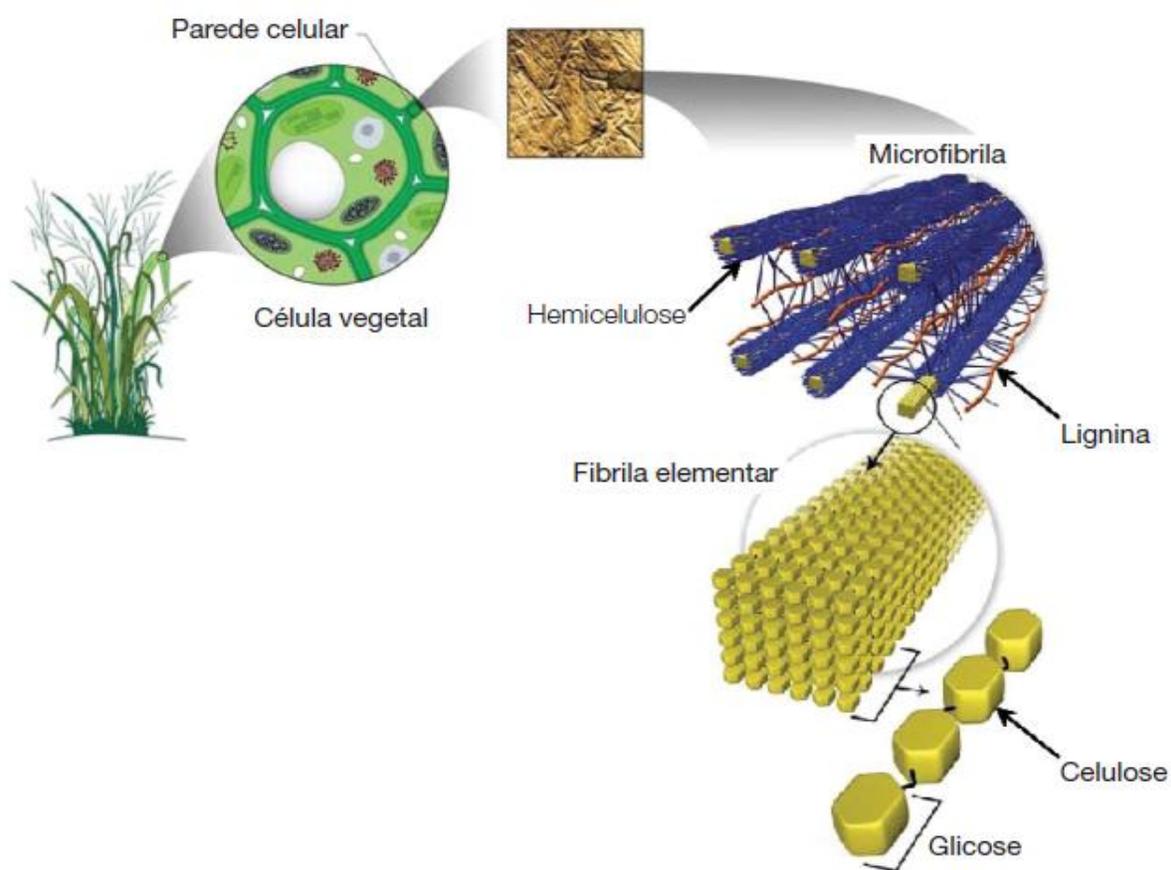
As biomassas lignocelulósicas constituem o material mais abundante em nosso planeta, tornando-se atrativas para produção de etanol, assim como para outros biocombustíveis. Os materiais lignocelulósicos têm em sua composição basicamente celulose, hemicelulose e lignina, na proporção aproximada de 40 a 50%, 20 a 30% e 25 a 30% respectivamente, variando em função do tipo de material, como se observa na Tabela 2.1.

**Tabela 2.1:** Composição Química dos materiais lignocelulósicos (CASTRO e PEREIRA, 2010).

<i>Fontes Lignocelulósicas</i>	<i>Celulose (%)</i>	<i>Hemicelulose (%)</i>	<i>Lignina (%)</i>
Bagaço de cana ( <i>Saccharum officinarum</i> )	36	28	20
Palha de cana	36	21	16
Palha de milho ( <i>Zea mays</i> )	36	28	29
Sabugo de milho	36	28	NR
Palha de trigo ( <i>Triticum aestivum</i> )	39	36	10
Palha de cevada ( <i>Hordeum vulgare</i> )	44	27	7
Farelo de cevada	23	33	21
Palha de arroz ( <i>Oryza sativa</i> )	33	26	7
Casca de arroz	36	20	19
Palha de aveia ( <i>Avena sativa</i> )	41	16	11
Palha de algodão ( <i>Gossypium hirsutum</i> )	42	12	15
Casca de amendoim ( <i>Arachis hypogaea</i> )	38	36	16
Douglas fir ( <i>Pseudotsuga menziesii</i> )	50	18	28
Pinheiro ( <i>Pinus sp.</i> )	44	26	29
Salgueiro ( <i>Salix alba</i> )	37	23	21
Capim elefante ( <i>Pennisetum purpureum</i> )	32	20	9
Resíduos sólidos municipais	33	9	17
Papel	43	13	6
Papelão	47	25	12
Jornal	62	16	21

Nas plantas, as cadeias lineares de celulose contribuem para a resistência mecânica, enquanto a estrutura amorfa e hidrofóbica da lignina é responsável pela resistência química, em

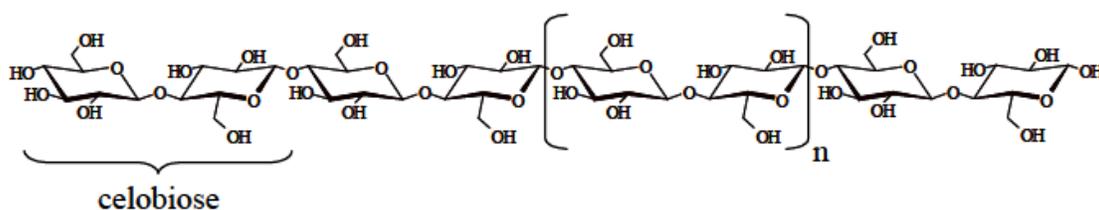
particular à proteção contra a água. A hemicelulose é responsável pela ligação entre a celulose e a lignina (Figura 2.2). Deste modo, os dois maiores obstáculos para impedir a hidrólise da celulose de materiais lignocelulósicos são a recalcitrância da própria celulose cristalina, proveniente da estrutura linear das cadeias de celulose compactadas em microfibrilas e a alta proteção que a lignina proporciona à estrutura celulósica atuando como uma barreira física contra o ataque enzimático (ANDERSEN, 2007).



**Figura 2.2:** Estrutura da parede celular de materiais lignocelulósicos (CANILHA *et al.*, 2010).

### 2.2.1. Celulose

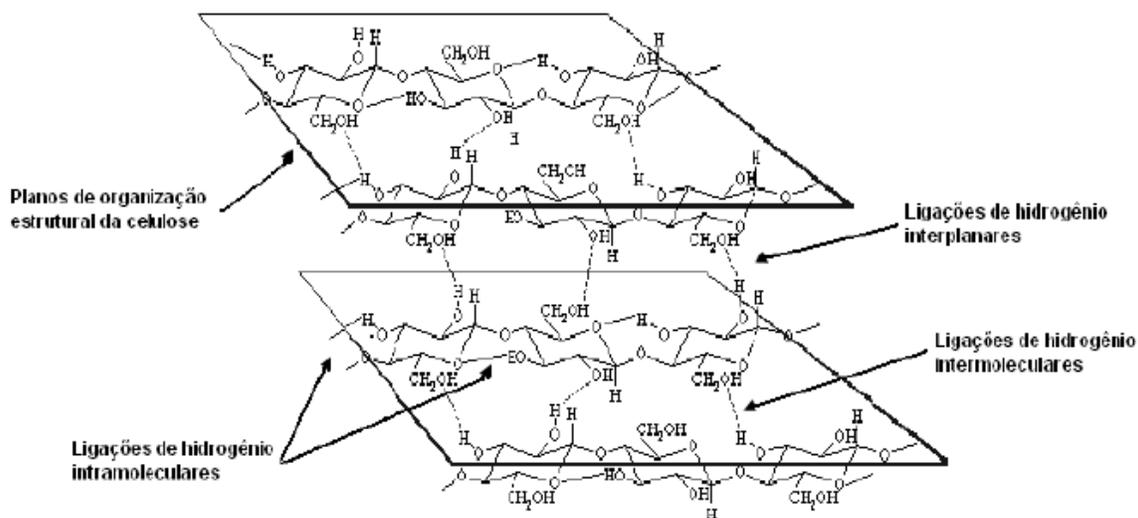
A celulose é o principal componente presente nos materiais lignocelulósicos. Trata-se de um homopolissacarídeo constituído por unidades de anidroglicopirranose ( $\beta$ -D-glicopirranose) ligadas entre si por ligações do tipo  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) glicosídicas formando uma cadeia linear (Figura 2.3). Duas unidades adjacentes formam uma ligação glicosídica através da eliminação de uma molécula de água, que envolve os grupos hidroxílicos dos carbonos 1 e 4. Esta estrutura dissacarídica recebe o nome de celobiose (FENGEL e WEGENER, 1989). A celobiose é definida como unidade conformacional mínima da celulose, enquanto a glicose representa tão somente a unidade fundamental das cadeias do homopolímero (TÌMÁR-BALÁZSC e EASTOP, 1998).



**Figura 2.3:** Estrutura da cadeia linear da celulose, formada por várias unidades consecutivas de celobiose (TÌMÁR-BALÁZSC e EASTOP, 1998).

O tamanho ou extensão da cadeia de celulose é medido através de seu grau de polimerização (GP), que representa o número de unidades de glicose que formam cada cadeia polimérica. O GP da celulose varia de acordo com a fonte, o grau de maturação da parede celular, o processamento a que as fibras foram submetidas e o seu envelhecimento. O GP da celulose nativa na madeira é de cerca de 2500 unidades de anidroglicose, enquanto que o GP do algodão é de aproximadamente 11000 unidades (MARTINS, 2005).

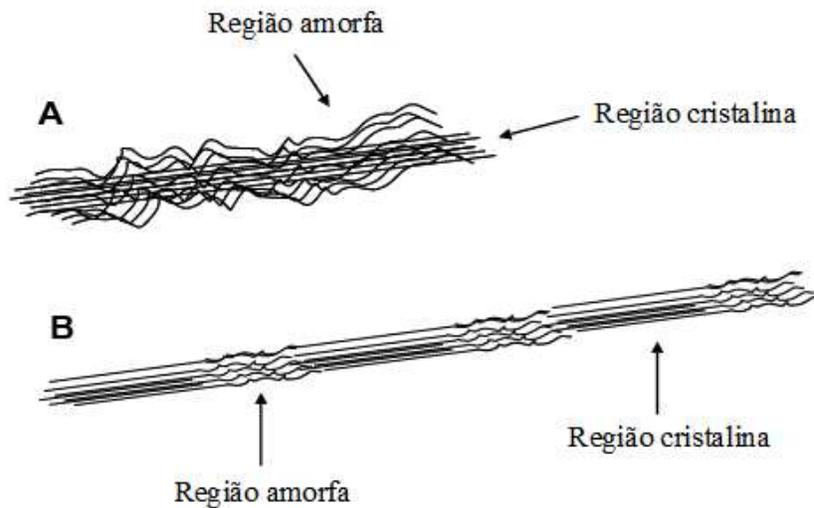
A cadeia macromolecular da celulose assume uma disposição linear devido a três fatores: a hidroxila no carbono anomérico possui orientação equatorial, a conformação em cadeia do anel piranosídico assume a disposição  ${}^4C_1$  e as ligações de hidrogênio intra e intermoleculares estabilizam a orientação da cadeia (Figura 2.4) (FENGEL e WEGENER, 1989).



**Figura 2.4:** Representação das ligações de hidrogênio na estrutura supramolecular da celulose (PITARELO, 2007).

Em sua estrutura supramolecular, a celulose apresenta regiões altamente ordenadas (regiões cristalinas), estabilizadas por numerosas ligações de hidrogênio intra e intermoleculares (Figura 2.4), e áreas menos ordenadas ou amorfas, onde as cadeias apresentam uma orientação randomizada (FAN *et al.*, 1987). As duas formas ocorrem em proporções características em celulosas de diferentes origens, e o ataque enzimático pode ser preferencial em um dos tipos de estrutura (GAMA, 1996). Na região cristalina a fibra tem maior resistência à tração, ao alongamento e a solvatação, já na região amorfa, a fibra apresenta maior grau de flexibilidade (FENGEL e WEGENER, 1989).

LARSSON *et al.* (1997) investigaram molecularmente a celulose e relataram que a maioria das regiões amorfas correspondia às cadeias situadas na superfície, visto que os componentes cristalinos ocupam o núcleo do microfibrila como apresentado na Figura 2.5(A).



**Figura 2.5:** Diferentes visões do modo de distribuição da celulose cristalina e amorfa na microfibrila. **A:** Celulose cristalina está no centro da microfibrila e é envolta pelo substrato amorfo. **B:** As regiões cristalinas e amorfas são repetidas ao longo da dimensão horizontal (ANDERSEN, 2007).

Uma arquitetura molecular diferente da celulose cristalina e amorfa foi proposta por MOSIER *et al.* (1999). Nesta abordagem a celulose é descrita como sendo semicristalina, com regiões de alta cristalinidade, com uma quantidade de aproximadamente 200 resíduos de glicose, separadas por regiões amorfas, como apresentado na Figura 2.5 (B).

Segundo MOSIER *et al.* (1999) as duas características mais importantes da celulose são a área superficial específica, SSA, e o índice de cristalinidade, CrI. A área superficial específica é definida como a quantidade de área superficial por massa de celulose. O índice de cristalinidade é a quantidade relativa de celulose cristalina em oposição à quantidade de celulose amorfa.

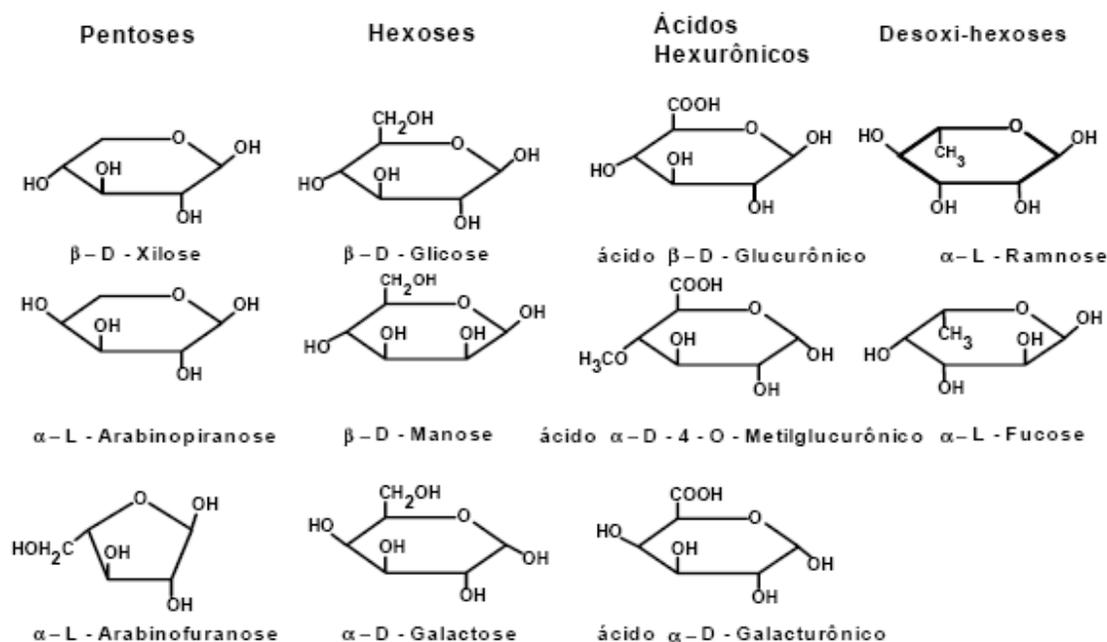
A celulose existe em sete estruturas de cristal (estruturas polimorfas) designadas como celulose I $\alpha$ , I $\beta$ , II, III<sub>I</sub>, III<sub>II</sub>, IV<sub>I</sub>, e IV<sub>II</sub> (O'SULLIVAN, 1997). Na natureza, a celulose I $\alpha$  e I $\beta$  são as formas de cristal mais abundantes. Celuloses produzidas por organismos primitivos teriam a forma I $\alpha$  dominante, enquanto a produzida por plantas superiores teria a forma I $\beta$  dominante. I $\alpha$  é meta-estável, e assim, mais reativa do que I $\beta$  (O'SULLIVAN, 1997). A porcentagem do polimorfo I $\alpha$  na celulose cristalina varia de 70% na celulose bacteriana (O'SULLIVAN, 1997), 64% na celulose isolada da alga *Valonia ventricosa*, e 20% no rami e na celulose do algodão

(YAMAMOTO e HORII, 1994). A coexistência de dois polimorfos da celulose nativa, os quais têm estabilidades diferentes, pode implicar que a parte do polimorfo I $\alpha$  dentro da microfibrila é mais propensa ao ataque enzimático (ANDERSEN, 2007).

### 2.2.2. Hemicelulose

As hemiceluloses são heteropolissacarídeos com cadeias menores que as da celulose e com uma estrutura linear ramificada. As unidades de açúcares que formam as hemiceluloses podem ser subdivididas em grupos, tais como pentoses, hexoses, ácidos hexourônicos e desoxi-hexoses (Figura 2.6).

As hemiceluloses são estruturalmente mais parecidas com a celulose do que com a lignina e são depositadas na parede celular em um estágio anterior à lignificação. Sua estrutura apresenta ramificações e cadeias laterais que interagem facilmente com a celulose, dando a estabilidade e flexibilidade ao agregado (RAMOS 2003).



**Figura 2.6:** Estrutura dos monossacarídeos que formam as hemiceluloses (FENGEL e WEGENER, 1989).

Devido à sua estrutura ramificada, as hemiceluloses são mais solúveis que a celulose, podendo ser isoladas da madeira por extração. Hemiceluloses são facilmente hidrolisadas por ácido forte deixando a celulose e lignina praticamente intactas (LIU e WYMAN, 2005; LLOYD e WYMAN, 2005), ou por base forte (FAN *et al.*, 1982). Em muitos casos pré-tratamentos com ácido diluído (0.5-1.0 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) sob temperaturas elevadas (140-190 °C) hidrolisaram a maioria da hemicelulose em petoses e hexoses solúveis (LLOYD e WYMAN, 2005).

Apesar de serem ambas constituídas por açúcares, existem importantes diferenças de comportamento reacional entre as hemiceluloses e a celulose, devido, principalmente, à estrutura física. As hemiceluloses são totalmente amorfas e, portanto, menos resistentes ao ataque de agentes químicos. Embora não haja evidências de que a celulose e as hemiceluloses estejam ligadas quimicamente, as ligações de hidrogênio e a interpenetração física existente entre elas tornam a sua separação quantitativa impossível. A presença de hemicelulose junto à celulose resulta em importantes propriedades para as fibras, contribuindo para o intumescimento, a mobilidade interna e o aumento da flexibilidade das fibras (BIANCHI, 1995).

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

### **2.2.3. Lignina**

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

A lignina é uma macromolécula amorfa com estrutura tridimensional muito complexa (Figura 2.7) e baseada em três precursores monoméricos: os álcoois coniferílico, sinapílico e *p*-cumarílico (Figura 2.8). A proporção dos precursores da lignina varia entre as diferentes espécies de plantas.

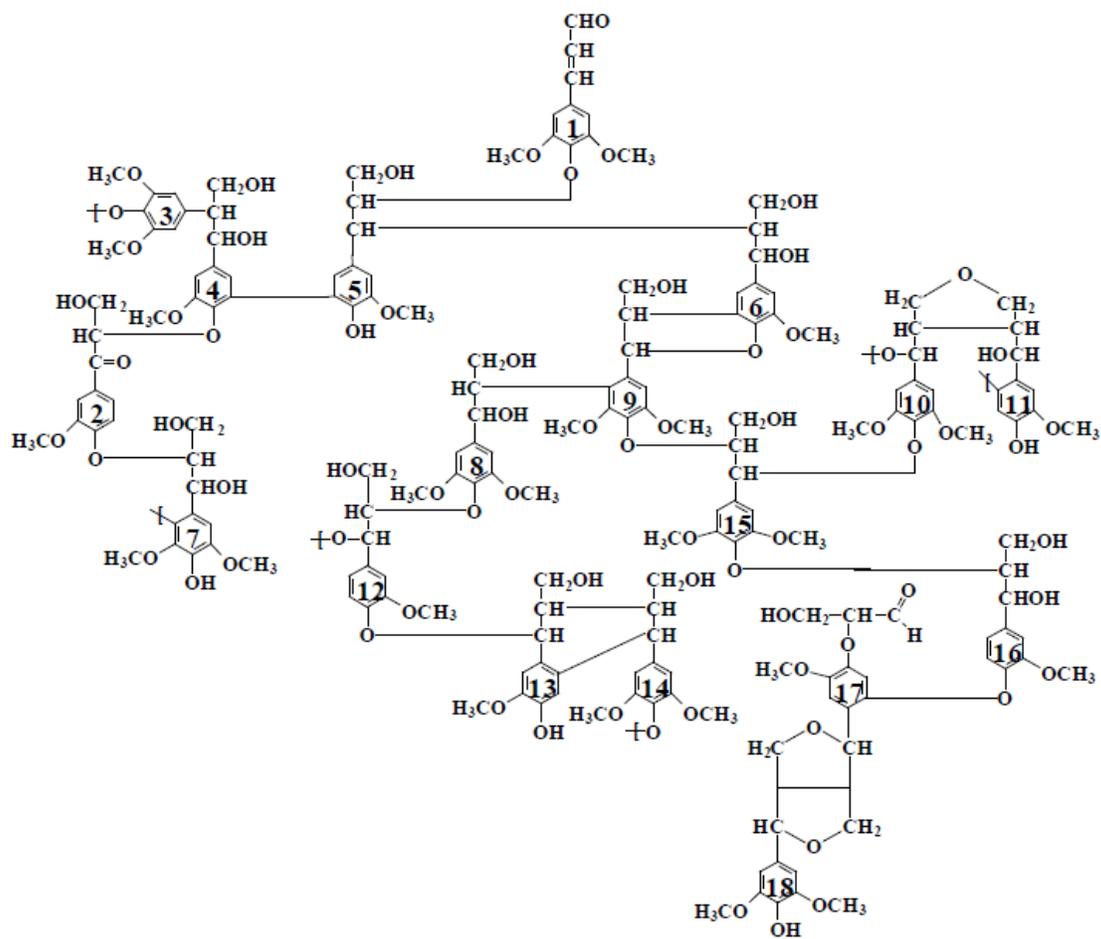


Figura 2.7: Estrutura da lignina de *Fagus sp* (FENGEL e WEGENER, 1989).

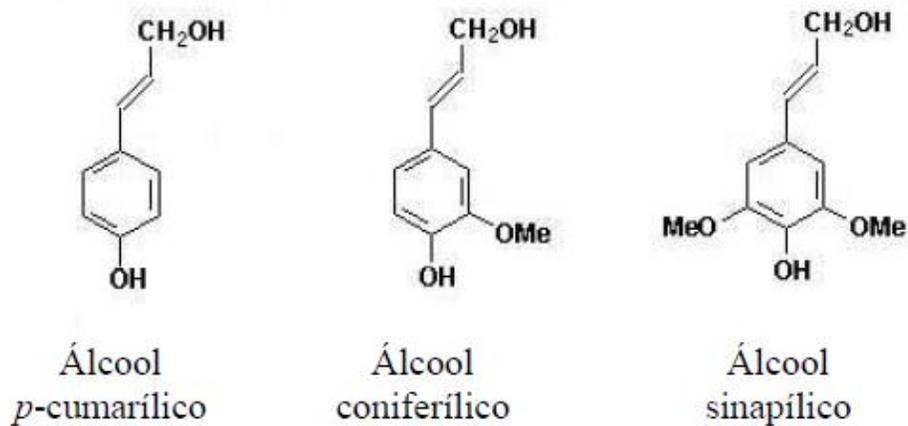


Figura 2.8: Estrutura dos álcoois precusores da lignina (SJÖSTRÖM, 1992).

As ligninas de madeiras duras apresentam em sua composição, além de grupos guaiacil (derivado do álcool coniferílico), proporções mais altas de grupos siringil (derivado do álcool sinapílico), enquanto as ligninas de madeiras moles são mais ricas em grupos guaiacil. Como consequência desta diferença química, as ligninas de madeiras duras são menos condensadas e mais susceptíveis à conversão química e biológica que as de coníferas. As ligninas de gramíneas, tais como o bagaço de cana, apresentam grupos p-cumaril, além de grupos siringil e guaiacil (FENGEL e WEGENER, 1989; FERNANDEZ *et al.*, 1990; FAIX *et al.*, 1992).

A propriedade física mais importante dessa macromolécula orgânica é a sua rigidez, que não só confere estrutura ao tecido da planta, mas também, previne o colapso de elementos condutores de água (MARTINS, 2005).

A lignina, tal como a hemicelulose, normalmente começa a se dissolver na água em torno de 180 °C, sob condições neutras (BOBLETER, 1994). A solubilidade da lignina em ambiente ácido, neutro ou alcalino depende, contudo do precursor (p-cumarílico, coniferílico, sinapílico ou uma combinação deles) da lignina (GRABBER, 2005).

A interação entre a lignina, celulose e hemicelulose determinam a estrutura da parede celular dos materiais lignocelulósicos.

#### **2.2.4. Outras substâncias**

Os componentes de menor massa molecular, presentes na biomassa lignocelulósica, incluem uma variedade de compostos orgânicos cuja presença é governada por uma série de fatores, entre os quais de natureza genética e climática. Esses componentes não residem na parede celular da planta e dividem-se, basicamente, em duas classes. A primeira classe engloba materiais conhecidos como extrativos por serem extraíveis em água e solventes orgânicos neutros ou volatilizados por arraste de vapor. A segunda classe engloba materiais que não são comumente extraíveis com os agentes mencionados, como, por exemplo, compostos inorgânicos (cinzas), proteínas e substâncias pécticas (RAMOS, 2003).

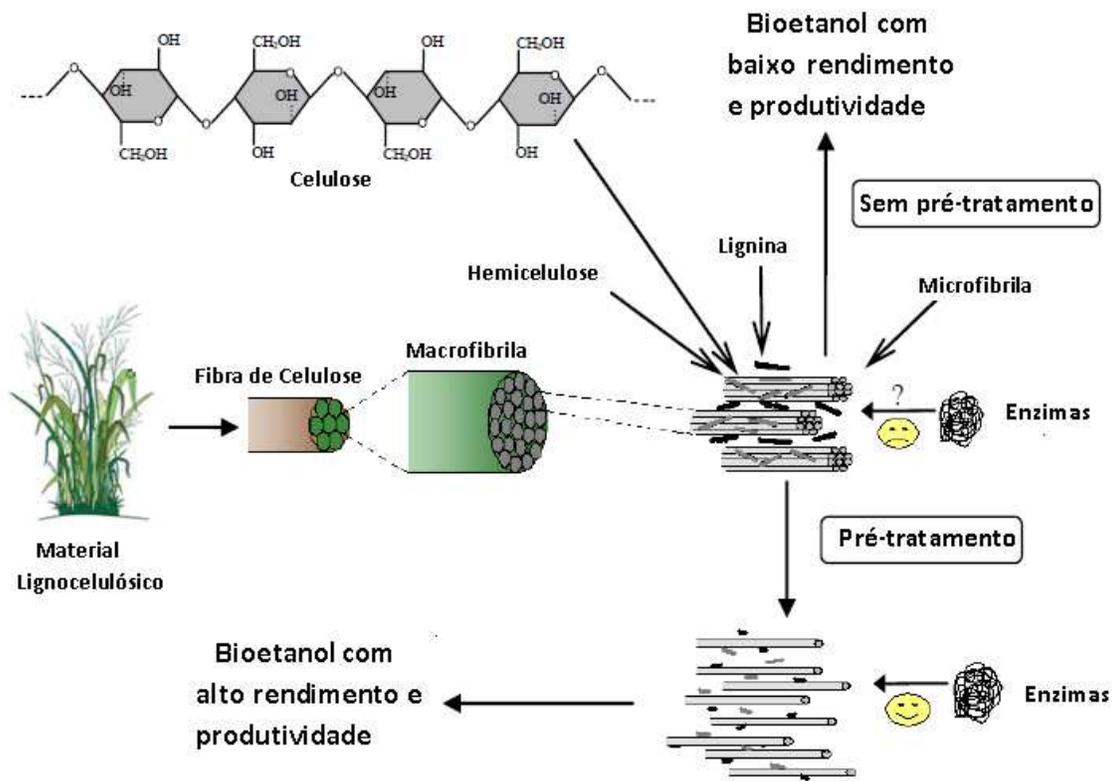
Os compostos extraíveis correspondem de 4-10% do peso seco da madeira. Incluem uma diversidade de compostos como os terpenos, que são polímeros de isopreno; as resinas, que incluem grande variedade de compostos não voláteis como óleos, ácidos graxos, álcoois, resinas ácidas, fitosterol, dentre outros; e os fenóis, que apresentam como representante principal os

taninos. Dentro desta fração de extraíveis podem-se incluir carboidratos de baixo peso molecular, alcalóides e lignina solúvel (RABELO, 2010).

Nas frações não extraíveis encontram-se parte das cinzas, os resíduos inorgânicos, principalmente carbonatos alcalinos, alcalinos terrosos e oxalatos, que permanecem depois de queimar o substrato a elevadas temperaturas, e representam aproximadamente 2% do peso seco das madeiras (KLASS, 1998).

### **2.3. Pré-tratamento**

Os açúcares do bagaço, assim como aqueles de qualquer outro material lignocelulósico, encontram-se na forma de polímeros (celulose e hemicelulose) associados entre si e recobertos por uma macromolécula aromática complexa (lignina), formando a microfibrila celulósica. Esta, por sua vez, constitui a parede celular (fibra) vegetal, uma estrutura recalcitrante difícil de ser desestruturada e convertida em monossacarídeos fermentescíveis. Em vista disso, resíduos agrícolas requerem um pré-tratamento para aumentar a digestibilidade da biomassa e fazer com que a celulose torne-se mais acessível às enzimas que convertem os carboidratos em açúcares fermentescíveis (CHANG *et al.*, 1998).



**Figura 2.9:** Pré-tratamento nos materiais lignocelulósicos (adaptado de TAHERZADEH *et al.*, 2008).

A Figura 2.9 representa o esquema das transformações que sofre a biomassa lignocelulósica durante o pré-tratamento com alteração da estrutura e aumento da área superficial da celulose.

Segundo HSU (1996) os principais objetivos do pré-tratamento são: reduzir o grau de cristalinidade da celulose, dissociar o complexo lignina-celulose, aumentar a área superficial da biomassa, preservar as pentoses maximizando os rendimentos em açúcares e evitar ou minimizar a formação de compostos que são inibidores do processo tanto na etapa de hidrólise quanto na etapa de fermentação. Além disso, o pré-tratamento deve minimizar a perda de celulose.

A eficiência do pré-tratamento depende das propriedades físico-químicas da matéria-prima. Resíduos agrícolas, como palhada de milho, que tem baixo teor de lignina são mais facilmente pré-tratados do que madeiras moles que contêm maiores quantidades de lignina e apresentam uma parede celular mais rígida (GREGG *et al.*, 1998; WINGREN *et al.*, 2003).

Segundo JØRGENSEN *et al.* (2007) um pré-tratamento para ser considerado adequado e eficiente, deve estar de acordo com os seguintes itens:

- maximizar a digestibilidade enzimática,
- otimizar a produção de subprodutos (lignina, por exemplo),
- não requerer a adição de reagentes que venham a inibir as enzimas hidrolíticas e os microrganismos fermentativos,
- minimizar o uso de energia, reagentes e equipamentos,
- permitir a transposição para escala industrial.

Vários métodos de pré-tratamento de biomassas lignocelulósicas têm sido sugeridos ao longo das duas últimas décadas. Em relação a sua natureza, estes podem ser classificados em três grupos principais: físicos, químicos, biológicos, além de uma possível combinação entre eles (SUN e CHENG, 2002; MOSIER *et al.*, 2005).

Geralmente, a combinação de métodos é mais efetiva que um único método, entretanto em alguns casos um segundo pré-tratamento não aumenta a digestibilidade do substrato pré-tratado pelo primeiro. Comparando com uma única etapa de pré-tratamento, o capital investido e os custos de processo de uma técnica de pré-tratamento combinada envolveria equipamentos adicionais e em alguns casos mais reagentes químicos (HSU, 1996).

A Tabela 2.2 resume as principais técnicas de pré-tratamentos avaliadas para os materiais lignocelulósicos com o objetivo de facilitar a hidrólise enzimática.

**Tabela 2.2:** Resumo dos métodos de pré-tratamentos para biomassa lignocelulósica (TAHERZADEH *et al.*, 2008 ).

<b>Métodos de pré-tratamento</b>	<b>Processo</b>	<b>Tipo de mudança</b>	<b>Obsevações</b>	<b>Referências</b>
<b>Físico</b>	<b>Moagem:</b> - Bola - Energia vibratória - Rolo duplo - Martelo	-Aumento da área superficial e tamanho dos poros da partícula -Diminuição no grau de polimerização -Diminuição no grau de cristalinidade da celulose	-Maioria dos métodos demandam alto consumo de energia -Maioria deles não é capaz de remover a lignina -É preferível não usar estes métodos para aplicações industriais -Geralmente nestes métodos não são usados produtos químicos	MAIS <i>et al.</i> (2002), TASSINARI <i>et al.</i> (1977), SIDIRAS <i>et al.</i> (1989).  KUMAKURA <i>et al.</i> (1982), LAFITTE-TROUQUE <i>et al.</i> (2002), KENNEDY <i>et al.</i> (2007), PARK <i>et al.</i> (2004), ESKICIOGLU <i>et al.</i> (2007).
	<b>Irradiação:</b> - Raios de elétrons - Raios $\gamma$ -Micro-ondas			
	<b>Outros:</b> -Hidrotérmico -Vapor de alta pressão -Expansão -Pressão -Pirólise -Extrusão			NEGRO <i>et al.</i> (2003), GARROTE <i>et al.</i> (1999).
<b>Químico e Físico-Químico</b>	<b>Explosão:</b> -Vapor -Fibra de amônia (AFEAX) -CO <sub>2</sub> -SO <sub>2</sub>	-Aumento da área acessível superficial -Deslignificação parcial ou quase completa -Diminuição no grau de polimerização	-Estes métodos estão entre os mais eficazes e incluem os processos mais promissores para as aplicações industriais -Geralmente possuem taxa de tratamento rápida	EMMEL <i>et al.</i> (2003), TUCKER <i>et al.</i> (2003), ALIZADEH <i>et al.</i> (2005), HOLTZAPPLE <i>et al.</i> (1991), BALLESTEROS <i>et al.</i> (2000), SASSNER <i>et al.</i> (2005), OHGREN <i>et al.</i> (2005), TENBORG <i>et al.</i> (1998), EKLUND <i>et al.</i> (1995), STENBERG

---

<p>-Diminuição no grau de cristalinidade da celulose -Hidrólise parcial ou completa da hemicelulose.</p>	<p>-Normalmente necessitam de condições adversas -Utilizam-se produtos químicos</p>	<p><i>et al.</i> (1998), JOSEFSSON <i>et al.</i> (2002), CARRASCO <i>et al.</i> (1994), RUIZ <i>et al.</i> (2008), ZHENG <i>et al.</i> (1996), ZHENG <i>et al.</i> (1995), KIM <i>et al.</i> (2001), SCHULTZ <i>et al.</i> (1984).</p>
<p><b>Álcali:</b> -Hidróxido de Sódio -Amônia -Sulfito de Amônio -Hidróxido de Cálcio</p>		<p>VACCARINO <i>et al.</i> (1987), KIM <i>et al.</i> (2006).</p>
<p><b>Ácido:</b> -Ácido Sulfúrico -Ácido Clorídrico -Ácido Fosfórico</p>		<p>TAHERZADEH <i>et al.</i> (2007a), TAHERZADEH <i>et al.</i> (2007b), TORGET <i>et al.</i> (1991), SCHELL <i>et al.</i> (2003).</p>
<p><b>Gás</b> -Dióxido de Nitrogênio -Dióxido de Enxofre -Dióxido de Cloro</p>		<p>FAN <i>et al.</i> (1982)</p>
<p><b>Agente Oxidante</b> -Peróxido de Hidrogênio -Ozônio -Oxidação Úmida</p>		<p>PALONEN <i>et al.</i> (2004a), SCHMIDT <i>et al.</i> (1998), BJERRE <i>et al.</i> (1996), MARTÍN <i>et al.</i> (2007), AZZAN <i>et al.</i> (1989), NEELY <i>et al.</i> (1984), WEEMAES <i>et al.</i> (2000), GOEL <i>et al.</i> (2003a), GOEL <i>et al.</i> (2003b), BENITEZ <i>et al.</i> (1997).</p>

---

---

**Extração de lignina  
por solvente:**

- Extração Etanol-  
Água
- Extração Benzeno-  
Água
- Extração Etileno-  
Glicol
- Extração Butanol-  
Água

PASQUINI *et al.* (2005).

---

**Biológico**

*Fungos e  
actinomicetos*

- Deslignificação
- Redução do grau de  
polimerização da  
celulose
- Hidrólise parcial da  
hemicelulose.

- Exigem baixo consumo  
de energia
- Condições ambientais  
amenas (temperatura e  
pressão)
- Taxa de tratamento muito  
lenta
- Não são usados produtos  
químicos
- Não são considerados  
para aplicações industriais.

AHRING *et al.* (1996),  
KURAKAKE *et al.* (2007),  
SRILATHA *et al.* (1995), DHOUIB  
*et al.* (2006).

### **2.3.1. Pré-tratamentos Físicos**

Os pré-tratamentos físicos normalmente são divididos em duas categorias gerais: mecânicos (formas de moagem) e não mecânicos (por exemplo, vapor de alta pressão, radiação de alta energia). Durante o pré-tratamento mecânico, as forças físicas, (por exemplo, ruptura ou esmagamento) subdividem o material lignocelulósico em partículas mais finas. Estas forças físicas podem reduzir a cristalinidade da celulose, o tamanho das partículas e grau de polimerização e aumentar a densidade aparente (FAN *et al.*,1982). Estas mudanças estruturais resultam em um material que pode ser mais acessível a tratamentos subseqüentes, porém o tratamento mecânico demanda elevado consumo de energia e tempo, sendo, portanto, pouco viável para aplicações industriais. Métodos não mecânicos de pré-tratamento físico também podem aumentar a digestibilidade, mas têm desvantagens semelhantes.

### **2.3.2. Pré-tratamentos Físico-Químicos**

Nesta categoria incluem-se misturas de pré-tratamentos físicos tais como a explosão a vapor com reagentes químicos. Na explosão a vapor molhada biomassa lignocelulósica é aquecida a altas temperaturas (cerca de 250 °C) e a pressão liberada rapidamente, levando à redução do tamanho das partículas. Em razão da alta temperatura empregada, há degradação da hemicelulose e transformação da lignina, beneficiando a etapa de hidrólise (SUN e CHENG, 2002). Estas alterações podem resultar em uma melhor acessibilidade para os tratamentos posteriores, mas as severas condições também geram produtos de degradação que podem inibir a hidrólise e a fermentação, o que não é interessante para o processo de conversão do material em etanol.

### **2.3.3. Pré-tratamentos Biológicos**

Pré-tratamentos biológicos envolvem o uso de microrganismos para a degradação da lignina, com o objetivo de facilitar a hidrólise enzimática da celulose. As vantagens deste pré-tratamento é o baixo requerimento energético e, as condições suaves do processo. Apesar de ser um tratamento efetivo, limpo e sem produção de metabolitos indesejáveis, o processo é demasiado lento para aplicá-lo industrialmente. Outra desvantagem é que estes tipos de

microrganismos não são seletivos e além de degradar hemicelulose e lignina também degradam a celulose (SUNG e CHENG, 2002).

#### **2.3.4. Pré-tratamento Químico**

Os pré-tratamentos químicos podem ser definidos como técnicas que envolvam agentes químicos tais como ácidos, bases e solventes orgânicos. Um tratamento químico tem como objetivo aumentar a superfície do substrato por inchaço das fibras e a modificação ou a remoção da hemicelulose e/ou da lignina para tornar a celulose mais acessível para hidrólise enzimática. (HSU, 1996; MOISER *et al.*, 2005).

Dentre os vários tipos de pré-tratamentos químicos será destacado, o alcalino (hidróxido de cálcio) e um que usa agente oxidante (peróxido de hidrogênio) para objeto de estudo, já que estes vêm sendo estudados no Laboratório de Processos Fermentativos e Enzimáticos (LEPFE) com bons resultados (RABELO, 2007; RABELO *et al.*, 2008 e 2009; FUENTES, 2009; GARCIA, 2009; RABELO, 2010, RIVERA *et al.*, 2010) e serão os pré-tratamentos usados no presente trabalho.

##### **2.3.4.1. Pré-tratamento com Hidróxido de Cálcio (Cal)**

O pré-tratamento alcalino é uma das principais classes de pré-tratamento químico, sendo, portanto foco de numerosos estudos. Ele emprega várias bases, incluindo hidróxido de sódio (ABDI *et al.*, 2000; CARRILLO *et al.*, 2005; PINTO *et al.*, 1996; SILVERSTEIN *et al.*, 2007), hidróxido de cálcio (cal) (KIM *et al.*, 2006; CHANG *et al.*, 2001; KAAR *et al.*, 2000), hidróxido de potássio (CHANG *et al.*, 2000), amônia aquosa (FOSTER *et al.*, 2001; KIM *et al.*, 2003), hidróxido de amônio (PRIOR *et al.*, 2006) e hidróxido de sódio (MISHIMA *et al.*, 2006; SAHA *et al.*, 2006; SAHA *et al.*, 2007) em combinação com peróxido de hidrogênio ou outros. O pré-tratamento alcalino é basicamente um processo de deslignificação, no qual uma quantidade significativa de hemicelulose é solubilizada também. Acredita-se que o mecanismo de pré-tratamento alcalino baseia-se na saponificação intermolecular das ligações cruzadas de ésteres da xilana presentes na hemicelulose com outros componentes, por exemplo, lignina e hemicelulose. O pré-tratamento alcalino também remove o acetil e várias substituições de ácido urônico da

hemicelulose, responsáveis pela redução da acessibilidade da celulose e hemicelulose pelas enzimas (ZHENG, *et al*, 2009a).

O pré-tratamento alcalino de materiais lignocelulósicos provoca inchaço, levando à diminuição do grau de polimerização e cristalinidade, maior área de superfície interna, o rompimento da estrutura da lignina e separação dos vínculos estruturais entre a lignina e carboidratos (FAN *et al.*, 1987). Outro aspecto importante do pré-tratamento alcalino é a mudança da estrutura da celulose para uma forma que é mais densa e termodinamicamente mais estável do que a celulose nativa (PETTERSEN, 1984).

A eficácia do pré-tratamento alcalino varia, dependendo do substrato e das condições de tratamento. Em geral, pré-tratamento alcalino é mais eficaz em madeiras duras, plantas herbáceas e resíduos agrícolas com baixo teor de lignina do que em coníferas com alto teor de lignina (BJERRE *et al.*, 1996).

Em comparação com outras tecnologias de pré-tratamento, o pré-tratamento alcalino geralmente utiliza baixas temperaturas e pressões, até mesmo condições ambientais. O tempo de pré-tratamento, no entanto, é relatado em termos de horas ou dias, sendo muito maior do que outros processos de pré-tratamento. Uma desvantagem significativa do pré-tratamento alcalino é a conversão de algumas bases em sais irrecuperáveis e/ou a incorporação de sais na biomassa durante as reações de pré-tratamento (ZHENG, *et al*, 2009a).

Hidróxido de sódio, hidróxido de cálcio, amônia e uréia são os álcalis mais comuns usados como agentes de pré-tratamentos. Embora o hidróxido de sódio aumente a digestibilidade da biomassa significativamente, este é de difícil reciclagem, além de ser uma base relativamente cara. Por causa da volatilidade, a amônia pode ser reciclada facilmente, mas é considerada um agente de pré-tratamento caro, além da necessidade de uma maior atenção para manipulá-la. A uréia é de fácil manipulação, mas é considerada um produto de alto custo, além de causar um aumento não muito significativo na digestibilidade da biomassa quando comparado com o de outras bases. Por outro lado, o hidróxido de cálcio (cal) apresenta várias vantagens, já que é fácil de ser manipulado e apresenta um baixo custo. Uma outra vantagem é que a cal pode ser recuperada tratando-se a água de lavagem com gás carbônico, o que minimiza ainda mais o seu custo (CHANG *et al.*, 1998).

O hidróxido de cálcio tem sido bastante usado como agente de pré-tratamento para aumentar a digestibilidade enzimática de resíduos lignocelulósicos tais como o bagaço de cana, palha de trigo, palha de milho, entre outros resíduos agroindustriais. (CHANG *et al.*, 1997 e 1998, KAAR e HOLTZAPPLE, 2000). Várias pesquisas têm utilizado a cal como um dos reagentes com grande potencial para o pré-tratamento da biomassa por ser um reagente de baixo custo e segurança para manipulação, apesar de apresentar menor solubilidade e ser mais fraca quando comparada com outras bases (CHANG *et al.*, 1998).

#### **2.3.4.2. Pré-tratamento com Peróxido de Hidrogênio Alcalino**

Um pré-tratamento oxidativo consiste na adição de um composto oxidante, como o peróxido de hidrogênio ou ácido peracético à biomassa, que está suspensa na água. O objetivo é remover a hemicelulose e lignina para aumentar a acessibilidade da celulose. Durante o pré-tratamento oxidativo diversas reações podem ocorrer, como a substituição eletrofílica, o deslocamento das cadeias laterais, a clivagem de ligações éter alquil arila ou a clivagem oxidativa dos núcleos aromáticos (HON e SHIRAISHI, 2001).

Os pré-tratamentos oxidativos têm sido usados para dissolver os componentes da matriz lignocelulósica e acelerar a hidrólise enzimática e a biodegradação. O peróxido de hidrogênio é usado para reagir com a lignina sob certas condições, e tem sido largamente usado por vários anos como alvejante em polpas de madeira altamente lignificadas para a produção de papel (REICHERT e PETE, 1949).

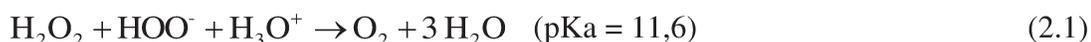
Em muitos casos, o oxidante utilizado não é seletivo e, portanto, as perdas de hemicelulose e celulose podem ocorrer. Os trabalhos desenvolvidos no LEPFE mostram que não há perdas de celulose quando se usa peróxido de hidrogênio (RABELO, 2007; RABELO *et al.*, 2008; GARCIA, 2009; RABELO, 2010). Um alto risco na formação de inibidores existe, conforme a lignina é oxidada e compostos aromáticos solúveis são formados (HENDRIKS e ZEEMAN, 2009). O trabalho de RABELO (2010), no entanto, mostra que as hexoses obtidas a partir da hidrólise enzimática de bagaço de cana pré-tratado com peróxido são fermentadas a etanol com rendimentos próximos ao rendimento teórico.

O peróxido de hidrogênio alcalino é um agente efetivo na deslignificação e solubilização da hemicelulose. Isto é devido à formação do ânion hidroperóxido ( $\text{HOO}^-$ ), formado em pH

alcalino, que se apresenta como a principal espécie ativa no peróxido. Em contraste, peróxido de hidrogênio é instável nas condições alcalinas e se decompõe em radicais hidroxil ( $\cdot\text{OH}^-$ ) e superóxido ( $\cdot\text{O}_2^-$ ). Estes radicais são responsáveis pela oxidação da estrutura da lignina, na qual ataca os grupos hidrofílicos (carboxil), quebrando algumas ligações e, eventualmente, levando à dissolução da lignina e hemicelulose (PAN *et al.*, 1988; FANG *et al.*, 1999; SUN *et al.*, 2004).

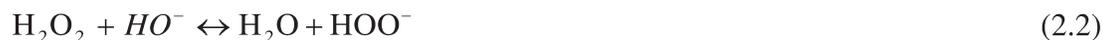
Para o entendimento do mecanismo da reação de deslignificação utilizando peróxido de hidrogênio alcalino é necessário examinar completamente as reações envolvidas na sua decomposição (GOULD, 1985).

Quando  $\text{H}_2\text{O}_2$  reage com água, tem-se a seguinte reação:



A deslignificação dos materiais lignocelulósicos com peróxido de hidrogênio é fortemente dependente do pH do meio. Seu melhor desempenho ocorre em meio alcalino, mas especificamente em pH na faixa de 11,5 a 11,6. Nesta faixa de pH, o mecanismo para a oxidação da lignina gera a formação de espécies químicas (radicais) altamente reativas (GARCIA, 2009).

As reações químicas, que ocasionam a formação de espécies reativas, estão dispostas a seguir:



Sob condições alcalinas, observa-se a formação do íon peroxidrila  $\text{HOO}^-$ . Quando o peróxido sofre decomposição, que pode ser acelerada em presença de luz, alto pH, aquecimento ou presença de metais de transição, há formação de oxigênio e água. Se houver aumento de pH ou aquecimento, principalmente na faixa de 110 a 120°C, o peróxido de hidrogênio é decomposto instantaneamente. Esta reação torna-se mais rápida se o pH atingir o pKa, que é de 11,6 a 25°C (LEGRINI e BRAUN, 1993; THOMPSON, 1995).

A reação de decomposição pode ser observada a seguir:



Com a adição de uma base ao peróxido de hidrogênio, sendo que a mais comumente utilizada é hidróxido de sódio, há formação de uma solução com alto poder deslignificador. Os

radicais hidroxil ( $HO\cdot$ ) e superóxido ( $\cdot O_2^-$ ), decorrentes da decomposição do peróxido de hidrogênio, são responsáveis pela oxidação da lignina e dissolução da hemicelulose (FANG *et al.*, 1999).

O pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino em resíduos lignocelulósicos, como o bagaço de cana-de-açúcar, aumenta enormemente a susceptibilidade para a hidrólise enzimática e conseqüentemente a produção de etanol (AZZAM, 1989).

Estudos realizados por RABELO (2007) determinaram as condições ótimas de pré-tratamento com peróxido de hidrogênio para bagaço de cana-de-açúcar, que são 1 h de reação, temperatura de 25°C e concentração de 7,355% de  $H_2O_2$ . Os resultados de massa de açúcares redutores totais, ART, e glicose após 48 h de hidrólise foram 0,4899 g/g biomassa bruta seca e 0,3740 g/g biomassa bruta seca, respectivamente. O máximo rendimento de glicose obtido foi de 84,07 %.

## **2.4. Hidrólise de biomassa lignocelulósica**

Os processos de hidrólise mais comuns são o processo com ácido concentrado, a hidrólise com ácido diluído em duas etapas e a hidrólise enzimática. Estes serão descritos em detalhes a seguir.

### **2.4.1. Hidrólise ácida**

#### **2.4.1.1. Hidrólise com ácido diluído**

Os processos que empregam ácidos diluídos, em geral utilizam como catalisador o ácido sulfúrico diluído a 0,1-0,7% ou o ácido clorídrico (CARDOSO, 2008). A hidrólise ocorre em dois estágios para acomodar as diferenças entre a hemicelulose e a celulose e para maximizar o rendimento em açúcares redutores provenientes da hemicelulose e da celulose (HARRIS *et al.*, 1985). O primeiro estágio é operado sob condições mais brandas para hidrolisar a hemicelulose, enquanto que o segundo estágio é otimizado para hidrolisar a fração de celulose mais resistente. Os hidrolisados líquidos são recuperados em cada etapa, neutralizados e fermentados em etanol.

