UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARLON GUALBERTO GANTER DE MOURA

HIDRÓLISE ENZIMÁTICA EM BATELADA ALIMENTADA DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR EXPLODIDO A VAPOR: MODELAGEM MATEMÁTICA E ESTUDOS DE SIMULAÇÃO DO PROCESSO

CURITIBA

2021

HIDRÓLISE ENZIMÁTICA EM BATELADA ALIMENTADA DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR EXPLODIDO A VAPOR: MODELAGEM MATEMÁTICA E ESTUDOS DE SIMULAÇÃO DO PROCESSO

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Química, no Programa de Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Pereira Ramos Coorientador: Prof. Dr. Marcos Lúcio Corazza

CURITIBA 2021

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP) UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA

Moura, Marlon Gualberto Ganter de

Hidrólise enzimática em batelada alimentada de bagaço de canade-açúcar explodido a vapor: modelagem matemática e estudos de simulação do processo / Marlon Gualberto Ganter de Moura. – Curitiba, 2021.

1 recurso on-line : PDF.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química.

Orientador: Luiz Pereira Ramos Coorientador: Marcos Lúcio Corazza

1. Hidrólise. 2. Enzimas. 3. Bagaço de cana. 4. Modelagem matemática. I. Universidade Federal do Paraná. II. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Ramos, Luiz Pereira. IV. Corazza, Marcos Lúcio. V. Título.

Bibliotecário: Elias Barbosa da Silva CRB-9/1894



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO SETOR DE CIENCIAS EXATAS UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO QUÍMICA -40001016026P2

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação QUÍMICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de MARLON GUALBERTO GANTER DE MOURA intitulada: HIDRÓLISE ENZIMÁTICA EM BATELADA ALIMENTADA DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR EXPLODIDO A VAPOR: MODELAGEM MATEMÁTICA E ESTUDOS DE SIMULAÇÃO DO PROCESSO, sob orientação do Prof. Dr. LUIZ PEREIRA RAMOS, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua <u>aprovação</u> no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 29 de Outubro de 2021.

UIZ PEREIRA RAMOS Presidente da Banca Examinadora

FERNANDO AŬĜUSTO PEDERSEN VOLL Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Jauciny Seon centro CLAUDINEY SOARES CORDEIRO Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Dedico este trabalho aos meus pais (Regina e João), com amor.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me permitiu estar presente no espaço e na época certos para chegar até este momento.

Aos meus pais, João Gualberto de Moura e Regina Beatriz de Ganter de Moura e ao meu irmão, Marcus Gualberto Ganter de Moura, por todo apoio e compreensão nos momentos em que estive ausente fisicamente. Pelo incentivo e amor incondicional de sempre. Vocês são a fonte de inspiração para tudo que faço.

Ao meu orientador, Professor Dr. Luiz Pereira Ramos por todos os conhecimentos transmitidos e pela constante disponibilidade em me ajudar.

Ao Professor Dr. Marcos Lúcio Corazza por sua dedicação na coorientação e pelos diversos conhecimentos transmitidos ao longo deste período.

Aos amigos que conheci no laboratório, Laís Pastre Dill, Débora Kochepka, Maria Juliane Suota, Thiago Alessandre Silva, Priscila Fernandes, Julio César Longato e professor Arion Zandoná Filho por toda a ajuda para expandir meus conhecimentos dentro e fora do ambiente de estudos.

Aos meus amigos de fora do ambiente acadêmico, Giuliano Madalosso, Tomaz Fialho Moscal, Jan Oliver Hoffman, Arion Monteiro Bach, Thaís Carvalho, Erik Marcon, Joaquim Moura, Henrique Leite, Ellen Cardoso, Gabriela Palka, Letícia Pereima, Magali Reixach, Henrique Bochonko, Bianca Ercole e Henrique Glasmeyer por se fazerem presentes mesmo a muitos quilômetros de distância, por me motivarem e me proporcionarem os melhores momentos de descontração.

À equipe da Coordenação e ao pessoal da secretaria pelo extremo zelo e dedicação aos seus trabalhos, que facilitaram o sucesso do meu.

Ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Química, pela compreensão nos momentos difíceis que existiram durante a pandemia do COVID-19.

Aos membros da banca de qualificação, Prof^a. Dr^a. Nádia Krieger e Prof. Dr. Claudiney Cordeiro, pelas diversas contribuições que ajudaram no aperfeiçoamento deste trabalho e no meu desenvolvimento.

Aos membros da banca de defesa, Profs. Drs. Claudiney Cordeiro e Fernando Augusto Pedersen Voll por aceitarem prontamente o convite e estarem dispostos a contribuir com a avaliação e correção desse trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química, pela oportunidade concedida.

Aos órgãos de fomento à pesquisa: CNPq, FINEP e Fundação Araucária, pelo apoio financeiro ao grupo de pesquisa.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho e acompanharam o meu progresso.

"A ciência será sempre uma busca, jamais uma descoberta real.

É uma jornada, nunca uma chegada."

(Karl Raimund Popper)

RESUMO

Amostras de bagaço de cana-de-açúcar de origem industrial foram pré-tratadas por explosão a vapor sob condições pré-otimizadas, lavadas com água para a remoção de inibidores e depois submetidas a experimentos de hidrólise enzimática com o objetivo de maximizar a produção de glucose. Ao todo, sete replicatas do prétratamento foram realizadas em condições de auto-hidrólise a 195 °C por 7,5 min. Então, análises por cromatografia de fase líquida foram realizadas na fração solúvel em água oriunda do pré-tratamento e em hidrolisados ácidos e enzimáticos do material pré-tratado, de modo a avaliar seus efeitos sobre a composição química do bagaço e determinar os diferentes rendimentos de processo. De modo geral, experimentos realizados nas mesmas condições revelaram similaridades na composição química dos produtos de pré-tratamento e nos rendimentos de hidrólise enzimática conforme normativa aplicada para avaliar a acessibilidade enzimática do material pré-tratado. As frações solúveis em água derivadas das diversas condições de pré-tratamento revelaram altas concentrações de pentoses como a xilose, além da inevitável formação de derivados furânicos, ácidos alifáticos e compostos fenólicos, que foram caracterizados por métodos cromatográficos de análise. A recuperação de glucanas, xilanas e lignina após o pré-tratamento, somando as frações solúvel e insolúvel em água, foi de 95%, 80% e 90% em média, respectivamente. A explosão a vapor do bagaço de cana revelou a possibilidade de uma remoção seletiva das hemiceluloses, produzindo materiais com teores de glucanas próximos a 55%, xilanas abaixo de 3% e lignina próximos a 33%. Em seguida, os experimentos de hidrólise enzimática foram organizados em um planejamento experimental Box-Behnken, que resultaram em diferentes valores de conversão de material em equivalentes de glucose. A enzima utilizada nesse trabalho foi a Cellic CTec3 (Novozymes), cuja atividade celulásica total foi de 225 FPU mL⁻¹ e o teor de proteína total foi de 252,3 mg g⁻¹ (peso úmido). A análise estatística dos dados experimentais indicou que o ponto de melhor rendimento de glucose livre após a hidrólise enzimática em batelada foi alcançado com o emprego de enzima de pelo menos 32,0 FPU g⁻¹ de glucanas para teores de sólidos totais acima de 15%. Após a realização desses ensaios, os dados coletados foram utilizados em um modelo matemático proposto por Godoy et al. (2019) para realizar simulações em batelada e batelada alimentada. Para esse último regime, diferentes estratégias de alimentação foram realizadas com a adição tanto de carga de substrato, quanto de carga de enzima como catalisador da reação. Com isso, foi possível demonstrar a viabilidade da estratégia de sólidos totais em batelada alimentada, porque a conversão de glucanas para glucose livre aumentou quase 10%, passando de 84 g L⁻¹ na melhor condição de batelada para 91 g L⁻¹ em regime de batelada alimentada com alimentação intermitente de substrato e enzima.

Palavras-chave: Hidrólise enzimática. Pré-tratamento. Bagaço de cana-de-açúcar. Otimização. Batelada alimentada. Modelagem matemática.

ABSTRACT

Industrial samples of sugar cane bagasse were pretreated by steam explosion using pre-optimized conditions and enzymatic hydrolysis experiments were performed with water-washed pretreated materials to remove inhibitors and improve glucose yields. Seven pretreatment experiments were carried out by steam explosion at 195 °C and 7,5 min. Acid and enzymatic hydrolysates were analysed by liquid chromatography to yield bagasse chemical composition and pretreatment mass balances. In general, different batches using the same pretreatment conditions produced the same changes in chemical composition, mass balance and enzymatic hydrolysis yields, which were performed according to an international standard to assess substrate accessibility. Steam explosion water-solubles showed high pentose concentration (mostly xylose and xylo-oligomers), besides furan derivatives, aliphatic acids and phenolic compounds that were chacarterized and quantifies by chromatographic analysis. The total mass recovery of glucans, xylans and lignin were 95%, 80% and 90% in average, respectively, inclusing the movieties found in water-soluble and water-insoluble fractions after the pretreatment. Steam explosion of sugarcane bagasse led to the selective removal of hemiceluloses, producing materials with glucan contents around 55%, low xylans (<3%) and 33% of lignin. Then, enzymatic hydrolysis experiments were organized in a Box-Behnken design and performed to release different values of glucose equivalents (glucose plus cellobiose), with cellobiose being a minor component of all reaction products. The best results were achieved using the highest levels of substrate total solids and enzyme loading. Cellic CTec3 (Novozymes) was the enzyme used in this study, whose total cellulase activity measured was 225 FPU mL⁻¹ and total protein was 252.3 mg g⁻¹ (wet weight). Statistical analysis of data showed that the best yield of free glucose after a batch enzymatic hydrolysis was achieved using at least 32 FPU g⁻¹ of glucan in total solids above 15%. After these tests, data were collected and they were used in the mathematical model of Godoy et al. (2019) to simulate batch and fed-batch enzymatic hydrolysis. In fed-batch system, different feeding strategies were assessed with the addition of both substrate and enzyme loads (reaction catalyst). As a result, it was possible to show the feasibility of fed-batch enzymatic hydrolysis with high total solids, since the glucan conversion on to free glucose increased almost 10%, from 84 g L⁻¹ on the best condition of batch system to 91 g L⁻¹ on the fed-batch enzymatic hydrolysis with substrate and enzyme feeding.

Key-words: Enzymatic hydrolysis. Pretreatment. Sugar cane bagasse. Optimization. Fed-batch. Matematical modeling.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - PROCESSO DE PRODUÇÃO DO ETANOL A PARTIR DA	
CANA-DE-AÇÚCAR. FONTE: Adaptado de Nova Cana (2021)	33
FIGURA 2 - ETAPAS DE PRODUÇÃO DO ETANOL 2G. FONTE: O autor	
(2021)	34
FIGURA 3 - DIAGRAMA DE PRODUÇÃO DE ETANOL CELULÓSICO	
BASEADA EM PRÉ-TRATAMENTOS ÁCIDOS COMO A	
EXPLOSÃO A VAPOR. FONTE: O Autor (2021)	35
FIGURA 4 - CADEIA LINEAR DA CELULOSE, INDICANDO A PRESENÇA	
DE CELOBIOSE COMO UNIDADE REPETITIVA, DE TERMINAIS	
REDUTORES (TR) E NÃO REDUTORES (TNR) E DA UNIDADE	
QUE CONTÉM A LIGAÇÃO GLICOSÍDICA β-(1→4). FONTE: O	
Autor (2021)	37
FIGURA 5 - DIFERENTES CONFORMAÇÕES DA GLUCOSE EM SOLUÇÃO	
AQUOSA. HIDROXILA EM AZUL: POSIÇÃO EQUATORIAL;	
HIDROXILA EM VERMELHO: POSIÇÃO AXIAL. FONTE:	
Adapatado de Clayden <i>et al</i> . (2012)	38
FIGURA 6 - LIGAÇÕES DE HIDROGÊNIO INTRAMOLECULARES E	
INTERMOLECULARES ENTRE AS CADEIAS LINEARES DE	
CELULOSE. FONTE: Adaptado de Fengel e Wegener (1989)	39
FIGURA 7 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE UMA HEMICELULOSE	
PRESENTE NO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR,	
MOSTRANDO OS GRUPOS SUBSTITUINTES COM A	
PRESENÇA DE ARABINOSE (VERDE), GRUPOS ACETILA	
(AZUL) E ÁCIDO GLUCURÔNICO (VERMELHO). FONTE:	
Adaptadao de Carvalho <i>et al.</i> (2017)	39
FIGURA 8 - ESTRUTURAS DOS ALCOÓIS CINÂMICOS PRECURSORES	
DA ESTRUTURA DA LIGNINA: (A) ÁLCOOL CONIFERÍLICO	
(GRUPO GUAIACILA); (B) ÁLCOOL SINAPÍLICO (GRUPO	
SIRINGILA); (C) ÁLCOOL p-COUMARÍLICO (GRUPO p-	
HIDROXIFENILA). FONTE: O Autor (2021).	40
FIGURA 9 - REPRESENTAÇÃO DOS DIFERENTES TIPOS DE LIGAÇÃO	
PRESENTES NA LIGNINA, EM QUE OS RETÂNGULOS COM	
TRAÇADO CONTÍNUO REPRESENTAM AS LIGAÇÕES ÉTER	

E	E OS DE TRAÇADO PONTILHADO, AS LIGAÇÕES C-C.	
F	-ONTE: CHIO <i>et al. (</i> 2019)	1
FIGURA 10 -	ESQUEMA REPRESENTATIVO DA ESTRUTURA	
	ORGANIZACIONAL DA PAREDE CELULAR DE PLANTAS	
	SUPERIORES. FONTE: Adaptado de U.S. DOE (2018) 4	3
FIGURA 11 -	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ALTERAÇÃO DA	
	ESTRUTURA LIGNOCELULÓSICA APÓS PRÉ-TRATAMENTO	
	BASEADO EM HIDRÓLISE ÁCIDA. FONTE: Adaptado de	
	Silveira <i>et al</i> . (2015)	4
FIGURA 12 -	ESQUEMA SIMPLIFICADO DA HIDRÓLISE ÁCIDA DE	
	CADEIAS DE XILANAS E GLUCANAS. ARABINOSE (1),	
	XILOSE (2), XILOOLIGÔMERO COM GRAU DE	
	POLIMERIZAÇÃO IGUAL A 3 (3) XILOOLIGÔMEROS DE ALTA	
	MASSA MOLAR (4), OLIGOSSACARÍDEOS ÁCIDOS (5),	
	GLUCOSE (6), CELOBIOSE (7) E CELOOLIGÔMEROS (8).	
	FONTE: Adaptado de Ramos (2003) 4	-5
FIGURA 13 -	ISOMERIZAÇÃO ACÍCLICA DA GLUCOSE. FONTE: Adaptado	
	de Rassmussen <i>et al.</i> (2014) 4	-6
FIGURA 14 -	FORMAÇÃO DE 5-(HIDROXIMETIL)-FURFURAL A PARTIR DA	
	FRUTOSE. FONTE: Adaptado de Rassmussen <i>et al</i> . (2014) 4	7
FIGURA 15 -	HIDRÓLISE ÁCIDA DA CELOBIOSE. FONTE: O Autor (2021) 4	.9
FIGURA 16 -	MODO DE AÇÃO DAS ENZIMAS ENDOGLUCANASES (EG),	
	CELOBIOHIDROLASES (CBH) Ε β-GLUCOSIDASES (βG).	
	FONTE: Adaptado de Pirich <i>et al.</i> (2020)5	j 1
FIGURA 17 –	ESQUEMA DE ABORDAGEM DE SOLUÇÃO DE UM	
	PROBLEMA GENÉRICO UTILIZANDO MODELAGEM	
	MATEMÁTICA. FONTE: Adaptado de Mitroff <i>et al. (</i> 1974)5	;9
FIGURA 18 -	ESQUEMA DO MODELO DE KADAM PARA A HIDRÓLISE	
	ENZIMÁTICA DE PALHA DE MILHO. FONTE: Kadam <i>et al.</i>	
	(2004)	62
FIGURA 19 -	ETAPAS DO PROJETO PROPOSTO PARA	
	DESENVOLVIMENTO DE UM NOVO MODELO PARA	
	OTIMIZAÇÃO DA PROCESSO EM BATELADA ALIMENTADA	
	PARA A HIDRÓLISE ENZIMÁTICA EM ALTO TEOR DE	

	SÓLIDOS DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR PRÉ-	
	TRATADO A VAPOR. FONTE: O Autor (2021).	69
FIGURA 20 -	- DIAGRAMA DE BLOCOS DO PROCESSO DE PRÉ-	
	TRATAMENTO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR POR	
	EXPLOSÃO A VAPOR PARA A SUA SUBSEQUENTE	
	HIDRÓLISE ENZIMÁTICA. FONTE: O Autor (2021)	73
FIGURA 21 -	- RENDIMENTOS DE RECUPERAÇÃO MÁSSICA NAS	
	FRAÇÕES SÓLIDA E LÍQUIDA PARA OS DIFERENTES	
	EXPERIMENTOS DE PRÉ-TRATAMENTO POR EXPLOSÃO A	
	VAPOR DO BAGAÇO DE CANA NAS MESMAS CONDIÇÕES	
	DE 195 °C E TEMPO DE RESIDÊNCIA A 7,5 min. FONTE: O	
	Autor (2021).	82
FIGURA 22 -	- RECUPERAÇÃO DE (A) GLUCANAS E (B) XILANAS NOS	
	MATERIAIS PRÉ-TRATADOS E FRAÇÕES SOLÚVEIS EM	
	ÁGUA PARA OS EXPERIMENTOS DE EXPLOSÃO A VAPOR	
	DO BAGAÇO DE CANA A 195°C POR 7,5 min. FONTE: O Autor	
	(2021)	83
FIGURA 23 -	- CROMATOGRAMAS DA FRAÇÃO LÍQUIDA OBTIDA A	
	PARTIR DA EXPLOSÃO A VAPOR DO BAGAÇO DE CANA A	
	195 °C POR 7,5 min. FONTE: O Autor (2021)	84
FIGURA 24 -	- RENDIMENTO EM (A) GLUCOSE E (B) XILOSE A PARTIR DA	
	HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO BAGAÇO PRÉ-TRATADO	
	EMPREGANDO 60 FPU g ⁻¹ DE GLUCANA DE CELLIC CTec3 A	
	150 rpm POR 96 h. FONTE: O Autor (2021)	91
FIGURA 25 -	- GRÁFICOS DE VALORES OBSERVADOS VS. VALORES	
	PREDITOS EM GLUCOSE LIBERADA EM g L ⁻¹ DOS	
	RESULTADOS OBTIDOS A PARTIR DO PLANEJAMENTO	
	EXPERIMENTAL BOX-BEHNKEN, UTILIZANDO OS	
	RENDIMENTOS DE 48 h EM GLUCOSE (g L-1) AO LONGO DA	
	HIDRÓLISE ENZIMÁTICA COMO FUNÇÃO RESPOSTA.	
	FONTE: O Autor (2021).	94
FIGURA 26 -	- DIAGRAMA DE PARETO PARA OS RESULTADOS OBTIDOS	
	A PARTIR DA REALIZAÇÃO DO PLANEJAMENTO	

	EXPERIMENTAL DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA	
	EMPREGANDO 48 h DE REAÇÃO. FONTE: O Autor (2021)	95
FIGURA 27	- COMPARAÇÃO ENTRE OS VALORES EXPERIMENTAIS E	
	CALCULADOS PELO MODELO USANDO OS PARÂMETROS	
	CINÉTICOS APRESENTADOS POR GODOY et al. (2019)	
	PARA A HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO BAGAÇO EXPLODIDO	
	A VAPOR EM DIFERENTES CONDIÇÕES: (A) 8 FPU g ⁻¹	
	glucana; (B) 24 FPU g⁻¹ glucana E (C) 40 FPU g⁻¹ glucana.	
	FONTE: O Autor (2021).	97
FIGURA 28 -	– COMPARAÇÃO ENTRE OS VALORES EXPERIMENTAIS E	
	CALCULADOS PELO MODELO USANDO OS PARÂMETROS	
	CINÉTICOS AJUSTADOS NO PRESENTE TRABALHO PARA A	
	HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO BAGAÇO EXPLODIDO A	
	VAPOR EM DIFERENTES CONDIÇÕES: (A) 8 FPU g ⁻¹ glucana;	
	(B) 24 FPU g ⁻¹ glucana E (C) 40 FPU g ⁻¹ glucana. FONTE: O	
	Autor (2021)	00
FIGURA 29 ·	- CINÉTICA DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA EM BATELADA	
	ALIMENTADA DO BAGAÇO PRÉ-TRATADO A VAPOR.	
	SÍMBOLOS REPRESENTAM OS VALORES EXPERIMENTAIS	
	DA CONCENTRAÇÃO DE GLUCOSE E AS LINHAS	
	REPRESENTAM OS VALORES SIMULADOS. FONTE: O Autor	
	(2021)	02
FIGURA 30 -	– ANÁLISE DO RENDIMENTO EXPRESSO EM MASSA DE	
	EQUIVALENTE DE GLUCOSE EM GRAMAS PELO TEMPO DE	
	REAÇÃO. FONTE: O Autor (2021)	05
FIGURA 31 -	– RENDIMENTO DE GLUCOSE EM RELAÇÃO AO TEOR DE	
	GLUCANAS PRESENTE NO MEIO EM CADA TEMPO DE	
	REAÇÃO. FONTE: O Autor (2021)	06

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - F	FATORES E NÍVEIS UTILIZADOS NO PLANEJAMENTO	
E	EXPERIMENTAL	74
TABELA 2 - C	COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO BAGAÇO DE CANA	77
TABELA 3 - C	COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS NA	
(CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE AMOSTRAS DE BAGAÇO	
[DE CANA-DE-AÇÚCAR	80
TABELA 4 - V	/OLUMES COLETADOS E pH DAS FRAÇÕES SOLÚVEIS EM	
Á	ÁGUA APÓS O PRÉ-TRATAMENTO POR EXPLOSÃO A	
١	VAPOR DO BAGAÇO DE CANA A 195 °C POR 7,5 min	84
TABELA 5 - C	CONCENTRAÇÃO MÉDIA EM g L ⁻¹ DOS COMPONENTES	
F	PRESENTES NA FRAÇÃO LÍQUIDA DA EXPLOSÃO A VAPOR,	
A	ANTES E APÓS O PROCEDIMENTO PÓS-HIDRÓLISE	85
TABELA 6 - C	COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA FRAÇÃO INSOLÚVEL FINAL	
A	APÓS A UNIFORMIZAÇÃO DO MATERIAL (n = 5)	86
TABELA 7 - C	COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA FRAÇÃO INSOLÚVEL EM ÁGUA	
C	DOS DIFERENTES EXPERIMENTOS APÓS O PRÉ-	
Г	TRATAMENTO POR EXPLOSÃO A VAPOR DO BAGAÇO DE	
C	CANA A 195 ºC POR 7,5 min	87
TABELA 8 - E	BALANÇO DE MASSA OBTIDO PARA AS FRAÇÕES	
l	NSOLÚVEL E SOLÚVEL APÓS O PRÉ-TRATAMENTO POR	
E	EXPLOSÃO A VAPOR DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR	88
TABELA 9 – (CONCENTRAÇÕES DE GLUCOSE E XILOSE (g L-1) OBTIDAS	
A	A PARTIR DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DE	
ŀ	HIDRÓLISE ENZIMÁTICA EMPREGANDO 48 h DE REAÇÃO	92
TABELA 10 -	PARÂMETROS ESTATÍSTICOS OBTIDOS POR ANÁLISE DE	
,	VARIÂNCIA (ANOVA) DOS RESULTADOS OBTIDOS A	
I	PARTIR DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL BOX-	
I	BEHNKEN, UTILIZANDO OS RENDIMENTOS DE 48 h DE	
I	HIDRÓLISE ENZIMÁTICA COMO FUNÇÃO RESPOSTA	93
TABELA 11 -	VALORES ESTIMADOS NESSE TRABALHO DE ACORDO	
	COM O MODELO MATEMÁTICO UTILIZADO EM	

COMPARAÇÃO COM OS RESULTADOS ENCONTRADOS	
POR GODOY <i>et al</i> . (2019)	. 98
TABELA 12 - CONDIÇÕES REALIZADAS PARA AS REAÇÕES EM REGIME	
DE BATELADA ALIMENTADA	101

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

- ANOVA Análise de variância simples
- ANP Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
- BCA Ácido bicinconínico
- $\beta G \beta$ -Glucosidase
- BSA Proteína de soro bovino
- CBH Celobiohidrolases
- CBM módulo de ligação aos carboidratos (do inglês, carbohydrate binding module)
- CLC complexos lignina-carboidrato
- CONAB Companhia Nacional de Abastecimento
- DNS Ácido 3,5-dinitrosalicílico
- EG Endoglucanase
- EqGlc Equivalentes de glucose
- E_{iB} Concentração da enzima adsorvida em g proteína g⁻¹ de substrato
- E_{iF} Concentração de enzima livre em g proteína g⁻¹ de substrato
- FPU Unidades de filtro de papel (do inglês, Filter Paper Unit)
- G₂ Concentração de celobiose em g kg⁻¹
- HMF 5-(hidroximetil)-furfural
- K_{1IG} Constante de inibição da glucose na reação 1 em g kg⁻¹
- K_{1IG2} Constante de inibição da celobiose na reação 1 em g kg⁻¹
- K_{1IX} Constante de inibição de xilose em g kg⁻¹.
- K_{iad} Constante de Langmuir
- LPMO monoxigenases líticas de polissacarídeos
- NREL Laboratório Nacional de Energia Renovável (do inglês, National Renewable Energy Laboratory)
- RMSD Erro quadrático médio
- RSS Resíduo da soma dos quadrados
- R_s Reatividade do substrato (adimensional)
- S Concentração de substrato final em g kg⁻¹
- S₀ Concentração de substrato inicial em g kg⁻¹
- X Concentração de xilose em g kg⁻¹

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	.28
2 OBJETIVOS	.31
2.1 OBJETIVO GERAL	31
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	.32
3.1 ASPECTOS GERAIS SOBRE A PRODUÇÃO DE ETANOL NO BRASIL	32
3.2 ESTRUTURA E COMPOSIÇÃO DOS MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS	36
3.2.1 Celulose	36
3.2.2 Hemiceluloses	38
3.2.3 Lignina	40
3.2.4 Compostos extraíveis e não extraíveis	41
3.2.5 Estrutura hierárquica de materiais lignocelulósicos	42
3.3 PRÉ-TRATAMENTO DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS	43
3.4 HIDRÓLISE	48
3.4.1 Hidrólise ácida	48
3.4.2 Hidrólise enzimática	49
3.4.3 Hidrólise enzimática em alto teor de sólidos	55
3.5 MODELAGEM MATEMÁTICA DA CINÉTICA DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA	1
DE MATERIAS LIGNOCELULÓSICOS	57
4 MATERIAL E MÉTODOS	.68
4.1 ETAPAS DO TRABALHO	68
4.2 MATERIAL	68
4.3 MÉTODOS	68
4.3.1 Caracterização da enzima Cellic CTec3	68
4.3.2 Determinação da composição química do bagaço de cana	70
4.3.3 Explosão a vapor do bagaço de cana-de-açúcar	72
4.3.4 Composição química das frações solúvel e insolúvel em água	72
4.3.5 Ensaios de hidrolise enzimática	73
4.3.6 Modelagem matemática	74
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	.77
5.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR	77
5.2 EXPLOSÃO A VAPOR	81

5.3 Composição química dos materiais pré-tratados	85
5.4 Balanço de massa do pré-tratamento	86
5.5 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA	89
5.5.1 Determinação da atividade celulásica e do teor de proteína	89
5.5.1 Ensaios preliminares de acessibilidade enzimática do substrato	90
5.5.2 Pré-otimização das reações de hidrólise enzimática	92
5.5.3 Modelagem cinética da hidrólise enzimática	95
6 CONCLUSÃO	107
REFERÊNCIAS	108

1 INTRODUÇÃO

O uso de materiais lignocelulósicos para a produção de energia e combustíveis renováveis tem sido estudado nos últimos anos em diversos países. Dentre eles está o Brasil, onde há diversas contribuições científicas na área, com destaque para a utilização do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração (SILVA *et al.*, 2016; NEVES *et al.*, 2016; PITARELO *et al.*, 2016). O etanol de segunda geração (ou etanol celulósico) é assim denominado porque no Brasil o etanol de primeira geração é produzido por fermentação alcoólica da sacarose presente no caldo da cana-de-açúcar, empregando tecnologia já muito bem estabelecida no mercado, enquanto o etanol de segunda geração é obtido a partir de matérias-primas lignocelulósicas que não têm impacto algum sobre a segurança alimentar. Neste contexto, produzir etanol celulósico a partir do bagaço de cana-de-açúcar representa um benefício ao meio ambiente, visto que é um material lignocelulósico gerado como resíduo do processamento da planta para a produção tanto de açúcar como de etanol e parte deste material gerado nas usinas brasileiras ainda não tem uma destinação definida (JONKER *et al.*, 2015; CAVALETT *et al.*, 2017).

