



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Engenharia Química

CAROLINA MARION DE GODOY

**MODELAGEM MATEMÁTICA E AVALIAÇÃO DE ESTRATÉGIAS DE
HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BAGAÇO DE CANA EM ALTAS
CARGAS DE SÓLIDOS**

CAMPINAS
2019

CAROLINA MARION DE GODOY

**MODELAGEM MATEMÁTICA E AVALIAÇÃO DE ESTRATÉGIAS DE
HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BAGAÇO DE CANA EM ALTAS
CARGAS DE SÓLIDOS**

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

Orientadora: PROFA. DRA. ALINE CARVALHO DA COSTA

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA
ALUNA CAROLINA MARION DE GODOY, E
ORIENTADA PELA PROFA. DRA. ALINE
CARVALHO DA COSTA.

CAMPINAS

2019

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): FAPESP, 2017/07633-0

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Rose Meire da Silva - CRB 8/5974

G548m Godoy, Carolina Marion de, 1993-
Modelagem matemática e avaliação de estratégias de hidrólise enzimática de bagaço de cana em altas cargas de sólidos / Carolina Marion de Godoy. – Campinas, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Aline Carvalho da Costa.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Hidrólise enzimática. 2. Modelagem matemática. 3. Bagaço de cana. 4. Batelada alimentada. 5. Otimização. I. Costa, Aline Carvalho da, 1970-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Mathematical modeling and evaluation of strategies of enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse under high solids loads

Palavras-chave em inglês:

Enzymatic hydrolysis
Mathematical modeling
Sugarcane bagasse
Fed-batch
Optimization

Área de concentração: Engenharia Química

Titulação: Mestra em Engenharia Química

Banca examinadora:

Aline Carvalho da Costa [Orientador]
Antonio José Gonçalves da Cruz
Edvaldo Rodrigo de Moraes

Data de defesa: 28-03-2019

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

Folha de Aprovação da Dissertação de Mestrado defendida por Carolina Marion de Godoy e aprovada em 28 de março de 2019 pela banca examinadora constituída pelos seguintes doutores:

Profa. Dra. Aline Carvalho da Costa
FEQ / UNICAMP

Prof. Dr. Antonio José Gonçalves da Cruz
Universidade Federal de São Carlos

Dr. Edvaldo Rodrigo de Moraes
Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais

*A ATA da Defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

*Dedico este trabalho aos meus pais,
Marileuse e Gilberto, e ao meu irmão,
Vitor, pelo apoio, carinho e paciência.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Marileuse e Gilberto, e ao meu irmão, Vítor, pelo constante apoio e incentivo.

À minha orientadora, Profa. Dra. Aline Carvalho da Costa, pelas sugestões, confiança e suporte ao longo de todo o projeto.

A todos os meus amigos do Laboratório de Engenharia de Processos Fermentativos e Enzimáticos (LEPFE), em especial à Daniele Machado pela grande ajuda e pela disponibilização de dados experimentais utilizados nesta dissertação.

À Universidade Estadual de Campinas e todos seus funcionários por proporcionarem as condições para a realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro (processo nº 2017/07633-0), sem o qual a realização deste trabalho seria impossível.

Enfim, agradeço a todos que de uma forma ou de outra tenham colaborado para a execução deste projeto. Muito obrigada.

RESUMO

A produção de etanol lignocelulósico a partir de bagaço de cana-de-açúcar é uma alternativa promissora para a ampliação da matriz energética brasileira. Porém, definir as estratégias mais eficientes de pré-tratamento e hidrólise da biomassa ainda é imprescindível para a viabilização econômica desse processo. Assim, este trabalho visou ao desenvolvimento de um modelo matemático para descrever a hidrólise enzimática de bagaço de cana em altas concentrações de sólidos e produto. O objetivo foi aplicar o modelo no estudo de diferentes estratégias de reação, identificando condições ótimas para a obtenção de hidrolisados ricos em glicose. Inicialmente, quatro modelos distintos foram considerados. A estimação de seus parâmetros foi feita utilizando a técnica de evolução diferencial, ED (*software* OCTAVE v.4.2.1). Dados experimentais de hidrólise enzimática em batelada (cargas de sólidos: 5-20% m/v) foram empregados nessa etapa e dois substratos foram considerados: bagaço submetido a pré-tratamento hidrotérmico (BH) e bagaço deslignificado (BAD). A melhor capacidade de ajuste foi obtida por um modelo de cinco parâmetros baseado em um esquema de uma reação. Essa modelagem incluiu diminuição da taxa de reação em função do aumento de conversão e inibição competitiva por glicose. Uma constante de inibição modificada foi usada para incorporar o aumento de severidade da inibição em hidrolisados com alto teor de açúcar. Contudo, o modelo mostrou problemas de identificabilidade devido à presença de parâmetros altamente correlacionados. Mesmo assim, ele foi capaz de fornecer resultados satisfatórios no teste F modificado (estimativas de erro iguais a 7,2 e 4,7%). Na fase de reestimação de parâmetros, o modelo também descreveu com acurácia aceitável as estratégias de hidrólise em batelada alimentada e em etapas. Por fim, a modelagem proposta foi empregada na otimização via ED dos processos de hidrólise estudados. Simulações em modo de batelada alimentada sugeriram que novos esquemas de alimentação podem aumentar a concentração final de glicose no hidrolisado, especialmente em sistemas usando BH. Já os resultados de otimização da estratégia de reações em etapas indicaram aumento no teor final de açúcar para os dois substratos avaliados, com predição de até 158,33 g/L de glicose na hidrólise de BAD.

Palavras-chave: Hidrólise enzimática; Modelagem matemática; Bagaço de cana; Batelada alimentada; Otimização.

ABSTRACT

The production of lignocellulosic ethanol using sugarcane bagasse is a promising alternative to expand the Brazilian energy matrix. However, determining the most efficient strategies of biomass pretreatment and hydrolysis is still imperative for the commercial feasibility of the process. Thus, this work aimed at the development of a mathematical model for the enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse under high concentrations of solids and product. The goal was to apply the model in the study of different reaction strategies, identifying the optimal conditions to attain glucose-rich hydrolysates. Initially, four distinct models were considered. Differential evolution (DE) was used for parameter estimation (software OCTAVE v.4.2.1). Batch experimental data of enzymatic hydrolysis (solids loads: 5-20% w/v) was also applied in this step and two substrates were considered: bagasse subjected to hydrothermal pretreatment (HB) and delignified bagasse (ADB). The best goodness of fit result was attained by a five parameter model based on a scheme with one reaction. This model included both the decrease in reaction rate with increasing conversion and the competitive inhibition by glucose. Also, a modified inhibition constant was used in order to incorporate the increasing severity of product inhibition in hydrolysates with high sugar content. Yet, the model showed identifiability issues due to highly correlated parameters. Nevertheless, it was able to provide good results to the modified F test (error estimates of 7.2 and 4.7%). In the parameter re-estimation phase, the model also described the fed-batch and the three-stage hydrolysis strategies with acceptable accuracy. Finally, the proposed model was used during the DE-based optimization of the considered hydrolysis processes. Fed-batch mode simulations suggested that the new feeding policies can increase the final glucose concentration in the hydrolysate, especially for systems using HB. On the other hand, the optimization results of the three-stage process indicated increasing sugar content for both analyzed substrates, predicting up to 158.33 g/L of glucose for ADB hydrolysis.

Keywords: Enzymatic hydrolysis; Mathematical modeling; Sugarcane bagasse; Fed-batch; Optimization.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.1. Oferta interna de energia em 2016 (BRASIL, 2017). Acervo pessoal. ...	17
Figura 2.1. Esquema da estrutura da parede celular. Adaptado de Rytioja <i>et al.</i> (2014).....	23
Figura 2.2. Estrutura do material lignocelulósico. Adaptado de Rytioja <i>et al.</i> (2014).	23
Figura 2.3. Esquema da cadeia de celulose indicando a unidade de repetição. Adaptado de Zhang e Lynd (2004).....	24
Figura 2.4. Representação esquemática do processo de hidrólise de celulose. Adaptado de Rytioja <i>et al.</i> (2014).....	41
Figura 2.5. Esquema de três reações proposto por Kadam <i>et al.</i> (2004). As relações de inibição não estão representadas. Adaptado de Kadam <i>et al.</i> (2004).....	56
Figura 2.6. Esquema reacional proposto por Peri <i>et al.</i> (2007). (...). Adaptado de Peri <i>et al.</i> (2007).	56
Figura 2.7. Esquema comparando as taxas de reação inibidas (segundo Michaelis-Menten) e os mecanismos para inibição competitiva e não-competitiva. (...). Acervo pessoal.....	59
Figura 2.8. Esquema do processo de crossover binário para um problema de otimização com 6 variáveis. (...). Adaptado de Storn e Prince (1997).....	67
Figura 3.1. Estratégia de hidrólise enzimática em etapas utilizando BH como substrato. Acervo pessoal.	71
Figura 3.2. Estratégia de hidrólise enzimática em etapas utilizando BAD como substrato. Acervo pessoal.	72
Figura 3.3. Estratégia de hidrólise enzimática com reciclo de hidrolisado para sistemas utilizando BH ou BAD como substrato. Acervo pessoal.	73

Figura 3.4. Análise do conteúdo de enzima adsorvida usando o teste da Diferença Mínima Significativa de Tukey com nível de significância de 0,05 (95% de confiança). DMS = 0,779.	76
Figura 4.1. Perfis de concentração de glicose em função do tempo segundo o Modelo #1 para a hidrólise de: (a) BH; (b) BAD. Cargas de sólidos usadas no ajuste: 5, 15 e 20% (m/v). Validação: 10% (m/v).	89
Figura 4.2. Perfis de concentração de glicose em função do tempo segundo o Modelo #2 para a hidrólise de: (a) BH; (b) BAD. Cargas de sólidos usadas no ajuste: 5, 15 e 20% (m/v). Validação: 10% (m/v).	90
Figura 4.3. Perfis de concentração de glicose em função do tempo segundo o Modelo #3 para a hidrólise de: (a) BH; (b) BAD. Cargas de sólidos usadas no ajuste: 5, 15 e 20% (m/v). Validação: 10% (m/v).	91
Figura 4.4. Perfis de concentração de glicose em função do tempo segundo o Modelo #4 para a hidrólise de: (a) BH; (b) BAD. Cargas de sólidos usadas no ajuste: 5, 15 e 20% (m/v). Validação: 10% (m/v).	92
Figura 4.5. Matrizes de correlação entre os parâmetros do Modelo #4 para cada substrato: (a) BH; (b) BAD. Valores destacados indicam alta correlação entre os parâmetros.	94
Figura 4.6. Perfis de concentração de glicose em função do tempo segundo a modelagem proposta para a hidrólise em batelada alimentada de: (a) BH; (b) BAD. As setas indicam os momentos em que material fresco foi alimentado ao sistema.	96
Figura 4.7. Perfis de concentração de glicose em função do tempo segundo a modelagem proposta para a hidrólise em etapas de: (a) BH; (b) BAD. As linhas tracejadas indicam o término de uma etapa e o início de outra.	97
Figura 4.8. Perfis de concentração de glicose em função do tempo segundo a modelagem proposta para a hidrólise com reciclo usando como substrato: (a) BH; (b) BAD. As linhas tracejadas indicam o início de uma nova reação de hidrólise utilizando substrato fresco e o hidrolisado reciclado.	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Composição média do bagaço de cana bruto. Adaptado de Junqueira <i>et al.</i> (2015).....	27
Tabela 2.2. Efeito das principais características estruturais da biomassa sobre a hidrólise enzimática.....	43
Tabela 2.3. Modelos de hidrólise enzimática de biomassa (Siglas: E = empírico; SM = semi-mecanístico; M = mecanístico; M-M = Michaelis-Menten; Ads. = adsorção enzimática; G = glicose; Cb = celobiose; X = xilose).....	51
Tabela 3.1. Composição química em base seca para os dois bagaços pré-tratados utilizados na geração dos dados experimentais, conforme apresentado por Machado (2018).....	69
Tabela 3.2. Dados de adsorção enzimática.....	75
Tabela 3.3. Alternativas de modelos consideradas para a descrição dos dados de hidrólise enzimática.....	77
Tabela 3.4. Principais características do algoritmo de evolução diferencial empregado.....	81
Tabela 4.1. Parâmetros do Modelo #1 estimados com dados de hidrólise enzimática em batelada para os dois substratos (BH e BAD). Os valores de estimativa do erro (ϵ) e dos intervalos de confiança (IC, 95%) também estão indicados.	85
Tabela 4.2. Parâmetros do Modelo #2 estimados com dados de hidrólise em batelada para os dois substratos. Os valores de ϵ e dos intervalos de confiança também estão indicados.....	86
Tabela 4.3. Parâmetros do Modelo #3 estimados com dados de hidrólise em batelada para os dois substratos. Os valores de ϵ e dos intervalos de confiança também estão indicados.....	86

Tabela 4.4. Parâmetros do Modelo #4 estimados com dados de hidrólise em batelada para os dois substratos. Os valores de ϵ e dos intervalos de confiança também estão indicados.....	86
Tabela 4.5. Parâmetros reestimados para a estratégia de hidrólise em batelada alimentada. Os valores de estimativa do erro (ϵ) e dos intervalos de confiança (IC, 95%) também estão indicados. Parâmetros marcados com (f) foram mantidos fixos durante a reestimação.....	95
Tabela 4.6. Parâmetros reestimados para a estratégia de hidrólise em etapas. Os valores de estimativa do erro (ϵ) e dos intervalos de confiança (IC, 95%) também estão indicados. Parâmetros marcados com (f) foram mantidos fixos durante a reestimação.....	96
Tabela 4.7. Parâmetros reestimados para a estratégia com reciclo de hidrolisado. Os valores de estimativa do erro (ϵ) e dos intervalos de confiança (IC, 95%) também estão indicados. Parâmetros marcados com (f) foram mantidos fixos durante a reestimação.....	98
Tabela 4.8. Resultados da otimização da estratégia de hidrólise enzimática em batelada alimentada usando BH como substrato.....	101
Tabela 4.9. Resultados da otimização da estratégia de hidrólise enzimática em batelada alimentada usando BAD como substrato.....	102
Tabela 4.10. Resultados da otimização da estratégia de hidrólise enzimática em etapas.	104

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Símbolo	Definição	Unidade
a	Parâmetro da constante de inibição modificada	$(\text{g/L})^{(1-n)}$
C	Concentração de celulose	g/L
C_0	Concentração inicial de celulose	g/L
C_{TOTAL}	Concentração total de celulose adicionada ao sistema	g/L
C_b	Concentração de celobiose	g/L
E_{ADS}	Concentração de enzima adsorvida	g/L
E_{LIVRE}	Concentração de enzima livre	g/L
E_{TOTAL}	Concentração total do complexo enzimático adicionado	g/L
G	Concentração de glicose	g/L
K_i^*	Constante de inibição modificada	g/L
$K_{ICb,cl}$	Constante de inibição por celobiose para as celulasas	g/L
K_{IG}	Constante de inibição por glicose para o complexo enzimático	g/L
$K_{IG,bg}$	Constante de inibição por glicose para as β -1,4-glicosidases	g/L
$K_{IG,cl}$	Constante de inibição por glicose para as celulasas	g/L
K_M	Constante de saturação para modelos de reação única	g/L
$K_{M,n}$	Constante de saturação da n-ésima reação	g/L
k	Constante da taxa para modelos de reação única	h^{-1} ; $\text{Lg}^{-1}\text{h}^{-1}$
k_n	Constante da taxa da n-ésima reação	h^{-1}
N_{alim}	Número de alimentações	-
n	Índice da constante de inibição modificada	-
R	Reatividade do substrato	-
r	Taxa de reação para modelos de reação única	$\text{gL}^{-1}\text{h}^{-1}$
r_n	N-ésima taxa de reação	$\text{gL}^{-1}\text{h}^{-1}$
S_0	Carga inicial de sólidos na batelada alimentada	%, m/v
S_n	Carga inicial de sólidos da n-ésima etapa	%, m/v
S_{alim}	Quantidade de substrato fresco alimentado	g
t	Tempo	h
t_i	Intervalo entre as alimentações	h
t_n	Tempo de reação da n-ésima etapa	h

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	6
RESUMO.....	7
ABSTRACT	8
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	9
LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	13
SUMÁRIO.....	14
CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO	17
1.1 Objetivos	21
CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	22
2.1 Biomassa Lignocelulósica.....	22
2.1.1 Celulose.....	24
2.1.2 Hemicelulose	25
2.1.3 Lignina	26
2.2 Bagaço de Cana-de-açúcar	26
2.3 Produção de Etanol 2G: Contextualização	27
2.4 Pré-tratamento	29
2.4.1 Pré-tratamento biológico.....	30
2.4.2 Pré-tratamento físico.....	31
2.4.3 Pré-tratamento químico	32
2.4.3.1 Pré-tratamento ácido	33
2.4.3.2 Pré-tratamento alcalino.....	34
2.4.4 Pré-tratamento físico-químico.....	35
2.4.4.1 Pré-tratamento hidrotérmico	35
2.5 Hidrólise	36
2.5.1 Hidrólise química	37
2.5.2 Hidrólise enzimática.....	38
2.5.2.1 Enzimas.....	39
2.5.2.2 Fatores que afetam a hidrólise enzimática	42
2.5.2.3 Estratégias de operação.....	47

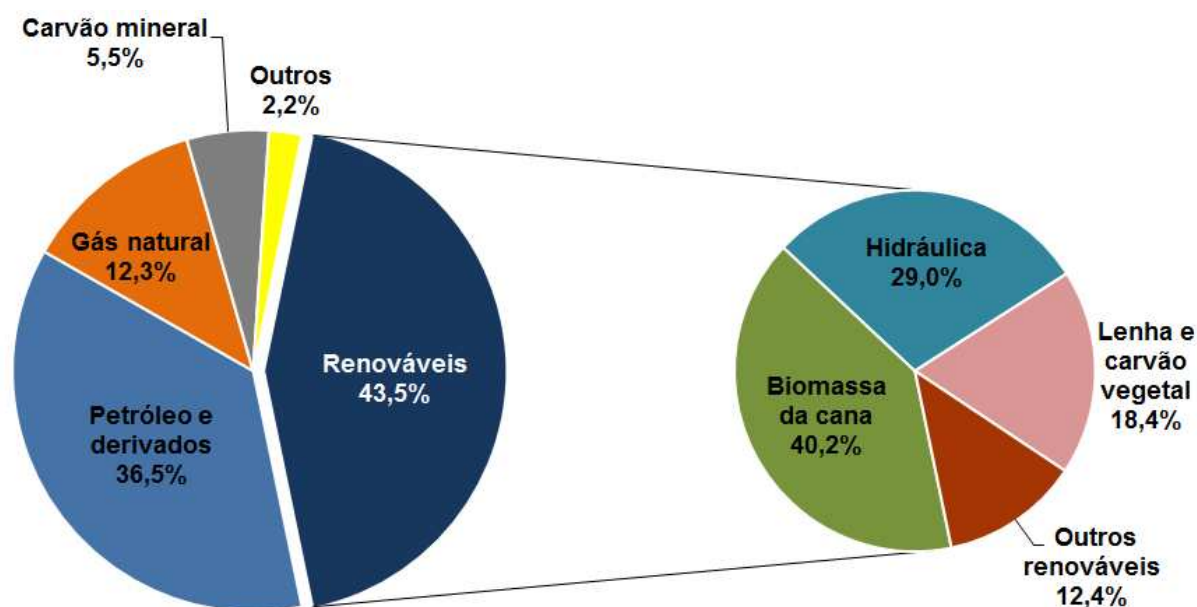
2.6	Modelagem Matemática de Hidrólise Enzimática.....	49
2.6.1	Modelagem semi-mecanística	55
2.6.1.1	Adsorção	57
2.6.1.2	Efeito estrutural do substrato.....	57
2.6.1.3	Inibição	59
2.6.1.4	Efeito sólido	60
2.6.1.5	Inativação enzimática	61
2.7	Otimização	62
2.7.1	Otimização através de evolução diferencial.....	64
CAPÍTULO 3 - MATERIAL E MÉTODOS		69
3.1	Parte Experimental.....	69
3.1.1	Substratos.....	69
3.1.2	Complexo enzimático.....	70
3.1.3	Dados de hidrólise enzimática	70
3.1.3.1	Hidrólise enzimática em batelada.....	70
3.1.3.2	Hidrólise enzimática em batelada alimentada	71
3.1.3.3	Hidrólise enzimática em etapas	71
3.1.3.4	Hidrólise enzimática com reciclo de hidrolisado	73
3.1.4	Ensaio de adsorção enzimática	74
3.2	Modelagem Matemática.....	76
3.2.1	Tratamento dos dados experimentais.....	76
3.2.2	Formulação dos modelos.....	77
3.2.3	Estimação dos parâmetros	80
3.2.4	Avaliação dos modelos e seleção.....	81
3.3	Análise de Diferentes Estratégias de Hidrólise	83
3.3.1	Reestimação dos parâmetros significativos.....	83
3.3.2	Otimização de diferentes estratégias.....	83
CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....		85
4.1	Definição do Modelo Cinético	85
4.2	Reestimação de Parâmetros.....	93
4.2.1	Sistema em batelada alimentada.....	94
4.2.2	Sistema em etapas	96
4.2.3	Sistema com reciclo de hidrolisado.....	98

4.3	Avaliação de Diferentes Estratégias de Hidrólise.....	101
4.3.1	Estratégia de hidrólise em batelada alimentada	101
4.3.2	Estratégia de hidrólise em etapas.....	103
CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES		106
5.1	Sugestões para Trabalhos Futuros	107
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS		108
APÊNDICES.....		119
	Apêndice A.....	119
ANEXOS		122
	Anexo I.....	122
	Anexo II.....	125
	Anexo III.....	126
	Anexo IV	127

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, a matriz energética do Brasil passou por grandes transformações visando criar alternativas para suprir a demanda doméstica e, dessa forma, atingir a independência externa (DIAS *et al.*, 2012). Atualmente, o país conta com uma das matrizes energéticas mais diversas do mundo, e que está entre aquelas que apresentam maior participação de fontes renováveis (BRASIL, 2017). A Figura 1.1 expõe a repartição da oferta interna de energia, segundo o Balanço Energético Nacional de 2017 (ano base 2016).

Figura 1.1. Oferta interna de energia em 2016 (BRASIL, 2017). Acervo pessoal.



Conforme exposto na Figura 1.1, as fontes renováveis já são responsáveis por 43,5% da oferta de energia no país. Dentre elas, se sobressaem a biomassa de cana (utilizada diretamente ou na produção de etanol), a energia de origem hidráulica e a lenha e carvão vegetal. Entretanto, Dias *et al.* (2012) apontam que o Brasil ainda está muito distante do seu limite de geração de energia, existindo diversas possibilidades a serem exploradas.

A expansão do número de fontes renováveis e o aumento da eficiência dessas matrizes são estratégias promissoras para garantir o desenvolvimento sustentável do setor e assegurar o abastecimento interno de energia (DIAS *et al.*, 2012; LIMA *et al.*, 2014). Nesse cenário, a produção de combustíveis a partir de

biomassa recebe grande destaque, pois, além de contribuir para a diminuição da concentração de gases do efeito estufa na atmosfera, pode contribuir para expandir o leque de atividades agrícolas e promover a geração de novos empregos através da instalação de biorefinarias (LIMA *et al.*, 2014).

No Brasil, o etanol é o principal biocombustível e sua produção a partir de caldo de cana-de-açúcar (etanol de primeira geração) já é um processo bem consolidado. A produção total de etanol durante a safra 2017-2018 foi de 27,8 bilhões de litros, o que faz do país o segundo maior produtor mundial desse combustível (UNICA, 2018). Contudo, Milanez *et al.* (2015) ressaltam a diminuição da competitividade do etanol de primeira geração nacional, evidenciada pelo aumento da importação de gasolina na última década e pela diminuição nos investimentos em novas usinas. Ademais, Lima *et al.* (2014) mencionam a necessidade de expandir significativamente a área cultivada de cana para conseguir atingir a produção necessária para atender às projeções de demanda do biocombustível.

Esses fatores somados ao crescente conflito entre o cultivo de alimentos e o de matérias-primas para fins energéticos aumentaram o interesse pelo uso de resíduos lignocelulósicos como complementos ou até mesmo substitutos para o caldo de cana na produção de etanol (NYKO *et al.*, 2010). Outro ponto importante da utilização dessas biomassas é a possibilidade de gerar o biocombustível durante o ano todo, ao contrário do modo de operação atual, que é limitado pela entressafra da cana (LIMA *et al.*, 2014).

O potencial das biomassas lignocelulósicas (constituídas principalmente por celulose, hemicelulose e lignina) para a produção de etanol se justifica não só pela abundância e baixo custo, mas também pela sua composição química (SILVEIRA *et al.*, 2015). No Brasil existem diferentes resíduos agroindustriais ou agroflorestais que poderiam servir como matéria-prima para biocombustíveis. Alguns dos principais materiais, em termos de volume gerado, incluem a palha e/ou cascas de culturas como cana-de-açúcar, milho, arroz, trigo e café, além de materiais como o bagaço de cana, cavacos e serragem de madeira, sabugo de milho e borra de café (DIAS *et al.*, 2012).

Dentre essas biomassas, grande destaque é dado ao bagaço de cana-de-açúcar, visto que ele é gerado dentro das próprias usinas sucroalcooleiras, o que facilita a produção do biocombustível devido à infraestrutura presente e elimina custos associados ao transporte da matéria-prima (MOREIRA NETO, 2011). Além disso, o bagaço é um material muito abundante no país: na safra 2017-2018 cerca de 166,7 milhões de toneladas foram geradas (base úmida, assumindo que 260 kg de bagaço sejam produzidos pela moagem de 1 t de colmos de cana) (LIMA *et al.*, 2014; UNICA, 2018). Diante desse quadro, Milanez *et al.* (2015) estimam que a produção nacional de etanol possa aumentar em até 50% se o bagaço for utilizado.

Entretanto, o processo de obtenção do etanol a partir de material lignocelulósico (etanol de segunda geração ou etanol 2G) ainda é pouco competitivo frente ao processo convencional: em julho de 2014 o custo estimado para a produção do etanol lignocelulósico era de R\$ 1,50 por litro contra um custo de R\$ 1,15 por litro para o etanol de primeira geração (MILANEZ, *et al.*, 2015). Soma-se a esse obstáculo o fato de que atualmente o bagaço não é um material subutilizado pela indústria. Ele é aplicado diretamente como combustível nas usinas para fornecer energia ao próprio processo e seu excedente é usado para gerar bioeletricidade, que pode ser comercializada (CARPIO e SIMONE DE SOUZA, 2017). Portanto, é preciso vencer as barreiras operacionais e reduzir os custos de produção para tornar o etanol 2G uma opção economicamente viável.

Diante dessa situação, as quatro principais etapas do processo de produção de etanol de segunda geração (pré-tratamento, hidrólise, fermentação e separação/destilação) têm sido extensamente estudadas. Dentre elas, a hidrólise é apontada como uma das grandes responsáveis pela baixa competitividade do processo (ao lado do pré-tratamento) (LYND *et al.*, 2017; CHANDEL *et al.*, 2018). Isso se deve ao fato de que as principais abordagens consideradas para sua realização ainda apresentam desvantagens que não foram contornadas, como alto custo, elevado tempo reacional, obtenção de baixas concentrações de glicose nos hidrolisados, entre outras (BANSAL *et al.*, 2009; SUAREZ *et al.*, 2014).