O National Renewable Energy Laboratory (NREL) (Golden, Colorado, subordinado ao

Departamento de Energia dos EUA), operado pela Midwest Research Institute, Bettelle, esboçou um processo no qual a hidrólise é realizada em duas fases para acomodar as diferenças entre a hemicelulose e celulose. A primeira etapa pode ser operada sob condições mais brandas para maximizar o rendimento da hemicelulose, a qual é hidrolisada mais rapidamente. A segunda etapa é otimizada para a hidrólise da fração cristalina da celulose. O NREL relatou os resultados de uma hidrólise ácida diluída de coníferas em que as condições dos reatores foram às seguintes: Fase 1, 0,7% de ácido sulfúrico, 190 °C, com tempo de 3 minutos; Fase 2, 0,4% de ácido sulfúrico, 215° C, com tempo de 3 minutos. Os hidrolisados líquidos foram recuperados em cada etapa e fermentados a etanol (NGUYEN, 1998).

Porém, devido às altas temperaturas aplicadas no segundo passo, uma quantidade considerável de açúcares e lignina solúvel são degradados levando a uma inibição durante o processo de fermentação (CLARK e MACKELI, 1984, WYMAN, 1994; LARSSON *et al.*, 1998).

#### **2.4.1.2. Hidrólise com ácido concentrado**

Os processos por ácido concentrado empregam ácido sulfúrico como agente de pré-tratamento, seguido pelo estágio de hidrólise com ácido diluído. O ácido concentrado desfaz a estrutura cristalina da celulose. Assim que a estrutura da celulose passa ao estado amorfo, torna-se possível a sua transformação completa e rápida em açúcares redutores, empregando condições não muito severas de reação (CARDOSO, 2008).

No processo de hidrólise ácida concentrada são utilizadas concentrações de ácido sulfúrico de 30 a 70 % em massa a temperaturas inferiores a 100 °C. Apesar de 90% da hidrólise da celulose e hemicelulose serem alcançadas neste processo, os ácidos concentrados são tóxicos, corrosivos e perigosos e exigem reatores que são resistentes à corrosão. Além disso, o ácido concentrado deve ser recuperado após a hidrólise para tornar o processo economicamente viável (VON SIVERS e ZACCHI, 1995).

A etapa de hidrólise gera subprodutos de reação indesejáveis, tais como: ácidos orgânicos de baixo peso molecular e compostos furânicos e fenólicos, que inibem a fermentação alcoólica (HASSUANI *et al.*, 2005).

### 2.4.2. Hidrólise Enzimática

No processo enzimático, a biomassa lignocelulósica é primeiramente pré-tratada para aumentar a acessibilidade ao ataque enzimático. Durante o pré-tratamento, a hemicelulose é hidrolisada em um processo similar ao primeiro passo da hidrólise com ácido diluído. No segundo passo, a hidrólise propriamente dita, a celulose é quebrada pela ação das enzimas celulasas (EKLUND *et al.*, 1990).

Os processos enzimáticos empregam celulase como biocatalisador de hidrólise, que requer condições brandas, temperaturas próximas a 50 °C, pH na faixa 4,5-6,0 e operação na pressão atmosférica, permitindo ainda, conversões superiores às obtidas pela hidrólise química, menor destruição de açúcares e menor acúmulo de substâncias tóxicas (furfurais e derivados de lignina) que podem afetar as células microbianas que serão utilizadas para fermentação do meio hidrolisado. Na rota enzimática são detectados pontos de economia no processo, tanto do ponto de vista energético, como de materiais, visto que os equipamentos podem ser confeccionados com materiais menos nobres. As principais barreiras aos processos enzimáticos são: o custo muito elevado da enzima celulase e o tempo mais longo para se obter rendimentos altos; um consumo energético elevado para manter os grandes volumes agitados e aquecidos por 48 a 96 horas, há também o risco de contaminação (CASTRO e PEREIRA, 2010; HASSUANI, 2005; GLASSER e KELLY, 1987; FENGEL e WEGENER, 1989).

A hidrólise enzimática da celulose e conversão dos açúcares liberados em moléculas de interesse, tal como o etanol, podem ser conduzidas de forma sequencial (processo HSF, hidrólise separada da fermentação) ou simultânea (SSF, sacarificação simultânea à fermentação) (OLOFSSON *et al.*, 2008).

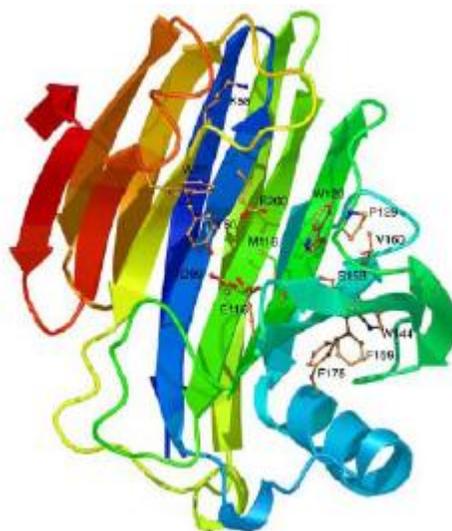
O processo SSF contribui com menor custo de investimento à planta, visto que nele são agrupadas duas etapas em um mesmo vaso reacional. Nessa forma de condução, as enzimas são menos passíveis de inibição pelos produtos de hidrólise, pois a glicose liberada é concomitantemente fermentada (OLOFSSON *et al.*, 2008). A manutenção de uma baixa concentração de glicose no meio também favorece o equilíbrio das demais reações de hidrólise, no sentido de formação de mais produto (CASTRO e PEREIRA, 2010).

Já o processo HSF apresenta como uma das principais vantagens frente ao SSF, a possibilidade de ambas as etapas, de hidrólise e de fermentação, serem conduzidas em suas

condições ótimas. Conforme discutido, as celulases comumente apresentam melhor atividade catalítica em temperaturas acima de 50 °C, bem acima da temperatura ideal para a etapa fermentativa. Nesse caso, como não há matéria-prima em suspensão durante a fermentação, as células podem ser recicladas ao sistema. No entanto, essa estratégia apresenta como desvantagens: o acúmulo de açúcares intermediários da hidrólise, causando inibição às enzimas (CASTRO e PEREIRA, 2010).

## 2.5. As Enzimas Celulolíticas

A celulase é classificada como sendo uma hidrolase e segundo a nomenclatura enzimática (E.C. 3.2.1), hidrolases *O*-glicosídicas são baseadas em sua especificidade ao substrato e ocasionalmente no seu mecanismo molecular. De acordo com a nomenclatura o número 3 refere-se às hidrolases; 3.2 glicosilases e 3.2.1 glicosidases, isto é, enzimas que hidrolisam compostos *O*-glicosil ou *S*-glicosil. Atualmente as hidrolases glicosídicas são agrupadas em 87 famílias (MARTINS, 2007). A Figura 2.10, apresenta a estrutura de uma celulase de *Trichoderma reesei*.



**Figura 2.10:** Celulase de *Trichoderma reesei* (SANDGREN *et al.*, 2005).

Tradicionalmente, as celulases foram classificadas em duas classes distintas: celobiohidrolases (CBH), também chamados *exo*-1,4- $\beta$ -D-glucanases (E.C 3.2.1.91) e *endo*-1,4- $\beta$ -D-glucanases (EG) (E.C 3.2.1.4), com base na sua especificidade de substrato, ou seja, a afinidade para os terminais ou interior da cadeia de celobiose, respectivamente. A terceira classe de enzimas trabalhando em conjunto e em sinergia com a CBH e EG, são  $\beta$ -glicosidases (BG). Elas muitas vezes não são reconhecidas como celulases "reais", pois hidrolisam ligações glicosídicas principalmente de oligosacarídeos solúveis e celobiose, logo não agindo na celulose em si (ANDERSEN, 2007).

As enzimas do complexo celulásico, responsáveis pela degradação de materiais lignocelulósicos são produzidas principalmente por microrganismos como fungos filamentosos e bactérias. As espécies de fungos mais estudadas que produzem celulases são o *Trichoderma reesei*, *Penicillium pinophilum*, *Humicola insolens*, *Trichoderma koningii*, *Penicillium funiculosum*, *Fusarium solani*, *Myrothecium verrucaria*, *Sporotrichum pulverulentum* e *Aspergilo niger*. Tais fungos excretam uma celulase de alta atividade no meio de cultura (PATHAK e GHOSE, 1973; STERNBERG, 1976; LEE e FAN, 1980; CANEVASCINI e GATTEN, 1981; LARIOS *et al.*, 1984; FAN *et al.*, 1987; DUFF e MURRAY, 1996). Entre as bactérias produtoras de celulase têm-se a *Cellulomonas fimi* e *Clostridium thermocellum* (BISARIA, 1991).

A quantidade das enzimas produzidas no complexo enzimático varia entre as espécies e depende do microrganismo que as produziu (ANDERSEN, 2007). Na Tabela 2.3, temos a distribuição individual das enzimas no complexo celulásico em três extratos produzidos por *Trichoderma longibrachiatum* Rut 30, *Humicola insolens* DSM 1800 e *Penicillium brasilianum* 20.888 IBT.

**Tabela 2.3:** Distribuição das enzimas que compõem o complexo celulolítico nas cepas de *Trichoderma*, *Humicola* e *Penicillium* (ANDERSEN, 2007).

Componente	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> Rut 30 [%] <sup>a</sup>	<i>Humicola insolens</i> DSM 1800 [%] <sup>a</sup>	<i>Penicillium brasilianum</i> IBT 20888 [%] <sup>b</sup>
CBH I (Cel7A)	50	20	18
CBH II (Cel6A)	20	< 5	25
EG I (Cel7B)	10	50	4
EG II (Cel5A)	5	5	10
EG III (Cel12A)	< 5	5	21
EG V (Cel45A)	< 5	10	n.d
BG (Cel3A)	~ 1-2	~ 1-2	n.d
Outras (não-celulase)	10	10	n.d

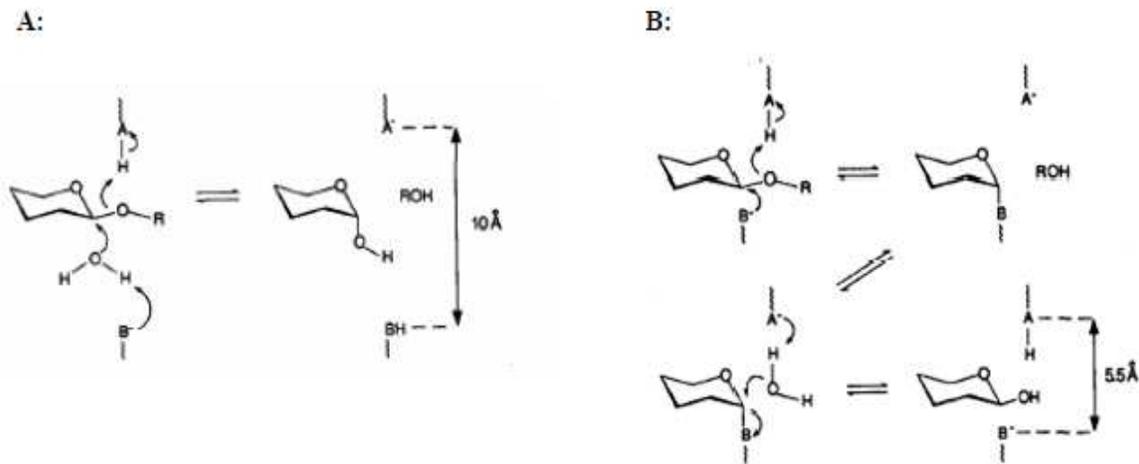
CBH: Celobiohidrolase; EG: Endoglucanase; BG:  $\beta$ -glicosidase; n.d: não determinado; <sup>a</sup>: de TOLAN e FOODY, 1999; <sup>b</sup>: de JØRGENSEN *et al.*, 2003.

### 2.5.1. Mecanismos da atividade celulolítica

Enzimas celulolíticas, como as glicosil hidrolases, hidrolisam ligações glicosídicas através de uma reação ácido-base onde os aminoácidos constituintes do sítio ativo atuam como ácidos e bases de Brønsted (MARTINS, 2005).

Hidrólise, como o próprio nome descreve, envolve a quebra de ligações por adição de água. Dois mecanismos diferentes podem ser distinguidos: o mecanismo de inversão e o de retenção (Figura 2.11). No mecanismo de inversão (Figura 2.11.A) ocorre um deslocamento de um nucleófilo no qual o ambiente carregado do sítio catalítico é utilizado para "ativar" um molécula de água para agir como um nucleófilo, enquanto um resíduo de aminoácido ácido doa o próton necessário. Nessa via catalítica, a ligação glicosídica é hidrolisada em apenas uma etapa e ocorre a inversão do carbono anomérico (C<sub>1</sub>), gerando um anômero  $\alpha$ .

O mecanismo de retenção (Figura 2.11.B) prossegue em duas etapas. Primeiro, uma ligação covalente intermediária é formada através do ataque nucleofílico de um aminoácido carregado sobre a ligação glicosídica. Na segunda etapa, a molécula de água libera o produto de hidrólise da enzima e recarrega aminoácido desprotonado (MOSIER *et al.*, 1999).



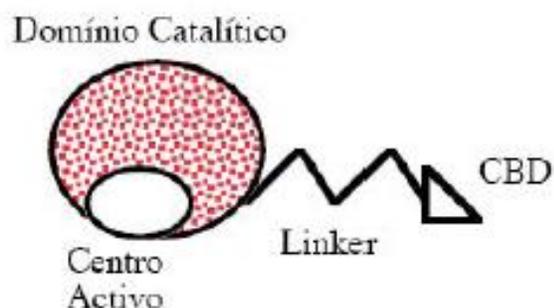
**Figura 2.11:** Representação esquemática dos mecanismos de inversão (A) e retenção (B) da hidrólise enzimática das ligações glicosídicas (DAVIES e HENRISSAT, 1995).

Enzimas que utilizam o mecanismo de retenção geralmente são capazes de realizar transglicosilação, enquanto que enzimas de inversão não podem (WILSON e IRWIN, 1999). Outra grande diferença entre glucosidases de inversão e retenção é a distância entre os dois resíduos de ácido. Para as enzimas de inversão a distância é de aproximadamente 10 Å, enquanto que a diferença média entre os resíduos catalíticos para a glucosidases de retenção é de aproximadamente 5,5 Å (MCCARTER e WITHERS, 1994; MOSIER *et al.*, 1999).

### 2.5.2. Constituição Estrutural das celulasas

Muitas celulasas são compostas por dois domínios distintos: o domínio de ligação ao substrato (DLS), “cellulose binding domain (CBD)”, ou “cellulose binding module (CBM)”, e o domínio catalítico (DC), que abriga o sítio ativo. Estes domínios estão ligados um ao outro através de uma cadeia polipeptídica flexível designada por “linker”, como mostra a Figura 2.12. O sítio ativo possui como função a hidrólise das ligações glicosídicas da celulose e cada classe de celulase possui uma forma diferente de sítio ativo, permitindo a hidrólise de ligações localizadas em regiões distintas do substrato (exemplo: ligações internas e ligações terminais, localizadas nas extremidades das cadeias) (MARTINS, 2005).

Os CBM aumentam a concentração de enzimas na superfície do substrato sólido, facilitando a ação das regiões ativas, ainda que possam também produzir uniões improdutivoas no substrato a elevadas concentrações de enzima (PALONEN *et al.*, 2004b).



**Figura 2.12:** Representação esquemática de uma celulase (CAVACO-PAULO, 1995).

Acredita-se que as diferenças existentes entre as estruturas dos domínios catalíticos da endoglicanases e celobiohidrolases são as responsáveis pela diferença no modo de ação delas. Nas celobiohidrolases o DC apresenta uma estrutura em túnel de aproximadamente 50 Å de comprimento, enquanto que nas endoglicanases o DC se dispõe de uma estrutura em fenda ou rachadura. (DIVNE *et al.*, 1994; HENRIKSSON *et al.*, 1996).

As enzimas que não apresentam CBM, ou seja, somente apresentam o domínio catalítico, têm mostrado que ainda apresentam habilidade para adsorver na celulose, mas com afinidade mais baixa que as outras enzimas que apresentam os dois domínios (SCHULEIN, 1997; KARLSSON *et al.*, 2002).

Na Tabela 2.4, temos um resumo das principais características de enzimas utilizadas na hidrólise da biomassa lignocelulósica provenientes de diversos microorganismos.

**Tabela 2.4:** Principais características de algumas enzimas celulolíticas utilizadas na hidrólise da biomassa lignocelulósica (ANDERSEN, 2007).

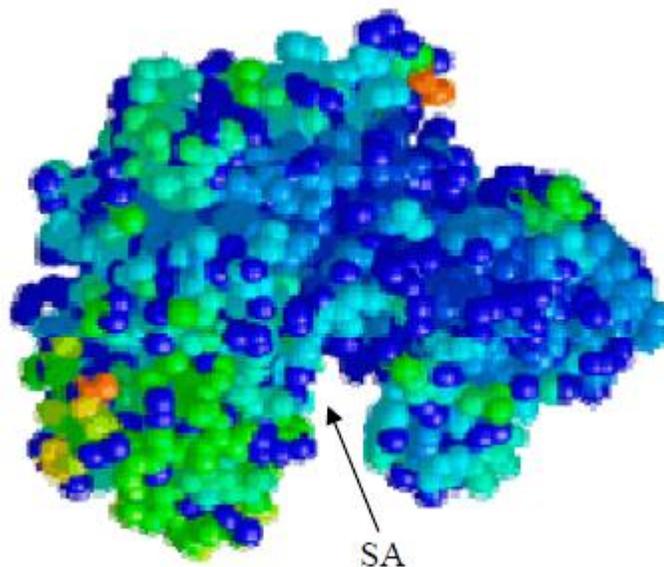
<b>Enzimas Mono-Componentes</b>						
	<b>Classe</b>	<b>Organismo</b>	<b>PM [kDa]</b>	<b>DLS</b>	<b>Mecanismo</b>	<b>pH ótimo</b>
<b>Cel7B</b>	EG I	<i>H. insolens</i>	50	Não	Retenção	7,5
<b>Cel45A</b>	EG V	<i>H. insolens</i>	43	Sim	Inversão	7,5
<b>Cel5C</b>	EG	<i>P. brasilianum</i>	65	Sim	Retenção	4,0
<b>Cel7A</b>	CBH I	<i>H. insolens</i>	70	Sim	Retenção	5,5 - 6,0
<b>Cel6A</b>	CBH II	<i>H. insolens</i>	51	Sim	Inversão	9,0
<b>Cel7B</b>	CBH	<i>P. brasilianum</i>	60	Não	Retenção	n.d
<b>Cel3A</b>	BG	<i>P. brasilianum</i>	110	Não	Retenção	4,8
<b>MCN 188</b>	BG	<i>A. niger</i>	91	Não	Retenção	4,0

CBH: Celobiohidrolase; EG: Endoglicanase; BG:  $\beta$ -glicosidase; n.d: não determinado; DLS: Donínio de Ligação ao Substrato; MCN 188: Mono-component Novozym 188 ( $\beta$ -glicosidase purificada).

### 2.5.3. Endoglicanase (EGs)

A endoglicanase é a enzima do complexo celulolítico responsável por iniciar a hidrólise. Tal enzima hidrolisa randomicamente as regiões internas da estrutura amorfa da fibra celulósica, liberando oligossacarídeos de diversos graus de polimerização (GP) e, conseqüentemente, novos terminais, sendo um redutor (quando a glicose possui uma hidroxila heterosídica livre) e um não redutor (quando a hidroxila heterosídica da molécula da extremidade participa de ligação com a glicose adjacente) (LYND *et al.*, 2002). A EG é a enzima celulolítica responsável pela rápida solubilização do polímero celulósico (redução do GP), devido à sua fragmentação em oligossacarídeos (KLEMAN-LEYER *et al.*, 1996).

O sítio ativo das endoglicanases possui a forma de uma chave, possibilitando a ação da enzima ao longo da cadeia de celulose e reduzindo o seu grau de polimerização de maneira considerável (MARTINS, 2005). As regiões de menor organização estrutural são mais facilmente atacadas, pois possuem cadeias que não estão envolvidas em interações de hidrogênio intermoleculares tão fortes quanto as que ocorrem em regiões cristalinas, levando, conseqüentemente, a uma maior exposição das ligações glicosídicas mais internas das cadeias de celulose (Figura 2.13).

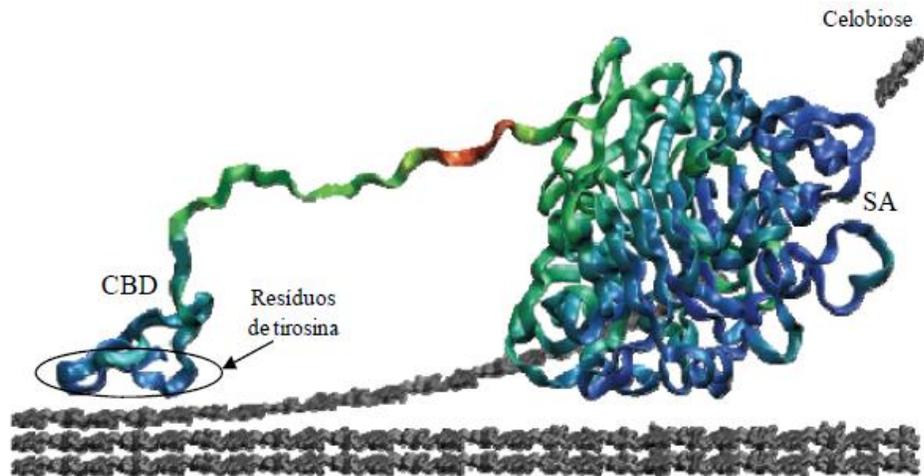


**Figura 2.13:** Sítio ativo (SA) em forma de chave das endoglicanases, que permite o acesso ao longo de uma cadeia de celulose (MARTINS, 2005).

#### 2.5.4. Celobiohidrolases (CBs)

As exoglicanases (ou CBHs) atuam nas extremidades das cadeias de celulose, liberando a celobiose como produto principal (ZANDONÁ FILHO, 2001; ROUVINEN *et al.*, 1990; DAVIES e HENRISSAT, 1995; HENRISSAT, 1998). Ocasionalmente, glicose e celotriose são produzidas em pequenas quantidades durante o estágio inicial da hidrólise (DIVNE *et al.*, 1994). Uma característica importante de todas as celobiohidrolases é que elas podem atuar na celulose microcristalina (TERRI, 1997).

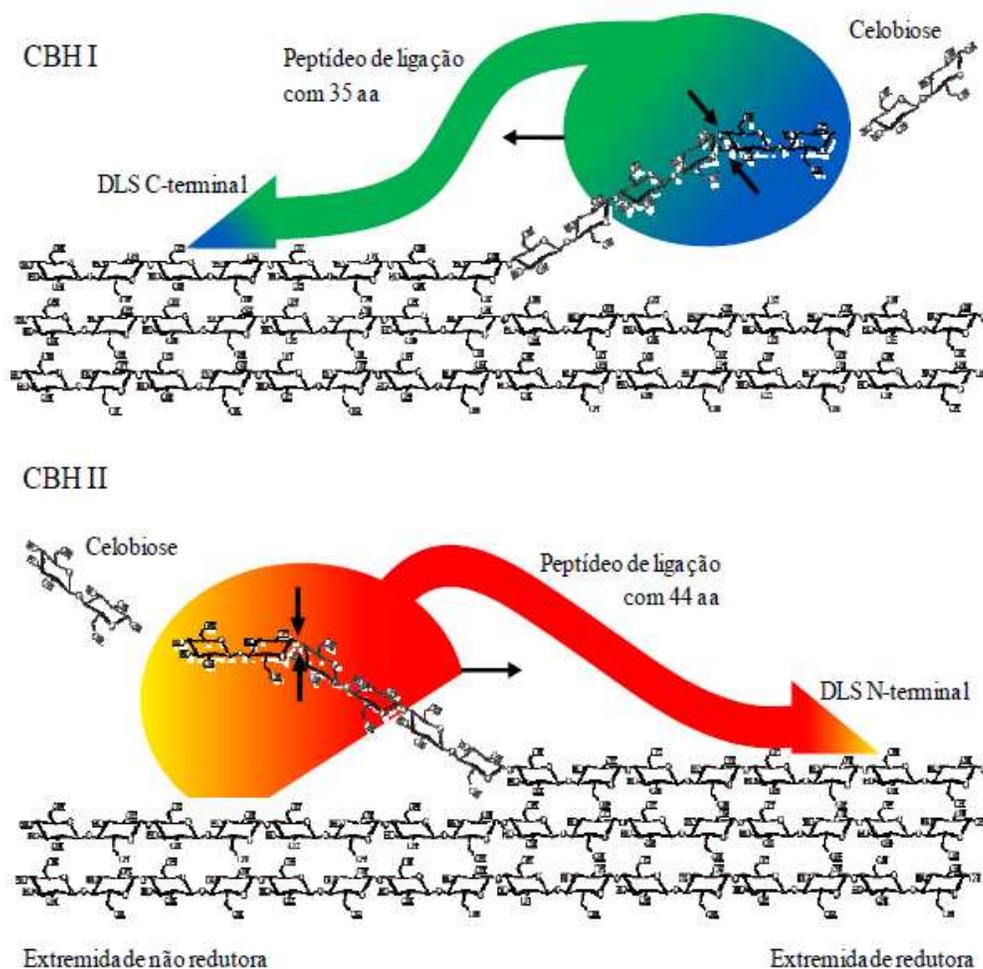
O sítio ativo das celobiohidrolases possui a forma de um túnel por onde a cadeia de celulose penetra e sofre hidrólise de suas ligações glicosídicas terminais (Figura 2.14), liberando majoritariamente celobiose (HUI, *et al.*, 2002). O CBD é constituído por 35 aminoácidos (aa) na CBH I e 44 aminoácidos na CBH II (Figura 2.15), possuindo a importante função de promover a adsorção da proteína ao substrato, conferindo estabilidade ao agregado e permitindo a melhor aproximação da cadeia de celulose ao sítio ativo (HUI, *et al.*, 2002). A adsorção ocorre por meio da interação de resíduos de tirosina (Tyr), presentes no CBD, com as unidades de glicopirranose, presentes na superfície da celulose (Figura 2.14) (MARTINS 2005).



**Figura 2.14:** Representação do sítio ativo (SA) e do domínio de ligação ao substrato (CBD) da CBH I de *Trichoderma reesei* (ROCHA DO MONTE, 2009).

As exoglicanases não atuam sobre celuloses solúveis por haver um impedimento estereoquímico causado pelos grupos substituintes, seja carboximetílico (CMC) ou hidroxietílico (HEC). As exoglucanases atuam sobre celulose cristalina (Avicel), produzindo uma redução lenta e gradual do seu grau de polimerização. Assim, ensaios de atividade sobre CMC (carboximetilcelulose) são característicos para as endoglucanases (EGs), enquanto que a atividade contra Avicel caracteriza as CBHs, tornando possível a diferenciação entre essas enzimas (MARTINS, 2005).

Estudos bioquímicos sugerem que CBH I hidrolisam as extremidades redutoras das cadeias de celulose em direção às extremidades não redutoras (BARR *et al.*, 1996; BOISSET *et al.*, 2000) (Figura 2.15), enquanto que a hidrólise das extremidades não redutoras acontece em direção à extremidade redutora pela CBH II (MOSIER *et al.*, 1999).



**Figura 2.15:** Representação do modo de ação da celobiohidrolase I (CBHI) e da celobiohidrolase II (CBH II) de *Trichoderma reesei* (ROCHA DO MONTE, 2009).

EGs e CBHs estão sujeitas à inibição pelo produto (celobiose e glicose). A celobiose apresenta um efeito inibidor nas enzimas maior que a glicose (HOLTZAPPLE *et al.*, 1990). Os modelos padrão de inibição, ou seja, inibição competitiva, não-competitiva, ou uma mistura destas, têm se mostrado dependentes do tipo de ligação com a celulase, da concentração de enzimas, da área de superfície da celulose acessível às enzimas, da razão enzima/substrato, da natureza e concentração do substrato e da variação da atividade de  $\beta$ -glicosidase (GUSAKOV e SINITSYN, 1992; GRUNO *et al.*, 2004).

### 2.5.5. $\beta$ -glicosidases (BGs)

As  $\beta$ -glicosidases, também denominadas celobiasas, hidrolisam a celobiose em glicose e removem glicose de terminais não redutores de pequenas celodextrinas. As  $\beta$ -glicosidases têm um papel fundamental para a degradação de materiais lignocelulósicos. A celobiose, principal substrato para a  $\beta$ -glicosidase, é um potente inibidor das enzimas EGs e CBHs, portanto a ausência dessa enzima diminui o potencial do processo de sacarificação da biomassa (NICOLAU DE ALMEIDA, 2009). HAN e CHEN (2008) mostraram que a adição de  $\beta$ -glicosidase de sabugo de milho durante a sacarificação e fermentação desta mesma biomassa diminui a concentração de celulose em 28% e a produção de etanol aumentou em 20%.

O mercado atual oferece muitos complexos de celulase que contêm níveis baixos de  $\beta$ -glicosidase, conduzindo a um aumento do acúmulo de celobiose nos hidrolisados enzimáticos de celulose, logo é indicado que se adicione no meio reacional uma certa quantidade desta enzima proveniente de outras fontes de complexos enzimáticos. Desta forma há uma diminuição da concentração de celobiose no meio reacional, ocasionando diminuição da inibição e aumento na eficiência da hidrólise enzimática (SZCZODRAK e FIEDUREK, 1996; SUN e CHENG, 2002).

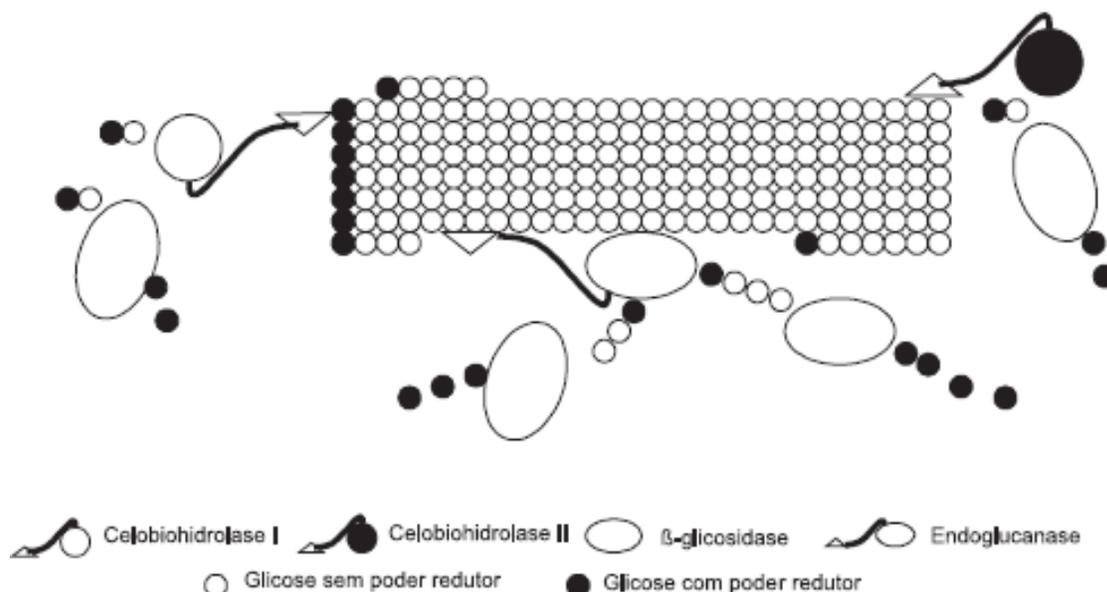
O mecanismo de catálise da hidrólise das ligações glicosídicas ocorre de maneira semelhante para as endoglucanases e para as celobiohidrolases, através de uma reação ácido-base onde os aminoácidos constituintes do sítio ativo atuam como ácidos e bases de Bronsted (MARTINS, 2005).

### 2.5.6. Sinergismo entre as Enzimas Celulolíticas

Quando atuam conjuntamente, as enzimas do complexo celulolítico apresentam um rendimento melhor do que a soma dos rendimentos individuais, ou seja, quando atuam isoladamente umas das outras. Tal efeito é conhecido como sinergia. São conhecidas pelo menos três formas de sinergia entre as celulases (LYND *et al.*, 2002; BHAT e BHAT, 1997): sinergia *endo-exo* - a endoglucanase, atuando nas regiões amorfas da fibra, disponibiliza terminais redutores e não redutores para atuação de CBH I e CBH II, respectivamente; sinergia *exo-exo* - as CBH I e CBH II atuam simultaneamente na hidrólise dos terminais redutores e não redutores liberados por ação da endoglucanase; sinergias *exo-BG* e *endo-BG* - como seus produtos de hidrólise, a celobiohidrolase e a endoglucanase liberam celobiose e oligossacarídeos,

respectivamente, que são substratos para a  $\beta$ -glicosidase (CASTRO e PEREIRA, 2010).

A Figura 2.16 ilustra a ação sinérgica entre exoglicanase, endoglicanase e  $\beta$ -glicosidase na hidrólise da fibra celulósica.



**Figura 2.16:** Modo de ação das enzimas do complexo celulolítico (CASTRO e PEREIRA, 2010).

Numerosos estudos realizados sobre sinergia entre as enzimas celulolíticas purificadas mostraram que a sinergia é dependente da proporção individual das enzimas (HENRISSAT *et al.*, 1985), da concentração (WOODWARD *et al.*, 1988), e das propriedades físico-químicas do substrato (HENRISSAT *et al.*, 1985).

## 2.6. Fatores que afetam a hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos é confrontada por uma série de fatores que diminuem o desempenho da enzima, o que aumenta o tempo necessário para a hidrólise completa.

A Figura 2.17 apresenta alguns fatores que limitam a hidrólise enzimática, principalmente quando se trabalha em altas concentrações de sólidos:

1: Inibição da  $\beta$ -glicosidase e da celobiohidrolase pelos produtos (glicose e celobiose, respectivamente).

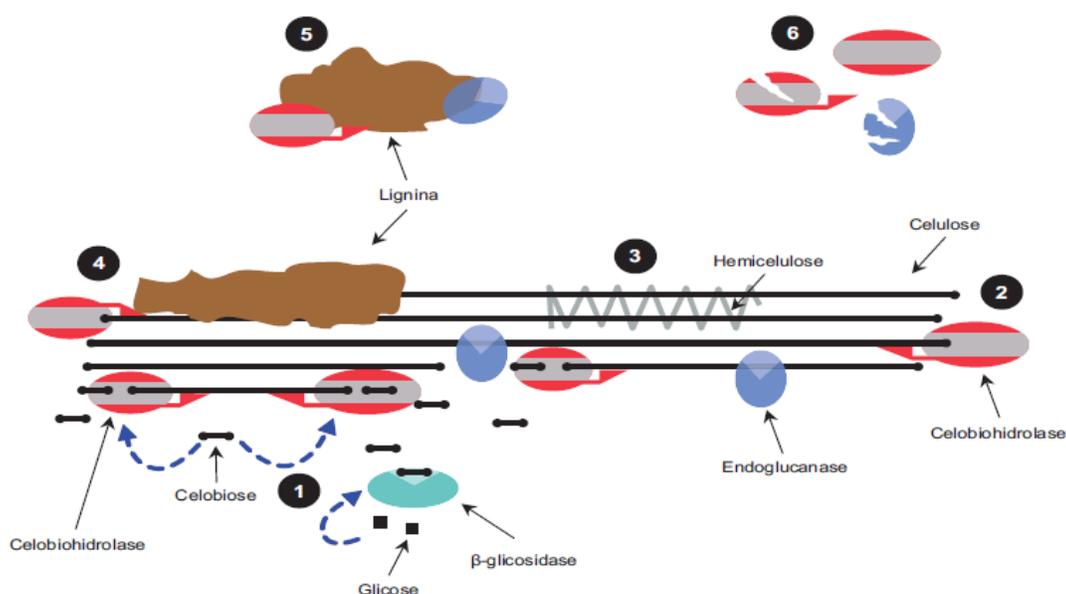
2: Adsorção improdutiva da celobiohidrolase à celulose. Devido à processabilidade das celobiohidrolases e sua forte ligação à cadeia de celulose em seu núcleo catalítico, obstáculos podem paralisar as enzimas levando a uma ligação improdutiva.

3: Obstrução do acesso das celulases à celulose pela hemicelulose.

4: Obstrução do acesso das celulases à celulose pela lignina

5: Adsorção inespecífica das enzimas à lignina.

6: Desnaturação ou perda da atividade enzimática devido a agitação mecânica, atividade proteolítica ou baixa termoestabilidade



**Figura 2.17:** Visão simplificada dos principais fatores que limitam a eficiência da hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica (simbolizados por linhas retas) (JØRGENSEN *et al.*, 2007).

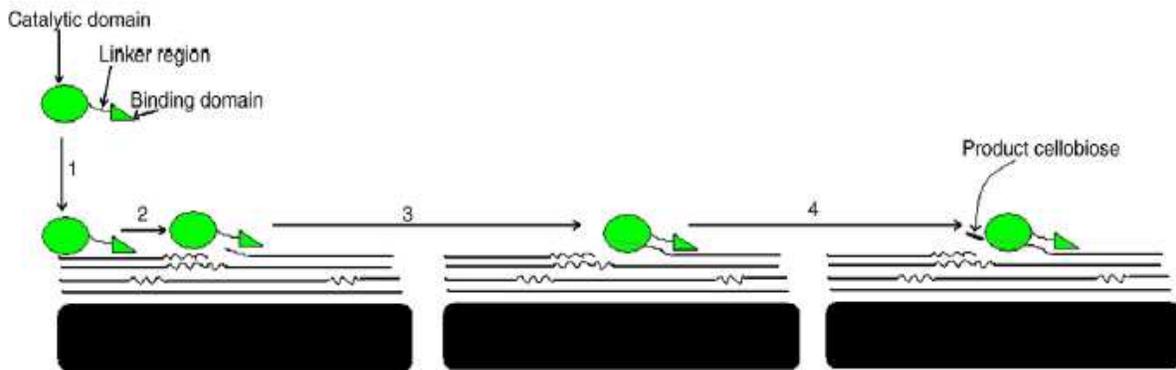
O uso de altas concentrações de substrato aumenta o problema da inibição por produto, o que resulta em menor desempenho das enzimas. A presença de lignina, que protege as cadeias de celulose e adsorve as enzimas, é também um importante obstáculo para uma hidrólise eficiente. Além disso, a atividade de algumas enzimas pode ser perdida devido à desnaturação ou degradação (JØRGENSEN *et al.*, 2007). Dentre os fatores que estão intimamente ligados à composição do substrato e, portanto, ao método de pré-tratamento empregado, vale citar

alterações em sua porosidade e área superficial durante a hidrólise (SUN e CHENG, 2002; MANSFIELD *et al.*, 1999), o acúmulo de lignina no meio reacional (para substratos ricos em lignina) (PAN *et al.*, 2004; ADSUL *et al.*, 2005; SCHEVCHENKO *et al.*, 1999; MOONEY *et al.*, 1999) e mudanças no grau de polimerização e na cristalinidade da celulose (FAN *et al.*, 1987; MARTÍN *et al.*, 2007; RAMOS *et al.*, 1992).

## **2.7. Mecanismo da reação de hidrólise enzimática**

A hidrólise da celulose, devido à sua natureza heterogênea, envolve mais passos do que a cinética enzimática clássica. As principais etapas são descritas por BANSAL *et al.*, (2009) (Figura 2.18):

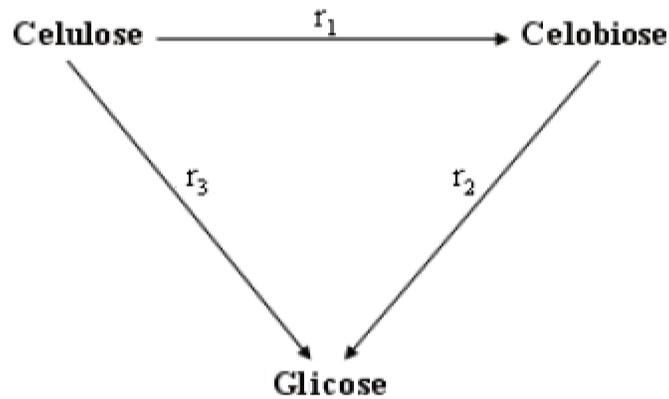
1. Adsorção das celulasas no substrato via domínio de ligação (STÅHLBERG *et al.*, 1991),
2. Localização de uma ligação suscetível para hidrólise na superfície do substrato (JERVIS *et al.*, 1997) (final da cadeia se celobiohidrolase, quebra de ligação se endoglicanase),
3. Formação do complexo enzima-substrato (Por ligação no final da cadeia no túnel catalítico da celobiohidrolase, para iniciar a hidrólise) (DIVINE *et al.*, 1998; MULAKALA e REILLY, 2005),
4. Hidrólise da ligação  $\beta$ -glicosídica e simultâneo deslizamento da enzima ao longo da cadeia de celulose (DIVINE *et al.*, 1998; MULAKALA e REILLY, 2005),
5. Dessorção das celulasas do substrato ou repetição da etapa 4 ou etapas 2 e 3 somente se o domínio catalítico desprender-se da cadeia,
6. Hidrólise da celobiose a glicose pela enzima  $\beta$ -glicosidase (se presente no complexo enzimático). Além disso, a inibição do produto (BEZERRA e DIAS, 2005; HOLTZAPPLE *et al.*, 1990; XIAO *et al.*, 2004; YUE *et al.*, 2004) e as mudanças nas propriedades do substrato ao longo da hidrólise afetam os passos acima.



**Figura 2.18:** Etapa 1 a 4 para uma celobiohidrolase atuando sobre um substrato celulósico (não em escala). Para endoglicanase, etapas 2 e 3 são diferentes, pois não exigem cadeia terminal para agir. Etapa 1 — Adsorção, etapa 2 — posição no final da cadeia, etapa 3 — formação de um complexo enzima-substrato, etapa 4 — hidrólise da ligação  $\beta$ -glicosídica (BANSAL *et al.*, 2009).

## 2.8. Modelagem da hidrólise enzimática em biomassa lignocelulósica

Uma vez que a celulose é um substrato insolúvel e as enzimas são catalisadores solúveis, a hidrólise enzimática é um processo biocatalítico heterogêneo. A maioria dos modelos para hidrólise enzimática foram desenvolvidos baseando-se no esquema de três reações (ZHENG *et al.*, 2009b) mostrado na Figura 2.19 no qual as reações  $r_1$ ,  $r_2$  e  $r_3$  estão envolvidas: 1) uma reação heterogênea para a produção de celobiose a partir da celulose catalisada pelas enzimas endoglucanase (EG) e celobiohidrolases (CBH I e CBH II); 2) uma reação homogênea para a produção de glicose a partir de celobiose catalisada pela enzima  $\beta$ -glicosidase (BG); e 3) uma reação heterogênea para a produção de glicose a partir da celulose catalisada pelas celobiohidrolases (CBH I e CBH II).



**Figura 2.19:** Esquema de reação simplificado para a modelagem da hidrólise de biomassa lignocelulósica (Adaptado de ZHENG *et al.*, 2009b).

O balanço de massa para o substrato (celulose) e produtos (celobiose e glicose) é dado pelas equações de (2.5) a (2.7):

$$\frac{dC}{dt} = -r_1 - r_3 \quad (2.5)$$

$$\frac{dB}{dt} = 1.056 r_1 - r_2 \quad (2.6)$$

$$\frac{dG}{dt} = 1.053 r_2 + 1.111 r_3 \quad (2.7)$$

Onde C, B e G são as concentrações de celulose, celobiose e glicose, respectivamente, e  $r_1$ ,  $r_2$  e  $r_3$  são as taxas de reação.

Os balanços de massa de celulose, celobiose e glicose são baseados em princípios de conservação de massa, de forma que estas equações (Equações (2.5) a (2.7)) não vão mudar se modificações forem feitas nas expressões para a taxa de reação (ZHENG *et al.*, 2009b).

## 2.9. Classe de modelos

Os modelos para hidrólise enzimática de substratos lignocelulósicos e para substratos celulósicos puros podem ser amplamente divididos em três classes: modelos empíricos (Tabela 2.5), modelos baseados em Michaelis-Menten (Tabela 2.6) e modelos que levam em conta a adsorção (Tabela 2.6).

### 2.9.1. Modelos empíricos

Um modelo representativo desta categoria é aquele proposto por GHARPURAY *et al.* (1983). Esses autores utilizaram a regressão para desenvolver um modelo exponencial para descrever a influência das características da palha de trigo pré-tratada sobre a conversão da celulose ( $X = 1 - [\text{concentração final de celulose}]/[\text{concentração inicial de celulose}]$ ) medida após 8 h:

$$X = 2.044(SSA)^{0.998}(100 - CrI)^{0.257}(L)^{-0.388} \quad (2.8)$$

Onde SSA é a área superficial medida pelo método BET (Brunauer-Emmett-Teller), CrI é o índice de cristalinidade e L é teor residual de lignina. Os resultados indicaram que o aumento na área superficial e a diminuição na cristalinidade e teor de lignina melhoraram a hidrólise, com a área superficial sendo o fator estrutural mais influente, seguido pelo teor de lignina (ZHANG e LYND, 2004).

A Tabela 2.5, apresenta uma lista de modelos empíricos na literatura, junto com suas variáveis previstas e independentes

Embora os modelos empíricos não sejam aplicáveis fora das condições para as quais eles foram desenvolvidos e não forneçam nenhuma visão sobre os detalhes mecânicos do processo, eles são úteis de diversas maneiras:

a) Eles podem ajudar na compreensão das interações entre as propriedades do substrato. Pode ser mostrado que os efeitos de uma propriedade individual do substrato, tal como cristalinidade ou teor de lignina, pode depender dos níveis de outras (CHANG e HOLTZAPPLE, 2000; KIM e HOLTZAPPLE, 2006; O'DWYER *et al.*, 2008).

b) Modelos empíricos podem ser úteis em estimativas de taxas iniciais, os quais são

importantes em experimentos de ressuspensão ou “resuspension experiments” (onde as enzimas são separadas da superfície da celulose não reativa e o substrato parcialmente hidrolisado é submetido à hidrólise enzimática sob condições iniciais) e gráficos de Lineweaver–Burk (LINEWEAVER e BURK, 1934) usados no modelos de Michaelis–Menten.

c) Modelos estatísticos podem ser usados para otimizar condições de reação (KIM *et al.*, 2008; VÁSQUEZ *et al.*, 2007). Nesses dois exemplos foi empregada a metodologia da superfície de resposta para se encontrar o nível ótimo (para maximizar a conversão de celulose a glicose) de fatores operacionais (pH, temperatura, carga enzimática e porcentagem de sólidos por VÁSQUEZ *et al.*, (2007) e pH, temperatura e concentração de enzimas por KIM *et al.*, (2008)).

**Tabela 2.5:** Modelos Empíricos (BG –  $\beta$ -glicosidase) (BANSAL *et al.*, 2009).

Referência	Y (variável predita)	X (variável independente)	Substrato	Fonte de Enzimas
GHARPURAY <i>et al.</i> (1983)	Extensão da hidrólise (depois de 8 h)	Cristalinidade, lignina, área superficial específica	Palha de trigo pré-tratada	<i>T. reesei</i>
OHMINE <i>et al.</i> (1983)	Conversão	Tempo	Avicel	<i>T. viride</i>
SATTLER <i>et al.</i> (1989)	Conversão	Tempo, frações de fácil e difícil hidrólise	Madeira de álamo pré-tratada	Celluclast+BG (Novo, Dinamarca)
KOULLAS <i>et al.</i> (1992)	Conversão, máxima conversão	Tempo, lignina e cristalinidade	Avicel moída, palha moída pré-tratada com álcali, palha de trigo moída, palha de trigo pré-tratada com álcali	<i>Fusarium oxysporum</i>
OOSHIMA <i>et al.</i> (1991)	Conversão, taxa de hidrólise, enzima adsorvida	Tempo	Avicel	<i>T. viride</i>
KURAKAKE <i>et al.</i> (1995)	Conversão, taxa de hidrólise, enzima adsorvida	Tempo	Avicel, madeira pré-tratada Wilner	<i>T. reesei</i> , <i>T. viride</i>

PARAJÓ <i>et al.</i> (1996)	Conversão	Tempo, frações de fácil e difícil hidrólise	Madeira de pinheiro pré-tratada com NaOH	<i>T. reesei</i> +BG
TARANTILI <i>et al.</i> (1996)	Conversão	Tempo, conversão máxima, tempo para alcançar metade da conversão máxima	Avicel moída, papel filtro, algodão grego purificado	<i>Fusarium oxysporum</i> and <i>Neurospora crassa</i>
MOLDES <i>et al.</i> (1999)	Taxa máxima de conversão de celulose, taxa max. de produção de glicose	Razão de enzima por substrato e razão de licor por sólidos	Lascas de madeira pré-tratadas	Celluclast (Novo Denmark)
CHANG e HOLTZAPPLE, (2000)	Conversão após 1 h e final de glucana e xilana	Lignina, teor de acetil, glucanas e índice de cristalinidade	Híbrido de álamo, bagaço de cana e switchgrass	Cytolase (celulase da Environmental BioTechnologies, Santa Rosa, CA)+BG
PARK <i>et al.</i> (2002)	Conversão	Tempo e concentração de enzimas	Resíduos de papel de escritório	<i>T. viride</i> , <i>Acremonium cellulolyticus</i>
LAUREANO-PEREZ <i>et al.</i> (2005)	Taxa inicial de hidrólise e extensão após 72 h	Cristalinidade e características espectroscópicas	Palha de milho	Cellulase from NREL+BG
KIM e HOLTZAPPLE, (2006)	Rendimentos de hidrólise de glucana, xilana e holocelulose	Lignina residual	Palha de milho pré-tratada	Spezyme CP from NREL+BG
VÁSQUEZ <i>et al.</i> (2007)	Concentração de glicose	pH, carga enzimática, temperatura e porcentagem de sólidos	Bagaço de cana hidrolisado com ácido	GC 220 (Genencor International Inc.)
BERLIN <i>et al.</i> (2007)	Conversão de glucana a glicose e xilana a xilose	Massa de xilanase, pectinase e $\beta$ -glucosidase	Palha de milho moída e palha de milho pré-tratada com ácido diluído	Celluclast 1.5L + BG (Novozymes), xilanase e

				pectinase (Genencor International)
KIM <i>et al.</i> (2008)	Concentração de açúcares redutores e etanol	pH, temperatura, inoculação de enzima, tempo de reação	Resíduos agrícolas	Spirizyme Plus FG (Novozymes, Dinamarca)
ZHOU <i>et al.</i> (2009)	Glicose produzida após 72 h de hidrólise	Concentrações de Cel7A, Cel6A, Cel6B, Cel7B, Cel12A, Cel61A	Palha de milho explodida a vapor	<i>T. viride</i> (Cel7A, Cel6A, Cel6B, Cel7B, Cel12A, Cel61A)+BG

### 2.9.2. Modelos baseados em Michaelis – Menten

A modelagem de Michaelis-Menten pressupõe um sistema homogêneo onde a transferência de massa (enzima-substrato e enzima-produto) não é a etapa limitante, portanto somente a etapa catalítica (complexo enzima-substrato ao complexo enzima-produto) é considerada como sendo a etapa que domina a reação. No entanto, a hidrólise da celulose ocorre em um sistema heterogêneo de duas fases. As enzimas são dissolvidas em uma fase aquosa, enquanto a celulose existe como sólido cristalino. Para dificultar ainda mais a modelagem, a celulose é um polímero heterogêneo que pode assumir diferentes formas de cristais e possuir diferentes graus de cristalinidade (MOSIER *et al.*, 1999).