A produção de etanol celulósico ainda apresenta alguns desafios, uma vez que é baseada na fermentação dos carboidratos liberados pela hidrólise da celulose e das hemiceluloses. Assim, são requeridas etapas de processo prévias à fermentação, que compreendem o condicionamento da matéria-prima para evitar contaminações, o prétratamento e a hidrólise enzimática. Sabe-se que os principais componentes macromoleculares de materiais lignocelulósicos, celulose, hemiceluloses e lignina, apresentam forte interação molecular, o que lhes confere alta recalcitrância a processamentos químicos ou biológicos. Para reduzir essa recalcitrância é necessário realizar uma primeira etapa de pré-tratamento, que pode ser baseada em abordagens químicas, físicas, biológicas ou na combinação destas (SILVEIRA *et al.*, 2015). Nesse sentido, a explosão a vapor tem sido uma das técnicas mais amplamente empregadas devido a sua viabilidade econômica e elevada eficiência no fracionamento de materiais lignocelulósicos em correntes passíveis de conversão a produtos de grande interesse industrial, como biocombustíveis, biomateriais e insumos químicos de plataforma (GAUR *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2018).

A segunda etapa da produção de etanol celulósico é a hidrólise dos carboidratos presentes no material pré-tratado, que pode ser ácida ou enzimática, de modo a produzir açúcares fermentescíveis em alto rendimento. Atualmente, várias preparações enzimáticas encontram-se comercialmente disponíveis para este fim, no entanto, seu alto custo de produção prejudica a viabilidade econômica do processo. Assim, uma estratégia para reduzir custos é a realização da reação em altos teores de sólidos, isto é, quando a concentração de biomassa lignocelulósica é maior que 15% (m v⁻¹). O emprego de altos teores de sólidos pode diminuir os custos da produção de etanol celulósico por intensificar o processo de hidrólise e produzir altas concentrações de açúcares para a fermentação, resultando em concentrações de etanol no mosto fermentado que viabilizam a sua recuperação por destilação. Apesar disso, o emprego de sólidos totais elevados exige maiores cargas de enzima e maiores esforços de otimização para maximizar os fenômenos de transferência de massa e calor durante a hidrólise (GAO et al., 2014; FOCKINK et al., 2016; CHEN e LIU, 2017; HERNÁNDEZ-BELTRÁN e HERNÁNDEZ-ESCOTO, 2018; MUKASEKURU et al., 2018; GODOY et al., 2019).

As desvantagens da hidrólise enzimática em alta carga de sólidos podem ser contornadas pela adoção do modo de operação em batelada alimentada, que se refere à realização da reação em menores teores de sólidos iniciais (por exemplo, 5 a 10%) e aumento da carga de substrato no decorrer da reação até atingir a carga de sólidos necessária e suficiente para viabilizar o processo (ZHANG e LYND, 2004; LIU *et al.*, 2015; MUKASEKURU *et al.*, 2018). A compreensão dos fenômenos envolvidos na cinética da hidrólise enzimática empregando alto teor de sólidos em regime de batelada alimentada é importante para a otimização do processo e pode ser feita com o auxílio de modelos matemáticos, como o modelo descrito por Godoy *et al.* (2019) que foi utilizado como base para o desenvolvimento desse estudo.

Neste trabalho, o bagaço de cana-de-açúcar foi pré-tratado por explosão a vapor e os materiais produzidos nesta etapa foram posteriormente submetidos à hidrólise enzimática. A produção de açúcares fermentescíveis a partir da hidrólise enzimática foi tentativamente otimizada em incubadora de agitação orbital mediante o emprego de um planejamento fatorial Box-Behnken, usando como variáveis de processo o teor de sólidos, a carga enzimática e agitação do meio reacional. Os resultados obtidos no planejamento dedicado foram posteriormente utilizados para simulação de experimentos em regime de batelada e batelada alimentada por meio do auxílio do modelo matemático simplificado utilizado por Godoy *et al.* (2019). Finalmente, reações em batelada alimentada foram realizadas em reatores de 3 L para verificar a validade das cinéticas de reação. Com isso, buscou-se contribuir ao aumento da viabilidade de processos de conversão de segunda geração, como a produção de etanol celulósico, com um estudo que resultasse no aumento da conversão de glucanas em glucose utilizando estratégias de batelada alimentada com adição intermitente de substrato (bagaço de cana prétratado a vapor e lavado com água para a remoção de inibidores) e da preparação enzimática selecionada para os ensaios.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Otimizar a produção de açúcares fermentescíveis, majoritariamente hexoses, a partir do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor, utilizando hidrólise enzimática em regime de batelada alimentada e reações em altos teores de sólidos totais com auxílio de modelagem matemática na interpretação da cinética das reações.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

I. Produzir substratos celulósicos a partir de bagaço de cana-de-açúcar, empregando explosão a vapor em condições previamente otimizadas;

II. Maximizar o rendimento da hidrólise enzimática de substratos celulósicos derivados de bagaço de cana-de-açúcar, realizada em batelada, utilizando como base um planejamento tipo Box-Behnken com variação da carga enzimática, agitação e teor de sólidos totais em três níveis;

III. Realizar a análise estatística dos dados do planejamento Box-Behnken e em seguida validar o modelo estatístico;

IV. Utilizar um modelo cinético a partir das equações propostas por Godoy *et al*. (2019) para simular hidrólises enzimáticas em regime de batelada;

V. Utilizar as condições otimizadas obtidas pela modelagem matemática para simular hidrólises enzimáticas em batelada alimentada;

VI. Validar a simulação realizada mediante a condução de um experimento de batelada alimentada.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ASPECTOS GERAIS SOBRE A PRODUÇÃO DE ETANOL NO BRASIL

A utilização e o estudo de tecnologias sustentáveis vêm aumentando muito nos últimos tempos, principalmente nos setores de produção e uso de energia, devido a problemas ambientais relacionados à emissão de gases poluentes e às mudanças climáticas. Nesse sentido, a crescente pressão para diminuir o uso de combustíveis derivados do petróleo incentiva a pesquisa para aumentar a produção e uso de biocombustíveis líquidos como o etanol e o biodiesel, setores em que o Brasil se destaca mundialmente (BRASIL, 2020). Além disso, no Brasil, há leis como a que criou a Política Nacional de Biocombustíveis (Lei nº 13.576/2017) e o programa RenovaBio, cujos objetivos visam contribuir e promover a expansão dos biocombustíveis na matriz energética em concordância com as diretrizes estabelecidas pelo Acordo de Paris (DIAL *et al.*, 2015).

No Brasil, a produção de etanol dito de primeira geração, ou etanol sacarínico, é produzido majoritariamente a partir da sacarose presente no caldo de cana-de-açúcar. Essa atividade, paralelamente à produção de açúcar (sacarose) em suas diferentes formas, fez com que o Brasil se tornasse o maior produtor mundial dessa matéria-prima. Apesar disso, verificou-se recentemente uma redução significativa na área cultivada de cana-de-açúcar no país, com consequências sobre as estimativas de produção para a safra 2020/21 segundo o levantamento realizado pela Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), em comparação à safra anterior. Percebeu-se que, no terceiro levantamento do ano de 2020, a produção de etanol apresentará redução de 7,9%, saindo de 35,7 bilhões de litros no exercício passado para 32,9 bilhões de litros ao final da safra atual do ano de 2021 (CONAB, 2021). A CONAB atribui essas reduções à pandemia e à ocorrência de um clima mais seco ao longo da safra 2020/21 (CONAB, 2020).

O etanol brasileiro é produzido majoritariamente pela fermentação da sacarose presente no caldo da cana-de-açúcar e as tecnologias envolvidas nesse processo já estão muito bem consolidadas. Conforme mostrado na FIGURA 1, o processamento da cana-de-açúcar inicia-se com a colheita, que pode ser manual ou mecanizada, seguida

de uma etapa de pré-lavagem (etapa 1). A seguir, o produto segue para um picador (etapa 2), que tem a função de facilitar o processo de moagem para extração do caldo (etapa 3). O caldo é então clarificado para remover impurezas, para depois seguir para um tanque de decantação (etapa 4). Posteriormente, o caldo clarificado é esterilizado (etapa 5) para então ser transferido para as dornas de fermentação, onde é inoculado com o fermento para a produção de etanol e gás carbônico (etapa 6). O mosto fermentado é depois submetido a uma etapa de destilação (etapa 7), que poderá ser desidratado ou não a etanol anidro para ser transferido para tanques de armazenamento (etapa 8). Finalmente, o produto segue para caminhões tanque, que são responsáveis pela distribuição do produto.



FIGURA 1 - PROCESSO DE PRODUÇÃO DO ETANOL A PARTIR DA CANA-DE-AÇÚCAR. FONTE: Adaptado de Nova Cana (2021).

O volume da produção de etanol sacarínico, também denominado etanol de primeira geração (E1G), é de aproximadamente 78 L por tonelada de cana-de-açúcar processada. Esse processo também gera uma quantidade significativa de resíduos sólidos, na forma da palha e do bagaço de cana-de-açúcar. Tais materiais são comumente utilizados nas usinas de etanol para a geração de energia e vapor, mas parte de sua produção tem sido considerada estratégica para a produção de etanol celulósico ou de segunda geração (E2G) (CLARK *et al.*, 2012).

O E2G é produzido a partir de materiais lignocelulósicos por uma sequência de etapas que se encontram ilustradas na FIGURA 2. Essas etapas incluem o prétratamento, a hidrólise enzimática, a fermentação de hexoses e/ou pentoses, a recuperação do etanol por destilação e o tratamento dos efluentes gerados no processo (SILVEIRA *et al.*, 2015).



FIGURA 2 - ETAPAS DE PRODUÇÃO DO ETANOL 2G. FONTE: O autor (2021).

As técnicas de pré-tratamento mais recorrentes em projetos de E2G são baseadas no conceito de hidrólise ácida. Nessa etapa, a matéria-prima lignocelulósica é submetida a condições que favorecem a remoção de grande parte das hemiceluloses, com o consequente aumento da acessibilidade das glucanas (majoritariamente celulose) às enzimas envolvidas na etapa de hidrólise. Posteriormente, durante a fermentação, as pentoses e hexoses oriundas das hemiceluloses por hidrólise ácida e do substrato pré-tratado por hidrólise enzimática são convertidas em etanol que, por fim, é recuperado do mosto fermentado por destilação. É importante salientar que, durante o pré-tratamento, diferentes tipos de compostos inibitórios podem ser formados, como furfural, 5-(hidroximetil)-furfural (HMF), ácidos orgânicos e compostos fenólicos. Assim, dependendo da concentração destes, faz-se necessária a introdução de uma etapa de destoxificação antes da etapa de fermentação, que é feita para a retirada de compostos inibitórios (SILVEIRA *et al.*, 2015). A FIGURA 3 representa um diagrama de produção de etanol celulósico baseado em pré-tratamentos ácidos como a explosão a vapor.

De acordo com o Laboratório Nacional de Energia Renovável (NREL, do inglês *National Renewable Energy Laboratory*), as tecnologias E2G podem ser vistas como plataforma para o desenvolvimento de biorrefinarias, que visam maximizar a conversão

da biomassa em um espectro de produtos passíveis de comercialização como combustíveis, energia, ração animal, bioprodutos e insumos para a indústria química. Assim, coprodutos como compostos furânicos podem ser destinados à síntese de polímeros e produtos de química fina, enquanto resíduos provenientes da etapa de hidrólise enzimática, ricos em lignina, podem ter diferentes destinações como a produção de bioóleo (WANG *et al.*, 2013), materiais compósitos (BAKER e RIALS, 2013), vanilina (ARAUJO *et al.*, 2010) e ácido adípico (DAVIS *et al.*, 2013), entre outros. No entanto, em muitos casos, a produção desses compostos a partir de recursos renováveis ainda enfrentam barreiras tecnológicas como a obtenção de rendimentos que tornem os processos economicamente viáveis e de produtos que apresentem propriedades comparáveis às obtidas por meio da rota petroquímica (LALANNE *et al.*, 2021).



FIGURA 3 - DIAGRAMA DE PRODUÇÃO DE ETANOL CELULÓSICO BASEADA EM PRÉ-TRATAMENTOS ÁCIDOS COMO A EXPLOSÃO A VAPOR. FONTE: O Autor (2021). Dentre as dezenas de usinas produtoras de etanol no país, duas envolvem tecnologias de produção de segunda geração: a usina Bioflex da GranBio, localizada em São Miguel dos Campos (AL), que utiliza a palha de cana como matéria-prima, e a usina Costa Pinto da Raízen, localizada em Piracicaba (SP), que emprega o bagaço da cana. Essas duas usinas produziram juntas 6,11 milhões de litros de E2G entre 2019 e 2020, processando 106,36 mil toneladas de bagaço e palha de cana, sendo 81,34 mil toneladas em 2019 e 25,03 mil toneladas em 2020. Apesar dessa evolução, a tecnologia E2G ainda apresenta gargalos tecnológicos como a necessidade de melhorias nas etapas de prétratamento, hidrólise enzimática e fermentação, visando aumentar a eficiência dos processos, diminuir custos e ampliar a escala de produção (ANP, 2020; ROBAK e BALCEREK, 2018).

3.2 ESTRUTURA E COMPOSIÇÃO DOS MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

A estrutura da parede celular de materiais lignocelulósicos, como bagaço e palha de cana de cana-de-açúcar, é caracterizada pela forte interação entre três componentes macromoleculares: celulose, hemiceluloses e lignina (RAMOS, 2003). Portanto, é importante entender a natureza do arranjo estrutural e a composição química desses materiais para propor estratégias que minimizem o impacto de fatores adversos ao processo de obtenção de etanol celulósico.

3.2.1 Celulose

A celulose foi descoberta pelo cientista francês Anselme Payen em 1838, quando percebeu a presença de um material sólido fibroso altamente resistente que era recuperado de tecidos vegetais após tratamento com ácido e amônia. Este cientista também foi responsável por determinar a fórmula química da celulose ($C_6H_{10}O_5$) (FRENCH *et al.,* 2003).

A celulose é um homopolissacarídeo linear formado por unidades de Dglucopiranose unidas por ligações glicosídicas β do tipo (1 \rightarrow 4) (HON, 2000). O tamanho da cadeia da celulose é dado pelo grau de polimerização (GP), que revela o número de resíduos D-anidroglucopiranosil que se encontram interligados. O GP da celulose pode variar de acordo com a origem do material que, segundo Hallac e Ragauskas (2011), vai de 300 na celulose microcristalina a mais de 10000 em celulose bacteriana e algumas fibras de ocorrência natural.

A FIGURA 4 mostra que as cadeias de celulose assumem uma disposição linear devido à orientação equatorial da hidroxila anomérica (anômero β) e sua ligação com a posição 4 da unidade adjacente (RAMOS, 2003; SILVEIRA *et al.*, 2014). Os dois terminais da cadeia linear da celulose são chamados de redutor e não redutor. Terminal não redutor é aquele cujo carbono anomérico está envolvido em uma ligação glicosídica. Já o terminal redutor tem a hidroxila no carbono anomérico livre, sendo, portanto, suscetível ao fenômeno de mutarrotação, que é responsável pela possibilidade de ocorrência de substituintes anoméricos em posição axial (α) ou equatorial (β).



celobiose

FIGURA 4 - CADEIA LINEAR DA CELULOSE, INDICANDO A PRESENÇA DE CELOBIOSE COMO UNIDADE REPETITIVA, DE TERMINAIS REDUTORES (TR) E NÃO REDUTORES (TNR) E DA UNIDADE QUE CONTÉM A LIGAÇÃO GLICOSÍDICA β-(1→4). FONTE: O Autor (2021).

A FIGURA 5 mostra a estrutura da glucose em solução aquosa, que se apresenta com 66% das hidroxilas anoméricas na posição equatorial (hidroxila em azul) e 33% na posição axial (hidroxila em vermelho), restando apenas 1% do carboidrato na forma de cadeia alifática aberta. As diferentes proporções mostradas para os confôrmeros da glucose indicam que a estrutura mais estável é aquela com a hidroxila anomérica em posição equatorial, fato explicado por ser o estado de menor energia, com a ligação C-O em orientação anti-periplanar em relação à ligações C-C de C2 e C3, enquanto para a posição axial a ligação C-O teria orientação sinclinal (*gauche*). A posição anti-periplanar é mais estável porque os grupos mais volumosos de cada carbono (C2 e C3) estão mais distantes entre si, causando um menor efeito estérico.



FIGURA 5 - DIFERENTES CONFORMAÇÕES DA GLUCOSE EM SOLUÇÃO AQUOSA. HIDROXILA EM AZUL: POSIÇÃO EQUATORIAL; HIDROXILA EM VERMELHO: POSIÇÃO AXIAL. FONTE: Adapatado de Clayden *et al.* (2012).

A orientação equatorial dos grupos hidroxila remanescentes dos resíduos de Danidroglucopiranose possibilita a formação de uma rede de ligações de hidrogênio intrae intermoleculares, que promovem a agregação das cadeias celulósicas em fibrilas elementares termodinamicamente estáveis e com alto grau de cristalinidade (FIGURA 6). Essa rede confere ao agregado elevada resistência à tensão, tornando a celulose insolúvel em muitos solventes polares e explicando parcialmente a sua baixa suscetibilidade à hidrólise (DING e HIMMEL, 2006). No entanto, algumas regiões da estrutura da celulose podem apresentar menor organização supramolecular ou maior caráter amorfo e, por consequência, são mais acessíveis às reações de hidrólise (LAUREANO-PEREZ *et al.*, 2005).

3.2.2 Hemiceluloses

As hemiceluloses são heteropolissacarídeos normalmente ramificados que podem ser formados por diversas unidades, incluindo pentoses (D-xilose e L-arabinose), hexoses (D-glucose, D-galactose, D-manose) e, em alguns casos, grupos acetila e ácidos urônicos (ácidos D-glucurônico e 4-O-metil-D-glucurônico). A composição das hemiceluloses é variável e dependente da espécie da planta e do tipo de tecido vegetal. As estabilidades térmica e química desses compostos são menores quando comparadas às da celulose, devido ao seu menor grau de polimerização, entre 100 a 200, e pela presença de substituintes que se dispõem ao longo da cadeia principal (RAMOS, 2003). Esses polissacarídeos encontram-se ligados à lignina por ligações covalentes e interações mais fracas como ligações de hidrogênio e de Van der Waals, formando complexos lignina-carboidrato (CLC). Já com a celulose predominam interações do tipo ligação de hidrogênio envolvendo hidroxilas primárias e secundárias, carboxilas e um dos pares não ligantes do oxigênio do anel.



FIGURA 6 - LIGAÇÕES DE HIDROGÊNIO INTRAMOLECULARES E INTERMOLECULARES ENTRE AS CADEIAS LINEARES DE CELULOSE. FONTE: Adaptado de Fengel e Wegener (1989).

А FIGURA 7 mostra representação esquemática de а uma arabinoglucuronoxilana típica de bagaço de cana-de-açúcar. Nessa figura há a presença de grupamentos unidos à cadeia principal por ligações O-2 e O-3, que se encontram representados em diferentes cores. A arabinose é mostrada em verde e está ligada ao oxigênio do carbono 3 da xilose (ligação O-3) como Xyl-3Ara. Já os grupamentos acetila estão representados em azul e estão ligados tanto ao carbono 3 quanto ao carbono 2 (ligação O-2) da xilose em unidades monossubstituídas (Xyl-3Ac, Xyl-2Ac) ou dissubstituídas (Xyl-2Ac-3Ac). A FIGURA 7 também apresenta o ácido 4-O-metil-Dglucurônico como substituinte da cadeia principal em ligação do tipo α -(1 \rightarrow 2). Esse resíduo, representado em vermelho, está ligado a um resíduo acetilado da xilose no carbono 3, sendo, portanto, identificado com a sigla Xyl-3Ac-2GlcA.



FIGURA 7 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE UMA HEMICELULOSE PRESENTE NO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR, MOSTRANDO OS GRUPOS SUBSTITUINTES COM A PRESENÇA DE ARABINOSE (VERDE), GRUPOS ACETILA (AZUL) E ÁCIDO GLUCURÔNICO (VERMELHO). FONTE: Adaptadao de Carvalho *et al.* (2017).

O grau de substituição influencia na solubilidade da cadeia de xilanas e na sua capacidade de se ligar à celulose por ligações de hidrogênio. Xilanas que possuem muitos substituintes são mais solúveis em água, enquanto cadeias lineares não substituídas são pouco solúveis em água e se ligam mais eficientemente à celulose.

3.2.3 Lignina

A lignina constitui a fração não-polissacarídica mais abundante da lignocelulose e é formada a partir de três precursores monoméricos, os álcoois *p*-coumarílico, coniferílico e sinapílico, denominados álcoois cinâmicos (FIGURA 8) (LIN e DENCE, 1992). Assim como nas hemiceluloses, a composição da lignina é característica da espécie e pode ser influenciada pelo ambiente em que a planta se desenvolve. No caso de gimnospermas (coníferas) como o pinus, a lignina é basicamente derivada do álcool coniferílico (grupos guaiacila, G), enquanto em angiospermas dicotiledôneas (folhosas) como o eucalipto, sua composição é majoritariamente formada pelos álcoois coniferílico e sinapílico (grupos guaiacila e siringila, G e S). Nas angiospermas monocotiledôneas (gramíneas) como a cana-de-açúcar, além desses dois álcoois cinâmicos existem unidades aromáticas não metoxiladas derivadas do álcool *p*-cumarílico (grupos *p*hidroxifenila, H) em menor quantidade (RALPH *et al.*; RAMOS, 2003).



FIGURA 8 - ESTRUTURAS DOS ALCOÓIS CINÂMICOS PRECURSORES DA ESTRUTURA DA LIGNINA: (A) ÁLCOOL CONIFERÍLICO (GRUPO GUAIACILA); (B) ÁLCOOL SINAPÍLICO (GRUPO SIRINGILA); (C) ÁLCOOL *p*-COUMARÍLICO (GRUPO *p*-HIDROXIFENILA). FONTE: O Autor (2021).

Para o desenvolvimento de um sistema produtivo inserido no conceito de biorrefinaria, a lignina tem grande importância como precursora para a produção de compostos fenólicos de interesse industrial, além de derivados de ácidos cinâmicos

como a vanilina (HOLLADAY *et al.*, 2007; LAURICHESSE e AVEROUS, 2014). Entretanto, a heterogeneidade de sua estrutura e os processos envolvidos no seu isolamento oferecem desafios para o seu aproveitamento de forma economicamente viável.

A lignina apresenta uma estrutura complexa e heterogênea, que é caracterizada pela presença de diversos tipos de ligação. A principal ligação é do tipo éter- β -arílica, que envolve cadeias alifáticas e anéis aromáticos (ligação β -O-4). Essa ligação corresponde a até 50% das ligações presentes nas ligninas de coníferas e até 60% nas de folhosas. Além disso, outros tipos de ligações também podem existir, que envolvem cadeias alifáticas C3 (β - β), cadeias alifáticas e anéis aromáticos (β -5') e carbonos aromáticos (5-5'), além de ligações 4-O-5' e dibenzodioxocina (DBDO). Os dois tipos principais de ligações podem ser divididos em ligações condensadas (carbono-carbono) e ligações do tipo éter, como é mostrado na FIGURA 9 (CHIO et al., 2019).



FIGURA 9 - REPRESENTAÇÃO DOS DIFERENTES TIPOS DE LIGAÇÃO PRESENTES NA LIGNINA, EM QUE OS RETÂNGULOS COM TRAÇADO CONTÍNUO REPRESENTAM AS LIGAÇÕES ÉTER E OS DE TRAÇADO PONTILHADO, AS LIGAÇÕES C-C. FONTE: CHIO *et al.* (2019).

3.2.4 Compostos extraíveis e não extraíveis

A biomassa também contém compostos orgânicos minoritários de baixa massa molar que não estão ligados diretamente à parede celular, denominados extraíveis. Estes compostos recebem tal denominação por serem extraídos da matriz por tratamento com solventes de polaridades distintas. Os extraíveis são responsáveis pela cor, cheiro, resistência natural ao apodrecimento, sabor e propriedades abrasivas características da planta (NEVES *et al., 2016*; D'ALMEIDA, 1988). A natureza e a proporção de tais compostos variam de acordo com o tipo da planta. Em folhosas podese encontrar de 2 a 3% de extraíveis, enquanto em coníferas e gramíneas esse percentual pode chegar a 10% e 26%, respectivamente (MORAIS *et al.*, 2012; SARTO e SANSIGOLO, 2010).

Os compostos extraíveis orgânicos podem conter terpenos, lignanas, estilbenos, flavonoides, ácidos fenólicos, ceras, ácidos graxos, alcoóis, esteróides e hidrocarbonetos, que podem ser removidos da estrutura lignocelulósica pela solubilização em solventes orgânicos como hexano, diclorometano, etanol e misturas de solventes com polaridades intermediárias. Por outro lado, materiais hidrossolúveis como carboidratos, dentre os quais se destacam sacarose, amido e substâncias pécticas, são usualmente extraídos por lavagem aquosa, podendo essa ser realizada a quente ou a frio (FENGEL e WEGENER, 1989; HON, 2000).

Os compostos não extraíveis, em geral, correspondem a cinzas insolúveis (compostos inorgânicos) e proteínas presentes no tecido vegetal (KLOCK *et al.*, 2005). Szczerbowski *et al.* (2014) demonstraram a presença de vários óxidos (CaO, MgO, MnO, K₂O, Na₂O, MnO, SrO, TiO₂, Fe₂O₃, Al₂O₃ e SiO₂) nas cinzas do bagaço e da palha de cana-de-açúcar. A origem de maioria desses compostos se deve a sua função no metabolismo das plantas, mas alguns outros, como Al₂O₃ e SiO₂, são atribuídos à contaminação com solo. Já a presença de TiO₂ e Fe₂O₃ foi relacionada à abrasão de facas e a eventos de corrosão de acessórios empregados no processamento da cana.