No caso da hidrólise enzimática (que é tida como uma das formas mais promissoras por causa de sua seletividade e altos rendimentos), uma das principais linhas de pesquisa envolve a definição de estratégias de processamento que

permitam trabalhar com altas cargas de sólidos. Nessas condições, o teor final de glicose obtido é alto suficiente para não comprometer as demais etapas do processo e, além disso, é possível contar com redução nas dimensões e no número de equipamentos, diminuição do consumo energético com aquecimento e resfriamento, economia de água e diminuição da geração de efluentes (MODENBACH e NOKES, 2013; BATTISTA *et al.*, 2018).

Contudo, operar com mais de 15% (m/m) de sólidos não é algo trivial. Nessas circunstâncias há pouca ou até mesmo nenhuma água livre no sistema, o que dificulta a transferência de massa, favorecendo o acúmulo de produto e inibidores. Soma-se também o fato de que a mistura reacional se apresenta como uma lama de viscosidade extremamente alta, dificultando a agitação (KRISTENSEN *et al.*, 2009; MODENBACH e NOKES, 2013; BATTISTA *et al.*, 2018). Fora isso, pode ocorrer o chamado “efeito sólido”, que corresponde à diminuição da conversão de celulose em glicose conforme aumenta a concentração inicial de biomassa no meio reacional (KRISTENSEN *et al.*, 2009).

Assim, existem várias propostas de esquemas de operação na literatura que visam minimizar o efeito sólido e aperfeiçoar o processo de hidrólise enzimática em altas cargas de sólidos, de modo a obter altas concentrações de glicose. Alguns exemplos incluem os trabalhos de Hodge *et al.* (2009), que avaliam estratégias de hidrólise em batelada alimentada, de Xue *et al.* (2012a), que propõem um processo com reciclo de parte do hidrolisado, de Yang *et al.* (2011) e de Xue *et al.* (2012b), que estudam hidrólise em múltiplas etapas, e de Ludwig *et al.* (2014), que sugerem um sistema de agitação específico para o reator de hidrólise.

Entretanto, investigar essas diversas estratégias pode demandar um número proibitivo de ensaios experimentais. Nesse cenário, a modelagem matemática da cinética da hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos é de grande relevância. Um modelo poderia contribuir para um melhor entendimento do processo, permitindo apontar mais facilmente os fatores de maior influência sobre a conversão e prever o efeito de mudanças nas condições de reação. Ele também teria aplicações em estudos de otimização, aumento de escala e simulações, economizando tempo e recursos (KUMAR e MURTHY, 2013; MOREIRA NETO, 2016).

Dessa forma, o presente trabalho propõe o desenvolvimento de um modelo matemático que descreva adequadamente a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar em condições de altas concentrações de sólidos ($> 20\%$ m/v) e de produto (> 100 g glicose/L). Além disso, busca-se investigar diferentes formas de operação para a realização da hidrólise, considerando, inclusive, estratégias já sugeridas na literatura, como as avaliadas por Machado (2018).

1.1 Objetivos

O presente trabalho visa ao desenvolvimento de um modelo matemático capaz de descrever e prever adequadamente a hidrólise enzimática de bagaço de cana em condições de altas cargas de sólidos e de produto, de forma que o mesmo possa ser utilizado para avaliação de diferentes estratégias, com foco na maximização da conversão e da concentração final de glicose. Como objetivos específicos, destacam-se:

1. Analisar a aplicabilidade dos modelos de hidrólise enzimática já desenvolvidos na Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP (MOREIRA NETO, 2011; MOREIRA NETO, 2016) para descrição de sistemas trabalhando com altas concentrações de sólidos e de produto.
2. Revisar os principais modelos propostos na literatura para descrição de hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos, visando identificar novas abordagens ou diferentes aspectos que possam ser incorporados ao modelo em desenvolvimento.
3. Após a estimação do modelo, determinar os parâmetros cujos efeitos sejam mais significativos sobre a resposta e, então, reestimá-los para diferentes condições operacionais.
4. Usar o modelo desenvolvido para a avaliação de diferentes estratégias de operação com altas cargas de sólidos, como batelada alimentada, hidrólise em múltiplas etapas e sistemas com reciclo.

CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biomassa Lignocelulósica

Biomassa é um termo utilizado para designar o grupo de materiais orgânicos não fósseis, de origem microbiana, animal ou vegetal (DIAS *et al.*, 2012). Algumas fontes importantes de biomassa incluem: produtos agrícolas, resíduos urbanos, esterco, resíduos agroindustriais e de matadouros, descarte de lavouras e resíduos florestais.

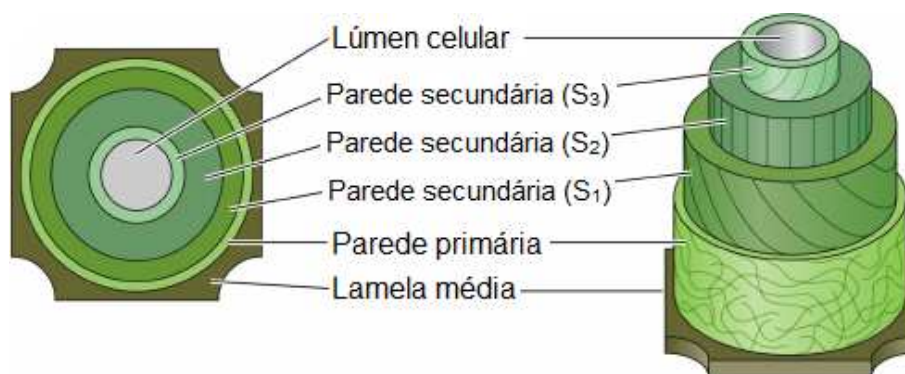
Nesse grupo, destacam-se os materiais lignocelulósicos, que são as biomassas mais abundantes no planeta, com uma produção mundial anual estimada em cerca de 10-50 bilhões de toneladas (ZHAO *et al.*, 2012). Sua composição varia significativamente de acordo com a origem do material, mas, usualmente, são formados basicamente por celulose (38-50%), hemiceluloses (23-32%) e lignina (15-25%), fora quantidades pequenas de substâncias como pectina, cinzas, proteínas e extrativos (ZHAO *et al.*, 2012; SILVEIRA *et al.*, 2015; SUN *et al.*, 2016).

Uma forma comum de classificar as biomassas lignocelulósicas é dividi-las em gramíneas (e resíduos agrícolas), madeiras macias e madeiras de lei (HASSAN *et al.*, 2018). Normalmente, essas duas últimas classes apresentam maiores concentrações de celulose e lignina em sua matriz, quando comparadas a gramíneas (embora existam exceções). Ademais, as madeiras macias e de lei se distinguem principalmente pela concentração de lignina presente (geralmente mais baixa em madeiras de lei) e pela composição de suas hemiceluloses (formadas majoritariamente por galactose, glicose e manose em madeiras macias e por ácido glicurônico e xilose em madeiras de lei) (ZHAO *et al.*, 2012; RYTIOJA *et al.*, 2014).

A abundância e a composição dos materiais lignocelulósicos fazem com que eles sejam matérias-primas atraentes para biorefinarias, especialmente para a produção de biocombustíveis. Contudo, as características estruturais desse tipo de biomassa (resultantes da organização da parede celular dos vegetais) impõem obstáculos ao seu processamento (SILVEIRA *et al.*, 2015).

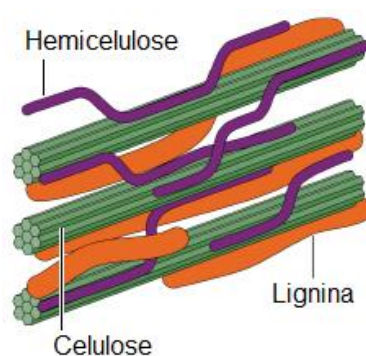
A parede celular é composta de três camadas principais: a lamela média, a parede primária e a parede secundária, conforme exposto na Figura 2.1. A lamela média é a camada mais externa, que preenche o espaço entre diferentes células. Em seguida encontra-se a parede primária (que pode ser de dois tipos, dependendo de seus constituintes) e a parede secundária. Essa última é dividida em subcamadas denominadas de S_1 (mais externa), S_2 (região intermediária) e S_3 (envolvendo o lúmen celular) (ZHAO *et al.*, 2012; RYTIOJA *et al.*, 2014).

Figura 2.1. Esquema da estrutura da parede celular. Adaptado de Rytioja *et al.* (2014).



A estrutura e a composição dessas camadas variam de espécie para espécie, podendo também depender da fase de crescimento da planta ou do tecido ao qual a célula pertence (RYTIOJA *et al.*, 2014). No entanto, de maneira geral, observa-se que a concentração de lignina tende a diminuir das camadas externas para as internas. O oposto é verificado para a celulose e a hemicelulose, que são mais abundantes nas subcamadas S_2 e S_3 (ZHAO *et al.*, 2012). Além disso, as cadeias de celulose normalmente se apresentam como microfibras cercadas por hemicelulose e outros compostos (e.g.: pectina). Já a lignina está preferencialmente localizada na parte externa dessas fibras, onde se encontra ligada covalentemente à hemicelulose (ZHANG e LYND, 2004). A Figura 2.2 ilustra essa estrutura.

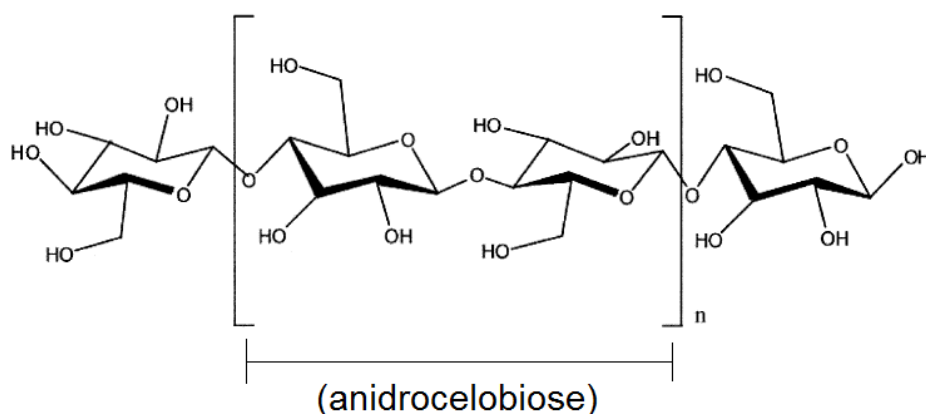
Figura 2.2. Estrutura do material lignocelulósico. Adaptado de Rytioja *et al.* (2014).



2.1.1 Celulose

A celulose é um polissacarídeo linear composto por moléculas de glicose unidas através de ligações β -(1 \rightarrow 4) glicosídicas (SILVEIRA *et al.*, 2015). Sua unidade estrutural mínima (estrutura repetida na cadeia) é a anidrocetobiose, conforme indicado na Figura 2.3.

Figura 2.3. Esquema da cadeia de celulose indicando a unidade de repetição. Adaptado de Zhang e Lynd (2004).



A presença de hidroxilas ao longo da estrutura da celulose permite que as interações inter ou intracadeia ocorram através de ligações de hidrogênio e não só por forças de van der Waals. Esse fato somado à alta simetria das cadeias resulta na organização do polissacarídeo na forma de fibras, culminando na formação de zonas cristalinas (ZHANG e LYND, 2004). Essas estruturas cristalinas podem ser encontradas em quatro estados distintos (celuloses tipo I, II, III ou IV), sendo que o polímero está naturalmente na forma I. A celulose pode ainda apresentar zonas amorfas, onde há menor compactação (ZHAO *et al.*, 2012).

Três parâmetros comumente empregados na caracterização desse polissacarídeo são o índice de cristalinidade, o grau de polimerização e a acessibilidade (inferida principalmente pela medida da área superficial). O índice de cristalinidade (*ICr*) fornece uma estimativa da porcentagem de celulose cristalina num dado sólido (ZHANG e LYND, 2004; ZHAO *et al.*, 2012). Ele é normalmente medido utilizando difração de raios-X, sendo calculado através da Equação 2.1.

$$ICr (\%) = \frac{(I_{002} - I_{am})}{I_{002}} \times 100 \quad (2.1)$$

Em que I_{002} é a intensidade do pico 002 (ângulo de varredura igual a $22,5^\circ$) e I_{am} é a mínima intensidade registrada entre os picos 101 e 002 (ângulo de varredura igual a $18,5^\circ$) (DE OLIVEIRA MOUTTA *et al.*, 2013).

O grau de polimerização (GP) indica o número de unidades monoméricas numa cadeia polimérica. No caso da celulose, ele também fornece um indício da quantidade de ligações glicosídicas intracadeia e terminais (proporcionalmente, quanto menor o GP maior a abundância de ligações terminais). Usualmente, os materiais celulósicos apresentam GP na faixa de 100 a 15000 (ZHANG e LYND, 2004).

Por fim, a acessibilidade indica qual o grau de exposição das ligações glicosídicas da cadeia de celulose ao ataque de agentes externos. Ela pode ser avaliada pela medida das áreas superficiais (tanto internas como externas), embora outros fatores devam ser considerados como porosidade, tamanho das cadeias e tamanho de poros (ZHANG e LYND, 2004; ZHAO *et al.*, 2012).

2.1.2 Hemicelulose

A hemicelulose compreende um grupo de polissacarídeos heterogêneos, ramificados ou não, de cadeia curta (grau de polimerização na faixa de 70 a 200). Esses heteropolímeros podem apresentar em sua estrutura unidades derivadas de pentoses (e.g.: xilose e arabinose), hexoses (e.g.: manose, glicose e galactose) e outros compostos, como ácido glicurônico (SAHA, 2003; ZHAO *et al.*, 2012).

A composição da hemicelulose de biomassas lignocelulósicas é variada, mas, de modo geral, estão presentes polissacarídeos como: xilanas, glucomanas, glucanos, mananas, xiloglucanos e arabinoxilanas. Entretanto, a estrutura e o conteúdo desses açúcares dependem da fonte do material (espécie de vegetal, tecido de origem, etc.) (SAHA, 2003; ZHAO *et al.*, 2012; RYTIOJA *et al.*, 2014). Todavia, observa-se que madeiras de lei geralmente são ricas em xilanas, enquanto que madeiras moles possuem altas concentrações de glucomanas (SAHA, 2003). Gramíneas, por sua vez, contam com altos teores de arabinoxilanas (ZHAO *et al.*, 2012).

Em todos os casos, a fração hemicelulósica se apresenta como um material amorfo, resultante das estruturas ramificadas e/ou altamente heterogêneas

dos polissacarídeos presentes. Portanto, a porção de hemicelulose acaba sendo mais susceptível à degradação do que outros elementos da biomassa, como as fibras de celulose (SILVEIRA *et al.*, 2015).

2.1.3 Lignina

A lignina é uma macromolécula amorfa de estrutura complexa. Ela é encontrada envolvendo as fibras de celulose nos materiais lignocelulósicos, criando uma barreira física e química contra o ataque de microrganismos e enzimas, de modo a proteger os polissacarídeos (ZHAO *et al.*, 2012; RYTIOJA *et al.*, 2014).

Sua estrutura é composta basicamente por unidades p-hidroxifenilas, guaiacilas e siringilas. Porém, a proporção entre essas unidades varia com a espécie da planta. No geral, madeiras moles são ricas em guaiacil. Madeiras de lei, por sua vez, possuem concentração maior de grupos siringil que o observado em madeiras moles, além de também apresentarem grupos guaiacil. Já a lignina de gramíneas possui as três unidades, com um conteúdo significativo de p-hidroxifenil. Essa diferença de composição resulta em ligninas de propriedades distintas, o que reforça o fato de que a natureza do material pode afetar seu processamento (RABELO, 2010).

Nesse aspecto, além de servir como uma barreira física ao processo de hidrólise da celulose, a lignina é capaz de adsorver celulasas, dificultando ainda mais a hidrólise da biomassa segundo a rota enzimática (LYND *et al.*, 2002; ZHANG e LYND, 2004). Contudo, a capacidade de adsorção da lignina parece depender de sua composição, grupos funcionais e distribuição na matriz lignocelulósica, o que é função de sua origem e do pré-tratamento ao qual o material foi submetido (ZHAO *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2017).

2.2 Bagaço de Cana-de-açúcar

O bagaço de cana-de-açúcar é o material obtido na etapa de moagem da cana para obtenção da garapa (caldo rico em sacarose), que é utilizada na produção de açúcar e etanol de primeira geração. Nesse processo, uma tonelada de colmos

da planta é capaz de gerar, em média, de 240 a 300 kg de bagaço, em base úmida (DIAS *et al.*, 2012).

Logo que sai da moenda, o bagaço apresenta cerca de 50% (m/m) de umidade e sua densidade aparente é de aproximadamente 120 kg/m³ (MARTINS, 2015). A composição do material pode variar de acordo com sua origem (região, época do ano, condições de cultivo da cana, etc.), condições operacionais nas quais ele foi obtido e também com os métodos de análise aplicados na quantificação de seus componentes (JUNQUEIRA *et al.*, 2015). A Tabela 2.1 apresenta a composição média para o bagaço bruto (sem sofrer qualquer tipo de pré-tratamento) que é utilizada pelo Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE) nas simulações realizadas na Biorefinaria Virtual de Cana-de-açúcar.

Tabela 2.1. Composição média do bagaço de cana bruto. Adaptado de Junqueira *et al.* (2015).

Componente	Conteúdo em base seca (% m/m)
Celulose	43,38
Lignina	23,24
Hemicelulose	25,63
Cinzas	2,94
Extrativos	4,82
Umidade (% m/m)	50,00

2.3 Produção de Etanol 2G: Contextualização

Conforme mencionado no Capítulo 1, o processo de fabricação de etanol de segunda geração a partir de bagaço de cana é uma alternativa promissora para a produção de biocombustíveis no Brasil. Atualmente, existem duas plantas de etanol 2G com capacidade superior a 38 milhões de litros/ano no país (Granbio em Alagoas e Raízen em Piracicaba). Ademais, é possível citar mais quatro plantas dessa capacidade operando no mundo, três nos EUA e uma na Itália (LYND *et al.*, 2017). Embora elas sejam plantas de demonstração (cujo objetivo principal é possibilitar uma análise da operabilidade e uma avaliação de custos mais fidedigna), é possível

utilizá-las como exemplo para definir quais as principais etapas no processamento da biomassa para a geração de etanol 2G.

De maneira geral, os processos contam com uma etapa inicial de recebimento e condicionamento da matéria-prima (o que varia de acordo com a biomassa utilizada). Em seguida, existem operações que visam à conversão do material lignocelulósico em açúcares fermentescíveis (processo *upstream*). Essas operações fazem parte das etapas de pré-tratamento (geralmente do tipo físico-químico) e de hidrólise (normalmente via enzimática). Os passos finais do processo objetivam transformar os açúcares gerados em etanol. Esses passos também ocorrem na produção de etanol de primeira geração e compreendem as etapas de fermentação e destilação (embora a fermentação possa ser significativamente diferente, dependendo, por exemplo, do aproveitamento ou não de pentoses) (LYND *et al.*, 2017; CHANDEL *et al.*, 2018).

Somam-se a essas etapas principais operações secundárias, como o uso de resíduos para geração de calor e/ou de bioeletricidade (CARPIO e SIMONE DE SOUZA, 2017). Além disso, algumas plantas optam por produzir as enzimas empregadas na hidrólise ao invés de utilizar coquetéis enzimáticos comerciais (LYND *et al.*, 2017).

Contudo, apesar do processo apresentado fazer parte do paradigma atual para a produção de etanol 2G, novas abordagens podem ganhar mais espaço num futuro próximo, como o uso de cepas específicas de bactérias termofílicas capazes de hidrolisar a biomassa e fermentar os monossacarídeos liberados (e.g.: *Clostridium thermocellum*) (LYND *et al.*, 2017). Outro viés é desenvolver melhorias às etapas do presente processo, especialmente no que diz respeito ao pré-tratamento e à hidrólise, que são tidos como grandes obstáculos para tornar o etanol 2G mais competitivo (CHANDEL *et al.*, 2018).

Diante desse cenário, as Seções 2.4 e 2.5 são dedicadas às etapas de pré-tratamento e de hidrólise, respectivamente.

2.4 Pré-tratamento

Conforme mencionado na Seção 2.1, as características estruturais do material lignocelulósico garantem alta recalcitrância à hidrólise (dada a presença de lignina e a baixa acessibilidade aos polissacarídeos), dificultando o processamento da biomassa. Logo, sem um pré-tratamento adequado, toda a cadeia de produção de etanol 2G é comprometida devido à diminuição drástica da eficiência da hidrólise, que pode até mesmo ser inviabilizada (no caso da aplicação de hidrólise via enzimática), dados os baixos rendimentos e velocidades de reação atingidos (AMIRI e KARIMI, 2018).

Dessa forma, pode-se dizer que a etapa de pré-tratamento tem por objetivo alterar a biomassa de modo a eliminar ou minimizar as barreiras químicas e físicas que a estrutura lignocelulósica impõe à execução da hidrólise e da fermentação. Alguns exemplos de alterações promovidas incluem a redução no tamanho das partículas, a solubilização das frações de hemicelulose, a remoção ou redistribuição da lignina, o aumento da área superficial e da porosidade da biomassa e a redução da cristalinidade e do grau de polimerização da celulose (VAN DYK e PLETSCHE, 2012; SILVEIRA *et al.*, 2015).

Contudo, além de proporcionar o aumento da digestibilidade do substrato lignocelulósico, o pré-tratamento também deve ser realizado de forma a:

- minimizar a geração de compostos que possam agir como inibidores da hidrólise e/ou da fermentação (e. g.: HMF, furfural, compostos fenólicos, ácido acético, etc.);
- permitir a recuperação da lignina, dentre outros compostos que possam ser aplicados para produção de bioprodutos;
- minimizar perdas e degradação, especialmente da fração de celulose;
- minimizar o consumo energético e o uso de reagentes e utilidades (RABELO, 2010; SILVEIRA *et al.*, 2015).

Ademais, é recomendado que a estratégia de pré-tratamento seja simples, ecologicamente correta e economicamente competitiva (HASSAN *et al.*, 2018). Esse último parâmetro é muito importante, visto que o pré-tratamento

representa um ponto crítico na viabilidade econômica de todo o processo (tanto por seu custo direto, como por influenciar a eficiência e, conseqüentemente, o custo das etapas subsequentes) (RABELO, 2010).

A seleção do tipo de pré-tratamento a ser empregado deve levar em conta diversos fatores. Dentre eles, a biomassa que está sendo utilizada é um dos mais importantes, uma vez que diferentes estratégias de pré-tratamento promovem diferentes alterações no material lignocelulósico, podendo ser mais ou menos eficazes dependendo da composição ou das características físicas da biomassa (HASSAN *et al.*, 2018).

O objetivo final do processo também deve ser levado em consideração no momento da definição do pré-tratamento: o método escolhido para um processo de produção de etanol 2G pode não ser o mais adequado para a produção de outros biocombustíveis. As concentrações de inibidores geradas por um pré-tratamento podem ser aceitáveis no processamento de etanol, mas proibitivas para a produção de butanol, por exemplo (AMIRI e KARIMI, 2018).

Com relação aos tipos de pré-tratamento, eles podem ser divididos em biológicos, físicos e químicos. Existem também métodos que combinam aspectos dessas classes, como é o caso dos processos AFEX (*Ammonia fiber explosion*) e hidrotérmico, que podem ser classificados como físico-químicos (SILVEIRA *et al.*, 2015).

2.4.1 Pré-tratamento biológico

Essa abordagem utiliza microrganismos capazes de se desenvolverem em materiais lignocelulósicos, em especial os fungos de decomposição branca, branca e parda (SUN *et al.*, 2016). Durante seu desenvolvimento, esses microrganismos produzem enzimas capazes de atuar na matriz lignocelulósica, tornando a celulose mais acessível (SILVEIRA *et al.*, 2015). Quando fungos de decomposição branca e branca são utilizados o principal efeito do pré-tratamento é a degradação da lignina, já quando fungos de decomposição parda são empregados ocorre preferencialmente o ataque à pectina e à celulose (TIAN *et al.*, 2018). Os processos podem ser desenvolvidos tanto para culturas puras quanto para combinações entre diferentes espécies.

Os grandes atrativos desse tipo de pré-tratamento são seu baixo consumo energético e seu apelo ambiental, uma vez que não são usados aditivos químicos (SUN *et al.*, 2016). Porém, o longo tempo de processamento (de alguns dias até semanas) limita significativamente sua aplicação. Além disso, há a necessidade de efetuar várias etapas de lavagem do material pré-tratado antes que ele possa seguir para as etapas de hidrólise e fermentação, produzindo uma quantidade significativa de efluentes, o que diminui o caráter sustentável dessa estratégia (SILVEIRA *et al.*, 2015).

Um problema que também pode ser julgado como relevante é o fato de que alguns dos fungos considerados (sobretudo os de decomposição branca) apresentam baixa seletividade, consumindo parte da celulose e da hemicelulose presentes na biomassa (MOREIRA NETO, 2016). Contudo, essa situação vem sendo contornada aplicando o procedimento de recombinação gênica para obtenção de indivíduos que atuem de maneira mais seletiva (TIAN *et al.*, 2018).

2.4.2 Pré-tratamento físico

Os pré-tratamentos físicos podem ser baseados tanto em processos mecânicos como em tecnologias emergentes. As principais estratégias mecânicas utilizam moagem (tanto via seca como via úmida) ou extrusão. Na moagem, o aumento da digestibilidade do substrato é atingido principalmente devido à redução do tamanho das partículas e à diminuição da cristalinidade e do grau de polimerização, enquanto que no processo de extrusão ocorre o rompimento das fibras do material (SUN *et al.*, 2016; HASSAN *et al.*, 2018). Entretanto, o consumo de energia dessas abordagens é muito alto, o que inviabiliza a sua aplicação (pelo menos de forma isolada). Uma tendência é executar a operação mecânica como uma etapa inicial para outros tipos de pré-tratamento, usualmente químicos (e.g.: promover a moagem da biomassa antes do tratamento organossolve ou por ácido diluído) (SILVEIRA *et al.*, 2015). Outra opção que vem sendo estudada é o desenvolvimento de processos que combinem operações mecânicas com o uso de reagentes químicos, como estratégias de despolimerização de materiais lignocelulósicos através de mecanocatálise (HICK *et al.*, 2010; SCHÜTH *et al.*, 2014).

No âmbito das tecnologias emergentes, Hassan *et al.* (2018) destacam os pré-tratamentos via micro-ondas, ultrassom, raios gama, irradiação por feixe de elétrons, campo elétrico pulsado e alta pressão (*high-pressure homogenization* e *high hydrostatic pressure*). De maneira geral, as vantagens desses métodos estão relacionadas à ausência de aditivos químicos, à baixa geração de resíduos, aos menores tempos de processamento e à baixa geração de compostos inibidores das etapas de hidrólise e fermentação. Todavia, a utilização desses pré-tratamentos na indústria de etanol 2G ainda é uma realidade distante, dado o alto custo de capital requerido (e até mesmo a ausência de equipamentos compatíveis com processos em larga escala) e, em alguns casos, a necessidade de combinar algumas dessas estratégias com diferentes formas de pré-tratamento para garantir sua eficiência (SUN *et al.*, 2016; HASSAN *et al.*, 2018).

2.4.3 Pré-tratamento químico

Essa classe de pré-tratamentos se caracteriza por fazer uso de aditivos químicos (ácidos, álcalis, solventes orgânicos, compostos oxidantes, líquidos iônicos, etc.) (SUN *et al.*, 2016). Seu efeito na matriz lignocelulósica varia muito de acordo com a técnica empregada, podendo incluir deslignificação, remoção da hemicelulose, intumescimento das fibras, aumento da porosidade e diminuição da cristalinidade e do grau de polimerização da celulose (RABELO, 2010; MOREIRA NETO, 2016).