A condição de excesso de substrato em relação a enzima que é geralmente empregada na suposição de estado pseudo-estacionário (SCHNELL, 2003) mesmo se já alcançada inicialmente, não é capaz de manter altas conversões visto que ocorrem alterações na estrutura do substrato durante a hidrólise.

A hidrólise da celulose é uma reação heterogênea ocorrendo na superfície do substrato, sendo além disso uma reação ocorrendo numa dimensão menor que três. Para sistemas de reação heterogêneos, suposições de cinética química clássica de sistemas mistos uniformes não vigoram, resultando em ordens de reação aparentes, constantes de velocidade dependentes do tempo e variação não uniforme das espécies reagentes no meio fractal ou dimensionalmente restrita (ANACKER e KOPELMAN, 1987; KOPELMAN, 1986; KOPELMAN, 1988). Este comportamento é chamado de cinética fractal.

A cinética de Michaelis-Menten pode ser aplicada para descrever a conversão da celobiose solúvel a glicose por  $\beta$ -glicosidase, já que esta é uma reação homogênea.

Na literatura temos modelos de Michaelis–Menten que apresentaram bons ajustes aos dados experimentais sob as condições em que eles foram desenvolvidos. BEZERRA e DIAS, (2004) testaram oito modelos diferentes de Michaelis–Menten contra dados de hidrólise de Avicel por *T. reesei* Cel7A para 24 razões de substrato-enzima diferentes (BANSAL *et al.*, 2009).

**Tabela 2.6:** Modelos baseados em Michaelis – Menten e Adorção. (M-M: Michaelis – Menten, IP — Inibição por produto, QSS — Suposição de Estado Pseudo-Estacionário, Ads — Abordagem de adsorção, BG –  $\beta$ -glicosidase) (Adaptado de BANSAL *et al.*, 2009).

Referência	Metodologia	Substrato	Fonte de Enzimas	Causa do declínio da taxa de reação além de IP
HUANG, (1975)	Ads, QSS	Solka Floc amorfa	<i>T. viride</i>	–
SUGA <i>et al.</i> (1975)	M-M	Estudo teórico		
HOWELL e STUCK, (1975)	M-M	Solka Floc	<i>T. viride</i>	–
MAGUIRE, (1977)	Ads	Fibra de celulose Alpha	<i>T. viride</i> Celobiohidrolase (então conhecida como enzima C <sub>1</sub> )	–
HOWELL, (1978)	QSS	Solka Floc	<i>T. viride</i>	Inativação da enzima
OKAZAKI e MOO-YOUNG, (1978)	QSS, M-M	Estudo analítico		
PEITERSON e EDWARD ROSS, (1979)	M-M, duas fases: cristalina + amorfa	Celulose deslignificada moída	<i>T. reesei</i> +BG	Dois fases: cristalina + amorfa
DWIVEDI e GHOSE, (1979)	Ads, QSS	Bagaço de cana-de-açúcar	<i>T. reesei</i>	-
FAN e LEE, (1983)	Ads	Solka Floc	<i>T. reesei</i> +BG	Diminuição da reatividade do substrato

ASENJO, (1983); ASENJO, (1984)	Ads	Solka Floc	<i>T. viride</i>	Somente uma fração é disponível para ataque
BELTRAME <i>et al.</i> (1984)	M-M	Têxteis, resíduos de algodão, polpa pré-tratada	<i>T. viride</i> +BG	–
HOLTZAPPLE <i>et al.</i> (1984)	Ads, QSS	Solka Floc	<i>T. viride</i> +BG	Accessibilidade é incluída como um parâmetro
SCHEIDING <i>et al.</i> (1984)	M-M	Avicel	<i>T. reesei</i> +BG	Desativação da enzima, fração cristalina + amorfa
WALD <i>et al.</i> (1984)	Ads, QSS, ordem da taxa aparente	Palha de arroz	<i>T. reesei</i> +BG	–
CAMINAL <i>et al.</i> (1985)	M-M	Forma microcristalina da celulose Merk	Cellulase from Merk	Desativação da enzima
GUSAKOV <i>et al.</i> (1985)	M-M	Astes de algodão pré-tratadas quimicamente	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> + BG	Desativação da enzima, modelo de substrato com duas fases
CONVERSE <i>et al.</i> (1988)	Ads, QSS, constante de velocidade dependente do tempo	Forma microcristalina da celulose Merk	<i>T. viride</i>	Desativação da enzima, limitações da transferência de massa na fase “bulk”
NAKASAKI <i>et al.</i> (1988)	M-M	Papel de filtro	Meicelase CEPB-5081	Fração não degradável
CONVERSE <i>et al.</i> (1990)	Ads, acessibilidade caracterizada por área superficial	Madeira pré-tratada	<i>T. reesei</i> +BG	Mudança na área superficial do substrato
PHILIPPIDIS <i>et al.</i> (1993); PHILIPPIDIS <i>et al.</i> (1992);	Ads	Celulose Alpha, celobiose e gliconolactona	<i>T. reesei</i> +BG	Desativação da enzima, adsorção da celulase e $\beta$ -glicosidase na lignina, coeficiente de reatividade do substrato incluído na reatividade do

				substrato
CONVERSE e OPTEKAR, (1993)	Ads	Avicel	Dados de (WOODWARD et al. (1988b) ( <i>T. reesei</i> (Cel6A, Cel7A, Cel5A) Celluclast+BG (de Novo, Dinamarca)	–
NIDETZKY e STEINER, (1993)	Ads, M-M, duas fases do substrato	Sigmacell, Avicel, alpha-celulose, forro de algodão	Celluclast+BG (de Novo, Dinamarca)	Desativação da enzima, duas fases no substrato
NIDETZKY <i>et al.</i> (1993b)	Pseudo reação de 2º ordem	Palha de trigo	Celluclast+BG (de Novo, Dinamarca)	–
Nidetzky <i>et al.</i> (1994)	M-M	Papel de filtro Whatman no. 1	<i>T. reesei</i> (Cel7A, Cel6A, Cel 7B)+BG	–
SOUTH <i>et al.</i> (1995)	Ads	Dados de NUTOR e CONVERSE, (1991)	<i>T. reesei</i>	Diminuição da reatividade do substrato
LUO <i>et al.</i> (1997)	Ads.	Sabugo de milho pré-tratado	<i>Trichocheirium reesei/ Aspergillus niger</i>	Desativação da enzima
MOLDES <i>et al.</i> (1999)	M-M, Empírica	Lascas de madeira pré-tratadas	Celluclast+BG (de Novo, Dinamarca)	–
SCHELL <i>et al.</i> (1999)	Mesmo que PHILIPPIDIS <i>et al.</i> (1992)	Douglas Fir pré- tratado com ácido diluído	Iogen super clean celulase	Mesmo que (Philippidis <i>et al.</i> , 1992)
MOVAGARNEJAD <i>et al.</i> (2000)	Ads	Forma microcristalina da celulose Merk	Celluclast+BG (de Novo, Dinamarca)	Complexos inativos formados no substrato
MOON <i>et al.</i> (2001)	Ads	Madeira pré-tratada com explosão a vapor	Celluclast+BG (de Novo, Dinamarca)	Reatividade do substrato, desativação da enzima
PETTERSSON <i>et al.</i> (2002)	Ads	Dados de STEMBERG et al. (2000) (madeira de conífera pré-tratada	Celluclast 2L+BG (da Novo, Dinamarca)	Diminuição da área superficial específica da celulose, adsorção

		com vapor)		da celulase e $\beta$ -glicosidase na lignina
GAN <i>et al.</i> (2003)	Ads	Alpha-celulose (Sigma C802)	<i>T. reesei</i>	Fração inerte de celulose, desativação da enzima
MOVAGARNEJAD, (2005); MOVAGARNEJAD e SOHRABI, (2003)	Ads	Resíduos de materiais celulósicos	Celluclast + BG (de Novo, Dinamarca)	Inacessibilidade dos sítios ativos a enzima
BEZERRA e DIAS, (2004)	Avaliação dos modelos M-M	Avicel	<i>T. reesei</i> (Cel7A)	–
SHEN <i>et al.</i> (2004)	Ads	Algodão seco, viscose e fios de linho	<i>Trichoderma pseudokoningii</i> <i>T. reesei</i> (Cel7A and Cel7B) e <i>H. insolens</i> (Cel6A e Cel7A)	–
DING e XU, (2004)	Ads, QSS	PASC, Avicel, PCS	<i>T. reesei</i> (Cel7A and Cel7B) e <i>H. insolens</i> (Cel6A e Cel7A)	–
KADAM <i>et al.</i> (2004)	Ads	Palha de milho pré-tratada	CPN celulase comercial (logen Corp) + BG	Reatividade do substrato
LIN <i>et al.</i> (2005)	Ads	Celulose em pó F-101 (Sigma, E.U.A.)	<i>T. reesei</i> + BG	Enzima adsorvida convertida irreversivelmente em complexo inativo
SHIN <i>et al.</i> (2006)	M-M	Alpha cellulose e madeira pré-tratada com explosão a vapor	Dados de (MOON <i>et al.</i> (2001)) Celluclast + BG (da Novo, Dinamarca)	Inibição por lignina, desativação da enzima
LJUNGGREN, (2005)	Ads	Spruce e bagaço de cana-de-açúcar pré-tratados	Celluclast + BG (de Novo, Dinamarca)	Desativação da enzima, adsorção da $\beta$ -glicosidase na lignina
ZHANG e LYND, (2006)	Ads	PASC, Avicel, celulose bacteriana, algodão, papel de	Resultados comparados com o sistema	–

		filtro	celulásico de <i>T. reesei</i> (Cel7A, Cel6B, Cel7B) na literatura	
DRISSEN <i>et al.</i> (2007)	M-M, Ads	Avicel, papel de filtro Whatman, palha de trigo	Cellubrix (Novozymes Corp. Dinamarca) +BG	Desativação da enzima, diminuição da reatividade do substrato
PERI <i>et al.</i> (2007)	Ads	Celulose não cristalina (preparada de algodão e $\alpha$ -celulose), $\alpha$ -celulose	Spezyme CP (Genencor)	–
O'DWYER <i>et al.</i> (2007)	Mesmo modelo que HOLTZAPPLE <i>et al.</i> (1984)	Palha de milho pré-tratada com cal	<i>T. reesei</i> + BG	–
AL-ZUHAIR, (2008)	Ads	Aparas de madeira altamente cristalina, carboximetilcelulose (CMC)	<i>Aspergillus niger</i>	Substrato com duas fases
LIAO <i>et al.</i> (2008)	Ads	Material lignocelulósico de adubo de laticínios	Celluclast+BG (de Sigma) Novozymes NS 50052 (de Novozymes) e Spezyme AO3117 (de Genencor International)	Diminuição da reatividade do substrato
SHEN e AGBLEVOR, (2008a)	Ads, QSS	Explosão a vapor dos resíduos do descaroçamento do algodão	Spezyme AO3117 (Genencor International)	Desativação da enzima
SHEN e AGBLEVOR, (2008b)	Ads, QSS	Resíduos do descaroçamento do algodão, paper sludge	Spezyme AO3117 (Genencor International)	Desativação da enzima
SHAO <i>et al.</i> (2009a); SHAO <i>et al.</i> (2009b)	Ads	Resíduos de paper sludge	Spezyme CP (Genencor) + BG (Sigma-Aldrich)	Diminuição da reatividade do substrato

ZHENG <i>et al.</i> (2009b)	Ads	azevém selvagem	Celluclast+BG (Novozymes Inc.)	Diminuição da reatividade do substrato, adsorção à lignina
--------------------------------	-----	-----------------	--------------------------------------	---

### 2.9.3. Adsorção nos modelos de hidrólise de celulose.

A incorporação de concentrações de celulase adsorvida em modelos de hidrólise tem sido alcançada de duas formas: com a ajuda de equações cinéticas ou com isotermas de adsorção de Langmuir.

Um exemplo de modelo usando equações cinéticas para a quantificação de enzima adsorvida foi proposto por GAN *et al.* (2003) onde as equações 2.9 e 2.10 foram usadas para as espécies adsorvidas:



$$\frac{dC_{E^*S_C}}{dt} = k_{Sc1} C_E C_{S_C} - k_{Sc2} C_{E^*S_C} - k_P C_{E^*S_C} \quad (2.10)$$

E é a enzima, Sc é o sítio ativo da celulose E\*Sc é o complexo enzima– celulose , C<sub>E</sub> é a concentração de enzima, C<sub>E\*Sc</sub> é a concentração do complexo enzima–celulose, C<sub>Sc</sub> é a concentração do sítio ativo da celulose, k<sub>Sc1</sub> é a constante de adsorção no sítio ativo da celulose, k<sub>Sc2</sub> é a constante de dessorção no sítio ativo da celulose e k<sub>P</sub> é constante de formação de produto.

Alguns dos modelos (AL-ZUHAIR, 2008; BROWN e HOLTZAPPLE,1990; CONVERSE *et al.*, 1988; DRISSEN *et al.*, 2007; FAN e LEE,1983; GAN *et al.*, 2003; HUANG, 1975; KADAM *et al.*, 2004; LIN, 2005; MOON *et al.*, 2001; NIDETZKY e STEINER, 1993; PERI *et al.*, 2007; SHEN e AGBLEVOR, 2008a; SOUTH *et al.*, 1995; WALD *et al.*, 1984) assumem formação instântanea do complexo substrato–enzima (adsorção completamente produtiva), de forma que a quantidade de celulase adsorvida é a mesma do complexo enzima-substrato. Alguns outros (ASENJO, 1984; CONVERSE e OPTEKAR, 1993; DING e XU, 2004; HOLTZAPPLE *et al.*, 1984; LIAO *et al.*, 2008; LUO *et al.*, 1997; RYU *et al.*, 1982) assumem um passo cinético adicional na superfície do substrato depois da adsorção da celulase, como fez LUO *et al.* (1997), onde a enzima celulase adsorvida se combina com o substrato para formar um

complexo celulase-substrato (BANSAL *et al.*, 2009).

Um exemplo de modelo empregando a isoterma de adsorção de Langmuir foi desenvolvido por KADAM *et al.* (2004). A quantidade adsorvida é dada por:

$$E_b = \frac{E_{\max} K_{ad} E_f S}{1 + K_{ad} E_f} \quad (2.11)$$

onde  $E_{\max}$  é a capacidade máxima de adsorção no montante de celulase por quantidade de celulose,  $E_b$  é a concentração de enzima adsorvida,  $E_f$  é concentração de enzima livre,  $K_{ad}$  é a constante de dissociação para a adsorção,  $S$  é a concentração de substrato.

A isoterma de Langmuir tem sido amplamente usada pois ela fornece um bom ajuste aos dados experimentais na maioria dos casos, e representa um modelo mecanístico simples que pode ser usado para comparar propriedades cinéticas de vários sistemas celulose-celulase. Deve ser notado que os pressupostos para o uso da isoterma de Langmuir, incluindo sitios de ligação uniformes e não interação entre as espécies adsorvidas, podem não ser necessariamente válidos para a adsorção da celulase em substratos lignocelulósicos (KADAM *et al.*, 2004; ZHANG e LYND, 2004). Na tentativa de superar essas e outras limitações, vários modelos de equilíbrio representando alternativas a equação de Langmuir foram propostos, como a isoterma de Langmuir–Freundlich (MEDVE *et al.*, 1997) e modelos de dois-sítios (MEDVE *et al.*, 1998; MEDVE *et al.*, 1997; STÅHLBERG *et al.*, 1991).

O uso da isoterma de Langmuir ou qualquer outra expressão matemática para o cálculo da quantidade de enzima adsorvida durante a hidrólise é uma suposição implícita que o equilíbrio da adsorção é estabelecido muito rápido em comparação com a etapa de hidrólise. A maioria dos estudos constataram que a celulase adsorvida alcança um valor constante em um tempo  $\leq 90$  min, ainda há estudos que sugerem que 30 min poderia ser suficiente (BOUSSAID e SADDLER, 1999; CHERNOGLAZOV *et al.*, 1988; KIM *et al.*, 1994; KIM *et al.*, 1998; KIM *et al.*, 1992; LEE e WOODWARD, 1989; OOSHIMA *et al.*, 1983; RABINOVICH *et al.*, 1983; SINGH *et al.*, 1991; STROBEL *et al.*, 1995; STUTZENBERGER, 1987), enquanto que a hidrólise completa da celulose requer um dia ou mais (LYND *et al.* (2002)).

O uso das mesmas isotermas em todos os momentos da reação assume que as características da adsorção do sistema substrato–enzima não mudam. HONG *et al.* (2007),

trabalhando com Avicel, mostraram que a máxima quantidade de enzima adsorvida ( $E_{\max}$  na isoterma de Langmuir) diminui com a conversão.

Lignina e hemicelulose agem como barreiras às celulases para alcançar o núcleo de celulose, e, portanto, as alterações nas características de adsorção serão mais pronunciadas em substratos lignocelulósicos em relação a substratos celulósicos puros. As características da adsorção podem depender do tipo de substrato utilizado e desde que os parâmetros da isoterma podem mudar com a conversão, é importante validar o modelo com uma quantidade de celulase adsorvida medida durante a hidrólise (BANSAL *et al.*, 2009).

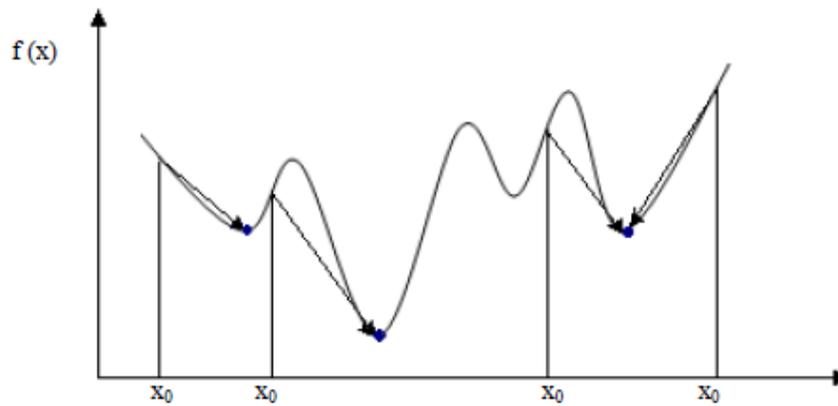
## 2.10. Otimização global e local

O conceito de otimização pode ser definido como um processo de busca da melhor solução dentro de um conjunto de possíveis soluções. A solução de um problema de otimização é caracterizada localmente e globalmente da seguinte maneira:

Seja  $f: \mathfrak{R}^n \rightarrow \mathfrak{R}$  e considerando um problema para minimizar  $f(x)$ ,  $x \in S$ . Se  $x^* \in S$  e se existe uma vizinhança de  $x^*$  contida em  $S$ , denotada por  $V(x^*)$ , tal que  $\forall x \in V(x^*)$ ,  $f(x) \geq f(x^*)$ ,  $x^*$  é chamado de mínimo local de  $f$ . Da mesma maneira, um ponto  $x^* \in S$  é a solução ótima global de  $f$ , ou solução do problema se  $\forall x \in S$ ,  $f(x) \geq f(x^*)$  (BEZ, 2005).

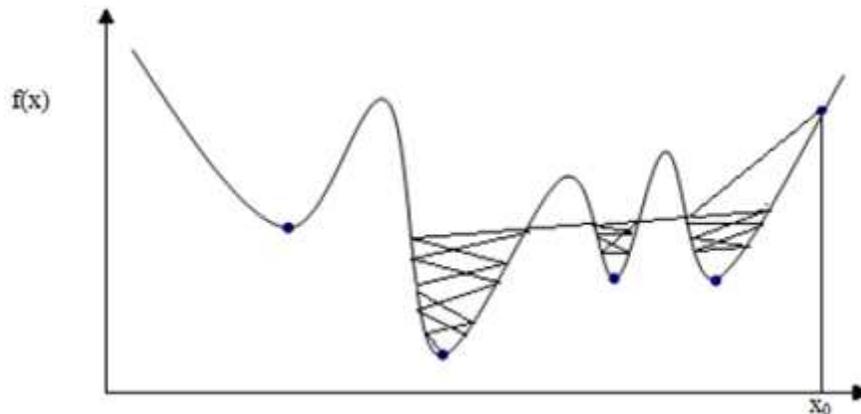
Os métodos de otimização têm um papel fundamental na modelagem matemática, pois uma vez que o modelo matemático é formulado deve-se determinar os valores dos parâmetros que produzam uma medida ótima como por exemplo: o máximo rendimento de um processo ou a descrição de dados observados.

Algoritmos com característica de conseguir obter uma solução ótima a partir de um ponto qualquer do espaço de busca são considerados algoritmos globais. Por sua vez, algoritmos locais são mais dependentes de configurações iniciais ou pontos de partida, pois tendem a seguir superfícies de funções e, portanto, atingirem pontos estacionários a partir dos quais não conseguem mais melhorar a solução. Logo, algoritmos locais são menos robustos que os algoritmos globais (RENÓ, 2007). A Figura 2.20, mostra o comportamento de algoritmos locais em relação aos pontos iniciais  $x_0$ .



**Figura 2.20:** Algoritmo de busca local (RENÓ, 2007).

Os algoritmos globais são técnicas de otimização mais robustas. Esses algoritmos realizam uma busca exaustiva, examinando cada ponto do espaço de busca procurando pelo ponto ótimo. A figura 2.21, mostra o comportamento dos algoritmos globais em relação ao ponto  $x_0$ .



**Figura 2.21:** Algoritmo de busca global (adaptado de RENÓ, 2007).

### 2.10.1. Algoritmo genético

Desenvolvidos inicialmente por John Holland (1975), os Algoritmos Genéticos (AG) são métodos que baseiam-se no processo genético e evolutivo dos seres vivos com o intuito de resolver determinados problemas de busca e otimização (FERNANDES e JR, 2003). Esse método idealmente é aplicado a problemas que não possuem uma técnica específica de resolução, uma vez que algoritmos genéticos são técnicas robustas e eficientes em espaços de procura irregulares,

multidimensionais e complexos.

Um AG difere dos algoritmos de busca tradicionais principalmente nos seguintes aspectos (GOLDBERG, 1989):

- AGs realizam uma busca usando uma população de pontos (soluções candidatas), e não um único ponto;
- AGs usam operadores probabilísticos e não operadores determinísticos;
- AGs usam diretamente a informação de uma função objetivo (cujo valor ótimo deseja-se encontrar), e não derivadas ou conhecimento auxiliar sobre o problema.

A primeira e a segunda característica citadas anteriormente contribuem para a robustez dos AGs, ajudando-os a escapar de pontos de extremos locais, a fim de alcançar o ponto de extremo global. A terceira característica contribui para a generalidade dos AGs que podem ser aplicados em muitos tipos de problemas.

Basicamente os AGs tratam da simulação da evolução de estruturas individuais (cromossomos), via processo de seleção e por operadores de busca, chamados operadores genéticos (mutação e cruzamento (*crossover*)). Este processo depende da aptidão atingida pelas estruturas individuais, frente a um ambiente. A seleção é focalizada nos indivíduos com um alto grau de aptidão, explorando a informação da aptidão disponível. O cruzamento e a mutação são responsáveis pelas modificações nos indivíduos (heurística geral para a exploração).

A seguir são listadas algumas etapas comuns em um AG (RODRIGUES, 2007; ZINI, 2009):

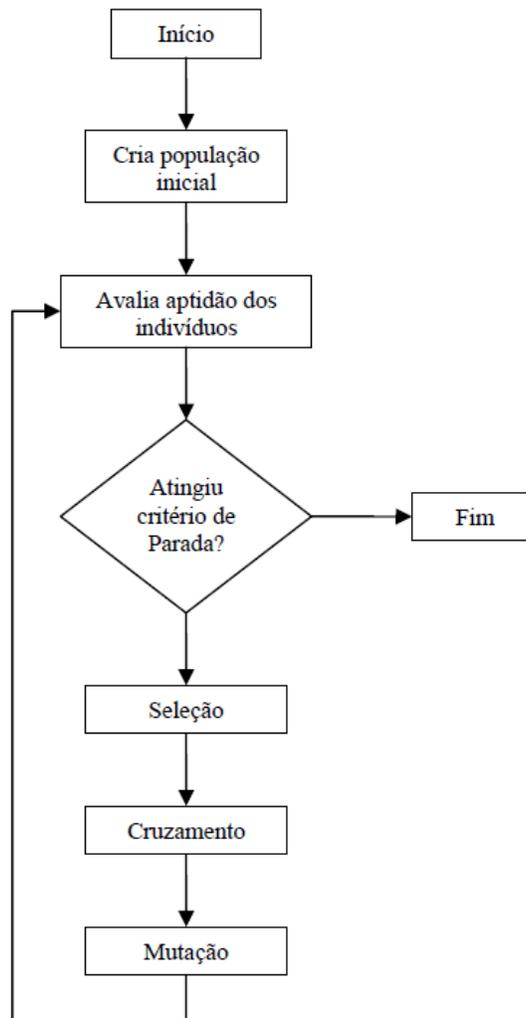
1. Geração da população inicial de cromossomos que consiste de um conjunto de possíveis soluções para o problema a ser resolvido. Essa população é geralmente gerada de forma aleatória;
2. A população é avaliada (de acordo com uma função, chamada função de aptidão ou “fitness”) e cada cromossomo recebe um valor que reflete sua qualidade para a resolução do problema. Desta forma, os melhores indivíduos são aqueles que apresentam função de aptidão de melhor qualidade;
3. Depois de avaliados, os indivíduos passam por um processo de seleção onde os indivíduos mais aptos são selecionados e os menos aptos são descartados;
4. São aplicados os operadores genéticos nos cromossomos selecionados. Os operadores

genéticos mais conhecidos são de cruzamento e o de mutação;

5. Uma nova geração de soluções é obtida contendo os descendentes gerados pelas modificações realizadas na etapa 4;

6. As etapas de 2 a 5 são repetidas até que um indivíduo de qualidade aceitável seja encontrado, um número preestabelecido de passos seja atingido ou o algoritmo não consiga mais mostrar evolução, ou seja, não se consegue melhorar a incumbente já encontrada;

As etapas mencionadas podem ser melhor entendidas através do fluxograma mostrado na Figura 2.22.



**Figura 2.22:** Esquema de um algoritmo genético típico (KONDAGESKI, 2008).

Cada ciclo completo do algoritmo da Figura 2.24, desde a avaliação da aptidão, ou “fitness”, dos indivíduos, até a aplicação do operador de mutação, representa 1 geração na linguagem dos algoritmos genéticos.

#### 2.10.1.1. Terminologia

Os algoritmos genéticos se utilizam dos conceitos da genética para simular a evolução das populações. Para melhor entender o conceito dos algoritmos genéticos, faz-se uma analogia entre os termos usados na biologia e o módulo computacional referente ao estudo dos algoritmos genéticos.

A seguir apresenta-se uma seqüência de nomes para descrição dos termos principais encontrados na literatura (VICTORINO, 2005; KONDAGESKI, 2008; ZINI, 2009), tais como:

**Cromossomo** - Nos AGs, um cromossomo representa a estrutura de dados que codifica uma solução para um problema, ou seja, um simples ponto no espaço de busca. Pode ser uma cadeia de bits, ou um vetor contendo as variáveis de decisão do problema de otimização;

**Indivíduo** - Um simples membro da população. Nos AGs, um indivíduo é formado pelo cromossomo e sua aptidão;

**População** – representa um conjunto de indivíduos da mesma espécie. Na linguagem dos AGs, representa um conjunto de pontos candidatos a solução do problema otimização;

**Gene** - Na biologia é a unidade de hereditariedade que é transmitida pelo cromossomo e que controla as características do organismo. Nos AGs, é um parâmetro codificado no cromossomo, ou seja, um elemento do cromossomo que descreve certa variável do problema;

**Geração** - O número de iterações que o algoritmo genético executa;

**Operações Genéticas** - Operações que o algoritmo genético realiza sobre cada um dos indivíduos (cromossomos). As mais conhecidas são a recombinação (*crossover*) e a mutação;

**Reprodução** - Em biologia significa multiplicação de novos indivíduos a partir de outros de mesma espécie. Em AGs, cruzamento (*crossover*) vem a ser uma troca de segmentos dos cromossomos (strings - séries) selecionados;

**Mutação** - Em biologia é a variação devido à alteração da constituição hereditária com aparecimento de uma nova variedade em qualquer espécie viva. Na linguagem em AGs é a modificação aleatória do cromossomo visando gerar novas possíveis soluções a explorar;

**Genótipo** - Na biologia representa a composição genética contida no genoma, ou seja, o conjunto de genes de um indivíduo. Nos AGs, representa a informação contida no cromossomo;

**Fenótipo** - Nos Algoritmos Genéticos representa o objeto, estrutura ou organismo construído a partir das informações do genótipo; é o cromossomo decodificado;

**Alelo** - Na biologia representa uma das formas alternativas de um gene. Nos AGs, representa os valores que o gene pode assumir. Por exemplo, um gene que representa o parâmetro cor de um objeto poderia ter os alelos azul, preto, verde, etc;

**Região Factível** - É o conjunto, espaço ou região que compreende as soluções factíveis do problema a ser otimizado. Deve ser caracterizado pelas funções de restrições, que definem as soluções factíveis do problema a ser resolvido.

**Seleção Natural** - Na linguagem biológica como já citado anteriormente é o mecanismo que garante aos indivíduos mais aptos, maiores chances de reprodução; fertilidade diferencial na natureza que favorece indivíduos que se adaptam melhor ao meio ambiente e tende a eliminar os piores (menos adaptados). Em AGs o processo seletivo é determinado pela aptidão (fitness) do indivíduo. Quanto maior sua aptidão maiores as chances de gerar descendentes. Indivíduos com aptidões baixas representam soluções indesejáveis no momento da avaliação;

**Função Objetivo** - É a função que se deseja otimizar. Esta função contém a informação do desempenho de cada indivíduo na população. Nesta função estão representadas as características do problema que o algoritmo genético necessita para realizar seu objetivo, sendo usualmente expressa como:  $F=f(x_1, x_2, \dots, x_n)$ , sendo  $x_1, x_2, \dots, x_n$  as variáveis que o algoritmo procura determinar para otimizar  $F$ .

### 2.10.1.2. Codificação

Uma das etapas mais complexas e que despende maior tempo e trabalho na aplicação dos algoritmos genéticos, é a fase de codificação do problema. A codificação consta basicamente da definição de como os cromossomos irão representar as possíveis soluções, funções de fitness para avaliar a adaptação de cada indivíduo, operadores genéticos de mutação e reprodução e mecanismos de seleção. O termo codificação se aplica normalmente de forma mais restrita, tratando apenas da representação dos cromossomos (BERCI, 2008).

Atualmente existem 3 abordagens distintas que são utilizadas para realizar o processo de

codificação dos AGs. A codificação clássica (ou binária) que trabalha com strings de bits, a codificação real que trabalha diretamente com valores reais e a codificação inteira, que trabalha apenas com valores inteiros (BRUN, 2004).

A principal justificativa em se utilizar a codificação binária se deve, principalmente, ao fato da teoria básica de implementação dos operadores genéticos e as características de convergência terem sido baseadas na codificação binária. Outra justificativa é que a codificação binária imita os dois tipos de alelos existentes num gene de um cromossomo (ZINI, 2009). Porém, com a necessidade de maior precisão numérica, as cadeias de bits se tornam excessivamente longas, o que acarreta na necessidade de um esforço computacional maior, causando também um consumo maior de tempo até a convergência dos algoritmos (BRUN, 2004).

A codificação real representa os cromossomos por números ou vetores reais. Essa representação permite cobrir um domínio bastante abrangente, o que seria difícil trabalhando com cadeias binárias, pois, para aumentar o domínio sem perder precisão, faz-se necessário aumentar o comprimento das cadeias binárias, o que causa um conseqüente aumento exponencial em complexidade ao problema. Além deste fator, essa codificação permite que a função de fitness seja atribuída diretamente ao cromossomo, sem necessidade de conversão (BERCI, 2008).

### **2.10.1.3. Geração da população inicial**

A população inicial de indivíduos é na maioria das vezes, gerada de forma aleatória. No entanto, existem ocasiões onde é mais apropriada uma geração da população inicial utilizando uma seleção heurística. Assim, logo no início, podem-se introduzir na população inicial indivíduos com características interessantes, como por exemplo, acrescentar soluções aproximadas conhecidas contendo algum tipo de informação prévia. Diversos trabalhos realizados comprovam que a inicialização não é crítica, desde que a população inicial contenha cromossomos suficientemente variados (população diversificada) (CANTÚ-PAZ, 1995; GOLDBERG, 1989).

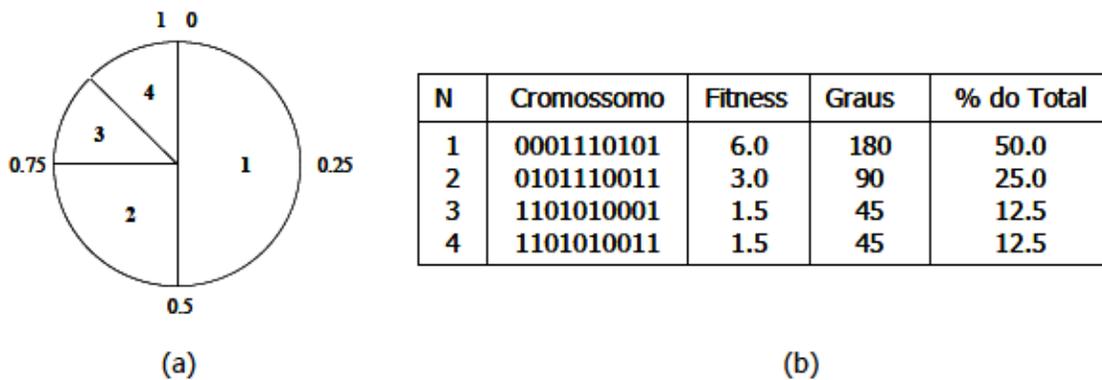
### 2.10.1.4. Mecanismos de seleção

Segundo SCHNEIDER (1998) a idéia principal do operador de seleção, em um algoritmo genético, é oferecer aos melhores indivíduos da população corrente preferência para o processo de reprodução, permitindo que estes indivíduos possam passar as suas características às próximas gerações. Isto funciona como na natureza, onde os indivíduos altamente adaptados ao seu ambiente possuem naturalmente mais oportunidades para reproduzir do que aqueles indivíduos considerados mais fracos.

Existem vários métodos para selecionar os indivíduos sobre os quais serão aplicados os operadores genéticos. A seguir, apresentam-se resumidamente alguns destes métodos:

**Roulette wheel:** neste método o *fitness* dos indivíduos é convertido em uma fração de uma roleta com área proporcional a esse *fitness*. Assim, um indivíduo com maior *fitness* representa uma maior porção da roleta. A roleta é rodada N vezes, sendo que esse N é o número de indivíduos que serão necessários para se realizar os operadores genéticos. Quanto maior a aptidão do indivíduo, mais chances de ele ser escolhido.

A Figura 2.23 ilustra o RW para uma população composta por quatro indivíduos. Girar a roleta é equivalente a gerar aleatoriamente um número com distribuição uniforme no intervalo [0, 1]. O valor obtido vai definir o cromossomo escolhido de acordo com as marcações na Figura 2.23 (a):



**Figura 2.23:** Exemplo do método de roleta para uma população de 4 indivíduos (RIVERA, 2006).

**Torneio:** Neste método, cada indivíduo da próxima geração é selecionado através de um torneio entre um grupo de  $n$  ( $n \geq 2$ ) indivíduos aleatoriamente tomados na população. Assim, o indivíduo mais adaptado entre eles (indivíduo de maior *fitness*) será escolhido para a próxima geração enquanto os demais indivíduos do grupo são descartados. O processo de seleção termina quando se realiza uma quantidade de torneios igual ao tamanho da população.

**Elitismo:** Este é um método bastante simples de seleção, baseado em um critério determinístico. Essa técnica tem por objetivo realizar a cópia dos  $n$  ( $n \geq 1$ ) melhores indivíduos para a próxima geração, no sentido de preservar a melhor solução encontrada até o momento, já que quando os indivíduos sofrem a ação dos operadores genéticos, algumas informações importantes podem vir a ser perdidas.

Sendo assim, além dos melhores indivíduos serem passados de uma geração para outra, também participarão da criação de novos indivíduos. A principal vantagem deste método está na garantia de convergência, ou seja, caso o ótimo global seja descoberto durante o processo de busca, o algoritmo genético deve convergir para esta solução (CASTRO, 2001).

O elitismo deve ser utilizado em adição a outro método de seleção, pois o elitismo é o responsável por determinar os indivíduos mantidos para a próxima geração enquanto que o outro método de seleção será o responsável por determinar os indivíduos selecionados para a geração de novos indivíduos através dos operadores genéticos (LIMA, 2009).

#### **2.10.1.5. Operadores genéticos**

Operadores genéticos são funções que se aplicam às populações, permitindo obter novas populações. Após a seleção dos indivíduos em uma população, realiza-se a recombinação e/ou mutação desses, obtendo assim uma nova população com melhores indivíduos ou não. Os operadores genéticos são extremamente necessários para diversificação da população mantendo as características das adaptações que são adquiridas pelas gerações antecessoras.

Os algoritmos genéticos básicos são normalmente constituídos de dois operadores: recombinação (*crossover*) e mutação.

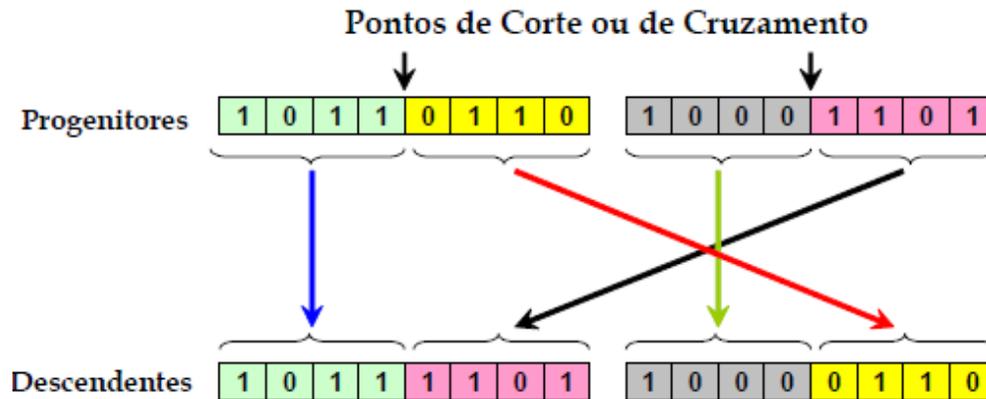
### 2.10.1.5.1. Recombinação (*crossover*)

A recombinação é o operador responsável por trocar e combinar características dos pais durante o processo de reprodução, permitindo que as próximas gerações herdem essas características. A idéia é que os novos indivíduos descendentes possam ser melhores que seus pais se eles herdarem as melhores características de cada pai progenitor.

#### Codificação Binária

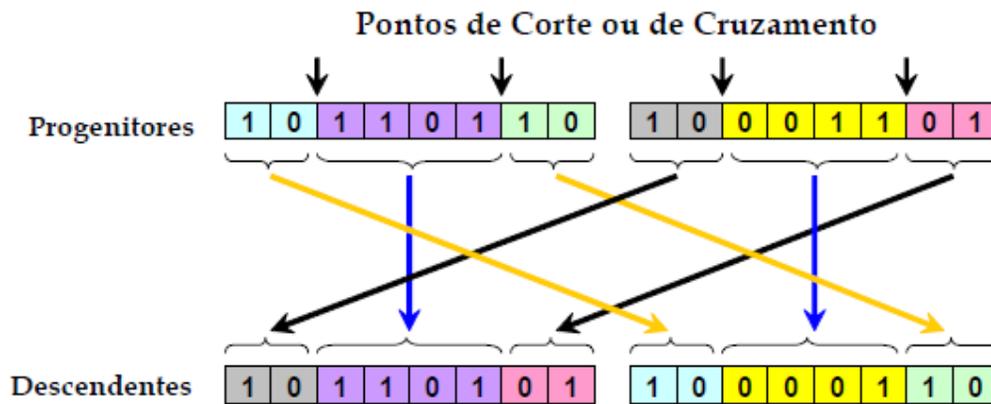
Quando utilizando a codificação binária, esse processo é computacionalmente reproduzido, principalmente de duas formas, através do cruzamento de um ou dois pontos.

**Um ponto de cruzamento (*single-point crossover*):** Um ponto de cruzamento é escolhido aleatoriamente dentro da *string* que representa o cromossomo. Baseado neste ponto, as cadeias binárias são quebradas e recombinadas em um novo cromossomo, formado pelas partes das cadeias que representam os cromossomos pais. Um exemplo deste tipo de recombinação pode ser visto na Figura 2.24.



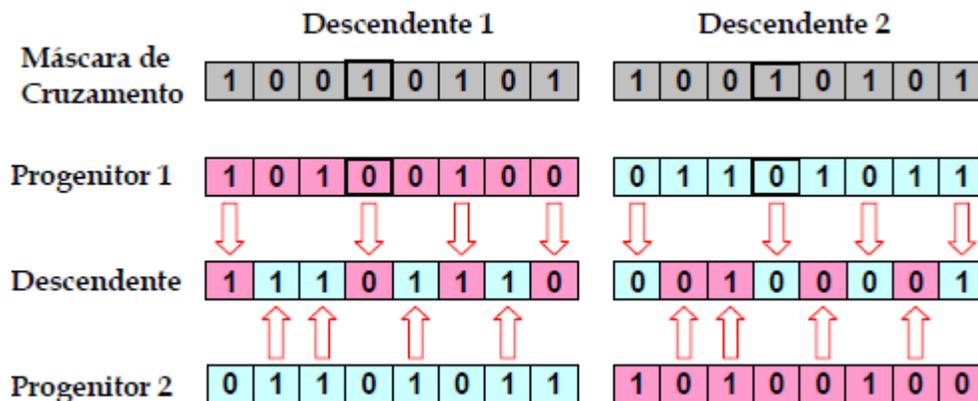
**Figura 2.24:** Representação da forma de cruzamento em um ponto (VICTORINO, 2005).

**Dois pontos de cruzamento (*two-point crossover*):** é realizado similarmente ao cruzamento de um ponto, porém a troca de segmentos é realizada com um número maior de intercalações, como visto na Figura 2.25.



**Figura 2.25:** Representação da forma de cruzamento em dois pontos (VICTORINO, 2005).

**Cruzamento uniforme:** Seu procedimento é o seguinte: inicialmente, sorteia-se os valores 0 ou 1 para cada gene do indivíduo. Quando o valor sorteado for o número 1, o gene em questão do primeiro pai é copiado para o primeiro filho e o do segundo pai é copiado para o segundo filho, caso contrário, o gene do segundo pai é copiado para o primeiro filho e o do primeiro é copiado para o segundo filho. Na Figura 2.26 está apresentado um modelo desse tipo de cruzamento.



**Figura 2.26:** Representação da forma de cruzamento uniforme (VICTORINO, 2005).

## Codificação Real

Na literatura são observados vários métodos de recombinação utilizados em codificação real e para exemplificar, temos métodos como: o de cruzamento simples, o da média simples e da

média geométrica:

**Cruzamento simples:** é o cruzamento mais simples na codificação real, onde são escolhidos aleatoriamente dois indivíduos de uma geração e estes geram os dois novos cromossomos. Funciona como o cruzamento de um ponto, porém com valores reais, onde o ponto de cruzamento é escolhido aleatoriamente (desde que não sejam os pontos extremos do cromossomo). Cada novo cromossomo possuirá metade dos genes de cada pai (BRUN, 2004).

Os cruzamentos da *média simples* e *média geométrica* são bastante simples, pois consistem em gerar um novo cromossomo usando a média simples e a média geométrica de dois cromossomos pais, respectivamente. As fórmulas para a média simples e média geométrica são apresentadas nas equações 2.12 e 2.13, respectivamente:

$$\text{Média Simples} \quad C_1 = \frac{P_1 + P_2}{2} \quad (2.12)$$

$$\text{Média Geométrica} \quad C_1 = \sqrt{P_1^2 \times P_2^2} \quad (2.13)$$

Onde  $C_1$  é o cromossomo filho,  $P_1$  e  $P_2$  são os cromossomos pais.

SANTA CATARINA E BACH (2003) constataram em seus trabalhos envolvendo algoritmos com codificação binária e com codificação real que em ambos os algoritmos, a solução ótima encontrada era muito similar para a função em questão. Porém, os algoritmos que utilizaram a codificação real encontraram esta solução ótima com um consumo menor de tempo. Fato este justificado pelo consumo de tempo em se calcular o valor numérico a partir da cadeia de bits que representa o valor.

#### 2.10.1.5.2. Mutação

Após a aplicação do operador de *crossover*, a nova geração de indivíduos passa pelo processo de mutação. O operador de mutação implica na modificação do valor de um ou mais genes de um indivíduo e visa restaurar o material genético perdido ou não explorado em uma população, visando prevenir a convergência prematura do AG para soluções sub-ótimas (MOLE, 2002).

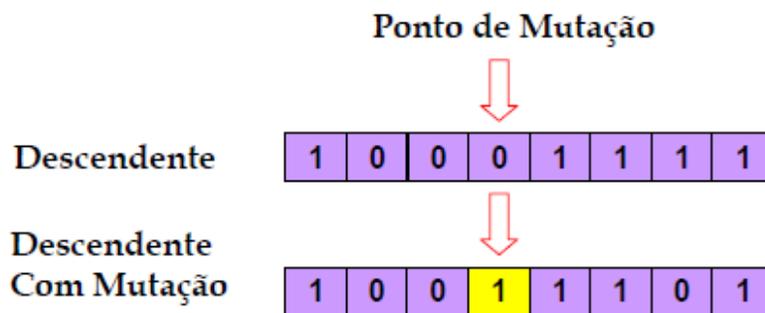
A mutação é um mecanismo importante nos AGs, pois previne a estagnação da

população em ótimo local, provocando o aumento da diversidade. A mutação ocorre durante o processo evolutivo segundo uma determinada probabilidade (a taxa de aplicação deste operador é usualmente muito baixa, sendo em geral empregada com menos de 1% de probabilidade). Caso a probabilidade de mutação seja muito alta, a busca torna-se essencialmente aleatória (VICTORINO, 2005).

### Codificação Binária

Na codificação binária a ocorrência de mutação em determinado gene é dada pela taxa de mutação, a qual normalmente possui um valor pequeno (entre 0,001e 0,01). Caso a taxa de mutação seja maior que o valor sorteado pelo gene então este sofrerá mutação.

A Figura 2.27 exibe um exemplo de mutação, onde o quarto gene apresentou um valor inferior à taxa de mutação e, portanto, sofrerá a mutação.



**Figura 2.27:** Exemplo de mutação binária onde apenas o 4º bit sofreu mutação (adaptado de VICTORINO, 2005).

Pode acontecer de um cromossomo possuir vários genes alterados pela mutação ou mesmo não apresentar nenhuma alteração, caso o valor sorteado seja sempre maior que a taxa de mutação.

### Codificação Real

Na literatura existem diversas formas de se realizar a mutação quando a codificação real está sendo utilizada, tais como (BRUN, 2004; VICTORINO, 2005): mutação uniforme, mutação gaussiana, mutação *creep* e mutação não uniforme.

**Mutação uniforme:** operador de mutação que substitui o valor de um gene escolhido com um valor aleatório uniforme selecionado dentro de um intervalo de valores pré-determinados. O operador de mutação uniforme é compatível com codificações inteira e ponto flutuante.

**Mutação não-uniforme:** operador que realiza mutação segundo uma probabilidade dinâmica, isto é, uma probabilidade que diminui de acordo com o aumento do número de gerações. Neste caso o operador evita a estagnação da população nos estágios iniciais do AG e permite um refinamento das soluções nos estágios finais da evolução. Este operador pode ser usado com quaisquer codificações.

**Mutação Gaussiana:** operador de mutação que adiciona um valor aleatório de acordo com uma distribuição gaussiana ( $N(\mu, \sigma^2)$ ), ao valor de um determinado gene.

Onde  $\mu$  é igual ao valor de gene a ser substituído e a variância é definida pelo próprio pesquisador. Caso o novo valor fique fora dos limites pré-estabelecidos ele é arredondado ou aproximado. Este operador funciona com codificações inteira e ponto flutuante.

**Mutação *creep*:** acrescenta-se ou subtrai-se um pequeno número aleatório obtido de uma distribuição  $N(0, \sigma^2)$  onde a variância assume um valor pequeno. Esta mutação é utilizada para explorar o espaço de busca localmente.

#### 2.10.1.6. Critérios de parada

Entende-se por critério de parada o momento em que se deseja interromper a execução do algoritmo.

Existem vários critérios para serem seguidos, e os mais comuns são apresentados por (GOLDBERG, 1989; LACERDA e CARVALHO, 1999):

- Número de gerações: quando o algoritmo atingir um número máximo de gerações, a execução do algoritmo é interrompida;
- Convergência: quando não ocorre melhora de soluções por um longo número de iterações;
- Valor da Função Objetivo (para problemas de otimização): quando o valor da função objetivo é conhecido, o algoritmo é finalizado quando esse valor é alcançado.

### 2.10.1.7. Parâmetros genéticos

O comportamento dos Algoritmos Genéticos é influenciado pelos parâmetros utilizados, para tanto, tornou-se necessário estudar de que maneira estes parâmetros afetam o comportamento dos AGs. Estes parâmetros definirão, por exemplo, com qual frequência serão empregados os operadores cruzamento ou mutação, e por este motivo, é importante analisar de que maneira eles influenciam no comportamento do Algoritmo Genético, para que se possa estabelecê-los conforme as necessidades do problema e dos recursos computacionais disponíveis. Esses parâmetros podem ser qualitativos ou quantitativos.

Alguns destes parâmetros são listados a seguir (RODRIGUES, 2007):

- **Tamanho da população:** do tipo quantitativo, diz respeito a quantos indivíduos farão parte da população a cada geração. Populações muito pequenas têm grandes chances de perder a diversidade necessária para convergir a uma boa solução, pois fornecem uma pequena cobertura do espaço de busca do problema. Entretanto, se a população tiver muitos indivíduos, o algoritmo poderá perder grande parte de sua eficiência pela demora em avaliar a função de aptidão de todo conjunto a cada iteração, além de ser necessário trabalhar com maiores recursos computacionais (ZINI, 2009).

- **Taxa de Cruzamento:** também do tipo quantitativo, é a probabilidade com o qual irá ocorrer a recombinação entre os indivíduos selecionados na população. Quanto maior for esta taxa, mais rapidamente novas estruturas serão introduzidas na população e neste caso podem-se perder estruturas de alta aptidão. Com um valor baixo, o algoritmo pode tornar-se muito lento (ZINI, 2009). Em inúmeras aplicações com AGs a grande maioria da faixa utilizada destes valores (faixa de taxa de cruzamento) encontra-se em torno de 0,5 e 0,9 (VICTORINO, 2005).

- **Taxa de Mutação:** também do tipo quantitativo, este parâmetro indica com qual taxa ou probabilidade ocorrerá a mutação nos indivíduos da população ao longo do processo de evolução. A mutação é utilizada para dar nova informação para a população e também para prevenir que a população se sature com cromossomos semelhantes (convergência prematura) (VICTORINO, 2005). Uma baixa taxa de mutação previne que uma dada posição fique estagnada em um valor, além de possibilitar que se chegue em qualquer ponto do espaço de busca. Com uma taxa muito alta a busca se torna essencialmente aleatória (KONDAGESKI, 2008). A melhor taxa de mutação depende do tipo de aplicação, mas para a maioria dos casos está entre 0,001 e 0,1

(VICTORINO, 2005).