3.2.5 Estrutura hierárquica de materiais lignocelulósicos

A recalcitrância, definida pelo alto grau de interação entre os componentes majoritários de materiais lignocelulósicos (celulose, hemiceluloses e lignina), dificulta o uso desses materiais em processos de segunda geração, como é o caso do etanol celulósico. Para ilustrar esse fato, a FIGURA 10 apresenta um esquema da parede celular de cana-de-açúcar, no qual se observa microfibrilas de celulose embebidas em uma matriz formada por hemiceluloses, pectina, lignina e outros componentes. O alto grau de associação molecular presente no agregado justifica a necessidade da aplicação

de técnicas de pré-tratamento para aumentar a disponibilidade dos polissacarídeos constituintes à bioconversão por procedimentos de hidrólise e fermentação (CUNHA e SILVA, 2001; GÁMEZ *et al.*, 2006; RAMOS, 2003).



FIGURA 10 - ESQUEMA REPRESENTATIVO DA ESTRUTURA ORGANIZACIONAL DA PAREDE CELULAR DE PLANTAS SUPERIORES. FONTE: Adaptado de U.S. DOE (2018).

3.3 PRÉ-TRATAMENTO DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

A etapa de pré-tratamento de materiais lignocelulósicos é empregada para desconstruir a parede celular e reduzir a interação entre os seus principais constituintes estruturais, tornando-os suscetíveis à conversão química ou biológica (RAMOS, 2003; BALAT, 2011). Diversas técnicas de pré-tratamento já foram desenvolvidas e essas se classificam em processos físicos, químicos, biológicos ou possíveis combinações entre esses (SILVEIRA *et al.*, 2015). Como exemplo de processo físico tem-se a moagem, de químico o uso de hidrólise ácida e de biológico a ação de fungos e bactérias.

A FIGURA 11 fornece uma representação esquemática da desconstrução da estrutura da parede celular lignocelulósica após ser submetida a um tipo de prétratamento como a hidrólise ácida (SILVEIRA et al. 2015). Nesta figura, a lignina (em azul) é liberada na forma de complexos lignina-carboidrato devido a hidrólise parcial das hemiceluloses (em vermelho). A pectina (em verde) também é extraída e parcialmente hidrolisada, enquanto a celulose (em cinza), de alto grau de polimerização, sofre hidrólise ácida parcial em menor proporção. Dessa forma, as ligações são parcialmente quebradas e a estrutura desenvolve maior área superficial e volumetria de poros.



FIGURA 11 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ALTERAÇÃO DA ESTRUTURA LIGNOCELULÓSICA APÓS PRÉ-TRATAMENTO BASEADO EM HIDRÓLISE ÁCIDA. FONTE: Adaptado de Silveira *et al.* (2015).

3.3.1 Pré-tratamento por explosão a vapor

A explosão a vapor é uma técnica que combina pré-tratamentos físicos e químicos cuja proposta é ambientalmente amigável, uma vez que envolve apenas o uso de vapor de água sob alta pressão. Essa técnica, quando realizada na ausência de catalisadores exógenos, é denominada auto-hidrólise, uma vez que ácidos orgânicos derivados da própria matriz lignocelulósica (especialmente o ácido acético) funcionam como catalisadores para a despolimerização das hemiceluloses (SILVA *et al.,* 2018).

A explosão a vapor é uma das técnicas mais empregadas para o fracionamento dos componentes macromoleculares da biomassa (CHEN *et al.*, 2013). Como consequência de seu uso, as ligações que asseguram a coesão da estrutura da parede celular vegetal são fragilizadas e algumas são quebradas, levando a um aumento de área superficial de contato e diminuição da sua resistência à hidrólise química ou enzimática (PAN *et al.*, 2005; ROCHA *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2018). A FIGURA 12 apresenta os principais produtos de hidrólise ácida oriundos da explosão a vapor. Nesse processo, o ácido acético é liberado pela hidrólise dos grupamentos acetila das hemiceluloses em temperaturas acima de 160 °C (PAN *et al.*, 2005). Esse ácido catalisa a quebra das ligações do complexo lignina-carboidrato e provoca a solubilização de grande parte das próprias hemiceluloses, que passam a ser facilmente removidas por extração aquosa (ROCHA *et al.*, 2012).


FIGURA 12 - ESQUEMA SIMPLIFICADO DA HIDRÓLISE ÁCIDA DE CADEIAS DE XILANAS E GLUCANAS. ARABINOSE (1), XILOSE (2), XILOOLIGÔMERO COM GRAU DE POLIMERIZAÇÃO IGUAL A 3 (3) XILOOLIGÔMEROS DE ALTA MASSA MOLAR (4), OLIGOSSACARÍDEOS ÁCIDOS (5), GLUCOSE (6), CELOBIOSE (7) E CELOOLIGÔMEROS (8). FONTE: Adaptado de Ramos (2003).

Os compostos liberados em meio aquoso por hidrólise ácida de xilanas e glucanas podem ser identificados como arabinose (1), xilose (2), xilooligômeros com grau de polimerização igual a 3 (3) xilooligômeros de alta massa molar (4), oligossacarídeos com ácidos ligados (5), glucose (6), celobiose (7) e celooligômeros (8) (FIGURA 12). Tem-se então a presença de pentoses, hexoses, combinações entre esses e ácido acético, que são produtos oriundos das reações de hidrólise durante o processo de pré-tratamento. Além disso, a explosão a vapor também pode levar à formação de compostos furânicos a partir da isomerização cíclica e acíclica da glucose (RASMUSSEN *et al.*, 2014). Apesar de ambos os mecanismos serem encontrados na literatura, a isomerização cíclica é menos provável devido à formação de um estado de transição que contém um anel de três membros. Assim, a isomerização acíclica deve ser o mecanismo preferencial porque depende apenas do processo de abertura do anel hemiacetálico

(mutarrotação).

A proposta da isomerização acíclica da glucose ocorre com a protonação do oxigênio do anel. Em seguida, a hidroxila do carbono anomérico doa a sua densidade eletrônica, estabelecendo uma ligação dupla com o carbono e causando a abertura do anel piranosídico. Com a abertura do anel ocorre também uma etapa de enolização, cujo produto encontra-se em equilíbrio com a sua forma cetônica. Na sequência, o oxigênio da carbonila da cetona é protonado, favorecendo o ataque nucleofílico do oxigênio da hidroxila do carbono 5 sobre o carbono carbonílico, formando o anel de 5 membros da frutose conforme demonstrado na FIGURA 13. Posteriormente, a frutose obtida, independentemente do mecanismo de sua formação, sofre sucessivas etapas de desidratação que levam à formação do HMF (RASMUSSEN *et al.*, 2014).



(2014).

A proposta de formação de HMF a partir da frutose (FIGURA 14) inicia-se com a protonação do oxigênio da hidroxila ligada ao carbono hemiacetálico do anel. Então, ocorre a expulsão de uma molécula de água, formando um intermediário que tem dois

híbridos de ressonância, um que apresenta um carbocátion terciário e outro com carga positiva no oxigênio do anel de 5 membros, que é o mais estável porque tem todos os átomos da molécula com o octeto completo. O carbocátion sofre ataque nucleofílico por uma molécula de água, formando uma estrutura que contém uma hidroxila protonada. Em seguida, ocorre o deslocamento de um próton entre carbonos vicinais (protontropia), expulsando uma molécula de água e levando à formação de um enol que, por tautomeria, apresenta-se em equilíbrio com a sua forma aldeídica. Finalmente, ocorrem sucessivas protonações das hidroxilas presentes na estrutura, com a consequente liberação de três moléculas de água e de HMF como produto (RASMUSSEN *et al.*, 2014).



FIGURA 14 - FORMAÇÃO DE 5-(HIDROXIMETIL)-FURFURAL A PARTIR DA FRUTOSE. FONTE: Adaptado de Rassmussen *et al.* (2014).

As reações de desidratação da xilose seguem o mesmo mecanismo descrito para a glucose. Porém, a diferença está nos produtos de isomerização e desidratação, que correspondem à xilulose e ao furfural, respectivamente. Por outro lado, as cinéticas de reação são mais rápidas devido à maior instabilidade de seu anel hemiacetálico (anel de 5 membros) (RASMUSSEN *et al.*, 2014).

Mokomele *et al.* (2018) estudaram a explosão a vapor do bagaço de cana para a obtenção de etanol variando a temperatura de 185 °C a 215 °C e o tempo de reação de 10 a 15 min. O melhor resultado de recuperação mássica de sólidos insolúveis foi de 70%, obtido utilizando a condição de 185 °C e 15 min. Já o melhor resultado para a recuperação de glucanas resultou da condição de 215 °C e 10 min, na qual 86% do valor máximo teórico de glucose foi obtido. No entanto, esse experimento levou a uma maior degradação de xilanas, cujo rendimento mássico foi de apenas 1,72%. Da maneira semelhante, Silveira *et al.* (2018) avaliaram o efeito da explosão a vapor do bagaço de cana utilizando condições de 210 °C e 10 min e obtiveram rendimentos mássicos próximos de 57% para glucanas, 28% para a lignina e apenas 2% para hemiceluloses na fração insolúvel derivada do pré-tratamento.

3.4 HIDRÓLISE

3.4.1 Hidrólise ácida

A hidrólise ácida é a etapa em que ligações glicosídicas são rompidas com a subsequente liberação de oligos e monossacarídeos no meio aquoso. A FIGURA 15 apresenta o esquema de hidrólise da celobiose, cuja primeira etapa envolve a protonação do oxigênio da ligação glicosídica em processo que aumenta a suscetibilidade deste ao ataque nucleofílico que ocorre na sequência. Na etapa 2, o oxigênio do anel doa elétrons para o oxigênio protonado, liberando uma molécula de glucose e o intermediário de reação, cujos híbridos de ressonância estão representados na etapa 3. A protonação ocorre no oxigênio da ligação glicosídica porque a espécie formada a partir disso apresenta um carbocátion que é estabilizado por ressonância. A estrutura do intermediário apresenta uma densidade de carga positiva maior no carbono ligado diretamente ao oxigênio do anel (carbocátion) e esse carbocátion sofre o ataque nucleofílico de uma molécula de água (etapa 3). Então, há formação de uma estrutura com um oxigênio protonado, cujo próton é removido por uma molécula de água na etapa 4, levando à regeneração do catalisador da reação e à liberação do monossacarídeo (glucose), conforme apresentado na etapa 5 da Figura 15.



FIGURA 15 - HIDRÓLISE ÁCIDA DA CELOBIOSE. FONTE: O Autor (2021).

A hidrólise ácida apresenta como principal vantagem o baixo tempo de reação (menor que 2 h). No entanto, suas desvantagens envolvem a necessidade de uso de equipamentos específicos para evitar a corrosão e a ocorrência de reações secundárias que levam a perdas significativas de rendimento de processo, particularmente devidas ao uso de temperaturas de reação relativamente altas. Tais fatores reduzem as premissas de viabilidade tanto econômica quanto ambiental do processo.

3.4.2 Hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática de materiais celulósicos pode ser considerada vantajosa porque ocorre em condições normais de temperatura e pressão (25 °C e 1 atm) e não oferece problemas de corrosão de equipamentos. Contudo, tem como desvantagens o alto custo das enzimas e o tempo necessário para atingir bons rendimentos de reação (FENILA e SHASTRI, 2016; CHEN e LIU, 2017).

A hidrólise enzimática ocorre pela ação de três principais classes de hidrolases: endoglucanases, exoglucanases e β-glucosidases. Além dessas, outras atividades específicas podem estar presentes no secretoma de fungos e bactérias, bem como em preparações celulásicas comerciais, como diversos tipos de hemicelulases e monoxigenases líticas de polissacarídeos (LPMOs), além de proteínas não hidrolíticas como suoleninas e expansinas; no entanto, a existência dessas atividades auxiliares não será aprofundada nesse trabalho. As endoglucanases (EG) clivam as ligações glicosídicas preferencialmente nas regiões amorfas da celulose, reduzindo seu grau de polimerização e gerando novos terminais redutores e não redutores. O modo de ação das endoglucanases é atribuído ao seu sítio catalítico, cuja forma em fenda permite a ação catalítica em qualquer ponto ao longo da cadeia. As exoglucanases, também denominadas celobioidrolases (CBH), agem nas extremidades redutoras (CBH I) e não redutoras (CBH II), liberando principalmente a celobiose (FIGURA 16). As exoglucanases apresentam um sítio catalítico na forma de túnel e agem de maneira processiva a partir das extremidades; portanto, para exercerem a sua atividade catalítica, essas enzimas exigem que a cadeia de celulose penetre no túnel onde se encontra o sítio catalítico, promovendo a solubilização gradual do substrato com efeito relativamente pequeno sobre o grau de polimerização (SHOSEYOV et al., 2006; WILSON et al., 2011; PIRICH et al., 2020). Finalmente, as β-glucosidases (βG), que não são celulases verdadeiras, hidrolisam a celobiose à glucose. Vale ressaltar que estas enzimas são suscetíveis a fenômenos de inibição pelo acúmulo de seus produtos de reação. Assim, a glucose liberada inibe as β Gs, promovendo o acúmulo de celobiose que, por sua vez, inibe a ação das exoglucanases e compromete o sinergismo entre exo e endoglucanases (AHMED et al., 2019; DU et al., 2020).

No processo de hidrólise, há ainda a necessidade de adsorção da enzima ao substrato. Tanto endoglucanases quanto exoglucanases apresentam em suas estruturas um peptídeo não hidrolítico denominado módulo de ligação aos carboidratos (do inglês, *carbohydrate binding module* – CBM). O CBM é um domínio polipeptídico que possui uma região com alta afinidade à superfície das fibras de celulose. Em outras palavras, a função do CBM é concentrar as enzimas na interface líquido-sólido, promovendo o contato entre o substrato e o seu sítio catalítico de modo a assegurar a orientação correta desse em relação ao primeiro. A FIGURA 16 ilustra o modo de ação de endoglucanases, exoglucanases e β Gs sobre a estrutura da celulose (SHOSEYOV *et al.*, 2006; AHMED *et al.*, 2019; DU *et al.*, 2020; PIRICH *et al.*, 2020).

O efeito da ação cooperativa de duas ou mais enzimas para o aumento da eficiência de hidrólise é denominado sinergismo e o principal dentre as enzimas celulásicas é o do tipo endo-exo, ou seja, entre CBHs e EGs. O sinergismo que existe

entre essas enzimas depende de vários fatores, incluindo os tipos de enzima, suas afinidades pelo substrato, que pode ser mais cristalino ou amorfo, a concentração em que se encontram em uma mistura e as condições empregadas na hidrólise, como temperatura e velocidade de agitação (WOODWARD *et al.,* 2018).



FIGURA 16 - MODO DE AÇÃO DAS ENZIMAS ENDOGLUCANASES (EG), CELOBIOHIDROLASES (CBH) E β-GLUCOSIDASES (βG). FONTE: Adaptado de Pirich *et al.* (2020).

O sinergismo entre β Gs e celulases verdadeiras (CBHs ou EGs) também já foi relatado. Por exemplo, β Gs de *T. koningii* mostraram sinergismo com CBH, mas não apresentaram tal sinergismo com uma EG da mesma fonte (WOOD e MCCRAE, 1982). O sinergismo entre CBH e β G é explicado pelo fato de a β G ter o papel de hidrolisar a celobiose, um potente inibidor da atividade das CBHs. Esse sinergismo é conhecido há muito tempo (RAMOS *et al.* 1993) e ainda vem sendo estudado por vários autores para celulases das famílias *Trichoderma sp.* e *Aspergillus sp.* (ZHAO *et al.*, 2018; NAG *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2006; RAMOS *et al.* 1993). Nag *et al.* (2015) investigaram o sinergismo de um complexo de celulases e concluíram que a EG pode ter ação sinérgica com CBH. Zhao *et al.* (2018) desenvolveram culturas mistas de *T. reesei* recombinante e *Aspergillus niger* e demonstraram uma melhora significativa no desempenho do complexo celulásico produzido para a hidrólise enzimática de substratos celulósicos devido ao sinergismo. Kolasa *et al.* (2014) e Septiani *et al.* (2019) também desenvolveram estudos similares com *T. reesei* e vários microrganismos produtores de β G. Kolasa *et al.* (2014) concluíram que a cultura mista de *T. reesei* com diferentes cepas

de *Aspergillus* resultou em uma eficiência de aproximadamente 80% na hidrólise de palha de trigo pré-tratada por explosão a vapor, enquanto a hidrólise utilizando *T. reesei* apresentou eficiência de 50%, sugerindo a contribuição da interação sinérgica. Septiani *et al.* (2019) observaram que uma cultura mista de *Aspergillus niger* e *T. reesei* resultou em um aumento de 2,23 na atividade celulásica em relação às atividades celulásicas das monoculturas.

O processo de hidrólise enzimática pode ser realizado em três regimes: batelada, batelada alimentada e contínuo. No primeiro caso, todo o substrato é alimentado no início e todo o produto é removido de uma única vez ao final do tempo de residência; no segundo, o substrato é alimentado em intervalos definidos e o produto pode ser retirado em parcelas ou de uma única vez ao final do processo; e, no terceiro, a alimentação de substrato é contínua e a retirada de produtos ocorre simultaneamente (RAMOS *et al.*, 1993; PRISTAVKA *et al.*, 2000). A etapa de hidrólise enzimática em regime de batelada é caracterizada por uma queda gradual da velocidade da reação ao longo do tempo, devido ao fato de que regiões mais acessíveis da celulose (regiões amorfas) são hidrolisadas rapidamente no início da reação, enquanto áreas menos acessíveis (regiões cristalinas) têm velocidade reacional menor (VÄLJAMÄE *et al.*, 2003).

Fatores associados ao comportamento das enzimas também afetam a hidrólise enzimática da celulose, como a inibição retroativa devido ao acúmulo dos produtos de reação (glucose e celobiose) e a inibição pelos coprodutos oriundos do pré-tratamento, como compostos furânicos, ácidos fenólicos e alifáticos, além de oligômeros hidrossolúveis (e.g., xilo-oligômeros). A celobiose compromete a atividade das exoglucanases por inibição competitiva, enquanto a glucose exerce o mesmo efeito inibitório sobre as β G. Assim, a inibição das β G leva ao acúmulo de celobiose que, por sua vez, compromete a sinergia que existe entre endoglucanases e exoglucanases. Segundo Daniel *et al.* (1996), a perda de atividade ao longo do processo de hidrólise também pode ocorrer por desnaturação térmica e por efeitos de agitação mecânica (cisalhamento). Ainda, Shu *et al.* (2014) sugeriram que o aprisionamento das endoglucanases nas fibras, tornando-as improdutivas, é outro fator que influencia a hidrólise principalmente em alta concentração de sólidos. Essa hipótese também já havia sido relatada por outros autores, como Tengborg *et al.* (2001), Xiao *et al.* (2004), Rosgaard *et al.* (2007) e Wang *et al.* (2009).

A lignina também pode prejudicar o acesso das celulases ao componente celulósico. Parte das enzimas responsáveis pela hidrólise da celulose pode ser inativada por adsorção sobre a superfície da lignina, reduzindo a sua disponibilidade para exercer alguma ação catalítica. Uma estratégia para evitar esse problema é a adição de uma quantidade grande de β G no complexo enzimático, cuja afinidade à lignina via interações hidrofóbicas leva à formação de uma monocamada que impede o contato com celulases, deixando-as livres para atuar sobre a hidrólise da celulose. Além das βG, outros tipos de aditivos também vêm sendo investigados com esse propósito, como surfactantes não iônicos, saponinas e albumina de soro bovino, de modo a aumentar o rendimento de hidrólise enzimática por meio de diferentes mecanismos de ação (MOONEY et al., 1998; SUN e CHENG, 2002; WANG et al., 2003). Wang et al. (2020) avaliaram a influência do surfactante não iônico Tween 20 na hidrólise enzimática em baixo teor de sólidos de bagaço de cana pré-tratado a vapor e perceberam que houve aumento de quase 20% na conversão de glucanas. Já Bernardi et al. (2021) avaliaram a influência da adição de LPMOs e ßG no complexo enzimático Celluclast[®] 1.5L (Novozymes) e perceberam um aumento de quase quatro vezes em relação ao uso do complexo não aditivado na liberação de açúcares durante a hidrólise enzimática de bagaço de cana pré-tratado a vapor em baixo teor de sólidos totais.

A agitação também exerce um efeito muito importante na hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos. Nesse caso, o aumento da velocidade de agitação causa efeitos de cisalhamento provocados pelas pás de agitação e de aumento da interface ar/líquido pela formação de bolhas. No entanto, essa velocidade deve ser alta o suficiente para que a transferência de massa dentro do reator seja maximizada. Sugere-se, portanto, que uma agitação eficiente deva promover uma melhor transferência de massa e calor, além de favorecer a redistribuição das enzimas e a dispersão dos produtos da hidrólise, afastando-os dos sítios ativos das enzimas vicinais, o que reduz a inibição pelo acúmulo do produto. Apesar disso, as celobiohidrolases, que são enzimas processivas, são menos suscetíveis ao aumento da agitação do que as endoglucanases, que geralmente são enzimas não processivas (DIGAITIS *et al.*, 2020).

Digaitis *et al.* (2020) mostraram que uma agitação intermitente, mesmo quando mais rápida, é menos eficiente do que a agitação contínua mais lenta, em particular para garantir a redistribuição de enzimas como as endoglucanases. Isto pode estar

relacionado ao fato de a agitação vigorosa causar a desnaturação da estrutura da enzima. Ainda, a estabilidade da enzima durante a agitação também pode variar dependendo da sua fonte; por exemplo, celulases de *T. reesei* C 30 mostraram ser mais suscetíveis à desnaturação pela agitação do que as celulases de *T. reesei* QM 9414 (TENGBORG *et al.*, 2001).

Altas velocidades de agitação podem levar a uma maior velocidade inicial de reação, entretanto, com o tempo, esta taxa pode ser reduzida pela desnaturação enzimática ocasionada por fenômenos de cisalhamento (TENGBORG *et al.,* 2001). O efeito da agitação também pode ser influenciado pelo tipo do agitador e não somente pela velocidade de agitação. Enayati *et al.* (1995) relataram que um maior rendimento de glucose foi obtido a partir de materiais lignocelulósicos (casca de soja) ao se usar um agitador magnético a 1500 rpm do que ao empregar um rotor mecânico de agitação (380 rpm). Isso provavelmente se deve ao fato de que o cisalhamento ocasionado por um agitador mecânico.

A natureza do material a ser hidrolisado também deve ser considerada, visto que materiais mais acessíveis são liquefeitos mais rapidamente do que materiais menos acessíveis. Existe também o efeito da carga de sólidos, particularmente para hidrólises realizadas em alto teor de sólidos totais em que a viscosidade do meio é bastante elevada. Portanto, uma agitação inadequada pode levar a maiores problemas de transferência de massa e calor, bem como à não distribuição homogênea das enzimas, que podem reduzir o rendimento da hidrólise. Kadić *et al.* (2014) observaram que a velocidade de agitação afetou apenas a hidrólise enzimática em teores de sólidos superiores a 13% (*e.g.*, 300 rpm gerou resultados melhores de hidrólise do que 100 rpm). Mussato *et al.* (2008) investigaram a hidrólise enzimática de bagaço de malte pré-tratado com ácido diluído e observaram que dentre as velocidades de 100, 150 e 200 rpm e cargas enzimáticas de 5, 25 e 45 FPU/g substrato, a melhor condição foi obtida para 100 rpm e 45 FPU/g substrato, indicando que altas velocidades aumentaram o efeito de cisalhamento e não geraram resultados melhores para esse caso de estudo.

Devido aos efeitos complexos sinérgicos e antagônicos da agitação durante a hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos, é necessário determinar a velocidade ótima de agitação para liquefazer a biomassa o mais rapidamente possível sem causar

a desnaturação de componentes essenciais do complexo enzimático e, assim, obter ótimos rendimentos de hidrólise (DIGAITIS *et al.*, 2020).

3.4.3 Hidrólise enzimática em alto teor de sólidos

Em geral, o termo alto teor de sólidos é utilizado quando a quantidade de água livre no sistema reacional é baixa. Segundo Jorgensen et al. (2007), Liu et al. (2015), Chen e Liu (2017) e Du et al. (2020), essa condição é atingida quando o teor de sólidos é igual ou superior a 15% (m m⁻¹) em base seca. O emprego de altos teores de sólidos na hidrólise enzimática para a produção de etanol celulósico pode resultar em uma melhora significativa nos custos de produção. Humbird et al. (2010) realizaram um estudo técnico-econômico avaliando a carga de sólidos totais e os custos operacionais envolvidos na produção de etanol de segunda geração. Foi demonstrado que o emprego de 20% de sólidos é necessário para tornar o processo economicamente viável, já que concentrações de açúcares fermentescíveis entre 80 a 100 g L⁻¹ são exigidas para que a concentração de etanol no mosto fermentado seja de no mínimo 4% (m m⁻¹), limite a partir do qual o processo de destilação torna-se viável (ROCHE et al., 2009; YANG et al., 2011, MODENBACH e NOKES, 2013). Além disso, Silva et al. (2020) destacaram outros fatores que justificariam a realização da hidrólise em alto teor de sólidos, como a redução no tamanho e número dos equipamentos envolvidos, menor geração de resíduos e menor consumo de água em etapas de separação e lavagem.

A conversão da celulose é menor quando a hidrólise enzimática é realizada em alto teor de sólidos totais e esse fenômeno, denominado efeito de sólidos, foi bastante discutido por autores como Kristensen *et al.* (2009) e Coussot (2005). Em teores de sólidos totais superiores a 20%, há a formação de suspensões muito densas em que prevalece a ocorrência de interações fibrilares. Desse modo, a água permanece totalmente adsorvida na biomassa e, não havendo água livre no sistema, a viscosidade do meio aumenta substancialmente. Nessas condições, a agitação do material e a difusão das enzimas se tornam mais difíceis, diminuindo consideravelmente a eficiência da hidrólise (HODGE *et al.*, 2009; MODENBACH e NOKES, 2013).

Há duas principais frentes para abordagem do problema de transferência de massas ocasionado pelo alto teor de sólidos totais: otimizar o sistema de agitação e

empregar a estratégia de reação em batelada alimentada. A primeira abordagem explicase pela otimização do tempo de liquefação, que pode ser alterado aumentando-se a velocidade de agitação ou empregando-se um sistema de agitação de eixo rotativo vertical ou horizontal. Pino *et al.* (2018) avaliaram o tipo de agitação durante a hidrólise enzimática e verificaram que agitação e o desenho do reator influenciam na hdrólise enzimática, de modo a melhorar a transferência de massa durante a reação. A segunda abordagem explica-se pela adição de substrato de forma intermitente ao longo da reação. Como exemplo, pode-se iniciar a reação em baixo teor de sólidos (5 a 10%) e, em seguida, adicionar novas cargas de substrato no decorrer do tempo, de modo a atingir cargas totais iguais ou superiores a 20% (CHEN *et al.*, 2007; LIU *et al.*, 2015; EMANUEL, 2017, GODOY *et al.*, 2019).