Em geral, os pré-tratamentos químicos são práticos e requerem baixo tempo de processamento, porém eles possuem algumas desvantagens como o custo associado aos reagentes químicos (e sua posterior recuperação), a ocorrência de perda ou degradação dos açúcares liberados e a possível formação de inibidores e compostos tóxicos (SILVEIRA *et al.*, 2015; HASSAN *et al.*, 2018).

A seguir serão discutidos com maior profundidade os pré-tratamentos ácido e alcalino (deslignificação), que foram os métodos empregados em um dos substratos utilizados no presente trabalho (bagaço de cana pré-tratado com ácido diluído e deslignificado por hidróxido de sódio - BAD).

2.4.3.1 Pré-tratamento ácido

O pré-tratamento ácido tem sido extensamente estudado e é um dos preferidos pela indústria, já sendo aplicado em diversas plantas para produção de etanol 2G (SILVEIRA *et al.*, 2015; AMIRI e KARIMI, 2018). Ele age na biomassa removendo a fração hemicelulósica (atacando especialmente as ligações glicosídicas e glicuronosil) e promovendo alterações na estrutura da lignina, resultantes de reações de condensação, despolimerização e repolimerização (AMIRI e KARIMI, 2018). No entanto, o processo também está sujeito à formação de compostos que atuam como inibidores das etapas de hidrólise e/ou fermentação: a xilose e a glicose liberadas podem ser desidratadas até furfural e hidroximetilfurfural (HMF), enquanto que compostos fenólicos podem ser liberados pela pequena parcela da lignina que é decomposta (MATHEW *et al.*, 2016). Assim, operações de desintoxicação e lavagem do material pré-tratado podem ser necessárias.

Usualmente o pré-tratamento ácido é executado empregando ácido diluído em temperaturas que variam entre 140 a 200 °C, mas existem vários fatores que devem ser considerados na definição das condições de processo (SILVEIRA *et al.*, 2015; AMIRI e KARIMI, 2018). O primeiro deles refere-se ao reagente: na maioria das vezes são utilizados ácidos inorgânicos (H₂SO₄ principalmente), mas outras opções também têm se mostrado interessantes, como os ácidos maléico e fumárico (KOOTSTRA *et al.*, 2009). A dosagem do ácido é outro ponto importante, assim como a escolha por trabalhar com ácido concentrado ou diluído, embora ácidos concentrados sejam raramente empregados devido aos altos custos associados à etapa de recuperação e ao caráter extremamente corrosivo desses reagentes (o que eleva o custo dos equipamentos) (SILVEIRA *et al.*, 2015; SUN *et al.*, 2016).

Outros parâmetros importantes envolvem o tamanho das partículas do material a ser pré-tratado, o tipo de reator utilizado e a definição do binômio temperatura e tempo de processamento. Ademais, o pré-tratamento ácido pode ser realizado em conjunto com uma etapa de deslignificação, visando aumentar a acessibilidade da celulose através da remoção da lignina (PIHLAJANIEMI *et al.*, 2015; SILVEIRA *et al.*, 2015).

2.4.3.2 Pré-tratamento alcalino

O pré-tratamento alcalino é aquele que submete o material lignocelulósico à ação de soluções alcalinas. Nesse processo, diversos reagentes podem ser empregados, com destaque para os hidróxidos de sódio, cálcio, amônio e potássio, além de amônia e ureia (RABELO, 2010; SUN *et al.*, 2016). A reação normalmente é conduzida com concentrações baixas de álcali, utilizando altas temperaturas (100-180 °C) por curtos intervalos de tempo (PIHLAJANIEMI *et al.*, 2015; SILVEIRA *et al.*, 2015; AMIRI e KARIMI, 2018). Entretanto, existe a possibilidade de realizar um tratamento mais brando, onde ocorre principalmente o intumescimento das fibras de celulose. Nesse caso, são aplicadas maiores concentrações de base e baixas temperaturas (0 °C, -15 °C) por várias horas ou até mesmo dias (SUN *et al.*, 2016; AMIRI e KARIMI, 2018).

O principal efeito do pré-tratamento alcalino é a deslignificação (remoção da lignina), que é alcançada pela despolimerização da lignina e pela quebra de ligações ésteres e pontes de ácido ferúlico (SUN *et al.*, 2016; PIHLAJANIEMI *et al.*, 2015). Parte da hemicelulose também é solubilizada nesse processo, mas recuperá-la do licor de pré-tratamento é difícil (PIHLAJANIEMI *et al.*, 2015). Além disso, assim como ocorre nos pré-tratamentos ácidos, há a possibilidade de geração de inibidores.

A remoção da lignina resulta num aumento significativo na acessibilidade e na processabilidade da celulose presente nos substratos. Aita *et al.* (2011), por exemplo, verificaram que a digestibilidade da celulose do bagaço de cana-energia foi de 35% utilizando pré-tratamento hidrotérmico (que não promove deslignificação) contra 77% aplicando pré-tratamento com hidróxido de amônio (ambos os resultados considerando uma carga de 4% m/m de carboidrato hidrolisada por 24 h usando 30 FPU de celulase / g de carboidrato).

Um dos fatores que explica esse contraste é a característica estrutural dos materiais. Driemeier *et al.* (2016) constataram uma diferença estrutural entre os materiais pré-tratados que foram deslignificados e aqueles cuja fração de lignina não sofreu remoção. Em seu estudo, os autores verificaram que, embora o aumento de porosidade seja um resultado de diversos pré-tratamentos, os poros observados em biomassas onde a lignina foi removida são maiores dos que aqueles presentes em

materiais onde a lignina sofreu apenas uma reconformação (no primeiro caso, os poros devem ser originados pelos espaços anteriormente ocupados pela lignina, enquanto que no segundo os poros são provavelmente fruto de imperfeições resultantes da deposição de agregados de lignina).

2.4.4 Pré-tratamento físico-químico

Essa abordagem inclui métodos que combinam a ação de solventes e/ou reagentes com efeitos físicos (como ruptura mecânica das fibras do material lignocelulósico). Dentre os principais pré-tratamentos físico-químicos é possível citar os processos AFEX (*Ammonia fiber explosion*), explosão a vapor, hidrotérmico (também chamado de auto-hidrólise ou LHW – *liquid hot water*) e CO₂ supercrítico (SILVEIRA *et al.*, 2015; SUN *et al.*, 2016).

A seguir será detalhado o pré-tratamento hidrotérmico, visto que o mesmo foi empregado em um dos substratos utilizados no presente trabalho (bagaço de cana pré-tratado hidrotermicamente - BH).

2.4.4.1 Pré-tratamento hidrotérmico

No pré-tratamento hidrotérmico a biomassa é exposta à água líquida num sistema em alta temperatura (150-240 °C) e elevada pressão (acima da respectiva pressão de saturação da água) (SILVEIRA *et al.*, 2015). Nesse processo, as fibras do material lignocelulósico sofrem rompimento devido à incorporação de moléculas de água. Ocorre ainda a remoção da hemicelulose devido à presença de íons hidrônio gerados tanto pela autoionização da água como pelos ácidos liberados na decomposição da biomassa (SILVEIRA *et al.*, 2015; MOREIRA NETO, 2016).

O processo de remoção da hemicelulose é similar ao descrito para o pré-tratamento ácido (vide Subseção 2.4.3.1) e, assim como nesse processo, é possível que ocorra a formação de inibidores, sobretudo furfural, HMF e ácido acético (DE OLIVEIRA MOUTTA *et al.*, 2013). No entanto, a produção de inibidores pode ser minimizada no pré-tratamento hidrotérmico através do controle do pH do meio, que deve ser mantido preferencialmente na faixa de 4-7 (SILVEIRA *et al.*, 2015; MOREIRA NETO, 2016).

As grandes vantagens do pré-tratamento hidrotérmico envolvem o fato de que apenas água é utilizada. A ausência de aditivos químicos é atraente do ponto de vista ambiental e econômico, além disso, o meio reacional é menos corrosivo, diminuindo o custo associado aos equipamentos. Essa forma de pré-tratamento também permite o uso direto da biomassa (ainda fresca ou com alta umidade) e gera uma concentração baixa de inibidores se comparada a outras abordagens (SUN *et al.*, 2016). Como principal desvantagem pode-se destacar o alto consumo energético relacionado ao uso de altas pressões e temperaturas (SILVEIRA *et al.*, 2015).

2.5 Hidrólise

A hidrólise do material lignocelulósico tem como objetivo promover a quebra das cadeias de celulose em moléculas de glicose, que servem de substrato na etapa de fermentação. Em alguns casos, procura-se também realizar a quebra de parte da hemicelulose em hexoses e pentoses (com destaque para a xilose), açúcares que também podem ser aproveitados por alguns microrganismos para produção de etanol (PRUNESCU e SIN, 2013). Ademais, a hidrólise da lignina e de outras frações da hemicelulose pode ser executada para obtenção de compostos que servem de base para a fabricação de outros produtos químicos, tais como resinas fenólicas e epóxi, adesivos, combustíveis, poliolefinas, entre outros materiais poliméricos (SILVEIRA *et al.*, 2015; CHANDEL *et al.*, 2018).

Estima-se que, para garantir que o processo de geração de etanol 2G seja economicamente vantajoso, a hidrólise da biomassa deva ser realizada em sistemas com altas cargas de sólidos (pelo menos de 15-20%, m/m). Isso porque essas são as condições limite para a obtenção de hidrolisados com concentração média de 8% (m/m) de glicose (considerando os rendimentos atualmente atingidos), levando à concentração mínima de etanol requerida para a operação eficiente da etapa de destilação (4%, m/m) (MODENBACH e NOKES, 2013; BATTISTA *et al.*, 2018).

As hidrólises química e enzimática são as duas principais abordagens empregadas no processamento de materiais lignocelulósicos, embora alternativas como a utilização de irradiação também tenham sido estudadas (TAHERZADEH e

KARIMI, 2007). A seguir as duas classes de métodos de hidrólise mais relevantes serão detalhadas.

2.5.1 Hidrólise química

Na hidrólise química ocorre a quebra das cadeias de celulose e de hemicelulose para a obtenção das hexoses e pentoses. Nesse processo, ácidos são os catalisadores geralmente utilizados, em especial os ácidos sulfúrico e clorídrico. Ainda que os ácidos nítrico e fosfórico também tenham sido estudados (LENIHAN *et al.*, 2010; ROMERO *et al.*, 2010).

Quanto ao procedimento adotado, existem duas formas de operação que se destacam. A primeira é a hidrólise com ácido diluído. Nela, a biomassa é exposta a dois estágios de reação, cada um deles concebido de modo a minimizar o consumo de energia e a perda de açúcares, além de evitar a formação exagerada de inibidores (RABELO, 2010). A divisão em estágios permite ainda a obtenção de dois hidrolisados distintos, um rico em glicose (resultante da hidrólise da celulose) e outro rico em pentoses (resultante da quebra da hemicelulose), facilitando as etapas de fermentação subsequentes (TAHERZADEH e KARIMI, 2007).

O primeiro estágio se assemelha a um pré-tratamento ácido e tem como resultado a hidrólise da hemicelulose. O segundo é normalmente mais severo para promover a quebra da celulose, utilizando temperaturas mais elevadas (> 200 °C) ou maiores tempos de reação. Esse processo de hidrólise em estágios resulta numa alta recuperação dos açúcares derivados da hemicelulose (cerca de 80-95%), mas o mesmo não é observado para a glicose: os rendimentos da hidrólise da celulose ficam em torno de 40-60% (TAHERZADEH e KARIMI, 2007).

O outro procedimento empregado é a hidrólise com ácido concentrado. Nesse caso, as condições de trabalho são mais brandas (temperaturas na faixa de 40-100 °C), enquanto que as concentrações de ácido ficam entre 30% e 70% (m/m) (TAHERZADEH e KARIMI, 2007). Os rendimentos das reações conduzidas segundo essa estratégia são, em geral, superiores aos observados na hidrólise com ácido diluído, chegando a atingir valores próximos a 90% na quebra da celulose. Contudo, o tempo de reação é normalmente maior (WIJAYA *et al.*, 2014).

A comparação entre as abordagens diluída e concentrada indica também que a última opção pode resultar em economia de energia (dadas as menores temperaturas e pressões) e na redução na formação de inibidores. Porém, a hidrólise em meio diluído consome menos ácido e não requer uma etapa de recuperação (o que é indispensável para o outro modo de operação). Além disso, apesar dos dois métodos sofrerem com a corrosão de equipamentos, esse problema é mais acentuado para a hidrólise com ácido concentrado (WIJAYA *et al.*, 2014).

Por fim, o meio reacional obtido pela hidrólise química pode precisar ser submetido a uma sequência de operações antes de chegar à etapa de fermentação. Alguns passos comuns são a concentração do sistema, a desintoxicação (e.g.: adsorção de inibidores), a recuperação do catalisador (para processo com ácido concentrado) e a neutralização do hidrolisado (LENIHAN *et al.*, 2010).

2.5.2 Hidrólise enzimática

Nessa estratégia de hidrólise, os açúcares fermentescíveis são obtidos através do uso de um complexo enzimático que atua de maneira sinérgica para catalisar as reações de hidrólise das cadeias de celulose e da hemicelulose, dependendo das enzimas utilizadas (VAN DYK e PLETSCHE, 2012). Esse processo é realizado em condições brandas, usualmente em meios reacionais agitados, com temperaturas entre 45-50 °C e pH próximo a 4,8 (circunstâncias ótimas para a ação das enzimas). Entretanto, para alcançar altas conversões a reação é normalmente conduzida por longos períodos de tempo (30-144 h) (MODENBACH e NOKES, 2013).

Em comparação à hidrólise química, a abordagem enzimática apresenta as vantagens de atingir maiores rendimentos (próximos ao valor teórico), possuir maior seletividade, não gerar quantidades expressivas de inibidores (prejudiciais às leveduras de fermentação), bem como apresentar níveis mais baixos de degradação dos monossacarídeos liberados. Ademais, a hidrólise enzimática é realizada em sistemas pouco corrosivos e em valores de temperatura e pressão menores do que os observados para os processos com ácido, o que diminui os custos dos equipamentos (BANSAL *et al.*, 2009; SUAREZ *et al.*, 2014). Porém, algumas desvantagens envolvem a necessidade de efetuar o pré-tratamento da biomassa (que pode ser opcional no caso da hidrólise química), o alto custo das enzimas e os

elevados tempos reacionais (e, por consequência, o alto custo energético) (BANSAL *et al.*, 2009; SUAREZ *et al.*, 2014). Mesmo assim, a hidrólise enzimática é tida como uma abordagem muito promissora para o processo de etanol 2G (VAN DYK e PLETSCHE, 2012).

As próximas subseções abordarão com maior detalhamento quais as enzimas que participam da hidrólise do material lignocelulósico e suas formas de atuação. Além disso, serão explicados os principais fatores que influenciam no andamento da reação. Finalmente serão apresentadas algumas estratégias de operação para conduzir a hidrólise enzimática.

2.5.2.1 Enzimas

O processo de hidrólise enzimática de todos os componentes de uma biomassa lignocelulósica é extremamente complexo, envolvendo a ação conjunta de uma grande variedade de enzimas. Para a quebra das cadeias de celulose são necessárias enzimas do complexo celulolítico (endoglucanases, celobiohidrolases e β -glicosidases). Já a hidrólise da hemicelulose requer vários tipos de enzimas, dada a natureza heterogênea desse polissacarídeo. Exemplos de enzimas importantes nesse processo incluem endo-xilanasas, β -xilosidases, endo-mananasas, β -manosidases. A quebra da lignina e da pectina também pode ser executada via enzimática. Nesse caso enzimas como lacases, lignina peroxidases e pectina metil esterases são relevantes (VAN DYK e PLETSCHE, 2012).

Dessa forma, as misturas enzimáticas comerciais são normalmente constituídas por uma grande gama de enzimas, em quantidades determinadas de acordo com o objetivo final de sua aplicação (considerando as características do substrato alvo, a sinergia entre as enzimas, etc.). Neste texto, será dado enfoque às enzimas que atuam na hidrólise da celulose, visto que o complexo enzimático empregado para a obtenção dos dados utilizados neste projeto possuía alta atividade dessas enzimas.

As três principais enzimas que catalisam a reação de quebra da celulose em moléculas de glicose são as endo-1,4- β -D-glicanases (endoglucanases, EGs), as exo-1,4- β -D-glicanases (celobiohidrolases, CBHs) e as β -1,4-glicosidases (BGLs) (LYND *et al.*, 2002; RYTIOJA *et al.*, 2014). As endoglucanases agem na parte interna

das fibras de celulose. Elas são capazes de se ligar randomicamente ao longo da cadeia, hidrolisando preferencialmente as ligações glicosídicas acessíveis da região amorfa. Esse processo é responsável pela redução rápida do grau de polimerização da celulose e pela formação de novos terminais redutores e não redutores no substrato (LYND *et al.*, 2002; ZHAO *et al.*, 2012; KUMAR e MURTHY, 2013). A ação dessas enzimas resulta ainda na liberação de oligossacarídeos de diferentes tamanhos no sistema e em uma diminuição significativa da viscosidade do meio (MODENBACH e NOKES, 2013).

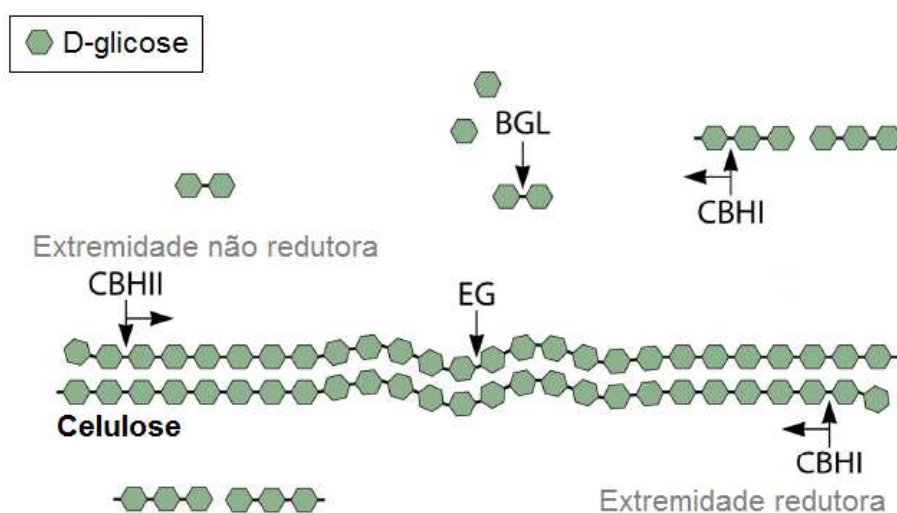
As celobiohidrolases atacam as ligações glicosídicas das extremidades da cadeia de celulose e podem ser subdivididas em tipo I (CBHI), que agem sobre terminais redutores, ou tipo II (CBHII), que atuam em terminais não redutores. Essas duas enzimas são responsáveis por liberar ao sistema moléculas de celobiose e, ocasionalmente, glicose. Contudo, diferentemente do que ocorre com grande parte das EGs, a maioria das celobiohidrolases realiza hidrólise de forma processiva, ou seja, as enzimas permanecem ligadas ao substrato após a catálise, o que se repete até que a cadeia atinja um tamanho mínimo (LYND *et al.*, 2002; KUMAR e MURTHY, 2013; RYTIOJA *et al.*, 2014).

Uma importante característica das CBHs e de outras celulases é a presença de uma estrutura modular de configuração singular que permite a ligação da enzima aos carboidratos. Essa estrutura, denominada CBM (*Carbohydrate-Binding Module*), é um domínio proteico diferente do sítio ativo, mas acredita-se que sua capacidade de promover a ligação do catalisador à cadeia de celulose facilite o processo de hidrólise (LYND *et al.*, 2002).

As β -glicosidases, por sua vez, são responsáveis pela conversão de celobiose e celodextrinas (e. g.: celotriose) em glicose. Assim, além de contribuir para a produção de glicose, as BGLs possuem a função de manter a concentração de celobiose e de pequenos oligossacarídeos baixa, o que é interessante, pois ajuda a minimizar o efeito de inibição por produto sobre as demais enzimas do complexo celulolítico (LYND *et al.*, 2002; ZHAO *et al.*, 2012).

A Figura 2.4 ilustra a atuação desse complexo enzimático na hidrólise da celulose.

Figura 2.4. Representação esquemática do processo de hidrólise de celulose. Adaptado de Rytioja *et al.* (2014).



Um fato que merece destaque é a alta sinergia entre EGs, CBHs e BGLs (i. e.: como a eficiência de hidrólise, em termos de rendimento ou de taxa de reação, é superior quando as enzimas são usadas juntas ao invés de separadas). Apesar do grau de sinergia depender da proporção e das características das enzimas envolvidas (bem como do substrato utilizado), a literatura propõe quatro formas principais de sinergia para o complexo celulolítico: entre CBHI e CBHII; entre diferentes EGs; entre EGs e CBHs; entre β -glicosidases e as demais enzimas (VAN DYK e PLETSCHE, 2012). Zhang e Lynd (2004) mencionam ainda a sinergia por proximidade devido à complexação de celulases; a sinergia intramolecular entre os sítios ativos e os CBMs e a sinergia entre celulose-enzima-microrganismo (no caso da utilização de células vivas e não somente do complexo enzimático).

Existem outras enzimas que podem atuar na quebra da celulose, além dos três tipos já apresentados. Rytioja *et al.* (2014) sugerem a possível participação de celobiose desidrogenases e mono-oxigenases líticas de polissacarídeos (nesse caso a quebra das ligações glicosídicas seria resultado da oxidação da cadeia de celulose). Lynd *et al.* (2002) citam também a presença de celodextrinases.

No que diz respeito à natureza das reações, elas podem ser homogêneas (como na conversão de celobiose à glicose pelas β -glicosidases) ou heterogêneas. Essas últimas são, em geral, mais lentas: suas taxas globais de reação são consequência de uma série de etapas. No geral, os passos mais influentes incluem

a transferência dos catalisadores do seio da fase líquida para a superfície do substrato (celulose); a adsorção das enzimas na celulose (auxiliada ou não por CBMs) e a localização da ligação química susceptível ao ataque; a formação do complexo enzima-substrato; o processo de catálise da reação em si; a posterior transferência dos produtos solúveis da superfície do substrato para o meio líquido e a desorção da enzima (caso ela não seja processiva) (LEE e FAN, 1983; BANSAL *et al.*, 2009; SUAREZ *et al.*, 2014). Porém, os passos relacionados à transferência de massa são normalmente menos limitantes que a catálise em si, embora a relevância de cada etapa dependa das características do substrato e das condições de reação (LEE e FAN, 1983).

A Subseção 2.5.2.2 apresenta alguns dos principais fatores que afetam a eficiência da hidrólise enzimática de biomassa lignocelulósica.

2.5.2.2 Fatores que afetam a hidrólise enzimática

São vários os fatores que podem influenciar a eficiência da hidrólise enzimática de matérias lignocelulósicas. Para facilitar seu estudo, eles podem ser separados em duas classes: uma associada a características da própria biomassa (como cristalinidade, acessibilidade/área superficial, teor de lignina, etc.) e outra relativa às condições de reação e às enzimas (temperatura, pH, nível de agitação, concentração de inibidores, etc.).

A primeira classe está relacionada à composição da biomassa e a suas características estruturais. Conforme exposto na Seção 2.1, a hemicelulose e a lignina presentes no material acabam diminuindo o acesso das enzimas às cadeias de celulose (dada a organização da parede celular). Assim, altas concentrações desses polímeros (em especial de lignina) comprometem significativamente a taxa e o rendimento da hidrólise. Além disso, a taxa de reação é afetada pela adsorção de enzimas do complexo celulolítico na lignina (LYND *et al.*, 2002; ZHANG e LYND, 2004; ZHAO *et al.*, 2012).

Quanto aos aspectos estruturais da biomassa, a Tabela 2.2 resume os principais parâmetros e seus efeitos sobre a hidrólise.

Tabela 2.2. Efeito das principais características estruturais da biomassa sobre a hidrólise enzimática.

Fator	Efeito
Cristalinidade	Analisando celulose isolada, verifica-se que a taxa de hidrólise da forma amorfa é superior a da cristalina, o que é justificado pela estrutura altamente ordenada e com grande número de ligações de hidrogênio, característica da celulose cristalina. Porém, no caso da biomassa ainda não há um consenso sobre o real efeito da cristalinidade, existindo estudos que reportam que o <i>ICr</i> não sofre alterações ao longo da reação. ^{a,b,c}
Grau de polimerização	O <i>GP</i> inicial da biomassa não tem influência significativa sobre a hidrólise. Mas, como esperado, o <i>GP</i> sofre diminuição conforme a reação progride, especialmente pela ação de endoglicanases. Ademais, materiais com menor <i>GP</i> possuem proporcionalmente um maior número de extremidades livres para a atuação de celobiohidrolases. ^{b,c}
Área superficial	A área superficial da biomassa está diretamente relacionada à acessibilidade das enzimas aos polissacarídeos. Assim, um aumento na área superficial tende a melhorar a digestibilidade do material. ^{a,b,c}
Tamanho de partículas	O tamanho de partículas é um parâmetro correlacionado à área superficial. Na prática, observa-se que a diminuição do tamanho das partículas resulta em maior área e, portanto, aumenta a taxa de hidrólise. No entanto, a redução das partículas se mostra eficiente até certo ponto (tamanho limite) a partir do qual não se observa mais um efeito apreciável sobre a velocidade de reação. ^{b,c}
Porosidade e tamanho de poro	Porosidade também é uma propriedade relacionada à acessibilidade. Porém, para que exista uma melhora na digestibilidade da biomassa não basta apenas alterar a porosidade. É preciso também aumentar o volume dos poros, de forma que o diâmetro médio seja maior que 5,1 nm (menor tamanho de poro capaz de acomodar as celulasas). ^{b,c,d}

^a (LYND *et al.*, 2002); ^b (ZHANG e LYND, 2004); ^c (ZHAO *et al.*, 2012); ^d (DRIEMEIER *et al.*, 2016).

A análise dos fatores expostos reforça a relevância da etapa de pré-tratamento e torna evidente que sua escolha deve ser feita de forma a que o processo seja capaz de produzir as alterações necessárias à biomassa utilizada. Contudo, é importante destacar que as relações de causa-efeito apresentadas na Tabela 2.2 devem ser consideradas com cautela. Isso porque, em geral, os estudos do impacto que as características estruturais da biomassa exercem sobre a eficiência da hidrólise estão sujeitos a grandes erros experimentais, resultantes tanto das técnicas de medida como da dificuldade de se isolar apenas um fenômeno (i.e.: muitas vezes mais de uma propriedade pode sofrer alteração, por exemplo, a cristalinidade pode diminuir ao mesmo tempo em que ocorre aumento do tamanho dos poros), o que compromete a obtenção de conclusões concretas (LYND *et al.*, 2002).

Com relação à classe de fatores associados às condições reacionais, a temperatura e o pH do meio merecem atenção. Para que a velocidade de reação seja alta é ideal que esses dois parâmetros estejam ajustados na faixa ótima de atuação das enzimas presentes no complexo utilizado (normalmente 45-50 °C e pH de aproximadamente 4,8). Entretanto existem estratégias de operação que utilizam condições fora dessa faixa, como processos que executam a hidrólise e a fermentação numa mesma etapa. Nesses casos, as taxas de hidrólise são usualmente menores e a desnaturação enzimática passa a ser um problema mais significativo (VAN DYK e PLETSCHKE, 2012).

O nível de agitação do meio reacional é outro fator pertinente. A literatura apresenta vários trabalhos acerca do desenvolvimento de sistemas de agitação eficientes para hidrólises com diferentes cargas de sólidos, especialmente para meios extremamente viscosos. O nível de agitação deve ser suficiente para minimizar as limitações que a transferência de massa possa impor sobre a reação e, ao mesmo tempo, deve ser adequado aos catalisadores, reduzindo a desnaturação mecânica das enzimas (MODENBACH e NOKES, 2013; LUDWIG *et al.*, 2014; BATTISTA *et al.*, 2018).