- **Tipo de Cruzamento:** é um parâmetro qualitativo. Nele se define qual tipo de Reprodução foi utilizada (1-ponto, N-pontos, média);

- **Tipo de Seleção:** também é um parâmetro qualitativo onde se tem o tipo de seleção utilizada no desenvolvimento do AG. (Seleção Proporcional, Amostragem Estocástica, *ranking*, torneio).

## 2.11. Planejamento de Experimentos

### 2.11.1. Planejamento de Plackett e Burman

Quando se começa a trabalhar com um novo sistema, um problema comum a ser resolvido é a determinação da influência de uma ou mais variáveis sobre algumas variáveis de interesse. Ou seja, deseja-se conhecer como as respostas são influenciadas por diferentes fatores. Para fazer uma triagem inicial dos fatores é vantajoso começar pela execução de um planejamento fatorial incompleto, o chamado fatorial fracionário (BARROS NETO *et al.*, 2001), já que o número de ensaios necessários para a execução de um planejamento fatorial  $2^k$  completo aumenta rapidamente com k, o número total de fatores investigados.

O planejamento Plackett e Burman é um tipo de planejamento fatorial fracionário que permite o teste de múltiplas variáveis independentes do processo com apenas um número pequeno de ensaios, em vez de usar planejamentos fatoriais completos.

Estes são planejamentos ortogonais saturados para casos em que  $k+1$  é um múltiplo de quatro. As primeiras linhas das matrizes de planejamento para  $k+1= 4, 8, 12, 16, 20\dots 100$  estão listadas em PLACKETT e BURMAN (1946), o restante das linhas pode ser gerado a partir destas.

A técnica de análise de sensibilidade Plackett–Burman permite testar até  $N - 1$  fatores em  $N$  (múltiplo de 4) ensaios (PLACKETT e BURMAN, 1946). Quando o número de fatores examinados é menor que  $N-1$ , o planejamento é completado com variáveis inertes, o que permite o cálculo do erro padrão para os fatores. BRUNS *et al.* (2003) recomendam que o número de fatores reais num planejamento de Plackett e Burman não ultrapasse o número de ensaios menos quatro ( $N-4$ ). Desta forma as colunas não usadas podem fazer o papel de variáveis inertes, sendo

aplicadas no cálculo dos erros.

Para analisar os resultados do planejamento Plackett-Burman, primeiro os fatores dos efeitos devem ser estimados. Depois geralmente uma abordagem é selecionada para identificar os efeitos mais importantes ou significativos. Uma abordagem gráfica, como o gráfico normal ou meio-normal, e métodos estatísticos podem ser usados. A maioria dos métodos estatísticos usam o teste- $t$ , onde o  $t$  estatístico requer uma estimativa do erro. A estimativa do erro pode ser feita de várias formas como: usando a variância dos experimentos em replicata (ex. no nível do ponto central ou por duplicata do planejamento de experimentos), dos efeitos negligenciáveis declarados a priori (interação ou variáveis inertes) (DEJAEGHER *et al.*, 2009).

## CAPÍTULO 3

### MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Parte 1: Dados Experimentais

Os dados experimentais usados neste trabalho são dados cinéticos da hidrólise enzimática de bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino, obtidos no trabalho de GARCIA (2009), bagaço pré-tratado com cal, obtidos no trabalho de FUENTES (2009), e de bagaço pré-tratado com ácido fosfórico+hidróxido de sódio, obtidos no trabalho de RUEDA (2010). Todos os trabalhos foram desenvolvidos no Laboratório de Processo Fermentativos e Enzimáticos (LEPFE).

##### 3.1.1. Substrato

A biomassa utilizada em todos os experimentos foi o bagaço de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), obtido da Usina da Pedra, localizada em Serrana, São Paulo, Brasil. Antes que se utilizasse o bagaço para qualquer análise, este material foi seco ao tempo por 3 dias, moído em moinhos de facas Wiley Mill modelo nº 3 e de martelo General Eletronic durante 10 minutos em cada moinho, para que apresentasse maior uniformidade. Posteriormente, foi peneirado usando peneira Tyler 35 e armazenado em freezer em sacos plásticos hermeticamente fechados.

##### 3.1.2. Pré-tratamento do bagaço de cana

Os três pré-tratamentos utilizados neste trabalho foram conduzidos em condições ótimas determinadas em trabalhos prévios (GARCIA, 2009; FUENTES, 2009; RUEDA, 2010) e usando o bagaço da mesma safra. A Tabela 3.1 mostra a composição do bagaço sem pré-tratar e com os 3 pré-tratamentos considerados.

### 3.1.2.1. Pré-tratamento com peróxido de hidrogênio

O pré-tratamento foi realizado com concentração de bagaço de 8% (w/v), 11% (v/v) de peróxido de hidrogênio e pH ajustado a 11,5 com hidróxido de sódio. A solução pre-tratada foi incubada em agitador orbital (Marconi, Piracicaba, SP, Brazil, MA-832), agitada em 150 rpm, 25 °C por 1 h (GARCIA, 2009; RIVERA *et al.*, 2010).

### 3.1.2.2. Pré-tratamento com hidróxido de cálcio

O pré-tratamento foi realizado com concentração de bagaço de 4% (w/v) e carga de cal de 0,4 g cal/g bagaço. A solução pre-tratada foi incubada em agitador orbital (Marconi, Piracicaba, SP, Brazil, MA-832), agitada em 150 rpm, 90 °C por 90 h (FUENTES, 2009; FUENTES *et al.*, 2011).

### 3.1.2.3. Pré-tratamento com ácido fosfórico + hidróxido de sódio

O pré-tratamento foi realizado com concentração de bagaço de 10% (w/v) e 0,5% (w/v) de ácido fosfórico em autoclave por 2 h a 140 °C. A deslignificação foi feita depois do pré-tratamento ácido, em autoclave com 1% (w/v) de hidróxido de sódio por 1 h a 100 °C. A deslignificação é uma etapa indispensável para aumentar o rendimento de glicose na etapa de hidrólise, pois na ausência dela o maior rendimento de glicose foi de aproximadamente 20% (RUEDA, 2010).

**Tabela 3.1:** Composição química do bagaço sem pré-tratamento e submetido a diferentes pré-tratamentos.

Componentes	Bagaço sem pré-tratar (%)	Bagaço pré-tratado com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (%)	Bagaço pré-tratado com Ca(OH) <sub>2</sub> (%)	Bagaço pré-tratado com H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> +NaOH (%)
Lignina total	25,1	9,87	15,6	14,11
Glucana	37,35	60,09	60,45	50,86
Xilana	23,66	16,58	21,33	20,71
Cinzas	1,79	-	-	-
Extrativos	3,25	-	-	-

### 3.1.3. Atividade Enzimática

Foram empregadas duas preparações enzimáticas nos experimentos, celulase de *Trichoderma reesei* (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany, ATCC 26 921) e  $\beta$ -glicosidase de *Aspergillus niger* (Novozym 188).

A atividade da enzima celulase foi determinada como unidades de papel de filtro por mililitro (FPU/mL), como recomendado pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (GHOSE *et al.*, 1987; ADNEY e BAKER, 1996).

A atividade da enzima  $\beta$ -glicosidase foi determinada através de uma solução de celobiose 15 mmol/L, e expressa em unidades por mililitro (CBU/mL) (WOOD *et al.*, 1988). As atividades enzimáticas foram de 64,11 FPU/mL para a celulase e 308,37 CBU/mL para a  $\beta$ -glicosidase.

### 3.1.4. Hidrólise Enzimática

A hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado foi realizada em erlenmeyers de 250 mL, contendo uma mistura de 100 mL de tampão citrato com pH ajustado para 4,8 e 3% (m/v) de bagaço pré-tratado nas condições ótimas para os 3 pré-tratamentos. A cada ensaio foram adicionadas diferentes concentrações de celulase e  $\beta$ -glicosidase de acordo com um planejamento  $2^2$  + configuração estrela (BARROS NETO *et al.*, 2003) com triplicata no ponto central. A tabela 3.2 mostra a matriz de planejamento. Na primeira e na terceira colunas encontram-se expressas as concentrações enzimáticas da celulase e  $\beta$ -glicosidase por grama de bagaço pré-tratado para cada ensaio, na segunda e quarta colunas estão mostradas as concentrações enzimáticas equivalentes em termos de concentração de enzima por litro de solução. Os frascos foram incubados em agitador orbital (Marconi MA-832), agitado a 100 rpm a 50 ° C. Alíquotas foram retiradas em intervalos de 10 min, 20 min, 30 min, 40 min, 50 min, 1 h, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h, 36 h, 48 h, 60 h, 72 h e fervidas para desativar as enzimas e avaliadas para teor de açúcar. As amostras foram filtradas por um filtro de 0,45  $\mu$ m e o teor de monossacarídeos (D-glicose, D-xilose e L-arabinose) foi quantificado em um sistema de HPLC (Waters Corporation, Massachusetts, E.U.A) equipado com um detector de índice de refração.

**Tabela 3.2:** Matriz de planejamento para os ensaios destinados à variação das concentrações das enzimas celulase e  $\beta$ -glicosidase.

Ensaio	Celulase (FPU/g.b.s)	Celulase (FPU/L)	$\beta$ -glicosidase (CBU/g.b.s)	$\beta$ -glicosidase (CBU/L)
1	5,83	175	7,33	220,0
2	5,83	175	42,67	1280,0
3	25,83	775,0	7,33	220,0
4	25,83	775,0	42,67	1280,0
5	1,67	50,0	25	750,0
6	30	900,0	25	750,0
7	15,83	475,0	0	0,0
8	15,83	475,0	50	1500,0
9 (C)	15,83	475,0	25	750,0
10 (C)	15,83	475,0	25	750,0
11 (C)	15,83	475,0	25	750,0

g.b.s = grama de bagaço seco

No Apêndice A temos os dados cinéticos de GARCIA (2009), RUEDA (2010), e de FUENTES (2009) referentes a matriz de planejamento apresentada na Tabela 3.2.

### 3.2. Parte 2: Métodos matemáticos

Nesta seção serão apresentados os métodos adotados desde o tratamento dos dados experimentais utilizados nas etapas de modelagem até o procedimento de estimativa de parâmetros e de re-estimação dos parâmetros mais significativos quando consideramos diferentes pré-tratamentos. O trabalho de modelagem e estimativa de parâmetros foi realizado com o software COMPAQ VISUAL FORTRAN versão 6.6.

O trabalho computacional foi realizado em um computador Mobile AMD Sempron processador 3000+ 1,8 Ghz com 1Gb de memória RAM e HD de 80 Gigabytes.

#### 3.2.1. Tratamento dos dados experimentais

O software OriginPro 8.0 foi utilizado para o ajuste dos dados experimentais a uma expressão sigmoideal, de forma que os valores da função obtida e seus parâmetros fossem utilizados na etapa de otimização para representação dos dados experimentais. Assim, os valores

obtidos pelo modelo cinético foram comparados com os da curva sigmoideal e minimizados através do programa de otimização.

A equação 3.1 foi adotada para representar os valores experimentais de glicose (G) em função do tempo de hidrólise enzimática.

$$G = A \frac{t^B}{C^B + t^B} \quad (3.1)$$

Nesta equação A, B e C são constantes e  $t$  é o tempo de hidrólise

### 3.2.2. Critério de otimização

$\theta$  é o vetor que contém todos os parâmetros cinéticos a serem otimizados. O objetivo da otimização é encontrar  $\theta$  pela minimização da função objetivo, Equação 3.2, pelo algoritmo genético Pikaia usando dados experimentais de glicose na faixa de concentração de enzimas definida na Tabela 3.2.

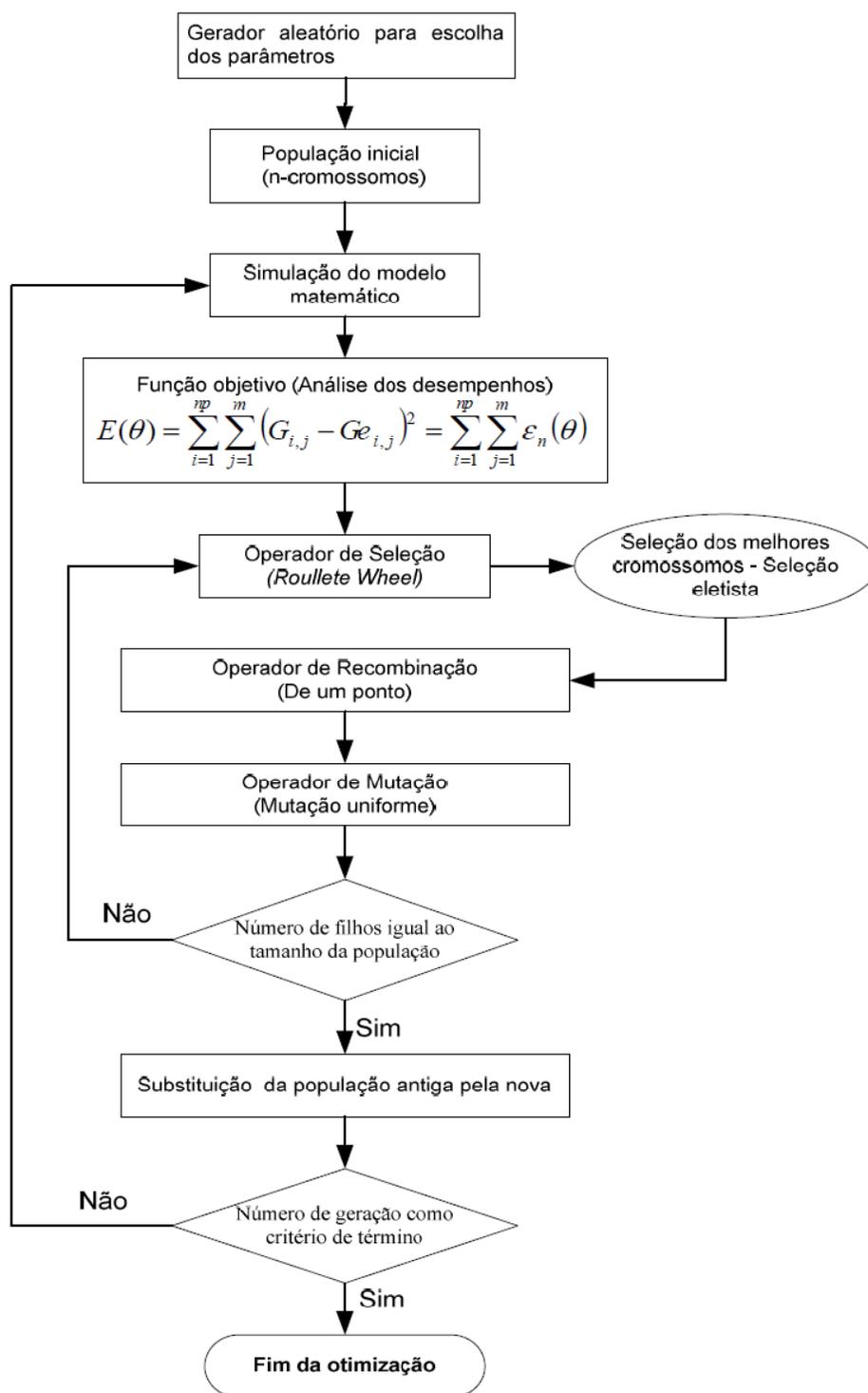
$$E(\theta) = \sum_{i=1}^{np} \sum_{j=1}^m (G_{i,j} - Ge_{i,j})^2 = \sum_{i=1}^{np} \sum_{j=1}^m \varepsilon_n(\theta) \quad (3.2)$$

Na Equação 3.2,  $np$  e  $m$  são o número de pontos referentes às amostras de hidrólise enzimática em batelada e o número de perfis experimentais, respectivamente.  $Ge_{i,j}$  é a concentração de glicose medida no tempo de amostragem  $i$  para o perfil  $j$ .  $G_{i,j}$  é a concentração de glicose dada pelo modelo no tempo de amostragem  $i$  para o perfil  $j$ .  $\varepsilon_n(\theta)$  é o erro ao final da  $n$ -ésima amostra.

### 3.2.3. Otimização dos parâmetros cinéticos por algoritmo genético

Nessa etapa há uma adaptação do modelo cinético adaptado de PHILIPPIDIS *et al.* (1992, 1993) e PHILIPPIDIS e HATZIS (1997) junto ao modelo de otimização por Algoritmo Genético (CHARBONNEAU e KNAPP, 1996).

Na Figura 3.1 temos uma apresentação sucinta do código do algoritmo genético utilizado neste trabalho.



**Figura 3.1:** Fluxograma para estimação de parâmetros cinéticos utilizando o algoritmo genético Pikaia.

Esse código se inicia através de uma população de indivíduos obtida a partir de uma distribuição aleatória uniforme entre 0 e 1, representando os diferentes parâmetros cinéticos que são considerados na otimização. O número de cromossomos são analisados a cada geração, sendo submetidos ao processo de seleção e aos operadores genéticos (recombinação e mutação) até sua finalização.

Os valores das variáveis são passados para o modelo, onde este é resolvido e utilizado para o cálculo da aptidão dos indivíduos. A aptidão dos indivíduos é definida pelo valor da função objetivo (Equação 3.2) considerando o conjunto de variáveis que é analisado. Os valores de adequação são obtidos e comparados.

O mecanismo de seleção é do tipo *Roulette Wheel*, que é usado para selecionar ambos os pais durante o ciclo reprodutivo. Um cromossomo é criado para cada um dos pais a partir dos  $n$  parâmetros. O AG Pikaia codifica os valores dos parâmetros com uma base de 10 dígitos inteiros (0 – 9). Cada dígito representa um gene no cromossomo. Por exemplo se  $n = 2$   $x_1 = 0.2384945$ ,  $x_2 = 0.2345895$  e 5 dígitos para a codificação o cromossomo codificado teria um valor de 2384923458. Após a etapa de codificação os cromossomos são submetidos aos operadores genéticos. O AG conta com operador de recombinação de um ponto que atua sobre um par de cromossomos pais para gerar dois cromossomos filhos.

O AG possui um operador de mutação uniforme, mas que permite que a taxa de mutação varie dinamicamente ao longo da corrida evolucionária.

Após passarem pelos operadores genéticos, os cromossomos filhos são decodificados para os valores reais dos parâmetros entre 0,0 e 1,0, e o modelo é executado novamente com os novos parâmetros cinéticos decodificados e dimensionados. O valor da aptidão destes novos descendentes é determinada, e esse processo é repetido até que o número de filhos seja igual ao número de cromossomos da população. Quando o número de cromossomos filhos se iguala ao número da população, toda a população antiga é substituída pela nova.

O AG incorpora uma estratégia de elitismo opcional onde o indivíduo mais apto em uma população é passados à geração seguinte.

O critério de término é definido como o número máximo de gerações.

No Apêndice B são apresentadas algumas definições das variáveis do código genético de CHARBONNEAU e KNAPP, onde se verificam as sub-rotinas do código, as variáveis de entrada

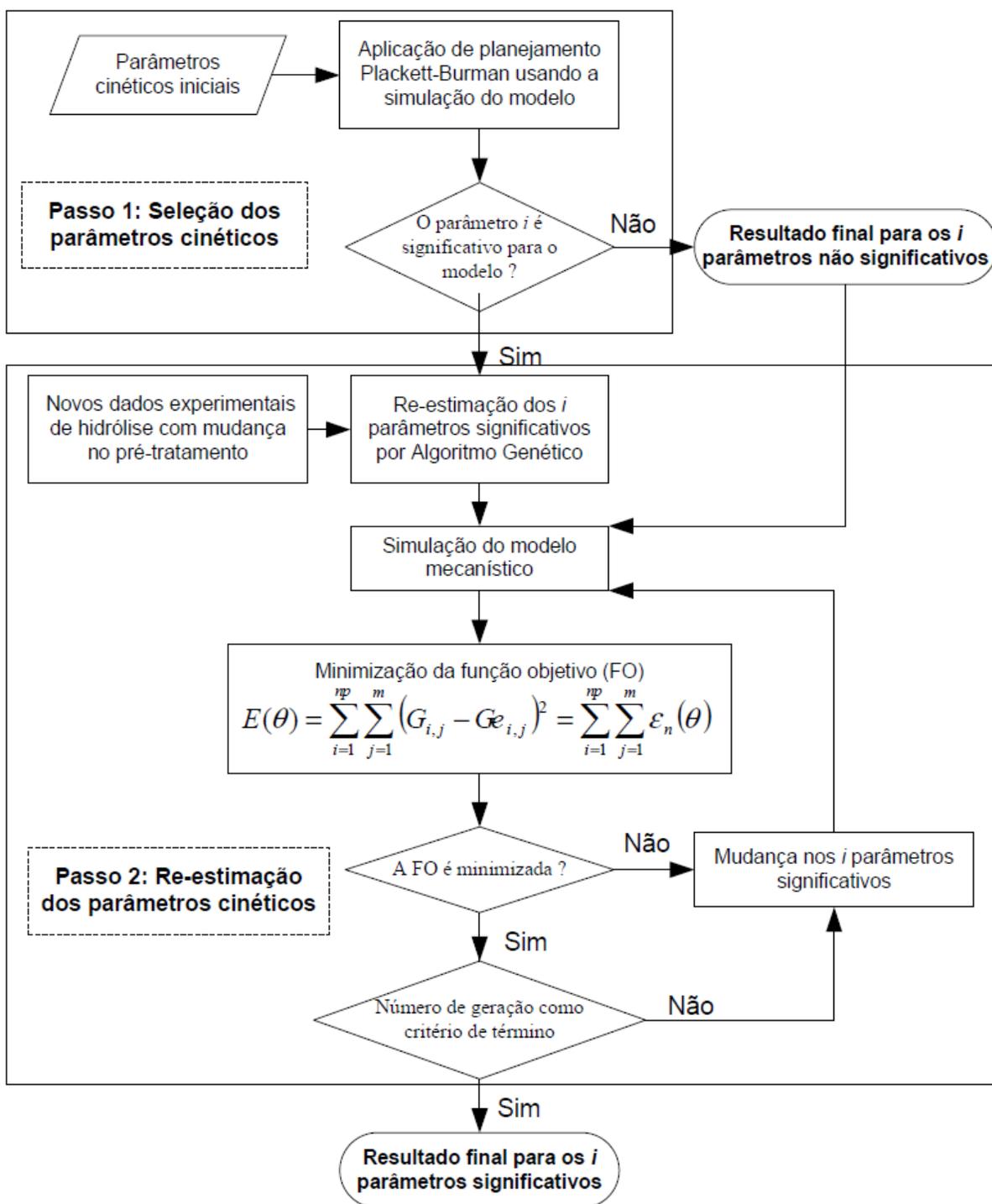
de dados, as variáveis do código genético e um exemplo de utilização do código genético.

### 3.2.4. Re-estimação dos parâmetros mais sensíveis

Uma vez feita a estimação dos parâmetros do modelo matemático para a biomassa pré-tratada com peróxido de hidrogênio alcalino, foi avaliada a necessidade de re-estimação de parâmetros quando consideramos diferentes pré-tratamentos. Para isso, foi usada uma metodologia baseada em planejamentos de Plackett-Burman para identificação dos parâmetros cinéticos que mais influenciam o comportamento dinâmico das variáveis de processo e de estimar somente estes parâmetros na presença de novas condições de operação. Esta metodologia já foi aplicada com ótimos resultados a um processo de fermentação alcoólica com flutuações na qualidade da matéria-prima (ANDRADE, 2007; ANDRADE *et al.*, 2009).

A metodologia de re-estimação de parâmetros envolve as etapas descritas na Figura 3.2 e explicados a seguir:

- 1) Obtenção dos 9 parâmetros cinéticos a partir do modelo adaptado de PHILIPPIDIS *et al.* (1992, 1993) e PHILIPPIDIS e HATZIS (1997);
- 2) Escolha dos  $i$  parâmetros não significativos obtidos pelo planejamento Plackett-Burman para serem mantidos fixos no processo de estimação;
- 3) Definição da ordem de grandeza dos parâmetros relevantes. Como na literatura há escassez de dados para bagaço de cana-de-açúcar, foram tomados como referência os parâmetros cinéticos estimados inicialmente para bagaço de cana pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino;
- 4) São utilizados novos dados experimentais de hidrólise (perfil de glicose) com mudança no pré-tratamento do bagaço;
- 5) Otimização dos valores dos parâmetros significativos por Algoritmo Genético, minimizando a função objetivo;
- 6) O procedimento é repetido até que um número de gerações pré estabelecidas seja atingida.



**Figura 3.2:** Fluxograma geral das etapas de seleção e re-estimação dos parâmetros mais sensíveis na modelagem da cinética de hidrólise de bagaço de cana sob diferentes pré-tratamentos (adaptado de ANDRADE *et al.* 2009).

## CAPÍTULO 4

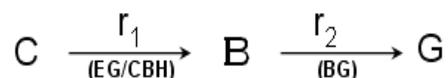
### RESULTADOS E DISCUSSÕES

#### 4.1. Desenvolvimento do modelo de hidrólise enzimática

Neste trabalho, o modelo cinético para sacarificação e fermentação simultâneas (SFS), proposto nos trabalhos de PHILIPPIDIS *et al.* (1992, 1993) e PHILIPPIDIS e HATZIS (1997), foi modificado para descrever a cinética do processo de hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar.

Para o desenvolvimento do modelo foram feitas as seguintes considerações:

1: Celulose é convertida em glicose através da celobiose. Conversão direta de celulose à glicose foi negligenciada. Esta suposição resulta nas reações em série apresentadas na Figura 4.1.



**Figura 4.1:** Mecanismo de hidrólise enzimática de biomassa lignocelulósica contendo duas reações.

2: O complexo celulolítico (*enzc*) consiste apenas de endoglicanase e celobiohidrolase, mas não há distinção entre elas.

3: É considerado que as taxas de adsorção-dessorção da celulase na superfície do substrato permanecem em equilíbrio em todos os momentos.

De acordo com a Figura 4.1, celulose (C) é hidrolisada a celobiose (B) em uma reação heterogênea catalisada pelas enzimas endoglucanase (EG) e celobiohidrolase (CBH). Celobiose é convertida em duas unidades de glicose monoméricas (G) em uma reação homogênea catalisada pela enzima  $\beta$ -glicosidase (BG).

Os balanços de massa do modelo de hidrólise enzimática são dados pelas Eqs. 4.1 – 4.3.

$$\frac{dC}{dt} = -r_1 \quad (4.1)$$

$$\frac{dB}{dt} = 1.056r_1 - r_2 \quad (4.2)$$

$$\frac{dG}{dt} = 1.053r_2 \quad (4.3)$$

onde as concentrações de (C), (B) e (G) são dadas em (g/L),  $t$  é o tempo (h) e  $r_1$ ,  $r_2$  e  $r_3$  são as taxas de reação (g/(L·h)).

As taxas cinéticas são dadas pelas Eqs. 4.4 – 4.5.

$$r_1 = \frac{K_1 C e^{-\lambda t}}{1 + \frac{B}{K_{1B}} + \frac{G}{K_{1G}}} \quad (4.4)$$

$$r_2 = \frac{K_2 B}{K_m \left[ 1 + \frac{G}{K_{2G}} \right] + B} \quad (4.5)$$

onde  $K_1$  e  $K_2$  são constantes concentradas de taxa reação específica para celulose ( $\text{h}^{-1}$ ) e celobiose (g/(L·h)).  $K_{1B}$ ,  $K_{1G}$ , e  $K_{2G}$  são constantes de inibição (g/L) não competitiva da celulase por celobiose e glicose e inibição competitiva de  $\beta$ -glicosidase por glicose, respectivamente.  $K_m$  é a constante de saturação de celobiose para  $\beta$ -glicosidase (g/L), and  $\lambda$  é uma constante ( $\text{h}^{-1}$ ) que leva em conta a taxa de diminuição da área superficial de celulose.

A constante concentrada de taxa reação  $K_1$  exhibe dependência de Michaelis-Menten na concentração de celulase de acordo com a Eq. 4.6.

$$K_1 = \frac{k_1 \cdot \text{enzc}}{K_{eq} + \text{enzc}} \quad (4.6)$$

onde  $\text{enzc}$  é a atividade da enzima celulase (FPU/g celulose),  $k_1$  é a taxa máxima específica de hidrólise de celulose à celobiose ( $\text{h}^{-1}$ ) e  $K_{eq}$  é a constante de saturação para adsorção da enzima celulase (g/L).

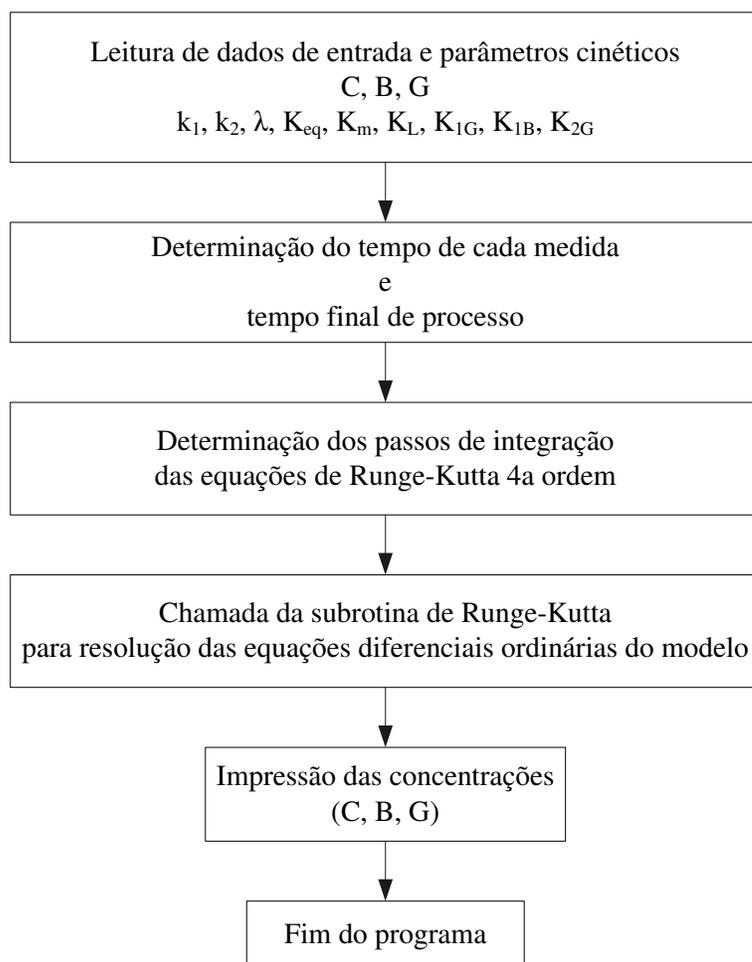
A constante concentrada de taxa de reação  $K_2$  da hidrólise homogênea da celobiose é

proporcional a concentração de  $\beta$ -glicosidase com redução devido à adsorção irreversível de lignina (PHILIPPIDIS *et al.*, 1997), sendo descrita pela Eq. 4.7.

$$K_2 = k_2 \cdot enzg(1 - K_L L) \quad (4.7)$$

onde *enzg* é a atividade da enzima  $\beta$ -glicosidase (CBU/g celulose),  $k_2$  é a taxa específica de hidrólise da celobiose à glicose (g/(IU·h)),  $K_L$  é a constante de adsorção irreversível da  $\beta$ -glicosidase à lignina (L/g) e (L) é a concentração de lignina (g/L).

Na Figura 4.2 é apresentado um fluxograma para resolução das Equações 4.1–4.3 usando um programa em Fortran com um algoritmo de integração baseado no método de Runge-Kutta quarta ordem.



**Figura 4.2:** Fluxograma para resolução do modelo para cinética de hidrólise enzimática.

## 4.2. Estimação dos parâmetros cinéticos para bagaço de cana pré-tratado com peróxido de hidrogênio

Nesta etapa foram utilizados os dados experimentais obtidos do trabalho de GARCIA (2009) para hidrólise de bagaço com variação nas concentrações das enzimas celulase e  $\beta$ -glicosidase e com concentração inicial de biomassa em 30 g/L conforme descrito na seção 3.1.4.

Para o procedimento de ajuste simultâneo dos parâmetros cinéticos foram utilizados perfis experimentais de glicose nos ensaios 1, 3, 4, 5, 6 e 9 apresentados na Tabela A.1 do apêndice A, sendo que os demais ensaios foram usados na validação do modelo.

O modelo matemático desenvolvido consiste de 9 parâmetros cinéticos a serem ajustados e um sistema de 3 equações diferenciais ordinárias de problema de valor inicial (Equações 4.1 – 4.3) que descrevem perfis de concentração de celulose, celobiose e glicose.

As condições iniciais de celulose, celobiose e glicose usadas no procedimento de estimação de parâmetros e simulação do modelo foram fixadas em 18.027 g/L (bagaço com 60,09% de celulose), 0.0 e 0.0 g/L, respectivamente.

O ajuste dos parâmetros foi obtido por meio do algoritmo genético Pikaia e a posterior simulação do modelo foi feita usando um programa em linguagem Fortran com um algoritmo de integração baseado no método de Runge-Kutta quarta ordem (rotina IVPRK do IMSL MATH LIBRARY FORTRAN-90).

**Tabela 4.1:** Principais características técnicas usadas pelo algoritmo genético Pikaia.

Opção escolhida - PIKAIA	Parâmetros	Valor dos Parâmetros
	Número de segmentos do cromossomo	9
Elitismo, modo de mutação: variável, plano de reprodução: substituição geracional completa	Tamanho da população	100
	Probabilidade do <i>crossover</i>	0,85d
	Taxa inicial de mutação	0,005
	Mínima taxa de mutação	0,0005
	Máxima taxa de mutação	0,25

A Tabela 4.1 apresenta os principais parâmetros genéticos selecionados no algoritmo genético Pikaia. Os valores dos parâmetros e opções de mutação e plano de reprodução adotados

na Tabela 4.1 foram valores padrões recomendados no *User's Guide to PIKAIA* (ver apêndice B).

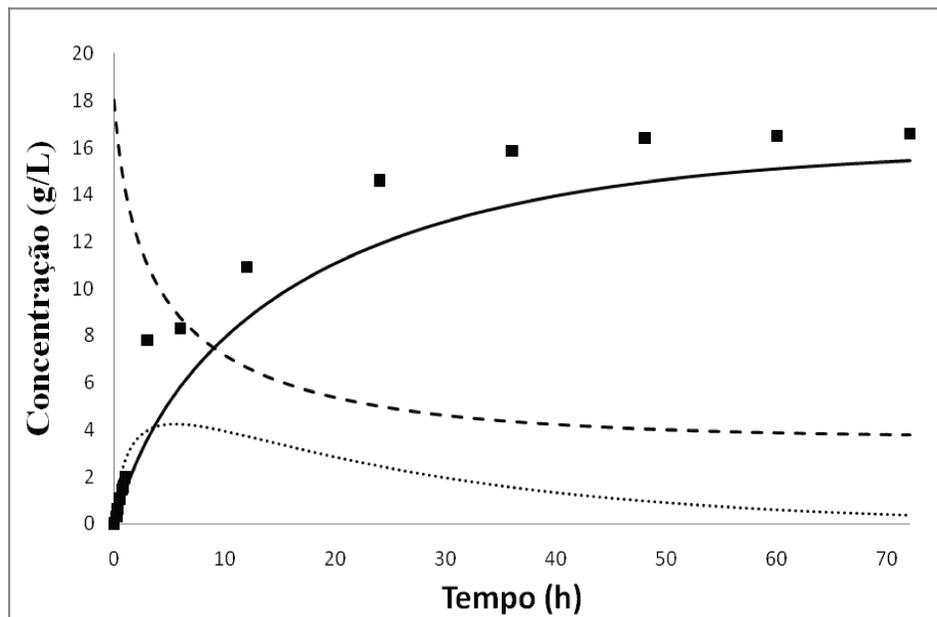
Os 9 parâmetros cinéticos do modelo, obtidos na etapa de otimização descrita na seção 3.2.3, estão apresentados na Tabela 4.2.

**Tabela 4.2:** Parâmetros estimados pelo AG Pikaia para dados de bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino.

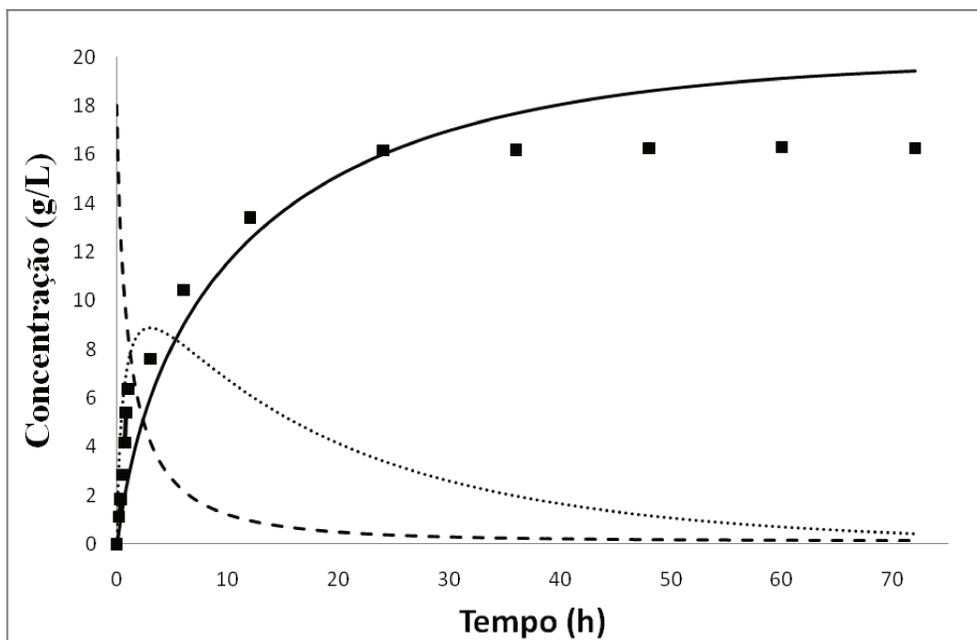
Parâmetro	Valor
$K_1$	12,5 h <sup>-1</sup>
$K_2$	17,944 g/(CBU · h)
$\lambda$	0,046 h <sup>-1</sup>
$K_{eq}$	365,6 g/L
$K_L$	0,033 g/L
$K_m$	96,34 g/L
$K_{IG}$	2,109 g/L
$K_{IB}$	23,25 g/L
$K_{2G}$	0,43 g/L

O conjunto de valores dos parâmetros otimizados na Tabela 4.2 foi utilizado no modelo para simular a hidrólise enzimática do bagaço de cana pré-tratado com peróxido de hidrogênio e os resultados estão mostrados nas Figuras 4.3 – 4.10. As Figuras 4.3 – 4.8 mostram os perfis simulados de celulose, celobiose e glicose para os ensaios 1, 3, 4, 5, 6 e 9, respectivamente, os quais foram usados para estimar os parâmetros do modelo. As Figuras 4.9 – 4.10 mostram a validação do modelo usando os ensaios 2 e 8 que não foram utilizados no procedimento de estimação de parâmetros.

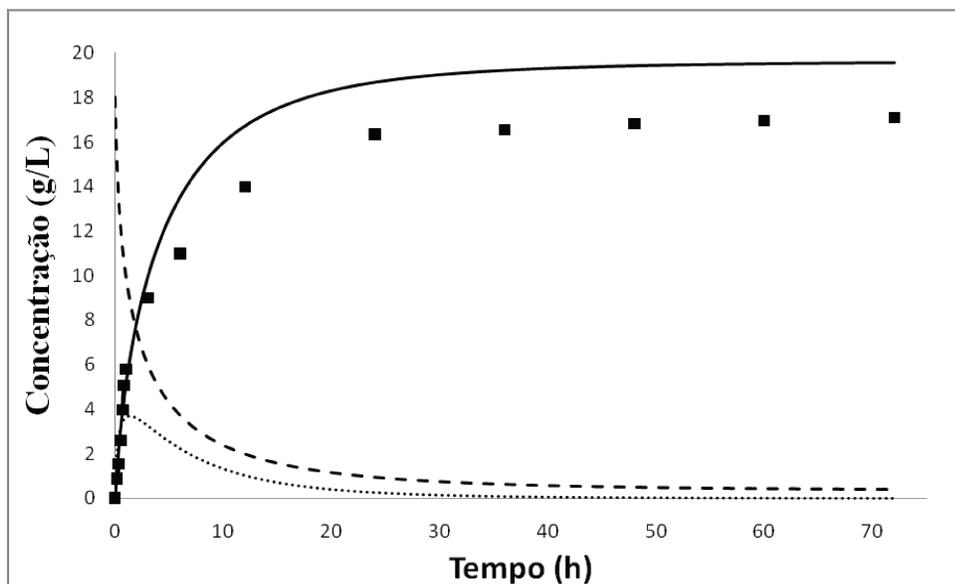
Não foi considerada a simulação para o ensaio 7, pois o modelo desenvolvido não considera a reação direta da celulose a glicose e portanto quando se faz a simulação com 0 CBU/L de  $\beta$ -glicosidase não se observa formação de glicose pelo modelo. Mesmos modelos que consideram a reação direta de celulose a glicose apresentariam dificuldades de representar o ensaio 7, pois é sabido que o complexo celulolítico de *Trichoderma reesei* apresenta pequenas quantidades de  $\beta$ -glicosidase que precisariam ser quantificadas para uma simulação mais precisa.



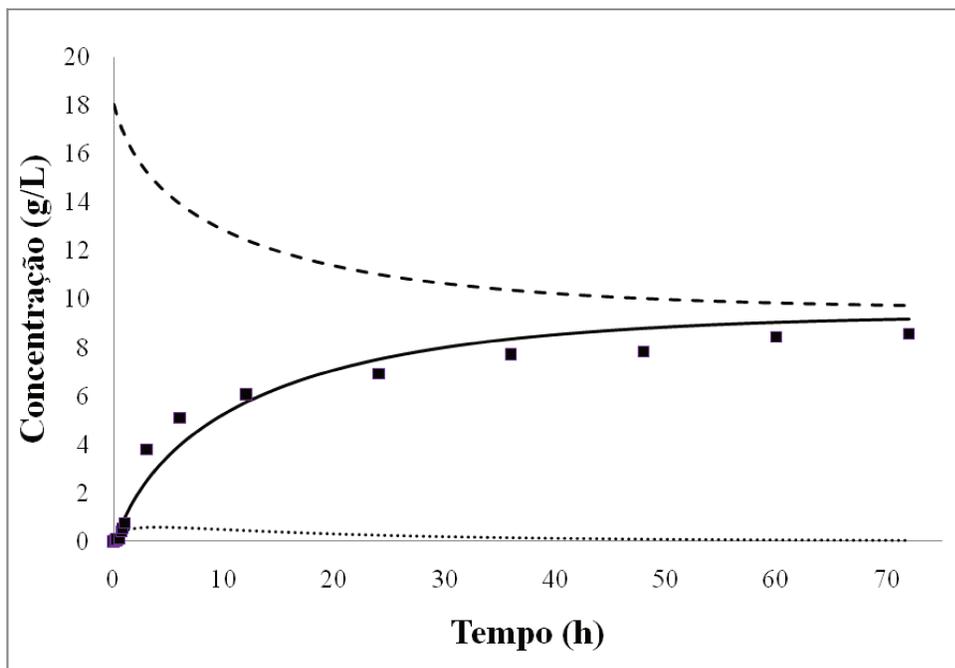
**Figura 4.3:** Dados experimentais e simulados para ensaio 1 (9,652 FPU/g celulose e 12,204 CBU/g celulose). Dados experimentais são para concentração de glicose (■). Curvas simuladas nas concentrações de celobiose (.....), celulose (---) e glicose (—).



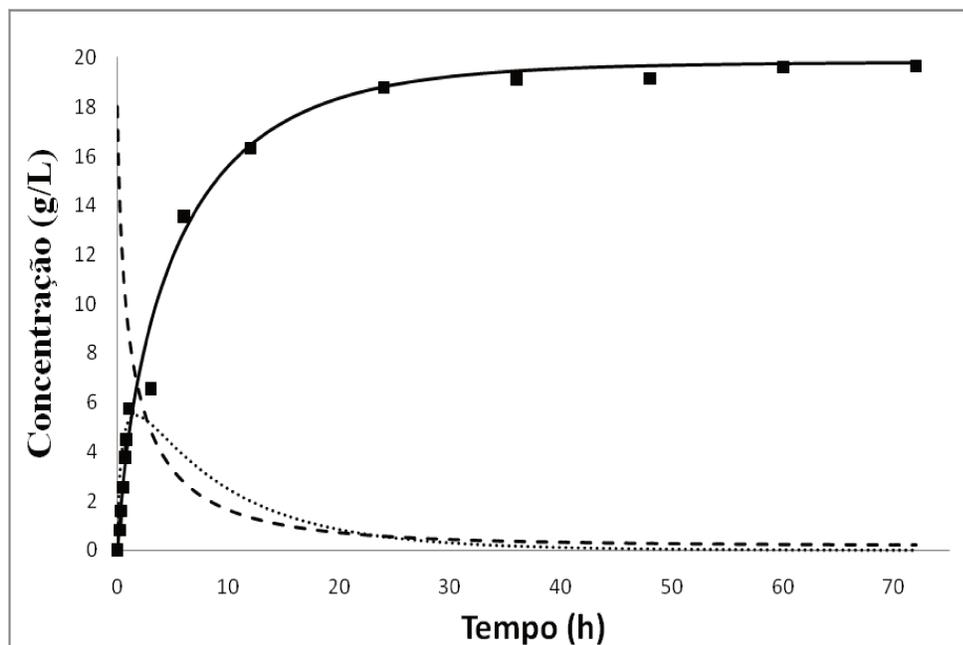
**Figura 4.4:** Dados experimentais e simulados para ensaio 3 (42,991 FPU/g celulose e 12,204 CBU/g celulose). Dados experimentais são para concentração de glicose (■). Curvas simuladas nas concentrações de celobiose (.....), celulose (---) e glicose (—).



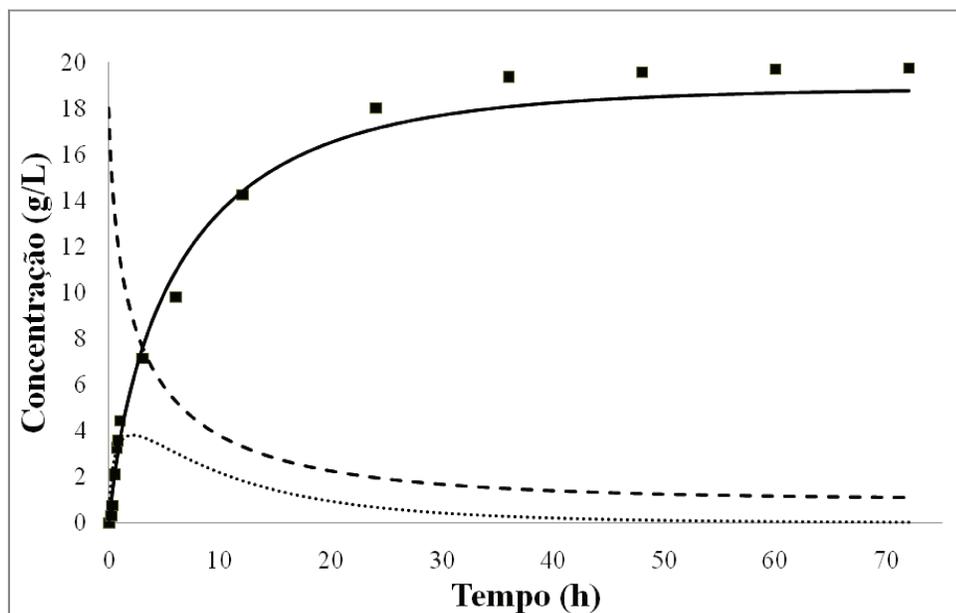
**Figura 4.5:** Dados experimentais e simulados para ensaio 4 (42,991 FPU/g celulose e 71,005 CBU/g celulose). Dados experimentais são para concentração de glicose (■). Curvas simuladas nas concentrações de celobiose (.....), celulose (- - -) e glicose (—).



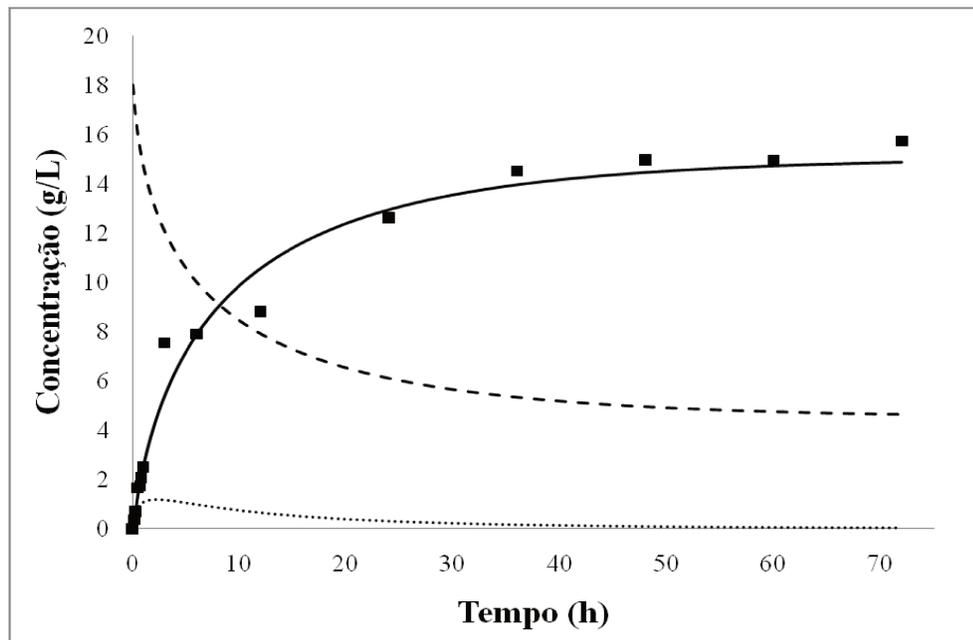
**Figura 4.6:** Dados experimentais e simulados para ensaio 5 (2,774 FPU/g celulose e 41,604 CBU/g celulose). Dados experimentais são para concentração de glicose (■). Curvas simuladas nas concentrações de celobiose (.....), celulose (- - -) e glicose (—).



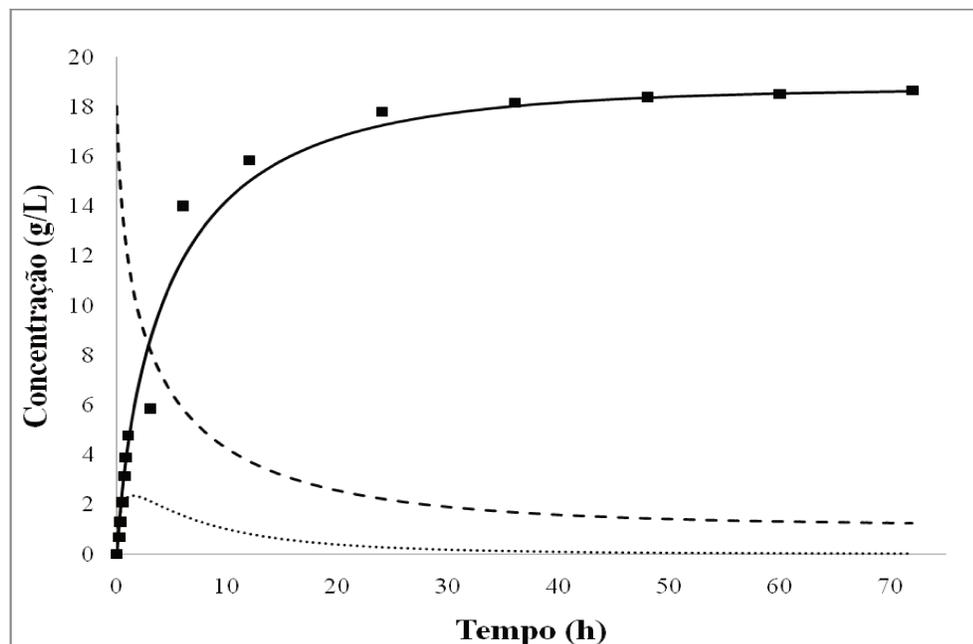
**Figura 4.7:** Dados experimentais e simulados para ensaio 6 (49,925 FPU/g celulose e 41,604 CBU/g celulose). Dados experimentais são para concentração de glicose (■). Curvas simuladas nas concentrações de celobiose (.....), celulose (- - -) e glicose (—).