A batelada alimentada apresenta vantagens técnicas e econômicas em relação aos outros regimes de hidrólise (ZHANG e LYND, 2004). Xu *et al.* (2019) estudaram a hidrólise enzimática em alto teor de sólidos totais (22% m v⁻¹) com batelada alimentada do bagaço de cana pré-tratado com base (solução de NaOH). Os autores conseguiram aumentar a eficiência da hidrólise enzimática empregando baixa dosagem de celulases (4 FPU g⁻¹ de biomassa seca) por meio da adição de enzimas acessórias e de outros aditivos como β G e surfactantes não iônicos. O uso de batelada alimentada forneceu os melhores resultados e a estratégia empregada foi a adição de 10% (m v⁻¹) de substrato no início da hidrólise e, então, acrescentar 5%, 4% e 3% (m v⁻¹) em 8, 12 e 16 h, respectivamente. Após 48 h de hidrólise, 122 g L⁻¹ de glucose foram produzidos para um rendimento em glucose de 80% e uma produtividade de 2,54 g L⁻¹ h⁻¹.

Mukasekuru *et al.* (2018) também empregaram batelada alimentada para aumentar a eficiência da hidrólise enzimática em alto teor de sólidos totais (20%), empregando bagaço de cana parcialmente deslignificado em meio alcalino. O uso de baixa dosagens de atividade celulásica (3 FPU g⁻¹ de substrato) foi investigado na ausência e na presença de vários aditivos como os já mencionados acima. Dentre todos os aditivos testados, Tween 80 foi o que apresentou maior contribuição para aliviar a inibição da lignina sobre a ação das celobiohidrolases, enquanto a albumina de soro bovino (BSA) colaborou para prevenir a adsorção de lignina sobre a celulose e o surfactante não iônico utilizado promoveu maior adsorção das enzimas ao substrato. O emprego de uma mistura de 40 mg de Tween 80, 10 mg de um surfactante não iônico e 20 mg de BSA por grama de substrato a ser hidrolisado foi capaz de aumentar o rendimento em glucose em 30% após 48 h de reação. A batelada alimentada também foi estudada com a adição de substrato de forma intermitente até 20% de sólidos totais e os rendimentos obtidos após 72 h foram de 83% e 90% de hidrólise de celulose e xilanas, respectivamente, com produção de 160 g L⁻¹ de açúcares fermentescíves.

Outra forma de otimizar o rendimento de hidrólise enzimática se dá por meio do emprego de um regime contínuo de reação, em que há a inserção contínua de material em um reator simultaneamente à retirada de produto formado. No entanto, essa configuração ainda enfrenta problemas de escalonamento devido à problema de transfer6encia de massa e energia, além de maior investimento de capital para a inserção de substrato e de enzima concomitantemente à retirada e separação dos produtos (QUIROGA *et al.*, 2015).

Geng *et al.* (2015) avaliaram três estratégias para maximizar a hidrólise enzimática a 15% de sólidos totais de palha de milho pré-tratada com ácido sulfúrico diluído. As estratégias foram: (1) batelada alimentada, feita com a adição de substrato de forma intermitente; (2) pré-adsorção das enzimas em parte do substrato pré-tratado, seguida da adição do restante de substrato para atingir o total de sólidos almejado; (3) processo de reutilização de parte da fase líquida presente no meio de hidrólise na metade do tempo total de reação e inserção dessa fase em estágio anterior do processo, com o objetivo de simular o seu estado estacionário. Todas essas três estratégias aumentaram a eficiência de hidrólise em 96 h de reação para 81%, em comparação aos valores próximos de 73% obtidos no experimento controle.

3.5 MODELAGEM MATEMÁTICA DA CINÉTICA DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE MATERIAS LIGNOCELULÓSICOS

3.5.1 Modelagem e simulação

A gestão de sistemas de produção de bens, serviços e pesquisa envolve um conjunto de decisões acerca das diversas atividades desenvolvidas em cada nível de planejamento, seja ele estratégico (longo prazo), tático (médio prazo) ou operacional (curto prazo). Essas decisões dever considerar as inter-relações entre as atividades e

sua interação com o ambiente externo. O principal desafio que existe por exemplo em uma pesquisa bem-sucedida é de tomar as decisões de maneira que o sistema opere da melhor forma possível, considerando que as atividades a elas associadas estão relacionadas e limitadas por vários fatores. Em tais situações, a utilização de modelos permite compreender melhor o ambiente em questão, identificar problemas, formular estratégias e oportunidades, apoiar e sistematizar o processo de tomada de decisões. Um modelo pode ser definido como uma representação de uma situação ou realidade, conforme vista por uma pessoa ou um grupo de pessoas, e construída de forma a auxiliar o tratamento daquela situação de uma maneira sistemática (MIGUEL *et al.*, 2012).

Em particular, modelos quantitativos são modelos abstratos descritos em linguagem matemática e computacional, que utilizam técnicas analíticas (matemáticas, estatísticas) e experimentais (simulação) para calcular valores numéricos das propriedades do sistema em questão, podendo ser usados para analisar os resultados de diferentes ações possíveis. Nesse viés, a simulação computacional é uma importante ferramenta de planejamento que procura emular, por meio de relações lógicas, o funcionamento de sistemas reais (muitas vezes complexos demais para serem modelados analiticamente, isto é, por meio de funções matemáticas), a fim de observar seu comportamento sob diferentes cenários (MIGUEL *et al.*, 2012).

A construção de um modelo de pesquisa operacional, em geral, envolve dois processos de abstração. Inicialmente, o sistema real, com grande número de variáveis, é abstraído em um modelo conceitual, ou seja, em uma descrição verbal na qual apenas uma fração das variáveis originais que definem o comportamento do sistema é considerada. Em seguida, o modelo conceitual é abstraído em um modelo matemático analítico (isto é, em que a descrição das relações do sistema pode ser expressa por funções matemáticas) ou em um modelo experimental de simulação (isto é, que procura emular por meio de relações lógicas o funciomento do sistema), para representar satisfatoriamente o sistema. Para formular um modelo matemático, simplificações razoáveis do modelo conceitual devem ser realizadas em diferentes níveis, tendo em mente, entretanto, que a validação do modelo proposto requer que sua solução seja coerente com os objetivos e restrições do sistema real. O diagrama da FIGURA 17 é um exemplo que ilustra um processo da abordagem de solução de um problema genérico utilizando modelagem matemática para resolução de problemas.



FIGURA 17 – ESQUEMA DE ABORDAGEM DE SOLUÇÃO DE UM PROBLEMA GENÉRICO UTILIZANDO MODELAGEM MATEMÁTICA. FONTE: Adaptado de Mitroff *et al.* (1974).

Na FIGURA 17 há uma representação de como a solução de um problema pode ser descrito e organizado em uma pesquisa operacional que utiliza modelagem matemática como método de solução de um problema. O diagrama considera que a pesquisa se inicia com uma realidade, problema ou situação a ser resolvida ou melhorada (círculo I). Em seguida, o próximo passo consiste na formação do modelo conceitual (círculo II) por meio da conceitualização dessa situação (seta 1). Essa é a primeira etapa em que são definidas as premissas, os fatos e o campo de variáveis que serão utilizadas para definir a natureza do problema e o nível em que essas variáveis serão tratadas, por exemplo, de um ponto de vista macro ou micro da situação. Uma vez que o modelo conceitual foi concluído, o modelo científico pode ser elaborado (círculo III) e a partir dele uma solução, se existir apenas uma, pode ser entregue (círculo IV). Essas etapas acontecem por meio da modelagem (seta 2) e da solução do problema (seta 3), em que pode haver a necessidade do uso de ferramentas e programas de cálculos, estatísticas e computacionais mais sofisticados.

Se a solução do problema necessitar de uma alimentação de dados retroativa, isto é, informações adicionais precisam ser inseridas no modelo para ele ser melhor esclarecido ou concluído, então existe o caso da implementação (seta 4) e nesse caso a iteração pode ser uma etapa a ser adicionada ao problema. Para finalizar o diagrama a seta que liga o problema ao modelo científico (seta 6) chamada de validação, corresponde ao grau entre a realidade e o modelo encontrado e deve ser estreito o suficiente para afirmar que o modelo está válido a partir da situação ou problema inicial. A seta vertical (seta 5) que existe entre o modelo conceitual e a solução denominada "Feedback" representa o retorno assertivo, os comentários e a opiniões que avaliam ao os resultados encontrados ao longo do desenvolvimento do trabalho, exigindo o senso crítico, experiência e habilidade dos autores do estudo em representar os conceitos de eficiência por meio de um modelo matemático.

3.5.2. Modelagem matemática da cinética de hidrólise enzimática do bagaço de canade-açúcar

A modelagem matemática da cinética de hidrólise enzimática do bagaço de cana tem sido realizada principalmente para entender a ação das enzimas com atividades específicas presentes em uma preparação celulásica: endoglucanases, exoglucanases e β-glucosidades e propiciar modelos matemáticos capazes de representar os fenômenos envolvidos neste tipo de processo. A partir da compreensão desses fenômenos, é possível desenvolver modelos matemáticos robustos e eficientes para a representação mais adequada do comportamento cinéticos das reações de hidrólise de materiais lignocelulósicos. Tais modelos, podem então ser utilizados na simulação, no dimensionamento, na otimização e no escalonamento dos reatores de hidrólise enzimática e na análise econômica de produção industrial. Portanto, o modelo deve ser rigoroso o bastante no sentido de considerar o fenômeno de adsorção de enzimas no substrato, inibição das enzimas por açúcares, efeitos da temperatura, do pH, da reologia do meio reacional, da sinergia e da acessibilidade do substrato (ZHANG e LYND, 2004).

Segundo Zhang e Lynd (2004) os modelos cinéticos que representam a hidrólise de materiais lignocelulósicos podem ser divididos em quatro grupos gerais: nãomecanístico, semi-mecanístico, funcional e estrutural. A categoria não-mecanístico é composta por modelos baseados em correlações de dados experimentais que não apresentam um cálculo explícito da concentração de celulase adsorvida. Embora esses modelos possam ser úteis para correlacionar dados, são pouco confiáveis sob condições diferentes daquelas para as quais a correlação foi desenvolvida. Modelos semimecanísticos são aqueles que apresentam um modelo de adsorção fenomenológico, mas que empregam a concentração como a única variável que descreve o estado do substrato (modelos semi-mecanísticos em relação ao substrato) ou são fundamentados em uma única atividade de hidrólise da celulose (modelos semi-mecanísticos em relação à enzima). Os modelos semi-mecanísticos podem ser úteis para a correlação de dados e para o projeto de reatores por meio da inclusão de um mínimo de informações necessárias para fins descritivos. No entanto, esses modelos apresentam limitações, uma vez que os modelos semi-mecanísticos em relação ao substrato não podem fornecer informações sobre comportamentos determinados por características do substrato que não sejam a sua concentração. Do mesmo modo, modelos semimecanísticos com relação à enzima não descrevem comportamentos determinados por múltiplas atividades enzimáticas.

Um modelo funcional é aquele que considera a adsorção das celulases, as múltiplas atividades enzimáticas presentes no meio e todas as variáveis de estado associadas à adição de substrato. Este tipo de modelo é útil para identificar e compreender a natureza e impacto dos fatores que limitam a taxa de reação e, desta forma, encontrar estratégias para minimizá-los. Apesar destes modelos terem potencial para serem utilizados na projeção de biorreatores, a aplicação neste contexto é limitada pela disponibilidade dos dados. Outra limitação dos modelos funcionais é que eles fornecem poucas informações a respeito da estrutura conformacional de celulases em nível molecular. Por outro lado, modelos estruturais se baseiam nas informações estruturais relativas aos componentes das celulases e suas interações com os substratos. Modelos estruturais são úteis para o estudo molecular de celulases e fornecem dados para o entendimento da relação estrutura/ função, ou seja, conseguem prever a estrutura e o modo de ação das enzimas. Dentre os modelos citados, o mais comum na literatura é o modelo semi-mecanístico, por este ser um modelo simplificado, que possibilita a correlação de dados com um conjunto mínimo de informações experimentais e não necessita de informações morfológicas e estruturais, tais como cristalinidade, grau de polimerização e área de superfície de contato do substrato (HODGE *et al.,* 2009).

3.5.3 Modelos matemáticos de Kadam et al. (2004) e Godoy et al. (2019)

Um dos modelos mais bem consolidados na literatura foi desenvolvido por Kadam *et al.* (2004) com base em experimentos de hidrólise enzimática de batelada de palha de milho pré-tratada com ácido sulfúrico diluído, empregando a celulase comercial CPN da logen (Canadá) e a β -glucosidase Novozym 188 da Novozymes (Dinamarca). O modelo envolveu a utilização de 18 parâmetros cinéticos e os autores modelaram três reações de hidrólise e uma reação de adsorção das enzimas utilizando uma isoterma de Langmuir.

A representação esquemática do modelo de Kadam *et al.* (2004) pode ser visualizada na FIGURA 18, em que são indicadas as reações de hidrólise enzimática dos componentes da celulose de forma simplificada, que foram incluídas na obtenção do modelo matemático. As linhas contínuas em preto representam o caminho entre o substrato e o produto, indicado por taxa de reação (r_x) nesse esquema. As linhas pontilhadas mostram as inibições possíveis das reações enzimáticas por diferentes compostos. Nesse modelo foi considerada a simplificação de que existem somente três tipos de carboidratos que podem potencialmente inibir as enzimas que atuam nas reações de hidrólises: a xilose, a glucose e a celobiose.



FIGURA 18 - ESQUEMA DO MODELO DE KADAM PARA A HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE PALHA DE MILHO. FONTE: Kadam *et al.* (2004).

Kadam *et al.* (2004) consideraram em seu modelo um parâmetro adimensional que indica a reatividade do substrato e esse foi utilizado como variável nas equações de conversão de glucanas para celobiose e glucose, conforme mostrado na Equação 1,

$$R_{s} = \alpha \frac{S}{S_{0}}$$
(1)

em que R_s é o parâmetro adimensional de reatividade do substrato, α é uma constante adimensional, *S* é a concentração de substrato final em g kg⁻¹, *S*₀ é a concentração de substrato inicial em g kg⁻¹. O autor justificou a complexidade do modelo devido ao objetivo de efetivamente simular o sistema com o potencial fenômeno de inibição de carboidratos e com a possibilidade de ocorrência de tanto reações heterogêneas quanto homogêneas nesse meio.

O modelo da isoterma de Langmuir foi utilizado para descrever a possível adsorção da enzima ao substrato, mostrado na Equação 2,

$$E_{iB} = \frac{E_{imax}K_{iad}E_{iF}S}{1+K_{iad}E_{iF}}$$
(2)

em que E_{iB} é a concentração da enzima adsorvida em g proteína g⁻¹ de substrato, E_{imax} é a concentração máxima de enzima em g proteína g⁻¹ de substrato, K_{iad} é a constante de Langmuir que fornece a capacidade de adsorção teórica em uma monocamada em g kg⁻¹, E_{iF} é a concentração de enzima livre em g proteína g⁻¹ de substrato e S é a concentração do substrato em g kg⁻¹.

A teoria do modelo de isoterma de Langmuir foi proposta em 1916 para explicar a adsorção sobre uma superfície simples, infinita e não porosa. O modelo tem como base a hipótese de movimentação das moléculas adsorvidas pela superfície do adsorvente de maneira que à medida que mais moléculas são adsorvidas há uma distribuição uniforme, formando uma monocamada que recobre toda a superfície.

No modelo foram utilizadas também outras equações para descrever as demais conversões. A Equação 3 descreve a conversão de glucanas para celobiose, com a inibição por glucose, celobiose e xilose,

$$r_{1} = \frac{k_{1r} E_{1B} R_{S} S}{1 + \frac{G_{2}}{K_{1IG2}} + \frac{G}{K_{1IG}} + \frac{X}{K_{1IX}}}$$
(3)

em que k_{1r} é a constante de velocidade da reação 1 em g mg⁻¹ h⁻¹, E_{1B} é a concentração de enzima na reação 1 em g kg⁻¹, R_S é a reatividade do substrato (adimensional), G_2 é a concentração de celobiose em g kg⁻¹, K_{1IG2} é a constante de inibição da celobiose na reação 1 em g kg⁻¹, G é a concentração de glucose em g kg⁻¹, K_{1IG} é a constante de inibição da glucose na reação 1 em g kg⁻¹, X é a concentração de xilose em g kg⁻¹ e K_{1IX} é a constante de inibição de xilose na reação 1 em g kg⁻¹. Nessa reação o autor considerou a influência das enzimas endo- β -1,4-glucanases (EC 3.2.1.4) e também exo- β -1,4-celobiohidrolases (CBH) (EC 3.2.1.91). Isso porque ele considera que há ação das enzimas nas regiões amorfas e também nas pontas não redutoras da cadeia de glucanas.

A Equação 4 descreve a conversão de glucanas para glucose com a inibição de glucose, celobiose e xilose,

$$r_{2} = \frac{k_{2r}(E_{1B} + E_{2B})R_{S}S}{1 + \frac{G_{2}}{K_{2IG}} + \frac{G}{K_{2IG}} + \frac{X}{K_{2IX}}}$$
(4)

em que os parâmetros são similares aos descritos na reação 1. Na equação (4) o autor considerou a influência tanto das enzimas que atuam na reação 1 quanto na própria reação 2, que seriam as enzimas exo- β -1,4-celobiohidrolases (CBH) (EC 3.2.1.91) que agem nas pontas não redutoras e as exo- β -1,4-glucana glucohidrolases (EC 3.2.1.74) responsáveis por atuar principalmente nos oligossacarídeos.

A Equação 5 descreve a conversão de celobiose para glucose com a inibição de glucose e xilose,

$$r_{3} = \frac{k_{3r} E_{2F} G_{2}}{K_{3M} (1 + \frac{G}{K_{3IG}} + \frac{X}{K_{3IX}}) + G_{2}}$$
(5)

em que os parâmetros também são similares aos descritos nas equações das reações 1 e 2. No entanto, para a reação 3 tem-se a presença apenas da enzima β-glucosidase (EC 3.2.1.21).

O balanço de massas foi feito utilizando as Equações 6 a 9, para as glucanas que envolvem as reações 1 e 2, para a celobiose, que envolve as reações 1 e 3 e para a glucose que envolve as reações 1, 2 e 3, com os respectivos coeficientes estequiométricos. A Equação 9 envolve o balanço de massas para as enzimas, em que a soma das enzimas totais, representada por E_{Ti} em g proteína g⁻¹ de substrato, é formada pela enzima livre E_{Fi} e pela enzima ligada E_{Bi} .

$$\frac{dS}{dt} = -r_1 - r_2 \tag{6}$$

$$\frac{dG_2}{dt} = -1.056r_1 - r_3$$
(7)

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

$$\mathsf{E}_{\mathsf{T}i} = \mathsf{E}_{\mathsf{F}i} + \mathsf{E}_{\mathsf{B}i} \tag{9}$$

Após a obtenção de todas essas equações, o autor utilizou o software Matlab para resolver o e encontrar os seus parâmetros.

Posteriormente, esse modelo foi utilizado por Hodge *et al.* (2009), que demonstrou a aplicabilidade do modelo. Mais recentemente, Godoy *et al.* (2019) desenvolveram um modelo simplificado, baseado no modelo de Kadam *et al.* (2004) para hidrólise enzimática de bagaço de cana em batelada e batelada alimentada. O modelo de Godoy *et al.* (2019) considera as seguintes premissas: a simplificação de que o complexo enzimático tem alta atividade β -glucosidásica e de que a liberação de celobiose no meio durante a reação é baixa em relação à quantidade de glucose liberada. Ademais, o complexo enzimático foi simplificado para apenas uma concentração (sem diferenças entre celulases e β -glucosidases ou xilanases). Os autores demostraram ainda que a adsorção das celulases não foi significativa para ser contemplada no modelo,

o substrato foi tido como uniforme e a inibição competitiva foi considerada para a glucose liberada no meio. Tanto a porcentagem de hemicelulose quanto a inativação enzimática têm valores relativamente baixos podem ser, portanto, negligenciáveis.

O modelo desenvolvido por Godoy *et al.* (2019) foi baseado na Equação 1 proposta Kadam *et al.* (2004) para calcular a reatividade do substrato, mas o parâmetro α foi considerado 1, simplificando-a como apresentado na Equação 10,

$$R = \frac{C}{C_0}$$
(10)

com C indicado pelo autor como concentração final de celulose (g L⁻¹) e C₀ como concentração de celulose inicial (g L⁻¹). Em seguida, os autores utilizaram uma equação para mostrar o efeito da transferência de massa que ocorre no meio, pois, quanto maior a quantidade de substrato, maior é a formação de produto e a inibição decorrente do seu acúmulo. Além disso, essa inibição também existe de forma indireta devido à mudança na viscosidade do sistema durante a reação. Dessa forma, a constante de inibição é mostrada na Equação 11,

$$K_{I}^{*} = K_{I,G}[1-a\frac{(G^{n})}{C_{T}}]$$
 (11)

em que K_{I}^{*} é a constante modificada de inibição (g L⁻¹), $K_{I,G}$ é a constante de inibição para a glucose (g L⁻¹), G é a concentração de glucose (g L⁻¹), C_T é a quantidade total de glucanas adicionadas ao sistema (g L⁻¹), a é o parâmetro com dimensões (g L⁻¹)⁽¹⁻ⁿ⁾ e n é um parâmetro adimensional.

Com base em todas essas considerações, o modelo cinético proposto passou a ser dado pelo balanço de massas expresso nas Equações 12 e 13,

$$\frac{dC}{dt} = -r$$
(12)

$$\frac{\mathrm{dG}}{\mathrm{dt}} = -1,111\mathrm{r} \tag{13}$$

enquanto a taxa de reação é dada pela Equação 14,

$$r = \frac{k E C R}{K_{M} \left[1 + \left(\frac{G}{K_{1}^{*}} \right) \right] + C}$$
(14)

em que C é a concentração de glucanas (g L⁻¹), G é a concentração de glucose (g L⁻¹), t é o tempo (h), r é a taxa de reação (g L⁻¹ h⁻¹), k é a constante da reação (h⁻¹), E é a concentração de enzima (g L⁻¹), R é a reatividade do substrato, K_1^* é a constante modificada de inibição (g L⁻¹) e K_M é a constante de saturação de glucanas (g L⁻¹).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ETAPAS DO TRABALHO

Este trabalho foi dividido em etapas que estão ilustradas na FIGURA 19, onde é possível visualizar os principais procedimentos experimentais utilizados para concluir os objetivos específicos propostos por esse projeto (item 2.2).

4.2 MATERIAL

O bagaço de cana-de-açúcar a ser utilizado nesse trabalho foi fornecido pela Raízen (Piracicaba, SP) e utilizado conforme recebido. Os demais reagentes empregados foram de grau analítico. Os padrões cromatográficos e demais reagentes foram adquiridos na especificação definida pelo procedimento em que foram utilizados. Já os ensaios de hidrólise enzimática foram realizados com a preparação comercial Cellic CTec3, fornecida pela Novozymes Latin America (Araucária, PR), que é composta majoritariamente por celulases e hemicelulases.

4.3 MÉTODOS

4.3.1 Caracterização da enzima Cellic CTec3

4.3.1.1 Determinação da atividade celulásica total

A determinação de atividade celulásica total da enzima Cellic CTec3 contra papel de filtro Whatman #1 foi baseada na capacidade da enzima em liberar açúcares redutores totais e sua quantificação foi fundamentada no conceito de FPU mL⁻¹ (*Filter Paper Unit*) (ADNEY e BAKER, 2008). A reação foi realizada utilizando 1,0 mL de solução enzimática em 1,0 mL de tampão acetato 50 mmol L⁻¹, pH 5,2. A mistura foi incubada por 10 min até atingir a temperatura de 50 °C e a reação foi





iniciada com a adição de uma tira de papel filtro (1,0 cm x 7,0 cm) de aproximadamente 70,0 ± 0,5 mg. Ao final do tempo de incubação, a liberação de açúcares redutores foi quantificada conforme o método do ácido 3,5dinitrossalissílico (DNS) proposto por Miller (1959). Esse método se baseia na redução do DNS ao ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, cujo produto absorve fortemente em 540 nm. A calibração do método colorimétrico empregou glucose como padrão em concentrações na faixa de 0,10 a 2,00 mg mL⁻¹. As amostras foram transferidas para cubetas de quartzo e as medidas de absorvância foram realizadas em espectrofotômetro UV-Vis (Shimadzu, Kyoto, Japão), que foram então utilizadas para construir as curvas de calibração baseadas em padrões de glucose de diferentes concentrações. Os cálculos foram baseados na Lei de Lambert-Beer e todas as análises foram realizadas em triplicada, cujas médias foram relatadas com os seus respectivos desvios padrão.

4.3.1.2 Determinação do teor de proteínas da preparação enzimática

A quantificação de proteínas foi realizada pelo método do ácido bicinconínico (BCA) (SMITH *et al.*, 1985), utilizando um kit comercial da Pierce Biotechnology (Rockford, IL, EUA). A metodologia consiste em preparar uma mistura do reagente A (solução de hidróxido de sódio 0,1 mol L⁻¹ pH 11,25, contendo carbonato de sódio, bicarbonato de sódio, ácido bicinconínico e tartarato de sódio - Sigma-Aldrich, catálogo número B9643) e do reagente B (solução a 0,25 mol L⁻¹ de sulfato de cobre - Sigma Aldrich, catálogo número C2284), na proporção de 50:1. Para cada teste foram adicionados 2 mL dessa mistura em um tubo de ensaio, seguido de 100 μL de amostra. Os tubos foram incubados a 37 °C por 30 min e, posteriormente, cada amostra foi transferida para uma cubeta de quartzo para leitura, que foi realizada em espectrofotômetro UV/Vis (Varian®, modelo CARY 100 Scan) no comprimento de onda de 562 nm. Um padrão de albumina de soro bovino (BSA) foi utilizado para o preparo da curva de calibração, que foi construída com base nas mesmas condições do ensaio.

4.3.2 Determinação da composição química do bagaço de cana

Os ensaios de determinação da composição química foram realizados de

acordo com as recomendações do Laboratório Nacional de Energias Renováveis (NREL - *National Renewable Energy Laboratory,* Golden, CO) dos Estados Unidos. A determinação da umidade do material nativo e dos materiais pré-tratados foi realizada em balança de infravermelho da Shimadzu®. A quantidade de cinzas foi determinada em mufla a 575 °C por 4 h (SLUITER *et al.* 2008d). Os extraíveis foram obtidos por extrações em Soxhlet por 12 h, primeiramente com água e depois com etanol 95% (SLUITER *et al.*, 2008b). Já o teor de sólidos insolúveis foi realizado conforme o procedimento descrito por Sluiter *et al.* (2008f), que foi então complementado pelo método de determinação de sólidos totais proposto por Sluiter *et al.* (2008c) (NREL/TP-510-42621).

A determinação da composição química dos materiais celulósicos teve início com o seu tratamento com ácido sulfúrico 72% (m v⁻¹) por 1 h a 30 °C. Em seguida, o material foi diluído para uma concentração de 3% (m v⁻¹) e condicionado a 120 °C por 1 h para posterior filtração em cadinho de vidro sinterizado de porosidade média. O teor de lignina insolúvel em ácido dos materiais celulósicos foi determinado por gravimetria, utilizando a massa retida no cadinho. A lignina solúvel em ácido foi quantificada por espectrofotometria no ultravioleta, utilizando o comprimento de onda de 240 nm de acordo com Sluiter *et al.* (2008a) (NREL/TP-510-42618). As amostras foram transferidas para cubetas de quartzo e as medidas de absorvância foram realizadas em espectrofotômetro UV-Vis (Shimadzu, Kyoto, Japão) afim de se determinar a concentração de lignina, utilizando a Lei de Lambert-Beer.