Além desses fatores, a determinação da carga enzimática e da concentração de sólidos empregada também influi na eficiência da hidrólise. No que diz respeito à carga enzimática, é necessário primeiramente definir qual o complexo

de enzimas empregado, levando em conta aspectos como a composição da biomassa, condições de reação (temperatura, pH, etc.), o objetivo final da hidrólise (quais açúcares serão fermentados), a especificidade das enzimas presentes, as relações de sinergia, entre outros (VAN DYK e PLETSCHE, 2012). Também é recomendável realizar um estudo acerca da carga enzimática ideal ao sistema, visto que é preciso atingir um equilíbrio entre o custo das enzimas e a taxa de hidrólise atingida. Entretanto, sobrecarregar o sistema com enzimas não é interessante, pois a velocidade de reação só irá aumentar até certo ponto. Quando o número de enzimas é excessivo elas passam a competir pelos pontos acessíveis do substrato, podendo inclusive diminuir a taxa global de reação (VAN DYK e PLETSCHE, 2012; MODENBACH e NOKES, 2013).

Quanto à concentração de biomassa utilizada, é importante notar que, apesar da operação com altas cargas de sólidos ser vantajosa (pela possibilidade de redução de custos e obtenção de hidrolisados mais concentrados em glicose), a carga total de sólidos no sistema deve ser compatível com os equipamentos disponíveis, para que limitações decorrentes de transferência de massa não comprometam a reação (MODENBACH e NOKES, 2013).

O efeito sólido é outro fator a ser ponderado no momento da definição da concentração inicial de biomassa a ser usada. Esse fenômeno é observado na hidrólise de alguns materiais lignocelulósicos e corresponde à diminuição da conversão da celulose em glicose conforme aumenta a carga inicial de biomassa no meio reacional (CARA *et al.*, 2007; KRISTENSEN *et al.*, 2009). Até o momento, o mecanismo por trás desse efeito ainda não foi completamente elucidado, embora ele provavelmente esteja relacionado às circunstâncias decorrentes do aumento do teor de sólidos do sistema, como a presença de pouca ou até mesmo nenhuma água livre, o que acaba dificultando a transferência de massa e favorecendo o acúmulo de produto e inibidores (MODENBACH e NOKES, 2013). Kristensen *et al.* (2009) avaliaram diversas possíveis causas do efeito sólido, como aumento da adsorção improdutiva de celulasas em lignina, aumento da concentração de inibidores fenólicos, efeito da diminuição da água livre, aumento na concentração de produtos (especialmente celobiose e glicose) e diminuição da fração de celulasas adsorvidas. Dentre esses fatores, os autores indicaram que os dois últimos seriam os mais

relevantes, com destaque para a diminuição da fração de enzimas adsorvidas, que foi o fator que apresentou maior correlação com a redução da conversão.

Finalmente, um fator de grande relevância é a concentração de inibidores presente no sistema. Esses inibidores podem ser tanto compostos resultantes da degradação da biomassa (formados principalmente durante o pré-tratamento) como os próprios produtos de reação.

A inibição por produto, especialmente glicose e celobiose, é um dos fatores que contribuem para a diminuição da taxa de reação conforme a hidrólise da biomassa progride e a conversão aumenta (BANSAL *et al.*, 2009). A glicose e a celobiose atuam como inibidores diretos, respectivamente, da β -1,4-glicosidase e das celulases. A glicose também apresenta um efeito inibitório sobre as celulases (embora menos significativo), mas sua maior influência sobre essas enzimas se dá de forma indireta: o aumento da concentração de glicose no meio inibe a ação das β -1,4-glicosidases, culminando num acúmulo de celobiose e, por consequência, na inibição das celulases (ANDRIĆ *et al.*, 2010). Os mecanismos de inibição atualmente considerados serão discutidos na Subseção 2.6.1.3.

Outros monossacarídeos presentes em menores quantidades no sistema também podem atuar como inibidores, tais como galactose, manose, xilose e arabinose (VAN DYK e PLETSCHE, 2012). Fora esses açúcares, o meio reacional pode conter ainda compostos originados pela degradação de hexoses e pentoses (resultantes da quebra parcial da celulose e da hemicelulose), tais como HMF, furfural e os ácidos fórmico, levulínico e acético. Compostos fenólicos derivados da lignina também podem estar presentes, como vanilina, siringaldeído e ácido tânico (HODGE *et al.*, 2008; TEJIRIAN e XU, 2011).

Hodge *et al.* (2008) avaliaram a capacidade de inibição desses compostos sobre a hidrólise de palha de milho, verificando que o efeito mais significativo é o do ácido acético. Entretanto, eles concluíram que a influência desses inibidores é pouco significativa frente à inibição provocada pelos açúcares, destacando que tanto os compostos fenólicos quanto o HMF e o furfural (fortes inibidores da fermentação) apresentaram efeito mínimo sobre a hidrólise.

Avaliando especificamente os derivados da lignina, Tejirian e Xu (2011) identificaram que compostos fenólicos oligoméricos (ácido tânico, proantocianidinas oligoméricas, etc.) exercem maior inibição sobre a hidrólise enzimática, se comparados aos compostos fenólicos simples (vanilina, siringaldeído, etc.). Eles também identificaram que os mecanismos de inibição estavam associados à complexação com as celulases e à adsorção na celulose (no caso de compostos fenólicos simples).

Uma vez expostos os fatores que influem na hidrólise enzimática, a Subseção 2.5.2.3 traz algumas das estratégias de operação mais importantes para a indústria de etanol de segunda geração.

2.5.2.3 Estratégias de operação

Tendo em vista os diversos parâmetros que podem influenciar na etapa de hidrólise e considerando também o aspecto econômico de todo o processo de geração de etanol 2G, diferentes formas de operação foram propostas.

Primeiramente, essas estratégias podem ser classificadas de acordo com o grau de integração da hidrólise com as demais etapas do processo. Atualmente, existem quatro principais classes: SHF (*Separate Hydrolysis and Fermentation*), que engloba estratégias em que a hidrólise é separada da etapa de fermentação; SSF (*Simultaneous Saccharification and Fermentation*), em que a hidrólise é realizada junto à etapa de fermentação da glicose; SSCF (*Simultaneous Saccharification and Co-Fermentation*), que envolve estratégias de hidrólise junto da fermentação de todas as hexoses e pentoses de interesse (como glicose e xilose); e CBP (*Consolidated BioProcessing*), em que a produção do complexo enzimático, a hidrólise e a fermentação dos açúcares ocorrem numa única etapa (num mesmo reator, utilizando uma determinada comunidade de microrganismos) (HAMELINCK *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2016; CHANDEL *et al.*, 2018).

As vantagens dessas diferentes classes de modos de operação estão relacionadas à minimização dos efeitos de inibição da hidrólise por produto e à diminuição do número de etapas no processo (o que reduz o número de reatores e equipamentos auxiliares e pode, inclusive, culminar em economia de tempo, energia e utilidades) (WANG *et al.*, 2016; CHANDEL *et al.*, 2018). Contudo, no presente

texto serão abordadas apenas estratégias do tipo SHF, onde as condições de reação (temperatura, pH, nível de agitação, etc.) podem ser definidas de forma a maximizar o rendimento da hidrólise, sem restrições referentes às leveduras ou a outros microrganismos que atuem na fermentação.

Uma das mais notáveis estratégias é a hidrólise em batelada alimentada, na qual o meio reacional é continuamente alimentado com substrato respeitando uma determinada especificação. Ela merece destaque, pois possibilita que a carga acumulada de sólido processado seja alta sem que a concentração de sólidos momentânea no sistema atinja valores muito elevados. Essa característica faz dessa abordagem uma boa alternativa para a hidrólise em batelada com altas cargas de sólidos, visto que nos dois casos consegue-se trabalhar com grande quantidade total de substrato, mas na batelada alimentada os problemas de baixas conversões e elevada viscosidade (que se traduz em dificuldades de agitação) são minimizados (HODGE *et al.* 2009; MODENBACH e NOKES, 2013). Exemplos de estudos acerca dessa estratégia incluem: Hodge *et al.* (2009); Wang *et al.* (2012) e Tervasmäki *et al.* (2017).

Estratégias que se baseiam em dividir a hidrólise enzimática em múltiplas etapas também são comumente desenvolvidas para o processamento de biomassa. Um exemplo é a proposta de Yang *et al.* (2011), na qual a hidrólise é dividida em três estágios. Os intervalos de tempo testados para os estágios foram de 9, 9 e 12 h, sendo que ao término de cada período o hidrolisado era coletado e a fração sólida era recolhida e preparada para o estágio seguinte, onde ocorria outra hidrólise (com nova adição de tampão e ajuste da carga enzimática). Nesse trabalho os autores utilizaram palha de milho pré-tratada por explosão a vapor (carga total de 30% m/v de sólidos durante a hidrólise) e concentração de celulasas na faixa de 15-30 FPU/g de celulose. Eles compararam o desempenho da hidrólise em três estágios (tempo total de 30 h) com o processo convencional (reação em batelada de 72 h). Como conclusão, foi observado que o processo em estágios era capaz de gerar maiores rendimentos em comparação com a hidrólise em batelada (principalmente devido à minimização da inibição por produto graças à remoção periódica do hidrolisado), além de reduzir o tempo de reação. Outras estratégias foram sugeridas por Xue *et al.* (2012b). Nesse caso, a hidrólise é dividida em etapas distintas para que a carga enzimática seja acrescida aos poucos no sistema. Em resumo, as diferentes formas

de operação propostas pelos autores incluem uma fase inicial na qual parte das enzimas é adicionada em meio diluído (5% m/m de sólidos). Em seguida, há um breve período de repouso (10 min) e uma subsequente concentração do sistema através de filtração (teor final de sólidos de 20% m/m). Então, ocorre um período de retenção (2-8 h) seguido de uma nova adição de enzimas, depois da qual a hidrólise é conduzida por mais 40-48 h. Nesse caso, os autores utilizaram o material lignocelulósico resultante do pré-tratamento de lascas de madeira com licor verde (Na_2CO_3 e Na_2S) e diferentes cargas enzimáticas foram avaliadas (5-40 FPU/g de substrato). Os resultados indicaram que a estratégia de adição das enzimas em etapas possibilita trabalhar com altas cargas de sólidos (20% m/m) e obter conversões comparáveis às de sistemas em batelada convencional com 5% m/m de sólidos.

Existem ainda estratégias de reciclo do hidrolisado, que têm por objetivo diluir os sólidos do meio (reduzindo, assim, a viscosidade no sistema) sem diminuir substancialmente a concentração final de açúcar atingida, mesmo que a inibição por produto possa ser mais acentuada. Um exemplo de trabalho que lida com o reciclo do hidrolisado foi realizado por Xue *et al.* (2012a). Por fim, existem estudos de estratégias de hidrólise que possuem um enfoque diferente, propondo novas configurações para reatores e sistemas de agitação, como é o caso do projeto conduzido por Ludwig *et al.* (2014).

2.6 Modelagem Matemática de Hidrólise Enzimática

Embora as principais etapas envolvidas na hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos sejam conhecidas, ainda existem detalhes relativos ao seu mecanismo que não foram completamente elucidados. Tal fato se deve em grande parte à complexidade inerente ao sistema (atuação conjunta de um grupo de enzimas, heterogeneidade do substrato, etc.), o que dificulta a análise isolada do efeito que diferentes fatores podem exercer (LEVINE *et al.*, 2010).

Apesar desses obstáculos, existe uma grande gama de modelos para a hidrólise enzimática de biomassa na literatura e, em geral, eles podem ser divididos em três classes: empíricos, semi-mecanísticos ou mecanísticos.

Normalmente, os modelos empíricos expressam a conversão como função do tempo de hidrólise ou de características do substrato e são válidos apenas dentro do intervalo experimental considerado em sua concepção (BANSAL *et al.*, 2009). Eles são muito úteis quando se deseja examinar o comportamento do sistema dentro de uma determinada faixa de condições (interpolação), podendo também ser empregados para estimar taxas iniciais de hidrólise ou auxiliar na identificação de interações entre as variáveis do sistema (SCOTT *et al.*, 2015). As principais abordagens adotadas nos modelos empíricos incluem regressão linear ou polinomial, modelagem estatística e, mais recentemente, modelagem através de redes neurais artificiais (VANI *et al.*, 2015).

Modelos mecanísticos e semi-mecanísticos, por sua vez, envolvem um maior número de parâmetros e tentam fornecer um melhor entendimento acerca dos detalhes fenomenológicos envolvidos na hidrólise enzimática (MOREIRA NETO, 2016). Uma grande vantagem dessas abordagens é a possibilidade de utilizar os modelos desenvolvidos para prever o comportamento do sistema estudado sob a influência de diferentes condições (extrapolação). Porém, é importante ressaltar que a capacidade de predição dos modelos deve ser comprovada através de etapas de validação e de análise da incerteza associada aos parâmetros (NIU *et al.*, 2016). Esta última compõe um grande desafio desse tipo de modelagem, visto que é significativa a quantidade de trabalhos na literatura que apresentam parâmetros com largos intervalos de confiança, o que pode ter origem em dados experimentais insuficientes ou presença de parâmetros correlacionados (SCOTT *et al.*, 2015).

A principal diferença entre modelos mecanísticos e semi-mecanísticos está no grau de detalhamento empregado. Geralmente, modelos semi-mecanísticos possuem menor quantidade de parâmetros e equações. Além disso, eles comumente utilizam um maior número de hipóteses simplificadoras para representar o sistema, tais como usar uma concentração única para as celulases e descrever a celulose através de uma única concentração (desconsiderar a presença de oligossacarídeos de diferentes tamanhos de cadeia) (MOREIRA NETO, 2016).

A Tabela 2.3 apresenta uma lista com modelos de hidrólise enzimática de biomassa presentes na literatura, bem como algumas considerações a seu respeito.

Tabela 2.3. Modelos de hidrólise enzimática de biomassa (Siglas: E = empírico; SM = semi-mecanístico; M = mecanístico; M-M = Michaelis-Menten; Ads. = adsorção enzimática; G = glicose; Cb = celobiose; X = xilose).

Modelo	Tipo	Substrato	Enzimas	Principais características do modelo		
				Base	Inibição	Outros
Kadam <i>et al.</i> (2004)	SM	Palha de milho pré-tratada (ácido diluído)	Celulase comercial CPN (logen Corp.) β -glicosidases Novo 188 (Novozymes)	M-M; Ads	Competitiva: G, Cb, X	Reatividade do substrato
Peri <i>et al.</i> (2007)	SM	Celulose não cristalina	Celulase comercial Spezyme CP (Genencor)	M-M; Ads	Não competitiva: G, Cb e celo-oligômeros Competitiva: G	-
Hodge <i>et al.</i> (2009)	SM	Palha de milho pré-tratada (ácido diluído)	Celulase comercial Spezyme CP (Genencor)	M-M; Ads	Competitiva: G, Cb, X	Reatividade do substrato; Batelada alimentada
Zheng <i>et al.</i> (2009)	SM	Azevém selvagem (<i>Leymus triticooides</i>) pré-tratado (ácido diluído)	Novo Celluclast 1.5L e Novo 188 (Novozymes)	M-M; Ads	Competitiva: G, Cb	Reatividade do substrato
Levine <i>et al.</i> (2010)	M	Avicel®	CBH I e EG II de <i>T. reesei</i> purificadas a partir de Celluclast (Novozymes)	M-M; Ads	Competitiva: G, Cb	Inativação térmica; Adsorção como reação elementar
Rivera <i>et al.</i> (2010)	E	Bagaço de cana pré-tratado com H ₂ O ₂ alcalino	Celulases de <i>T. reesei</i> (Sigma-Aldrich) Novo 188 (Novozymes)	-	-	Var. dependente: G; Var. independentes: tempo e cargas enzimáticas

Tabela 2.3. (continuação)

Modelo	Tipo	Substrato	Enzimas	Principais características do modelo		
				Base	Inibição	Outros
Hosseini e Shah (2011)	M	Avicel® e fibra de algodão pré-tratada com H ₃ PO ₄	CBH I e EG I de <i>Irpex lacteus</i> purificadas a partir de Driselase (Kyowa Hakko)	<i>chain end scission</i>	-	Difusão mássica; Reação na superfície externa e no interior da cadeia
Moreira Neto (2011)	SM	Bagaço de cana com pré-tratamentos: H ₂ O ₂ alcalino; H ₃ PO ₄ + NaOH; hidróxido de cálcio	Celulases de <i>T. reesei</i> (Sigma-Aldrich) Novo 188 (Novozymes)	M-M; Ads	Não competitiva: G, Cb Competitiva: G	Diminuição da área superficial em função do tempo
Flores-Sánchez et al. (2013)	SM	Sabugo de milho pré-tratado (ácido diluído)	Accellerase 1500 (Genencor) xilanases NS50030 e NS50014 (Novozymes)	M-M; Ads	Competitiva: G, Cb, X, xilo-oligossacarídeos e arabinose	Reatividade do substrato; Hidrólise de hemicelulose
Kumar e Murthy (2013)	M	Avicel®	CBH I e EG II de <i>T. reesei</i> purificadas a partir de Celluclast (Novozymes)	Modelagem Molecular Estocástica	G, Cb	Características estruturais da celulose; Sinergia entre enzimas
Luterbacher et al. (2013)	M	Validação: madeira de lei (com ou sem pré-tratamento por ácido diluído)	Modelagem: celulase Cel7A Validação: Spezyme CP (Genencor); Multifect (Genencor); Novo 188 (Novozymes)	Distribuição de tamanho de poros	-	Difusão mássica em poros e reação na superfície interna

Tabela 2.3. (continuação)

Modelo	Tipo	Substrato	Enzimas	Principais características do modelo		
				Base	Inibição	Outros
Prunescu e Sin (2013)	SM	Palha de trigo pré-tratada com vapor	Complexo celulolítico comercial (não especificado)	M-M; Ads	Competitiva: G, Cb, X, furfural	Hidrólise de xilana; Equações de transporte; Modelo para o pH
Zhang et al. (2014)	M	Palha de milho e lascas de choupo, ambos pré-tratados pelo processo AFEX	Spezyme CP (Genencor) Multifect (Genencor) Novo 188 (Novozymes) β -xilosidase não comercial	<i>smallest accessible compartment</i> (SAC); Ads	Oligômeros solúveis	Hidrólise de xilana
Angarita et al. (2015)	SM	Palha de cana com pré-tratamento hidrotérmico	Complexo celulolítico Cellic CTec2 (Novozymes)	M-M; Ads	Competitiva: G, Cb, X	Reatividade do substrato; Hidrólise de hemicelulose
Nag et al. (2015)	M	α -celulose- I_{β} e celulose- I_{β} de alta cristalinidade (Sigma–Aldrich)	CBHI e EGI (Megazyme) β -glicosidase isolada de Novozymes 188	Ads	Competitiva: G, Cb	População com diferentes cristalinidades e acessibilidades
Scott et al. (2015)	SM	Palha de milho pré-tratada (ácido diluído)	Celulase comercial Spezyme CP (Genencor)	M-M; Ads	Competitiva: G, Cb, ácido acético	Reatividade do substrato; Equação explícita para o efeito sólido
Vani et al. (2015)	E	Palha de arroz (pré-tratamento alcalino)	Celulase comercial (Zytex); β -glicosidasas de <i>A. niger</i> e xilanase (MAPS Enzymes)	-	-	Var. dep.: G e X; Var. independentes: tempo, carga de biomassa e tamanho de partículas

Tabela 2.3. (continuação)

Modelo	Tipo	Substrato	Enzimas	Principais características do modelo		
				Base	Inibição	Outros
Moreira Neto (2016)	SM	Bagaço de cana com pré-tratamentos: hidrotérmico e organossolve	Novo Celluclast 1.5L e Novo 188 (Novozymes)	M-M; Ads	Competitiva: G, Cb, X	Hidrólise de xilana; Diminuição da área superficial em função do tempo
Niu et al. (2016)	M	Modelagem: celulose amorfa Validação: celulose intumescida c/ H ₃ PO ₄	Modelagem: Spezyme CP (Genencor) Validação: EG CBH II (<i>Humicola insolens</i>); β-glicosidasas (<i>P. brasilianum</i>)	Ads	Não competitiva: G, Cb e celotriose	Inativação enzimática em função do tempo
Wang et al. (2016)	SM	Palha de trigo pré-tratada (ácido diluído)	Complexo celulolítico Cellic CTec2 (Novozymes)	M-M; Ads	G, etanol	Hidrólise de xilana; Modelo para SSCF (consumo de G, formação de etanol e morte celular)
Fockink et al. (2017)	E	Bagaço de cana pré-tratado (explosão a vapor)	Cellic CTec3 e Cellic HTec3 (Novozymes)	Cinética Fractal	-	Var. dep.: G, Cb e X; Var. independentes: tempo, carga de celulose e xilana
Tervasmäki et al. (2017)	SM	Papel de filtro qualitativo, 600 (VWR)	Flashzyme Plus 2G (Roal Oy)	Ads	Competitiva: G	Redução de atividade e capacidade adsorptiva das enzimas; Batelada alimentada

Diante do exposto, no presente trabalho será feita a opção por utilizar a modelagem semi-mecanística. A justificativa para essa escolha baseia-se na maior praticidade desses modelos, o que vem ao encontro da finalidade deste projeto: como o objetivo é a otimização e comparação de diferentes estratégias de operação, o equacionamento proposto deve ser capaz de representar o sistema, mas sem um detalhamento exacerbado, de forma a proporcionar respostas rápidas sem requerer grande esforço computacional. Mais detalhes sobre esse tipo de modelagem serão expostos na Subseção 2.6.1.

2.6.1 Modelagem semi-mecanística

Modelos semi-mecanísticos são constituídos basicamente por equações de balanço de massa e expressões para taxas de reação. Em geral, seus parâmetros são determinados através do ajuste do modelo a dados gerados experimentalmente, com posterior validação e análise de incerteza (KUMAR e MURTHY, 2013; NIU *et al.*, 2016).

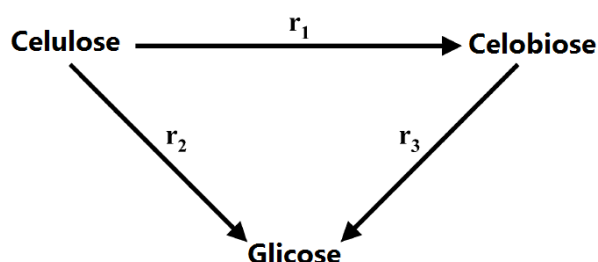
Quando esse tipo de modelagem é empregado para representar a hidrólise enzimática de biomassa, existem algumas hipóteses frequentemente encontradas em sua formulação. Levine *et al.* (2010), Kumar e Murthy (2013) e Niu *et al.* (2016) destacam:

- Adotar uma única concentração para representar um sistema complexo de diferentes enzimas;
- Tratar a celulose e/ou a hemicelulose como um substrato uniforme, i.e., utilizar uma concentração única e não diferenciar o material de acordo com suas propriedades (e.g.: seu grau de polimerização);
- Aplicar cinética do tipo Michaelis-Menten com ou sem alterações particulares aos sistemas em estudo.

Dessa forma, grande parte dos modelos semi-mecanísticos de hidrólise de materiais lignocelulósicos baseiam-se nos balanços de massa para celulose (representada através de uma concentração única para todas as cadeias insolúveis), glicose e celobiose (principais produtos da reação). No que diz respeito às taxas de reação, existem diferentes abordagens.

Vários autores (HODGE *et al.*, 2009; FLORES-SÁNCHEZ *et al.*, 2013; PRUNESCU e SIN, 2013; ANGARITA *et al.*, 2015; SCOTT *et al.*, 2015) usam como base o esquema descrito por Kadam *et al.* (2004). Nesse trabalho, são incluídas três taxas de reação: duas catalisadas por celulasas (conversão de celulose à celobiose e de celulose à glicose) e uma catalisada por β -1,4-glicosidases (conversão de celobiose à glicose), conforme esquematizado na Figura 2.5.

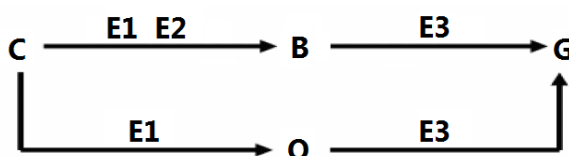
Figura 2.5. Esquema de três reações proposto por Kadam *et al.* (2004). As relações de inibição não estão representadas. Adaptado de Kadam *et al.* (2004).



Porém, outras propostas também podem ser encontradas. Em seu modelo para hidrólise enzimática em batelada alimentada, Tervasmäki *et al.* (2017) assumiram que a taxa de conversão de celobiose à glicose não seria um fator limitante (devido à elevada atividade de β -1,4-glicosidases), considerando uma única taxa de reação e realizando o balanço de massa apenas para a celulose e a glicose.

Já Peri *et al.* (2007) propuseram um modelo com quatro taxas de reação, conforme ilustrado na Figura 2.6.

Figura 2.6. Esquema reacional proposto por Peri *et al.* (2007). C = celulose, O = ceto-oligômeros solúveis, B = celobiose e G = glicose. Enzimas: E1 (endo-1,4- β -D-glicanases), E2 (exo-1,4- β -D-glicanases) e E3 (β -1,4-glicosidases). Adaptado de Peri *et al.* (2007).



Com relação à cinética, normalmente as reações homogêneas presentes no sistema são descritas segundo Michaelis-Menten (especialmente a reação de conversão de celobiose à glicose catalisada pelas β -1,4-glicosidases). A descrição das demais reações, no entanto, não é tão trivial.

A natureza heterogênea das reações de despolimerização da celulose faz com que não sejam válidas algumas das hipóteses base para a aplicação da equação de Michaelis-Menten, como o excesso de substrato frente à carga enzimática (KADAM *et al.*, 2004). Assim, as abordagens mais comuns sugerem alterações na cinética clássica de Michaelis-Menten, adicionando termos associados à adsorção das enzimas no substrato, além da inclusão de fatores estruturais e físico-químicos que possam ter influência sobre o comportamento do sistema. As Subseções 2.6.1.1 a 2.6.1.5 resumem algumas dessas propostas.

2.6.1.1 Adsorção

Conforme descrito na Subseção 2.5.2.1, tanto as endo-1,4- β -D-glicanases como as exo-1,4- β -D-glicanases atuam nas cadeias de celulose presentes na biomassa, necessitando adsorver no substrato, localizar um ponto de ligação para somente então efetuar a catálise. Esse processo heterogêneo ocorre na interface entre as fases líquida e sólida presentes no sistema e culmina na conversão da celulose em oligossacarídeos solúveis. Estes, por sua vez, são convertidos em glicose pela ação de β -1,4-glicosidase, numa reação homogênea em meio líquido.

Uma das maneiras de incorporar a natureza heterogênea do sistema na modelagem semi-mecanística é considerar a etapa de adsorção das celulasas, escrevendo as taxas de reação em termos da concentração de enzima adsorvida. Isso é feito adicionando ao modelo uma equação que relacione essa concentração com a carga total de enzima adicionada ao sistema (valor conhecido) (BANSAL *et al.*, 2009).

Para tanto, é usual utilizar modelos de adsorção, como a isoterma de Langmuir. Contudo, apesar de ser comumente empregado e descrever bem os dados experimentais, o modelo de Langmuir assume algumas hipóteses que não são válidas para o sistema, como uniformidade da superfície do adsorvente e ausência de interações entre as moléculas de adsorbato (KADAM *et al.*, 2004; ANGARITA *et al.*, 2015).