**Figura 4.8:** Dados experimentais e simulados para ensaio 9 (26,349 FPU/g celulose e 41,604 CBU/g celulose). Dados experimentais são para concentração de glicose (■). Curvas simuladas nas concentrações de celobiose (.....), celulose (- - -) e glicose (—).



**Figura 4.9:** Validação do modelo. Dados experimentais e simulados para ensaio 2 (9,652 FPU/g celulose e 71,005 CBU/g celulose). Dados experimentais são para concentração de glicose (■). Curvas simuladas nas concentrações de celobiose (.....), celulose (- - -) e glicose (—).



**Figura 4.10:** Validação do modelo. Dados experimentais e simulados para ensaio 8 (26,349 FPU/g celulose e 83,209 CBU/g celulose). Dados experimentais são para concentração de glicose (■). Curvas simuladas nas concentrações de celobiose (.....), celulose (- - -) e glicose (—).

Na Figura 4.3 podemos observar que o modelo cinético não foi capaz de representar precisamente o perfil experimental de glicose para a carga de enzimas utilizada neste ensaio. O modelo gerou um perfil de glicose com valores mais baixos que os experimentais durante a maior parte do tempo de hidrólise.

Na Figura 4.4 o modelo foi capaz de descrever os dados experimentais até as primeiras 20 horas de hidrólise, após esse momento o perfil de glicose gerado apresentou um crescimento contínuo enquanto que os dados experimentais mantiveram a concentração de glicose praticamente constante.

Na Figura 4.5 pode-se observar que o modelo foi capaz de representar de forma bastante satisfatória os dados experimentais até as primeiras 6 horas de hidrólise aproximadamente. Embora o modelo tenha apresentado o mesmo comportamento dos dados experimentais, a curva simulada está com seus valores deslocados acima do perfil experimental de glicose.

Em relação as Figuras 4.6 – 4.10 pode-se observar que o modelo cinético foi capaz de representar bem os dados experimentais durante todo o tempo de hidrólise.

Uma descrição mais precisa da qualidade da previsão do modelo será feita na seção 4.2.1.

#### **4.2.1. Desvios do modelo em relação aos dados experimentais**

Neste trabalho, a qualidade da previsão do modelo utilizando os parâmetros otimizados foi caracterizada utilizando o desvio-padrão residual (RSD), Equação 4.8, que fornece uma indicação da precisão da previsão, como sugerido nos trabalhos de ANDRADE *et al.* (2009) e RIVERA *et al.* (2007, 2010).

$$RSD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - y_{pi})^2}{n}} \quad (4.8)$$

onde  $y_i$  é o valor experimental,  $y_{pi}$  é o valor predito pelo modelo matemático e  $n$  é o número de pontos experimentais.

Como a magnitude do RSD irá variar dependendo da magnitude da variável a ser prevista, é mais fácil analisar o RSD escrito como uma média percentual dos valores experimentais  $\bar{y}_i$ :

$$RSD(\%) = \frac{\sqrt{RSD}}{\bar{y}_i} \times 100 \quad (4.9)$$

Segundo RIVERA *et al.* (2007), valores de RSD(%) menores que 10 % são aceitáveis para processos biotecnológicos.

Além disso, a qualidade da predição do modelo pode ser caracterizada usando o coeficiente de correlação (COR (%)) (MANTOVANELI *et al.*, 2007), Equação 4.10.

$$COR(\%) = \left( 1 - \frac{SEE}{S_{TT}} \right) \times 100 \quad (4.10)$$

$$\text{Onde } SEE = \sum_{i=1}^n (y_i - y_{pi})^2 \text{ e } S_{TT} = \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y}_i)^2$$

A Tabela 4.3 mostra a qualidade de predição do modelo cinético para concentração de glicose nos ensaios 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 e 9. Esta tabela inclui o desvio padrão residual, RSD(%), e o coeficiente de correlação, COR. Quando o modelo foi usado para descrever os dados provenientes dos ensaios 1, 3 e 4, a predição apresentou um erro um pouco alto na faixa de 19 – 24 e o coeficiente correlação apresentou valores abaixo de 93%, o que mostra que o modelo não conseguiu representar os dados experimentais com grande precisão, como pode ser visto pelas Figuras 4.3 – 4.5.

Para os dados representados pelos ensaios 6 e 9 e os de validação do modelo (ensaios 2 e 8) temos que estes ensaios apresentaram um desvio residual de aproximadamente 10% o que é um bom valor para processos biotecnológicos como já citado anteriormente e o coeficiente de correlação mostrou-se acima de 98% para estes ensaios.

Embora o ensaio 5 tenha apresentado o valor de 16,59% para o RSD(%), sendo um

pouco alto, podemos observar pela Figura 4.6 que o modelo simulado acompanha a tendência dos dados experimentais mesmo não se sobrepondo perfeitamente sobre eles.

**Tabela 4.3:** Comparação entre o desvio padrão residual, RSD(%), e o coeficiente de correlação, COR(%), para caracterizar a qualidade da predição do modelo cinético para bagaço de cana pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino.

<b>Ensaio</b>	<b>RSD (%)</b>	<b>COR (%)</b>
1	23,84	92,71
2 (validação)	11,10	98,25
3	23,00	88,62
4	19,70	92,16
5	16,59	96,76
6	8,05	99,34
8 (validação)	9,99	98,99
9	8,21	99,35

### **4.3. Metodologia de Plackett-Burman (PB) para a seleção dos parâmetros significativos para o problema de reestimação.**

Neste trabalho o planejamento Plackett-Burman (PB) foi utilizado para fazer um estudo do comportamento dinâmico dos 9 parâmetros presentes no modelo cinético de hidrólise enzimática adotado e verificar aqueles com maior influência nos perfis gerados pelo modelo matemático, de forma que os não significativos são mantidos constantes durante a etapa de reestimação para um outro tipo de pré-tratamento.

As respostas escolhidas para representar o experimento em batelada foram: a concentração de celulose (C), a concentração de celobiose (B) e a concentração de glicose (G). Os parâmetros cinéticos presentes no modelo estudado são: taxa máxima específica de hidrólise de celulose à celobiose ( $K_1$ ), taxa específica de hidrólise de celobiose à glicose ( $K_2$ ), taxa de diminuição na área superficial específica de celulose ( $\lambda$ ), constante de saturação para adsorção da enzima celulase ( $K_{eq}$ ), constante de saturação da celobiose a  $\beta$ -glicosidase ( $K_m$ ), constante de adsorção da enzima  $\beta$ -glicosidase à lignina ( $K_L$ ), constante de inibição da celulase por celobiose ( $K_{1B}$ ), constante de inibição da enzima celulase por glicose ( $K_{1G}$ ), constante de inibição da enzima  $\beta$ -glicosidase por glicose ( $K_{2G}$ ).

As condições iniciais de C, B e G foram fixadas em 18.027, 0.0 e 0.0 g/L, respectivamente. As atividades das enzimas celulase e  $\beta$ -glicosidase foram 26,3 FPU/g celulose e 41.6 CBU/g celulose.

Para aplicação da metodologia, foram escolhidos os valores de parâmetros obtidos para ensaios de hidrólise enzimática com bagaço de cana pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino. Estes valores foram variados e testados em dois níveis distintos, baixo (-) e alto (+), de acordo com a tabela 4.4. A diferença entre esses níveis e os valores nominais dos parâmetros foi de 10 %.

**Tabela 4.4:** Nível inferior (-) e superior (+) dos parâmetros utilizados no planejamento Plackett – Burman.

Parâmetros	Nível		
	(-)	Nominal (0)	(+)
$K_I$	11,25	12,5	13,75
$K_2$	16,15	17,944	19,738
$\lambda$	0,041	0,046	0,050
$K_{eq}$	329,04	365,6	402,16
$K_L$	0,029	0,033	0,036
$K_m$	86,706	96,34	105,974
$K_{IG}$	1,898	2,109	2,32
$K_{IB}$	20,925	23,25	25,575
$K_{2G}$	0,387	0,43	0,473

A matriz de planejamento de Plackett- Burman foi construída com 20 linhas e colunas, como apresentado na tabela 4.5. Foram feitas 20 simulações utilizando os valores de parâmetros correspondentes aos apresentados na tabela 4.4. Como o efeito de somente 9 parâmetros é avaliado, as colunas restantes são formadas por variáveis inertes, que são utilizadas na estimação do erro. Este valor de erro, no entanto, não tem significado físico, já que em simulação não há erro experimental.

**Tabela 4.5:** Matriz de planejamento Plackett – Burman contendo 9 parâmetros cinéticos.

<i>Ensaio</i>	$K_1$	$K_2$	$\lambda$	$K_{eq}$	$K_L$	$K_m$	$K_{IG}$	$K_{IB}$	$K_{2G}$
1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1
2	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1
3	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1
4	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1
5	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1
6	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1
7	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1
8	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1
9	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1
10	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1
11	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1
12	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1
13	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1
14	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1
15	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1
16	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1
17	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1
18	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1
19	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1
20	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1

Para cada uma das 20 simulações usando o modelo matemático, valores de C, B e G foram obtidos ao decorrer da hidrólise em intervalos de 10 min, 20 min, 30 min, 40 min, 50 min, 1 h, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h, 36 h, 48 h, 60 h, 72 h e usados como respostas no Planejamento de Plackett-Burman. Os resultados são apresentados nas Tabelas C.1 a C.14 presentes no Apêndice C.

Depois de obtidas as respostas de interesse, através das simulações realizadas de acordo com a matriz de planejamento apresentada na Tabela 4.5, foram determinados os efeitos estimados dos parâmetros cinéticos sobre as respostas, através do uso da ferramenta de Planejamento Fatorial de Plackett-Burman contida no Software Statistica 7.0 (Statsoft).

Com os efeitos dos parâmetros cinéticos obtidos pelo software Statistica foram plotadas as Figuras 4.11– 4.13.

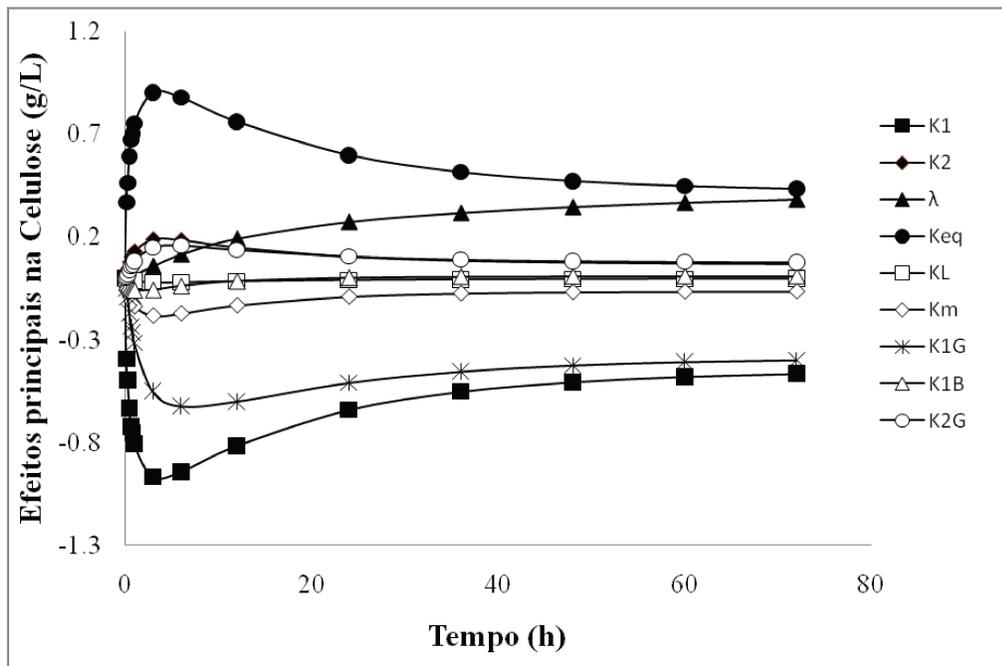


Figura 4.11: Efeito dos parâmetros cinéticos na concentração de celulose.

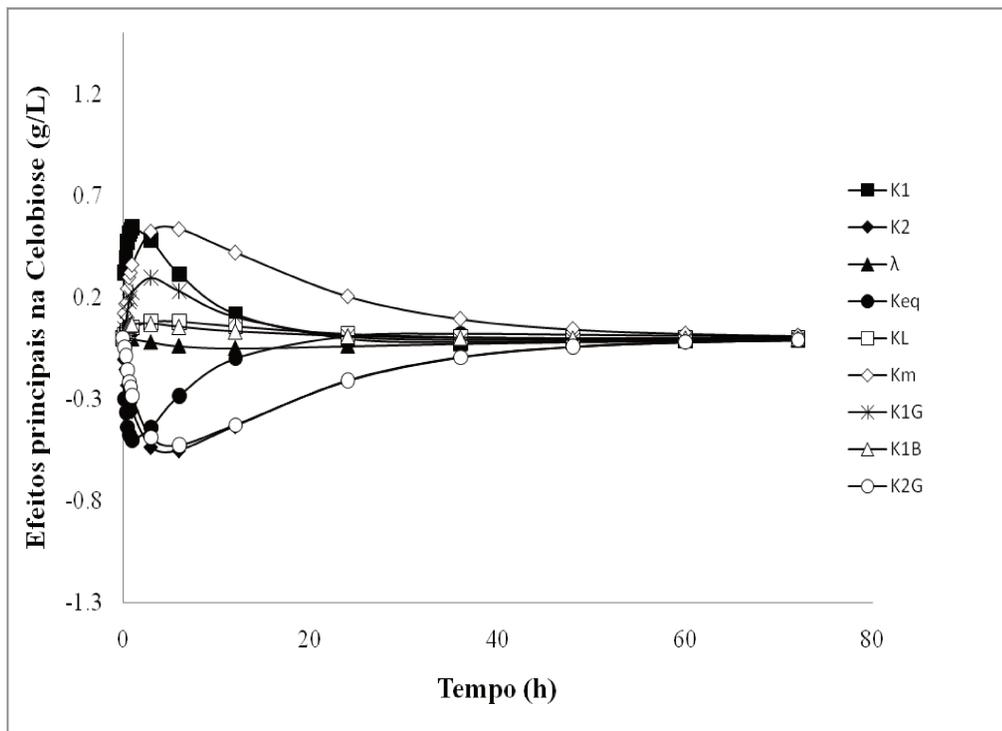
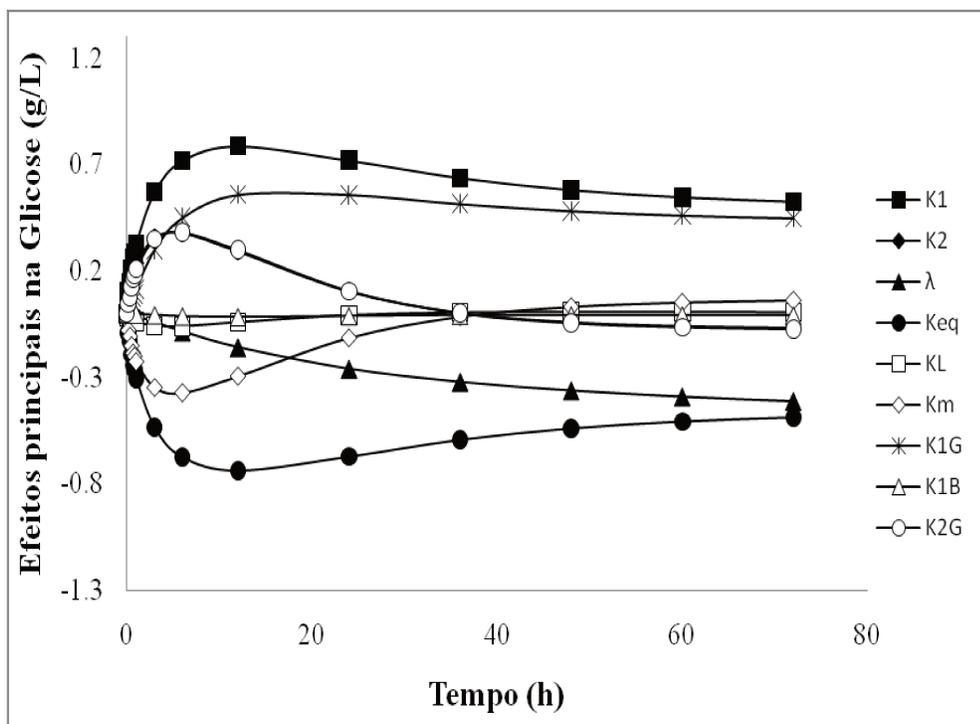


Figura 4.12: Efeito dos parâmetros cinéticos na concentração de celobiose.



**Figura 4.13:** Efeito dos parâmetros cinéticos na concentração de glicose.

Ao analisar os dados apresentados nas Figuras 4.11, 4.12 e 4.13 constatamos que vários parâmetros cinéticos têm seu grau de influência nas respostas alterado ao longo do tempo de hidrólise. Na Figura 4.13 o parâmetro  $\lambda$  ao início da hidrólise apresenta um efeito baixo para concentração de glicose, porém no decorrer do tempo a influência deste parâmetro torna-se bastante significativa para esta resposta. Na Figura 4.12 observamos que os efeitos de todos os parâmetros cinéticos para a concentração de celobiose diminuem com o tempo de hidrólise, dessa forma eles apresentam maior influência para esta resposta nas primeiras horas de reação. Estes resultados indicam que se fizermos a análise apenas no final da hidrólise podemos deixar de fora da re-estimação parâmetros importantes para descrever o início da hidrólise.

Para facilitar a identificação dos parâmetros mais importantes do modelo foram montadas as Tabelas 4.6 e 4.7 relacionando os efeitos dos parâmetros cinéticos sobre as concentrações de celulose, celobiose e glicose. Nestas tabelas, a área preta significa que o

parâmetro apresenta grande influência na resposta, a área cinza indica que o parâmetro apresenta pequena influência e a área branca significa que a influência dos parâmetros sobre a resposta é desprezível.

**Tabela 4.6:** Efeito dos parâmetros cinéticos nas variáveis no início da hidrólise (até 10 h).

	$K_1$	$K_2$	$\lambda$	$K_{eq}$	$K_L$	$K_m$	$K_{IG}$	$K_{IB}$	$K_{2G}$
<b>Celulose</b>	Black	Gray	Gray	Black	White	Gray	Black	White	Gray
<b>Celobiose</b>	Black	Black	White	Black	White	Black	Gray	White	Black
<b>Glicose</b>	Black	Gray	White	Black	White	Gray	Black	White	Gray

**Tabela 4.7:** Efeito dos parâmetros cinéticos nas variáveis ao final da hidrólise.

	$K_1$	$K_2$	$\lambda$	$K_{eq}$	$K_L$	$K_m$	$K_{IG}$	$K_{IB}$	$K_{2G}$
<b>Celulose</b>	Black	White	Black	Black	White	White	Black	White	White
<b>Celobiose</b>	White	Gray	White	White	White	Gray	White	White	Gray
<b>Glicose</b>	Black	White	Black	Black	White	White	Black	White	White

A Tabela 4.6 avalia a influência dos parâmetros cinéticos nas 10 primeiras horas do processo de hidrólise enzimática. Pode ser visto nesta tabela que, para a concentração de celulose, os parâmetros de maior influência (área preta) são:  $K_1$ ,  $K_{eq}$  e  $K_{IG}$ . Os parâmetros de menor influência (área cinza) são:  $K_2$ ,  $\lambda$ ,  $K_m$  e  $K_{2G}$ . Já os parâmetros  $K_L$  e  $K_{IB}$  (área branca) não apresentaram influência no início da hidrólise para a concentração de celulose.

Para a concentração de celobiose os parâmetros significativos foram:  $K_1$ ,  $K_2$ ,  $K_{eq}$ ,  $K_m$ ,  $K_{2G}$  (área preta) e  $K_{IG}$  (área cinza), enquanto que os parâmetros  $\lambda$ ,  $K_L$  e  $K_{IB}$  não apresentaram influência durante o início da hidrólise.

A Tabela 4.6 mostra que, com exceção do parâmetro  $\lambda$ , que não apresentou influência sobre a concentração de glicose nas primeiras 10 h de hidrólise, os demais parâmetros mostraram o mesmo comportamento observado na concentração de celulose.

A Tabela 4.7 foi montada da mesma forma que a Tabela 4.6, porém nesta a influência dos parâmetros foi avaliada das 10 horas iniciais até o final da hidrólise (72 h). Pode-se observar pela Tabela 4.7 que os parâmetros  $K_1$ ,  $\lambda$ ,  $K_{eq}$  e  $K_{IG}$  (área preta) foram significativos tanto para a concentração de celulose como para a concentração de glicose após 10 horas de hidrólise. Para a

concentração de celobiose os efeitos de todos os parâmetros diminuíram gradativamente até chegarem próximo do valor zero (não significativos) ao final do tempo de hidrólise. Os parâmetros  $K_2$ ,  $K_m$  e  $K_{2G}$  foram considerados significativos (área cinza) pois estes mantiveram influência, embora pequena, durante um intervalo de tempo maior que os demais parâmetros. Uma possível explicação no comportamento apresentado na análise de efeitos para a concentração de celobiose pode-se dar ao fato de que a celobiose por ser um intermediário na reação de hidrólise, apresenta uma concentração mais elevada no início da reação e no final é praticamente toda consumida para a formação de glicose, o que se justifica a não influência dos parâmetros nas últimas horas de reação.

No procedimento de re-estimação de parâmetros deve-se levar em consideração a influência dos parâmetros durante todo o tempo de hidrólise, dessa forma os resultados obtidos por meio das Tabelas 4.6 e 4.7 foram comparados. Verificou-se que os efeitos significativos para a concentração de celulose são dos parâmetros:  $K_1$ ,  $K_2$ ,  $\lambda$ ,  $K_{eq}$ ,  $K_m$ ,  $K_{1G}$  e  $K_{2G}$ . Os parâmetros significativos para a concentração de celobiose são:  $K_1$ ,  $K_2$ ,  $K_{eq}$ ,  $K_{1G}$  e  $K_{2G}$ . Finalmente os efeitos que são significativos para a concentração de glicose são os mesmos que são significativos para a concentração de celulose.

Então, de acordo com as Tabelas 4.6 e 4.7, existem 2 parâmetros não significativos ( $K_L$  e  $K_{1B}$ ) e 7 parâmetros significativos ( $K_1$ ,  $K_2$ ,  $\lambda$ ,  $K_{eq}$ ,  $K_m$ ,  $K_{1G}$  e  $K_{2G}$ ).

#### **4.4. Estimação dos parâmetros cinéticos para bagaço de cana pré-tratado com ácido fosfórico + hidróxido de sódio**

Para se avaliar o desempenho do modelo cinético quando se tem mudanças no pré-tratamento do bagaço de cana foram utilizados os dados experimentais obtidos do trabalho de RUEDA (2010). Os dados são para hidrólise de bagaço com variação nas concentrações das enzimas celulase e  $\beta$ -glicosidase e com concentração inicial de biomassa em 30 g/L conforme descrito na seção 3.1.4.

Desta forma, os experimentos realizados com esta nova condição de pré-tratamento foram utilizados na fase de reajuste de parâmetros com o objetivo de representar uma condição distinta. Para este teste, foi realizada uma comparação entre o ajuste do modelo aos dados experimentais com parâmetros cinéticos utilizados no desenvolvimento do modelo (Tabela 4.2) e com a re-estimação dos parâmetros mais sensíveis, como segue.

Com a finalidade de testar a capacidade de predição do modelo frente a mudanças no pré-tratamento utilizaram-se os perfis experimentais de glicose nos ensaios 1, 3, 4, 5, 6 e 9 apresentados na Tabela A.2 do apêndice A, sendo que os demais ensaios foram usados na validação do modelo sob nova condição de pré-tratamento.

As condições iniciais de celulose, celobiose e glicose usadas no procedimento de estimação de parâmetros e simulação do modelo foram fixadas em 15.258 g/L (bagaço com 50,86% de celulose), 0.0 e 0.0 g/L, respectivamente.

Os resultados foram comparados, sem e com re-estimação de parâmetros mais sensíveis.

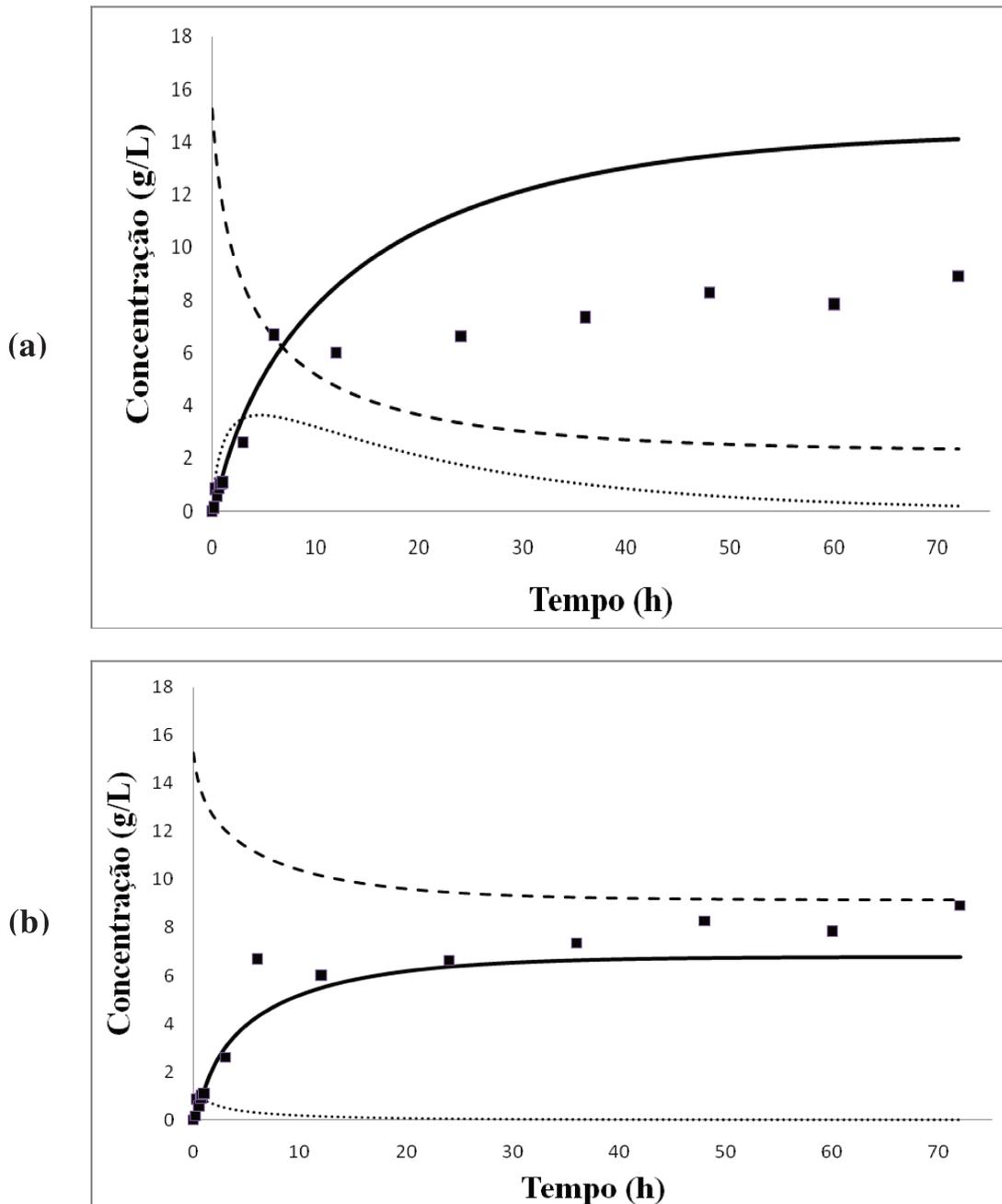
Na Tabela 4.8 são apresentados os parâmetros mais sensíveis que foram re-estimados por algoritmo genético e os parâmetros de menor influência que permaneceram fixos para a simulação do modelo para o bagaço pré-tratado com ácido fosfórico + hidróxido de sódio.

**Tabela 4.8:** Parâmetros estimados pelo AG Pikaia para dados de bagaço pré-tratado com ácido fosfórico + hidróxido de sódio.

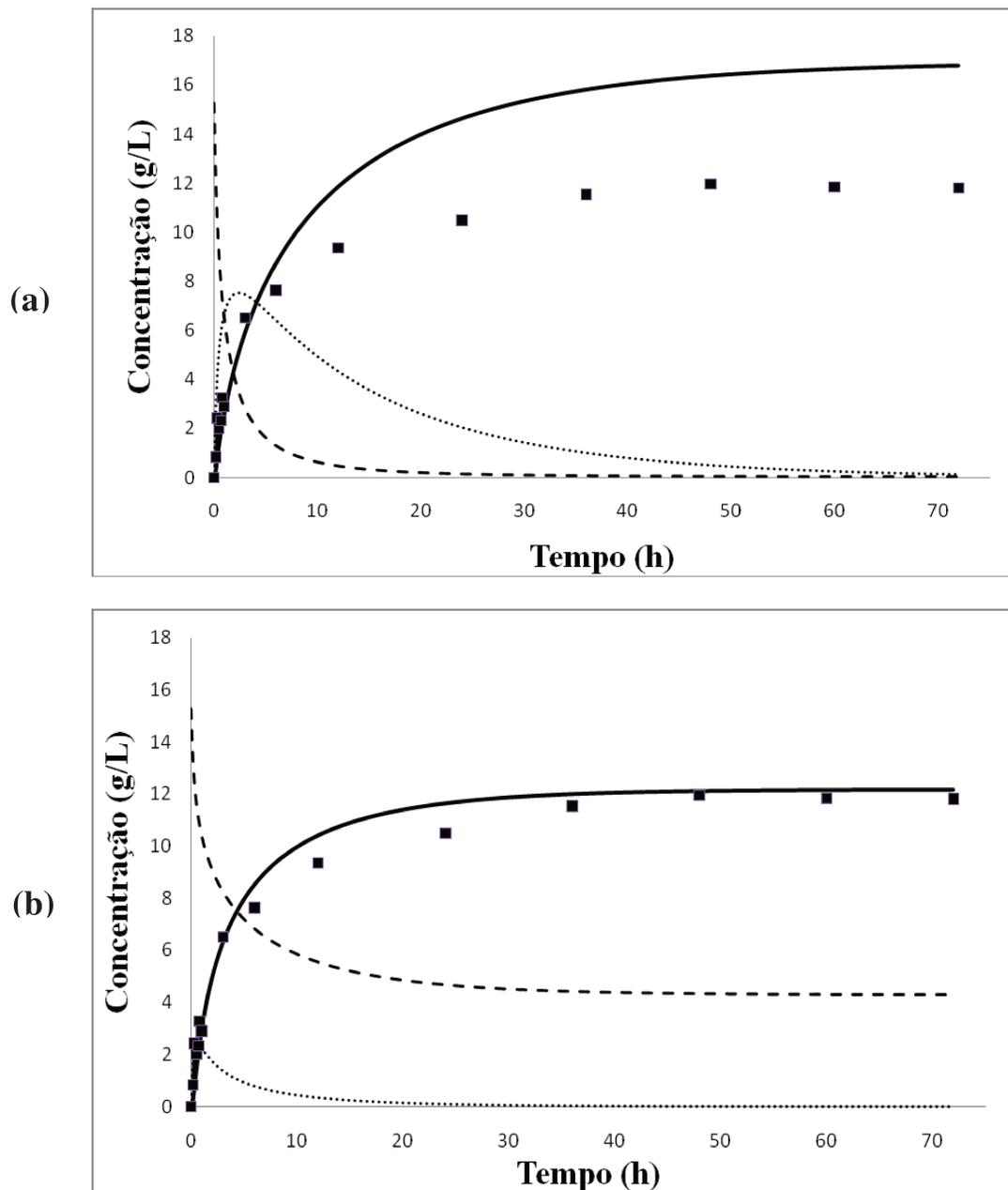
Parâmetro	Valor
$*K_1$	14,315 h <sup>-1</sup>
$*K_2$	16,25 g/(CBU ·h)
$*\lambda$	0,0875 h <sup>-1</sup>
$*K_{eq}$	754,35 g/L
$K_L$	0,033 g/L
$*K_m$	96,28 g/L
$*K_{IG}$	0,87 g/L
$K_{IB}$	23,25 g/L
$*K_{2G}$	3,572 g/L

\* parâmetros re-estimados

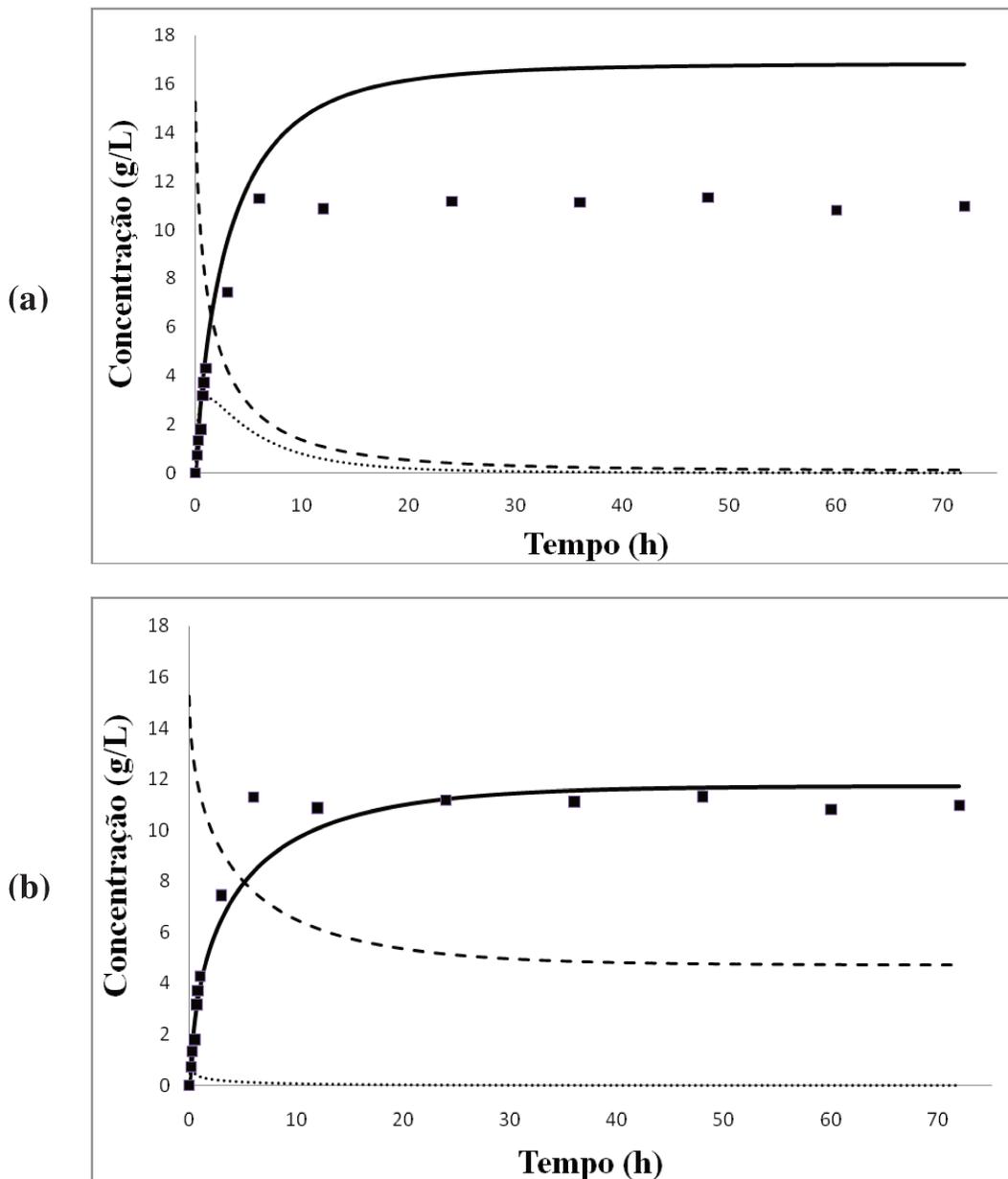
Nas Figuras 4.14 – 4.21 foram feitas simulações para se avaliar a capacidade de predição do modelo quando se tem mudanças no pré-tratamento do bagaço de cana. Foram considerados 2 casos: 1) Predição do modelo sem atualização dos parâmetros cinéticos sendo utilizados os parâmetros da Tabela 4.2 (Figuras 4.14a – 4.21a). 2) Predição do modelo utilizados os parâmetros re-estimados apresentados na Tabela 4.8 (Figuras 4.14b – 4.21b). As Figuras 4.14b – 4.21b mostram os perfis simulados de celulose, celobiose e glicose para os ensaios 1, 3, 4, 5, 6 e 9, respectivamente, os quais foram usados para estimar os parâmetros do modelo, sob novas condições de pré-tratamento. As Figuras 4.20b – 4.21b mostram a validação do modelo usando os ensaios 2 e 8 que não foram utilizados no procedimento de estimação de parâmetros.



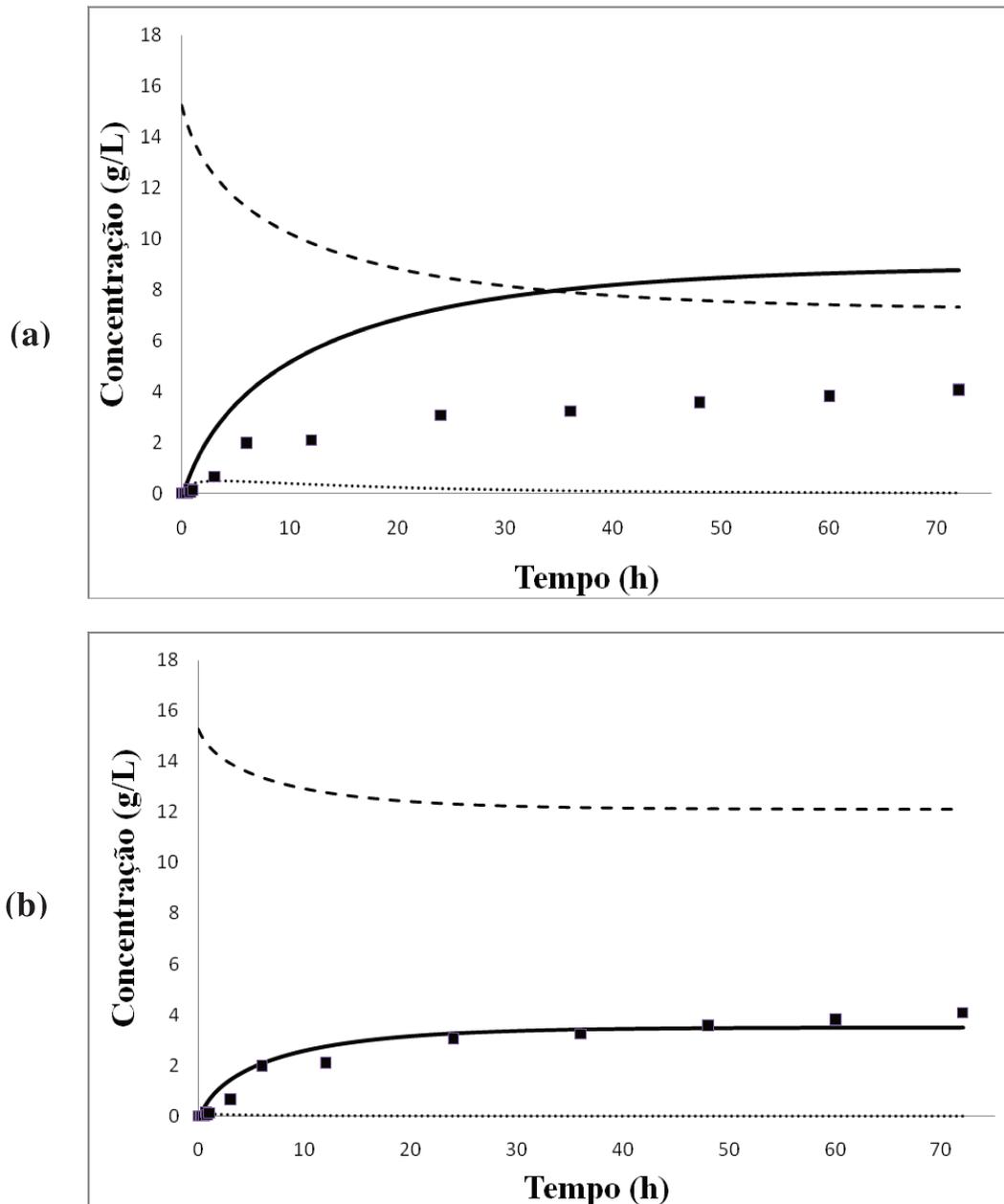
**Figura 4.14:** Predição das condições experimentais do ensaio 1 (11,404 FPU/g celulose e 14,419 CBU/g celulose). Dados experimentais são para concentração de glicose (■). Curvas simuladas nas concentrações de celobiose (.....), celulose (- - -) e glicose (—). **a)** Simulação sem re-estimação. **b)** Simulação com re-estimação.



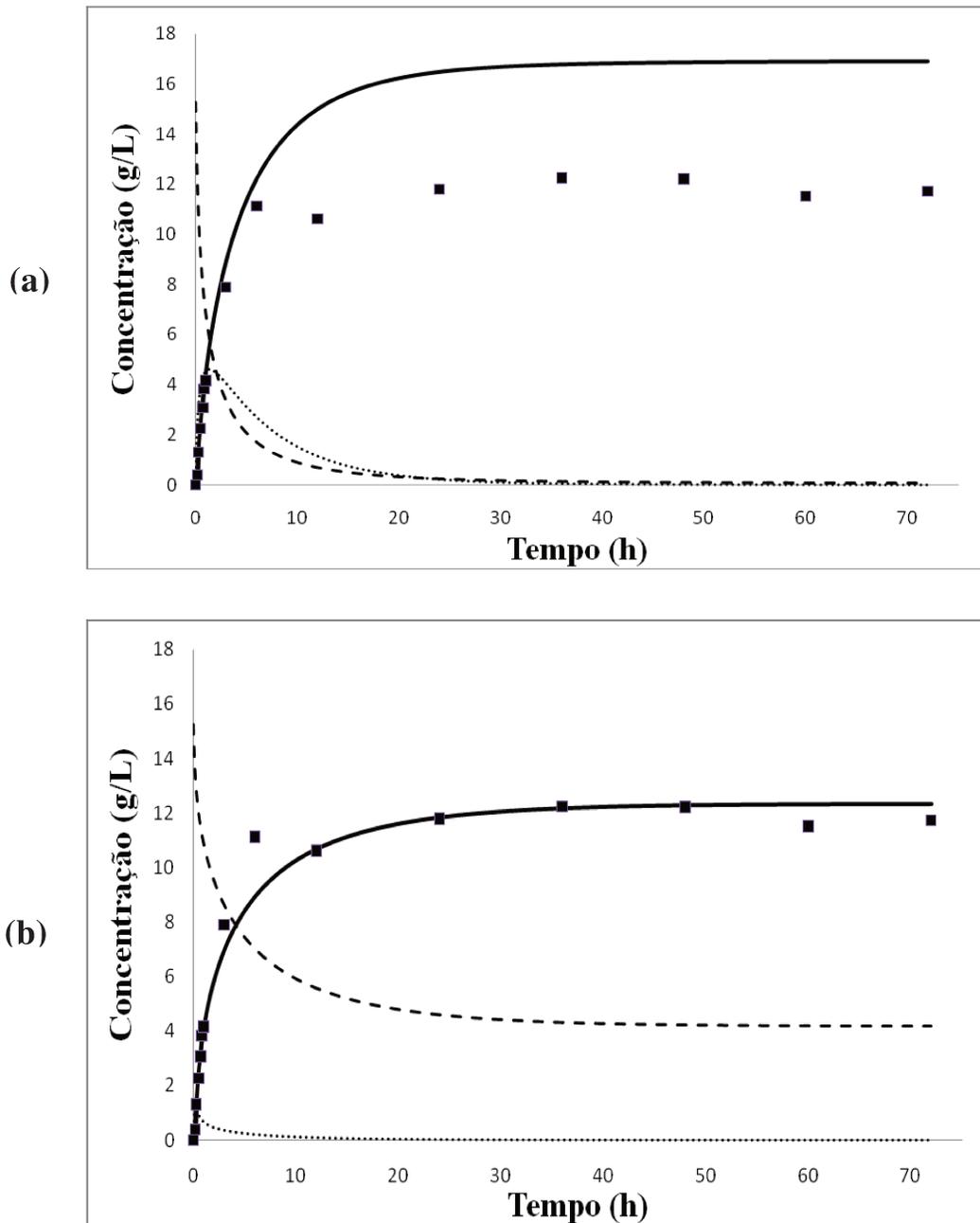
**Figura 4.15:** Predição das condições experimentais do ensaio 3 (50,793 FPU/g celulose e 14,419 CBU/g celulose). Dados experimentais são para concentração de glicose (■). Curvas simuladas nas concentrações de celobiose (.....), celulose (- - -) e glicose (—). **a)** Simulação sem re-estimação. **b)** Simulação com re-estimação.



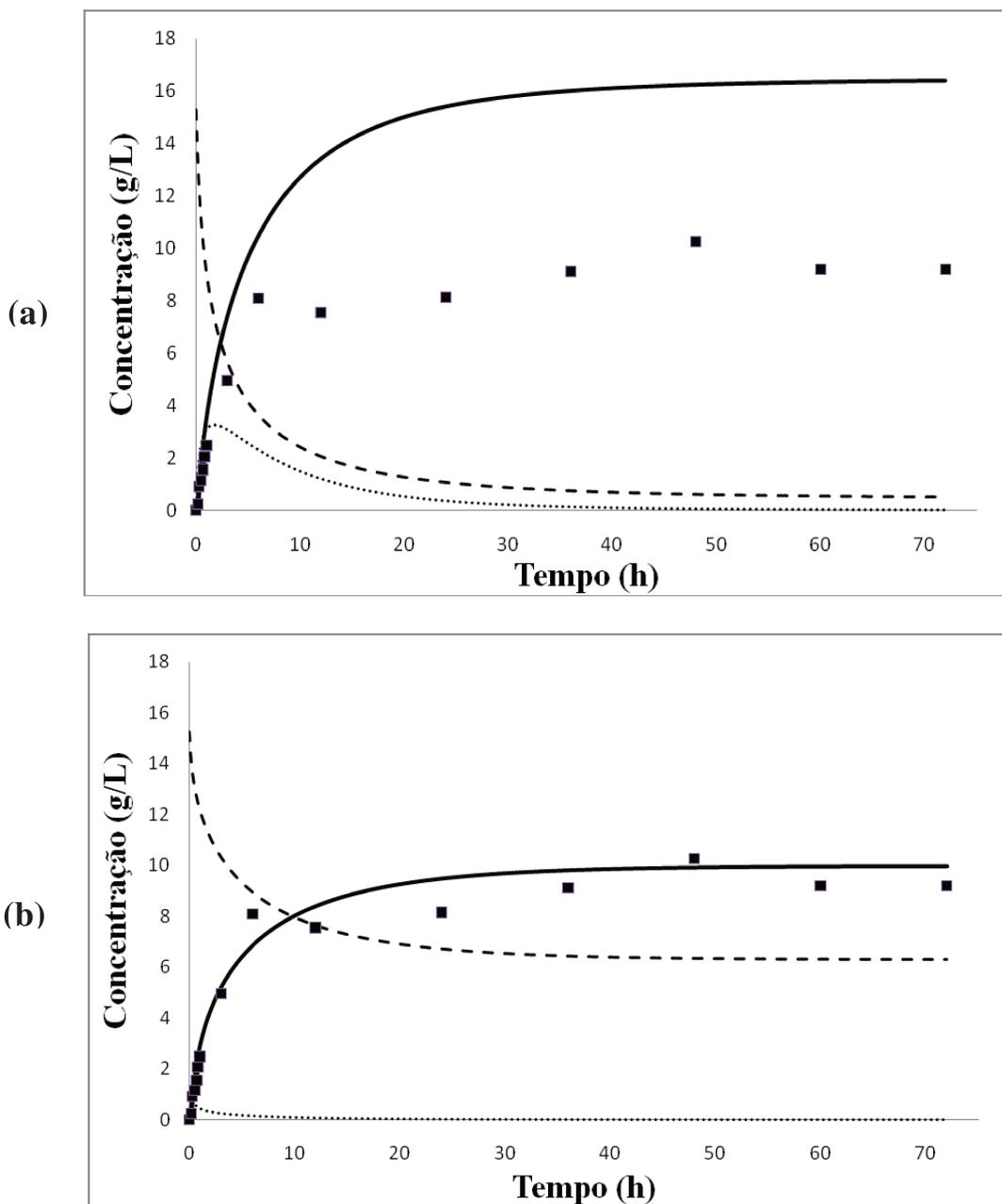
**Figura 4.16:** Predição das condições experimentais do ensaio 4 (50,793 FPU/g celulose e 83,890 CBU/g celulose). Dados experimentais são para concentração de glicose (■). Curvas simuladas nas concentrações de celobiose (.....), celulose (- - -) e glicose (—). **a)** Simulação sem re-estimação. **b)** Simulação com re-estimação.



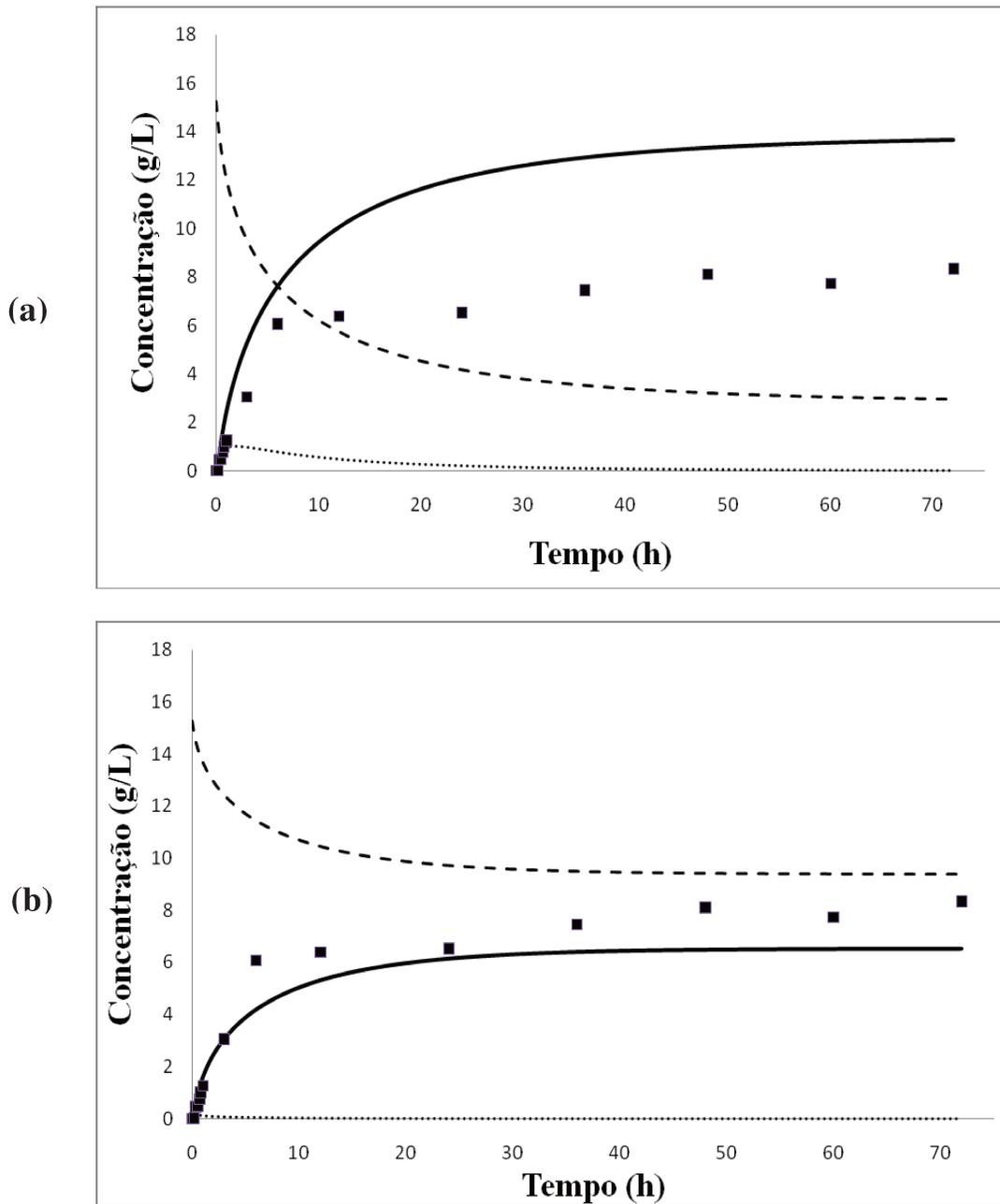
**Figura 4.17:** Predição das condições experimentais do ensaio 5 (3,277 FPU/g celulose e 49,155 CBU/g celulose). Dados experimentais são para concentração de glicose (■). Curvas simuladas nas concentrações de celobiose (.....), celulose (- - -) e glicose (—). **a)** Simulação sem re-estimação. **b)** Simulação com re-estimação.