A composição em carboidratos dos substratos celulósicos foi determinada nos hidrolisados ácidos resultantes (filtrado), utilizando um sistema de cromatografia em fase líquida da marca Shimadzu, modelo LC20AD. Esse sistema é provido de amostrador automático modelo SIL10A, desgaseificador de fase móvel modelo DGU 14A, forno de aquecimento de coluna modelo CTO 10A e de detectores nos modelos RID10A para índice de refração e SPD-M10Avp para espectrofotometria no UV-Vis. A análise foi realizada em coluna Rezex RHM (Phenomenex; 300 x 7,8 mm) a 65 °C, precedida por pré-coluna Carbo H (Phenomenex; 8,0 x 3,2 mm) e eluída com fase móvel de H₂SO₄ 5 mmol L⁻¹ a uma vazão de 0,6 mL min⁻¹. As quantificações foram efetuadas por padronização externa com base em curvas de calibração na faixa de 0,5 a 2,0 mg mL⁻¹, que foram construídas para cada componente monitorado (celobiose, glucose, xilose,

arabinose, ácido fórmico e ácido acético). A quantificação de compostos de desidratação (hidroximetilfurfural e furfural) foram convertidos em glucose e xilose mediante os seus respectivos fatores de conversão (0,70 e 0,64, respectivamente). Por outro lado, fatores de hidrólise foram considerados para contemplar a saída de uma molécula de água, gerando quocientes molares de 0,88 para a xilose e a arabinose e de 0,90 para glucose, galactose e manose.

4.3.3 Explosão a vapor do bagaço de cana-de-açúcar

A explosão a vapor do bagaço de cana-de-açúcar foi realizada no modo de auto-hidrólise, ou seja, sem a adição de catalisadores exógenos. Os ensaios foram realizados em um reator de aço inox com capacidade de 10 L, equipado com sensores para controle da temperatura e do tempo de reação, com vapor fornecido por caldeira de alta pressão. As condições reacionais adotadas foram baseadas nos estudos preliminares de Pitarelo *et al.* (2016), empregando a temperatura de 195 °C e o tempo de reação de 7,5 min. Após o pré-tratamento, todo o material coletado na saída do reator foi centrifugado para separação entre as fibras pré-tratadas (fração sólida) e a fração solúvel em água. A fração sólida foi lavada com água a um teor de sólidos totais de 5% (m v⁻¹) por 1 h sob agitação mecânica na temperatura ambiente (25 °C). Essa suspensão foi centrifugada novamente e os sólidos pré-tratados foram armazenados a vácuo sob refrigeração (4 °C) para análise de sua composição química e para posterior utilização nos experimentos de hidrólise enzimática. A FIGURA 20 apresenta o diagrama de blocos do processo de pré-tratamento do bagaço de cana.

4.3.4 Composição química das frações solúvel e insolúvel em água

A fração solúvel em água derivada da filtração após o pré-tratamento por explosão a vapor foi analisada no mesmo sistema cromatográfico descrito no item 3.2.2 para a quantificação por padronização externa de ácido fórmico, ácido acético, 5-(hidroximetil)-furfural e furfural. Além disso, foi realizada uma pós-hidrólise dessas frações com ácido sulfúrico diluído (SLUITER *et al.*, 2008e) para a conversão dos oligossacarídeos em monossacarídeos. Tais hidrolisados foram analisados nas mesmas condições cromatográficas descritas no item 3.2.2,

empregando padrões verdadeiros para realização da análise quantitativa por padronização externa. A fração insolúvel também foi caracterizada segundo o procedimento descrito no item 3.2.2, com exceção de que o ensaio para verificar a quantidade de compostos extraíveis no material não foi realizado porque estes já teriam sido removidos durante o pré-tratamento.



FIGURA 20 - DIAGRAMA DE BLOCOS DO PROCESSO DE PRÉ-TRATAMENTO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR POR EXPLOSÃO A VAPOR PARA A SUA SUBSEQUENTE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA. FONTE: O Autor (2021).

4.3.5 Ensaios de hidrolise enzimática

Para avaliar a acessibilidade do substrato, a hidrólise enzimática foi realizada em processo de batelada conforme o método NREL utilizando carga de sólidos totais de 2% (massa seca), carga enzimática de 60 FPU g⁻¹ de glucanas e temperatura de 50 °C em tampão de acetato 50 mmol L⁻¹ pH 5,2 (SELIG *et al.*, 2008). Os rendimentos de hidrólise foram calculados em relação à quantidade de glucose e xilose presentes nos materiais utilizados.

Após avaliação da acessibilidade do material, experimentos de hidrólise enzimática foram realizados de acordo com um planejamento do tipo Box-Behnken utilizando três variáveis em três níveis para um total de 15 ensaios realizados, cujos parâmetros foram baseados nos trabalhos de Fockink *et al.* (2017) e Mussato *et al.* (2008). As variáveis estudadas foram: teor de sólidos (5%, 12,5% e 20%), carga enzimática (8 FPU g⁻¹ de glucanas, 24 FPU g⁻¹ de glucanas, e 40 FPU g⁻¹ de glucanas) e velocidade de agitação (100, 150 e 200 rpm). A TABELA 1 mostra os fatores utilizados nos experimentos e os seus respectivos níveis, utilizados para obter o conjunto de dados que serão utilizados na modelagem matemática da hidrólise enzimática.

Variável	Código	Menor nível (-1)	Ponto central (0)	Maior nível (+1)
Sólidos totais (% ST)	а	5	12,5	20
Carga enzimática (FPU g ⁻¹ glucana)	b	8	24	40
Agitação (rpm)	С	100	150	200

TABELA 1 - FATORES E NÍVEIS UTILIZADOS NO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.

FONTE: O Autor (2021).

Após a realização dos experimentos conforme o planejamento experimental, a modelagem matemática foi realizada conforme descrito no item 4.3.6.

4.3.6 Modelagem matemática

O modelo matemático proposto por Godoy *et al.* (2019), com as premissas apresentadas no item 1.5.3, foi utilizado neste trabalho para a modelagem da cinética de hidrólise enzimática do bagaço de cana pré-tratado a vapor. No modelo empregado neste trabalho foram consideradas como variáveis a carga enzimática empregada e o teor de sólidos totais. A modelagem matemática da cinética

enzimática da hidrólise do bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor foi realizada usando-se o software Matlab. Neste trabalho foi usada a sub-rotina ode23s para resolver o sistema de equações diferenciais das velocidades das reações (Equações 6 a 8). Os parâmetros cinéticos foram ajustados usando-se a sub-rotina de otimização *fminsearch* (Matlab versão 9.4 R2018a), a qual está baseada no método de Nelder-Mead para minimização de funções não lineares multidimensionais. A função objetivo utilizada na estimativa dos parâmetros é descrita conforme a Equação 18,

$$M_{(\theta)} = \sum_{i=j}^{ne} \sum_{j=1}^{np} \left[\left(f(x_{ij}, \theta) - g_{ij} \right)^2 \right]$$
(18)

em que $f(x_{ij}, \theta)$ é a concentração de glucose calculada pelo modelo e g_{ij} é a concentração medida de glucose. O vetor x_{ij} contém as variáveis de estado e θ é o vetor dos parâmetros do modelo. Os termos ne e np representam os números de experimentos e os números de pontos de alíquotas por experimento, respectivamente.

A visualização do modelo foi feita observando os valores preditos em comparação com os dados experimentais da cinética da hidrólise e foi utilizado o cálculo do erro quadrático médio (RMSD), que é usado como estimador da qualidade estatística do ajuste. Sua fórmula é representada pela Equação 19,

$$RMSD = \sqrt{\frac{\sum_{n=1}^{N} (\hat{y}_{n} - y_{n})^{2}}{N}}$$
(19)

em que \hat{y}_n representa os valores estimados pelo modelo para n observações experimentais para a variável medida y_n com as variáveis observadas em diferentes tempos N. Neste trabalho, a concentração de glucose (g L⁻¹) foi variável considerada na função objetivo e também para o cálculo do RMSD.

Após o ajuste dos parâmetros do modelo, a validação foi feita utilizando dados (cinéticas realizadas) diferentes daqueles utilizados no ajuste. Dessa forma,

foi possível avaliar se o modelo consegue prever os resultados de hidrólise enzimática. Após isso, o modelo foi então utilizado para simulação de reações em batelada alimentada, com cargas intermitentes de sólidos no reator, e assim também verificar se ele consegue ser preditivo em relação a esse regime utilizado.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

A caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar seguiu os procedimentos do NREL (Golden, CO). As determinações dos percentuais de cinzas e extraíveis foram realizadas diretamente em amostras de bagaço nativo, enquanto os percentuais de carboidratos e de lignina foram determinados a partir de amostras livres de extraíveis. O procedimento de extração teve por finalidade a remoção dos compostos que não estão ligados diretamente à parede celular (compostos não estruturais), uma vez que esses podem interferir na quantificação da lignina presente em materiais lignocelulósicos (SLUITER *et al.*, 2008b). A TABELA 2 mostra os resultados de caracterização do material extraído, após a correção relativa aos teores de extrativos e cinzas, que foram determinados no material antes da extração.

Componente	Percentual (%)
Anidroglucose ¹	$\textbf{35,8} \pm \textbf{0,8}$
Anidroxilose ²	21,3 ± 0,7
Anidroarabinose ²	$1,\!5\pm0,\!2$
Grupo acetila ²	$\textbf{4,3} \pm \textbf{0,1}$
Hexoses desidratadas ³	$\textbf{1,1}\pm\textbf{0,1}$
Pentoses desidratadas ⁴	$\textbf{0,5}\pm\textbf{0,1}$
Lignina total	24,8
Lignina solúvel em ácido	$\textbf{2,8}\pm\textbf{0,1}$
Lignina insolúvel em ácido	22 ± 2
Extraíveis totais	5,6
Extraíveis em água	$\textbf{3,7} \pm \textbf{0,6}$
Extraíveis em etanol	$1,9\pm0,3$
Cinzas	$\textbf{3,7} \pm \textbf{0,5}$
Total	98.6

TABELA 2 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO BAGAÇO DE CANA.

¹ Presente como componente das β -(1 \rightarrow 4)-D-glucanas (celulose);

² Presente como componentes das heteroxilanas (hemiceluloses);

³Quantificado como 5-(hidroximetil)-furfural (HMF);

⁴ Quantificado como furfural.

FONTE: O Autor (2021).

O teor de extraíveis totais do bagaço de cana foi de 5,6%, sendo que 3,7% foram removidos com água e 1,9% com etanol (TABELA 2). A extração com água remove compostos hidrossolúveis como carboidratos de baixa massa molar e pectina. Já a extração com etanol remove compostos aromáticos oxigenados como ácidos fenólicos.

Na caracterização do material livre de extraíveis, todos os analitos encontrados por análise cromatográfica foram convertidos en sua forma anidra, levando em conta os seus respectivos fatores de hidrólise ácida (SLUITER *et al.*, 2008a). O teor de glucanas (medido como resíduos de glucopiranosil ou anidroglucose) foi de 36,9%, incluindo o teor de hexoses que foram convertidas a HMF, enquanto o percentual de hemiceluloses foi de 27,6% considerando a somatória dos resíduos de xilopiranosil (ou anidroxilose), arabinofuranosil (ou anidroarabinose), grupos acetila e pentoses convertidas a furfural. Os produtos de desidratação de hexoses e pentoses, formados durante a hidrólise ácida e detectados por cromatografia como HMF e furfural (TABELA 2), têm origens não identificadas porque o primeiro pode ter sido formado pela desidratação de diferentes tipos de hexoses como glucose e galactose, enquanto o segundo é oriundo da desidratação de unidades de xilose e arabinose. Segundo Rasmussen *et al.* (2014), glucose e xilose são convertidas a HMF e furfural em altas temperaturas durante o processo de hidrólise ácida, respectivamente.

O teor de cinzas presente no bagaço de cana foi de 3,7% (TABELA 2). Segundo Rocha *et al.* (2015), esse conteúdo pode apresentar variação de 0,7% até 7,9% entre bagaços de cana de diferentes origens. A variação no teor de cinzas pode ser atribuída a diversos fatores como a variedade da cana utilizada, a localização geográfica e condições edafoclimáticas do cultivo e impurezas oriundas do processo de colheita (solo) e dos maquinários utilizados no seu processamento industrial (abrasão e corrosão). Szczerbowski *et al.* (2014) atribuíram parte dessas variações à alta carga de contaminantes provenientes das impurezas no solo, como a alumina, e ao desgaste de equipamento durante o esmagamento e corte da canade-açúcar, como óxidos de ferro e de titânio.

O percentual de lignina total (somatório das ligninas solúvel e insolúvel em meio ácido) correspondeu a 24,8%, sendo um pouco superior ao observado em outros trabalhos desenvolvidos com bagaço de cana. Por exemplo, Rocha *et al.* (2015) encontraram valores que variaram de 19,14% até 26,12%. Já Szczerbowski

et al. (2014) encontraram valores médios de 20,6%. Uma das causas para essas diferenças pode estar associada ao método de determinação da lignina insolúvel em ácido, cujo valor deveria ter sido subtraído de seu teor de cinzas determinado experimentalmente. Outra possibilidade está relacionada à determinação da lignina solúvel em ácido, cujo valor pode ter sido superestimado ao ser utilizado o comprimento de onda de 240 nm durante a análise (SLUITER et al., 2012). Este efeito explica-se pela presença de pequenas concentrações de interferentes como compostos furânicos nos hidrolisados (HMF e furfural), que também absorvem nesse comprimento de onda. Um estudo inter-laboratorial feito por Sluiter et al. (2016) para a determinação da lignina solúvel em ácido no bagaço de cana comparou os resultados obtidos em diferentes comprimentos de onda e o emprego 320 nm, onde há menor absorção de HMF e furfural, resultou em um teor de lignina solúvel de apenas 1,9%, enquanto essa medida a 240 nm foi de 3,7%. Apesar da diferença entre esses valores, o método oficial sugere o uso de 240 nm e considera que a interferência de outros componentes na quantificação da lignina solúvel em ácido é negligenciável e está contida no erro da medida.

A TABELA 3 apresenta os valores encontrados por vários autores para a composição química do bagaço de cana. Esse levantamento envolve estudos realizados no mesmo grupo de pesquisa ao longo dos anos, usando os mesmos procedimentos e equipamentos para a análise química, bem como resultados oriundos do trabalho de outros grupos de pesquisa. De um modo geral, há coerência entre os dados relatados na tabela, particularmente para estudos realizados por pesquisadores do mesmo grupo. Por outro lado, algumas variações podem ser constatadas em comparação com trabalhos realizados por outros grupos, e isso pode estar relacionado a diferenças nos procedimentos analíticos e na origem e processamento das amostras, bem como na eventual prática de normalização dos dados experimentais.

TABELA 3 - COMPARAÇÃO DOS RES	SULTADOS OBTII	DOS NA CARACTERIZ	zação química	DE AMOSTRAS	S DE BAGAÇO DI	E CANA-DE	-AÇÚCAR.
Referência	Glucana	Hemiceluloses	Lignina	Cinzas	Extraíveis	Total	Origem
Trabalhos realizados pelo próprio	grupo de pesqui	sa					
Dados obtidos nesse trabalho	35,8 ± 0,8	27,6	24,8	3,7 ± 0,5	5,6	98,6	Brasil, SP
Fockink <i>et al.</i> (2018)	32,2±0,5	$18,9 \pm 0,3$	29,5 ± 0,9	8,3±0,2	7,6 ± 0,2	96,5	Brasil, SP
Fockink <i>et al.</i> (2017)	40,2±0,7	25,2 ± 0,4	26,1 ± 0,7	5,1±0,2	5,2 ± 0,1	101,8	Brasil, SP
Pitarelo <i>et al.</i> (2016)	38,0 ± 0,1	27,4 ± 0,1	20,8 ± 0,3	6,7 ± 0,2	5,2 ± 0,1	98,1	Brasil, SP
Szczerbowski <i>et al.</i> (2014)	37,74	27,23	20,57	6,5±0,2	4,1 ± 0,1	97,27	Brasil, SP
Trabalhos realizados por outros gr	rupos de pesquis	g					
Zhang <i>et al.</i> (2020)	41,2	22,8	25,2	3,6	1	92,8	China
Santo <i>et al.</i> (2018)	38,3 ± 0,1	20,1 ± 0,1	29,0 ± 1,0	6,0 ± 0,3		100,4	Brasil, SP
Santucci <i>et al.</i> (2016)	44,1	31,8	22,3	0,5		98,7	Brasil, SP
Rocha <i>et al.</i> (2015)	42,19	27,60	21,56	2,84	5,63	99,82	Brasil, SP
		FONTE: O	Autor (2021).				
5.2 EXPLOSÃO A VAPOR

A explosão a vapor foi realizada utilizando uma condição pré-otimizada por outros autores no mesmo reator para maximizar os rendimentos de glucanas e hemiceluloses a partir de amostras de bagaço de cana (PITARELO *et al.*, 2013; FOCKINK *et al.*, 2018). Nesse sentido, a temperatura selecionada foi de 195 °C para um tempo de residência de 7,5 min no reator, sem a adição de catalisadores exógenos, portanto, empregando condição de auto-hidrólise. Vale ressaltar que os produtos hidrossolúveis de hidrólise ácida foram removidos do material pré-tratado por lavagem aquosa, antes que esse fosse submetido aos ensaios de hidrólise enzimática.

As recuperações mássicas após o pré-tratamento por explosão a vapor estão apresentadas na Figura 21, sendo que a média foi de 66.8 ± 3.4 % para o material sólido e de 21.1 ± 0.5 % para a fração líquida ou hidrolisado hemicelulósico (fração C5). A explosão a vapor apresentou um rendimento médio superior que dados encontrados da literatura, cujos valores médios se encontram em torno de 80% para o bagaço de cana explodido a vapor. Por outro lado, a variância observada para sete experimentos independentes é justificada pela ocorrência de contaminação cruzada, eventuais perdas físicas das frações solúvel e insolúvel, e perdas de compostos furânicos e ácidos orgânicos na descarga do vapor saturado (*e.g.*, o ponto de ebulição furfural é de 162 °C). Esse e outros compostos voláteis estão representados esquematicamente como fração gasosa na Figura 20 (FOCKINK *et al.*, 2018).

Os resultados em relação às glucanas e às xilanas presentes nas frações sólida e líquida (solúvel em água) do pré-tratamento estão representados na FIGURA 22. Para todos os materiais pré-tratados, as quantidades percentuais de anidroglucose e de lignina aumentaram em relação aos percentuais observados no material de origem. Este aumento é devido à remoção de grande parte das hemiceluloses, uma vez que estas apresentam maior suscetibilidade à hidrólise ácida. Os componentes das hemiceluloses mais fortemente afetados por esta reação foram a anidroarabinose e os grupos acetila, já que estão presentes como substituintes na cadeia principal de xilana e, portanto, apresentam maior labilidade química. A recuperação das glucanas foi superior a 90%, sendo obtidas principalmente da fração insolúvel em água, enquanto as xilanas hidrolisadas foram

transferidas em sua maior parte para a fração solúvel em água (FIGURA 22 B). Para a fração insolúvel, a menor recuperação de glucanas foi de 92,7% e a máxima de 97%, enquanto para xilanas a média dos experimentos foi de apenas 0,8%, ou seja, um valor muito pequeno em relação ao teor observado no material de origem, evidenciando que houve a hidrólise e a recuperação de fragmentos de hemiceluloses na fração aquosa. Já a recuperação das xilanas na fração solúvel em água foi relativamente baixa (abaixo de 50% em média), revelando que grande parte das pentoses deve ter sido desidratada e perdida durante o processo pelos motivos já mencionados anteriormente (item 1.3).



FIGURA 21 - RENDIMENTOS DE RECUPERAÇÃO MÁSSICA NAS FRAÇÕES SÓLIDA E LÍQUIDA PARA OS DIFERENTES EXPERIMENTOS DE PRÉ-TRATAMENTO POR EXPLOSÃO A VAPOR DO BAGAÇO DE CANA NAS MESMAS CONDIÇÕES DE 195 °C E TEMPO DE RESIDÊNCIA A 7,5 min. FONTE: O Autor (2021).

As frações solúveis em água derivadas das diversas condições de prétratamento apresentaram volume total e pH muito próximos entre as sete replicatas realizadas nesse estudo (TABELA 4). Como os volumes das frações solúveis em água variaram entre 2 e 3,5 L, os resultados foram normalizados para 2,75 L para tornar comparáveis as concentrações dos analitos presentes nestas frações.





A quantidade de ácido acético encontrada na fração hidrossolúvel apresentou valor médio de 4,50 g L⁻¹ para um desvio padrão de 0,80 g L⁻¹ (TABELA 5). Com isso, conclui-se que tais experimentos promoveram a desacetilação parcial das hemiceluloses, uma vez que a concentração de ácido acético aumentou após a realização do procedimento de pós-hidrólise (TABELA 5). A FIGURA 23 confirma esse aumento pela diferença de área da banda de eluição referente ao ácido acético, após o procedimento de pós-hidrólise. Além disso, percebe-se a presença majoritária de oligômeros de xilanas nos hidrolisados ácidos do pré-tratamento, que foram pós-hidrolisados à xilose e a uma menor quantidade de glucose, provavelmente oriunda de xiloglucanas presentes no bagaço de cana. O aumento

que ocorre na concentração de ácido acético, cujo pKa é de 4,75 a 25°C, está de acordo com o valor de pH encontrado utilizando a equação de equilíbrio químico, cujo cálculo resultou em um pH de 2,9. Além disso, o baixo valor de pH da fração hidrossolúvel também pode ter sofrido influência do acúmulo de produtos com acidez superior ao ácido acético, tais como os ácidos fórmico (pKa = 3,75) e levulínico (pKa = 4,59), que podem ter se formado após a reidratação do HMF (MARTÍN *et al.*, 2002).



FIGURA 23 - CROMATOGRAMAS DA FRAÇÃO LÍQUIDA OBTIDA A PARTIR DA EXPLOSÃO A VAPOR DO BAGAÇO DE CANA A 195 °C POR 7,5 min. FONTE: O Autor (2021).

		······································
Experimento	Volume de fração líquida (L)	pH da fração líquida a 25°C
B1	3,5	2,8, ± 0,1
B2	2,8	2,7, ± 0,1
B3	2,8	2,7, ± 0,1
B4	2,8	$2,7 \pm 0,2$
B5	2,5	$2,8 \pm 0,2$
B6	2,0	2,8 ± 0,3
B7	2,0	2,7 ± 0,1

TABELA 4 - VOLUMES COLETADOS E pH DAS FRAÇÕES SOLÚVEIS EM ÁGUA APÓS O PRÉ-TRATAMENTO POR EXPLOSÃO A VAPOR DO BAGAÇO DE CANA A 195 °C POR 7,5 min.

FONTE: O Autor (2021).

Componente	Auto-hidrólise	Pós-hidrólise
Celobiose	0,82 ± 0,20	2,4 ± 0,5
Glucose	$0,44 \pm 0,20$	$1,3 \pm 0,3$
Xilose	4,21 ± 0,34	$7,4 \pm 0,9$
Arabinose	0,66 ± 0,15	$1,6 \pm 0,4$
Acético	$4,5 \pm 0,8$	$7,8 \pm 0,3$
HMF	0,13 ± 0,07	$0,12 \pm 0,01$
Furfural	0,11 ± 0,01	0,21 ± 0,05

TABELA 5 - CONCENTRAÇÃO MÉDIA EM g L⁻¹ DOS COMPONENTES PRESENTES NA FRAÇÃO LÍQUIDA DA EXPLOSÃO A VAPOR, ANTES E APÓS O PROCEDIMENTO PÓS-HIDRÓLISE.

Fonte: O Autor (2021).

5.3 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS MATERIAIS PRÉ-TRATADOS

As frações insolúveis em água (material fibroso) foram caracterizadas quanto a sua composição química e os resultados estão apresentados na TABELA 7. Para todos os experimentos realizados, os percentuais de anidroglucose e de lignina aumentaram em relação aos observados no material nativo. Como já observado anteriormente (item 1.3), este aumento é devido à remoção de grande parte das hemiceluloses, cujas estruturas apresentam substituições na cadeia principal como grupos acetila, ácidos urônicos e arabinose. Tais carboidratos estão ligados por ligações glicosídicas do tipo α -(1,2), cuja disposição axial lhes confere maior labilidade ácida. Vale ressaltar que a instabilidade conformacional da arabinose também facilita essa reação. Já os grupos acetila são facilmente hidrolisados devido à alta labilidade ácida das ligações éster. Assim, não foi detectada a presença de anidroarabinose e de grupos acetila na fração insolúvel (sólida) dos materiais pré-tratados.

Ao final da caracterização de cada explosão, todo o material pré-tratado foi reunido em apenas um único lote e esse foi uniformizado. Em seguida, o material foi novamente caracterizado em quintuplicata e os resultados encontram-se na TABELA 6. A composição obtida condiz com a média dos valores encontrados na TABELA 7, não havendo diferença maior que 2 unidades em cada componente mensurado. Essa composição foi então empregada para os experimentos de hidrólise enzimática.

Componente	Percentual (%)
Anidroglucose ¹	54,5 ± 0,4
Anidroxilose ²	2,7 ± 0,2
Hexoses desidratadas ³	0,6 ± 0,1
Pentoses desidratadas ⁴	0,4 ± 0,1
Lignina total	33,2 ± 0,6
Lignina solúvel em ácido	$2,4 \pm 0,3$
Lignina insolúvel em ácido	31,2 ± 0,8
Cinzas	$4,8 \pm 0,2$
Total	96,7

TABELA 6 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA FRAÇÃO INSOLÚVEL FINAL APÓS A UNIFORMIZAÇÃO DO MATERIAL (n = 5).

¹ Presente como componente das β -(1-4)-D-glucanas (celulose);

² Presente como componentes das heteroxilanas (hemiceluloses);

³ Quantificado como 5-(hidroximetil)-furfural (HMF);

⁴ Quantificado como furfural.

FONTE: O Autor (2021).

5.4 BALANÇO DE MASSA DO PRÉ-TRATAMENTO

O balanço de massas obtido para as frações insolúvel e solúvel em água, bem como o balanço total obtido pela somatória desses valores, estão representados na TABELA 8 para todos os experimentos realizados neste estudo. O total médio de glucanas recuperadas após o pré-tratamento foi superior a 90%. A recuperação mássica de xilose e arabinose, medidas principalmente na fração solúvel em água depois de convertidas para a forma anidro para expressar o seu valor equivalente em arabinoxilanas, foi baixa para esses experimentos de autohidrólise, sugerindo que sua degradação tenha levado a um acúmulo de compostos furânicos e ácidos orgânicos no meio. No entanto, é importante lembrar que o furfural tem ponto de ebulição de 162 °C e esse pode ter sido parcialmente perdido por volatilização durante a abertura da válvula inferior do reator de explosão a vapor. TABELA 7 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA FRAÇÃO INSOLÚVEL EM ÁGUA DOS DIFERENTES EXPERIMENTOS APÓS O PRÉ-TRATAMENTO POR EXPLOSÃO A VAPOR DO BAGAÇO DE CANA A 195 °C POR 7,5 min.