2.6.1.2 Efeito estrutural do substrato

A influência do sólido lignocelulósico no sistema reacional também pode ser incorporada considerando suas características estruturais, como cristalinidade,

área superficial, porosidade, entre outras (vide Subseção 2.5.2.2). Diversos trabalhos também incluem essas propriedades em seus modelos para descrever a redução da taxa de reação tipicamente observada conforme aumenta a conversão durante a hidrólise enzimática de biomassa (KADAM *et al.*, 2004; MOREIRA NETO 2011; MOREIRA NETO, 2016).

Uma abordagem normalmente utilizada para capturar o efeito da cristalinidade é modelar o substrato como bifásico, ou seja, considerar um substrato que apresenta frações com maior susceptibilidade à hidrólise do que outras. Isso pode ser feito definindo uma fração de substrato inerte ou realizando a distinção entre a celulose amorfa e a cristalina (menos acessível às celulases) (BANSAL *et al.*, 2009).

Outra característica comumente incluída na modelagem da hidrólise enzimática é chamada de reatividade. Ela é empregada para representar a diminuição da digestibilidade da biomassa durante a hidrólise, resultado do conjunto de alterações estruturais sofridas pelo substrato (KADAM *et al.*, 2004; MOREIRA NETO, 2016). Na maior parte dos modelos, ela é descrita através de um termo que decresce em função da conversão ou da concentração de substrato (BANSAL *et al.*, 2009). Kadam *et al.* (2004) expressaram a reatividade conforme a Equação 2.2:

$$R_S = \alpha \frac{S}{S_0} \quad (2.2)$$

Em que R_S é a reatividade do substrato, S é a concentração de substrato num dado momento, S_0 é a concentração inicial de substrato e α é uma constante (de valor unitário nesse modelo).

A acessibilidade das enzimas ao substrato também é um importante parâmetro a ser considerado. No modelo proposto por Moreira Neto (2016), por exemplo, a acessibilidade foi incorporada através de um termo relativo à diminuição da área superficial do substrato.

Finalmente, é importante destacar que existe certa controvérsia quanto à adoção dos efeitos estruturais do substrato para explicar a redução da taxa de reação. A justificativa está na dificuldade de medir a evolução de algumas dessas propriedades ao longo da hidrólise, o que compromete a obtenção de resultados

conclusivos (LYND *et al.*, 2002). Ademais existem estudos que mostram, por exemplo, que propriedades como a cristalinidade são constantes ao longo da hidrólise (NAG *et al.*, 2015).

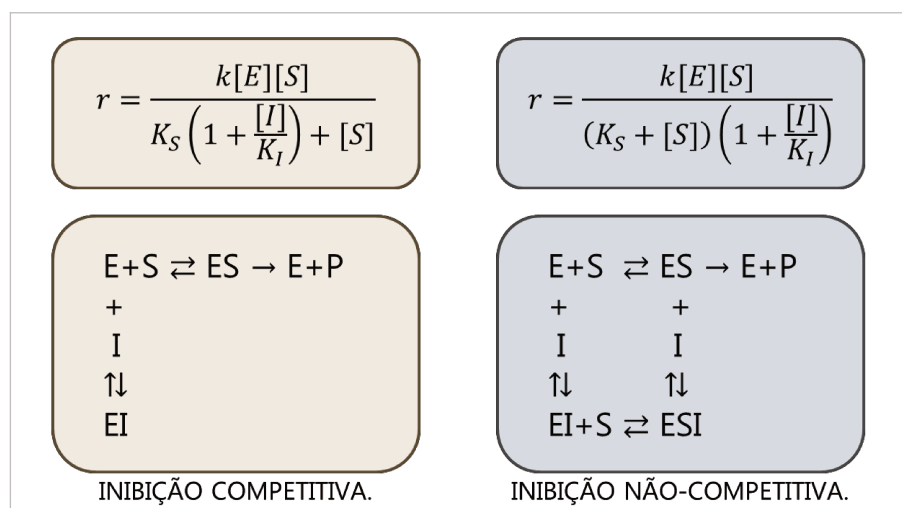
2.6.1.3 Inibição

Conforme mencionado na Subseção 2.5.2.2, a inibição enzimática pode ocorrer em maior ou menor intensidade no meio reacional, dependendo da composição da biomassa empregada, do tipo de pré-tratamento realizado e das enzimas utilizadas (RABELO, 2010). Em geral, os modelos de hidrólise incluem pelo menos a inibição pelos principais produtos (glicose e celobiose).

No que diz respeito aos mecanismos, a inibição das β -glicosidasas por produto (glicose) já foi extensamente estudada, sendo reportada como do tipo competitivo (ANDRIĆ *et al.*, 2010; VÁSQUEZ, 2017).

No caso da inibição de celulasas por glicose e celobiose, Andrić *et al.* (2010) apontam que não existe um consenso entre os modelos de hidrólise enzimática existentes na literatura com relação a qual forma de inibição adotar: ora ela é descrita como competitiva ora como não-competitiva. A Figura 2.7 ilustra a diferença entre essas duas abordagens.

Figura 2.7. Esquema comparando as taxas de reação inibidas (segundo Michaelis-Menten) e os mecanismos para inibição competitiva e não-competitiva. $[E]$, $[S]$ e $[I]$ representam, nesta ordem, as concentrações de enzima, substrato e inibidor. Nas equações da taxa (r) para formação do produto (P), os termos k , K_S e K_I são, respectivamente, as constantes da taxa, de saturação de substrato e de inibição. Acervo pessoal.



Essa discordância pode ser explicada pela dificuldade em efetuar ensaios de inibição conclusivos, dada a complexidade da hidrólise da celulose e as múltiplas variáveis do sistema (ANDRIĆ *et al.*, 2010). Porém, a análise estrutural tanto das endo-1,4-β-D-glicanases como das exo-1,4-β-D-glicanases sugere que o mecanismo mais provável seja o competitivo (MOREIRA NETO, 2016).

Um exemplo de trabalho recente que concorda com essa observação foi realizado por Vásquez (2017). Nesse estudo foi analisada a cinética de inibição de celulases de *Trichoderma reesei* (Celluclast 1.5L). Os resultados apontaram que os açúcares reduziram a taxa inicial de reação, mas não afetaram significativamente a sua velocidade máxima, indicando um comportamento competitivo.

Fora glicose e celobiose, xilose também é um inibidor considerado por diversos autores (KADAM *et al.*, 2004; ANGARITA *et al.*, 2015; MOREIRA NETO, 2016). A inclusão de outros compostos depende do processo estudado (SHF, SSF, etc.) e da biomassa utilizada.

2.6.1.4 Efeito sólido

Scott *et al.* (2015) sugerem que o efeito sólido seja incluído explicitamente nos modelos. Para isso, eles associaram o aumento da carga inicial de sólidos com duas possíveis consequências: a diminuição da atividade das enzimas adsorvidas ou a redução da carga enzimática adsorvida. Na primeira foi introduzido um termo linear com relação à carga inicial de sólidos para modificar a atividade enzimática das reações heterogêneas, conforme exposto na Equação 2.3:

$$r_j = (1 - b_j S_0) \cdot f\left(\sum E_{i,ADS}\right)_j \quad (2.3)$$

Na qual r_j é a j-ésima taxa de reação heterogênea considerada no modelo, b_j é o j-ésimo fator de diminuição de atividade, S_0 é a concentração inicial de celulose e $f\left(\sum E_{i,ADS}\right)_j$ é a j-ésima expressão para a taxa de hidrólise diretamente proporcional ao somatório das concentrações de enzimas adsorvidas.

A outra abordagem analisada envolveu a inclusão de uma função linear da carga inicial de sólidos para diminuir a quantidade de enzima adsorvida. As Equações 2.4 e 2.5 ilustram esse procedimento.

$$r_j = f \left(\sum E_{i,ADS} \right)_j \quad (2.4)$$

$$E_{i,ADS} = (1 - a_i S_0) \cdot f_{i,ADS} \quad (2.5)$$

Em que r_j é a j-ésima taxa de reação heterogênea considerada no modelo, $f(\sum E_{i,ADS})_j$ é a j-ésima expressão para a taxa de hidrólise diretamente proporcional ao somatório das concentrações de enzimas adsorvidas, a_i é o i-ésimo fator de decréscimo de adsorção, S_0 é a concentração inicial de celulose e $f_{i,ADS}$ é o modelo de adsorção empregado para a i-ésima enzima.

Os resultados do estudo de Scott *et al.* (2015) revelaram que ambas as abordagens se mostraram capazes de descrever adequadamente dados experimentais de hidrólise enzimática de palha de milho. Contudo, destaca-se que a segunda hipótese se mostra mais palpável, em vista do comportamento experimental observado para a hidrólise em altas cargas de sólidos, já que alguns autores reportam a redução da fração de enzimas adsorvidas (KRISTENSEN *et al.*, 2009).

2.6.1.5 Inativação enzimática

Dependendo das condições operacionais do sistema reacional considerado, as enzimas podem estar mais ou menos susceptíveis à inativação térmica ou mecânica. Assim, a inativação é um fator recorrente nos modelos, podendo ser escrita tanto para a concentração total de enzimas como apenas para a fração adsorvida. As formas mais comuns para representá-la utilizam processos de primeira ou segunda ordem (BANSAL *et al.*, 2009).

Além disso, a inativação pode ocorrer pela obstrução das enzimas na própria superfície do substrato ou devido à presença de lignina. O primeiro caso é mais provável de ocorrer com as celobiohidrolases e pode ser descrito por meio de um modelo de erosão (BANSAL *et al.*, 2009). O segundo pode ocorrer com celulasas e hemicelulasas, sendo resultado da adsorção improdutiva das enzimas na lignina (TEJIRIAN e XU, 2011).

2.7 Otimização

Os problemas de otimização são aqueles que têm por objetivo obter um valor extremo de máximo, mínimo ou multiobjetivo (via programação por metas) de uma função, $f(\mathbf{x})$, e, para isso, se preocupam em determinar os valores das variáveis, $\mathbf{x} = (x_1, \dots, x_k)$, que levam a essa situação (CHAPRA, 2012). Em termos matemáticos, o enunciado geral de um problema de otimização pode ser expresso pela Equação 2.6:

$$\text{Min } f(\mathbf{x}) \quad \text{s.a.} \quad \begin{cases} g_i(\mathbf{x}) \leq 0 & i = 1, \dots, n \\ h_j(\mathbf{x}) = 0 & j = 1, \dots, m \\ \mathbf{x} \in S \end{cases} \quad (2.6)$$

Na qual $f(\mathbf{x})$ é a função objetivo (que deve ser minimizada), g_i e h_j são funções que representam as possíveis restrições (podem ou não estar presentes) e S é o espaço de busca ($S \subset \mathbb{R}$) (BEZ, 2005).

De forma geral, os processos de otimização podem ser classificados em locais ou globais. No primeiro caso, a solução encontrada (\mathbf{x}^*) é um ponto de ótimo dentro de uma vizinhança, $V(\mathbf{x}^*)$, pertencente ao espaço de busca, ou seja, para $\forall \mathbf{x} \in V(\mathbf{x}^*)$, $f(\mathbf{x}) \geq f(\mathbf{x}^*)$, no caso de mínimo local, ou $f(\mathbf{x}) \leq f(\mathbf{x}^*)$, no caso de máximo local. Já na otimização global, a solução encontrada (\mathbf{x}^*) é um ponto de ótimo em todo o espaço de busca: para $\forall \mathbf{x} \in S$, $f(\mathbf{x}) \geq f(\mathbf{x}^*)$, no caso de mínimo global, ou $f(\mathbf{x}) \leq f(\mathbf{x}^*)$, no caso de máximo global (BEZ, 2005).

Ademais, os problemas de otimização podem ser divididos em restritos, caso $g_i(\mathbf{x})$ ou $h_i(\mathbf{x})$ estejam presentes, ou irrestritos (caso contrário). Eles também podem ser classificados em unidimensionais, nos quais $\mathbf{x} = x_1$, ou multidimensionais (nos quais a função objetivo apresenta mais de uma variável dependente). Outras classificações estão baseadas nos tipos de funções presentes: se $f(\mathbf{x})$ e as restrições forem lineares, tem-se um caso de programação linear, já se $f(\mathbf{x})$ ou alguma restrição for não linear, tem-se um problema de programação não linear (CHAPRA, 2010).

Assim, os dois casos de otimização considerados neste trabalho (estimação de parâmetros de modelos de hidrólise enzimática e determinação de

condições operacionais para diferentes estratégias de hidrólise) podem ser classificados como problemas globais, irrestritos, multidimensionais não lineares.

No que diz respeito aos métodos de resolução, é possível dividi-los em determinísticos e estocásticos. Os métodos de otimização determinísticos necessitam de informações referentes à direção de crescimento da função e atuam vasculhando sucessivamente o espaço de busca, calculando o ponto seguinte com base no ponto atual (BEZ, 2005). Eles podem ser divididos em abordagens que requerem ou não o conhecimento de derivadas da função. Alguns exemplos de abordagens que fazem uso de derivadas são os métodos de Newton, do gradiente conjugado, Quase-Newton e de Marquardt. Métodos que não utilizam derivadas incluem o da seção áurea, o de Brent e o de Powell, dentre outros (CHAPRA, 2010).

Os métodos de otimização estocásticos são aqueles que empregam uma abordagem probabilística, sendo muitas vezes inspirados por outros campos do conhecimento, como biologia ou física (MOHD ZAIN *et al.*, 2018). Embora sua eficiência seja comprometida pelo fato de não serem utilizadas informações relativas ao comportamento da função objetivo, tais métodos tendem a fornecer pontos de ótimo global (o que às vezes não é atingido através de métodos determinísticos) (CHAPRA, 2010). Além disso, eles são especialmente interessantes nos casos de problemas não lineares ou que apresentem funções descontínuas ou não diferenciáveis (BEZ, 2005). Alguns exemplos desses métodos incluem *simulated annealing*, *tabu search*, *artificial bee colony*, enxame de partículas, algoritmos genéticos e evolução diferencial (BEZ, 2005; DA ROS *et al.*, 2013).

A comparação entre algoritmos determinísticos e estocásticos mostra que, normalmente, os últimos são mais indicados para a resolução de problemas associados a bioprocessos (MOHD ZAIN *et al.*, 2018). Isso é resultado de diversos fatores. Em primeiro lugar, observa-se que, de maneira geral, os algoritmos determinísticos crescem demasiadamente em complexidade com o número de variáveis do problema, o que contribui para que apresentem um maior *overhead* (sobrecarga de memória, tempo computacional, etc.). Ademais, é comum que eles acabem convergindo para ótimos locais e não globais quando o espaço de busca é muito complexo ou irregular, um problema que é minimizado pelos algoritmos estocásticos, dada sua robustez (MOREIRA NETO, 2011; MOHD ZAIN *et al.*, 2018).

Ainda considerando a resolução de problemas relacionados a bioprocessos, Mohd Zain *et al.* (2018) mencionam que, dentre os algoritmos estocásticos, aquele que tradicionalmente fornece o melhor desempenho é a evolução diferencial. Tal afirmação é corroborada por diversos trabalhos existentes na literatura. Um exemplo é o estudo conduzido por Da Ros *et al.* (2013), em que quatro algoritmos estocásticos de otimização (enxame de partículas, *simulated annealing*, evolução diferencial e *artificial bee colony*) foram avaliados quanto a seu desempenho na estimação de parâmetros de um modelo de fermentação alcoólica de hidrolisado de mandioca. Os resultados obtidos pelo algoritmo de evolução diferencial foram os mais satisfatórios e, como conclusão, os autores recomendam a utilização de evolução diferencial para a condução de processos de estimação de parâmetros cinéticos de modelos bioquímicos. Outro trabalho relevante é o de Rocha M. *et al.* (2014), no qual os autores avaliaram a performance de três classes de métodos de otimização meta-heurísticos na determinação do perfil ótimo de alimentação de quatro casos distintos de processos de fermentação em batelada alimentada. Os autores concluíram que a evolução diferencial era a estratégia mais consistente, fornecendo resultados aceitáveis em todos os casos avaliados e boa velocidade de convergência.

Diante do exposto anteriormente, fez-se a opção por trabalhar com um algoritmo de evolução diferencial para o desenvolvimento deste projeto.

2.7.1 Otimização através de evolução diferencial

O algoritmo de evolução diferencial foi proposto por Storn e Prince em 1997 e permite a minimização de funções contínuas, lineares ou não, diferenciáveis ou não (STORN e PRINCE, 1997). Ele faz parte da classe dos algoritmos evolutivos, isto é, métodos de otimização meta-heurísticos com abordagem populacional baseados em mecanismos de evolução biológica (DAS *et al.*, 2009).

Na resolução de problemas de otimização através de algoritmos evolutivos, trabalha-se com uma população de soluções candidatas. A conversão dessas possíveis soluções para a resposta final do problema está baseada em dois passos fundamentais: um processo de modificação da população (que geralmente envolve etapas de mutação e *crossover*) e um processo de seleção de indivíduos (DAS *et al.*, 2009).

No caso da evolução diferencial, a população de soluções candidatas é formada por NP vetores do tipo $V_{i,G}$ (com $i = 1, \dots, NP$), cada um deles composto por D elementos. Nessa notação, NP é o número total de indivíduos definido para a população, G denota qual o número da iteração (geração) atual e D é igual ao número de variáveis do problema de otimização (STORN e PRINCE, 1997).

Existem diferentes esquemas de algoritmos de evolução diferencial no que diz respeito ao processo de modificação da população. Eles são identificados segundo a nomenclatura “DE/a/b/c”. O termo “a” mostra qual o indivíduo que sofre mutação, sendo geralmente *rand* (quando um vetor da população é escolhido aleatoriamente) ou *best* (quando é selecionado o vetor associado ao valor mais baixo da função objetivo numa geração). O termo “b” é um número e indica quantas diferenças ponderadas são aplicadas na mutação. Finalmente, o termo “c” refere-se ao esquema de *crossover* utilizado, usualmente *bin* (binomial) ou *exp* (exponencial) (STORN e PRINCE, 1997; DAS *et al.*, 2009). De maneira simplificada, as principais estratégias de geração, modificação e seleção da população em algoritmos de evolução diferencial envolvem:

1. Obtenção da população inicial: os indivíduos ($V_{i,0}$) da população inicial são obtidos aleatoriamente, segundo distribuição uniforme de probabilidade, de forma a cobrir todo o espaço de busca. Caso seja definida uma estimativa inicial de solução, os indivíduos ($V_{i,0}$) são gerados de modo a se distribuir normalmente ao redor da mesma (STORN e PRINCE, 1997).
2. Mutação: durante a fase de mutação novos vetores (representados por $M_{i,G}$) são criados a partir da soma de diferenças ponderadas entre dois vetores populacionais a um terceiro indivíduo. As formas mais usuais de mutação são dadas pelas Equações 2.7-2.11:

DE/*rand*/1/... :

$$M_{i,G} = V_{r1,G} + F \cdot (V_{r2,G} - V_{r3,G}) \quad (2.7)$$

DE/*best*/1/... :

$$M_{i,G} = V_{best,G} + F \cdot (V_{r1,G} - V_{r2,G}) \quad (2.8)$$

DE/*target-to-best*/1/... :

$$\mathbf{M}_{i,G} = \mathbf{V}_{i,G} + F \cdot (\mathbf{V}_{best,G} - \mathbf{V}_{i,G}) + F \cdot (\mathbf{V}_{r1,G} - \mathbf{V}_{r2,G}) \quad (2.9)$$

DE/*rand*/2/... :

$$\mathbf{M}_{i,G} = \mathbf{V}_{r1,G} + F \cdot (\mathbf{V}_{r2,G} - \mathbf{V}_{r3,G}) + F \cdot (\mathbf{V}_{r4,G} - \mathbf{V}_{r5,G}) \quad (2.10)$$

DE/*best*/2/... :

$$\mathbf{M}_{i,G} = \mathbf{V}_{best,G} + F \cdot (\mathbf{V}_{r1,G} - \mathbf{V}_{r2,G}) + F \cdot (\mathbf{V}_{r3,G} - \mathbf{V}_{r4,G}) \quad (2.11)$$

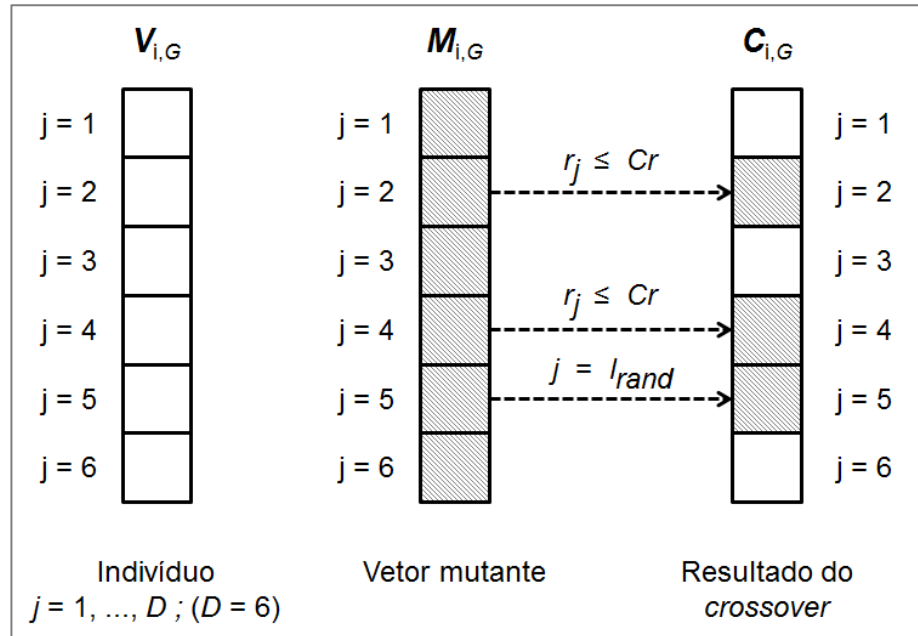
Em que os índices $r1, r2, r3, r4$ e $r5$ indicam indivíduos distintos escolhidos aleatoriamente na população, o subscrito *best* é referente ao indivíduo que resulta no menor valor da função objetivo numa dada geração e F é o fator de diferença ($F > 0$) (DAS *et al.*, 2009).

3. Crossover: nessa etapa é gerado um novo vetor ($\mathbf{C}_{i,G}$) resultante da combinação entre indivíduos ($\mathbf{V}_{i,G}$) e mutantes ($\mathbf{M}_{i,G}$). Os dois principais procedimentos adotados para essa combinação são o exponencial e o binário (DAS *et al.*, 2009). No caso deste trabalho, será empregado um algoritmo que utiliza o esquema binário. Nesse esquema, os elementos do vetor $\mathbf{C}_{i,G}$ são definidos de acordo com a Equação 2.12:

$$c_{j,i,G} = \begin{cases} m_{j,i,G} & \text{se } r_{(j)} \leq Cr \text{ ou } j = I_{rand} \\ v_{j,i,G} & \text{se } r_{(j)} > Cr \text{ e } j \neq I_{rand} \end{cases} \quad (2.12)$$

Em que $r_{(j)}$ é um número entre 0 e 1 gerado aleatoriamente (segundo uma distribuição uniforme) a cada novo elemento analisado, j indica qual o elemento dos vetores ($j = 1, \dots, D$; com D igual ao número total de variáveis a serem ajustadas), Cr é a constante de probabilidade de *crossover* ($0 \leq Cr \leq 1$) e I_{rand} é um número natural entre 1 e D escolhido randomicamente para garantir que pelo menos um elemento de $\mathbf{C}_{i,G}$ tenha origem no vetor mutante (STORN e PRINCE, 1997). A Figura 2.8 ilustra esse processo.

Figura 2.8. Esquema do processo de crossover binário para um problema de otimização com 6 variáveis. Nesse exemplo, $l_{rand} = 5$ e $r_{(2)}$ e $r_{(4)}$ são menores que o valor estabelecido para Cr . Adaptado de Storn e Prince (1997).



4. Seleção: o processo de seleção define quais vetores farão parte do conjunto populacional da próxima geração. Nesse processo, os vetores $V_{i,G}$ são comparados aos $C_{i,G}$ e os novos indivíduos ($V_{i,G+1}$) são escolhidos em termos do menor valor da função objetivo (f), conforme a Equação 2.13:

$$V_{i,G+1} = \begin{cases} C_{i,G} & \text{se } f(C_{i,G}) \leq f(V_{i,G}) \\ V_{i,G} & \text{se } f(C_{i,G}) > f(V_{i,G}) \end{cases} \quad (2.13)$$

Em seguida, os passos 2-4 são repetidos até que o critério de parada seja atingido. Alguns dos critérios comumente utilizados incluem o número máximo de iterações, o número máximo de avaliações da função, a definição de uma tolerância para a qualidade da população e a definição de um valor a ser atingido pela função objetivo (DAS *et al.*, 2009; OCTAVE, 2018).

Um ponto que também merece destaque na evolução diferencial é a escolha dos valores dos seus três parâmetros de controle: o número de indivíduos da população (NP), o fator de diferença (F) e a constante de probabilidade de

crossover (Cr). Embora não exista uma regra única, é possível encontrar algumas recomendações na literatura. O manual de referência de funções do *software* GNU OCTAVE reúne algumas delas. No caso do NP , uma boa estimativa é utilizar o valor de $10D$ (dez vezes o número de variáveis do problema). Com relação ao fator de diferença, recomenda-se escolher um valor no intervalo $[0,5, 1]$. Por fim, o valor de Cr influi significativamente na velocidade de convergência, sendo interessante aplicar valores próximos a 1 (OCTAVE, 2018).

Existem ainda variantes do algoritmo tradicional de evolução diferencial, que são desenvolvidas para tentar superar alguns contratempos aos quais o método pode estar sujeito, como convergência lenta ou prematura e alta sensibilidade aos parâmetros de controle (NP , F e Cr) (MOHD ZAIN *et al.*, 2018). No caso do presente trabalho, optou-se por utilizar a função *de_min* do programa OCTAVE v.4.2.1. Essa função tem como algoritmo padrão uma variação do algoritmo tradicional de evolução diferencial denominada de DEGL/SAW/bin (OCTAVE, 2018).

O esquema DEGL/SAW/bin aplica uma mutação baseada em vizinhanças globais e locais (DEGL). Nesse processo de mutação são gerados inicialmente dois vetores recombinantes: um local ($I_{i,G}$) e um global ($g_{i,G}$), ambos calculados segundo a Equação 2.9, só que o primeiro utilizando indivíduos vizinhos ao $V_{i,G}$ e o segundo considerando indivíduos de toda a população. Então, os vetores recombinantes são somados segundo a Equação 2.14, formando o vetor mutante ($M_{i,G}$) (DAS *et al.*, 2009).

$$M_{i,G} = w \cdot g_{i,G} + (1 - w) \cdot I_{i,G} \quad (2.14)$$

Em que w é um parâmetro denominado de fator de ponderação. No caso da estratégia DEGL/SAW/bin, o fator de ponderação é auto-adaptativo (SAW). Além disso, conforme mencionado anteriormente, o algoritmo faz uso de *crossover* do tipo binário (bin). (DAS *et al.*, 2009; OCTAVE, 2018).

CAPÍTULO 3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Parte Experimental

3.1.1 Substratos

No presente estudo foram utilizados dados de hidrólise enzimática obtidos com bagaços de cana-de-açúcar que passaram por diferentes tipos de pré-tratamento. O primeiro substrato, aqui denominado de BH, foi submetido a pré-tratamento hidrotérmico. O segundo, denominado de BAD, sofreu pré-tratamento ácido diluído seguido de deslignificação por hidróxido de sódio. Ambos os materiais foram fornecidos e caracterizados pelo Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE/CNPEM) (Campinas, SP, Brasil).