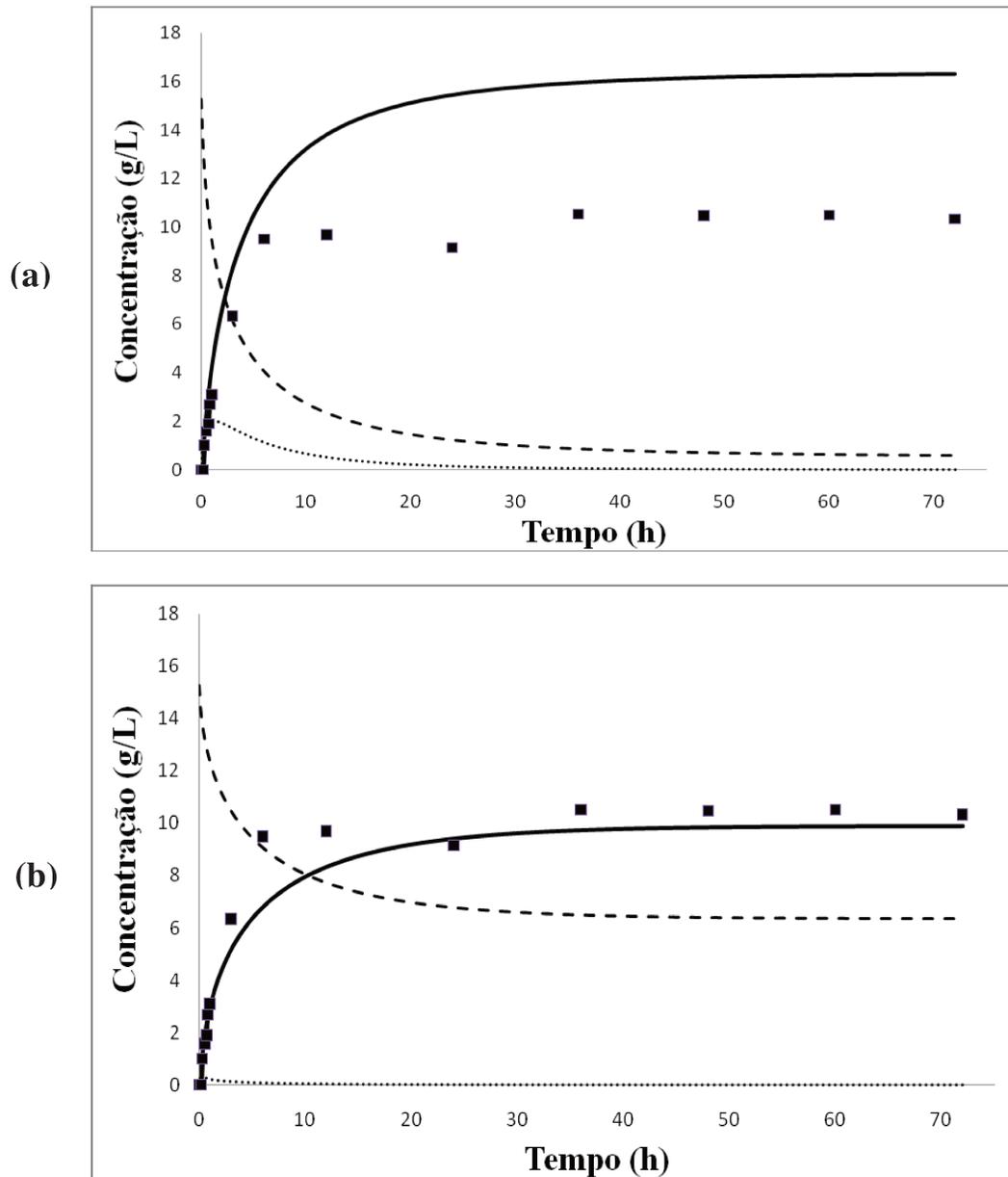
**Figura 4.18:** Predição das condições experimentais do ensaio 6 (58,985 FPU/g celulose e 49,155 CBU/g celulose). Dados experimentais são para concentração de glicose (■). Curvas simuladas nas concentrações de celobiose (.....), celulose (---) e glicose (—). **a)** Simulação sem re-estimação. **b)** Simulação com re-estimação.



**Figura 4.19:** Predição das condições experimentais do ensaio 9 (31,131 FPU/g celulose e 49,155 CBU/g celulose). Dados experimentais são para concentração de glicose (■). Curvas simuladas nas concentrações de celobiose (.....), celulose (- - -) e glicose (—). **a)** Simulação sem re-estimação. **b)** Simulação com re-estimação.



**Figura 4.20:** Predição das condições experimentais do ensaio 2 (11,404 FPU/g celulose e 83,890 CBU/g celulose). Dados experimentais são para concentração de glicose (■). Curvas simuladas nas concentrações de celobiose (.....), celulose (---) e glicose (—). **a)** Simulação sem re-estimação. **b)** Simulação com re-estimação.



**Figura 4.21:** Predição das condições experimentais do ensaio 8 (31,131 FPU/g celulose e 98,309 CBU/g celulose). Dados experimentais são para concentração de glicose (■). Curvas simuladas nas concentrações de celobiose (.....), celulose (---) e glicose (—). **a)** Simulação sem re-estimação. **b)** Simulação com re-estimação.

O desvio padrão residual, RSD(%), descrito pelas Equações 4.8 e 4.9 foi utilizado para caracterizar a qualidade da predição do modelo com e sem re-estimação dos parâmetros mais sensíveis. Pela Tabela 4.9 pode-se observar que em todos os ensaios onde não houve re-estimação de parâmetros os valores do RSD(%) estavam inaceitavelmente altos, na faixa de 52.90 – 195.70 %. Para os ensaios com re-estimação de parâmetros houve significativa melhora nos valores de RSD(%) em todos eles.

O valor um pouco alto apresentado pelo RSD(%), aproximadamente 25%, nos ensaios 1, 2 e 5 pode ser explicado pelas oscilações nos dados experimentais de glicose, como pode ser verificado nas Figuras 4.14, 4.20 e 4.17 respectivamente.

**Tabela 4.9:** Desvio padrão residual, RSD(%), usado para caracterizar a qualidade da predição do modelo cinético com parâmetros re-estimados para bagaço de cana pré-tratado com ácido fosfórico + hidróxido de sódio.

Ensaio	RSD (%)	
	Sem re-estimação	Com re-estimação
1	80,60	25,66
2 (validação)	89,73	25,24
3	43,58	11,16
4	52,94	13,93
5	195,70	25,95
6	44,33	10,20
8 (validação)	63,60	16,30
9	88,22	14,44

Uma vez que o modelo proposto descreveu bem a hidrólise de bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino e com ácido fosfórico+deslignificação com soda, mas com parâmetros diferentes, vamos comparar os rendimentos (%) em glicose na hidrólise e os parâmetros dos dois modelos, mostrados na Tabela 4.10 e 4.11 respectivamente.

Os rendimentos em glicose na hidrólise, para todas os ensaios considerados, foram calculados pela Equação 4.11 e são mostrados na Tabela 4.10.

$$\frac{g \text{ celulose hidrolisada}}{g \text{ celulose no bagaço pré-tratado}} = \frac{g \text{ glicose} \cdot \frac{162,2}{180,2}}{g \text{ celulose no bagaço pré-tratado}} \cdot 100\% \quad (4.11)$$

**Tabela 4.10:** Rendimento em glicose para os ensaios simulados de bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio e bagaço pré-tratado com ácido fosfórico + hidróxido de sódio.

Ensaio	Rendimento (%) bagaço pré-tratado com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Rendimento (%) bagaço pré-tratado com H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> +NaOH
1	77.06	40.00
2	74.19	38.58
3	96.99	71.83
4	97.75	69.04
5	45.79	20.69
6	98.79	72.66
8	92.97	58.41
9	93.70	58.86

**Tabela 4.11:** Parâmetros cinéticos estimados por AG Pikaia para dados de bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio e bagaço pré-tratado com ácido fosfórico + hidróxido de sódio.

Parâmetros	Valores para bagaço pré-tratado com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Valores para bagaço pré-tratado com H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> +NaOH
<i>K<sub>1</sub></i>	12,5 h <sup>-1</sup>	14,315 h <sup>-1</sup>
<i>K<sub>2</sub></i>	17,944 g/(CBU · h)	16,25 g/(CBU · h)
<i>λ</i>	0,046 h <sup>-1</sup>	0,0875 h <sup>-1</sup>
<i>K<sub>eq</sub></i>	365,6 g/L	754,35 g/L
<i>K<sub>m</sub></i>	96,34 g/L	96,28 g/L
<i>K<sub>1G</sub></i>	2,109 g/L	0,87 g/L
<i>K<sub>2G</sub></i>	0,43 g/L	3,572 g/L

Pode-se observar da Tabela 4.11 que os parâmetros que sofreram grande alteração considerando os dois pré-tratamentos foram:

- $\lambda$ : praticamente dobrou para o pré-tratamento com ácido fosfórico.

Analisando as Figuras 4.11 e 4.13 nota-se que o parâmetro  $\lambda$  tem efeito positivo na concentração de celulose e negativo na concentração de glicose. O termo de decaimento exponencial da Equação 4.4,  $e^{-\lambda t}$ , leva em conta a diminuição na taxa de produção de glicose como resultado da diminuição da mobilidade da enzima causada pela diminuição da área superficial da celulose.

$\lambda$  é um parâmetro que descreve a taxa de diminuição da área superficial da celulose, de forma que quanto maior, mais rápida a diminuição da taxa superficial e mais difícil converter a celulose em glicose com o passar do tempo. O valor de  $\lambda$  é determinado pela natureza da biomassa usada como substrato e pelas condições de pré-tratamento empregada: condições promissoras são aquelas que produzem um material altamente digestível pelo aumento de sua área superficial específica (pequeno  $\lambda$ ).

No trabalho de PHILIPPIDIS e HATZIS (1997), o impacto do fator  $\lambda$  foi avaliado no rendimento em etanol no processo de sacarificação e fermentação simultâneas. Neste trabalho, para papel reciclado sem pré-tratamento, com  $\lambda$  de  $0,02 \text{ h}^{-1}$  e taxa de diluição de  $0,01875 \text{ h}^{-1}$ , o rendimento em etanol foi de 45,7%. Quando se considerou um processo de pré-tratamento que reduzisse o valor de  $\lambda$  pela metade mantendo o mesmo substrato com a mesma taxa de diluição, obteve-se um rendimento em etanol de 59,5%.

Quando comparamos os rendimentos em glicose apresentados na Tabela 4.10 de bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio com os de bagaço pré-tratado com ácido fosfórico, podemos constatar que os rendimentos alcançados com peróxido de hidrogênio foram bem superiores aos obtidos com ácido fosfórico. Para os ensaios 1, 5 e 9 obtivemos rendimentos de 77,06%, 45,79% e 93,70% para bagaço pré-tratado com peróxido e 40%, 20,69% e 58,86% para bagaço pré-tratado com ácido. Com base nos dados de rendimento em glicose e pelo valor do parâmetro  $\lambda$  ser praticamente o dobro para o bagaço pré-tratado com ácido fosfórico, podemos concluir que a taxa de diminuição da área superficial seria menor no pré-tratamento com peróxido, logo a reação acontece de forma mais completa e o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio é mais eficiente.

- $K_{eq}$ : dobrou no caso do pré-tratamento ácido.

Da mesma forma que o parâmetro  $\lambda$ , o parâmetro  $K_{eq}$  tem efeito positivo na celulose e negativo na concentração de glicose, como pode ser observado nas Figuras 4.11 e 4.13.

$K_{eq}$  é a constante de equilíbrio de adsorção da celulase, este parâmetro está relacionado com a afinidade da enzima celulase com o sítio de ligação do substrato. PHILIPPIDIS e HATZIS (1997) estimaram o impacto da eficiência de ligação da enzima no processo de sacarificação e fermentação simultâneas pela simulação de  $K_{eq}$  no rendimento em etanol na faixa de 0 – 5000 g/L. Quanto menor o valor da constante de equilíbrio, mais forte é a afinidade da enzima ao substrato e, além disso, maior é a eficiência de ligação. PHILIPPIDIS e HATZIS (1997) consideraram ainda uma celulase com  $K_{eq}$  de 1000 g/L, que conduziu a um rendimento em etanol de 27,5% e uma celulase com a metade desse valor (500 g/L) conduziu a um rendimento de 34,7%.

O bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio apresentou o valor de  $K_{eq}$  (365,6 g/L) como sendo praticamente a metade do valor de  $K_{eq}$  (754,35 g/L) estimado para o bagaço pré-tratado com ácido fosfórico, o que indica uma maior afinidade do complexo celulolítico para com o bagaço pré-tratado com peróxido. Essa maior afinidade pode ser observada quando comparamos as diferenças nos valores de rendimento em glicose alcançados para os dois pré-tratamentos, como mostra a Tabela 4.10.

- $K_{IG}$ : caiu pra menos da metade.

De acordo com as Figuras 4.11 e 4.13,  $K_{IG}$  tem efeito positivo na glicose e negativo na celulose.  $K_{IG}$  é a constante de inibição da celulase por glicose. Quanto menor o valor de  $K_{IG}$  maior a inibição da celulase pela glicose, nesse caso significaria que a inibição é maior na hidrólise de bagaço pré-tratado com ácido fosfórico.

- $K_{2G}$ : subiu mais de 8 vezes.

Pelas Figuras 4.11 e 4.13,  $K_{2G}$  tem efeito positivo na glicose apenas na etapa inicial da hidrólise, porém não apresentou efeito significativo na celulose.  $K_{2G}$  é a constante de inibição da  $\beta$ -glicosidase pela glicose. Quanto menor o valor de  $K_{2G}$  maior a inibição, nesse caso a inibição

da  $\beta$ -glicosidase pela glicose foi bem menor no caso do pré-tratamento com ácido fosfórico.

Não se conseguiu atribuir um significado físico que justificasse a mudança dos valores de  $K_{1G}$  e  $K_{2G}$  apresentada nos dois pré-tratamentos, pois  $K_{1G}$  e  $K_{2G}$  são parâmetros que aparentemente estão mais relacionados ao complexo enzimático utilizado do que com as características do substrato.

#### 4.5. Estimação dos parâmetros cinéticos para bagaço de cana pré-tratado com hidróxido de cálcio (cal)

Nesta seção os dados experimentais de FUENTES (2009) para hidrólise de bagaço com variação nas concentrações das enzimas celulase e  $\beta$ -glicosidase, apresentados na Tabela A.3 do apêndice A foram utilizados na atualização dos parâmetros do modelo cinético frente a mudanças no pré-tratamento do bagaço.

O procedimento de atualização dos parâmetros cinéticos por algoritmo genético foi o mesmo apresentado na seção 4.4 para bagaço pré-tratado com ácido fosfórico + hidróxido de sódio.

As condições iniciais de celulose, celobiose e glicose usadas no procedimento de estimação de parâmetros e simulação do modelo foram fixadas em 18.135 g/L (bagaço com 60,45% de celulose), 0.0 e 0.0 g/L, respectivamente.

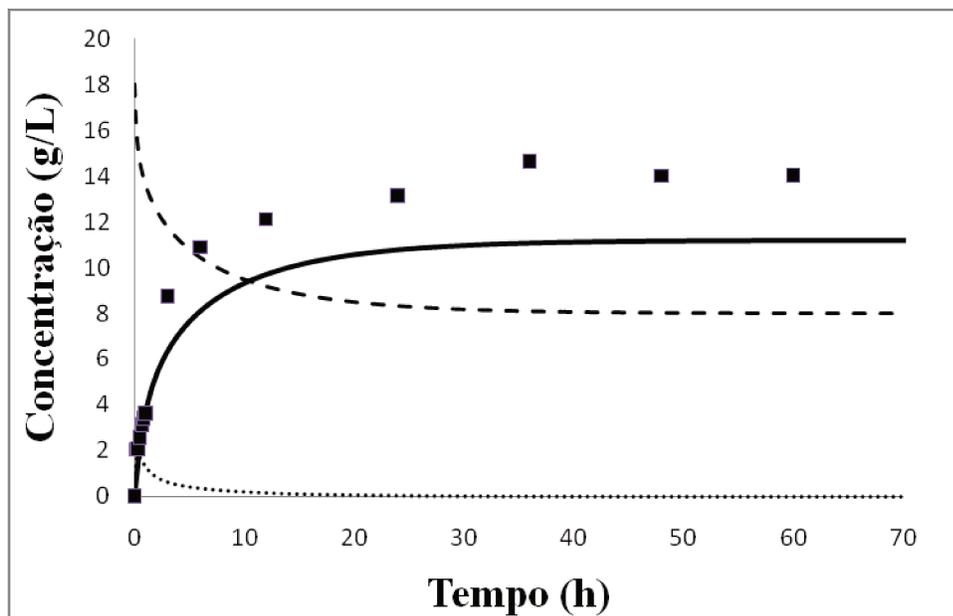
Na Tabela 4.12 temos os parâmetros mais sensíveis que foram re-estimados por algoritmo genético e os parâmetros de menor influência que permaneceram fixos na etapa de simulação do modelo.

**Tabela 4.12:** Parâmetros estimados pelo AG Pikaia para dados de bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio (cal).

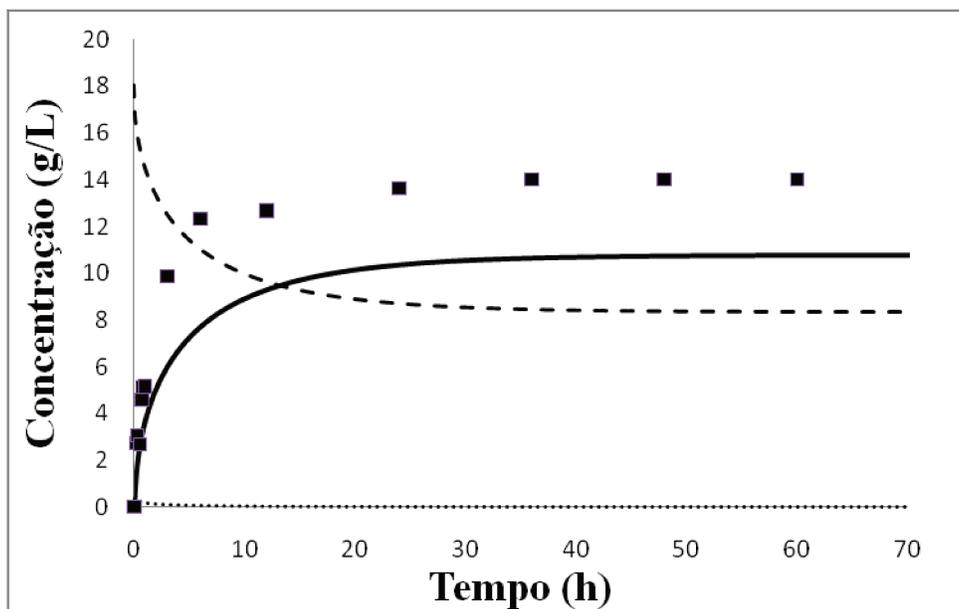
Parâmetro	Valor
* $K_1$	38,97 h <sup>-1</sup>
* $K_2$	17,944 g/(CBU ·h)
* $\lambda$	0,0857 h <sup>-1</sup>
* $K_{eq}$	352,65 g/L
$K_L$	0,033 g/L
* $K_m$	75,34 g/L
* $K_{1G}$	0,323 g/L
$K_{1B}$	23,25 g/L
* $K_{2G}$	3,952 g/L

\* parâmetros re-estimados

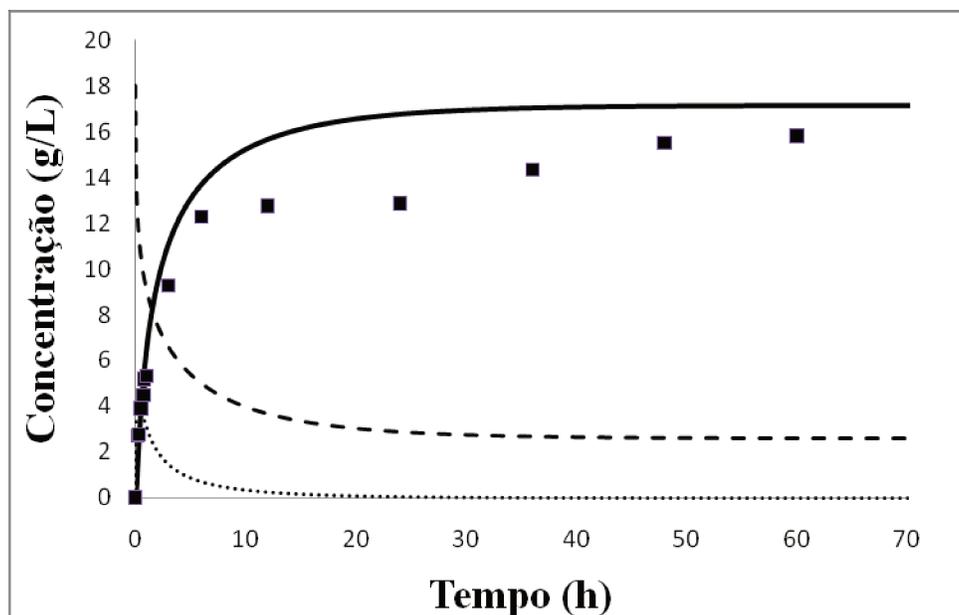
Nas Figuras 4.22 – 4.29 foram apresentados os perfis simulados de celulose, celobiose e glicose para os ensaios 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 e 9, utilizando os parâmetros cinéticos descritos na Tabela 4.12 juntamente com os dados experimentais de glicose.



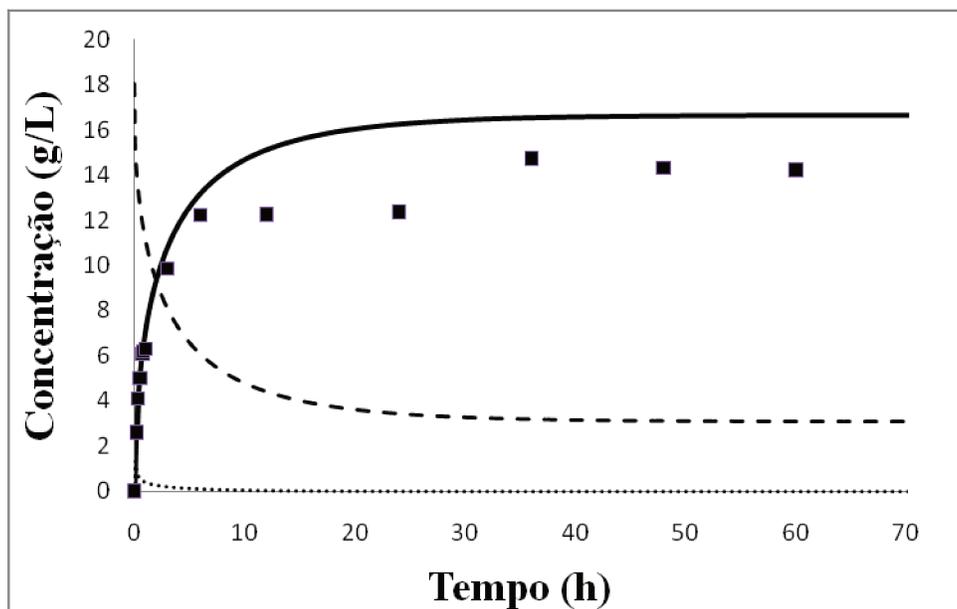
**Figura 4.22:** Dados experimentais e simulados para ensaio 1 (9,595 FPU/g celulose e 12,131 CBU/g celulose). Dados experimentais são para concentração de glicose (■). Curvas simuladas nas concentrações de celobiose (.....), celulose (- - -) e glicose (—).



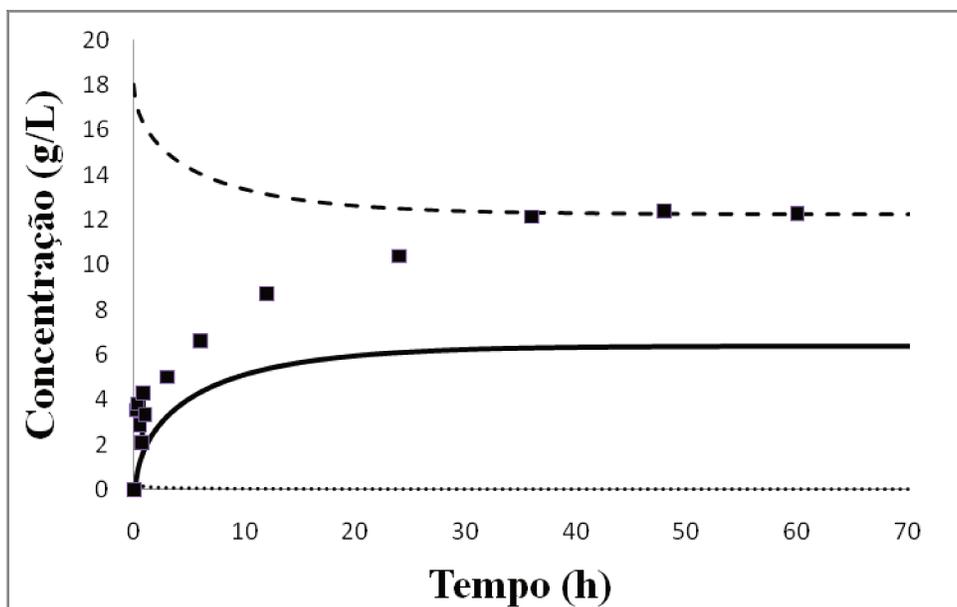
**Figura 4.23:** Dados experimentais e simulados para ensaio 2 (9,595 FPU/g celulose e 70,582 CBU/g celulose). Dados experimentais são para concentração de glicose (■). Curvas simuladas nas concentrações de celobiose (.....), celulose (- - -) e glicose (—).



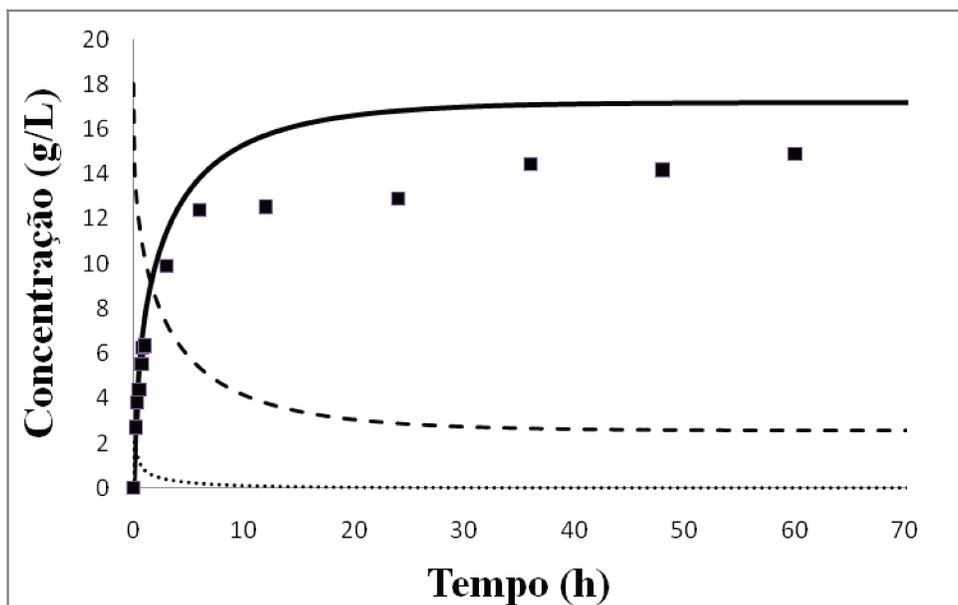
**Figura 4.24:** Dados experimentais e simulados para ensaio 3 (42,735 FPU/g celulose e 12,131 CBU/g celulose). Dados experimentais são para concentração de glicose (■). Curvas simuladas nas concentrações de celobiose (.....), celulose (- - -) e glicose (—).



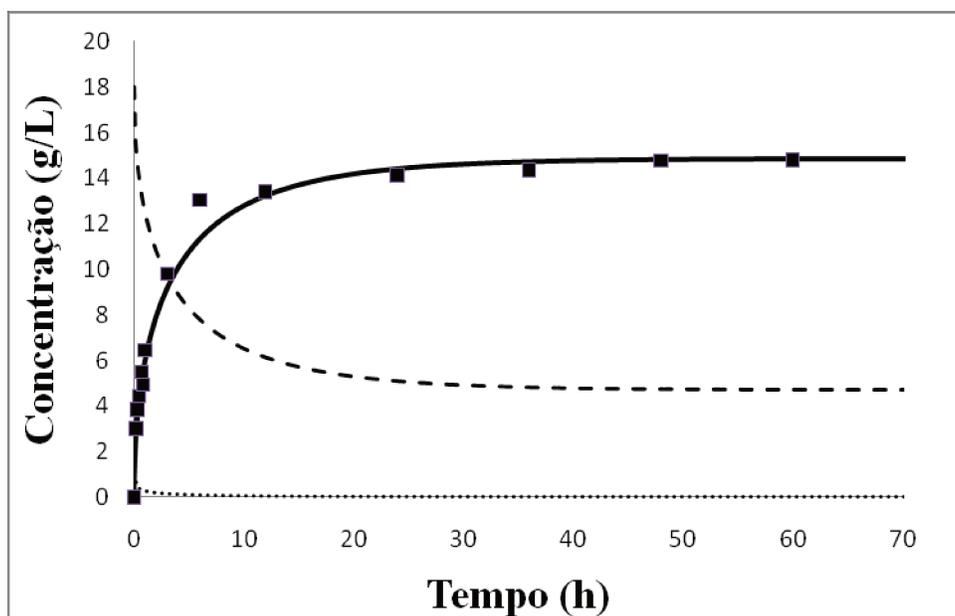
**Figura 4.25:** Dados experimentais e simulados para ensaio 4 (42,735 FPU/g celulose e 70,582 CBU/g celulose). Dados experimentais são para concentração de glicose (■). Curvas simuladas nas concentrações de celobiose (.....), celulose (---) e glicose (—).



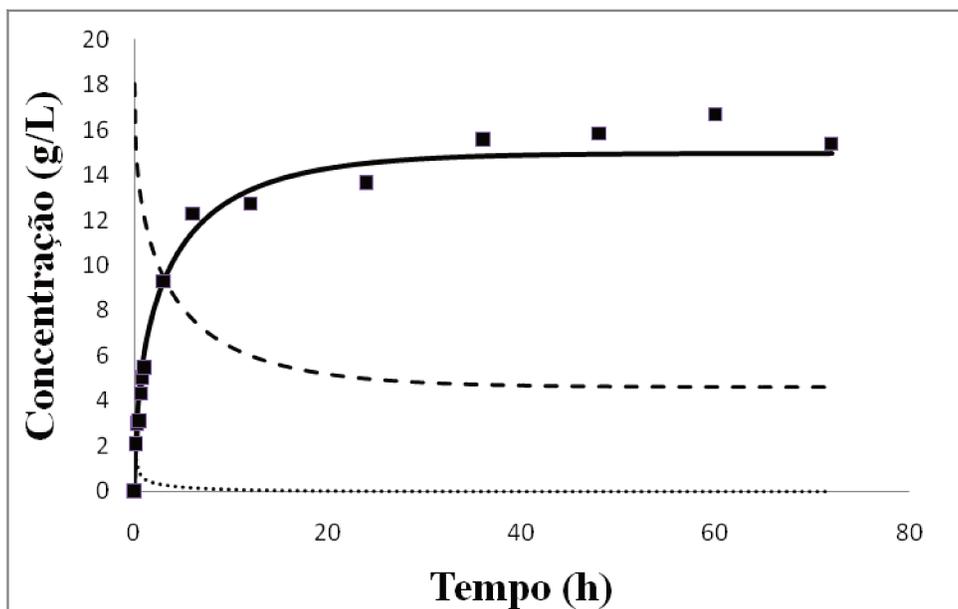
**Figura 4.26:** Dados experimentais e simulados para ensaio 5 (2,757 FPU/g celulose e 41,356 CBU/g celulose). Dados experimentais são para concentração de glicose (■). Curvas simuladas nas concentrações de celobiose (.....), celulose (---) e glicose (—).



**Figura 4.27:** Dados experimentais e simulados para ensaio 6 (49,628 FPU/g celulose e 41,356 CBU/g celulose). Dados experimentais são para concentração de glicose (■). Curvas simuladas nas concentrações de celobiose (.....), celulose (---) e glicose (—).



**Figura 4.28:** Dados experimentais e simulados para ensaio 8 (26,192 FPU/g celulose e 82,713 CBU/g celulose). Dados experimentais são para concentração de glicose (■). Curvas simuladas nas concentrações de celobiose (.....), celulose (---) e glicose (—).



**Figura 4.29:** Dados experimentais e simulados para ensaio 9 (26,192 FPU/g celulose e 41,356 CBU/g celulose). Dados experimentais são para concentração de glicose (■). Curvas simuladas nas concentrações de celobiose (.....), celulose (- - -) e glicose (—).

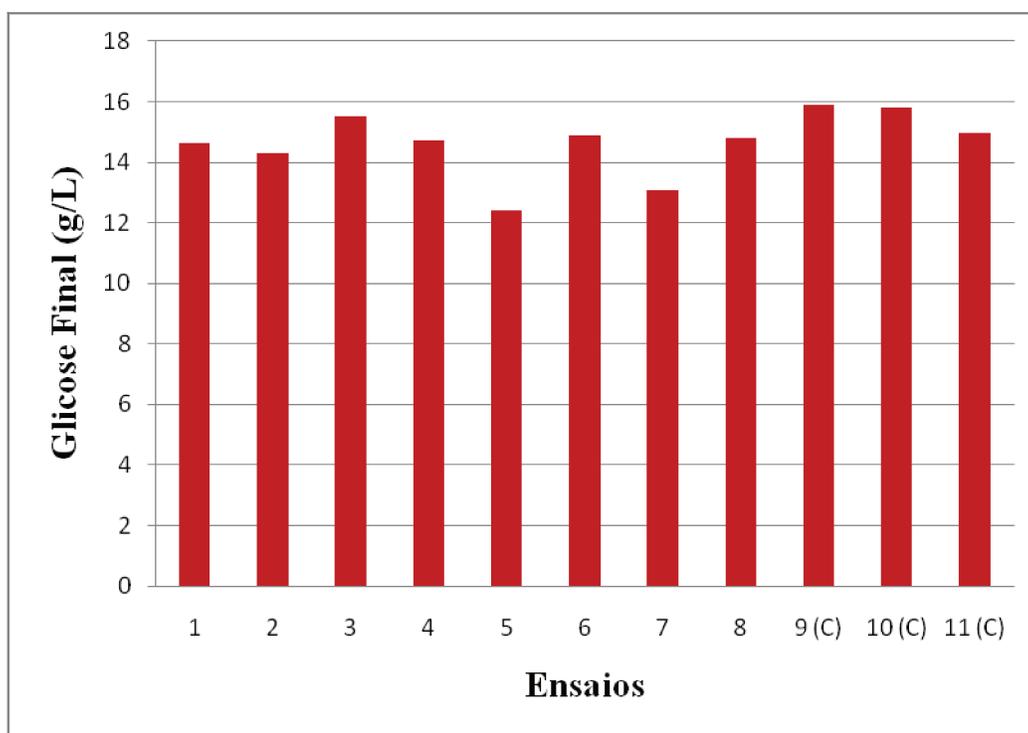
Nas Figuras 4.22 e 4.23, onde a concentração de enzima celulase (9,595 FPU/g celulose) usada nos experimentos e na simulação do modelo foi menor que a concentração usada no ponto central (26,192 FPU/g celulose), pode-se observar que os dados simulados apresentaram perfis de glicose mais baixos se comparados com os ensaios experimentais. Esse comportamento se intensifica quando comparamos o perfil de glicose simulado com o experimental na Figura 4.26, que possui uma concentração de enzima (2,757 FPU/g celulose) em torno de 9 vezes menor que a concentração utilizada nos ensaios 1 e 2 (Figuras 4.22 e 4.23).

Nas Figuras 4.24, 4.25 e 4.27, onde a concentração de enzima celulase (42,735 FPU/g celulose para as Figuras 4.24 e 4.25 e 49,628 FPU/g celulose para a Figura 4.27) usada nos experimentos e na simulação do modelo foi maior que a concentração usada no ponto central (26,192 FPU/g celulose), observou-se que os dados simulados apresentaram perfis de glicose um pouco mais altos que os valores experimentais.

Para os ensaios 8 e 9, nos quais a concentração de enzima celulase (26,192 FPU/g celulose) era a mesma utilizada no ponto central observou-se que o modelo foi capaz de descrever os dados experimentais em ambos os ensaios, como apresentado nas Figuras 4.28 e 4.29.

Na Figura 4.30 temos os valores experimentais de glicose produzida após 72 horas de hidrólise de bagaço de cana pré-tratado com hidróxido de cálcio. Os valores experimentais de glicose foram obtidos a partir de um planejamento  $2^2$  + configuração estrela com repetição no ponto central.

Ao se analisar os 11 valores experimentais de glicose no planejamento  $2^2$  + configuração estrela mostrado na Figura 4.30, pode-se notar que há pouca variação na concentração de glicose produzida entre os ensaios 1 – 11. Essa análise preliminar mostra-nos que há indícios de que as concentrações das enzimas celulase e  $\beta$ -glicosidade apresentaram pouca influência na concentração de glicose para os dados de hidrólise de bagaço de cana pré-tratado com hidróxido de cálcio com variação na carga enzimática.



**Figura 4.30:** Dados experimentais para concentração de glicose ao final da hidrólise enzimática (72 horas de reação) para bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio.

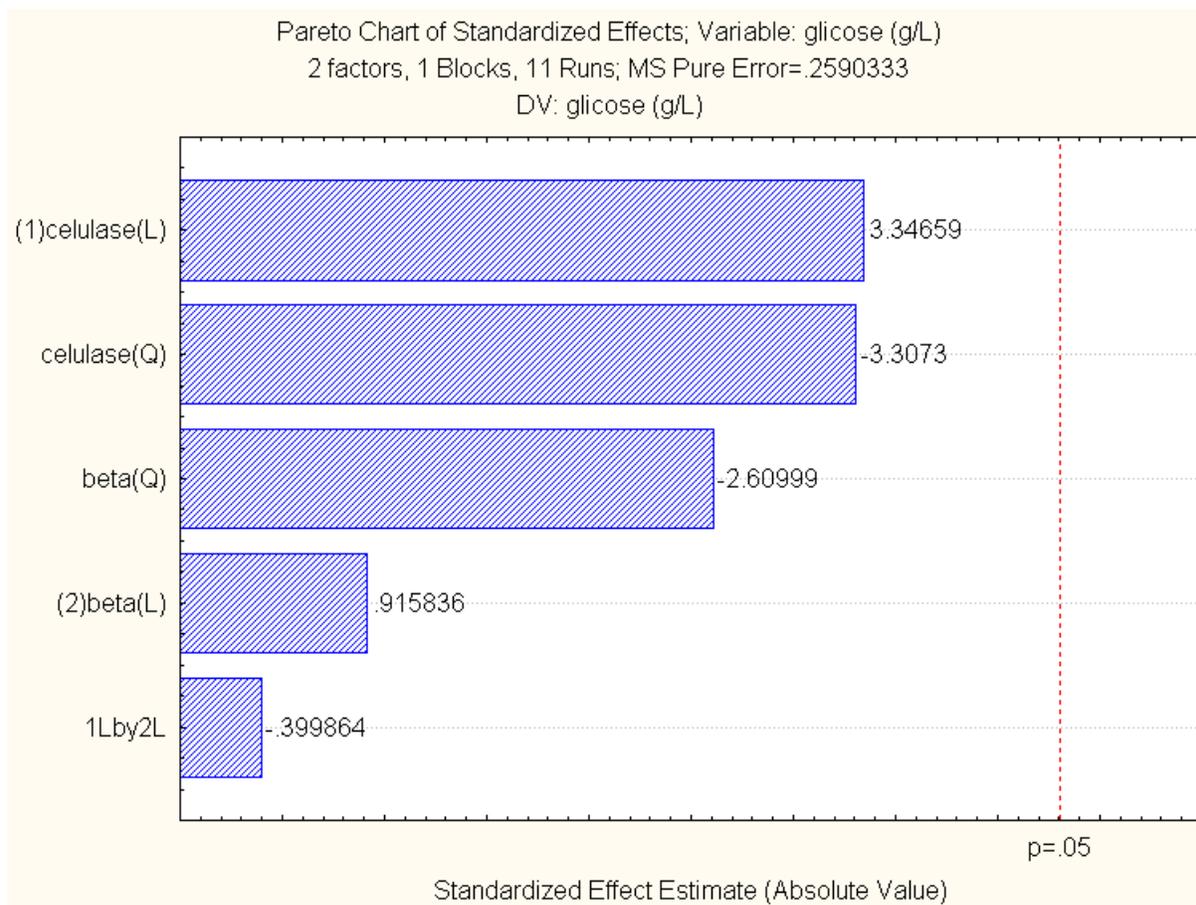
Para verificar a relação entre a concentração de glicose produzida ao final da hidrólise (72 horas) e as demais variáveis do processo (concentração de celulase e  $\beta$ -glicosidase), foram

realizadas análises estatísticas utilizando o software STATISTICA 7.0. A Figura 4.31 apresenta o Gráfico Pareto dos efeitos padronizados das concentrações de celulase e  $\beta$ -glicosidase para a concentração de glicose final.

A análise dos efeitos principais e de interação das variáveis foi realizada considerando o erro puro. Para dizer se a variável é significativa ou não, foi utilizado o parâmetro estatístico  $p$ . O nível de confiança para essas análises foi de 95,0%, o que corresponde a um valor de  $p < 0,05$ .

No Gráfico Pareto (Figura 4.31) é possível visualizar os efeitos dos parâmetros operacionais e de suas interações sobre a concentração final de glicose. Através da Figura 4.31 pode-se observar que tanto a concentração de celulase como a de  $\beta$ -glicosidase não exercem influências significativas sobre a concentração final de glicose.

A não influência das enzimas na concentração de glicose para a hidrólise de bagaço de cana pré-tratado com hidróxido de cálcio justifica a dificuldade que o modelo teve de representar de maneira satisfatória os dados experimentais, principalmente nos ensaios em que se utilizou pequenas cargas enzimática (ensaio 5). No modelo desenvolvido as únicas variáveis que eram alteradas durante o procedimento de estimação de parâmetros e simulação foram as atividades enzimáticas, pois a concentração inicial de lignina e celulose foram mantidas constantes quando se trabalhou com dados provenientes de um mesmo pré-tratamento.



**Figura 4.31:** Gráfico Pareto dos efeitos padronizados das concentrações de celulase e  $\beta$ -glicosidase para a concentração de glicose final.

## CAPÍTULO 5

### CONCLUSÕES

Neste trabalho, o processo de hidrólise enzimática em batelada agitada do bagaço de cana-de-açúcar foi modelado adaptando um modelo cinético desenvolvido inicialmente para o processo de fermentação e sacarificação simultâneos proposto nos trabalhos de PHILIPPIDIS *et al.* (1992, 1993) e PHILIPPIDIS e HATZIS (1997). O modelo adaptado considera a hidrólise do bagaço de cana à glicose como sendo um sistema de duas reações, onde não é considerada a conversão direta da biomassa à glicose. O modelo inclui ainda vários fatores, como inibição por produto final (celobiose e glicose), equilíbrio de adsorção-dessorção da enzima celulase sobre o substrato e adsorção irreversível da enzima  $\beta$ -glicosidase à lignina. A simulação do modelo foi desenvolvida em linguagem FORTRAN. Foram realizadas as simulações do processo, e também a análise do comportamento dinâmico dos efeitos dos parâmetros no modelo, através da técnica de planejamento Plackett-Burman para identificação da influência dos parâmetros sobre o processo desenvolvido, podendo assim, facilitar o procedimento de re-estimação de parâmetros e, conseqüentemente, diminuir a complexidade do sistema.

A metodologia de estimação de parâmetros usando algoritmo genético (método estocástico) foi capaz de prever de forma satisfatória o conjunto de dados experimentais de glicose com variação nas concentrações de enzimas celulase e  $\beta$ -glicosidase no bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino.

A análise de sensibilidade Plackett-Burman permitiu reduzir o número de parâmetros a serem re-estimados de 9 para 7 na etapa de atualização do modelo frente a novas condições de pré-tratamento. A tarefa de identificação dos parâmetros mais significativos mostrou-se difícil pois no caso de estudo o efeito dos parâmetros nas respostas do processo variavam durante o tempo de hidrólise. Houve situações em que alguns parâmetros manifestaram influência apenas no início da hidrólise enquanto que outros no final.

Na etapa de re-estimação de parâmetros foram considerados dados experimentais de glicose para bagaço pré-tratado com ácido fosfórico + hidróxido de sódio e bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio (cal). Para o bagaço pré-tratado com ácido fosfórico + hidróxido de sódio o modelo atualizado conseguiu reproduzir de forma acurada tanto o conjunto de dados utilizados no procedimento de estimação de parâmetros como os usados na validação do modelo. Já para os dados de bagaço pré-tratado com cal o modelo não conseguiu reproduzir de forma satisfatória alguns dados experimentais. A falta de ajuste para esses dados se justificou pois as concentrações de celulase e  $\beta$ -glicosidase não exerceram influência significativa sobre a concentração de glicose experimental como foi constado pelo gráfico de Pareto apresentado na seção 4.5.

## SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Como sugestão para trabalhos futuros, com base nos resultados aqui apresentados, tem-se:

- Realização de experimentos para determinar os parâmetros cinéticos do modelo desenvolvido neste trabalho comparando estes resultados com os obtidos pela otimização por algoritmos genéticos;
- Determinação da adsorção enzimática ao longo do processo de hidrólise, podendo ser utilizadas isotermas de Langmuir;
- Estudos relacionados à desativação do complexo enzimático;
- Determinação do índice de cristalinidade da biomassa ao longo do processo de hidrólise enzimática visando encontrar uma relação entre o índice de cristalinidade e a digestibilidade da biomassa durante a etapa de hidrólise,
- Utilização de redes neurais para descrição da cinética de hidrólise enzimática,
- Determinação de um modelo fenomenológico que leve em conta as sugestões descritas anteriormente;
- Uso de redes neurais e/ou modelo fenomenológico para determinação de um perfil ótimo de alimentação de substrato durante operação de um reator em batelada alimentada através da solução de um problema de controle ótimo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDI, N., HAMADACHE, F., BELHOCINE, D., et al. Enzymatic saccharification of solid residue of olive mill in a batch reactor. *Biochem Eng J.*, 6: 177–183, 2000.

ADNEY, B., BAKER, J. Measurement of cellulase activities. *Chemical analysis and testing task – laboratory analytical procedure*. LAP-006, National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO, USA, 1996.

ADSUL, M. G., GHULE, J. E., SHAIKH, H., SINGH, K. B. GOKHALE, D. V. Enzymatic hydrolysis of delignified bagasse polysaccharides. *Carbohydrate Polymer*, 62: 6-10, 2005.

AHRING, B. K., JENSEN, K., NIELSEN, P., BJERRE, A. B., SCHMIDT, A. S. Pretreatment of wheat straw and conversion of xylose and xylan to ethanol by thermophilic anaerobic bacteria. *Bioresource Technol*, 58: 107-113, 1996.

ALIZADEH, H., TEYMOURI, F., GILBERT, T. I., DALE, B. E. Pretreatment of switchgrass by ammonia fiber explosion (AFEX). *Appl. Biochem. Biotechnol*, 124: 1133-1141, 2005.

AL-ZUHAIR, S. The effect of crystallinity of cellulose on the rate of reducing sugars production by heterogeneous enzymatic hydrolysis. *Bioresource Technol.*, 99: 4078–4085, 2008.

ANACKER, L. W., KOPELMAN, R. Steady-state chemical kinetics on fractals: segregation of reactants. *Phys. Rev. Lett.*, 58: 289–291, 1987.

ANDERSEN, NATALIJA. *Enzymatic Hydrolysis of Cellulose - Experimental and Modeling Studies*. BioCentrum-DTU, Technical University of Denmark, Denmark, 2007. Tese (Doutorado).

ANDRADE, RAFAEL RAMOS DE. *Procedimento para o Desenvolvimento de Modelo Matemático Robusto para o Processo de Fermentação Alcoólica*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2007. Dissertação (Mestrado).

ANDRADE, R. R., RIVERA, E. A. C., ATALA, D. I. P., MACIEL FILHO, R., MAUGERI FILHO, F., COSTA, A. C. Study of kinetic parameters in a mechanistic model for bioethanol

production through a screening technique and optimization. *Bioprocess Biosyst. Eng*, 32: 673-680, 2009.

ASENJO, J. A. Maximizing the formation of glucose in the enzymatic hydrolysis of insoluble cellulose. *Biotechnol. Bioeng*, 25: 3185–3190, 1983.

ASENJO, J. A. Modeling the bioconversion of cellulose into microbial products: rate limitations. *Process Biochem*, 19: 217–224, 1984.

AZZAM, A. M. Pretreatment of cane bagasse with alkaline hydrogen peroxide for enzymatic hydrolysis of cellulose and ethanol fermentation. *J. Environ. Sci. Hea*, 24: 421-433, 1989.

BALLESTEROS, I., OLIVA, J. M., NAVARRO, A. A., GONZALEZ, A., CARRASCO, J., BALLESTEROS, M. Effect of chip size on steam explosion pretreatment of softwood. *Appl. Biochem. Biotechnol*, 84: 97-110, 2000.

BANSAL, P., HALL, M., REALFF, M. J., LEE, J. H., BOMMARIUS, A. S. Research review paper: Modeling cellulase kinetics on lignocellulosic substrates. *Biotechnol. Advances*, 27: 833–848, 2009.