Componente	Experimentos						
	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7
Anidroglucose ¹	53,0 ± 0,1	55,2 ± 1,7	$53,4 \pm 0,3$	57,4 ± 1,5	$52,8 \pm 2,4$	55 ± 0,3	57 ± 1
Anidroxilose ²	2,11 ± 0,30	$2,15 \pm 0,31$	$1,83 \pm 0,05$	2,71 ± 0,10	2,79 ± 0,24	2,02 ± 1,44	2,33 ± 1,04
Lignina total	36,48 ± 2,2	34,4 ± 0,7	35,11 ± 3,39	34,17 ± 0,40	$33,11 \pm 2,52$	30,69 ± 1,32	33,46 ± 3,55
Lignina solúvel em ácido	$2,8 \pm 0,3$	2,7 ± 0,1	2,7 ± 0,1	$3,0 \pm 0,4$	2,8±0,3	2,1 ± 0,7	1,6 ± 0,2
Lignina insolúvel em ácido	33,68 ± 1,89	$31,70 \pm 0,63$	32,38 ± 3,47	$31,17 \pm 0,03$	$30,37 \pm 2,21$	28,64 ± 0,60	$31,83 \pm 3,40$
Hexoses desidratadas ³	0,55 ± 0,04	0,66 ± 0,08	0,72 ± 0,30	$0,55 \pm 0,17$	$0,52 \pm 0,26$	0,48 ± 0,09	$0,45 \pm 0,05$
Pentoses desidratadas ⁴	0,37 ± 0,04	0,46 ± 0,06	0,31 ± 0,06	0,34 ± 0,02	0,36 ±0,01	$0,43 \pm 0,05$	4,99 ± 0,01
Cinzas	3,87 ± 0,56	$4,63 \pm 0,52$	4,93 ± 0,94	3,92 ± 1,13	5,28 ± 1,35	5,06 ± 1,18	4,99 ± 0,01
TOTAL	96,50	97,49	96,33	99,04	94,88	93,74	98,84
¹ Presente como componente das β ² Presente como componentes das	-(1-4)-D-glucanas heteroxilanas (her	(celulose); niceluloses):					

-^a Quantificado como 5-(hidroximetil)-furfural (HMF); ⁴ Quantificado como furfural;

FONTE: O Autor (2021).

TABELA 8 - BALANÇC BAGAÇO DE CANA-D) DE MASSA O E-AÇÚCAR.	BTIDO PARA A	S FRAÇÕES IN:	SOLÚVEL E SOL	.ÚVEL APÓS O I centual (%)	PRÉ-TRATAMEN	NTO POR EXPL	OSÃO A VAPOR DO
Componente	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	Média
				Fraç	ão insolúvel			
Anidroglucose	93,4	96,9	93,6	94,1	92,7	96,9	93,4	94,4 ± 1,8
Anidroxilose	6,2	6,2	5,8	9,1	8,9	6,4	7,6	7,1 ± 1,4
Lignina total	92,8	85,3	95,1	98,1	90,4	81,5	92,1	90,8 ± 5,7
				Fra	ção solúvel			
Anidroglucose	0,2	0,4	0,9	0,3	0,2	1,1	0,4	$0,5 \pm 0,2$
Anidroxilose	45,6	42,9	49,5	42,5	45,4	46,3	45,7	45,4 ± 2,3
Anidroarabinose	15,4	20,7	22,7	19,4	18,9	16,6	20,1	$19,1 \pm 2,5$
Grupo acetila	15,6	7,5	8,3	8,2	8,6	8,7	4,2	8,7 ± 3,4
					Total			
Anidroglucose	93,6	97,3	94,5	94,4	92,9	98,0	93,8	94,9 ± 3
Anidroxilose	51,8	49,1	55,3	51,6	54,3	52,7	53,3	52,6 ± 2,7
Anidroarabinose	15,4	20,7	22,7	19,4	18,9	16,6	20,1	19 ± 2,3
Grupo acetila	15,6	7,5	8,3	8,2	8,6	8,7	4,2	8,7 ± 4
Lignina total	92,8	85,3	95,1	98,1	90,4	81,5	92,1	90,8 ± 4,2
			FON	NTE: O Autor, 20	21.			

A TABELA 8 evidencia que mais de 90% das glucanas foram recuperadas na fração sólida do pré-tratamento, com desvio padrão menor que 2%. Esse fato confirma que a explosão a vapor recupera com eficiência a anidroglucose presente nas fibras do material. Por outro lado, a recuperação de xilanas na fração insolúvel foi muito baixa por motivos já explicados anteriormente (item 1.3). Esse fato corrobora a ideia de que pré-tratamentos ácidos geram um produto sólido com pouca quantidade de anidroxilose, tornando desnecessária a adição de hemicelulases durante a etapa posterior de hidrólise enzimática. Grupos acetila não foram detectados nos substratos pré-tratados, mas sua presença não foi muito uniforme nas frações hidrossolúveis de todos os experimentos. Já a concentração de xilose nas frações hidrossolúveis, majoritariamente na forma oligomérica, revelou-se interessante para a recuperação de xilo-oligossacarídeos de alto valor agregado ou mesmo para a recuperação de xilose livre por hidrólise ácida, que poderia então ser fermentada a etanol ou vertida a outros produtos de interesse como xilitol, ácidos orgânicos e compostos furânicos. A fração sólida também apresentou altos teores de lignina, cujo impacto sobre a hidrólise enzimática deve sempre ser avaliado. O ponto de maior relevância para essa parte do trabalho foi a recuperação da fração sólida em alto rendimento, pois desta depende a etapa de hidrólise enzimática em modos de batelada e batelada alimentada.

5.5 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

5.5.1 Determinação da atividade celulásica e do teor de proteína

A determinação de atividade celulásica total foi feita conforme descrito no item 3.2.1 (método NREL adaptado) e o valor médio encontrado foi de 225 FPU mL⁻¹ de Cellic CTec3, com o desvio padrão de 5,0 unidades para ensaios realizados em triplicata, o que representa aproximadamente 188 FPU g⁻¹ quando se leva em conta a densidade do produto (d = 1,19 g mL⁻¹). Esse valor está próximo ao relatado por Sun *et al.* (2015), que encontraram uma atividade celulásica total de 165 FPU g⁻¹ para a Cellic CTec3 utilizando o mesmo procedimento analítico (item 3.2.1).

A quantidade de proteína foi medida utilizando o método do ácido bicinconínico (BCA) para detecção e quantificação colorimétrica da proteína total e o valor encontrado foi de 252,3 mg g⁻¹ de Cellic CTec3 (peso úmido), com desvio de 2,3% para ensaios realizados em triplicata. O resultado obtido é comparável com o relatado por Sun *et al.* (2015), que mediram a atividade enzimática e o teor de proteína de diferentes complexos enzimáticos produzidos pela empresa Novozymes: Cellic CTec, Cellic CTec2 e Cellic CTec3. O valor encontrado por Sun *et al.* (2015) para a enzima Cellic CTec3 foi de 233,7 mg g⁻¹ de amostra (peso úmido), embora o método de medição utilizado foi com a ninhidrina.

O teste que usa o ácido bicinconínico combina a reação de redução do cobre pela presença de proteína em meio alcalino (reação de biureto), com detecção colorimétrica do complexo formado envolvendo duas moléculas de BCA e o cátion cuproso. Esse complexo absorve fortemente em 562 nm e seu aumento é linear e proporcional à concentração de proteína no meio. O método BCA oferece a vantagem de ser rápido, uma vez que os reagentes já estão prontos em um kit de baixo valor comercial. Já o método da ninhidrina, utilizado por Sun *et al.* (2015), detecta a presença do grupo α -amino livre em aminoácidos terminais de peptídeos e proteínas e do grupo ε -amino da lisina. Tal método está baseado no mecanismo de adição do nitrogênio nucleofílico a aldeídos e cetonas, formando iminas cuja concentração é medida por espectrofotometria no visível a 470 nm. Esse método apresenta a vantagem de ser rápido, sensível e preciso. No entanto, apresenta a desvantagem de ser custoso, com exigência de equipamentos e reagentes específicos tais como ninhidrina, cloreto de estanho II, etilenoglicol e uso de atmosfera de nitrogênio (STARCHER, 2001).

5.5.1 Ensaios preliminares de acessibilidade enzimática do substrato

A primeira parte dos estudos de hidrólise enzimática consistiu em realizar ensaios preliminares seguindo a norma NREL/TP 5100-63351 (RESCH *et al.*, 2015), que avalia a acessibilidade do substrato e a eficiência do pré-tratamento por meio de uma hidrólise enzimática em baixo teor de sólidos totais e alta carga enzimática. Essas reações foram realizadas nas mesmas condições estudadas por Resch *et al.* (2015), baseadas em um teor de sólidos totais de 2% e no uso de 60 FPU g⁻¹ de glucanas do complexo enzimático Cellic CTec3. Os resultados para a liberação de glucose e xilose no meio estão mostrados nos perfis cinéticos da FIGURA 24.



FIGURA 24 - RENDIMENTO EM (A) GLUCOSE E (B) XILOSE A PARTIR DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO BAGAÇO PRÉ-TRATADO EMPREGANDO 60 FPU g⁻¹ DE GLUCANA DE CELLIC CTec3 A 150 rpm POR 96 h. FONTE: O Autor (2021).

A análise dos gráficos revela que o substrato foi bastante acessível à ação das enzimas. A FIGURA 24A mostra que houve hidrólise total das glucanas presentes no bagaço pré-tratado a vapor e isso se deve à boa acessibilidade química do substrato e à excelente atividade celulásica do complexo enzimático utilizado. Já a FIGURA 24B mostra que as enzimas não foram capazes de hidrolisar a totalidade das xilanas presentes no substrato e isso se deve provavelmente ao seu baixo teor de hemiceluloses (menos que 2%) e, também,

ao tipo e distribuição das hemiceluloses que sobreviveram ao pré-tratamento. Esse fato poderia ser minimizado com a adição prévia de um complexo enzimático que tenha alta atividade hemicelulásica, como seria o caso da enzima Cellic HTec3.

Uma vez caraterizada a alta acessibilidade do substrato, o próximo passo foi a realização de um planejamento experimental para analisar os rendimentos de hidrólise.

5.5.2 Pré-otimização das reações de hidrólise enzimática

A pré-otimização das reações de hidrólise enzimática foi realizada conforme o planejamento experimental apresentado na TABELA 9. Os resultados de 48 h de hidrólise foram registrados como função resposta para o planejamento.

REAÇÃO.				
PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DE HIDRÓLISE	ENZIMÁTICA	EMPREGAN	IDO 48 h	DE
TABELA 9 – CONCENTRAÇOES DE GLUCOSE E .	XILOSE (g L ⁻¹)	OBTIDAS A	A PARTIR	DO

	Variávei	S					Resul	tados para	a 48 h c	le reação
Exp.	Sólidos 1	totais	Enzima	(FPU	Anitação	(rpm)	Gluco	se (a l -1)	Xilose	(a + 1)
	(% ST)		g ⁻¹ gluca	na)	Agnaçac	((piii)	Oluco	30 (g L)	711030	, (g L)
	Código	Valor	Código	Valor	Código	Valor	Real	Predito	Real	Predito
1	-1	5	-1	8	0	150	2,9	3,3	0,2	0,4
2	-1	5	1	40	0	150	32,1	26,8	0,8	0,8
3	0	12,5	-1	8	0	150	51,1	64,4	2,7	2,8
4	1	20	1	40	0	150	76,4	88,9	2,9	2,8
5	1	20	-1	8	-1	100	41,4	45,3	2,3	2,3
6	0	12,5	1	40	-1	100	41,9	45,3	1,3	1,6
7	0	12,5	-1	8	1	200	36,3	47,3	2,3	2,3
8	0	12,5	1	40	1	200	68,9	76,0	2,8	2,8
9	-1	5	-0	24	-1	100	28,6	32,0	1,0	0,9
10	1	20	0	24	-1	100	72,1	82,4	3,2	3,3
11	-1	5	0	24	1	200	29,0	30,3	1,2	1,4
12	1	20	0	24	1	200	84,3	92,4	3,2	3,4
13	0	12,5	0	24	0	150	54,5	62,7	2,3	2,4
14	0	12,5	0	24	0	150	56,3	62,3	2,3	2,3
15	0	12,5	0	24	0	150	57,7	65,5	2,4	2,3

FONTE: O Autor (2021).

O rendimento de glucanas em glucose (g L⁻¹) após 48 h de hidrólise enzimática foi escolhida como resposta devido a uma escolha de tempo reduzido para avaliação dos resultados e comparação entre os valores reais e preditos. Além disso, segundo Arantes e Saddler (2011), a velocidade é maior até este estágio e, a partir de então, uma diminuição expressiva é observada devido à maior recalcitrância da celulose remanescente. Estes mesmos autores relataram, por meio de uma análise técnico-econômica, que longos períodos de hidrólise acarretam em significativos aumentos no custo operacional do processo.

Os resultados obtidos para os experimentos de 48 h de hidrólise foram então submetidos à análise de variância, que se encontra mostrada na TABELA 10. O bom ajuste do modelo foi confirmado pelos valores de F para regressão e resíduos, bem como pelos altos valores de R² explicado (0,967) e de porcentagem máxima de variância explicável (0,988) para a resposta de conversão em g L⁻¹. Isto significa que 96,7% da variância foi explicada pelo modelo proposto para a conversão em glucose, garantindo-lhes uma boa previsibilidade. A Equação 20 representa o modelo quadrático que proporcionou melhor ajuste das concentrações de glucose obtidas em 48 h de hidrólise.

TABELA	10 -	PARÂM	ETROS	EST	ATÍST	ICOS	OBT	IDOS	POR	ANÁLIS	E DE	VARI	ÂNCIA
(ANOVA)	DOS	RESUL	TADOS	OBT	IDOS /	A PAF	rtir	DO P	LANE	JAMENTO) EXF	PERIME	ENTAL
BOX-BEF	INKE	N, UTILIZ	ZANDO	OS I	RENDI	MENT	OS	DE 48	3 h DE	i hidró	ISE I	ENZIM	ÁTICA
COMO FI	UNÇÃ	O RESP	OSTA.										

Fonte	SQ	GL	MQ	F	F _{tab}
Regressão	6499,9	9	722,2	46,1	4,8
Resíduos	78,4	5	15,7		
Falta de ajuste	73,0	3	24,3	9,2	19,2
Erro puro	5,3	2	2,7		
R ² = 0,9943; %Var =	0,9981				

SQ: soma dos quadrados; GL: grau de liberdade; MQ: média dos quadrados; F: distribuição de Fischer encontrada; F_{tab:} distribuição de Fischer tabelada.

 R_{Glc} = 56,14+10,94a+23,90b+4,32c-1,03ab+8,02ac+2,29bc-10,92a²-4,56b²+1,89c² Eq. 20

O modelo feito com base no planejamento experimental apresentou pequena falta de ajuste frente a um nível de confiança de 95%, o que pode ser

observado pelo gráfico de correlação entre valores observados e valores preditos que se encontra registrado na FIGURA 25.



FIGURA 25 - GRÁFICOS DE VALORES OBSERVADOS VS. VALORES PREDITOS EM GLUCOSE LIBERADA EM g L⁻¹ DOS RESULTADOS OBTIDOS A PARTIR DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL BOX-BEHNKEN, UTILIZANDO OS RENDIMENTOS DE 48 h EM GLUCOSE (g L⁻¹) AO LONGO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA COMO FUNÇÃO RESPOSTA. FONTE: O Autor (2021).

As concentrações de glucose obtidas para hidrólise com 5,0 FPU g⁻¹ de glucanas a 12% de sólidos totais foram baixas, sugerindo que nesses casos a relação enzima/substrato estava aquém do necessário para gerar bons rendimentos de hidrólise. Por outro lado, a agitação, dentro do espaço amostral empregado na execução do planejamento fatorial, não apresentou influência sobre os resultados de hidrólise enzimática.

Idealmente, uma condição reacional de hidrólise deve apresentar alta concentração de açúcares no final da reação. Esses objetivos são satisfeitos com o emprego de pelo menos 32,0 FPU g⁻¹ de glucanas para teores de sólidos totais acima de 15%. Por exemplo, o experimento 12 revelou alta concentração de açúcares após 48 h, alcançando aproximadamente 90 g L⁻¹ de glucose. De acordo com Galbe e Zacchi (2007), esta concentração já é suficiente para tornar economicamente viável a destilação do etanol após a etapa de fermentação. A análise estatística mostrou que o modelo foi capaz de representar esses dados experimentais e a análise visual da cinética de hidrólise também evidencia que, para essas condições, os valores preditos ficaram próximos dos valores experimentais (FIGURA 25).

O gráfico de Pareto da FIGURA 26 mostra o significado estatístico das diferentes variáveis do processo e suas interações primárias e secundárias. As variáveis que apresentaram maior influência positiva sobre a conversão em glucose (g L⁻¹) foram o teor de sólidos totais e a carga enzimática. A interação entre as variáveis quadráticas relativas ao teor de sólidos totais e à carga enzimática também apresentou uma influência positiva (11,23 p.p.), indicando que ao aumentar os dois parâmetros concomitantemente, a conversão em glucose é favorecida. Ainda, as componentes linear e quadrática da agitação e a interação das variáveis agitação e teor de sólidos totais favoreceram os resultados de conversão. As demais variáveis e suas interações mostraram influências inferiores a 7 p.p..



Efeito Estimado Padronizado (Valor Absoluto)

Legenda: ST, sólidos totais (% m m⁻¹); EN, carga enzimática (FPU g⁻¹ de glucanas); AG, agitação (rpm); Q, termo quadrático; L, termo linear.

FIGURA 26 - DIAGRAMA DE PARETO PARA OS RESULTADOS OBTIDOS A PARTIR DA REALIZAÇÃO DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA EMPREGANDO 48 h DE REAÇÃO. FONTE: O Autor (2021).

5.5.3 Modelagem cinética da hidrólise enzimática

Após a realização do planejamento experimental, alguns experimentos foram repetidos para buscar o objetivo de realizar a modelagem matemática para a hidrólise enzimática para altos teores de sólidos totais. As equações utilizadas nessa modelagem foram propostas por Godoy *et al.* (2019). Por meio da

utilização dos parâmetros desse modelo com os dados coletados no presente trabalho, as curvas de cinética de hidrólise enzimática foram apresentadas na FIGURA 27. Observa-se que o modelo cinético com os parâmetros apresentados por Godoy et al. (2019) não foi capaz de representar de forma adequada o comportamento da reação de hidrólise do bagaço pré-tratado por explosão a vapor, principalmente nas condições de maior concentração de sólidos totais. Tal resultado foi atribuído à existência do efeito de sólidos, que é associado a limitações de transferência de massa e à inibição enzimática pelo acúmulo do produto. Além disso, outra causa para os parâmetros não representarem bem os dados está nas equações apresentadas. Como se percebe no modelo, há apenas uma equação que representa a taxa de reação de conversão de glucanas para glucose (Equação 14). Isso evidencia que não houve consideração para a conversão de glucanas para celobiose ou mesmo de celobiose para glucose, além da inibição que esses componentes podem causar durante a reação. A ausência de equações como essas impacta diretamente no balanço de massa, que é feito por meio das Equações 12 e 13, cujas equações diferenciais indicam a conversão de celulose em glucose ao longo do tempo na reação. Isso poderia ser então corrigido com a adição de outros parâmetros e das taxas de conversão com as respectivas inibições.

As FIGURAS 27A e 27B revelam que cargas enzimáticas de 8 e 24 FPU g-1 glucana e alto teor de sólidos resultaram em baixos rendimentos de hidrólise. Isso é explicado principalmente pelo fenômeno denominado efeito de sólidos, em que a grande quantidade de sólidos inseridos no meio reacional dificulta a transferência de massa prejudicando o rendimento final. Além disso, nessas reações também existem grande quantidade de lignina presente no substrato utilizado, com valor médio de 33% (TABELA 6), que pode agir como uma barreira estérica para a ação das enzimas e ainda promover a adsorção não produtiva das celulases através de interações hidrofóbicas. Esse problema poderia ser também resolvido com a inserção de parâmetros que pudessem avaliar a adsorção e a inibição associadas à presença de lignina no meio de reação. Por exemplo, no modelo apresentado de Kadam *et al.* (2004), houve a inserção de uma isoterma de Langmuir (Equação 2) que tem por objetivo verificar a adsorção de que parte

das enzimas encontravam-se adsorvidas na lignina. Já o modelo utilizado por Godoy *et al.* (2019) desconsidera esse fenômeno.



FIGURA 27 - COMPARAÇÃO ENTRE OS VALORES EXPERIMENTAIS E CALCULADOS PELO MODELO USANDO OS PARÂMETROS CINÉTICOS APRESENTADOS POR GODOY et al. (2019) PARA A HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO BAGAÇO EXPLODIDO A VAPOR EM DIFERENTES CONDIÇÕES: (A) 8 FPU g⁻¹ glucana; (B) 24 FPU g⁻¹ glucana E (C) 40 FPU g⁻¹ glucana. FONTE: O Autor (2021).

Devido aos resultados apresentados na FIGURA 27, uma nova estimativa dos parâmetros foi feita usando-se as condições reacionais de 8 FPU g⁻¹ glucana e 5% sólidos, 40 FPU g⁻¹ glucana e 5% sólidos, 40 FPU g⁻¹ glucana e 20% sólidos, 24 FPU g⁻¹ glucana e 12,5% sólidos e os novos valores encontram-se registrados na TABELA 11, em comparação com os valores apresentados por Godoy *et al.* (2019).

Os parâmetros ajustáveis no modelo de Godoy *et al.* (2019) são k, K_M, $K_{I,G}$, a e n. As constantes de reação (k) e de inibição para a glucose ($K_{I,G}$) levaram a um impacto positivo nos rendimentos de hidrólise. Já a constante de saturação de glucanas (K_M) e os parâmetros a e n, quando aumentaram, levaram a um

efeito negativo sobre o resultado da reação. A previsão do comportamento cinético da reação foi bastante influenciada pelo parâmetro n, indicando que o aumento da concentração de glucose no meio compromete a atuação das enzimas, caracterizando a inibição retroativa ou pelo acúmulo de produto. Além disso, Godoy *et al.* (2019) empregaram a enzima comercial Cellic CTec2, cuja atividade celulásica total e teor de proteína foram de 112,65 FPU mL⁻¹ e 74,63 mg mL⁻¹, respectivamente. Já para o trabalho atual, a enzima utilizada foi a Cellic CTec3, cuja atividade enzimática e teor de proteína correspondem a 225 FPU mL⁻¹ e 252,3 mg mL⁻¹, respectivamente, utilizando os mesmos métodos de medição.

TABELA 11 - VALORES ESTIMADOS NESSE TRABALHO DE ACORDO COM O MODELO MATEMÁTICO UTILIZADO EM COMPARAÇÃO COM OS RESULTADOS ENCONTRADOS POR GODOY *et al.* (2019).

Derâmetre	Valor estimado nesse	Valor estimado por Godoy
Parametro	trabalho	<i>et al.</i> (2019)
k (h ⁻¹)	1,7974	4,367
К _м (g L ⁻¹)	1,6663 x 10 ⁻²	0,018
K _{I,G} (g L ⁻¹)	1,3575 x 10 ⁻²	8,300 x 10 ⁻³
а	1,8825 x 10 ⁻³	0,100
n	2,4717	1,557
RMSD (g L ⁻¹)	5,8	7,9

k: constante da reação (h-1);

K_M: constante de saturação de glucanas;

K_{I,G}: constante de inibição para a glucose;

a: parâmetro com dimensões (g L⁻¹) (1-n);

n: parâmetro adimensional.

FONTE: O Autor (2021).

Os parâmetros que sofreram maior ajuste (TABELA 10) foram a constante cinética e o parâmetro adimensional n. Esse último, de acordo com a Equação 11, tem a capacidade de influenciar a constante de inibição de forma exponencial durante a modelagem matemática. O modelo simplificado proposto por Godoy *et al.* (2019), cujos parâmetros estão na (TABELA 10), considera que a inibição é devida apenas ao acúmulo da glucose, mas sabe-se que presença de celobiose pode exercer um poder inibitório ainda maior sobre as celulases, o que nos permite comcluir que um parâmetro para esse efeito também deveria

existir no modelo. Tal parâmetro foi considerado no modelo desenvolvido por Kadam *et al.* (2004), pois as Equações 3 e 4 se referem à conversão de glucanas em celobiose e glucose, respectivamente, com a presença do fator de inibição de celobiose considerado em ambos os casos. Kadam *et al.* (2004) demonstraram que a inibição retroativa, ou seja, pelo acúmulo dos produtos de reação no meio, é alta para tempos acima de 48 h de reação e dessa forma a inserção de um parâmetro relativo a essa inibição seria importante para situações em que o tempo de incubação fosse mais longo. No entanto, deve-se ressaltar que o acúmulo de celobiose depende intrinsecamente da quantidade de atividade β -glucosidásica na preparação enzimática utilizada para a hidrólise, atividade essa muito alta no caso da enzima Cellic CTec3.

5.5.3.1 Validação do modelo matemático

Após o reajuste e a apresentação dos novos parâmetros do modelo cinético, novas simulações foram realizadas paralelamente à validação do modelo, conforme apresentado na FIGURA 28.

A validação do modelo foi realizada com condições experimentais diferentes daquelas utilizadas para o ajuste dos parâmetros relatados na TABELA 11. A FIGURA 28 mostra a qualidade dos ajustes, inclusive para bateladas com altos teores de sólidos (vide curvas de linha preta). Vale também ressaltar que o erro quadrático médio (RMSD) obtido (5,9 g L⁻¹) foi menor do que o apresentado por Godoy *et al.* (2019).

5.5.3.2 Simulações das reações em batelada alimentada

Após construção, ajuste e validação do modelo para hidrólise enzimática em batelada, os mesmos parâmetros foram usados para realizar a modelagem em regime de batelada alimentada, com alimentações intermitentes de substrato. Foram realizadas diferentes condições para avaliar a adição de sólidos e a adição de carga enzimática ao longo de 96 h de reação. O planejamento desses experimentos encontra-se na TABELA 12 e os resultados foram representados graficamente na FIGURA 29.



FIGURA 28 – COMPARAÇÃO ENTRE OS VALORES EXPERIMENTAIS E CALCULADOS PELO MODELO USANDO OS PARÂMETROS CINÉTICOS AJUSTADOS NO PRESENTE TRABALHO PARA A HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO BAGAÇO EXPLODIDO A VAPOR EM DIFERENTES CONDIÇÕES: **(A)** 8 FPU g⁻¹ glucana; **(B)** 24 FPU g⁻¹ glucana E **(C)** 40 FPU g⁻¹ glucana. FONTE: O Autor (2021).

As reações A, B e C da TABELA 12 tiveram cargas iniciais de sólidos de 10%, seguidas da adição de mais 20% divididos em partes iguais em 6, 9, 12 e 24 h de reação, totalizando 30% de sólidos totais. Os melhores rendimentos foram encontrados nas reações A e C, em que a concentração final chegou próxima de 92 g L⁻¹ para carga inicial de sólidos totais de 10% e carga enzimática total de 24 FPU g⁻¹ glucana. A única diferença entre estas condições experimentais foi o critério de adição de enzimas ao longo do processo: na reação A toda a enzima foi adicionada de uma única vez no início da reação, enquanto na reação C esta mesma carga enzimática foi dividida em duas partes iguais que foram adicionadas no início e após 9 h de reação.

			א הרטוואור טר טר				
Reação	Carga inicial de sólidos totais (%)	Carga inicial de enzima (FPU g ⁻¹	Massa de su adicionado	lbstrato o (%)	Carga de adicionada glucar	enzima (FPU g ⁻¹ 1a)	Concentração final de alucose (a/L)
		glucana)	Tempo(h)	Carga	Tempo(h)	Carga	
			9	5			
<	0	V C	6	5			01 05
۲	0	74	12	5	INEILINE		8 I,00
			24	5			
			9	5	9	0	
C	0	r c	6	5	6	2,4	
מ	0.	24	12	5	12	2,4	- øu,us
			24	5	24	2,4	I
			9	5			
¢	0	C T	6	5	C	(7	
ر	0	7	12	5	ת	7	91,90
			24	5			
					6	2,4	
Ω	20	24	Nenhur	Ę	12	2,4	76,31
					24	2,4	
					6	2,4	
ш	12,5	24	Nenhur	E	12	2,4	55,64
					24	2,4	
		_	FONTE: O Autor ((2021).			