Mais detalhes acerca dos procedimentos de pré-tratamento empregados podem ser encontrados na Tese de Machado (2018). A caracterização química dos materiais encontra-se transcrita na Tabela 3.1. As composições indicadas estão em base seca.

Tabela 3.1. Composição química em base seca para os dois bagaços pré-tratados utilizados na geração dos dados experimentais, conforme apresentado por Machado (2018).

Componente ^a	Teor no BH (% m/m)	Teor no BAD (% m/m)
Celulose	61,07 ± 0,97	71,22 ± 0,19
Hemiceluloses	2,10 ± 0,06	2,05 ± 0,18
Lignina total	31,97 ± 0,05	20,10 ± 0,47
Cinzas	6,44 ± 0,06	7,55 ± 0,17
Extrativos	-	-
Total	101,58 ± 1,05	100,00 ± 0,28

^a A metodologia adotada na caracterização dos materiais foi descrita por Rocha G.J.M. *et al.* (2014).

A umidade dos bagaços pré-tratados foi determinada via analisador de umidade por infravermelho (GEHAKA – IV2500, São Paulo, SP, Brasil) em duplicata. O valor obtido nos dois casos (BH e BAD) foi de aproximadamente 7% (m/m) (valor de umidade dos materiais durante seu armazenamento).

3.1.2 Complexo enzimático

O complexo enzimático empregado nos ensaios considerados neste trabalho foi o *Cellic CTec2* (NOVOZYMES, Bagsværd, Dinamarca). Esse coquetel é indicado para aplicação na degradação de materiais lignocelulósicos em açúcares simples e apresenta em sua composição uma mistura de celulases, hemicelulases e β -glicosidases.

A caracterização do complexo foi efetuada através de duas análises. A primeira foi a determinação da atividade enzimática de celulase presente no sistema, que foi realizada segundo a metodologia proposta por Ghose (1987), conforme indicado pela União Internacional de Química Pura e Aplicada. A segunda foi a quantificação da proteína total, seguindo o método de Bradford (BRADFORD, 1976).

O valor de atividade medido foi de $112,65 \pm 13,54$ FPU/mL (unidades de papel de filtro por mililitro do coquetel) e o teor proteico obtido foi de $74,63 \pm 3,02$ mg/mL.

3.1.3 Dados de hidrólise enzimática

Os dados empíricos de hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar empregados nas fases de modelagem matemática e de reestimação de parâmetros deste projeto foram gerados por Machado (2018). Conforme mencionado nas Subseções 3.1.1 e 3.1.2, os materiais pré-tratados BH e BAD foram utilizados como substratos nos ensaios e as hidrólises foram executadas com o coquetel enzimático *Cellic CTec2*. A seguir são apresentadas as principais informações referentes aos procedimentos adotados em cada estratégia de hidrólise considerada. As metodologias detalhadas estão descritas na Tese de Machado (2018).

3.1.3.1 Hidrólise enzimática em batelada

Os experimentos de hidrólise em batelada foram feitos variando a concentração inicial de celullignina (BH ou BAD) nos sistemas. Os casos considerados no presente trabalho são aqueles cujas cargas de sólidos foram de 5, 10, 15 e 20% (m/v).

Todos os ensaios foram realizados em duplicata e em todos os sistemas a biomassa foi diluída em tampão citrato 0,05 M (pH 4,8) complementado com azida

sódica (acrescida na proporção de 0,02% / g de substrato) e o coquetel enzimático foi adicionado de forma a garantir uma carga de celulase de 15 FPU/g de sólidos. A incubação foi feita a 50 °C por 144 h com agitação de 150 rpm.

A quantificação dos açúcares liberados (celobiose e glicose) foi feita através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Os dados obtidos encontram-se no Anexo I.

3.1.3.2 Hidrólise enzimática em batelada alimentada

A hidrólise em batelada alimentada foi realizada utilizando uma carga inicial de 10% (m/v) de sólidos (BH ou BAD). Assim como no processo em batelada, foi utilizado tampão citrato 0,05 M (pH 4,8) complementado com azida sódica (0,02% / g de biomassa) e carga enzimática de 15 FPU/g de substrato. A incubação ocorreu a 50 °C por um período de tempo total de 144 h com agitação de 150 rpm.

Após 6 h de reação, foram efetuadas três alimentações espaçadas entre si por intervalos de 6 h. Cada alimentação foi composta de bagaço pré-tratado (em quantidade equivalente à utilizada em sistemas com 5% m/v de sólidos) acrescido de coquetel enzimático suficiente para manter a carga de celulases no sistema em 15 FPU/g de biomassa. As concentrações de celobiose e de glicose obtidas ao longo do processo foram determinadas via HPLC. Os resultados encontram-se no Anexo II.

3.1.3.3 Hidrólise enzimática em etapas

A hidrólise em etapas foi desenvolvida englobando três estágios distintos, conforme exposto pelas Figuras 3.1 e 3.2.

Figura 3.1. Estratégia de hidrólise enzimática em etapas utilizando BH como substrato. Acervo pessoal.

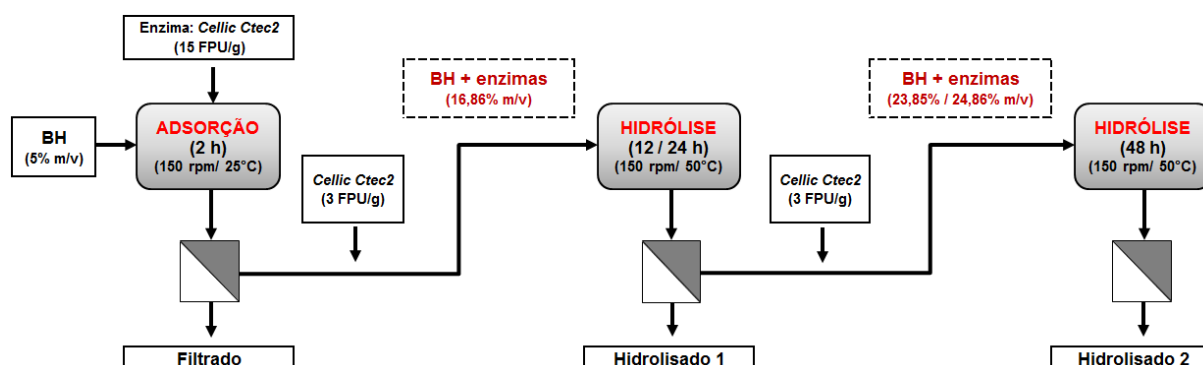
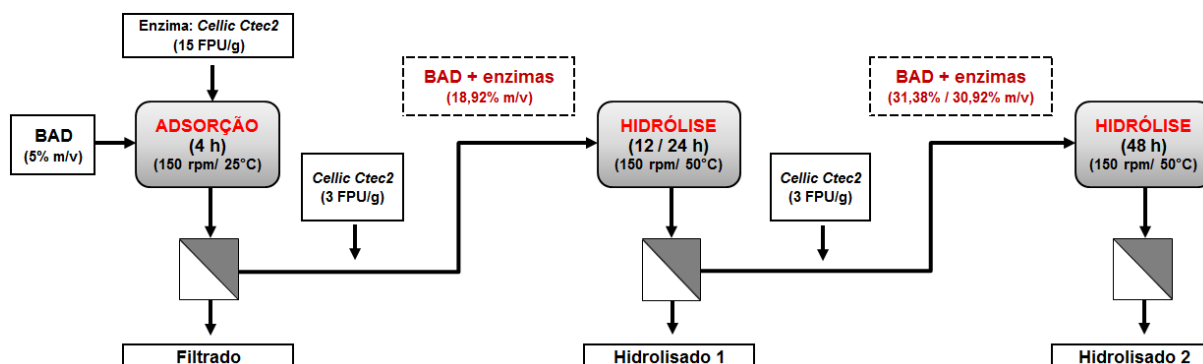


Figura 3.2. Estratégia de hidrólise enzimática em etapas utilizando BAD como substrato. Acervo pessoal.



O primeiro estágio é uma etapa de adsorção enzimática num sistema com carga de 5% (m/v) de sólidos. Assim como nas demais estratégias, foi utilizado tampão citrato 0,05 M (pH 4,8) com azida sódica e 15 FPU de celulase / g de substrato. A adsorção ocorreu por 2 h para o BH e por 4 h para o BAD, ambos os casos a 25 °C e 150 rpm, condições nas quais era atingido o equilíbrio de adsorção enzimática nos sistemas em questão (sem hidrólise significativa do substrato), conforme previamente estudado por Machado (2018). Esse estágio foi concluído por uma operação de filtração, onde parte da fase líquida foi descartada com o intuito de concentrar o sistema.

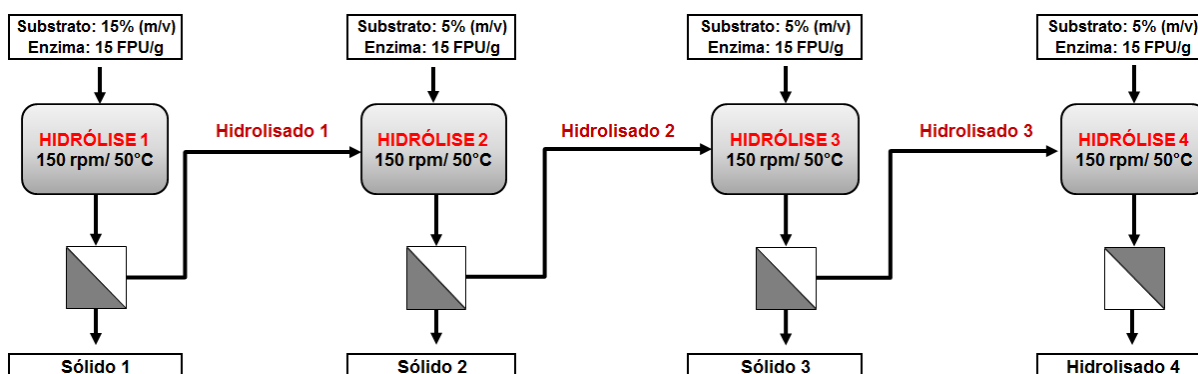
A hidrólise enzimática teve início na segunda etapa. A biomassa concentrada no estágio anterior recebeu a adição de 3 FPU de celulase / g de sólidos, de forma a recuperar a carga enzimática perdida no filtrado. A carga de sólidos inicial para a hidrólise nos ensaios com BH foi de 16,86 % (m/v) e de 18,92 % (m/v) para os ensaios com BAD. A incubação foi realizada a 50 °C e 150 rpm por um período de tempo pré-determinado (foram testados intervalos de 12 h e 24 h). Em seguida, os sistemas foram filtrados para remover parte do hidrolisado.

Os substratos concentrados e pré-hidrolisados passaram então para o último estágio do processo. O procedimento dessa etapa é similar ao da anterior. Foram acrescentados 3 FPU de celulase / g de sólidos e os sistemas foram submetidos a uma nova fase de hidrólise. As condições de incubação foram as mesmas, porém o tempo de reação foi de 48 h. O teor de glicose alcançado ao longo do processo foi medido via HPLC. Os valores determinados encontram-se no Anexo III.

3.1.3.4 Hidrólise enzimática com reciclo de hidrolisado

A estratégia de hidrólise com reciclo de hidrolisado foi organizada em quatro etapas, conforme exposto na Figura 3.3.

Figura 3.3. Estratégia de hidrólise enzimática com reciclo de hidrolisado para sistemas utilizando BH ou BAD como substrato. Acervo pessoal.



O tempo total do processo variou, sendo considerados períodos de 48, 96 e 192 h. Em todos os casos, cada reação de hidrólise possuía a mesma duração (12, 24 ou 48 h).

Conforme exposto na Figura 3.3, a primeira reação de hidrólise foi executada num sistema com carga de 15% (m/v) de sólidos. Novamente, tampão citrato 0,05 M (pH 4,8) com azida sódica foi empregado e a carga de celulase foi de 15 FPU / g de substrato. O meio reacional foi mantido a 50 °C e 150 rpm. Após o período de incubação (12, 24 ou 48 h), foi efetuada uma operação de filtração, visando separar o hidrolisado (a ser utilizado na fase seguinte) do resíduo sólido.

As demais etapas de hidrólise enzimática foram realizadas com uma concentração inicial de sólidos de 5% (m/v). Em todos os casos, o hidrolisado obtido na etapa anterior serviu como agente de diluição do substrato. Além disso, novas cargas de *Cellic CTec2* eram adicionadas na concentração de 15 FPU de celulase / g de substrato. A incubação dos sistemas foi idêntica à realizada na primeira hidrólise e uma nova etapa de filtração era feita ao término de cada reação.

Cromatografia líquida de alta eficiência foi utilizada para determinar o teor de glicose ao longo do processo. Os valores medidos encontram-se no Anexo IV.

3.1.4 Ensaios de adsorção enzimática

Conforme mencionado na Subseção 2.6.1.4, um fator às vezes incorporado a modelos de hidrólise enzimática de biomassa para considerar explicitamente o efeito sólido é a redução da carga enzimática adsorvida em função da concentração de sólidos do sistema. Contudo, não existe um consenso entre os resultados experimentais presentes na literatura que permita afirmar que tal fenômeno realmente ocorra de forma significativa.

Dessa forma, no presente projeto foram realizados ensaios de adsorção enzimática com o intuito de avaliar o efeito do aumento da carga inicial de sólidos sobre a concentração de equilíbrio de enzimas adsorvidas no sistema. Além disso, os ensaios foram feitos para fornecer os valores de concentração de enzima adsorvida (E_{ADS}) e de enzima livre (E_{LIVRE}), necessários para o desenvolvimento de alguns dos modelos estudados neste trabalho (Modelos #1 e #2).

Esses experimentos foram realizados utilizando como substrato o bagaço deslignificado (BAD), visto que os resultados dos ensaios de hidrólise desse material mostraram uma diminuição da conversão final do processo conforme aumentava a concentração inicial de sólidos no sistema (vide dados do Anexo I). O complexo enzimático empregado foi o mesmo utilizado nos ensaios de hidrólise (*Cellic CTec2*).

Os ensaios foram preparados em triplicatas para cada uma das diferentes cargas iniciais de sólidos (5, 10, 15, 20 e 25 % m/v). Em cada caso, a massa de bagaço a ser utilizada foi determinada em balança analítica (BEL ENGINEERING – M124Ai, Piracicaba, SP, Brasil). O material foi transferido para Erlenmeyers de 125 mL, onde foram adicionados o tampão (citrato de sódio 50 mM, pH 4,8) e o coquetel enzimático (*Cellic CTec2*, 15 FPU / g de substrato).

Os Erlenmeyers foram incubados em *shaker* (MARCONI – MA832, Piracicaba, SP, Brasil) por 8 h (tempo suficiente para atingir o equilíbrio de adsorção para todas as concentrações avaliadas), a 25 °C e com agitação de 150 rpm.

Após a incubação foram coletadas amostras da fase líquida presente no sistema. Em alguns casos (20 e 25 % de sólidos), não existia sobrenadante, sendo necessário centrifugar o material para obter as amostras. A centrifugação foi

realizada em centrífuga de bancada (Nova Técnica - NT 810, NEW QUÍMICA, Belo Horizonte, MG, Brasil) por 2 minutos a 3000 rpm.

Por fim, a determinação da concentração de enzima livre foi realizada através da quantificação de proteína nas amostras coletadas. O método de Bradford (BRADFORD, 1976) foi empregado nessa etapa. A carga de enzima adsorvida foi calculada como a diferença entre a concentração total de enzima adicionada e o valor de proteína livre determinado.

A Tabela 3.2 apresenta os resultados em termos das concentrações de enzima livre (E_{LIVRE}) e adsorvida (E_{ADS}). As cargas de enzima adsorvida (em mg/g de bagaço) e as respectivas frações do complexo enzimático que sofreram adsorção também são indicadas.

Tabela 3.2. Dados de adsorção enzimática ^a.

Sólidos, % (m/v)	E_{LIVRE} (g/L)	E_{ADS} (g/L)	Enzima adsorvida (mg/g)	Fração adsorvida (%)
5	0,110 ± 0,007	0,387 ± 0,007	7,744 ± 0,147	77,93
10	0,199 ± 0,013	0,795 ± 0,013	7,946 ± 0,133	79,96
15	0,281 ± 0,082	1,210 ± 0,082	8,064 ± 0,548	81,14
20	0,547 ± 0,039	1,441 ± 0,039	7,204 ± 0,197	72,50
25	0,694 ± 0,051	1,790 ± 0,051	7,161 ± 0,206	72,06

^a Os dados apresentados foram gerados a partir de ensaios usando BAD, contudo eles também foram aplicados nos modelos desenvolvidos para sistemas trabalhando com BH. Essa extrapolação foi feita com base nos resultados de cinética de adsorção realizados por Machado (2018), onde foi verificado que, apesar de apresentarem cinéticas de adsorção distintas, os sistemas utilizando BH e BAD atingem valores de E_{ADS} similares no equilíbrio.

A análise da Tabela 3.2 mostra que a fração do complexo enzimático que foi adsorvida variou entre 72,06% e 81,14%. Entretanto, a fim de verificar se houve um decréscimo significativo na concentração de enzima adsorvida com o aumento da carga de sólidos, os dados gerados foram submetidos ao Teste de Tukey. A Figura 3.4 expõe essa análise.

Figura 3.4. Análise do conteúdo de enzima adsorvida usando o teste da Diferença Mínima Significativa de Tukey com nível de significância de 0,05 (95% de confiança). DMS = 0,779.

	5% (m/v)	10% (m/v)	15% (m/v)	20% (m/v)	25% (m/v)
5% (m/v)		-0,201	-0,319	0,540	0,584
10% (m/v)	0,201		-0,118	0,741	0,785
15% (m/v)	0,319	0,118		0,859	0,903
20% (m/v)	-0,540	-0,741	-0,859		0,044
25% (m/v)	-0,584	-0,785	-0,903	-0,044	

A análise da Figura 3.4 evidencia que a concentração de enzima adsorvida durante os ensaios com carga inicial de sólidos de 5% (m/v) não diferiu significativamente das demais, com nível de significância de 0,05 (95% de confiança). Portanto, foi possível concluir que a carga de sólidos não tem um efeito significativo na fração de enzimas adsorvidas. Assim, a adsorção enzimática parece não ser um fator relevante para explicar a diminuição da conversão nos ensaios de hidrólise enzimática do BAD conforme aumenta a carga de sólidos.

Diante desses dados, os modelos desenvolvidos neste projeto não consideraram a diminuição na fração de enzimas adsorvidas para descrever o efeito sólido.

3.2 Modelagem Matemática

3.2.1 Tratamento dos dados experimentais

Esta etapa foi realizada com o intuito de aumentar o número de pontos em cada conjunto de dados a serem utilizados nas fases de estimação e reestimação de parâmetros. Esse procedimento foi realizado empregando os resultados gerados por Machado (2018), constantes nos Anexos I-IV.

O tratamento foi efetuado ajustando curvas aos dados experimentais pertencentes a cada perfil de concentração de glicose ou de celobiose. Para tanto, foi empregada a técnica de *spline* cúbica, com o auxílio do programa OCTAVE v.4.2.1 (função *splinefit*).

3.2.2 Formulação dos modelos

Após a análise de diferentes abordagens presentes na literatura, foram propostas, inicialmente, quatro alternativas de modelos para a descrição da hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar nos sistemas em estudo. A intenção foi permitir a comparação dos diferentes modelos e a posterior seleção daquele que melhor descrevesse os dados experimentais.

Conforme mencionado na Seção 2.6, os modelos considerados são do tipo semi-mecanístico, uma vez que essa classe apresenta um grau de complexidade suficiente para atender aos objetivos estabelecidos para este projeto.

As duas primeiras alternativas consideradas (Modelos #1 e #2) são simplificações da modelagem descrita por Moreira Neto (2016), sendo desprezados os termos de diminuição da área superficial da celulose e a reação de conversão de xilana em xilose.

Os Modelos #3 e #4 têm como base a modelagem proposta por Tervasmäki *et al.* (2017). Entretanto, diferentes fatores associados à diminuição da taxa de reação foram considerados.

A Tabela 3.3 apresenta o equacionamento dos quatro modelos avaliados neste trabalho.

Tabela 3.3. Alternativas de modelos consideradas para a descrição dos dados de hidrólise enzimática.

Identificação	Equações de balanço ^a	Equações de taxa
Modelo #1	$\frac{dC}{dt} = -r_1 - r_3$	$r_1 = \frac{k_1 E_{ADS} C}{K_{M,1} \left[1 + \left(\frac{Cb}{K_{ICb,cl}} \right) + \left(\frac{G}{K_{IG,cl}} \right) \right] + C}$
	$\frac{dCb}{dt} = 1,056 r_1 - r_2$	$r_2 = \frac{k_2 E_{LIVRE} Cb}{K_{M,2} \left[1 + \left(\frac{G}{K_{IG,bg}} \right) \right] + Cb}$
	$\frac{dG}{dt} = 1,053 r_2 + 1,111 r_3$	$r_3 = \frac{k_3 E_{ADS} C}{K_{M,3} \left[1 + \left(\frac{Cb}{K_{ICb,cl}} \right) + \left(\frac{G}{K_{IG,cl}} \right) \right] + C}$

Tabela 3.3. (continuação)

Modelo #2	$\frac{dC}{dt} = -r_1$	$r_1 = \frac{k_1 E_{ADS} C}{K_{M,1} \left[1 + \left(\frac{Cb}{K_{ICb,cl}} \right) + \left(\frac{G}{K_{IG,cl}} \right) \right] + C}$
	$\frac{dCb}{dt} = 1,056 r_1 - r_2$	
	$\frac{dG}{dt} = 1,053 r_2$	$r_2 = \frac{k_2 E_{LIVRE} Cb}{K_{M,2} \left[1 + \left(\frac{G}{K_{IG,bg}} \right) \right] + Cb}$
Modelo #3	$\frac{dC}{dt} = -r$	$r = \frac{k E_{TOTAL} C R}{\left[1 + \left(\frac{G}{K_{IG}} \right) \right]}$
	$\frac{dG}{dt} = 1,111 r$	$R = C/C_0$
Modelo #4	$\frac{dC}{dt} = -r$	$r = \frac{k E_{TOTAL} C R}{K_M \left[1 + \left(\frac{G}{K_I^*} \right) \right] + C}$
	$\frac{dG}{dt} = 1,111 r$	$K_I^* = K_{IG} \left[1 - a \left(\frac{G^n}{C_{TOTAL}} \right) \right]; R = C/C_0$

^a Os coeficientes das equações foram determinados considerando a estequiometria.

Para a definição desses modelos foram adotadas as seguintes hipóteses:

1. O substrato é tido como uniforme, tanto em características estruturais (cristalinidade, porosidade, etc.) como em acessibilidade das enzimas à biomassa.
2. A fração de hemicelulose é desprezível, o que se deve à baixa porcentagem presente nos bagaços pré-tratados (vide Tabela 3.1).
3. A lignina presente é inerte.
4. O efeito da inativação enzimática de qualquer natureza (térmica, mecânica, etc.) é desprezado.
5. Nos modelos #3 e #4 assume-se que a conversão da celobiose em glicose não é uma etapa limitante no sistema em estudo, o que se justifica pelas baixas concentrações de celobiose observadas (quando comparadas às de glicose, vide Anexo I) e pela elevada

atividade de β -1,4-glicosidase inerente ao coquetel enzimático considerado (*Cellic CTec2*).

6. No modelo #2 faz-se a distinção entre a reação de quebra da celulose em celobiose (r_1) e a reação de conversão da celobiose em glicose (r_2).
7. No modelo #1 são consideradas as mesmas reações presentes no modelo #2 e é incluída a r_3 , que representa a conversão direta de celulose em glicose.
8. Nos modelos #1 e #2 o complexo enzimático é representado por duas concentrações enzimáticas, uma referente às celulases (sem distinção entre endoglicanases e celobiohidrolases) e outra às β -1-4-glicosidases.
9. Nos modelos #1 e #2 assume-se que apenas as celulases adsorvem no bagaço, por isso sua concentração é representada pela concentração de enzima adsorvida, E_{ADS} (vide ensaios de adsorção na Subseção 3.1.4).
10. Nos modelos #1 e #2 a concentração de β -1,4-glicosidase é representada pela concentração de enzima livre, E_{LIVRE} (vide Subseção 3.1.4).
11. Nos modelos #3 e #4 o coquetel enzimático é representado por uma concentração única, igual à concentração total de enzimas no sistema (não é feita a distinção entre os diferentes tipos de enzima presentes). Essa simplificação foi possível uma vez que esses modelos apresentam uma única taxa de reação.
12. Os sistemas estão sujeitos à inibição competitiva por produto. Glicose e celobiose são consideradas inibidores nas reações r_1 e r_3 . Já nas reações r_2 e r , apenas glicose é tida como inibidor.
13. Outros possíveis inibidores como xilose ou compostos originados pela degradação da biomassa foram desprezados em função do baixo teor presente nos sistemas.
14. Nos modelos #3 e #4, o termo de reatividade do substrato (R) é adicionado para descrever a diminuição da taxa de reação em

função do aumento da conversão, conforme sugerido por Kadam *et al.* (2004).

15. No modelo #4 o efeito sólido é incluído de forma explícita. Porém, optou-se por não associar o fenômeno à adsorção enzimática, visto que ensaios de adsorção não indicaram uma diminuição significativa da fração de enzimas adsorvidas com o aumento da carga de sólidos nos sistemas (vide Subseção 3.1.4). No caso, assume-se que o efeito sólido esteja relacionado ao aumento da severidade da inibição por produto. Assim, é proposta uma constante de inibição modificada (K_I^*), conforme a Equação 3.1:

$$K_I^* = K_{IG} \left[1 - a \left(\frac{G^n}{C_{TOTAL}} \right) \right] \quad (3.1)$$

Na qual K_I^* é a constante de inibição modificada (g/L), K_{IG} é a constante de inibição por glicose (g/L), G é a concentração de glicose (g/L), C_{TOTAL} é a quantidade total de celulose adicionada ao sistema (g/L), a é um parâmetro com a unidade $(g/L)^{(1-n)}$ e n é um índice adimensional.

3.2.3 Estimação dos parâmetros

A estimação dos parâmetros foi conduzida para cada um dos modelos considerados e para cada bagaço utilizado como substrato (BH e BAD). Ela foi realizada empregando os pontos obtidos pelo tratamento dos dados experimentais dos ensaios de hidrólise em batelada, considerando apenas os sistemas de reação a 5, 15 e 20% (m/v) de sólidos. Os dados de hidrólise em batelada gerados no sistema com concentração de bagaço de 10% (m/v) não foram utilizados nesta etapa para que os mesmos pudessem ser aplicados na fase de validação do modelo.

O algoritmo aplicado na estimação dos parâmetros (θ) de um dado modelo envolveu a minimização da função objetivo $Min_{(\theta)}$, dada pela Equação 3.2 para os Modelos #1 e #2 e pela Equação 3.3 para as demais abordagens:

$$Min_{(\theta)} = \sum_{i=1}^{ne} \sum_{j=1}^{np} \left[\left(\frac{Cb_{i,j}^* - Cb_{i,j}}{Cb_{i,j}} \right)^2 + \left(\frac{G_{i,j}^* - G_{i,j}}{G_{i,j}} \right)^2 \right] \quad (3.2)$$

$$Min_{(\theta)} = \sum_{i=1}^{ne} \sum_{j=1}^{np} \left[\left(\frac{G_{i,j}^* - G_{i,j}}{G_{i,j}} \right)^2 \right] \quad (3.3)$$

Nas Equações acima, $Cb_{i,j}^*$ e $G_{i,j}^*$ são, respectivamente, as concentrações de celobiose e glicose preditas pelo modelo a ser ajustado; np é o número total de pontos pertencentes a um dado perfil de hidrólise; ne é o número de ensaios em batelada (no caso, três: 5%, 15% e 20%) e $Cb_{i,j}$ e $G_{i,j}$ são os valores de concentração de celobiose e glicose gerados após o tratamento dos dados empíricos. O método de minimização empregado foi o da evolução diferencial, através da função *de_min* do programa OCTAVE v.4.2.1. Os principais aspectos do algoritmo dessa função estão resumidos na Tabela 3.4.