BARR, B. K., HSIEH, Y-L, GANEM, B., WILSON, D. B. Identification of two functionally distinct classes of exocellulases. *Biochem.*, 35:586-592, 1996.

BARROS NETO, B., SCARMINIO, I. S., BRUNS, R. E. “Como Fazer Experimentos: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria”, Editora da Unicamp, Campinas, SP, Brasil, 2001.

BELTRAME, P. L., CARNITI, P., FOCHER, B., MARZETTI, A., SARTO, V. Enzymatic hydrolysis of cellulosic materials: a kinetic study. *Biotechnol. Bioeng.*, 26: 1233–1238, 1984.

BHAT, M. K., BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. *Biotechnol. Adv*, 15: 583-620, 1997

BENITEZ, F. J., BELTRANHEREDIA, J., TORREGROSA, J., ACERO, J. L. Improvement of the anaerobic biodegradation of olive mill wastewaters by prior ozonation pretreatment. *Bioprocess Eng*, 17: 169-175, 1997.

BERCI, CÉSAR DALTOÉ. *Observadores Inteligentes de Estado: Propostas*. Campinas: Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação, Universidade Estadual de Campinas, 2008. Dissertação (Mestrado).

BERLIN, A., MAXIMENKO, V., GILKES, N., SADDLER, J. Optimization of enzyme complexes for lignocellulose hydrolysis. *Biotechnol. Bioeng*, 97: 287–296, 2007.

BEZ, EDSON TADEU. *Procedimento de representação de soluções em otimização global: aplicação em modelos de iteração espacial*. Florianópolis: Programa de Pós-graduação em Engenharia de Produção, Universidade Federal de Santa Catarina, 2005. Tese (Doutorado).

BEZERRA, R. M, F., DIAS, A. A. Discrimination among eight modified Michaelis–Menten kinetics models of cellulose hydrolysis with a large range of substrate/enzyme ratios. *Appl. Biochem. Biotech.*, 112:173–184, 2004.

BEZERRA, R. M, F., DIAS, A. A. Enzymatic kinetic of cellulose hydrolysis. *Appl. Environ. Microb*, 126:49–59, 2005.

BIANCHI, MARIA LUCIA. *Polpação de palha de milho utilizando-se diferentes processos organosolv*. Campinas: Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, 1995. Dissertação (Mestrado).

BNDES – BANCO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO E SOCIAL; CGEE – CENTRO DE GESTÃO E ESTUDOS ESTRATÉGICOS. Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável. Rio de Janeiro: BNDES, 2008. 316 p.

BISARIA, V. S. (1991). Bioprocessing of agro-residues to glucose and chemicals. *In: Bioconversion of waste materials to industrial products*, ed. A. M. Martin, 210 – 213. London: Elsevier.

BJERRE, A. B., OLESEN, A. B., FERNQVIST, T. Pretreatment of wheat straw using combined wet oxidation and alkaline hydrolysis resulting in convertible cellulose and hemicellulose. *Biotechnol. Bioeng*, 49: 568–577, 1996.

BOBLETER, O. Hydrothermal degradation of polymers derived from plants. *Prog. Polym. Sci*, 19: 797–841, 1994.

BOISSET, C., FRASCHINI, C., SCHULEIN, M., HENRISSAT, B., CHANZY, H. Imaging the enzymatic digestion of bacterial cellulose ribbons reveals endo character of the cellobiohydrolase Cel6A from *Hemicella insolens* and its mode of synergy with cellobiohydrolase Cel7A. *Appl. Environ. Microbio.*, 66:1444-1452, 2000.

BOUSSAID, A., e SADDLER, J. N. Adsorption and activity profiles of cellulases during the hydrolysis of two Douglas fir pulps. *Enzyme Microb. Technol*, 24:138–143, 1999.

BROWN, R. F., HOLTZAPPLE, M. T. A comparison of the Michaelis–Menten and HCH-1 models. *Biotechnol. Bioeng.*, 36: 1151–1154, 1990.

BRUN, A. L. *Algoritmos Genéticos*. Apostila EPAC – Encontro Paranaense de Computação, 2004.

BRUNS, R. E.; BARROS NETO, B.; SCARMINO, I. S. Como fazer experimentos. 2.ed. **Editora da Unicamp**. Campinas, 2003. 401 p.

CAMINAL, G., LÓPEZ-SANTÍN, J., SOLÀ C. Kinetic modeling of the enzymatic hydrolysis of pretreated cellulose. *Biotechnol. Bioeng*, 27: 1282–1290, 1985.

CANEVASCINI, G., GATTEN, C. A. A comparative investigation of various cellulase assay procedures. *Biotechnol. Bioengng.*, 23:1573-1590, 1981.

CANILHA, L., MILAGRES, A. M. F., SILVA, S. S., SILVA, J. B. A., FELIPE, M. F. A., ROCHA, G. J. M., FERRAZ, A., CARVALHO. W. Sacarificação da biomassa lignocelulósica através de pré-hidrólise ácida seguida por hidólise enzimática: Uma estratégia de “desconstrução” da fibra vegetal. *Revista Analytica*, 44: 48-54, 2010.

CANTÚ-PAZ, E. *A Summary of Research on Parallel Genetic Algorithms*. IlliGal Report No. 95007, July 1995.

CARDOSO, VANESSA MIGUEL. *Aplicação da radiação de feixe de elétrons como pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar para hidrólise enzimática da celulose*. São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, 2008. Dissertação (Mestrado).

CARRASCO, J. E., SAIZ, M. C., NAVARRO, A., SORIANO, P., SAEZ, F., MARTINEZ, J. M. Effects of dilute-acid and steam explosion pretreatments on the cellulose structure and kinetics of cellulosic fraction hydrolysis by dilute acids in lignocellulosic materials. *Appl. Biochem. Biotechnol*, 45: 23-34, 1994.

CARRILLO, F., LIS, M. J., COLOM, X., et al. Effect of alkali pretreatment on cellulase hydrolysis of wheat straw: Kinetic study. *Process Biochem*, 40: 3360–3364, 2005.

CASTRO, A. M., PEREIRA, N. J. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. *Quim. Nova*, 33: 181-188, 2010.

CASTRO, RODRIGO EVANGELISTA. *Otimização de estruturas, com multiobjetivos via algoritmo genético de pareto*. Rio de Janeiro: Coordenação dos Programas de Pós Graduação de Engenharia - COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2001. Tese (Doutorado)

CAVACO-PAULO, ARTUR. *Influência da agitação mecânica e da composição enzimática no tratamento do algodão com celulases*. Escola de engenharia, Universidade do Minho, 1995. Tese de doutorado

CHANG, V. S., BURR, B., HOLTZAPPLE, M. T. Lime pretreatment of switchgrass. *Applied biochemistry and biotechnology*, 63-65:3-19, 1997.

CHANG, V. S., NAGWANI, M., HOLTZAPPLE, M. T. Lime pretreatment of crop residues bagasse and wheat straw. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 74: 135–159, 1998.

CHANG, V., HOLTZAPPLE, M. Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity. *Appl Biochem Biotechnol*, 84/86: 5–37, 2000.

CHANG, V. S., NAGWANI, M., KIM, C. H., HOLTZAPPLE, M. T. Oxidative lime pretreatment of high-lignin biomass. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 94:1–28, 2001.

CHARBONNEAU, P., & KNAPP, B. A User's Guide to PIKAIA 1.0, NCAR Technical Note 418+IA (Boulder: National Center for Atmospheric Research), 1996.

CHERNOGLAZOV, V. M., ERMOLOVA, O. V., KLYOSOV, A. A. Adsorption of high-purity endo-1,4- $\beta$ -glucanases from *Trichoderma reesei* on components of lignocellulosic materials: cellulose, lignin, and xylan. *Enzyme Microb. Technol.*, 10:503–507, 1988.

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

CONVERSE, A. O., MATSUNO, R., TANAKA, M., TANIGUCHI, M. A model of enzyme adsorption and hydrolysis of microcrystalline cellulose with slow deactivation of the adsorbed enzyme. *Biotechnol. Bioeng.*, 32: 38–45, 1988.

CONVERSE, A. O., OOSHIMA, H., BURNS, D. S. Kinetics of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials based on surface area of cellulose accessible to enzyme and enzyme adsorption on lignin and cellulose. *Appl. Biochem. Biotech.*, 24/25: 67–73, 1990.

CONVERSE, A. O., OPTEKAR, J. D. A synergistic kinetics model for enzymatic cellulose hydrolysis compared to degree-of-synergism experimental results. *Biotechnol. Bioeng.*, 42: 145–148, 1993.

DAVIES, G., HENRISSAT, B. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*, 3: 853-859, 1995.

DEJAEGHER, B., DURAND, A., VANDER HEYDEN, Y. Identification of significant effects from an experimental screening design in the absence of effect sparsity. *Journal of Chromatography B*, 877: 2252–2261. 2009.

DHOUB, A., ELLOUZ, M., ALOUI, F., SAVADI, S. Effect of bioaugmentation of activated sludge with white-rot fungi on olive mill wastewater detoxification. *Lett. Appl. Microbiol.*, 42: 405-411, 2006.

DING, H., XU, F. Productive cellulase adsorption on cellulose. *A. C. S. symser*, 889: 154–169, 2004.

DIPARDO, J. Outlook for Biomass Ethanol Production and Demand. Energy Information Administration/DOE, Washington, DC, 2000.

DIVNE, C., STAHLBERG, J., REINIKAINEN, T., RUOHONEN, L., PETTERSSON, G., KNOWLES, J. K. C., TEERI, T. T., JONES, T. A. The 3-dimensional crystal-structure of the catalytic core of cellobiohydrolase-I from *Trichoderma reesei*. *Science*, 265:524-528, 1994.

DIVNE, C., STÅHLBERG, J., TEERI, T. T., JONES, T. A. High-resolution crystal structures reveal how a cellulose chain is bound in the 50 Å long tunnel of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. *J Mol Biol*, 275:309–325, 1998.

DRISSEN, R. E. T., MAAS, R. H. W., MAAREL, M. J. E. C. V. D., KABEL, M. A., SCHOLS, H. A., TRAMPER, J. A generic model for glucose production from various cellulose sources by a commercial cellulase complex. *Biocatal. Biotransfor.*, 25: 419–429, 2007.

DUFF, S. J. B., MURRAY, W. D. Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: a review. *Bioresource Technology*, 55:33, 1996.

DWIVEDI, C. P., GHOSE, T. K. A model on hydrolysis of bagasse cellulose by enzyme from *Trichoderma reesei* QM 9414. *J. Ferment. Technol.*, 57: 15-24, 1979.

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

EKLUND, R., GALBE, M., ZACCHI, G. The influence of SO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> impregnation of willow prior to steam pretreatment. *Bioresource Technol*, 52: 225-229, 1995.

EMMEL, A., MATHIAS, A. L., WYPYCH, F., RAMOS, L. P. Fractionation of Eucalyptus grandis chips by dilute acid- catalysed steam explosion. *Bioresource Technol*, 86, 105-115, 2003.

ESKICIOGLU, C., TERZIAN, N., KENNEDY, K. J., DROSTE, R. L., HAMODA, M. Athermal microwave effects for enhancing digestibility of waste activated sludge. *Water Res*, 41, 2457-2466, 2007.

FAIX, O., GRUNWALD, C. BEINHOFF, O. Determination of phenolic hydroxyl group content of milled wood lignin (MWLs) from different botanical origins using selective aminolysis, FTIR, H-NMR, and UV spectroscopy. *Holzforschung*, 46:425 - 432, 1992.

FAN, L. T., LEE, Y. H, GHARPURAY, M. M. The nature of lignocellulosics and their pretreatments for enzymatic hydrolysis. *Adv. Biochem. Eng.*, 23:157-187, 1982.

FAN, L. T., GHARPURAY, M. M., LEE, Y. H. Design and economics evaluation of cellulose hydrolysis processes. *In: Cellulose hydrolysis Biotechnology Monographs*, 57, 149-187. New York: Springer-Verlag, 1987.

FAN, L. T., LEE, Y. H. Kinetic studies of enzymatic hydrolysis of insoluble cellulose: derivation of a mechanistic kinetic model. *Biotechnol. Bioeng*, 25:2707–2733, 1983.

FANG, J. M., SUN, R. C., SALISBURY, D., *et al.* Comparative study of hemicelluloses from wheat straw by alkali and hydrogen peroxide extractions. *Polymer Degradation and Stability*, 66:423–432, 1999.

FENGEL, D., WEGENER, G. *Wood chemistry, ultrastructure, reactions*. Berlin: Walter de Gruyter & CO, 613p., 1989.

FERNANDES, A. M. da R.; JR, I. C. *Algoritmos Genéticos*. *In: Inteligência Artificial – noções gerais*. [S.l.]: Visual Book, 116 - 127 p, 2003.

FERNANDEZ, N., MORCK, R., JOHNSRUD, S. C., KRINGSTAD, K. P. Carbon-13 NMR study on lignin from bagasse. *Holzforschung*, 44:35 - 38, 1990.

FOSTER, B. L., DALE, B. E., DORAN-PETERSON, J. B. Enzymatic hydrolysis of ammonia-treated sugar beet pulp. *Appl Biochem Biotechnol*, 91/93: 269–282, 2001.

FUENTES, L. L. G., RABELO, S. C., MACIEL FILHO, R., COSTA, A. C. Kinetics of lime pretreatment of sugarcane bagasse to enhance enzymatic hydrolysis. *Appl Biochem Biotechnol*, 163: 612-625, 2011.

FUENTES, LAURA LILIANA GARZÓN. *Determinação de dados cinéticos da deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar e da hidrólise enzimática no pré-tratamento com hidróxido de cálcio*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2009. Dissertação (Mestrado).

GAMA, FRANCISCO MIGUEL PORTELA. *Mecanismo bioquímico da acção de celulases de Trichoderma reesei*. Escola de Engenharia, Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, 1996. Tese (Doutorado).

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

GARCIA, DANIELA DOS REIS. *Determinação de dados cinéticos do pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar com peróxido de hidrogênio alcalino e da hidrólise enzimática posterior*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2009. Dissertação (Mestrado).

GARROTE, G., DOMINGUEZ, H., PARAJO, J. C. Hydrothermal processing of lignocellulosic materials. *Holz Als Roh-und Werkst*, 57: 191-202, 1999.

GHARPURAY, M. M., LEE, Y. H., FAN, L. T. Structuralmodification of lignocellulosics by pretreatments to enhance enzymatic hydrolysis. *Biotechnol. Bioeng*, 25:157–72, 1983.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulose activities. *Pure and Applied Chemistry*, 59: 257-268, 1987.

GLASSER, W. G., KELLY, S. S. *Encyclopedia of Polymer Science and Engeneering*. New York, Jonh Wiley & Sons, Inc. Lignin. p.796-849, 1987.

GOEL, R., TOKUTOMI, T., YASUI, H. Anaerobic digestion of excess activated sludge with ozone pretreatment. *Water Sci. Technol*, 47, 207-214, 2003a.

GOEL, R., TOKUTOMI, T., YASUI, H., NOIKE, T. Optimal process configuration for anaerobic digestion with ozonation. *Water Sci. Technol*, 48: 85-96, 2003b.

GOLDBERG, D. E. *Genetic Algorithms in Search, Optimization and Machine Learning*. New York: Addison Wesley Longman, 1989.

GOULD, J. M. Studies on the mechanism of alkaline peroxide delignification of agricultural residues. *Biotechnology and Bioengineering*, 27(3):225-231, 1985.

GRABBER, J. H. How do lignin composition, structure, and cross-linking affect degradability? A review of cell wall model studies. *Crop Sci.* 45: 820–831, 2005.

GREGG, D.J.; BOUSSAID, A.; SADDLER, J.N. Technoeconomic evaluations of a generic wood-to-ethanol process: Process effect of increased cellulose yields and enzyme recycle. *Bioresourc. Technol.*, 63, 7-12, 1998.

GRUNO, M., VALJAMAE, P., PETTERSEN, G., JOHANSSON, G. Inhibition of the *Trichoderma reesei* cellulases by cellobiose is strongly dependent on the nature of the substrate. *Biotechnol. Bioeng.*, 86:503- 511, 2004

GUSAKOV, A. V., SINITSYN, A. P. KLYOSOV, A. A. Kinetics of the enzymatic hydrolysis of cellulose: 1. A mathematical model for a batch reactor process. *Enzyme Microb. Technol.*, 7: 346–352, 1985.

GUSAKOV, A. V., SINITSYN, A. P. A theoretical analysis of cellulase product inhibition: effect of cellulase binding constant, enzyme/substrate ratio, and  $\beta$ -glucosidase activity on the inhibition pattern. *Biotechnol. Bioeng.*, 40:663-671, 1992.

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

HAN, Y., CHEN, H. Characterization of  $\beta$ -glucosidase from corn stover and its application in simultaneous saccharification and fermentation. *Bioresour. Tech*, 99: 6081-6087, 2008.

HARRIS, J. F., BAKER, A. J., CONNER, A. H., JEFFRIES, T. W., MINOR, J. L., PATTERSON, R. C., SCOTT, R. W., SPRINGER, E. L., ZORBA, J. *Two-Stage Dilute Sulfuric*

*Acid Hydrolysis of Wood: An Investigation of Fundamentals*. General Technical Report FPL-45, U.S. Forest Products Laboratory, Madison, Wisconsin, 1985.

HASSUANI, S. J., LEAL, M. R. L. V., MACEDO, I. C. *Biomass power generation: sugar cane bagasse and trash* - Piracicaba: PNUD-CTC, Série Caminhos para Sustentabilidade, 2005.

HENDRIKS, A. T. W. M., ZEEMAN, G. Review: Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Tech*, 100: 10-18, 2009.

HENRIKSSON, H., STAHLBERG, J., ISAKSSON, R., PETTERSSON, G. The active sites of cellulases are involved in chiral recognition: A comparison of cellobiohydrolase I and endoglucanase I. *FEBS Letters*, 390:339-344, 1996.

HENRISSAT, B., DRIGUES, H., VIET, C., SCHULEIN, M. Synergism of cellulases from *Trichoderma reesei* in the degradation of cellulose. *Bio/Technology*, 3:722-726, 1985.

HENRISSAT, B., TEERI, T. T., WARREN, R. A. J. A scheme for designating enzymes that hydrolyze the polysaccharides in the cell walls of plants. *FEBS Lett.*, 425:352-354, 1998.

HOLTZAPPLE, M. T., CARAM, H. S., HUMPHREY, A. E. The HCH-1 model of enzymatic cellulose hydrolysis. *Biotechnol. Bioeng.*, 26: 775-780, 1984.

HOLTZAPPLE, M, COGNATA, M., SHU, Y., HENDRICKSON, C. Inhibition of *Trichoderma reesei* cellulase by sugars and solvents. *Biotechnol. Bioeng*, 36:275-87, 1990.

HOLTZAPPLE, M. T., JUN, J. H., ASHOK, G., PATIBANDLA, S. L., DALE, B. E. The ammonia freeze explosion (AFEX) process – A practical lignocellulose pretreatment. *Appl. Biochem. Biotechnol*, 28: 59-74, 1991.

HON, D. N. S., SHIRAIISHI, N. *Wood and Cellulosic Chemistry*, second ed. Dekker, New York, 2001.

HONG, J., YE, X., ZHANG, Y. H. P. Quantitative determination of cellulose accessibility to cellulase based on adsorption of a nonhydrolytic fusion protein containing CBM and GFP with its applications. *Langmuir*, 23: 12535-12540, 2007.

HOWELL, J. A. Enzyme deactivation during cellulose hydrolysis. *Biotechnol. Bioeng*, 20: 847–863, 1978.

HOWELL, J. A., STUCK, J. D. Kinetics of solka floc cellulose hydrolysis by *Trichoderma viride* cellulase. *Biotechnol. Bioeng*, 17:873–893, 1975.

HSU, T. Pretreatment of biomass. In: *Handbook on bioethanol production and utilization*. Wyman C.F. (Ed.), Taylor & Francis, Bristol, 179-195, 1996.

HUANG, A. A. Kinetic studies on insoluble cellulose–cellulase system. *Biotechnol Bioeng*, 17:1421–1433, 1975.

HUI, J. P. M., WHITE, T. C., THIBAUT, P. Identification of glycan structure and glycosylation sites in cellobiohydrolase II and endoglucanases I e II from *Trichoderma reesei*. *Glycobiology*, 12: 837-849, 2002.

KAAR, W. E, HOLTZAPPLE, M. T. Using lime pretreatment to facilitate the enzymatic hydrolysis of corn stover. *Biomass and Bioenergy*, 18:189–199, 2000.

KADAM, K. L., RYDHOLM, E. C., MCMILLAN, J. D. Development and validation of a kinetic model for enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass. *Biotechnol. Progr.*, 20: 698–705, 2004.

KARLSSON, J., SIIKA-AHO, M., TENKANEN, M., TJERNELD, F. Enzymatic properties of the low molecular mass endoglucanases Cel12A (EG III) and Cel45A (EG V) of *Trichoderma reesei*. *J. Biotechnol.*, 99:63-78, 2002.

KENNEDY, K. J., THIBAUT, G., DROSTE, R. L. Microwave enhanced digestion of aerobic SBR sludge. *Water SA*, 33: 261-270, 2007.

KIM, D. W., JANG, Y. H., JEONG, Y. K. Adsorption kinetics and behaviour of two cellobiohydrolases from *Trichoderma reesei* on microcrystalline cellulose. *Biotechnol. Appl. Biochem*, 27:97–102, 1998.

KIM, D. W., JEONG, Y. K., JANG, Y. H., LEE, J. K. Purification and characterization of endoglucanase and exoglucanase components from *Trichoderma viride*. *J. Ferment. Bioeng*, 77:363–369, 1994.

KIM, D. W., KIM, T. S., JEONG, Y. K., LEE, J. K. Adsorption kinetics and behaviors of cellulase components on microcrystalline cellulose. *J. Ferment. Bioeng*, 73:461–466, 1992.

KIM, K. H., HONG, J. Supercritical CO<sub>2</sub> pretreatment of lignocellulose enhances enzymatic cellulose hydrolysis. *Bioresource Technol*, 77: 139-144, 2001.

KIM, T H, KIM, J. S., SUNWOO, C., et al. Pretreatment of corn stover by aqueous ammonia. *Bioresour Technol*, 90: 39–47, 2003.

KIM, S., HOLTZAPPLE, M. T. Effect of structural features on enzyme digestibility of corn stover. *Bioresource Technol*, 97:583–591, 2006.

KIM, T. H., LEE, Y. Y. Fractionation of corn stover by hot-water and aqueous ammonia treatment. *Bioresource Technol*, 97: 224-232, 2006.

KIM, J.K., OH, B. R., SHIN, H. J., EOM, C. Y., KIM, S. W. Statistical optimization of enzymatic saccharification and ethanol fermentation using food waste. *Process Biochem*, 43: 1308–1312, 2008.

KLASS, D. L. *Biomass for renewable energy, fuels, and chemicals*. Academic Press, San Diego, 1998.

KLEMAN-LEYER, K. M., SIIKA-AHO, M., TEERI, T. T., KIRK, T. K. The cellulases Endoglucanase I and Cellobiohydrolase II of *Trichoderma reesei* act synergistically to solubilize native cotton cellulose but not to decrease its molecular size. *App. Environ. Microbiol*, 62: 2883-2887, 1996.

KONDAGESKI, JONAS HEITOR. *Calibração de modelo de qualidade da água para rio utilizando algoritmo genético*. Curitiba: Pós-Graduação em Engenharia de Recursos Hídricos e Ambiental, Universidade Federal do Paraná, 2008. Dissertação (Mestrado).

KOPELMAN, R. Rate processes on fractals: theory, simulations and experiments. *J. Stat. Phys.*, 42: 185–200, 1986.

KOPELMAN, R. Fractal reaction kinetics. *Science*, 241:1620–1626, 1988.

KOULLAS, D. P., CHRISTAKOPOULOS, P., KEKOS, D., MACRIS, B. J., KOUKIOS, E. G. Correlating the effect of pretreatment on the enzymatic hydrolysis of straw. *Biotechnol. Bioeng* 39:113–6, 1992.

KRISTENSEN, JAN BACH. *Enzymatic hydrolysis of lignocellulose Substrate interactions and high solids loadings*. Faculty of Life Sciences, University of Copenhagen, Denmark, 2009. Tese (Doutorado).

KUMAKURA, M., KOJIMA, T., KAETSU, I. Pretreatment of lignocellulosic wastes by combination of irradiation and mechanical crushing. *Biomass*, 2: 299-308, 1982.

KURAKAKE, M., SHIRASAWA, T., OOSHIMA, H., CONVERSE, A. O., KATO, J. An extension of the HARANO–OOSHIMA rate expression for enzymatic hydrolysis of cellulose to account for changes in the amount of adsorbed cellulase. *Appl. Biochem. Biotech*, 50:231–241, 1995.

KURAKAKE, M., IDE, N., KOMAKI, T. Biological pretreatment with two bacterial strains for enzymatic hydrolysis of office paper. *Curr Microbiol*, 54: 424-428, 2007.

JERVIS, E. J., HAYNES, C. A., KILBURN, D. G. Surface diffusion of cellulases and their isolated binding domains on cellulose. *J Biol Chem*, 272:24016–24023, 1997.

JØRGENSEN, H., KRISTENSEN, J. B., FELBY, C. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. *Biofuels, Bioprod. Bioref*, 1:119–134, 2007.

JOSEFSSON, T., LENNHOLM, H., GELLERSTEDT, G. Steam explosion of aspen wood. Characterisation of reaction products. *Holzforschung*, 56: 289-297, 2002.

LACERDA, E. G. M.; CARVALHO, A. C. P. L. *Sistemas Inteligentes: Aplicações a Recursos Hídricos e Ciências Ambientais*. 1999. Capítulo: Introdução aos Algoritmos Genéticos.

LAFITTE-TROUQUE, S., FORSTER, C. F. The use of ultrasound and gamma-irradiation as pre-treatments for the anaerobic digestion of waste activated sludge at mesophilic and thermophilic temperatures. *Bioresource Technol*, 84: 113-118, 2002.

LARIOS, G., GILBON, A., HUITRON, C. *Sistema celulolítico extracelular de Aureobasidium sp.* Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM México D.F. Curso de Biotecnología de Enzimas Industriales. 16-19 October, Fundación CIEPE, Venezuela, 1984.

LARSSON, P. T., WICKHOLM, K., IVERSEN, T. A CP/MAS <sup>13</sup>C NMR investigation of molecular ordering in celluloses. *Carbohydr. Res.* 302: 19-25, 1997.

LARSSON, S., PALMQVIST, E., HAHN-HAGERDAL, B., *et al.* The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. *Enzyme Microb. Technol.*, 24:151-159, 1998.

LAUREANO-PEREZ, L., TEYMOURI, F., ALIZADEH, H., DALE, B. E. Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass. *Appl. Biochem. Biotech*, 121–124:1081–99, 2005.

LEE, N. E., e WOODWARD. J. Kinetics of the adsorption of *Trichoderma reesei* C30 cellulase to DEAE-Macrosorb. *J. Biotechnol*, 11:75–82, 1989.

LEE, Y. H., FAN, L. T. Properties and mode of action of cellulase. *Adv. Biochem. Engng.*, 17:131-168, 1980.

LEGRINI, O. E. O, BRAUN, A. M. Photochemical process for water treatment. *Chem. Rev.*, v. 93, p. 671-698, 1993.

LIAO, W., LIU, Y., WEN, Z., FREAR, C., CHEN, S. Kinetic modeling of enzymatic hydrolysis of cellulose in differently pretreated fibers from dairy manure. *Biotechnol. Bioeng.*, 101:441–451, 2008.

LIMA, LORENA MASCARENHAS. *Mineração de Dados Utilizando Algoritmos Genéticos Adaptativos*. Salvador: Instituto de Matemática, Universidade federal da Bahia, 2009. Monografia

LIN, J., LEE, S. M., KOO, Y. M. Modeling and simulation of simultaneous saccharification and fermentation of paper mill sludge to lactic acid. *J. Microbiol. Biotechn.*, 15: 40–47, 2005.

LINEWEAVER, H., BURK, D. The determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc.*, 56: 658–666, 1934.

LIU, C, WYMAN, C.E. Partial flow of compressed-hot water through corn stover to enhance hemicellulose sugar recovery and enzymatic. *Bioresource Technology*, 96: 1978-1985, 2005.

LJUNGGREN, M. Kinetic Analysis and modeling of enzymatic hydrolysis and SSF. 2005. <http://www.chemeng.lth.se/exjobb/061.pdf>.

LLOYD, T.A, WYMAN, C.E. Combined sugar yields for dilute sulfuric acid pretreatment of corn stover followed by enzymatic hydrolysis of the remaining solids. *Bioresour. Tech*, 96: 1967-1977, 2005.

LUO, J., XIA, L., LIN, J., CEN, P. Kinetics of simultaneous saccharification and lactic acid fermentation processes. *Biotechnol. Progr.*,13: 762–767, 1997.

LYND, L. R., ELANDER, R. T., WYMAN, C. E. Likely features and costs of mature biomass ethanol technology. *Appl. Biochem. Biotech*, 57–58: 741–761, 1996.

LYND, L. R., WEIMER, P. J., VAN ZYL, W. H., PRETORIUS, I. S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol. Molec. Biol. Rev.*, 66: 506-577, 2002.

MACEDO, I. C., NOGUEIRA, L. A. H. *Cadernos do Núcleo de Assuntos Estratégicos*. 2005. Seção 2: Avaliação da Expansão da Produção de Etanol no Brasil, p.141.

MAGUIRE, R. J. Kinetics of the hydrolysis of cellulose by  $\beta$ -1,4-glucan cellobiohydrolase of *Trichoderma viride*. *Can. J. Biochem*, 55: 644–650, 1977.

MAIS, U., ESTEGHLALIAN, A. R., SADDLER, J. N., MANSFIELD, S. D. Enhancing the enzymatic hydrolysis of cellulosic materials using simultaneous ball milling. *Appl. Biochem. Biotechnol*, 98: 815-832, 2002.

MANSFIELD, S. D., MOONEY, C., SADDLER, J. N. Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis. *Biotechnol. Prog.*, 15:804-816, 1999.

MANTOVANELI, I. C. C., RIVERA, E. A. C., COSTA, A. C., MACIEL FILHO, R. Hybrid Neural Network Model of an Industrial Ethanol Fermentation Process Considering the Effect of Temperature. *Appl. Biochem. Biotechnol*, 136: 817-834, 2007.

MARTÍN, C., KLINKE, H. B., THOMSEN, A. B. Wet oxidation as a pretreatment method for enhancing the enzymatic convertibility of sugarcane bagasse. *Enzyme Microb. Tech*, 40: 426-432, 2007.

MARTINS, LEONARDO FARIA. *Caracterização do complexo celulásico de Penicillium echinulatum*. Curitiba: Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, 2005. Dissertação (Mestrado).

MARTINS, RAFAEL ELIAS. *Estudo da imobilização de celulase em géis de quitosana*. Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, 2007. Dissertação (Mestrado).

MCCARTER, J. D., WITHERS, S. G. Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. *Curr. Opin. Struct. Biol*, 4: 885-892, 1994.

MEDVE, J., KARLSSON, J., LEE, D., TJERNELD, F. Hydrolysis of microcrystalline cellulose by cellobiohydrolase I and endoglucanase II from *Trichoderma reesei*: adsorption, sugar production, and synergism of the enzymes. *Biotechnol. Bioeng.*, 59: 621–634, 1998.

MEDVE, J., STÅHLBERG, J., TJERNELD, F. Isotherms for adsorption of cellobiohydrolase I and II from *trichoderma reesei* on microcrystalline cellulose. *Appl. Biochem. Biotech.*, 66: 39–56, 1997.

MISHIMA, D., TATEDA, M., IKE, M., et al. Comparative study on Chemicals pretreatments to accelerate enzymatic hydrolysis of aquatic macrophyte biomass used in water purification processes. *Bioresour. Technol.*, 97: 2166–2172, 2006.

MOLDES, A. B., ALONSO, J. L., PARAJÓ, J. C. Cogeneration of cellobiose and glucose from pretreated wood and bioconversion to lactic acid: a kinetic study. *J. Biosci. Bioeng*, 87:787–792, 1999.

MOLE, VILSON LUIZ DALLE. *Algoritmos Genéticos – Uma abordagem paralela baseada em populações cooperantes*. Florianópolis: Programa de Pós-Graduação em Ciência da Computação, Universidade Federal de Santa Catarina, 2002. Dissertação (Mestrado).

MOON, H., KIM, J. S., OH, K. K., KIM, S. W., HONG, S. I. Kinetic modeling of simultaneous saccharification and fermentation for ethanol production using steam-exploded wood with glucose- and cellobiose-fermenting yeast, *Brettanomyces custersii*. *J. Microbiol. Biotechn*, 11: 598–606, 2001.

MOONEY, C. A., MANSFIELD, S. D., TOUHY, M. G., SADDLER, J. N. The effect of initial pore volume and lignin content on enzymatic hydrolysis of softwoods. *Bioresour. Technol.*, 64:113-119, 1999.

MOSIER, N. S., HALL, P., LADISCH, C. M., LADISCH, M. R. Reaction kinetics, molecular action and mechanisms of cellulosic proteins. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 65: 23-40, 1999.

MOSIER, N., WYMAN, C. E., DALE, B., ELANDER, R., LEE, Y.Y., HOLTZAPPLE, M. T., LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technol*, 96: 673–686, 2005.

MOVAGARNEJAD, K., SOHRABI, M., KAGHAZCHI, T., VAHABZADEH, F. A model for the rate of enzymatic hydrolysis of cellulose in heterogeneous solid–liquid systems. *Biochem. Eng. J.*, 4: 197–206, 2000.

MOVAGARNEJAD, K. Modified shrinking particle model for the rate of enzymatic hydrolysis of impure cellulosic waste materials with enzyme reuse by the substrate replacement. *Biochem. Eng. J.*, 24: 217–223, 2005.

- MOVAGARNEJAD, K., SOHRABI, M. A model for the rate of enzymatic hydrolysis of some cellulosic waste materials in heterogeneous solid–liquid systems. *Biochem. Eng. J.*, 14: 1–8, 2003.
- MULAKALA, C., REILLY, P. J. *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) Cel7A as a molecular machine: a docking study. *Proteins Struct Funct Bioinf*, 60: 598–605, 2005.
- NAKASAKI, K., MURAI, T., AKIYAMA, T. Kinetic modeling of simultaneous saccharification and fermentation of cellulose. *J. Chem. Eng. Jpn.*, 21: 436–438, 1988.
- NEGRO, M. J., MANZANARES, P., BALLESTEROS, I., OLIVA, J. M., CABANAS, A., BALLESTEROS, M. Hydrothermal pretreatment conditions to enhance ethanol production from poplar biomass. *Appl. Biochem. Biotechnol*, 105: 87-100, 2003.
- NEELY, W. C. Factors affecting the pretreatment of biomass with gaseous ozone. *Biotechnol. Bioeng*, 26: 59-65, 1984.
- NGUYEN, Q. Milestone Completion Report: Evaluation of a Two-Stage Dilute Sulfuric Acid Hydrolysis Process. *National Renewable Energy Laboratory (NREL)*, 1998.
- NICOLAU DE ALMEIDA, MAÍRA. *Celulases e hemicelulases de espécies de Acremonium endofíticas*. Viçosa: Departamento de Bioquímica Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, 2009. Dissertação (Mestrado).
- NIDETZKI, B., STEINER, W, HAYN, M., ESTERBAUER, H. Enzymatic hydrolysis of wheat straw after steam pretreatment: experimental data and kinetic modeling. *Bioresource Technol.*, 44: 25–32, 1993.
- NIDETZKI, B., STEINER, W. A new approach for modeling cellulase–cellulose adsorption and the kinetics of the enzymatic hydrolysis of microcrystalline cellulose. *Biotechnol. Bioeng.*, 42: 469–479, 1993.
- NIDETZKI, B., STEINER, W, HAYN, M., CLAEYSSSENS, M. Cellulose hydrolysis by the cellulases from *Trichoderma reesei*: a new model for synergistic interaction. *Biochem. J.*, 298: 705–710, 1994.

O'DWYER, J. P., ZHU, L., GRANDA, C. B., HOLTZAPPLE, M. T. Enzymatic hydrolysis of lime-pretreated corn stover and investigation of the HCH-1 Model: inhibition pattern, degree of inhibition, validity of simplified HCH-1 Model. *Bioresource Technol.*, 98: 2969–2977, 2007.

OHGREN, K., GALBE, M., ZACCHI, G. Optimization of steam pretreatment of SO<sub>2</sub>-impregnated corn stover for fuel ethanol production. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 121: 1055-1067, 2005.

OHMINE, K., OOSHIMA, H., HARANO, Y. Kinetic study on enzymatic hydrolysis of cellulose by cellulase from *Trichoderma Viride*. *Biotechnol. Bioeng.*, 25:2041–53, 1983.

OKAZAKI, M., MOO-YOUNG, M. Kinetics of enzymatic hydrolysis of cellulose: analytical description of a mechanistic model. *Biotechnol. Bioeng.*, 20: 637–663, 1978.

OLIVÉRIO, J. L., HILST, A. G. P. *DHR-Dedini Hidrólise Rápida – Revolutionary Process for Producing Alcohol from Sugar Cane Bagasse*, XXV International Society of Sugar Cane Technologists Congress, Guatemala, Janeiro/fevereiro, 2005.

OLOFSSON, K., BERTILSSON, M., LIDÉN, G. A short review on SSF - an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. *Biotechnology for Biofuels*, 1:1-14, 2008.

OOSHIMA, H., SAKATA, M., HARANO, Y. Adsorption of cellulase from *Trichoderma viride* on cellulose. *Biotechnol. Bioeng.*, 25:3103–3114, 1983

OOSHIMA, H., KURAKAKE, M., KATO, J., HARANO, Y. Enzymatic activity of cellulase adsorbed on cellulose and its change during hydrolysis. *Appl. Biochem. Biotech.*, 31:253–66, 1991.

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

PALONEN, H., THOMSEN, A. B.; TENKANEN, M., SCHMIDT, A. S., VIKARI, L. Evaluation of wet oxidation pretreatment for enzymatic hydrolysis of softwood. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 117: 1-17, 2004a.

PALONEN, H., TJERNELD, F., ZACCHI, G., TENKANEN, M. Adsorption of *Trichoderma reesei* CBH I and EG II and their catalytic domains on steam pretreated softwood and isolated lignin. *Journal of Biotechnology*, 107:65-72, 2004b.

PAN, G. X., BOLTON, J. L., LEARY, G. J. Determination of ferulic and p-coumaric acids in wheat straw and the amounts released by mild acid and alkaline peroxide treatment. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 46:5283–5288, 1988.

PAN, X., ZHANG, X., GREGG, D. J., SADDLER, J. N. Enhanced enzymatic hydrolysis of steam-exposed Douglas fir wood by alkali-oxygen post-treatment. *Appl. Biochem. Biotech*, 113-116: 1103-1114, 2004.

PARAJÓ, J. C., ALONSO, J. L., SANTOS, V. Development of a generalized phenomenological model describing the kinetics of the enzymatic hydrolysis of NaOH-treated pine wood. *Appl. Biochem. Biotech*, 56:289–299, 1996.

PARK, E. Y., IKEDA, Y., OKUDA, N. Empirical evaluation of cellulase on enzymatic hydrolysis of waste office paper. *Biotechnol. Bioproc. E*, 7:268–274, 2002.

PARK, B., AHN, J. H., KIM, J., HWANG, S. Use of microwave pretreatment for enhanced anaerobiosis of secondary sludge. *Water Sci. Technol*, 50: 17-23, 2004.

PASQUINI, D., PIMENTA, M. T. B., FERREIRA, L. H., Curvelo, A. A. S. Extraction of lignin from sugar cane bagasse and *Pinus taeda* wood chips using ethanol-water mixtures and carbon dioxide at high pressures. *J. Supercrit. Fluid*, 36: 31-39, 2005.

PATHAK, A. N., GHOSE, T. K. Cellulases-1. Sources technology. *Process Biochem.*, 8:35-38, 1973.

PATURAU, J. M. *By-products of the cane sugar industry - an introduction to their industrial utilization*. 3<sup>a</sup>. Ed. Amsterdam, Elsevier, 435p, 1989.

PEITERSON, N., ROSS EDWARD, W. J. Mathematical model for enzymatic hydrolysis and fermentation of cellulose by *Trichoderma*. *Biotechnol Bioeng*, 21: 997-1017, 1979.

PERI, S., KARRA, S., LEE, Y. Y., KARIM, M. N. Modeling intrinsic kinetics of enzymatic cellulose hydrolysis. *Biotechnol. Progr.*, 23: 626–637, 2007.

PETTERSEN, R. C. The chemical composition of wood (chapter 2). In: Rowell, R.M. (Ed.), The chemistry of solid wood, Advances in Chemistry Series, vol. 207. American Chemical Society, Washington, DC, p. 984, 1984.

PETTERSSON, P. O., EKLUND, R., ZACCHI, G. Modeling simultaneous saccharification and fermentation of softwood. *Appl. Biochem. Biotech*, 98–100: 733–746, 2002.

PHILIPPIDIS, G. P., SMITH, T. K., WYMAN, C. E. Study of the enzymatic hydrolysis of cellulose for production of fuel ethanol by the simultaneous saccharification and fermentation process. *Biotechnol. Bioeng*, 41: 846–853, 1993.

PHILIPPIDIS, G. P., SPINDLER, D. D., WYMAN, C. E. Mathematical modeling of cellulose conversion to ethanol by the simultaneous saccharification and fermentation process. *Appl. Biochem. Biotech*, 34/35: 543–56, 1992.

PHILIPPIDIS, G. P., HATZIS, C. Biochemical Engineering Analysis of Critical Process Factors in the Biomass-to-Ethanol Technology. *Biotechnology Progress*, 13: 222–231, 1997.

PINTO, J. H., KAMDEN, D. P. Comparison of pretreatment methods on the enzymatic saccharification of aspen wood. *Appl Biochem Biotechnol*, 61: 289–297, 1996.

PITARELO, ANA PAULA. *Avaliação da susceptibilidade do bagaço e da palha de cana-de-açúcar à bioconversão via pré-tratamento a vapor e hidrólise enzimática*. Curitiba: Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, 2007. Dissertação (Mestrado).

PLACKETT, R. L., BURMAN, J. P. The design optimum multifactorial experiments. *Biometrika*, 33: 305-325, 1946.

PRIOR, B. A., DAY, D. F. Hydrolysis of ammonia-pretreated sugar cane bagasse with cellulase, beta-glucosidase, and hemicellulase preparations. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 146: 151–164, 2008.

RABELO, SARITA CÂNDIDO. *Avaliação de desempenho do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2007. Dissertação (Mestrado).

RABELO, S. C., FILHO, R. M., COSTA, A. C. A Comparison Between Lime and Alkaline Hydrogen Peroxide Pretreatments of Sugarcane Bagasse for Ethanol Production. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 144: 87-100, 2008.

RABELO, S. C., FILHO, R. M., COSTA, A. C. Lime Pretreatment of Sugarcane Bagasse for Bioethanol Production. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 153: 139-150, 2009.

RABELO, SARITA CÂNDIDO. *Avaliação e Otimização de Pré-Tratamentos e Hidrólise Enzimática do Bagaço de Cana-de-Açúcar para Produção de Etanol de Segunda Geração*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2010. Tese (doutorado).

RABINOVICH, M. L., CHERNOGLAZOV, V. M., KLESOV, A. A. Isoenzymes of endoglucanase in cellulase complexes: different affinity for cellulose and different role in the hydrolysis of an insoluble substrate. *Biochemistry*, 48: 321–329, 1983.

RAMOS, L. P. The chemistry involved in the pretreatment of lignocellulosic materials. *Química Nova*, 26: 863-87, 2003.

RAMOS, L. P., BREUIL, C., SADDLER, J. N. Comparison of steam pretreatment of eucalyptus, aspen and spruce wood chips and their enzymatic hydrolysis. *Appl. Biochem. Biotechnol*, 34-35: 37-48, 1992.

REICHERT, J. S., PETE, R. H. Peroxide Bleaching of Groundwood. *TAPPI J.* 32(3): 97, 1949.

REIN, P. W. Prospects for the conversion of a sugar mill into a biorefinery. *Proc. Int. Soc. SugarCane Technol*, 2007.

RENÓ, MARIA LUIZA GRILLO. *Uso de Técnicas de Otimização Robusta Multi-Objetivos na Produção de Cimento*. Itajubá: Instituto de Engenharia Mecânica, Universidade Federal de Itajubá, 2007. Dissertação (Mestrado).

RIVERA, ELMER ALBERTO CCOPA. *Otimização de bioprocessos: Avaliação de desempenho das abordagens determinística e por algoritmo genético*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2006. Tese (Doutorado).

RIVERA, E. A. C., COSTA, A. C., ANDRADE, R. R., ATALA, D. I. P., MAUGERI FILHO, F., MACIEL FILHO, R. Development of adaptive modeling techniques to describe the temperature dependent kinetics of biotechnological processes. *Biochemical Engineering Journal*, 36: 157-166, 2007.

RIVERA, E. C., RABELO, S. C., GARCIA, D. R., FILHO, R. M., COSTA, A. C. Enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse for bioethanol production: determining optimal enzyme loading using neural networks. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 85: 983-992, 2010.

ROCHA DO MONTE, JOSEANA. *Sacarificação da polpa celulósica do bagaço de cana-de-açúcar com celulasas e xilanases*. Lorena: Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, 2009. Dissertação (Mestrado).

RODRIGUES, NÁTALLI MACEDO. *Um algoritmo cultural para problemas de despacho de energia elétrica*. Maringá: Departamento de Ciência da Computação, Universidade Estadual de Maringá, 2007. Dissertação (Mestrado).

ROUVINEN, J., BERGFORS, T., TEERI, T., KNOWLES, J. K. C., JONES, T. A. Three-dimensional structure of cellobiohydrolase II from *Trichoderma reesei*. *Science*. 249:380-386, 1990.

RUEDA, SANDRA MARCELA GÓMEZ. *Pré-tratamento e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2010. Dissertação (Mestrado).

RUIZ, E., CARA, C., MANZANARES, P., BALLESTEROS, M., CASTRO, E. Evaluation of steam explosion pretreatment for enzymatic hydrolysis of sunflower stalks. *Enzyme Microb. Tech*, 42: 160-166, 2008.

RYU, D. D. Y., LEE, S. B., TASSINARI, T., MACY, C. Effect of compression milling on cellulose structure and on enzymatic hydrolysis kinetics. *Biotechnol. Bioeng*, 24: 1047–67, 1982.

SAHA, B. C., COTTA, M. A. Ethanol production from alkaline peroxide pretreated enzymatically accharified wheat straw. *Biotechnol Progr*, 22: 449–453, 2006.

SAHA, B. C., COTTA, M. A. Enzymatic saccharification and fermentation of alkaline peroxide retreated rice hulls to ethanol. *Enzyme Microb Technol*, 41: 528–532, 2007.

SANDGREN, M., MITCHINSON, J. S. Structure and biochemical studies of GH family 12 cellulases; improved thermal stability, and ligand complex. *Proc. Biophys. Mol. Biol*, 89: 246-291, 2005.

SANTA CATARINA, A., BACH, S. L. Estudo do efeito dos parâmetros genéticos na solução otimizada e no tempo de convergência em algoritmos genéticos com codificações binária e real. *Acta Scientiarum: Technology*. Maringá, 25: 147- 152, 2003.

SASSNER, P., GALBE, M., ZACCHI, G. Steam pretreatment of Salix with and without SO<sub>2</sub> impregnation for production of bioethanol. *Appl. Biochem. Biotechnol*, 121: 1101-1117, 2005.

SATTLER, W., ESTERBAUER, H., GLATTER, O., STEINER, W. The effect enzyme concentration on therate of the hydrolysis of cellulose. *Biotechnol. Bioeng*, 33:1221–34, 1989.

SCHEIDING, W., THOMA, M., ROSS, A., SCHUGERL, K. Modelling of the enzymatic hydrolysis of cellobiose and cellulose by a complex enzyme mixture of *Trichoderma reesei* QM9414. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 20: 176–182, 1984.

SHEVCHENKO, S. M., BEATSON, R. P., SADDLER, J. N. The nature of lignin from steam explosion/enzymatic hydrolysis of softwood. *Appl. Biochem. Biotechnol*, 77: 867-876, 1999.

SCHNELL, S. A century of enzyme kinetics: reliability of the  $K_M$  and  $v_{max}$  estimates. *Comment. Theor. Biol.*, 8: 169–187, 2003.

SCHULEIN, M. Enzymatic properties of cellulases from *Humicola insolens*. *J Biotechnol.*, 57:71-81, 1997.

SCHELL, D. J., FARMER, J., NEWMAN, M., MCMILLAN, J. D. Dilute-sulfuric acid pretreatment of corn stover in pilot-scale reactor: Investigation of yields, kinetics, and enzymatic digestibilities of solids. *Appl. Biochem. Biotechnol*, 105: 69-85, 2003.

SCHELL, D. J., RUTH, M. F., TUCKER, M. P. Modeling the enzymatic hydrolysis of dilute-acid pretreated douglas fir. *Appl. Biochem. Biotech.*, 77-79:67-81, 1999.

SCHMIDT, A., THOMSEN, A. Optimization of wet oxidation pretreatment of wheat straw. *Bioresource Technol*, 64: 139-151, 1998.

SCHNEIDER, ANDRÉ. *Algoritmo Adaptativo Genético para Acompanhamento da Trajetória de Alvos Móveis*. Porto Alegre: Instituto de Informática, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1998. Dissertação (Mestrado).

SCHULTZ, T. P., MCGINNIS, G. D., BIERMANN, C. J. Similarities and differences in pretreating woody biomass by steam explosion, wet oxidation, autohydrolysis, and rapid steam hydrolysis/continuous extraction. In Proceedings of Annual Symposium on Energy from Biomass and Wastes, Lake Buena Vista, FL, USA, 1984.

SEABRA, JOAQUIM EUGÊNIO ABEL. *Análise de opções tecnológicas para uso integral da biomassa no setor de cana-de-açúcar e suas implicações*. Campinas: Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, 2008 Tese (Doutorado).

SHAO, X., LYND, L., WYMAN, C. Kinetic modeling of cellulosic biomass to ethanol via simultaneous saccharification and fermentation: Part II. Experimental Validation using waste paper sludge and anticipation of CFD analysis. *Biotechnol Bioeng*, 102:66-72, 2009a.

SHAO, X., LYND, L., WYMAN, C., BAKKER, A. Kinetic modeling of cellulosic biomass to ethanol via simultaneous saccharification and fermentation: Part I. Accomodation of intermittent feeding and analysis of staged reactors. *Biotechnol Bioeng*, 102:59-65, 2009b.

SHEN, J., AGBLEVOR, F. A. Kinetics of enzymatic hydrolysis of steam-exploded cotton gin waste. *Chem. Eng. Commun*, 195: 1107-1121, 2008a.

SHEN, J., AGBLEVOR, F. A . Optimization of enzyme loading and hydrolytic time in the hydrolysis of mixtures of cotton gin waste and recycled paper sludge for the maximum profit rate. *Biochem. Eng. J.*, 41: 241–250, 2008b.

SHEN, Y., WANG, L. M., SUN, K. Kinetics of the cellulase catalyzed hydrolysis of cellulose fibres. *Text. Res. J.*, 74: 539–545, 2004.

SHEVCHENKO, S. M., BEATSON, R. P., SADDLER, J. N. The nature of lignin from steam explosion/enzymatic hydrolysis of softwood. . *Appl. Biochem. Biotechnol*, 77: 867-876, 1999.

SHIN, D., YOO, A., KIM, S. W., YANG, D. R. Cybernetic modeling of simultaneous saccharification and fermentation for ethanol production from steam-exploded wood with *Brettanomyces custersii*. *J. Microbiol. Biotechn.*, 16: 1355–1361, 2006.