TABELA 12 - CONDICÕES REALIZADAS PARA AS REACÕES EM REGIME DE RATEI ADA AI IMENTADA

101





FIGURA 29 - CINÉTICA DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA EM BATELADA ALIMENTADA DO BAGAÇO PRÉ-TRATADO A VAPOR. SÍMBOLOS REPRESENTAM OS VALORES EXPERIMENTAIS DA CONCENTRAÇÃO DE GLUCOSE E AS LINHAS REPRESENTAM OS VALORES SIMULADOS. FONTE: O Autor (2021).

Os perfis de hidrólise obtidos demonstram que a adição total de enzima (24 FPU g⁻¹ de glucana) logo no início da reação permitiu atingir em torno de 30 g L⁻¹ de glucose em 6 h de reação (reação A), enquanto na reação C, desse mesmo tempo, a concentração de glucose foi de apenas 20 g L⁻¹. Os dados experimentais apresentaram a mesma tendência em outros tempos de reação, como, por exemplo, em 24 h, quando a concentração de glucose foi de 50 g L⁻¹

para a reação C e de 50 g L⁻¹ para a reação A. Apesar destas diferenças, os consumos de glucanas (celulose) após 96 h de hidrólise foram similares, porém, o modelo foi claramente mais preditivo para a reação A, em que a totalidade da enzima foi adicionada no início (FIGURA 29A e 29C).

A Reação B apresentou a adição tanto de substrato como de enzima em 6, 9 12 e 24 h de reação, com teor inicial de sólidos de 10% e carga enzimática inicial de 24 FPU g⁻¹ glucana. Essa adição de enzima, na proporção de 10% do valor inicial nos tempos de 9, 12 e 24 h (TABELA 12), foi feita com o intuito de avaliar a eventual perda de atividade catalítica ao longo do processo. Percebese na FIGURA 29B e nos dados da TABELA 12 que a inserção de quantidades adicionais de enzima aumentou consideravelmente o rendimento de hidrólise em tempos de 24 h. Porém, não houve mudança substancial nos rendimentos finais de hidrólise (96 h de reação), demonstrando que, nestas condições, a uso de cargas enzimáticas adicionais só seria vantajoso para menores tempos de reação.

A reação C pode ser comparada ao experimento 12 do planejamento experimental (TABELA 9), que foi realizado em condições similares e produziu de 84,3 g L⁻¹ de glucose, porém, sem a adição de carga enzimática complementares. Esse rendimento foi o melhor rendimento do planejamento fatorial, que utilizou a carga máxima de sólidos para a estratégia de reação em batelada (20%). Portanto, concluiu-se que as condições de batelada alimentada empregadas nesse experimento terial a capacidade de aumentar a conversão de glucanas em pelo menos 17%.

Nas reações D e E da TABELA 12, a carga de sólidos foi adicionada de uma única vez, no início da reação, enquanto diferentes cargas enzimáticas foram adicionadas ao longo do tempo. A reação D iniciou com uma carga de 20% de sólidos com a adição de 10% da carga inicial de enzima nos tempos de 9, 12 e 24 h. Apesar de começar com uma grande carga de sólidos, o rendimento final de hidrólise foi baixo, produzindo apenas 76,31 g L⁻¹ de glucose. Essa reação mostrou que a adição de sólidos de uma única vez resulta em valores menores de conversão de glucanas, mesmo com a adição de enzimas ao longo da reação, evidenciando problemas relacionados à transferência de massa e energia (efeito de sólidos), como já relatado por outros autores (CHEN *et al.*, 2007; LIU *et al.*, 2015; GODOY *et al.*, 2019).

A reação D pode ser comparada ao experimento 12 do planejamento experimental (TABELA 8), que foi realizado em condições semelhantes e apresentou a produção de 84,3 g L⁻¹ de glucose, porém, sem a adição de cargas enzimáticas adicionais. Assim, em primeira análise, pode-se concluir que o uso de cargas enzimáticas não aumentou o rendimento da reação de hidrólise. No entanto, a adição de cargas adicionais de enzima gerou um efeito de diluição, já que a enzima foi pré-condicionada em tampão acetato antes de ser transferida para o meio de reação.

Uma forma de avaliar a influência da diluição é por meio da análise do rendimento expresso em massa, conforme demonstrado na FIGURA 30. No entanto, esse exercício foi apenas realizado para as reações B e C da TABELA 12 porque, na reação B, houve tanto adição de substrato quanto de enzima (TABELA 12) e o volume final atingiu cerca de 186 mL, enquanto na reação C houve apenas uma única adição de enzima e o volume final atingiu cerca de 166 mL, sempre levando em conta o teor de umidade do substrato e o volume de adição da enzima. Assim, apesar do volume final ter sido maior para a reação B, os resultados destas duas reações (cerca de 16 g de glucose em 96 h de reação) foram muito próximos quando expressos em rendimento mássico. Portanto, esse resultado mostra que o uso de cargas adicionais de enzima não foi capaz de aumentar o rendimento mássico de glucose em 96 h de reação. Dessa forma, o aumento da carga de enzimas adicionada ao meio só encarece o procedimento de hidrólise sem acarretar aumentos expressivos do rendimento da reação, provavelmente devido ao acúmulo de lignina no meio e a conseguente perda de atividades enzimáticas essenciais por fenômenos de adsorção.

Da mesma forma que na reação D, a reação E demonstrou que adição de carga enzimática ao longo do tempo não contribuiu para o aumento da conversão final de glucose (FIGURA 29E). Essa reação teve início com a carga de sólidos de 12,5% e carga enzimática de 24 FPU g⁻¹ de glucanas, com uso adicional de 10% desse valor inicial (ou seja, de 2,4 FPU g⁻¹) nos tempos de 9, 12 e 14 h de hidrólise. A reação E pode então ser comparada aos experimentos 13 a 15 do planejamento experimental da TABELA 8, que produziram concentrações de glucose muito semelhantes (em torno de 55 g L⁻¹) sem o emprego de cargas enzimáticas adicionais durante a reação de hidrólise.



FIGURA 30 – ANÁLISE DO RENDIMENTO EXPRESSO EM MASSA DE EQUIVALENTE DE GLUCOSE EM GRAMAS PELO TEMPO DE REAÇÃO. FONTE: O Autor (2021).

De todas os experimentos realizados em batelada alimentada, a reação A foi a mais próxima às condições normalmente descritas na literatura, em que apenas o substrato é adicionado em etapas e, para esse sistema, os dados experimentais foram muito próximos aos valores simulados no modelo. No entanto, a falta de ajuste para outras condições experimentais revela que o modelo empregado ainda é muito simplificado para descrever todos os fenômenos envolvidos ao longo do processo de hidrólise enzimática em alto teor de sólidos totais, particularmente quando essa é realizada em regime de batelada alimentada.

Os rendimentos mássicos de hidrólise da FIGURA 30 também foram calculados e expressos em relação à massa de glucanas adicionada ao meio de reação, durante o experimento de batelada alimentada. Tais cálculos também foram realizados apenas para as reações B e C da TABELA 11 e os resultados encontram-se registrados na FIGURA 31. Percebe-se, em ambos os casos, rendimentos teóricos de 80% foram atingidos ao fim de 96 h de hidrólise, apesar da carga de sólidos ter atingido 30% usando a estratégia de batelada alimentada com a carga total de enzimas dividida e adicionada em tempos diferentes de reação.

A aplicação do modelo simplificado de Godoy *et al.* (2019) aos seus dados experimentais mostrou-se adequada e preditiva, com todos os parâmetros sendo significativos a um nível de confiança de 95%. Porém, o modelo proposto para reações em batelada não foi robusto o suficiente para ajustar os dados experimentais gerados no presente trabalho, exigindo, com isso, o reajuste de

todos os parâmetros nele envolvidos. Várias razões podem ser elencadas para justificar essa observação experimental, sendo que as mais imediatas estariam relacionadas ao substrato e às enzimas utilizadas nesses estudos. Apesar de Godoy et al. (2019) também terem utilizado bagaco de cana explodido a vapor. as condições experimentais de pré-tratamento foram diferentes, gerando substratos com diferentes composições químicas e suscetibilidades à hidrólise enzimática. Por outro lado, Godoy et al. (2019) empregaram Cellic CTec2 em seus ensaios de hidrólise, enquanto o presente trabalho foi baseado no uso de uma enzima de maior atividade e melhor desempenho de hidrólise (Cellic CTec3). Portanto, estima-se que a inserção de novos parâmetros no modelo, que levem em consideração propriedades das enzimas empregadas, como teor proteico, atividade celulásica total e presença de atividades auxiliares em sua composição, possa facilitar a comparação entre esses dois projetos de investigação (Nwamba et al. 2021). Além disso, vale ressaltar que a inserção de um parâmetro inibitório em relação ao acúmulo de celobiose no meio não foi considerado em ambos os estudos porque a atividade β-glucosidásica das duas enzimas (Cellic CTec2 e Cellic CTec3) é muito alta. Assim, tal argumento seria ainda mais válido para o presente estudo, porque tal atividade β-glucosidásica da Cellic CTec3 é muito superior à observada na Cellic CTec2.



FIGURA 31 – RENDIMENTO DE GLUCOSE EM RELAÇÃO AO TEOR DE GLUCANAS PRESENTE NO MEIO EM CADA TEMPO DE REAÇÃO. FONTE: O Autor (2021).

6 CONCLUSÃO

O pré-tratamento por explosão a vapor do bagaço de cana-de-açúcar produziu um material bastante uniforme para a realização dos experimentos de hidrólise enzimática, com teor de glucanas próximo de 55% e alta suscetibilidade à hidrólise enzimática. Além disso, o balanço mássico do pré-tratamento mostrou recuperação de glucanas e de lignina acima de 90%, além de recuperação de xilanas próxima de 70%. Os ensaios de hidrólise enzimática mostraram que o melhor resultado de hidrólise foi atingido com 20% de sólidos e 24 FPU g⁻¹ glucana, com liberação de aproximadamente 84 g L⁻¹ de glucose. No entanto, a condição de batelada alimentada com carga final de 30% de sólidos e 24 FPU g⁻¹ glucana alcançou um resultado próximo de 91 g L⁻¹ de glucose. Portanto, a estratégia de batelada alimentada para a reação de hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado a vapor resultou em um aumento de pelo menos 10% na conversão de glucanas em glucose.

O modelo cinético baseado nos parâmetros apresentados por Godoy et al. (2019) não foi capaz de se ajustar aos dados experimentais obtidos nesse trabalho e de representar de forma adequada o comportamento cinético da reação de hidrólise em regime de batelada do bagaço pré-tratado por explosão a vapor, principalmente nas condições de maior concentração de sólidos totais (acima de 12,5% de sólidos). O modelo não se ajustou devido ao substrato diferente e ao complexo enzimático, mas também devido à simplicidade das equações utilizadas. No caso desse trabalho, os parâmetros do modelo de Godoy *et al.* (2019) foram reajustados e em seguida ele foi validado. Esse modelo validado para o regime de batelada com os novos parâmetros foi utilizado para simulação do regime em batelada alimentada e foi capaz de prever os resultados nesse regime de operação.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, R. S.; SILVEIRA, M. H. L.; PITARELO, A. P.; CORAZZA, M. L.; RAMOS, L. P.
 Kinetics of enzyme-catalyzed hydrolysis of steam-exploded sugarcane bagasse.
 Bioresource Technology, v. 147, p. 416-423, 2013.
- ADNEY, B.; BAKER, J. Measurement of cellulase activities. **NREL Report No. TP-510-42628**, Golden, CO, 2008.
- AHMED, F.; SONG, H. S.; OOI, C. W.; HO, Y. K. Modelling heterogeneity in cellulose properties predicts the slowdown phenomenon during enzymatic hydrolysis.
 Chemical Engineering Science, v. 206, p. 118-133, 2019.
- ANGARITA, J. D.; SOUZA, R. B. A.; CRUZ, A. J. G.; BISCAIA Jr. E. C.; SECCHI, A. R.
 Kinetic modeling for enzymatic hydrolysis of pretreated sugarcane straw.
 Biochemical Engineering Journal, v. 104, p. 10-19, 2015.
- AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO (ANP). **Anuário estatístico 2020**. Disponível em: http://www.anp.gov.br/arquivos/central-conteudos/anuarioestatistico/2020/texto-secao-4.pdf>. Acesso em 02/03/2021.
- ARANTES, V.; SADDLER, J. N. Cellulose accessibility limits the effectiveness of minimum cellulase loading on the efficient hydrolysis of pretreated lignocellulosic substrates. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, p.3, 2011.
- ARAUJO, J. D. P.; GRANDE, C. A.; RODRIGUES, A. E. Vanillin production from lignin oxidation in a batch reactor. Chemical Engineering Research and Design. v. 88, p. 1024–1032, 2010.
- ARAUJO, A.; D'SOUZA, J. Characterization of cellulolytic enzyme components from *Aspergillus terreus* and its mutant. Journal of Fermentation Technology, v. 64, p. 463-467, 1986.
- BAKER, D. A.; RIALS, T. G. Recent advances in low-cost carbon fiber manufacture from lignin. **Journal of Applied Polymer Science**. v. 130, p. 713–728, 2013.
- BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: a review. Energy Conversion and Management, v. 52, p. 858-875, 2011.

BALLESTEROS, M.; OLIVA, J. M.; MANZANARES, P.; JAND NEGRO, M.;

BALLESTEROS, I. Ethanol production from paper material using a simultaneous saccharification and fermentation system in a fed-batch basis. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, p. 559-561, 2002.

- BALI, G.; MENG, X.; DENEFF, J. I.; SUN, Q.; RAGAUSKAS, A. J. The effect of alkaline pretreatment methods on cellulose structure and accessibility. **ChemSusChem**, v. 8, p. 275-279, 2015.
- BERNARDI, A. V.; GEROLAMO, L. E.; GOUVÊA, P. F.; YONAMINE, D. K.; PEREIRA,
 L. M. S.; OLIVEIRA, A. H. C.; UYEMURA, S. A.; DINAMARCO, T. M. LPMO
 AfAA9_B and Cellobiohydrolase AfCel6A from A. fumigatus Boos Enzymatic
 Saccharification Activity of Cellulase Cocktail. International Journal of Molecular
 Sciences, v. 22, p. 276-299. 2021.
- BEZERRA, R. M. F.; DIAS, A. Utilization of integrated michaelis-menten equation to determine kinetic constants. Biochemistry And Molecular Biology Education, v. 35, n. 2, p.145-150, 2007.
- BONOMI A.; SCHMIDELL, W. Modelagem matemática e simulação de processos fermentativos. Biotecnologia industrial Engenharia Bioquímica. São Paulo: Edgard Blucher, p. 123-178, 2001.
- BRASIL. **RenovaBio**. Ministério de Minas e Energia. Disponível em: http://www.mme.gov.br. Acesso em 04 de junho de 2020.
- BRASIL. Resolução nº 5 de 5 de junho de 2018. Estabelece as metas compulsórias anuais de redução de emissões de gases causadores do efeito estufa para a comercialização de combustíveis. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 06 jun. 2018. Disponível em: http://www.in.gov.br. Acesso em 25 mar. 2019.
- CAVALETT, O.; CHAGAS, M. F.; JUNQUEIRA, T. L.; WATANABE, M. D.; BONOMI, A. Environmental impacts, of technology learning curve for cellulosic ethanol in Brazil. Industrial Crops and Products, v. 106, p. 31-39, 2017.
- CARVALHO, D. M.; ABAD, M. A.; EVTUGUIN, A.V.; COLODETTE, J. L.; LINDSTRÖM, M. E.; VILAPLANA, F.; SEVASTYANOVA, O. Isolation and characterization of

acetylated glucuronoarabinoxylan from sugarcane bagasse and straw. **Carbohydrates Polymers**, v. 156, p. 223-234, 2017.

- CASTRO, E.; NIEVES, I. U.; RONDÓN, V.; SAGUES, W. J.; SANDOVAL, M. T. F.; YOMANO, L. P.; YORK, S. W.; ERICKSON, J. W. V. Potential for ethanol production from different sorghum cultivars. **Industrial Crops & Products**, v. 109, p. 367-373, 2017.
- CHEN, H.; LIU, Z. Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass from low to high solids loading. **Engineering Life Science**, v. 17, p. 489-499, 2017.
- CHEN, M.; XIA, L.; XUE, P. Enzymatic hydrolysis of corncob and ethanol production from cellulosic hydrolysate. International Biodeterioration & Biodegradation, v. 59, p. 85-89, 2007.
- CHEN, W. H.; TSAI, C. C.; LIN, C. F.; TSAI, P.Y.; HWANG, W.S. Pilot-scale study on the acid-catalyzed steam explosion of rice straw using a continuous pretreatment system. **Bioresource Technology**, v. 128, p. 297-304, 2013.
- CHIO, C.; SAIN, M.; QIN, W. Lignin utilization: A review of lignin depolymerization from various aspects. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 107, p. 232-249, 2019.
- CLARK, J. H.; LUQUE, R.; MATHARU, A. S. Green Chemistry, biofuels and biorefinary. Annu. Rev. Cehm. Biomol. Eng. 3:183-207, 2012.

CLAYDEN J.; GREEVES, N.; WARREN, S. Organic Chemistry. Oxford, v. 2, 2012.

- CONAB. Acompanhamento da Safra Brasileira de Cana-de-açúcar. Primeiro levantamento, v. 1, Safra 2020/21, 2021.
- CUNHA, C. M.; SILVA, F. T. Characterization of carbohydrates present in hydrolysate obtained from sugar cane bagasse pretreated by explosion. 6th Brazilian
 Symposium Chemistry Lignins and other Wood Components, vol. VII, Proceedings, São Paulo, 2001. p.221-226.
- DA COSTA LOPES, A. M.; JOÃO, K. G.; RUBIK, D.F.; BOGEL-LUKASIK, E.; DUARTE,
 L. C.; ANDREAUS, J.; BOGEL-LUKASIK, R. Pretreatment of lignocellulosic
 biomass using ionic liquids: wheat strw fractionation. Bioresource Technology, v.
 142, p. 198-208, 2013.

- D'ALMEIDA, M. L. O. Composição química de materiais lignocelulósicos: Celulose e Papel. ed. São Paulo: Instituto de Pesquisas do Estado de São Paulo, 1988.
- DANIEL, R. M.; DINES, M.; PETACH, H. H. The denaturation and degradation of stable enzymes at high temperature. **Biochemistry**, v. 317, p. 1-11, 1996.
- DAVIS, R.; R. DAVIS, L. TAO, E. C. D. TAN, M. J. BIDDY, G. T. BECKHAM, C. SCARLATA, J. JACOBSON, K. CAFFERTY, J. ROSS, J. LUKAS, D. KNORR AND P. SCHOEN. Process design and economics for the conversion of lignocellulosic biomass to hydrocarbons: Dilute acid and enzymatic Deconstruction of biomass to sugars and biological conversion of Sugars to Hydrocarbons. NREL Report No. TP-5100-60223, Golden, CO, 2013.
- DIAS, M. O. S.; FILHO, R. M.; MANTELATTO, P. E.; CAVALETT, O.; ROSSELL, C. E. V.; BONOMI, A.; LEAL, M. R. L. Sugarcane processing for ethanol and sugar in Brazil. Environmental Development, v. 15, p. 35-5, 2015.
- DIGAITIS, R.; THYBRING, E. E.; THYGESEN, L. G. Investigatind the role of mechanics in lignocellulosic biomass degradation during hydrolysis: Part II. **Biotechnology Progress**, IN PRESS, 2020.
- DING, S.; HIMMEL, M. E. The maize primary cell wall microfibril: a new model derived from direct visualization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 597-606, 2006.
- DOU Diário Oficial da União. Resolução nº 5 de 5 de junho de 2018. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 06 jun. 2018. Disponível em: http://www.in.gov.br. Acesso em 25 mar. 2019.
- DU, J.; LIANG, J.; GAO, X.; LIU, G.; QU, Y. Optimization of an artificial cellulase cocktail for high-solids enzymatic hydrolysis of cellulosic materials with different pretreatment methods. **Bioresource Technology**, v. 295, p. 122272, 2020.
- EMANUEL, E. **Techno-economic implications of fed-batch enzymatic hydrolysis**. Master thesis. University of Nebraska, 2017.
- ENAYATI, N.; PARULEKAR, S. J. Enzymatic saccharification of soybean hull-based materials. **Biotechnology Progress**, v.11, p. 708-711, 1995.

- FAO. The state of food agriculture. Biofuels: prospects, risks and opportunities –
 Food and Agricultural Organisation of the United Nations, 2008. Disponível em:
 www.fao.org. Acesso em 30 de março de 2019.
- FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood: chemistry, ultrastructure, reactions**. Ed. New York, NY, USA: Walter de Gruyter, 1989.
- FENILA, F.; SHASTRI, Y. Optimal control of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. **Resource Efficient Technologies**, p. S96-S104, 2016.
- FOCKINK, D. H.; URIO, M. B.; CHIARELLO, L. M.; JORGE, H. S.; RAMOS, L. P.
 Principles and challenges involved in the enzymatic hydrolysis of cellulosic materials at high total solids. In: Soccol C., Brar S., Faulds C., Ramos L. (eds)
 Green Fuels Technology. Green Energy and Technology, Springer, pp. 147–173, 2016.
- FOCKINK, D. H.; URIO, M. B.; SÁNCHEZ, H. J.; RAMOS, L. P. Enzymatic hydrolysis of steam-treated sugarcane bagasse: effect of enzyme loading and substrate total solids on its fractal kinetic modeling and rheological properties. **Energy Fuels**, v. 31, p. 6211-6220, 2017.
- FOCKINK, D. H.; SÁNCHEZ, H. J.; RAMOS, L. P. Comprehensive analysis of sugarcane bagasse steam explosion using autocatalysis and dilute acid hydrolysis (H₃PO₄ and H₂SO₄) at equivalent combined severity factors. **Industrial Crops and Products**, v. 123, p. 563-572, 2018.
- FRENCH, A. D.; BERTONIERE, N. R.; BROWN, R. M.; CHANZY, H.; GRAY, D.; HATTORI, K.; GLASSE, W. Cellulose. Encyclopedia of Polymer Science and Technology, v. 5, p. 473-507, 2003.
- GALBE, M.; ZACCHI, G. Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production. In: L. Olsson. Biofuels. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 2007. p. 41-65.
- GÁMEZ, S.; GONZÁLEZ-CABRIALES, J. J.; RAMÍREZ, J. A.; GARROTE, G.; VÁZQUEZ, M. Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid. **Journal of Food Engineering**, v. 74, p. 78-88, 2006.

- GAO, Y.; XU, J.; YUAN, Z.; ZHANG, Y.; LIU, Y.; LIANG, C. Optimization of fed-batch enzymatic hydrolysis from alkali-pretreated sugarcane bagasse for highconcentration sugar production. **Bioresource Technology**, v. 167, 41–45, 2014.
- GAUR, R.; SEMWAL, S.; RAJ, T.; LAMBA, B. Y.; RAMU, E.; GUPTA, R. P.; KUMAR,
 R.; PURI, S. K. Intensification of steam explosion and structural intricacies
 impacting sugar recovery. Bioresource Technology, v. 241, p. 692-700, 2017.
- GENG, W.; JIN, Y.; JAMEEL, H.; PARK, S. Strategies to achieve high-solids enzymatic hydrolysis of dilute-acid pretreated corn stover. **Bioresource Technology**, v. 187, p. 43-48, 2015.
- GHOSE, T.K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, p. 257-268, 1987.
- GODOY, C. M.; MACHADO, D. L.; COSTA, A. C. Batch and fed-batch enzymatic hydrolysis of pretreated sugarcane bagasse – Assays and modeling. Fuel, v. 253, p. 392-399, 2019.
- GUPTA, R.; KUMAR, S.; GOMES, J.; KUHAD, R. C. Kinetic study of batch and fedbatch enzymatic saccharification of pretreated substrate and subsequent fermentation to ethanol. **Biotechnology for Biofuels**, p. 5-16, 2012.
- HALLAC, B. B.; RAGAUSKAS, A. J. Analyzing cellulose degree of polymerization and its relevancy to cellulosic ethanol. Biofuels, Bioproducts and Biorefining, v. 5, p. 215-225, 2011.
- HERNÁNDEZ-BELTRÁN, J. U.; HERNÁNDEZ-ESCOTO, H. Enzymatic hydrolysis of biomass at high-solids loadings through fed-batch operation. Biomass and Bioenergy, v. 119, p. 191-197, 2018.
- HODGE, D. B.; KARIM, M. N.; SCHELL, D. J.; MCMILLAN, J. D. Model-based fedbatch for high-solids enzymatic cellulose hydrolysis. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 152, p. 88-107, 2009.
- HOLLADAY, J. E.; BOZELL, J. J.; WHITE, J. F.; JOHNSON, D. Top value-added chemicals from biomass. Volume II – Results of Screening for potential candidates from Biorefinary Lignin. DOE Report PNNL-16983, 2007. Disponível em: http://chembioprocess.pnl.gov. Acesso em: 30 de março de 2019.

- HOLTZAPPLE, M.; KARIM, M. N.; GU, C.; LIANG, C., RAFTERY, J. Development of modified HCH-1 kinetic model for long-term enzymatic cellulose hydrolysis and comparison with literature models. **Biotechnology for Biofuels**, p. 12-34, 2019.
- HON, D. N. S.; SHIRAISHI, N. Wood and Cellulosic Chemistry. New York, USA. 2nd ed. 2000.
- HUMBIRD, D.; MOHAGHEGHI, A.; DOWE, N.; SCHELL, D. Economic Impact of Total Solids Loading on Enzymatic Hydrolysis of Dilute Acid Pretreated Corn Stover.
 Biotechnology Progress, v. 26, p. 1245-1251, 2010.
- JØRGENSEN, H.; KRISTENSEN, J. B.; FELBY, C. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. Biofuels, Bioproducts and Biorefining, v. 1, p. 119-134, 2007.
- JONKER, J.; VAN DER HILST, F.; JUNGINGER, H.; CAVALETT, O.; CHAGAS, M.; FAAIJ, A. Outlook for ethanol production costs in Brazil up to 2030, for different biomass crops and industrial technologies. **Applied Energy**, v. 147, p. 593-610, 2015.
- KADAM, K. L.; RYDHOLM, E. C.; McMILLAN, J. D. Development and validation of a kinetic model for saccharification of lignocellulosic biomass. Biotechnology
 Progress, v. 20, p. 698-705, 2004.
- KADIC, A.; PALMQVIST, B.; LIDÉN, G. Effects of agitation on particle-size distribution and enzymatic hydrolysis of pretreated spruce and giant reed. Biotechnology for Biofuels, v. 7, p. 77-87, 2014.
- KHAMSEH, A. A. G.; MICCIO, M. Comparison of batch, fed-batch and continuous wellmixed reactors for enzymatic hydrolysis of orange peel wastes. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 1588-1594, 2012.
- KIM, S.; HOLTZAPPLE, M. T. Effect of structural features on enzyme digestibility of corn stover. Bioresource Technology, v. 97, p. 583-591, 2006.
- KLOCK, U.; MUÑIZ, G. I. B.; HERNANDEZ, J. A.; ANDRADE, A. S. Química da Madeira. Fupef, Curitiba, 2005.
- KOPELMAN, R. Fractal Reaction Kinetics. Science, v. 241, p. 1620-1626, 1988.