Tabela 3.4. Principais características do algoritmo de evolução diferencial empregado.

Característica	Valor
Argumento da Função	Função objetivo, $Min_{(\theta)}$
Dados de Saída	Vetor de parâmetros estimados (θ^*) Valor final da função objetivo, $Min_{(\theta^*)}$ Variáveis referentes à convergência
Variáveis de Controle	
Nº de indivíduos da população (NP)	$10 \times D$, D = número de parâmetros
Fator de diferença (F)	0,8
Constante de <i>crossover</i> (Cr)	0,9
Esquema de resolução	DEGL/SAW/bin
Valor a ser alcançado (VTR)	0
Tolerância (tol)	0,001
Nº máximo de iterações ($maxiter$)	500

3.2.4 Avaliação dos modelos e seleção

Nessa fase do projeto, os modelos propostos foram avaliados quanto à qualidade do ajuste e à capacidade de predição, de forma a selecionar aquele que

melhor descreve a cinética de hidrólise de cada um dos bagaços utilizados (BAD e BH). Para tanto, dois métodos foram empregados.

O primeiro foi uma inspeção visual dos perfis de hidrólise, i.e., uma comparação entre os valores de concentração de açúcares preditos pelos modelos e os dados empíricos obtidos ao longo das reações. Nessa avaliação, tanto os dados utilizados na estimação dos parâmetros (resultados de hidrólise em batelada com cargas iniciais de sólidos de 5, 15 e 20% m/v) como os dados reservados para a validação (resultados de hidrólise em batelada com carga inicial de 10% m/v de sólidos) foram utilizados.

O segundo método considerado foi o teste F modificado, conforme sugerido por Bonomi e Schmidell (2001). Esse teste fornece uma estimativa do mínimo erro experimental (ϵ) que seria necessário para garantir o ajuste de um modelo a um conjunto de dados experimentais. O cálculo de ϵ segue a Equação 3.4:

$$\epsilon = \sqrt{\frac{s^2 (N - 1)}{\sum_{i=1}^N (g_i)^2}} \quad (3.4)$$

Em que N é o número total de dados empíricos, g_i é o i -ésimo valor de concentração de glicose medido e s^2 é a estimativa da variância do erro do modelo, dada pela Equação 3.5:

$$s^2 = \frac{SQR}{N - m} \quad (3.5)$$

Na qual SQR é a soma dos quadrados dos resíduos e m é o número de parâmetros ajustados presentes no modelo.

É importante destacar que no teste F modificado foram utilizados apenas os dados relacionados à concentração de glicose (mesmo para os modelos que incluem explicitamente as reações envolvendo celobiose). Isso foi feito para facilitar a comparação direta entre os quatro modelos estudados.

Além da avaliação do ajuste dos modelos, foi realizada a determinação dos intervalos de confiança dos parâmetros, visando à verificação do grau de incerteza associado ao procedimento de estimação. Esses intervalos foram calculados considerando a abordagem de distribuição normal assintótica das

estimativas dos parâmetros. Para isso, recorreu-se a uma função análoga à *nlparci* (MATLAB), mas implementada no programa OCTAVE v.4.2.1.

3.3 Análise de Diferentes Estratégias de Hidrólise

3.3.1 Reestimação dos parâmetros significativos

Após a seleção da modelagem mais adequada para a representação das reações de hidrólise em batelada dos dois substratos (BH e BAD), os modelos foram adaptados para descreverem os demais sistemas em estudo (processos em batelada alimentada, em etapas e com reciclo de hidrolisado).

Para tanto, os códigos anteriormente implementados foram modificados para incluírem as mudanças de volume e concentração inerentes aos novos processos considerados. Então, os parâmetros dos modelos foram reestimados para cada nova estratégia, utilizando os pontos obtidos pelo tratamento dos dados experimentais dos ensaios dispostos nos Anexos II-IV.

A reestimação dos parâmetros também foi efetuada através de evolução diferencial (função *de_min* do OCTAVE v.4.2.1), seguindo o procedimento descrito na Subseção 3.2.3. Entretanto, parâmetros não significativos presentes nos modelos foram mantidos fixos nessa etapa.

É importante destacar que a definição dos parâmetros significativos foi realizada com base nos intervalos de confiança calculados: aqueles contendo o valor zero foram considerados não significativos. Além disso, a matriz de correlação (obtida através da função utilizada para calcular os intervalos de confiança) também foi empregada para ajudar na definição de quais parâmetros deveriam ser fixados na reestimação.

Finalmente, os modelos gerados via reestimação de parâmetros foram avaliados de forma análoga à descrita na Subseção 3.2.4.

3.3.2 Otimização de diferentes estratégias

A meta do processo de otimização foi determinar condições operacionais que maximizassem a concentração final de glicose do hidrolisado gerado em todas

as estratégias analisadas. A fim de alcançar tal objetivo efetuou-se a minimização do negativo do valor final de concentração de glicose determinado através de simulações baseadas na modelagem proposta para cada estratégia. Novamente, fez-se uso do método de evolução diferencial, através da função *de_min* do programa OCTAVE v.4.2.1 (as variáveis de controle empregadas foram as mesmas expostas na Tabela 3.4, com exceção do *VTR*, que foi definido como - Inf.).

O tipo de resposta gerado durante a etapa de otimização dependeu de quais as variáveis operacionais mais relevantes para cada estratégia estudada. No caso dos sistemas em batelada alimentada, por exemplo, a resposta era composta por três variáveis: a carga inicial de sólidos (S_0), o intervalo entre as alimentações (t_i) e a quantidade de substrato fresco alimentado (S_{alim}). O número de alimentações realizadas durante o processo (N_{alim}) foi mantido fixo ao longo da resolução do problema de minimização. Contudo, diferentes valores de N_{alim} foram testados.

Também foram impostas algumas restrições durante a otimização das estratégias de hidrólise. A primeira diz respeito ao tempo total de reação, que foi mantido igual ao tempo considerado nos ensaios experimentais, com intuito de facilitar a comparação dos resultados obtidos. A segunda restrição refere-se à carga máxima de sólidos momentânea dentro do sistema. Tal fator foi considerado devido à dificuldade para trabalhar com sistemas muito concentrados, especialmente com o BH. Assim, foram estabelecidos limites na concentração de sólidos a fim de garantir a viabilidade do processo (tanto no aspecto da eficiência da transferência de massa e calor, como no âmbito da redução dos custos associados ao sistema de agitação).

No caso da batelada alimentada, o limite imposto foi de 20% (m/v) de sólidos, lembrando que esse valor restringe apenas a concentração momentânea dentro do reator e não a carga acumulada ao longo do processo. Essa restrição está de acordo com a literatura: Hodge *et al.* (2009), por exemplo, consideraram um limite de 15% (m/m). Na hidrólise em etapas, a análise foi feita considerando três limites de cargas de sólidos: 20% (m/v); 25% (m/v), que foi a maior concentração atingida experimentalmente com o BH; e 30% (m/v) (apenas para o BAD).

CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Definição do Modelo Cinético

Conforme mencionado na Seção 3.2, quatro modelos foram considerados para a descrição da hidrólise enzimática dos substratos em estudo (BH e BAD). Nesta seção é feita a análise do desempenho de cada um desses modelos, além de ser definida qual a abordagem a ser utilizada para o desenvolvimento das demais etapas do presente projeto.

Os resultados de estimação de parâmetros dos Modelos #1 a #4 estão expostos nas Tabelas 4.1-4.4. Além dos valores dos parâmetros, são apresentados seus intervalos de confiança (com 95% de confiança) e as estimativas de erro mínimo experimental (resultados do teste F modificado).

Tabela 4.1. Parâmetros do Modelo #1 estimados com dados de hidrólise enzimática em batelada para os dois substratos (BH e BAD). Os valores de estimativa do erro (ϵ) e dos intervalos de confiança (IC, 95%) também estão indicados.

Parâmetros	Ensaio com BH		Ensaio com BAD	
	Valor	IC, 95%	Valor	IC, 95%
k_1 (h ⁻¹)	15,787	[-73,923 ; 105,50]	41,752	[41,752 ; 41,753]
$K_{M,1}$ (g/L)	197,57	[-1027,2 ; 1422,3]	13,644	[6,604 ; 20,686]
$K_{ICb,cl}$ (g/L)	7,251	[-325,48 ; 339,98]	0,175	[0,175 ; 0,175]
$K_{IG,cl}$ (g/L)	0,594	[-0,073 ; 1,261]	0,215	[0,134 ; 0,295]
k_2 (h ⁻¹)	24,292	[-35028 ; 35076]	75,359	[66,451 ; 84,267]
$K_{M,2}$ (g/L)	9,997	[-13945 ; 13965]	0,279	[-0,178 ; 0,736]
$K_{IG,bg}$ (g/L)	0,232	[-12,694 ; 13,158]	0,124	[-0,108 ; 0,355]
k_3 (h ⁻¹)	7,239	[4,161 ; 10,317]	37,748	[37,726 ; 37,769]
$K_{M,3}$ (g/L)	4,937	[-0,603 ; 10,478]	19,812	[15,130 ; 24,495]
Erro, ϵ (%)		19,1		23,3

Tabela 4.2. Parâmetros do Modelo #2 estimados com dados de hidrólise em batelada para os dois substratos. Os valores de ε e dos intervalos de confiança também estão indicados.

Parâmetros	Ensaio com BH		Ensaio com BAD	
	Valor	IC, 95%	Valor	IC, 95%
k_1 (h^{-1})	5,082	[3,638 ; 6,526]	8,830	[6,027 ; 11,634]
$K_{M,1}$ (g/L)	21,880	[6,086 ; 37,673]	19,672	[1,695 ; 37,649]
$K_{ICb,cl}$ (g/L)	1,394	[-0,838 ; 3,627]	2,111	[0,632 ; 3,590]
$K_{IG,cl}$ (g/L)	3,583	[1,186 ; 5,980]	3,739	[1,227 ; 6,251]
k_2 (h^{-1})	32,038	[-49,303 ; 113,38]	90,951	[79,762 ; 102,14]
$K_{M,2}$ (g/L)	0,288	[-1,350 ; 1,926]	0,246	[-0,074 ; 0,568]
$K_{IG,bg}$ (g/L)	0,176	[-0,505 ; 0,857]	0,168	[-0,036 ; 0,373]
Erro, ε (%)	25,8		25,9	

Tabela 4.3. Parâmetros do Modelo #3 estimados com dados de hidrólise em batelada para os dois substratos. Os valores de ε e dos intervalos de confiança também estão indicados.

Parâmetros	Ensaio com BH		Ensaio com BAD	
	Valor	IC, 95%	Valor	IC, 95%
k ($L g^{-1} h^{-1}$)	0,331	[0,321 ; 0,341]	0,527	[0,518 ; 0,536]
K_{IG} (g/L)	2,267	[2,205 ; 2,329]	4,314	[4,256 ; 4,371]
Erro, ε (%)	6,9		10,4	

Tabela 4.4. Parâmetros do Modelo #4 estimados com dados de hidrólise em batelada para os dois substratos. Os valores de ε e dos intervalos de confiança também estão indicados.

Parâmetros	Ensaio com BH		Ensaio com BAD	
	Valor	IC, 95%	Valor	IC, 95%
k (h^{-1})	4,367	[3,871 ; 4,863]	8,865	[8,545 ; 9,185]
K_M (g/L)	0,018	[-5,650 ; 5,687]	$7,159 \times 10^{-3}$	[-1,948 ; 1,963]
K_{IG} (g/L)	$8,300 \times 10^{-3}$	[-2,539 ; 2,556]	$5,191 \times 10^{-3}$	[-1,413 ; 1,423]
a (g/L) ⁽¹⁻ⁿ⁾	0,100	[-0,112 ; 0,312]	$2,880 \times 10^{-5}$	$[-5,994 \times 10^{-5}$ $1,175 \times 10^{-4}]$
n	1,557	[1,082 ; 2,032]	3,269	[2,610 ; 3,929]
Erro, ε (%)	7,2		4,7	

É importante destacar que uma comparação direta entre os parâmetros apresentados nas Tabelas 4.1-4.4 e aqueles existentes em modelos presentes na literatura é pouco aconselhável, uma vez que diferentes hipóteses podem ter sido consideradas durante a modelagem. Ademais, os sistemas em estudo podem diferir significativamente dependendo das condições empregadas (e.g.: substratos, coquetéis enzimáticos, etc.). Entretanto, é possível afirmar que as ordens de grandeza dos resultados são coerentes com o observado em diversos trabalhos (KADAM *et al.*, 2004; ANGARITA *et al.*, 2015; SCOTT *et al.*, 2015; MOREIRA NETO, 2016; TERVASMÄKI *et al.*, 2017).

Uma análise mais expressiva dos resultados pode ser feita considerando os intervalos de confiança dos parâmetros, já que eles servem como um indicativo da incerteza associada ao processo de estimação e auxiliam na identificação dos parâmetros significativos dos modelos.

No Modelo #1 (Tabela 4.1), observa-se um grande número de parâmetros com intervalos de confiança que incluem o valor zero, especialmente nos resultados obtidos com dados do bagaço submetido ao tratamento hidrotérmico. Além disso, mesmo nos resultados gerados a partir do outro substrato, existem parâmetros com intervalos de confiança de grande amplitude, como ocorre com a constante de saturação $K_{M,1}$ (amplitude superior a 50% do valor do parâmetro). Essas observações evidenciam a existência de um alto grau de incerteza na estimação dos parâmetros, o que pode ser fruto de diversos fatores. Algumas das causas mais comuns são apontadas por Scott *et al.* (2015), incluindo o uso de um número insuficiente de dados e a existência de alta correlação entre os parâmetros. No primeiro caso, a modelagem avaliada é pouco sensível à variação de alguns dos parâmetros considerando a região e/ou a acurácia da coleta dos dados empíricos, resultando na incerteza durante a etapa de estimação. Já quando há grande correlação entre os parâmetros, a incerteza decorre da existência de mais de um conjunto de valores capaz de minimizar o somatório dos resíduos (função objetivo da etapa de estimação), visto que o efeito da alteração de um parâmetro pode ser compensado pela modificação de outro. No contexto dos modelos considerados no presente trabalho, é provável que o último fenômeno seja mais relevante, uma vez que termos como as constantes de saturação e de inibição apresentam forte correlação entre si.

Uma avaliação similar pode ser feita para o Modelo #2 (Tabela 4.2). Embora o número de parâmetros com intervalos de confiança que incluam o valor zero seja menor que o verificado nos resultados do Modelo #1, a amplitude de diversos intervalos de confiança é muito elevada (chegando a mais de 70% do valor do parâmetro para as constantes de saturação $K_{M,1}$). Dessa forma, os resultados da estimação de parâmetros desse modelo também estão sujeitos a um elevado grau de incerteza.

Uma melhora significativa é verificada nos resultados do Modelo #3 (Tabela 4.3), tanto aqueles gerados a partir de dados de hidrólise de BH como aqueles gerados a partir de BAD. Os intervalos de confiança determinados, além de mais estreitos, apresentam amplitude máxima de cerca de 3,0% sobre o valor do parâmetro, o que indica um processo de estimação de parâmetros satisfatório. Além disso, esses intervalos de confiança indicam que os dois parâmetros do modelo (k e K_G) são significativos (com nível de significância de 0,05).

No caso do Modelo #4 (Tabela 4.4), voltam a aparecer intervalos de confiança contendo o valor zero, ainda que os demais apresentem amplitudes aceitáveis (máximo de 30,5% sobre o valor do parâmetro). Novamente, a incerteza associada à etapa de estimação pode ser explicada pela presença de parâmetros correlacionados.

Ainda analisando as Tabelas 4.1-4.4, é possível avaliar a qualidade do ajuste dos modelos aos dados experimentais através dos valores das estimativas do mínimo erro experimental (ϵ). Esses resultados revelam que o Modelo #4 é aquele com melhor desempenho geral, apresentando, no máximo, $\epsilon = 7,2\%$. Esse valor de ϵ indica que para o Modelo #4 fornecer um ajuste adequado é necessário que os dados empíricos apresentem um erro experimental superior a 7,2%, que é um valor em conformidade com o encontrado em processos de hidrólise de biomassa, especialmente em condições de baixa reprodutibilidade (como ocorre em sistemas operando com altas cargas de sólidos). Por outro lado, os valores de ϵ expostos nas Tabelas 4.1 e 4.2 sugerem que os Modelos #1 e #2 apresentam uma capacidade muito limitada de descrição dos dados experimentais, sendo pouco adequados para a representação dos sistemas em estudo (pelo menos considerando os valores atualmente estimados para os parâmetros).

Outra forma de verificar a capacidade de ajuste dos modelos é através da inspeção visual dos perfis de hidrólise. As Figuras 4.1-4.4 apresentam o comparativo entre os dados experimentais obtidos a partir de BH e BAD e os perfis de concentração de glicose em função do tempo de hidrólise preditos pelos Modelos #1 a #4. Os perfis de concentração de celobiose obtidos com os Modelos #1 e #2 encontram-se dispostos no Apêndice A.

Figura 4.1. Perfis de concentração de glicose em função do tempo segundo o Modelo #1 para a hidrólise de: (a) BH; (b) BAD. Cargas de sólidos usadas no ajuste: 5, 15 e 20% (m/v). Validação: 10% (m/v).

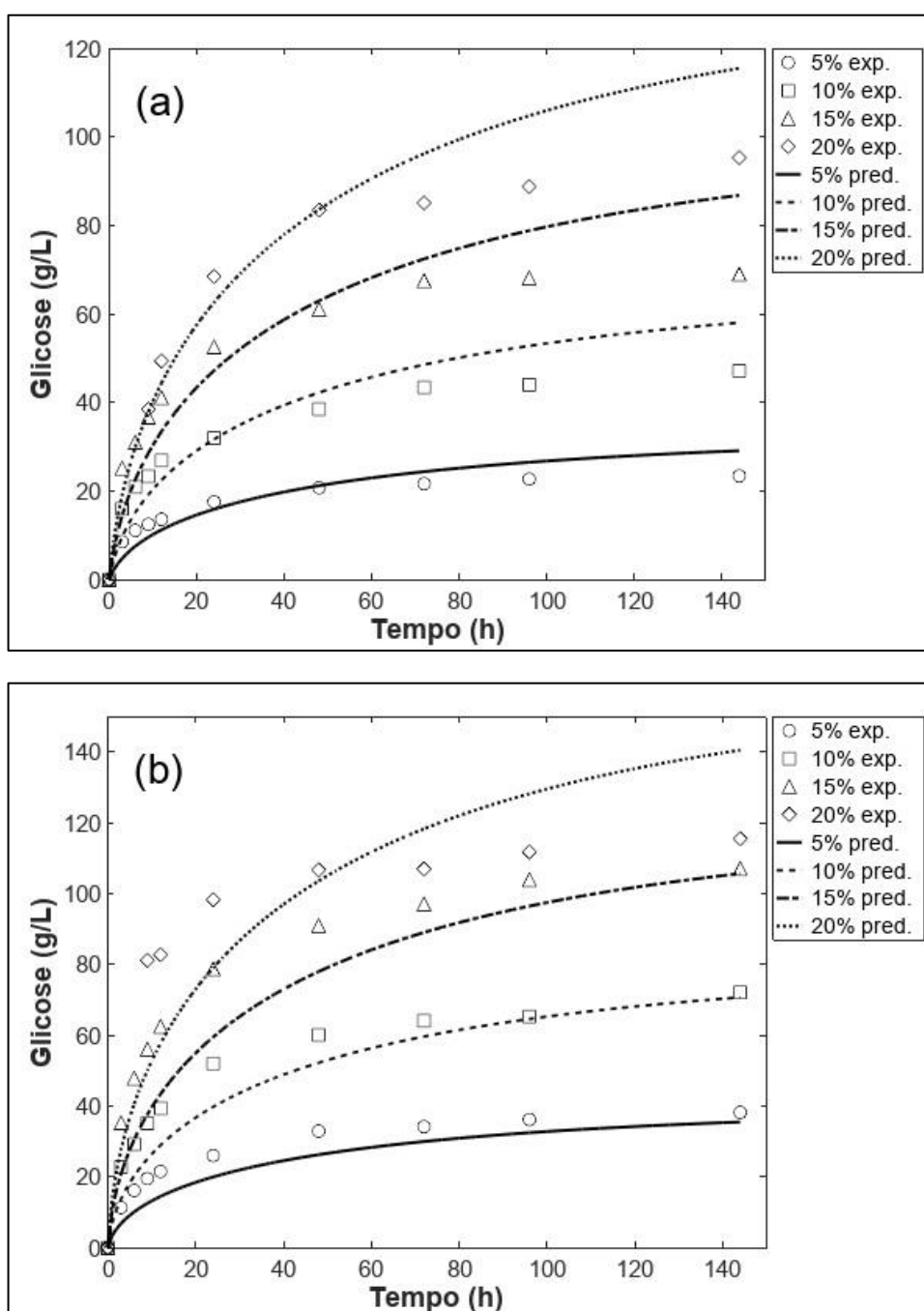


Figura 4.2. Perfis de concentração de glicose em função do tempo segundo o Modelo #2 para a hidrólise de: (a) BH; (b) BAD. Cargas de sólidos usadas no ajuste: 5, 15 e 20% (m/v). Validação: 10% (m/v).

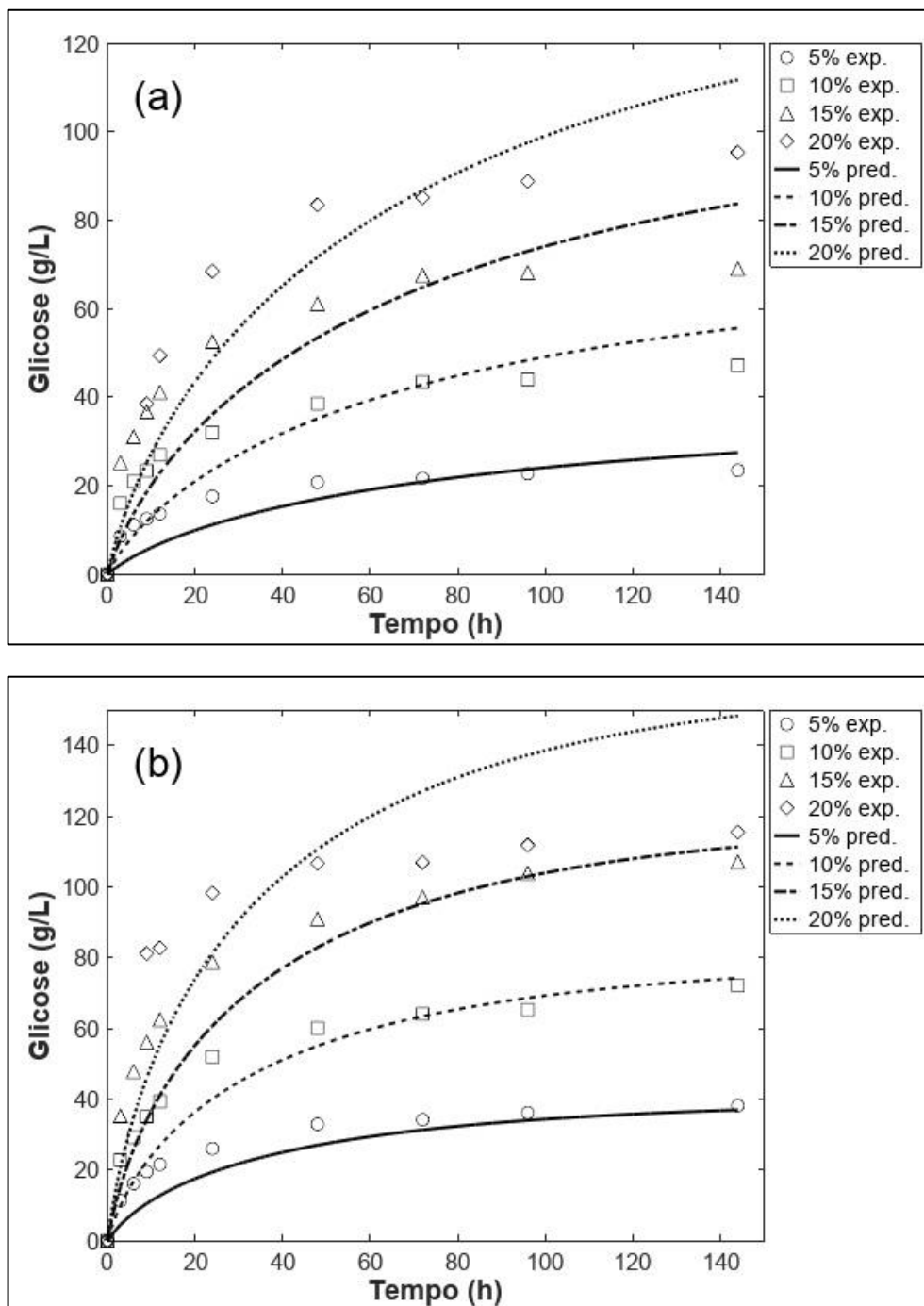


Figura 4.3. Perfis de concentração de glicose em função do tempo segundo o Modelo #3 para a hidrólise de: (a) BH; (b) BAD. Cargas de sólidos usadas no ajuste: 5, 15 e 20% (m/v). Validação: 10% (m/v).