SIDIRAS, D. K., KOUKIOS, E. G. Acid saccharification of ball-milled straw. *Biomass*, 19: 289-306, 1989.

SILVERSTEIN, R. A., CHEN, Y., SHARMA-SHIVAPPA, R. R., et al. A comparison of chemical pretreatment methods for improving saccharification of cotton stalks. *Bioresour Technol*, 98: 3000–3011, 2007.

SINGH, A., KUMAR, P. K. R. SCHUGERL, K. Adsorption and reuse of cellulases during saccharification of cellulosic materials. *J. Biotechnol*, 18: 205–212, 1991.

SJÖSTRÖM, E. Wood Chemistry Fundamentals and Applications. 2. Ed. California USA; Academic Press, 1992.

SOUTH, C. R., HOGSETT, D. A. L., LYND, L. R. Modeling simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulose to ethanol in batch and continuous reactors. *EnzymeMicrob. Technol.*, 17: 797–803, 1995.

SRILATHA, H. R.; NAND, K., BABU, K. S., MADHUKARA, K. Fungal pretreatment of orange processing wastes by solid-state fermentation for improved production of methane. *Process Biochem*, 30: 327-331, 1995.

STÅHLBERG, J., JOHANNSSON, G., PETTERSSON, G. A new model for enzymatic hydrolysis of cellulose based on the two-domain structure of cellobiohydrolase I. *Nat. Biotechnol*, 9:286–90, 1991.

STERNBERG, D. Production of cellulase by *Trichoderma*. *Biotechnology and Bioengineering Symposium*, 35-53, 1976.

STENBERG, K., TENGBORG, C., GALBE, M., ZACCHI, G. Optimisation of steam pretreatment of SO<sub>2</sub>-impregnated mixed softwoods for ethanol production. *J. Chem. Technol. Biotechnol*, 71: 299-308, 1998.

STROBEL, H. J., CALDWELL, F. C. DAWSON, K. A. Carbohydrate transport by the anaerobic thermophilic *Clostridium thermocellum* LQRI. *Appl. Environ. Microbiol*, 61:4012–4015, 1995.

STUTZENBERGER, F. Selective adsorption of endoglucanases from *Thermomonospora curvata* on protein-extracted lucerne fibers. *Lett. Appl. Microbiol*, 5:1–4, 1987.

SUGA, K., DEDEM, G. V., MOO-YOUNG, M. Degradation of polysaccharides by endo and exo enzymes: a theoretical analysis. *Biotechnol. Bioeng*, 17:433–439, 1975.

SUN, J. X., SUN, X. F, SUN, R. C., SU, Y. Q. Fractional extraction and structural characterization of sugarcane bagasse hemicelluloses. *Carbohydrate Polymers*, 56:195–204, 2004.

SUN, Y., CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: review. *Biosource Tech*, 83: 1-11, 2002.

SZCZODRAK, J., FIEDUREK, J. Technology for conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *Biomass and Bioenergy*, 10(5/6):367-375, 1996.

TAHERZADEH, M. J., KARIMI, K. Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: A review. *BioResources*, 2: 472-499, 2007a.

TAHERZADEH, M. J., KARIMI, K. Enzymatic-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: A review. *BioResources*, 2: 707-738, 2007b.

TAHERZADEH, M. J., KARIMI, K. Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review. *Int. J. Mol. Sci*, 9: 1621-1651, 2008.

TARANTILI, P. A., KOULLAS, D. P., CHRISTAKOPOULOS, P., KEKOS, D., KOUKIOS, E. G., MACRIS, B. J. Crosssynergism in enzymatic hydrolysis of lignocellulosics: mathematical correlations according to a hyperbolic model. *Biomass Bioenerg*, 10:213–219, 1996.

TASSINARI, T., MACY, C. Differential speed two roll mill pretreatment of cellulosic materials for enzymatic hydrolysis. *Biotechnol. Bioeng*, 19: 1321-1330, 1977.

TENBORG, C., STENBERG, K., GALBE, M., ZACCHI, G., LARSSON, S., PALQVIST, E., HAHN-HÄGERDAL, B. Comparison of SO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> impregnation of softwood prior to steam pretreatment on ethanol production. *Appl. Biochem. Biotechnol*, 70: 3-15, 1998.

TERRI, T. T. Crystalline cellulose degradation: a new insight into the function of cellobiohydrolases. *Tibtech.*, 15:160-167, 1997.

THOMPSON, R. Industrial inorganic chemicals: productions and uses. Hydrogen Peroxide, p. 175-198, 1995.

TÍMAR-BALÁZSY, A, EASTOP, D. Chemical Principles of Textile Conservation. Oxford, UK: *Butterworth Heinemann*, 1998.

TOLAN, J. S., FOODY, B. Cellulases from submerged fermentation. *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol*, 65: 41-67, 1999.

TORGET, R., HIMMEL, M. E., GROHMANN, K. Dilute sulfuric acid pretreatment of hardwood bark. *Bioresource Technol*, 35: 239-246, 1991.

TUCKER, M. P., KIM, K. H., NEWMAN, M. M., NGUYEN, Q. A. Effects of temperature and moisture on dilute-acid steam explosion pretreatment of corn stover and cellulase enzyme digestibility. *Appl. Biochem. Biotechnol*, 105: 165-177, 2003.

VACCARINO, C., LO CURTO, R. B., TRIPODO, M. M.; BELLOCCO, E., LAGANFI, G., PATAN, R. Effect of SO<sub>2</sub>, NaOH and Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pretreatments on the degradability and cellulase digestibility of grape marc. *Biol. Waste*, 20: 79-88, 1987.

VICTORINO, IGOR RICARDO DE SOUZA. *Otimização de um Reator Industrial de Produção de Álcool Cíclico Utilizando Algoritmos Genéticos*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2005. Tese (Doutorado).

VÁSQUEZ, M. P., SILVA, J. N., Jr, M. B. S., Jr, N. P. Enzymatic hydrolysis optimization to ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation. *Appl. Biochem. Biotech*, 136-140:141-153, 2007.

VON SIVERS, M., ZACCHI, G. A techno-economical comparison of three processes for the production of ethanol from pine. *Bioresour. Technol.*, 51: 43-52, 1995.

WALD, S., WILKE, C. R., BLANCH, H. W. Kinetics of the enzymatic hydrolysis of cellulose. *Biotechnol. Bioeng.*, 26: 221-230, 1984.

WEEMAES, M., GROOTAERD, H., SIMOENS, F., VERSTRAETE, W. Anaerobic digestion of ozonized biosolids. *Water Res*, 34: 2330-2336, 2000.

WILSON, D. B, IRWIN, D. C. Genetics and properties of cellulases. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol*, 65:1-21, 1999.

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

WOOD, T. M., BHAT, K. M. Methods for measuring cellulase activities, pp. 87-116. *In: W. A. Wood and S. T. Kellog (eds.), Methods in enzymology*, Vol. 160. Academic Press, San Diego, CA, 1988.

WOODWARD, J., LIMA, M., LEE, N. E. The role of cellulase concentration in determining the degree of synergism in the hydrolysis of microcrystalline cellulose. *Biochem. J.*, 255:895-899, 1988.

WRINGREN, A.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Techno-Economic Evaluation of Producing Ethanol from Softwood: Comparison of SSF and SHF and Identification of Bottlenecks. *Biotechnol. Progress*, 19: 1109 -1117, 2003.

XIAO, Z., ZHANG, X., GREGG, D. J., SADDLER, J. N. Effects of sugar inhibition on cellulases and glucosidase during enzymatic hydrolysis of softwood substrates. *Appl. Environ. Microb*, 113–116:1115–1126, 2004.

YAMAMOTO, H., HORII, F. In situ crystallization of bacterial cellulose I. Influences of polymeric additives, stirring and temperature on the formation of celluloses I $\alpha$  and I $\beta$  as revealed by cross polarization/magic angle spinning (CP/MAS) <sup>13</sup>C NMR spectrometry. *Cellulose* 1:57-66, 1994.

YUE, Z., BIN, W., BAIXU, Y., PEIJI, G. Mechanism of cellobiose inhibition in cellulose hydrolysis by cellobiohydrolase. *Sci China Ser C*, 47:18–24, 2004.

ZANDONÁ FILHO, ARION. *Caracterização de celulases derivadas de cepas recombinantes de trichoderma reesei e uso no tratamento de fibras celulósicas comerciais*. Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, 2001. Dissertação (Mestrado).

ZHANG, Y. H. P., LYND, L. R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. *Biotechnol. Bioeng*, 88: 797–824, 2004.

ZHANG, Y. H. P., LYND, L. R. A functionally based model for hydrolysis of cellulose by fungal cellulase. *Biotechnol Bioeng*, 94: 888-898, 2006.

ZHENG, Y., LIN, H. M., WEN, J., CAO, N., YU, X., TSAO, G. T. Supercritical carbon dioxide explosion as a pretreatment for cellulose hydrolysis. *Biotechnol. Lett*, 17: 845-850, 1995.

ZHENG, Y., TSAO, G. T. Avicel hydrolysis by cellulase enzyme in supercritical CO<sub>2</sub>. *Biotechnol. Lett*, 18: 451-454, 1996.

ZHENG, Y., PAN, Z., ZHANG, R. Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production. *Int J Agric & Biol Eng*, 2: 51-68, 2009a.

ZHENG, Y., PAN, Z., ZHANG, R., JENKINS, B. M. Kinetic modeling for enzymatic hydrolysis of pretreated creeping wild ryegrass. *Biotechnol. Bioeng*, 102: 1558–69, 2009b.

ZHOU, J., WANG, Y. H., CHU, J., LUO, L. Z., ZHUANG, Y. P., ZHANG, S. L. Optimization of cellulase mixture for efficient hydrolysis of steam-exploded corn stover by statistically designed experiments. *Bioresource Technol*, 100:819–825, 2009.

ZINI, ÉRICO DE OLIVEIRA COSTA. *Algoritmo Genético Especializado na Resolução de Problemas com Variáveis Contínuas e Altamente Restritos*. Ilha Solteira: Pós-graduação em Engenharia Elétrica da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, Universidade Estadual Paulista, 2009. Tese (Mestrado).

## APÊNDICE A

Nesta seção serão apresentados os dados cinéticos de hidrólise enzimática com variação na carga enzimática de celulase e  $\beta$ -glicosidase de bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino, obtidos no trabalho de GARCIA (2009), de bagaço pré-tratado com ácido fosfórico+hidróxido de sódio, obtidos no trabalho de RUEDA (2010), e de bagaço pré-tratado com cal, obtidos no trabalho de FUENTES (2009).

**Tabela A.1:** Dados de glicose (g/L) obtidos para hidrólise enzimática com variação da carga enzimática (GARCIA (2009)).

	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7	Ensaio 8	Pontos Centrais
Tempo (min)	Glicose (g/L)								
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
10	0,299	0,358	1,134	0,879	0,040	0,808	0,151	0,680	0,296 $\pm$ 0,02
20	0,635	0,705	1,846	1,531	0,088	1,577	0,210	1,309	0,763 $\pm$ 0,02
30	1,061	1,654	2,851	2,583	0,108	2,552	0,608	2,087	2,100 $\pm$ 0,20
40	1,447	1,738	4,165	3,974	0,406	3,758	0,852	3,145	3,254 $\pm$ 0,10
50	1,559	2,079	5,404	5,073	0,536	4,494	0,995	3,880	3,570 $\pm$ 0,02
60	1,969	2,504	6,366	5,782	0,763	5,758	1,301	4,776	4,446 $\pm$ 0,02
180	7,802	7,530	7,608	8,994	3,800	6,538	3,722	5,868	7,143 $\pm$ 0,28
360	8,296	7,897	10,442	10,984	5,102	13,553	5,799	14,010	9,813 $\pm$ 0,12
720	10,913	8,821	13,402	13,982	6,071	16,324	6,617	15,839	14,258 $\pm$ 0,48
1440	14,606	12,625	16,171	16,340	6,927	18,786	8,642	17,789	18,031 $\pm$ 0,46
2160	15,859	14,516	16,190	16,531	7,718	19,132	10,181	18,148	19,380 $\pm$ 0,12
2880	16,396	14,974	16,243	16,822	7,836	19,150	11,682	18,385	19,584 $\pm$ 0,07
3600	16,484	14,939	16,296	16,959	8,445	19,620	12,242	18,518	19,699 $\pm$ 0,19
4320	16,587	15,728	16,260	17,104	8,570	19,659	12,722	18,647	19,747 $\pm$ 0,14

**Tabela A.2:** Dados de glicose (g/L) obtidos para hidrólise enzimática com variação da carga enzimática (RUEDA (2010)).

	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7	Ensaio 8	Pontos Centrais
Tempo (min)	Glicose (g/L)								
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
10	0,1505	0,0112	0,8277	0,7273	0,000	0,3588	0,4167	0,000	0,2267 ± 0,0075
20	0,8588	0,4584	2,4210	1,3245	0,000	1,3081	0,7640	0,9970	0,9048 ± 0,0081
30	0,5842	0,4776	2,0158	1,7915	0,000	2,2551	0,9169	1,5766	1,1457 ± 0,0006
40	0,8997	0,7504	2,3293	3,1683	0,1642	3,0747	1,1471	1,8892	1,5450 ± 0,0024
50	1,0441	1,0018	3,2649	3,7153	0,0322	3,8350	1,1129	2,6780	2,0483 ± 0,0061
60	1,1008	1,2517	2,8920	4,2847	0,1125	4,1671	1,2579	3,0996	2,4746 ± 0,0079
180	2,6007	3,0474	6,5176	7,4339	0,6538	7,8947	2,4039	6,3322	4,9454 ± 0,0025
360	6,6938	6,0657	7,6355	11,2871	1,9772	11,1286	6,4372	9,4960	8,0929 ± 0,0007
720	6,0202	6,3805	9,3505	10,8653	2,0963	10,6213	5,8315	9,6850	7,5436 ± 0,0032
1440	6,6333	6,5217	10,4841	11,1722	3,0557	11,7882	6,0511	9,1477	8,1384 ± 0,0028
2160	7,3566	7,4597	11,5379	11,1135	3,2337	12,2473	7,9113	10,5230	9,1173 ± 0,0005
2880	8,2785	8,1091	11,9539	11,3122	3,5767	12,2139	8,8013	10,4779	10,2583 ± 0,0018
3600	7,8565	7,7366	11,8407	10,7983	3,8194	11,5075	8,8151	10,5008	9,1863 ± 0,0046
4320	8,9121	8,3385	11,8066	10,9631	4,0687	11,7245	9,4334	10,3319	9,1918 ± 0,0092

**Tabela A.3:** Dados de glicose (g/L) obtidos para hidrólise enzimática com variação da carga enzimática (FUENTES (2009)).

	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7	Ensaio 8	Pontos Centrais
Tempo (min)	Glicose (g/L)								
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
10	2,042	2,744	2,704	2,608	3,520	2,697	2,383	3,015	2,087 ± 0,522
20	2,071	3,048	2,766	4,085	3,817	3,814	2,236	3,855	3,008 ± 0,456
30	2,574	2,684	3,897	4,995	2,869	4,376	3,132	4,446	3,114 ± 0,756
40	3,134	4,584	4,493	6,056	2,087	5,507	4,327	5,506	4,325 ± 0,514
50	3,405	5,132	5,183	6,201	4,299	6,257	4,706	4,920	5,025 ± 0,604
60	3,620	5,154	5,337	6,307	3,325	6,347	5,592	6,453	5,468 ± 0,310
180	8,747	9,880	9,278	9,865	4,998	9,882	9,807	9,784	9,291 ± 0,161
360	10,879	12,338	12,285	12,212	6,621	12,385	12,483	13,044	12,269 ± 0,147
720	12,129	12,686	12,749	12,260	8,706	12,521	12,622	13,391	12,731 ± 0,157
1440	13,146	13,635	12,868	12,362	10,383	12,892	13,382	14,131	13,650 ± 0,336
2160	14,652	14,009	14,355	14,729	12,128	14,443	13,831	14,339	15,580 ± 0,401
2880	14,019	14,020	15,501	14,294	12,385	14,170	14,070	14,778	15,848 ± 0,508
3600	14,028	14,022	15,821	14,235	12,265	14,878	13,072	14,799	16,685 ± 0,226
4320	14,064	13,189	15,356	13,663	12,190	14,706	13,032	14,395	15,375 ± 0,804

## APÊNDICE B

Neste tópico serão apresentadas as subrotinas, definições, estrutura geral e um exemplo da aplicação do algoritmo genético PIKAIA. As informações descritas nesta seção bem com o exemplo foram extraídas do User's Guide to PIKAIA 1.0 (CHARBONNEAU e KNAPP, 1996).

### Subrotinas do Código Genético

**encode** – codifica parâmetros fenótipos em genótipos  $ph(k)$

**decode** – decodifica genótipo em parâmetros fenótipos  $ph(k)$

**cross** – gera dois cromossomos filhos de dois cromossomos pais

**mutate** – introduz mutação aleatória num genótipo

**adjmut** – implementa uma taxa de mutação variável, o critério é a diferença relativa na aptidão entre o melhor indivíduo e os na média

**select** – seleção dos pais na população usando o método da roleta com a aptidão relativa dos indivíduos determinando a probabilidade de escolha

**genrep** – o modo de reprodução por substituição total acumula os filhos num estoque temporário. Uma vez que  $np$  filhos tenham sido produzidos e estocados a população dos pais é completamente substituída (por uma única chamada da subrotina `newpop`)

**stdrep** – reprodução estado-estacionário: insere o par de filhos na população somente se eles se ajustam adequadamente (substituição aleatória se  $irep=2$  ou substitui o indivíduo menos apto se  $irep=3$ ).

**newpop** – substitui a geração antiga pela nova, recalcula aptidão e rank

**rninit** – é o iniciador (semente) da função `urand`, geradora de números aleatórios para execução do AG

**urand** – retorna o próximo desvio pseudo-aleatório de uma sequência que é

uniformemente distribuída no intervalo [0, 1]

### **Vetores internos**

**oldph** – população principal de tamanho  $n \times np$

**newph** – nova população de tamanho  $n \times np$

**fitns** – valores de aptidão de tamanho  $np$

**jfit** – rank baseado na aptidão de tamanho  $np$

**ifit** – índice de rank de tamanho  $np$

### **Constantes**

**n** – comprimento do indivíduo (número de parâmetros ajustáveis)

**nmax** – é o número máximo de parâmetros ajustáveis ( $n \leq nmax$ )

**pmax** – é o número máximo da população ( $np \leq pmax$ )

**dmax** – é o número máximo de genes (dígitos) por segmento de cromossomo (parâmetro) ( $nd \leq dmax$ )

### **Definições das variáveis de entrada de dados**

**np** – número de indivíduos numa população (padrão é 100)

**ngen** – número de gerações no qual a solução é evoluída (padrão é 500)

**nd** – número de algarismos significativos (i.e., número de genes) retidos na codificação do cromossomo (padrão é 5)

**pcross** – probabilidade de cruzamento,  $0.0 \leq pcross \leq 1.0$  (padrão é 0,85)

**imut** – modo de mutação; 1/2=uniforme/variável (padrão é 2)

**pmut** – taxa inicial de mutação; deve ser pequena,  $0.0 \leq pmut \leq 1.0$  (padrão é 0,005)

(Nota: a taxa de mutação é a probabilidade que um dado gene tem de sofrer mutação durante a reprodução)

**pmutmn** – mínima taxa de mutação,  $0.0 \leq \text{pmutmn} \leq 1.0$  (padrão é 0,0005)

**pmutmx** – máxima taxa de mutação,  $0.0 \leq \text{pmutmx} \leq 1.0$  (padrão é 0,25)

**fdif** – diferencial de aptidão relativa; variando de 0 (nenhum) a 1 (máximo) (padrão é 1)

**irep** – plano de reprodução; 1/2/3 = Seleção da geração total para substituição/Substituição aleatória no estado estacionário/Substituição do indivíduo menos apto no estado estacionário (padrão é 1)

**ielite** – elitismo; 0/1. 0, para não utilização do elitismo (melhor indivíduo não é necessariamente replicado de uma geração para a próxima); 1, para utilização do elitismo (melhor indivíduo é replicado para próxima geração) (padrão é 1)

**irvb** – seleciona a o tipo de demonstração dos resultados gerados pelo PIKAIA. 0 (exibe apenas a aptidão da solução e os valores do parâmetros na última geração)/1 (exibe os resultados apresentados na opção 0 e os detalhes dos parâmetros genéticos do AG/2 (mostra a evolução da população a cada geração) (padrão é 0)

### **Definições das variáveis de saída de dados**

**fn\_val** – corresponde aos valores que da função aptidão ao longo no processo evolucionário

**x(1:n)** – é o vetor com a solução “ótima” encontrada (a solução que maximiza a função de aptidão ff)

**f** – é o valor da função aptidão em x

**status** – é um indicador de sucesso ou falha na chamada do pikaia (0=sucesso; diferente de zero=falha)

## B.1. Descrição geral

PIKAIA é uma subrotina de otimização de domínio público escrita em linguagem FORTRAN baseada em algoritmo genético. A codificação interna do AG PIKAIA é baseada num alfabeto decimal composto de 10 inteiros simples (0 a 9). O AG PIKAIA está disponível no site do High Altitude Observatory (<http://www.hao.ucar.edu/modeling/pikaia/pikaia.php>).

Internamente, a subrotina PIKAIA procura maximizar uma função  $f(x)$  num espaço de dimensão  $n$ , onde:

$$x=(x_1,x_2,\dots,x_n), \quad x_n \in [0.0,1.0] \quad \forall n$$

A restrição dos parâmetros no intervalo de  $[0.0,1.0]$  permite maior flexibilidade, porém implica que o usuário deva normalizar os parâmetros que serão utilizados para maximizar a função  $f(x)$ .

A chamada da subrotina pikaia é feita pelo comando:

```
call pikaia (twod,n,ctrl,x,f,status)
```

onde **twod** é o nome da FORTRAN *function* para ser maximizada, **n** é a dimensão do espaço de busca, **ctrl** é um vetor que contém as variáveis de entrada que determinam o comportamento do AG. O vetor de saída **x** contém os parâmetros ótimos determinados pelo algoritmo, o escalar **f** é a aptidão da solução e a variável de saída **status** é um indicador de sucesso ou falha na chamada do pikaia.

A *function* twod deve ser declarada como:

```
Function twod(n,x)
```

O AG PIKAIA conduz a tarefa de maximização a uma população composta de  $n_p$  indivíduos (soluções candidatas). O tamanho da população permanece fixo durante o processo evolucionário. A população evolui até que um número pré determinado de gerações seja atingido.

## B.2. Estrutura do AG PIKAIA

A estrutura geral do algoritmo genético PIKAIA consiste de 2 laços que controlam os ciclos reprodutivos e de geração. Na estrutura apresentada abaixo foram omitidos os principais argumentos pertencentes às subrotinas citadas.

```
do 10 ig=1,ngen [ciclo geracional]
  do 20 ip=1,np/2 [ciclo reprodutivo]
    call select (ip1) [seleção do pai]
    call select (ip2) [seleção da mãe]
21    If (ip1.eq.ip2) go to 21 [sem reprodução assexuada]
    call encode (ph1,gn1) [codificação do cromossomo pai]
    call encode (ph2,gn2) [codificação do cromossomo mãe]
    call cross (gn1,gn2) [reproduz dois filhos a partir
                        de 2 pais]
    call mutate (gn1) [mutação aleatória no primeiro
                     filho]
    call mutate (gn2) [mutação aleatória no segundo
                     filho]
    call decode (ph1,gn1) [decodificação do primeiro filho]
    call decode (ph2,gn2) [decodificação do segundo filho]
    if (irep.eq.1) then
      call genrep (ip,ph1,ph2,newph) [inserção/estoque de ambos
                                    os filhos]
    else
      call stdrep (irep,ph1,ph2,oldph,fitns,ifit,jfit)
                                     [inserção/estoque completo]
    endif
20    continue
    If (irep.eq.1) call newpop [substitui a geração antiga pela
                              nova]
10  continue
```

Inicialmente solicita-se ao usuário uma “semente” inicial, um número natural  $S$  cuja representação em base binária não exceda 4 bytes; com auxílio dessa semente, e de um gerador de números pseudo aleatórios, uma geração de indivíduos é construída.

O tamanho da população ( $np$ ) e o número de gerações ( $ngen$ ) através do qual a população evolui são ambos parâmetros de entrada. A cada iteração do laço interno (do 20) gera dois filhos de dois pais, de maneira que esse laço necessita ser executado somente  $np/2$  vezes a fim de produzir uma nova geração de  $np$  indivíduos. Uma iteração do ciclo reprodutivo implica na escolha de dois pais (call select), e a codificação de seus respectivos cromossomos ( $gn1$ ,  $gn2$ ) de seus fenótipos correspondentes ( $ph1,ph2$ ). O operador de cruzamento (*crossover*) é então

aplicado (call cross) para os cromossomos pais, e o operador de mutação aplicado (call mutate) para cada um dos cromossomos filhos resultantes. Os cromossomos filhos são então decodificados em seus fenótipos correspondentes (call decode), e acumulados em um reservatório temporário (call genrep) ou inseridas na população (call stdrep) dependendo do modo de reprodução adotado (controlado pelo parâmetro irep). Sob um dos modos de reprodução, a nova população é transferida do reservatório temporário para a população principal ao final do ciclo de geração (call newpop) com a população antiga sendo eliminada.

PIKAIA estoca a população num vetor bidimensional (oldph), de tamanho  $n \times np$ , onde  $n$  é o número de parâmetros ajustáveis da função a ser maximizada. A coluna oldph (1:n,i) corresponde ao  $i$ -ésimo indivíduo da população.

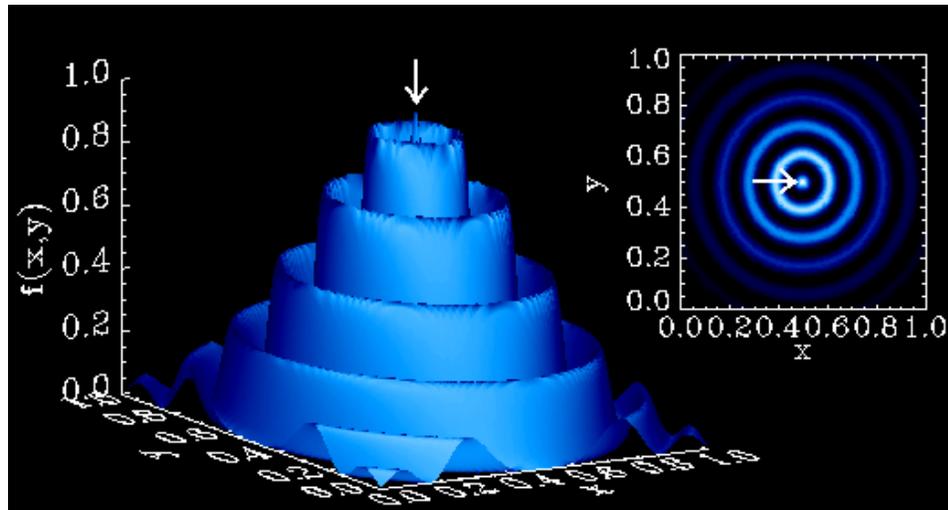
### B.3. Um exemplo do uso de PIKAIA

Considerando um problema de otimização que consiste em maximizar uma função de duas variáveis  $f(x, y)$  (Equação A.1 e A.2) com  $x, y$  delimitada entre 0 e 1.

$$f(x, y) = \cos^2(n\pi r) \exp(-r^2 / \sigma^2) \quad (\text{A.1})$$

$$r^2 = (x - 0.5)^2 + (y - 0.5)^2, \quad x, y \in [0.0, 1.0] \quad (\text{A.2})$$

Onde  $n$  e  $\sigma$  são constantes conhecidas. A Figura A.1 é a superfície plotada desta função para  $n=9$  e  $\sigma^2=0.15$ . O máximo global está em  $(x^*, y^*) = (0.5, 0.5)$ , com  $f(x^*, y^*) = 1.0$ . O máximo global está circundado por anéis concêntricos de máximos secundários, localizados em distâncias radiais.



**Figura A.1:** Superfície plotada da função  $f(x,y)$ . O máximo global (indicado por uma seta branca) está localizado em  $(x,y) = (0.5,0.5)$ , onde  $f = 1$  (Extraído de <http://www.hao.ucar.edu/modeling/pikaia/pikaia.php>).

O espaço de busca problema tem dimensão 2 ( $n=2$ ), e tudo que o usuário necessita é prover uma FORTRAN *function* que aceite como variável de entrada um vetor de dimensão 2 contendo um par  $(x,y)$  e que retorne o valor da função  $f(x,y)$  para ser usado diretamente como a medida da aptidão absoluta necessária para estabelecer o rank na população. A população consiste de **np** pares  $(x,y)$ . O espaço de busca  $[x(1),x(2)]=[x,y]$  já está no intervalo  $[0,1]$  de maneira que não há necessidade de um redimensionamento dos parâmetros de entrada. Abaixo temos um modelo de uma FORTRAN *function* para o caso apresentado:

```

C*****
      function twod(n,x)
C=====
c      Compute sample fitness function (2-d landscape)
C=====
      implicit none
c
c      Input:
      integer n
      real x(n)
c
c      Output
      real twod
c
c      Constant

```

```

real pi,sigma2
integer nn
parameter (pi=3.1415926536,sigma2=0.15,nn=9)
c
c Local
real rr

if (x(1).gt.1.or.x(2).gt.1.) stop
rr=sqrt((0.5-x(1))**2+(0.5-x(2))**2)
twod=cos(rr*nn*pi)**2 *exp(-rr**2/sigma2)

return
end function twod

```

Abaixo temos o *code driver* para a chamada da subrotina pikaia, fazendo uso dos valores padrões para os parâmetros de entrada.

```

program xpkaia
c=====
c Sample driver program for pikaia.f
c=====
implicit none
integer n, seed, i, status
parameter (n=2)
real ctrl(12), x(n), f, twod
external twod

c
c (twod is an example fitness function, a smooth 2-d landscape)
c
c First, initialize the random-number generator
c
WRITE (*, '(A)', ADVANCE='NO') ' Random number seed (I*4)?'
read(*,*) seed
call rninit(seed)

c
c Set control variables (use defaults)
do 10 i=1,12
ctrl(i) = -1
10 continue
ctrl(2)=50

c
c Now call pikaia
call pikaia(twod,n,ctrl,x,f,status)

c
c Print the results
write(*,*) ' status: ',status
write(*,*) ' x: ',x
write(*,*) ' f: ',f
write(*,20) ctrl
20 format(' ctrl: ',6f9.5/10x,6f9.5)
c

```

```
goto 1  
end program xpcaia
```

Neste exemplo uma população de  $n_p=100$  indivíduos foi evoluída através de  $n_{gen}= 200$  gerações, sendo que a solução obtida apresentou  $f(x,y) = 0,999997$ , muito próximo do máximo global de  $f(x^*,y^*)=1,0$ .

## APÊNDICE C

Resultado do planejamento Plackett-Burman para as concentrações de celulose, celobiose e glicose obtidos ao decorrer da hidrólise. Os resultados estão apresentados nas Tabelas C.1 a C.14.

**Tabela C.1:** Resultado das simulações de hidrólise enzimática no tempo 10 min para nível inferior (-) e superior (+) dos parâmetros utilizados no planejamento Plackett – Burman.

<b>tempo</b>	<b>10 min</b>		
<b>Simulação</b>	<b>substrato (g/L)</b>	<b>celobiose (g/L)</b>	<b>glicose (g/L)</b>
<b>1</b>	15.6952	1.6934	0.8098
<b>2</b>	15.7095	1.6496	0.8400
<b>3</b>	15.7077	1.7333	0.7538
<b>4</b>	15.9874	1.5710	0.6138
<b>5</b>	15.6174	1.8131	0.7702
<b>6</b>	15.2923	2.0292	0.9041
<b>7</b>	15.2537	2.0547	0.9203
<b>8</b>	15.6487	1.6941	0.8608
<b>9</b>	16.0640	1.3311	0.7812
<b>10</b>	15.6626	1.8123	0.7207
<b>11</b>	16.0028	1.4955	0.6760
<b>12</b>	15.1873	2.2601	0.7778
<b>13</b>	16.0011	1.4541	0.7216
<b>14</b>	15.6555	1.7396	0.8052
<b>15</b>	16.0161	1.5136	0.6422
<b>16</b>	15.6678	1.7292	0.8026
<b>17</b>	15.2452	2.1973	0.7795
<b>18</b>	15.2846	1.9304	1.0167
<b>19</b>	15.7276	1.6265	0.8441
<b>20</b>	15.7089	1.7244	0.7619

**Tabela C.2:** Resultado das simulações de hidrólise enzimática no tempo 20 min para nível inferior (-) e superior (+) dos parâmetros utilizados no planejamento Plackett – Burman.

<b>Tempo</b>	<b>20 min</b>		
<b>corridas</b>	<b>celulose (g/L)</b>	<b>celobiose (g/L)</b>	<b>glicose (g/L)</b>
<b>1</b>	14,9128	2,0982	1,2535
<b>2</b>	14,9308	2,0528	1,2813
<b>3</b>	14,9183	2,1772	1,1641
<b>4</b>	15,2400	2,0194	0,9726
<b>5</b>	14,7716	2,3036	1,1942
<b>6</b>	14,4065	2,5057	1,3874
<b>7</b>	14,3306	2,5590	1,4157
<b>8</b>	14,8246	2,1306	1,3174
<b>9</b>	15,3847	1,6426	1,2085
<b>10</b>	14,8586	2,2705	1,1323
<b>11</b>	15,2670	1,9087	1,0593
<b>12</b>	14,2185	2,8753	1,2073
<b>13</b>	15,2697	1,8336	1,1353
<b>14</b>	14,8296	2,1846	1,2551
<b>15</b>	15,3031	1,9074	1,0204
<b>16</b>	14,8472	2,1701	1,2506
<b>17</b>	14,3237	2,7672	1,2041
<b>18</b>	14,3803	2,3828	1,5460
<b>19</b>	14,9533	2,0235	1,2871
<b>20</b>	14,9199	2,1649	1,1754

**Tabela C.3:** Resultado das simulações de hidrólise enzimática no tempo 30 min para nível inferior (-) e superior (+) dos parâmetros utilizados no planejamento Plackett – Burman.

<b>Tempo</b>	<b>30 min</b>		
<b>corridas</b>	<b>celulose (g/L)</b>	<b>celobiose (g/L)</b>	<b>glicose (g/L)</b>
<b>1</b>	13,7139	2,6169	2,0405
<b>2</b>	13,7326	2,5773	2,0613
<b>3</b>	13,7015	2,7672	1,8960
<b>4</b>	14,0517	2,6512	1,6286
<b>5</b>	13,4538	2,9717	1,9561
<b>6</b>	13,0711	3,1076	2,2385
<b>7</b>	12,9246	3,2102	2,2933
<b>8</b>	13,5447	2,7106	2,1299
<b>9</b>	14,3279	2,0393	1,9660
<b>10</b>	13,6243	2,8727	1,8707
<b>11</b>	14,0986	2,4827	1,7540
<b>12</b>	12,7348	3,7097	1,9785
<b>13</b>	14,1145	2,3442	1,8822
<b>14</b>	13,5483	2,7726	2,0607
<b>15</b>	14,1888	2,4336	1,7054
<b>16</b>	13,5723	2,7544	2,0532
<b>17</b>	12,9263	3,5241	1,9609
<b>18</b>	13,0031	2,9543	2,4756
<b>19</b>	13,7627	2,5377	2,0695
<b>20</b>	13,7027	2,7502	1,9125

**Tabela C.4:** Resultado das simulações de hidrólise enzimática no tempo 40 min para nível inferior (-) e superior (+) dos parâmetros utilizados no planejamento Plackett – Burman.

<b>Tempo</b>	<b>40 min</b>		
<b>corridas</b>	<b>celulose (g/L)</b>	<b>celobiose (g/L)</b>	<b>glicose (g/L)</b>
<b>1</b>	12,8025	2,9298	2,7245
<b>2</b>	12,8180	2,8994	2,7392
<b>3</b>	12,7730	3,1393	2,5366
<b>4</b>	13,1232	3,0759	2,2140
<b>5</b>	12,4424	3,4024	2,6273
<b>6</b>	12,0712	3,4646	2,9745
<b>7</b>	11,8656	3,6042	3,0561
<b>8</b>	12,5638	3,0724	2,8397
<b>9</b>	13,5126	2,2758	2,6234
<b>10</b>	12,6864	3,2485	2,5180
<b>11</b>	13,1852	2,8620	2,3703
<b>12</b>	11,6168	4,2457	2,6572
<b>13</b>	13,2150	2,6688	2,5406
<b>14</b>	12,5676	3,1380	2,7663
<b>15</b>	13,3283	2,7682	2,3099
<b>16</b>	12,5940	3,1195	2,7565
<b>17</b>	11,8783	4,0018	2,6232
<b>18</b>	11,9638	3,2898	3,2780
<b>19</b>	12,8551	2,8510	2,7488
<b>20</b>	12,7728	3,1195	2,5577

**Tabela C.5:** Resultado das simulações de hidrólise enzimática no tempo 50 min para nível inferior (-) e superior (+) dos parâmetros utilizados no planejamento Plackett – Burman.

<b>Tempo</b>	<b>50 min</b>		
<b>corridas</b>	<b>celulose (g/L)</b>	<b>celobiose (g/L)</b>	<b>glicose (g/L)</b>
<b>1</b>	12,4165	3,0407	3,0369
<b>2</b>	12,4298	3,0151	3,0490
<b>3</b>	12,3795	3,2758	2,8305
<b>4</b>	12,7251	3,2386	2,4852
<b>5</b>	12,0131	3,5624	2,9361
<b>6</b>	11,6514	3,5894	3,3098
<b>7</b>	11,4205	3,7435	3,4044
<b>8</b>	12,1475	3,2032	3,1648
<b>9</b>	13,1644	2,3587	2,9234
<b>10</b>	12,2896	3,3854	2,8150
<b>11</b>	12,7933	3,0054	2,6550
<b>12</b>	11,1478	4,4445	2,9694
<b>13</b>	12,8296	2,7881	2,8434
<b>14</b>	12,1518	3,2699	3,0899
<b>15</b>	12,9610	2,8918	2,5882
<b>16</b>	12,1783	3,2520	3,0792
<b>17</b>	11,4387	4,1774	2,9271
<b>18</b>	11,5259	3,4054	3,6431
<b>19</b>	12,4703	2,9627	3,0591
<b>20</b>	12,3782	3,2551	2,8537

**Tabela C.6:** Resultado das simulações de hidrólise enzimática no tempo 1h para nível inferior (-) e superior (+) dos parâmetros utilizados no planejamento Plackett – Burman.

<b>Tempo</b>	<b>1 h</b>		
<b>corridas</b>	<b>celulose (g/L)</b>	<b>celobiose (g/L)</b>	<b>glicose (g/L)</b>
<b>1</b>	11,7435	3,2028	3,6146
<b>2</b>	11,7517	3,1865	3,6226
<b>3</b>	11,6931	3,4824	3,3761
<b>4</b>	12,0261	3,4951	2,9925
<b>5</b>	11,2645	3,8072	3,5108
<b>6</b>	10,9244	3,7694	3,9287
<b>7</b>	10,6498	3,9458	4,0483
<b>8</b>	11,4215	3,3977	3,7674
<b>9</b>	12,5528	2,4782	3,4776
<b>10</b>	11,5988	3,5914	3,3662
<b>11</b>	12,1040	3,2289	3,1862
<b>12</b>	10,3379	4,7483	3,5500
<b>13</b>	12,1525	2,9686	3,4064
<b>14</b>	11,4268	3,4658	3,6897
<b>15</b>	12,3169	3,0804	3,1058
<b>16</b>	11,4524	3,4501	3,6778
<b>17</b>	10,6788	4,4441	3,4913
<b>18</b>	10,7662	3,5686	4,3161
<b>19</b>	11,7989	3,1268	3,6329
<b>20</b>	11,6894	3,4607	3,4032

**Tabela C.7:** Resultado das simulações de hidrólise enzimática no tempo 3h para nível inferior (-) e superior (+) dos parâmetros utilizados no planejamento Plackett – Burman.

<b>Tempo</b>	<b>3 h</b>		
<b>corridas</b>	<b>celulose (g/L)</b>	<b>celobiose (g/L)</b>	<b>glicose (g/L)</b>
<b>1</b>	8,0908	3,32944	7,54283
<b>2</b>	8,04515	3,37615	7,54442
<b>3</b>	7,983	3,814	7,15247
<b>4</b>	8,18579	4,12315	6,60144
<b>5</b>	7,25694	4,24127	7,50991
<b>6</b>	7,0838	3,85498	8,10919
<b>7</b>	6,63056	4,05465	8,40293
<b>8</b>	7,5203	3,6056	7,88641
<b>9</b>	9,12736	2,5365	7,22518
<b>10</b>	7,88352	3,89791	7,17472
<b>11</b>	8,27739	3,71436	6,93003
<b>12</b>	6,19873	5,28482	7,58774
<b>13</b>	8,38949	3,24149	7,30331
<b>14</b>	7,53666	3,67501	7,79513
<b>15</b>	8,74256	3,42637	6,71603
<b>16</b>	7,52295	3,6939	7,79049
<b>17</b>	6,72445	4,90345	7,40474
<b>18</b>	6,75004	3,54191	8,80998
<b>19</b>	8,14884	3,27259	7,53816
<b>20</b>	7,94358	3,80024	7,21078

**Tabela C.8:** Resultado das simulações de hidrólise enzimática no tempo 6h para nível inferior (-) e superior (+) dos parâmetros utilizados no planejamento Plackett – Burman.

<b>Tempo</b>	<b>6 h</b>			
	<b>corridas</b>	<b>celulose (g/L)</b>	<b>celobiose (g/L)</b>	<b>glicose (g/L)</b>
<b>1</b>		5,7797	2,6597	10,8180
<b>2</b>		5,6718	2,7441	10,8490
<b>3</b>		5,6651	3,1839	10,3934
<b>4</b>		5,7747	3,6228	9,8093
<b>5</b>		4,8245	3,5458	10,9471
<b>6</b>		4,7506	3,0392	11,5627
<b>7</b>		4,2892	3,1431	11,9663
<b>8</b>		5,1331	2,8712	11,3143
<b>9</b>		6,8421	2,0062	10,3247
<b>10</b>		5,5752	3,2389	10,4354
<b>11</b>		5,8164	3,1970	10,2113
<b>12</b>		3,8912	4,4244	11,0597
<b>13</b>		5,9462	2,6709	10,6211
<b>14</b>		5,1568	2,9351	11,2206
<b>15</b>		6,3964	2,9205	9,8575
<b>16</b>		5,0814	2,9865	11,2503
<b>17</b>		4,4040	4,1415	10,7873
<b>18</b>		4,3446	2,6623	12,4110
<b>19</b>		5,8361	2,6207	10,7964
<b>20</b>		5,5722	3,1903	10,4900

**Tabela C.9:** Resultado das simulações de hidrólise enzimática no tempo 12 h para nível inferior (-) e superior (+) dos parâmetros utilizados no planejamento Plackett – Burman.

<b>Tempo corridas</b>	<b>12 h</b>		
	<b>celulose (g/L)</b>	<b>celobiose (g/L)</b>	<b>glicose (g/L)</b>
<b>1</b>	3,8106	1,5646	14,1607
<b>2</b>	3,6205	1,6584	14,2732
<b>3</b>	3,7188	1,9871	13,8179
<b>4</b>	3,7662	2,4076	13,3223
<b>5</b>	2,8558	2,1933	14,5604
<b>6</b>	2,8370	1,7505	15,0475
<b>7</b>	2,4790	1,7284	15,4689
<b>8</b>	3,1869	1,6497	14,7646
<b>9</b>	4,7872	1,1803	13,4795
<b>10</b>	3,6446	2,0126	13,8736
<b>11</b>	3,7045	2,0682	13,7484
<b>12</b>	2,1876	2,7483	14,7189
<b>13</b>	3,8192	1,6326	14,0795
<b>14</b>	3,2141	1,6979	14,6837
<b>15</b>	4,3078	1,8998	13,2547
<b>16</b>	3,0567	1,7628	14,7903
<b>17</b>	2,5716	2,6392	14,4068
<b>18</b>	2,4311	1,4046	15,8630
<b>19</b>	3,8621	1,5452	14,1238
<b>20</b>	3,5462	2,0160	13,9793

**Tabela C.10:** Resultado das simulações de hidrólise enzimática no tempo 24 h para nível inferior (-) e superior (+) dos parâmetros utilizados no planejamento Plackett – Burman.

<b>Tempo</b>	<b>24 h</b>		
<b>corridas</b>	<b>celulose (g/L)</b>	<b>celobiose (g/L)</b>	<b>glicose (g/L)</b>
<b>1</b>	2,4295	0,5726	16,7410
<b>2</b>	2,1489	0,6347	16,9876
<b>3</b>	2,3714	0,7779	16,5894
<b>4</b>	2,3925	1,0201	16,3110
<b>5</b>	1,5538	0,8356	17,4379
<b>6</b>	1,5511	0,6144	17,6737
<b>7</b>	1,3568	0,5493	17,9583
<b>8</b>	1,8963	0,5696	17,3370
<b>9</b>	3,2555	0,4484	15,9533
<b>10</b>	2,3136	0,7835	16,6479
<b>11</b>	2,2028	0,8532	16,6976
<b>12</b>	1,1777	1,0426	17,6380
<b>13</b>	2,2833	0,6330	16,8400
<b>14</b>	1,9225	0,5922	17,2841
<b>15</b>	2,7433	0,8110	16,1411
<b>16</b>	1,6847	0,6357	17,5027
<b>17</b>	1,3860	1,0590	17,3892
<b>18</b>	1,2139	0,4311	18,2417
<b>19</b>	2,4735	0,5678	16,6971
<b>20</b>	2,1073	0,8121	16,8470

**Tabela C.11:** Resultado das simulações de hidrólise enzimática no tempo 36 h para nível inferior (-) e superior (+) dos parâmetros utilizados no planejamento Plackett – Burman.

<b>Tempo</b>	<b>36 h</b>		
<b>corridas</b>	<b>celulose (g/L)</b>	<b>celobiose (g/L)</b>	<b>glicose (g/L)</b>
<b>1</b>	1,9373	0,2379	17,6407
<b>2</b>	1,6055	0,2752	17,9704
<b>3</b>	1,8949	0,3302	17,5907
<b>4</b>	1,9113	0,4512	17,4451
<b>5</b>	1,1055	0,3462	18,4517
<b>6</b>	1,1036	0,2473	18,5579
<b>7</b>	0,9971	0,2014	18,7246
<b>8</b>	1,4579	0,2247	18,1878
<b>9</b>	2,6832	0,1961	16,8554
<b>10</b>	1,8443	0,3310	17,6461
<b>11</b>	1,6513	0,3802	17,8089
<b>12</b>	0,8633	0,4154	18,6481
<b>13</b>	1,7132	0,2772	17,8486
<b>14</b>	1,4824	0,2346	18,1500
<b>15</b>	2,1399	0,3766	17,2693
<b>16</b>	1,2045	0,2602	18,4322
<b>17</b>	0,9835	0,4498	18,4782
<b>18</b>	0,8154	0,1609	18,9693
<b>19</b>	1,9773	0,2369	17,5973
<b>20</b>	1,5786	0,3576	17,9135

**Tabela C.12:** Resultado das simulações de hidrólise enzimática no tempo 48 h para nível inferior (-) e superior (+) dos parâmetros utilizados no planejamento Plackett – Burman.

<b>Tempo</b>	<b>48 h</b>		
<b>corridas</b>	<b>celulose (g/L)</b>	<b>celobiose (g/L)</b>	<b>glicose (g/L)</b>
<b>1</b>	1,7176	0,1100	18,0197
<b>2</b>	1,3512	0,1337	18,4022
<b>3</b>	1,6826	0,1521	18,0144
<b>4</b>	1,6977	0,2107	17,9358
<b>5</b>	0,9036	0,1585	18,8738
<b>6</b>	0,9014	0,1137	18,9234
<b>7</b>	0,8453	0,0852	19,0158
<b>8</b>	1,2670	0,1001	18,5312
<b>9</b>	2,4217	0,0944	17,2532
<b>10</b>	1,6355	0,1519	18,0669
<b>11</b>	1,3933	0,1849	18,3015
<b>12</b>	0,7318	0,1761	19,0462
<b>13</b>	1,4455	0,1357	18,2952
<b>14</b>	1,2904	0,1047	18,5003
<b>15</b>	1,8495	0,1900	17,7888
<b>16</b>	0,9868	0,1209	18,8209
<b>17</b>	0,8032	0,2054	18,9360
<b>18</b>	0,6426	0,0715	19,2556
<b>19</b>	1,7555	0,1098	17,9778
<b>20</b>	1,3313	0,1729	18,3830

**Tabela C.13:** Resultado das simulações de hidrólise enzimática no tempo 60 h para nível inferior (-) e superior (+) dos parâmetros utilizados no planejamento Plackett – Burman.

<b>Tempo</b>	<b>60 h</b>		
<b>corridas</b>	<b>celulose (g/L)</b>	<b>celobiose (g/L)</b>	<b>glicose (g/L)</b>
<b>1</b>	1,6093	0,0546	18,1984
<b>2</b>	1,2179	0,0706	18,6169
<b>3</b>	1,5779	0,0747	18,2122
<b>4</b>	1,5925	0,1034	18,1657
<b>5</b>	0,8000	0,0795	19,0722
<b>6</b>	0,7976	0,0580	19,0975
<b>7</b>	0,7728	0,0401	19,1439
<b>8</b>	1,1741	0,0487	18,6886
<b>9</b>	2,2912	0,0482	17,4470
<b>10</b>	1,5326	0,0745	18,2628
<b>11</b>	1,2580	0,0969	18,5447
<b>12</b>	0,6692	0,0797	19,2174
<b>13</b>	1,3050	0,0720	18,5185
<b>14</b>	1,1970	0,0509	18,6609
<b>15</b>	1,6945	0,1024	18,0535
<b>16</b>	0,8749	0,0620	19,0074
<b>17</b>	0,7109	0,1011	19,1485
<b>18</b>	0,5562	0,0359	19,3891
<b>19</b>	1,6460	0,0547	18,1576
<b>20</b>	1,2016	0,0904	18,6142

**Tabela C.14:** Resultado das simulações de hidrólise enzimática no tempo 72 h para nível inferior (-) e superior (+) dos parâmetros utilizados no planejamento Plackett – Burman.

<b>Tempo</b>	<b>72 h</b>		
<b>corridas</b>	<b>celulose (g/L)</b>	<b>celobiose (g/L)</b>	<b>glicose (g/L)</b>
<b>1</b>	1,5533	0,0284	18,2884
<b>2</b>	1,1434	0,0395	18,7324
<b>3</b>	1,5237	0,0384	18,3107
<b>4</b>	1,5381	0,0528	18,2796
<b>5</b>	0,7430	0,0428	19,1742
<b>6</b>	0,7405	0,0317	19,1887
<b>7</b>	0,7358	0,0202	19,2060
<b>8</b>	1,1264	0,0249	18,7667
<b>9</b>	2,2232	0,0254	17,5467
<b>10</b>	1,4794	0,0382	18,3602
<b>11</b>	1,1824	0,0536	18,6742
<b>12</b>	0,6373	0,0383	19,2965
<b>13</b>	1,2264	0,0404	18,6392
<b>14</b>	1,1489	0,0261	18,7405
<b>15</b>	1,6070	0,0578	18,1977
<b>16</b>	0,8131	0,0340	19,1055
<b>17</b>	0,6601	0,0532	19,2555
<b>18</b>	0,5094	0,0195	19,4585
<b>19</b>	1,5893	0,0284	18,2483
<b>20</b>	1,1291	0,0500	18,7373