- KOLASA, M.; AHRING, B. K.; LUBECK, P. S.; LUBECK, M. Co-cultivation of *Trichoderma reesei* RutC30 with three black *Aspergillus* strains facilitates efficient hydrolysis of pretreated wheat straw and shows promises for on-site enzyme production. **Bioresource Technology**, v. 169, p. 143-148, 2014.
- KUKLE, S.; GRAVITIS, J.; PUTNINA, A.; STIKUTE, A. The effect of steam explosion treatment on technical hemp fibres. Environmental Technology Resources, v. 1, p. 230-237, 2011.
- LALANNE, L.; NIANHONGO, G. S.; GUEBITZ, G. M.; PELLIS, A. Biotechnological production and high potential of furan-based renewable monomers and polymers.
 Biotechnology Advances, v. 48, p. 107707, 2021.
- LAN, T. Q.; GLEISNER, R.; ZHU, J. Y.; DIEN, B. S.; HECTOR, R. E. High titer ethanol production from SPORL-pretreated lodgepole pine by simultaneous enzymatic saccharification and combined fermentation. **Bioresource Technology**, v. 127, p. 391-297, 2013.
- LAUREANO-PEREZ, L.; TEYMOURI, F.; ALIZADEH, H.; DALE, B. E. Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 124, p. 1081-1099, 2005.
- LAURICHESSE, S.; AVEROUS, L. Chemical modification of lignins: Towards biobased polymers. **Progress in Polymer Science**, v. 39, p. 1266-1290, 2014.
- LIAO W.; LIU Y.; WEN Z.; FREAR C.; CHEN S. Kinetic modeling of enzymatic hydrolysis of cellulose in differently pretreated fiber from dairy manure. Biotechnology Bioeng., v.101, p. 441-451, 2008.
- LI J.; LI, S.; HAN, B.; YU, M.; LI, G.; JIANG, Y. A novel cost-effective technology to convert sucrose and homocelluloses in sweet sorghum stalks into ethanol.
 Biotechnology for Biofuels., v.6, p. 174-186, 2013.
- LIN, S. Y.; DENCE, C. W. Methods in lignin chemistry. Ed. Springer, 1992.
- LIU, Y.; XU, J.; ZHANG, Y.; YUAN, Z.; XIE, J. Optimization of high solids fed-batch saccharification of sugarcane bagasse based on system viscosity changes. Journal of Biotechnology, v. 21, p. 5-9, 2015.

- LONGATI, A. A.; LINO, A. R. A.; GIORDANO, R. C.; FURLAN, F. F.; CRUZ, A. J. G. Defining research and development process targets through retro-technoeconomic analysis: The sugarcane biorefinery case. **Bioresource Technology**, v. 263, p. 1-9, 2018.
- MARJANOFF, P. J.; GRAY, P. P. Optimization of steam explosion as method for increasing susceptibility of sugarcane bagasse to enzymatic saccharification.
 Biotechnology Bioengineering. v. 29, p. 733-741, 1987.
- MARTÍN, C.; GALBE, M.; NILVEBRANT, N.; JÖNSSON, L. J.; Comparison of the fermentability of enzymatic hydrolysates of sugarcane bagasse pretreated by steam explosion using different impregnating agents. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.98-100, p. 700-716, 2002.
- MILES-BARRETT, D. M.; NEAL, A. R.; HAND, C.; MONTGOMERY, J. R.; PANOVIC, I.; OJO, O. S.; LANCEFIELD, C. S.; CORDES, D. B.; SLAWIN, A. M.; LEBL, T. The synthesis and analysis of lignin-bound Hibbert ketone structures in technical lignins. Organic & Biomolecular Chemistry, v. 14, p. 10023-10030, 2016.
- MESA, L.; GONZÁLEZ, E.; RUIZ, E.; ROMERO, I.; CARA, C.; FELISSIA, F.; CASTRO,
 E. Preliminary evaluation of organosolv pre-treatment of sugar cane bagasse for glucose production: Application of 2³ experimental design. Applied Energy, v.87, p. 109-114, 2010.
- MIGUEL, P. A. C.; FLEURY, A.; MELLO, C. H. P.; NAKANO, D. N.; LIMA, E. P.;
 TURRIONI, J. B.; HO, L. L.; MORABITO, R.; MARTINS, R. A.; SOUZA, R.;
 COSTA, S. E. G.; PUREZA, V. Metodologia de pesquisa em engenharia de produção e gestão de operações. 2ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- MITCHELL, V. D.; TAYLOR, C. M.; BAUER, S. Comprehensive analysis of monomeric phenolics in dilute acid plant hydrolysates. **BioEnergy Research**, v.7, p. 654-669, 2014.
- MITROFF, I. I.; BETZ, F.; PONDY, L. R.; SEGASTI, F.; On Managing Sciences in the Systems Age: Two Schemas for the Study of science as a whole systems phenomenon. **Interfaces**, v. 4, p. 46-58, 1974.
- MME Ministério de Minas e Energia. **RenovaBio**. Disponível em: http://www.mme.gov.br. Acesso em 04 de junho de 2020.
- MODENBACH, A. A.; NOKES, S. E. Enzymatic hydrolysis of biomass at high-solids loadings – A review. Biomass and Bioenergy, v. 56, p. 526-544, 2013.
- MOHAGHEGHI, A.; TUCKER, M.; GROHMANN, K.; WYMAN, C. High solids simultaneous saccharification and fermentation of pretreated wheat straw to ethanol. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 33, p. 67-81, 1992.
- MOKOMELE, T.; SOUSA, L. C.; BALAN, V.; RENSBURG, E. V.; DALE, B. E.; GÖRGENS, J. F. Ethanol production potential from AFEX and steam-exploded sugarcane residues for sugarcane biorefineries. Biotechnology for biofuels. v. 11, p. 127-148, 2018.
- MOONEY, C. A.; MANSFIELD, S. D.; TOUHY, M. G.; SADDLER, J. N. The effect of initial pore volume and lignin content on the enzymatic hydrolysis of softwoods.
 Bioresource Technology, v. 64, p. 113-119, 1998.
- MORAIS, A. P. S.; BROETTO, F.; Pré-hidrólise ácida de bagaço d cana-deaçúcar e sua caracterização físico-química. **Revista Energia na Agricultura**, vol. 27, n. 4, 2012, p. 01-12.
- MORJANOFF, P.; GRAY, P.; Optimization of steam explosion as a method for increasing susceptibility of sugarcane bagasse to enzymatic saccharification.
 Biotechnology and Bioengineering, 1987.
- MUKASEKURU, M. R.; HU, J.; ZHAO, X.; SUN, F. F.; PASCAL, K.; REN, H.; ZHANG, J. Enhanced High-Solids Fed-Batch enzymatic hydrolysis of sugar cane bagasse with accessory enzymes and additives at low cellulase loading. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, IF 7632, 2018.
- MUSSATO, S. I.; DRAGONE, G.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. M. F.; ROBERTO,
 I. C. The effect of agitation speed, enzyme loading and substrate concentration on enzymatic hydrolysis of cellulose frow brewer's spent grain. Cellulose, v. 15, p. 711-721, 2008.
- NAG, A.; SPRAGUE, M. A.; GRIGGS, A. J.; LISCHESKE, J. J.; STICKEL, J. J.; MITTAL, A.; WANG, M.; JOHNSON, D. K. Parameter determination and validation

for a mechanistic model of the enzymatic saccharification of cellulose- I_{β} . **Biotechnology Progress**, v. 31, p. 1237-1248, 2015.

- NEVES, P. V.; PITARELO, A. P.; RAMOS, L. Production of cellulosic ethanol from sugarcane bagasse by steam explosion: effect of extractives content, acid catalyst and differente fermentation technologies. **Bioresource Technology**, v. 208, p. 184-194, 2016.
- NIDETZKI, B.; STEINER, W.; HAYN, M.; CLAEYSSENS, M. Cellulose hydrolysis by the cellulases from *Trichoderma reesei*: a new model for synergistic interaction. Biochemistry Journal, v. 298, p. 705-710, 1994.
- NWAMBA, M. C.; SONG, G.; SUN, F.; MUKASEKURU, M. R.; REN, H.; ZHANG, Q.; CAO, T.; WANG, H.; SUN, H.; HONG, J. Efficiency enhancement of a new cellulase cocktail at low enzyme loading for high solid digestion of alkali catalyzed atmospheric glycerol organosolvent pre-treated sugarcane bagasse. Bioresource Technology, v. 338, 2021.
- NOVA CANA. **Processos de fabricação do etanol.** Disponível em: www.novacana.com/etanol/fabricacao/>. Acesso em: 05/03/2021.
- OLIVEIRA, Cássia M. *et al.* Process integration of multiperiod sugarcane biorefinery. **Applied Energy**, v. 213, p. 520-539, 2018.
- PAN X.; XIE D.; GILKES N.; GREGG D. J.; SADDLER J.N. Strategies to enhance the enzymatic hydrolysis of pretreated softwood with high residual lignin content.
 Applied Biochemistry Biotechnology- Part A Enz Eng. Biotechnol., v. 121, p. 1069–1079, 2005.
- PARK, Y.; DOHERTY, W. O. S.; HALLEY, P. J. Developing lignin-based resin coatings and composites. **Industrial Crops & Products**, v. 27, p. 163–167, 2008.
- PEREIRA, S. C.; MAEHARA, L.; MACHADO, C. M. M.; FARINAS, C. S.; 2G etanol from the whole sugarcane lignocellulosic biomass. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, p. 88, 2015.
- PINO, M. S. Bioreactor design for enzymatic hydrolysis of biomass under the biorefinery concept. **Chemical Engineering Journal**, v. 347, p. 119-136, 2018.

- PIRICH, C. L.; PICHETH, G.F.; FONTES, A. M.; DELGADO-AGUILAR, M.; RAMOS, L.
 P. Disruptive enzyme-based strategies to isolate nanocellulose: a review.
 Cellulose, v. 27, p. 5457-5475, 2020.
- PITARELLO, A. P.; Da FONSECA, C.S.; CHIARELLO, L. M.; GÍRIO, F. M.; RAMOS, L.
 P. Ethanol production from sugarcane bagasse using phosphoric acid-catalyzed steam explosion. Journal of the Brazilian Chemical Society, v. 27, p. 1889-1898, 2016.
- PRISTAVKA, A.; KODITUVAKKY, P. A.; KOZLOV, Y. P.; ZACCHI, G.; BEREZIN, I. V.; RABINOVICH, M. L. High-solids enzymatic hydrolysis of steam-exploded willow without prior water washing. **Applied Biochemistry Microbiology**, v. 36(2), p. 101-108, 2000.
- QUIROGA, A. G.; SILVERA, A. B.; PADILLA, R. V.; COSTA, A. C.; MACIEL FILHO, R. Continuous and semicontinuous reaction systemns for high-solids enzymatica hydrolysis of lignocellulosics. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 32, nº 04, p. 805-819, 2015.
- RALPH J.; LUNDQUIST, K.; BRUNOV, G.; LU, F.; KIM, H.; SCHATZ, P. F.; MARITA, J.
 M.; HATFIELD, R. D.; RALPH, S. A.; CHRISTENSEN, J. H.; BOERJAN, W.
 Lignins: natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenyl-propanoids.
 Phytochemistry Reviews, v. 3, p. 29-60, 2004.
- RAMOS, L. P.; The chemistry involved in the pretreatment of lignocellulosic materials. **Química Nova**, v. 26, p. 863-871, 2003.
- RAMOS, L. P.; BREUIL, C.; SADDLER, J. N. The use of enzyme recycling and the influence of sugar accumulation on cellulose hydrolysis by Trichoderma cellulases.
 Enzyme Microbial Technology, v. 15, p. 19-25, 1993.
- RAMOS, L.P.; SILVA, L.; BALLEM, A. C.; PITARELO, A. P.; CHIARELLO, L. M.; SILVEIRA, M. H. L. Enzymatic hydrolysis of steam-exploded sugarcane bagasse using high total solids and low enzyme loadings. **Bioresource Technology**, v. 175, p.195-202, 2015.
- RASMUSSEN, H.; SORENSEN, H. R.; MEYER, A. S. Formation of degradation compounds from lignocellulosic biomass in the biorefinery: sugar reaction mechanisms. **Carbohydrate Research**, 385, 45-57, 2014.

- RELVAS, F. M.; MORAIS, A. R. C.; BOGEL-LUKASIK, R. Selective hydrolysis of wheat straw hemicellulose using high-pressure CO₂ as catalyst. **RSC Advances**, v. 5, p. 73935-73944, 2015.
- RESCH M. G.; BAKER, J. O.; DECKER, S. R. Low Solids Enzymatic Saccharification of Lignocellulosic Biomass. NREL/TP-510-63351. NREL – National Renewable Energy Laboratory, 2015.
- RFA. **2018 Ethanol Industry Outlook**. Renewable Fuels Association, 2018. Disponível em: https://ethanolrfa.org. Acesso em 01 de abril de 2019.
- ROBAK, K.; BALCEREK, M. Review of second generation bioethanol production from residual biomass. **Food Technology & Biotechnology**, v. 56, p. 174-182, 2018.
- ROCHA, G. J. M.; MARTÍN, C.; DA SILVA, V. F.; GÓMEZ, E. O.; GONÇALVES, A.R. Mass balance of pilot-scales pretreatment of sugarcane bagasse by steamexplosion followed by alkaline delignification. **Bioresource Technology**, v. 11, p. 447-452, 2012.
- ROCHA, G. J. M.; NASCIMENTO, V. M.; GONÇALVES, A. R.; SILVA, V. F. N.;
 MARTÍN, C. Influence of mixed sugarcane bagasse samples evaluated by elemental and physical-chemical composition. Industrial Crops and Products, v. 64, p. 52-58, 2015.
- ROCHE, C. M.; DIBBLE, C. J.; STICKEL, J. J. Laboratory-scale method for enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass at high-solids loadings. **Biotechnology for Biofuels**, v. 2, p. 28, 2009.
- ROSGAARD, L.; ANDRIC, P.; DAM-JOHANSEN, K.; PEDERSEN, S.; MEYER, A. Effects of substrate loading on enzymatic hydrolysis and viscosity of pretreated barley straw. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 143, p. 27-40, 2007.
- SANTO, M. E.; REZENDE, C. A.; BERNERDINELLI, O. D.; JR. P. N.; CURVELO, A. A. S.; AZEVEDO, E. R.; GUIMARÃES, F. E. G.; POLIKARPOV, I. Structural and compositional changes in sugarcane bagasse subjected to hydrothermal and organosolv pretreatments and their impacts on enzymatic hydrolysis. Industrial Crops & Products, v. 113, p. 64-74, 2018.

- SANTUCCI, B. S.; BRAS, J.; BELGACEM, M. N.; CURVELO, A. A. S.; PIMENTA, M. T.
 B. Evaluation of the effects of chemical composition and refining treatments on the properties of nanofibrillated cellulose films from sugarcane bagasse. Industrial Crops and Products, v. 91, p. 238-248, 2016.
- SARTO, C.; SANSIGOLO, C. A.; Cinética da remoção dos extrativos da madeira de Eucalyptus grandis durante polpação kraf. Acta Scientiarum Technology, v. 32, 2010, p. 227-235.
- SEDLAK, M.; HO, N. W. Y. Production of ethanol from cellulosic biomass hydrolysates using genetically engineered Saccharomyces Yeast Capable of cofermenting Glucose and Xylose. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 113, p. 403-416, 2004.
- SELIG, M.; WEISS, N.; JI, Y. Enzymatic Saccharification of Lignocellulosic Biomass. Laboratory analytical Procedure. NREL - National Renewable Energy Laboratory, 2008.
- SEPTIANI, D.; SURYADI, H.; MUN'IM, A. MUNGUNWARDOYO, W. Production of cellulase from Aspergillus niger and Trichoderma reesei mixed culture in caboxymethylcellulose medium as sole carbon. **Biodiversitas**, v. 20, p. 3539-3544, 2019.
- SHOSEYOV, O.; SHANI, Z.; LEVY, I. Carbohydrate Binding Modules: Biochemical Properties and Novel applications. Microbiology and Molecular Biology Reviews. P. 283-295, 2006.
- SHU, Z.; WANG, Y.; AN, L; YAO, L. The slowdown of the endoglucanase *Trichoderma reesei* Cel5A-Catalyzed Cellulose hydrolysis is related to its initial activity.
 Biochemistry, v.53, p. 7650-7658, 2014.
- SIDHU, M. S., KALRA. M. K.; SANDHU. D. K. Purification and characterization of cellulolytic enzymes from *Trichoderma harzianum*. Folia Microbiologica, v. 31, p. 293-302, 1986.
- SIEVERS, D. A.; KUHN, E. M.; STICKEL, J. J.; TUCKER, M. P.; WOLFRUM, E. J. Online residence time distribution measurement of thermochemical biomass pretreatment reactors. **Chemical Engineering Science**, v. 140, p. 330-336, 2016.

- SILVA, G. T.; CHIARELLO, L.M.; LIMA, E. M.; RAMOS, L. P. Sono-assisted alcaline pretreatment of sugarcane bagasse for cellulosic ethanol production. Catalysis Today, v. 269, p. 21-28, 2016.
- SILVA, T. A. L.; ZAMORA, H. D.; VARÃO, L. H. R.; PRADO, N. S.; BAFFI, M. A.; PASQUINI, D. Effect of steam explosion pretreatment catalysed by organic acid and alkali on chemical and structural properties and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse. Waste Biomass Valor, v. 9, p.2191-2201, 2018.
- SILVA, A. S.; ESPINHEIRA, R. P.; TEIXEIRA, R. S. S.; SOUZA, M. F.; LEITÃO, V. F.; BOM, E. P. S. Constraints and advances in high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: a critical review. **Biotechnology for Biofuels**, p. 13-58, 2020.
- SILVEIRA, M. H. L.; RAU, M.; PINTO DA SILVA BON, E.; ANDREAUS, J. A simple and fast method for the determination of endo- and exo-cellulase activity in cellulase preparations using filter paper. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 51, n. 5, p. 280-285, 2012.
- SILVEIRA, M. H. L.; SIIKA-AHO, M.; KRUUS, K.; GARRIGA, L. M.; RAMOS, L. P. The essential role of plant cell wall degrading enzymes in the success of biorefineries: current status and future challenges. **Biofuels in Brazil**, Springer, 1^a Edição, p. 151-172, 2014.
- SILVEIRA, Marcos H. L.; MORAIS, A. R. C.; LOPES, A. M. C.; OLEKSZYSZEN, D. N.; LUKASIK, R. B.; ANDREAUS, J.; RAMOS, L. P. Current pretreatment technologies for the development of cellulosic ethanol and biorrefineries. ChemSusChem, v. 8, p. 3366-3390, 2015.
- SILVEIRA, Marcos H. L.; CHANDEL, A. K.; VANELLI, B. A.; SACILOTTO, K. S.;
 CARDOSO, E. B. Production of hemicellulosic sugars from sugarcane bagasse via steam explosion employing industrially feasible conditions: Pilot scale study.
 Bioresource Technology Reports, v. 3, p. 138-146, 2018.
- SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass NREL/TP-510-42618. NREL – National Renewable Energy Laboratory, 2008a.

- SLUITER, A.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D. Determination of Extractives in Biomass NREL/TP-510-42619. NREL – National Renewable Energy Laboratory, 2008b.
- SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D. Determination of Ash in Biomass NREL/TP-510-42622. NREL – National Renewable Energy Laboratory, 2008c.
- SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D.; et al. Determination of Total Solids in Biomass and Total Dissolved Solids in Liquid Process Samples. NREL/TP-510-42621. NREL – National Renewable Energy Laboratory, 2008d.
- SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D. Determination of Sugars, Byproducts and Degradation Products in Liquid Fraction Process Samples NREL/TP-510-42623. NREL – National Renewable Energy Laboratory, 2008e.
- SLUITER, A.; HYMAN, D.; PAYNE, C.; WOLFE, J. Determination of Insoluble Solids in Pretreated Biomass Material NREL/TP-510-42627. NREL – National Renewable Energy Laboratory, 2008f.
- SLUITER, J. B.; CHUM, H.; GOMES, A. C.; TAVARES, R.; AZEVEDO, V.; PIMENTA, M.T.; RABELO, S. C.; MARABEZI, K.; CURVELO, A. A.; ALVES, A. R. Evaluation of Brazilian sugarcane bagasse characterization: an interlaboratory comparison study. Journal of AOAC International, v. 99, p. 579-585, 2016.
- SMITH, P. K.; KROHN, R. I.; HERMANSON, G. T.; *et al.*., Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, v. 150, n. 1, p. 76–85, 1985.
- STARCHER B. A ninhydrin-based assay to quantitate the total protein content of tissue samples. **Anal Biochem**, v. 292 p. 125–134, 2001.
- SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, v. 83, p. 1-11, 2002.
- SUN, F. F.; HONG, J.; HU, J.; SADDLER, J. N.; FANG, X.; ZHANG, Z.; SHEN, S. Acessory enzymes influence cellulase hydrolyses of the model substrate and the

realistic lignocellulosic biomass. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 15, p. 322-348, 2015.

- SZCZERBOWSKI, D.; PITARELO, A. P.; ZANDONÁ FILHO, A.; RAMOS, L. P. Sugarcane biomass for biorefineries: comparative composition of carbohydrates and non-carbohydrate components of bagasse and straw. Carbohydrate Polymers, v. 114, p. 95-101, 2014.
- TENGBORG, C.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Reduced inhibition of enzymatic hydrolysis of steam-pretreated softwood. Enzyme and Microbial Technology, v. 28, p. 835-844, 2001.
- TERMO SCIENTIFIC. **Pierce BCA Protein Assay Kit**. Catalog Numbers 23225 and 23227, 2020.
- TING, C. L.; MAKAROV, D.E.; WANG, Z.G. A kinetic model for the enzymatic action of cellulase. **Journal of Physical Chemistry**, v. B 113, p. 4970-4977, 2009.
- TOSCAN, A.; MORAIS, A. R. C.; PAIXÃO, S. M.; ALVES, L. s.; ANDREAUS, J. r.; CAMASSOLA, M.; DILLON, A. J. P.; LUKASIK, R. M. Effective extraction of lignin from elephant grass using imidazole and its effect on enzymatic saccharification to produce fermentable sugars. Industrial & Engineering Chemistry Research, v. 56, p. 5138-5145, 2017b.
- U.S. DOE United States Department of Energy office of science. **Bioenergy Research Centers**. 2018. Disponível em: https://genomicscience.energy.gov/centers/brcbrochure.pdf Acesso em: 04 jul 2020.
- VÄLJAMÄE, P.; KIPPER, K.; PETTERSSON, G.; JOHANSSON, G. Synergistic cellulose hydrolysis can be described in terms of fractal-like kinetics.
 Biotechnology and Bioengineering, v. 84, p. 254-257, 2003.
- WALLACE, J.; BRIENZO, M.; GARCÍA-APARICIO, M. P.; GÖRGENS, J. F. Lignin enrichment and enzyme deactivation as the root cause of enzymatic hydrolysis slowdown of steam pretreated sugarcane bagasse. New Biotechnology, v. 33, n. 3, 2016.

- WANG, L.-S.; LIU, J.; ZHANG, Y.-Z.; ZHAO, Y.; GAO, P.-J. Comparison of domains function between cellobiohydrolase I and endoglucanase I from *Trichoderma pseudokoningii* S-38 by limited proteolysis. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 24, p. 27-38, 2003.
- WANG, K.; JIANG, J.-X.; XU, F.; SUN, R.-C. Influence of steaming explosion time on the physic-chemical properties of cellulose from *Lespedeza stalks* (*Lespedeza crytobotrya*). Bioresource Technology, v. 100, p. 5288-5294, 2009.
- WANG, Z.; FENG, H. Fractal kinetic analysis of the enzymatic saccharification of cellulose under different conditions. Bioresource Technology, v. 101, p. 7995-8000, 2010.
- WANG, H. M.; MALE, J.; WANG, J. Recent advances in hydrotreating of pyrolysis biooil and its oxygen-containing model compounds. ACS Catal. v. 3, p. 1047–1070, 2013.
- WANG, W.; WANG, C.; ZAHOOR; CHEN, X.; YU, Q.; WANG, Z.; ZHUANG, X.; YUAN,Z. Effect of a Nonionic Surfactant on Enzymatic Hydrolysis of LignocelluloseBased on Lignocellulosic Features and Enzyme Adsorption. ACS Omega, 2020.
- WILSON, B. D. Microbial diversity of cellulose hydrolysis. Current opinion in Microbiology, v. 4, 2011, p. 259-263.
- WOOD, T. M.; MCCRAE, S. I. The cellulase of *Trichoderma koningii*. **Biochemical Journal**, v. 171, p. 61-72, 1978.
- WOOD, T. M.; MCCRAE, S. I. Purification and some properties of the extracellular β-Dglucosidase of the cellulolytic fungus *Trichoderma koningii*. The Journal of General Microbiology, v. 128, p. 2973-82, 1982.
- WOODWARD, J.; TROMPETTER, I.; SEWELL, B.T.; PIOTROWSKI, M. Substrate specificity of plant nitrilase complexes is affected by their helical twist.
 Communications Biology, v. 1, p. 186-175, 2018.
- XIAO, Z.; ZHANG, X.; GREGG, D. J.; SADDLER, J. N. Effects of sugar inhibition on cellulases and β-glucosidase during enzymatic hydrolysis of softwood substrates.
 Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 115, p. 1115-1126, 2004.

- XU, C.; ZHANG, J.; ZHANG, Y.; GUO, Y.; XU, H.; XU, J.; WANG, Z. Enhancement of high-solids enzymatic hydrolysis efficiency of alkali pretreated sugarcane bagasse at low cellulase dosage by fed-batch strategy based on optimized accessory enzymes and additives. **Bioresource Technology**, v. 292, 2019.
- YANG, B.; WYMAN, C. E.; Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. **Biofpr**, v. 2, p. 26-40, 2008.
- YANG, J.; ZHANG, X.; YONG, Q.; YU, S. Three-stage enzymatic hydrolysis of steam exploded corn stover at high substrate concentration. Bioresource Technology, v. 102, p. 4905-4908, 2011.
- YU, J.; ZHANG, J.; HE, J.; LIU, Z.; YU, Z. Combinations of mild physical or chemical pretreatment with biological pretreatment for enzymatic hydrolysis of rice hull.
 Bioresource Technology, v. 100, p. 903-908, 2009.
- ZHANG, J.; XIE, J.; ZHANG, H. Sodium hydroxide catalytic ethanol pretreatment and surfactant on the enzymatic saccharification of sugarcane bagasse. Bioresource Technology, v. 319, 124171, 2020.
- ZHANG, X.; YUAN, Q.; CHENG, G. Deconstruction of corncob by steam explosion pretreatment: correlations between sugar conversion and recalcitrant structures.
 Carbohydrate Polymers, v. 156, p. 351-356, 2017.
- ZHANG, Y. H. P.; LYND, L. R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. Biotechnology and Bioengineering, v. 88, p. 797-824, 2004.
- ZHANG, Y. H. P.; HIMMEL, M. E.; MIELEINZ, J. R.; Outlook for celullase improvement: Screening and selection strategies. Biotechnology Advances, v. 24, p. 452-481, 2006.
- ZHAO, C.; DENG, L.; FANG, H. Mixed culture of recombinant *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* for cellulase production to increase the cellulose degrading capability. **Biomass and Bioenergy**, v. 112, p. 93-98, 2018.