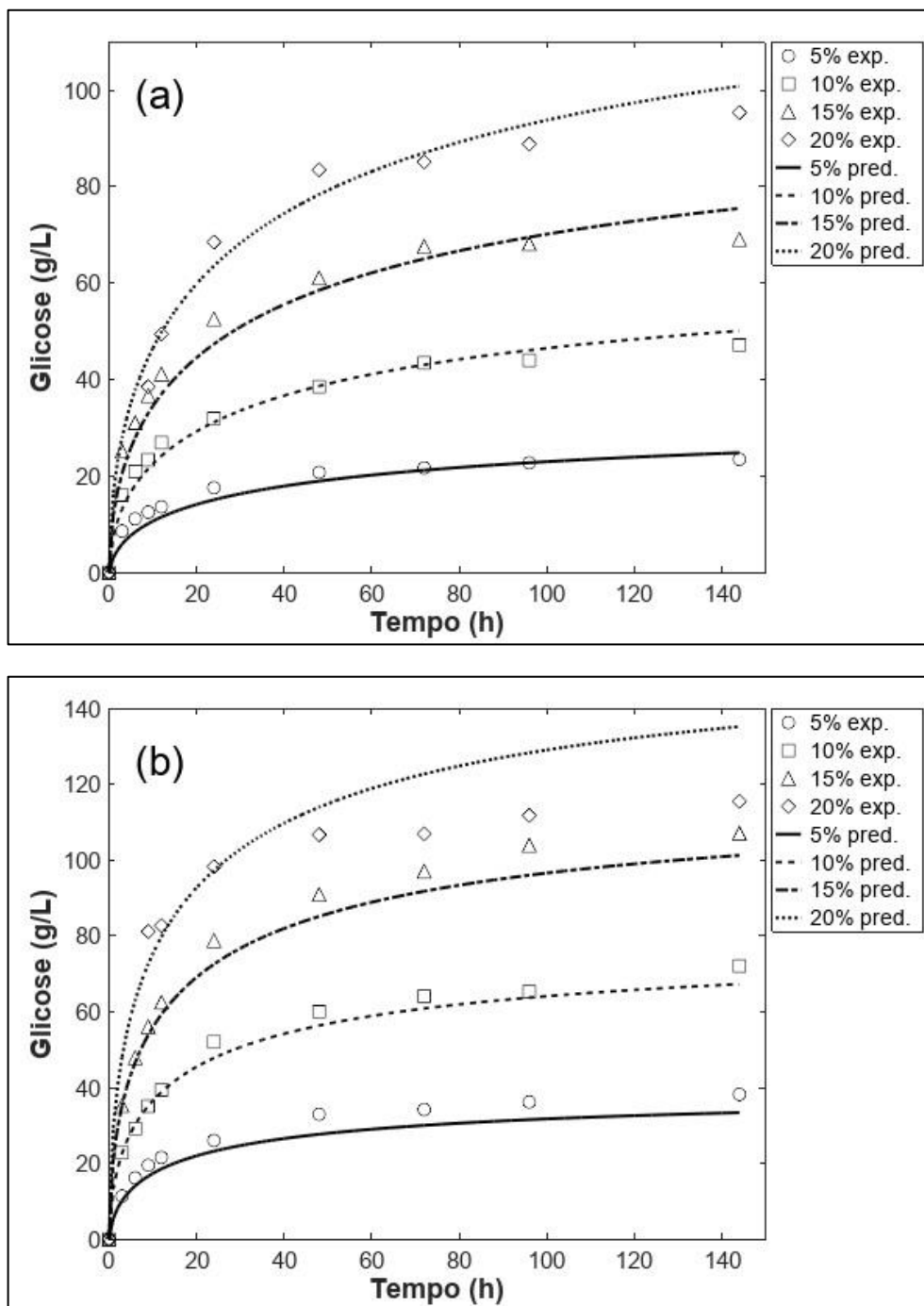
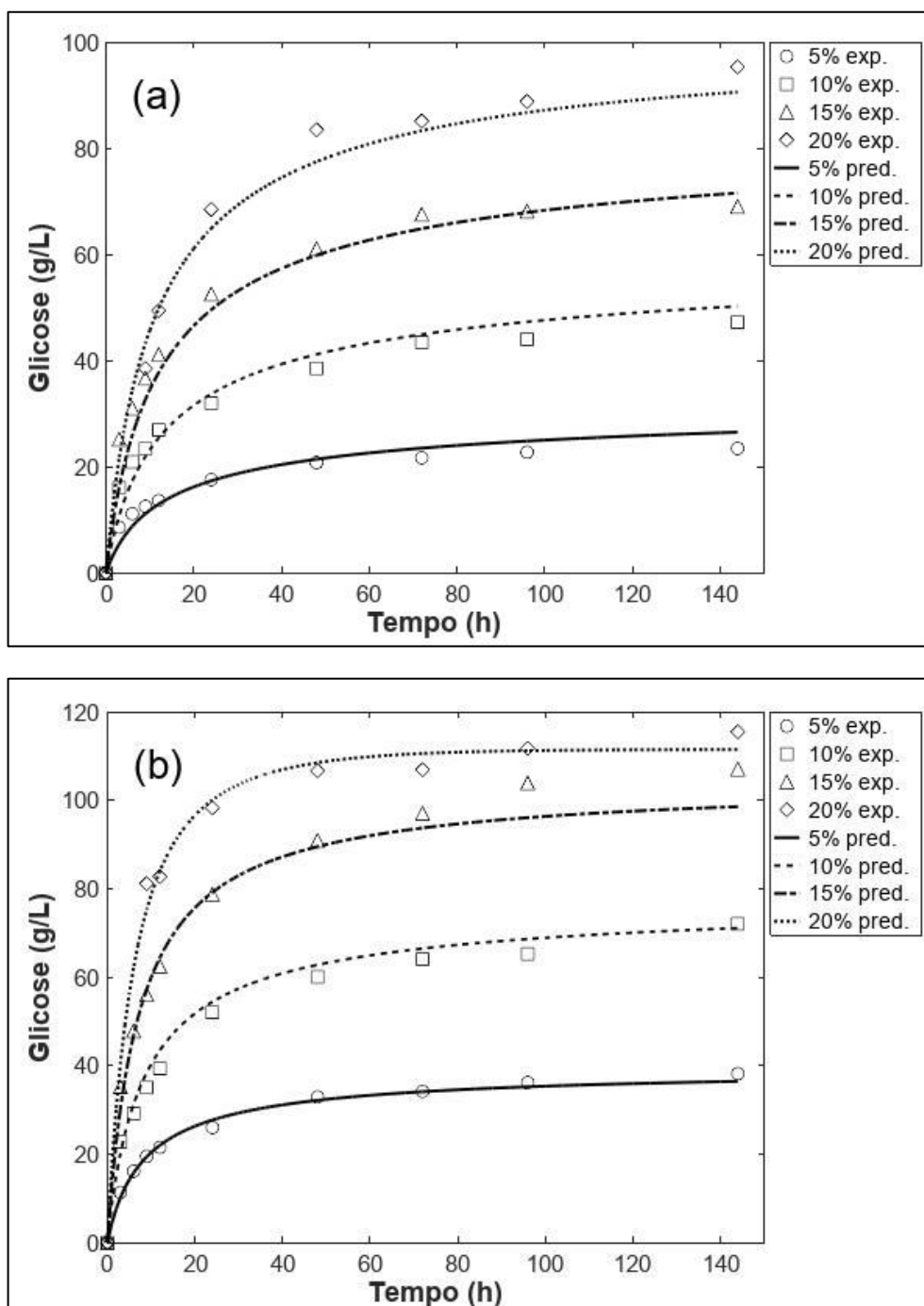


Figura 4.4. Perfis de concentração de glicose em função do tempo segundo o Modelo #4 para a hidrólise de: (a) BH; (b) BAD. Cargas de sólidos usadas no ajuste: 5, 15 e 20% (m/v). Validação: 10% (m/v).



A análise das Figuras 4.1 e 4.2 reforça os resultados apresentados nas Tabelas 4.1 e 4.2, evidenciando a inadequação dos Modelos #1 e #2 para a descrição da hidrólise dos substratos em estudo. Os perfis de concentração de glicose preditos por esses modelos sugerem taxas iniciais de formação de glicose

menores que as observadas experimentalmente. Ademais, a redução na taxa de reação em função do aumento da conversão é menos abrupta do que a verificada através dos dados experimentais. Portanto, os dois modelos foram desconsiderados nas etapas seguintes do trabalho.

Contudo, é importante mencionar que o desempenho pouco satisfatório dos Modelos #1 e #2 pode estar relacionado aos valores estimados para os parâmetros e não à modelagem em si. Uma possível solução seria tentar reduzir a incerteza na etapa de estimação e gerar novas respostas para os valores dos parâmetros. Isso poderia ser realizado coletando novos dados experimentais, em especial novos valores de concentração de celobiose (tendo em vista o elevado erro experimental inerente à quantificação desse açúcar). Outra opção seria definir os valores de alguns dos parâmetros com base em informações da literatura, de forma a permitir a realização da etapa de estimação considerando um subconjunto de parâmetros que apresentem menor correlação entre si.

Continuando a avaliação dos perfis de hidrólise, nota-se que as Figuras 4.3 e 4.4 indicam que os Modelos #3 e #4 possuem boa capacidade de descrição dos dados empíricos, concordando com os resultados expostos nas Tabelas 4.3 e 4.4. Entretanto, o Modelo #3 não é capaz de representar a diminuição abrupta de conversão observada na hidrólise de BAD conforme a carga de sólidos é aumentada de 15% para 20% (m/v). O Modelo #4, por sua vez, consegue capturar esse fenômeno com acurácia aceitável (vide Figura 4.4 b).

Assim, apesar do Modelo #4 apresentar problemas de identificabilidade de parâmetros (situação inferida a partir dos intervalos de confiança dispostos na Tabela 4.4), ele foi escolhido como base para as demais etapas do presente projeto.

4.2 Reestimação de Parâmetros

Após a escolha do Modelo #4, teve início a fase de reestimação de seus parâmetros, visando à adequação da modelagem para a descrição das diferentes estratégias de hidrólise (em batelada alimentada, em etapas e com reciclo de hidrolisado).

Conforme exposto na Subseção 3.3.1, alguns parâmetros do modelo selecionado foram mantidos fixos durante o processo de reestimação. No caso, optou-se por fixar os valores da constante de saturação (K_M) e do parâmetro a . A justificativa para tal escolha está nos intervalos de confiança desses parâmetros, que incluem o valor zero (vide Tabela 4.4). As matrizes de correlação apresentadas na Figura 4.5 também auxiliaram na decisão.

Figura 4.5. Matrizes de correlação entre os parâmetros do Modelo #4 para cada substrato: (a) BH; (b) BAD. Valores destacados indicam alta correlação entre os parâmetros.

(a)	k	K_M	K_{IG}	a	n
k	1,000				
K_M	0,535	1,000			
K_{IG}	0,534	1,000	1,000		
a	-0,448	-0,062	-0,061	1,000	
n	0,442	0,083	0,082	-0,998	1,000
(b)	k	K_M	K_{IG}	a	n
k	1,000				
K_M	0,523	1,000			
K_{IG}	0,522	1,000	1,000		
a	-0,066	0,436	0,436	1,000	
n	0,066	-0,433	-0,434	-1,000	1,000

Os pares de parâmetros destacados na Figura 4.5 apresentam grande correlação entre si. Assim, fixar um dos componentes de cada par foi uma tentativa de diminuir o grau de incerteza das subseqüentes etapas de reestimação.

4.2.1 Sistema em batelada alimentada

A Tabela 4.5 mostra os parâmetros do Modelo #4 reestimados para cada substrato (BH e BAD) usando os dados da estratégia de hidrólise em batelada alimentada. Além disso, são apresentados os intervalos de confiança dos novos parâmetros (com nível de significância de 0,05) e as estimativas do erro mínimo (resultados do teste F).

Tabela 4.5. Parâmetros reestimados para a estratégia de hidrólise em batelada alimentada. Os valores de estimativa do erro (ϵ) e dos intervalos de confiança (IC, 95%) também estão indicados. Parâmetros marcados com (f) foram mantidos fixos durante a reestimação.

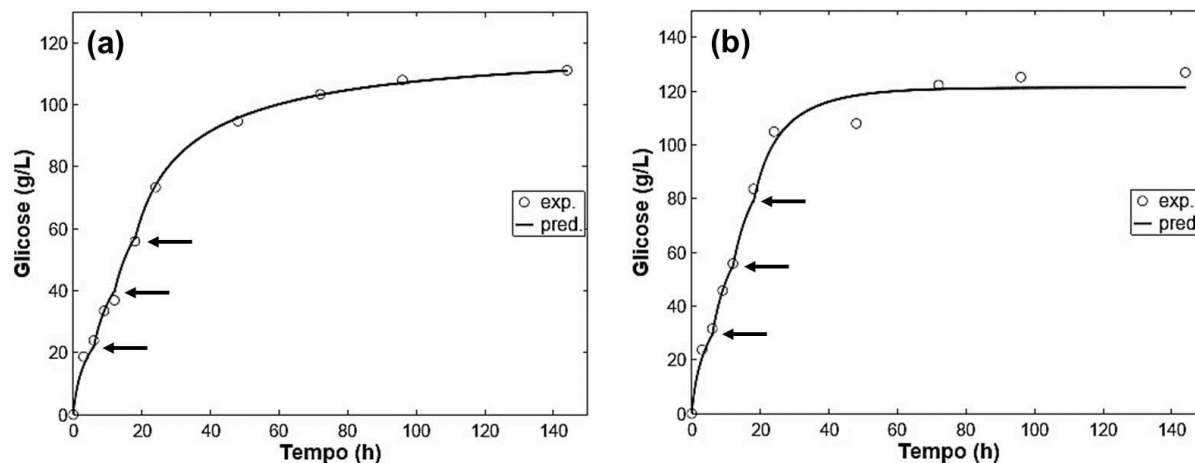
Parâmetros	Ensaio com BH		Ensaio com BAD	
	Valor	IC, 95%	Valor	IC, 95%
k (h^{-1})	12,245	[10,784 ; 13,706]	14,414	[12,746 ; 16,082]
K_M (g/L)	0,018 (f)	-	$7,159 \times 10^{-3}$ (f)	-
K_{IG} (g/L)	$2,565 \times 10^{-3}$	$[2,110 \times 10^{-3}$ $3,021 \times 10^{-3}]$	$1,383 \times 10^{-3}$	$[1,126 \times 10^{-3}$ $1,641 \times 10^{-3}]$
a (g/L) ⁽¹⁻ⁿ⁾	0,100 (f)	-	$2,880 \times 10^{-5}$ (f)	-
n	1,538	[1,528 ; 1,549]	3,252	[3,241 ; 3,264]
Erro, ϵ (%)	2,6		6,6	

Verificando os resultados da Tabela 4.5, é possível perceber uma diminuição na incerteza associada à determinação dos parâmetros, o que é evidenciado pelos intervalos de confiança mais estreitos do que os observados para o Modelo #4 na Seção 4.1 (Tabela 4.4). O parâmetro n , por exemplo, apresentou intervalos de confiança com amplitudes inferiores a 1% do seu valor (tanto para o sistema de hidrólise de BH como para o de hidrólise de BAD). Ainda assim, existe margem para melhora do processo de reestimação, uma vez que a constante de inibição (K_{IG}) apresentou intervalos de confiança com amplitudes de cerca de 18% sobre o valor do parâmetro.

No que diz respeito à capacidade de descrição dos dados empíricos, os valores das estimativas do mínimo erro experimental (ϵ) revelam um desempenho satisfatório da modelagem proposta. O máximo valor de ϵ observado (6,6%) é inferior ao obtido para os sistemas em batelada (7,2%) e, por consequência, também está em conformidade com os resultados de erro experimental encontrados em processos de hidrólise de biomassa.

Por fim, a inspeção visual dos perfis de hidrólise em batelada alimentada pode ser feita através da Figura 4.6. Os gráficos construídos mostram o comparativo entre os dados experimentais e os perfis de concentração de glicose em função do tempo de hidrólise preditos pelo Modelo #4 após a reestimação.

Figura 4.6. Perfis de concentração de glicose em função do tempo segundo a modelagem proposta para a hidrólise em batelada alimentada de: (a) BH; (b) BAD. As setas indicam os momentos em que material fresco foi alimentado ao sistema.



A análise dos perfis de hidrólise comprova que a modelagem considerada fornece um ajuste satisfatório dos dados empíricos (para a descrição de sistemas usando tanto BH como BAD), concordando com os resultados da Tabela 4.5.

4.2.2 Sistema em etapas

Os parâmetros do Modelo #4 reestimados para cada substrato (BH e BAD) usando os dados do sistema de hidrólise em etapas estão expostos na Tabela 4.6. As estimativas do erro mínimo e os intervalos de confiança dos novos parâmetros (com confiança de 95%) também são apresentados.

Tabela 4.6. Parâmetros reestimados para a estratégia de hidrólise em etapas. Os valores de estimativa do erro (ε) e dos intervalos de confiança (IC, 95%) também estão indicados. Parâmetros marcados com (f) foram mantidos fixos durante a reestimação.

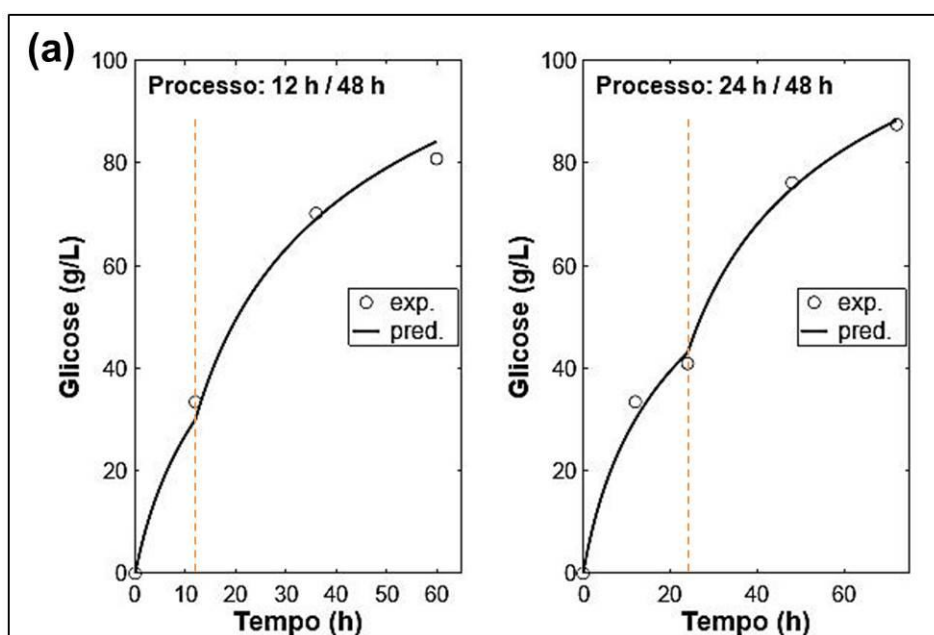
Parâmetros	Ensaio com BH		Ensaio com BAD	
	Valor	IC, 95%	Valor	IC, 95%
k (h^{-1})	2,622	[2,404 ; 2,840]	5,449	[4,482 ; 6,416]
K_M (g/L)	0,018 (f)	-	$7,159 \times 10^{-3}$ (f)	-
K_{IG} (g/L)	$5,330 \times 10^{-3}$	$[4,225 \times 10^{-3}$ $6,436 \times 10^{-3}]$	$1,264 \times 10^{-3}$	$[0,887 \times 10^{-3}$ $1,641 \times 10^{-3}]$
a (g/L) ⁽¹⁻ⁿ⁾	0,100 (f)	-	$2,880 \times 10^{-5}$ (f)	-
n	1,310	[1,207 ; 1,412]	2,801	[2,514 ; 3,088]
Erro, ε (%)	5,4		8,2	

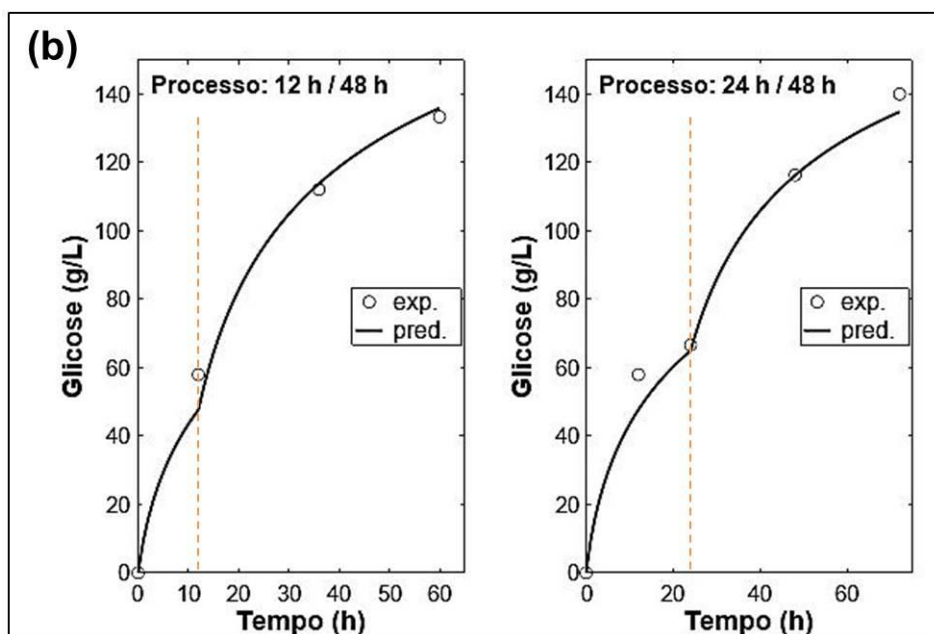
Os resultados presentes na Tabela 4.6 sugerem novamente uma redução na incerteza associada ao processo de determinação dos parâmetros, o que pode ser atribuído principalmente ao procedimento de manter fixos os parâmetros K_M e a no momento da reestimação. No entanto, é importante ressaltar que, apesar de aceitáveis, as amplitudes dos intervalos de confiança calculados ainda se mostram muito elevadas. O exemplo mais crítico ocorre com o parâmetro K_{IG} reestimado para a hidrólise do bagaço deslignificado, que apresentou intervalo de confiança com amplitude próxima a 30% de seu valor.

Quanto à qualidade do ajuste aos dados experimentais, a Tabela 4.6 expõe valores coerentes para as estimativas de erro ($\varepsilon = 5,4\%$ para o BH e $\varepsilon = 8,2\%$ para o BAD). Portanto, embora o máximo valor de ε tenha sido superior aos determinados para as estratégias de batelada e de batelada alimentada, pode-se afirmar que o teste F modificado indica um desempenho aceitável da modelagem proposta.

A avaliação dos perfis de hidrólise em etapas corrobora a capacidade de ajuste do modelo reestimado, como pode ser visto na Figura 4.7.

Figura 4.7. Perfis de concentração de glicose em função do tempo segundo a modelagem proposta para a hidrólise em etapas de: (a) BH; (b) BAD. As linhas tracejadas indicam o término de uma etapa e o início de outra.





4.2.3 Sistema com reciclo de hidrolisado

Os resultados de reestimação de parâmetros obtidos utilizando os dados da estratégia de reação com reciclo de hidrolisado para cada substrato (BH e BAD) estão expostos na Tabela 4.7. Ademais, são apresentados os intervalos de confiança dos novos parâmetros (com nível de significância de 0,05) e as estimativas do erro mínimo.

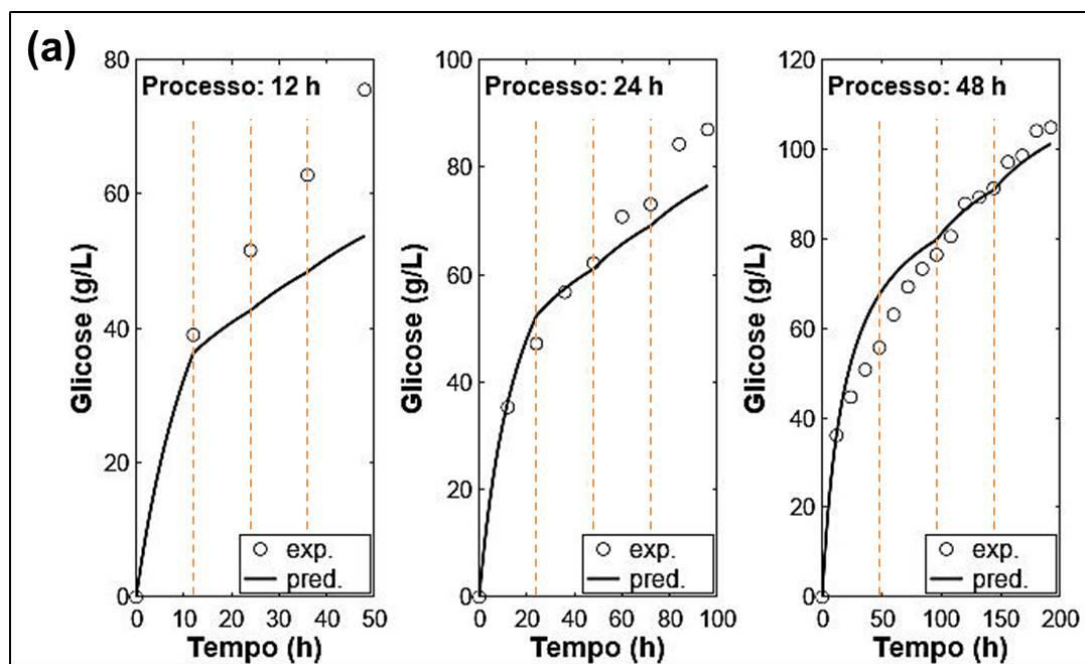
Tabela 4.7. Parâmetros reestimados para a estratégia com reciclo de hidrolisado. Os valores de estimativa do erro (ϵ) e dos intervalos de confiança (IC, 95%) também estão indicados. Parâmetros marcados com (f) foram mantidos fixos durante a reestimação.

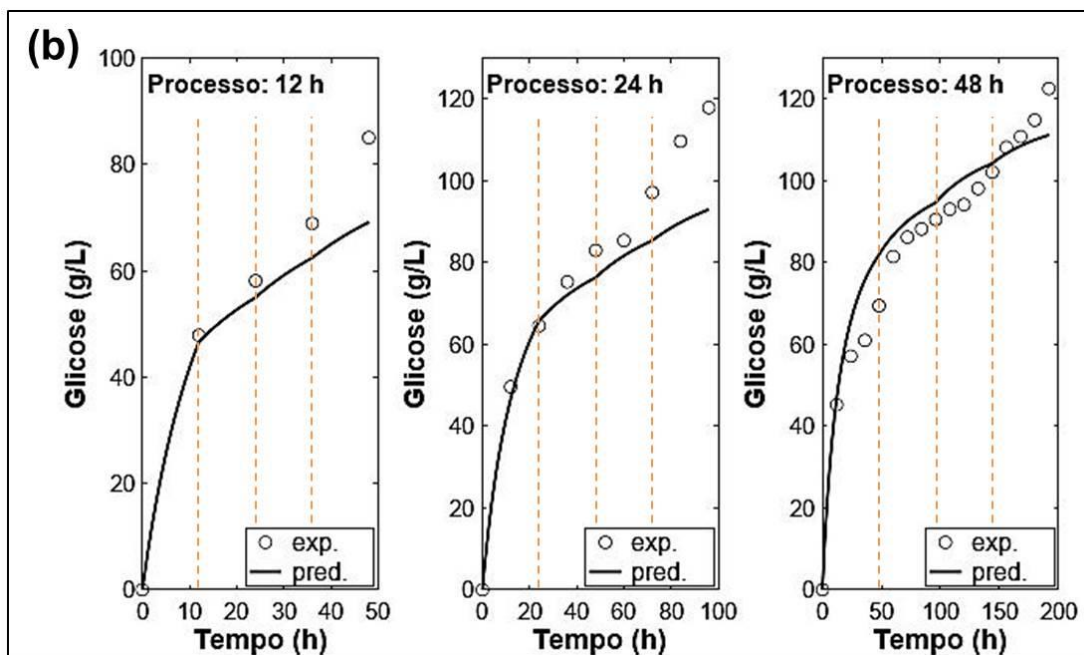
Parâmetros	Ensaio com BH		Ensaio com BAD	
	Valor	IC, 95%	Valor	IC, 95%
k (h^{-1})	3,031	[2,793 ; 3,268]	4,005	[3,773 ; 4,237]
K_M (g/L)	0,018 (f)	-	$7,159 \times 10^{-3}$ (f)	-
K_{IG} (g/L)	0,016	[0,010 ; 0,022]	$7,082 \times 10^{-3}$	$[5,741 \times 10^{-3}$ $8,422 \times 10^{-3}]$
a (g/L) ⁽¹⁻ⁿ⁾	0,100 (f)	-	$2,880 \times 10^{-5}$ (f)	-
n	1,207	[0,849 ; 1,565]	3,205	[3,161 ; 3,249]
Erro, ϵ (%)	11,0		11,2	

Analisando a Tabela 4.7 é possível verificar que, apesar de não estarem presentes intervalos de confiança compreendendo o valor zero, a grau de incerteza no processo de reestimação foi maior que o desejável, especialmente para os resultados referentes ao bagaço submetido ao pré-tratamento hidrotérmico. Nesse caso, grandes amplitudes foram observadas nos intervalos de confiança dos parâmetros K_{IG} e n (37,5 e 29,7% sobre seus valores absolutos, respectivamente). Uma possível solução para esse problema seria refazer a etapa de reestimação para a modelagem desse substrato (coletando um maior número de dados experimentais, por exemplo) a fim de obter intervalos de confiança mais estreitos para os parâmetros.

Já as estimativas do mínimo erro experimental (ϵ) indicam valores relativamente altos para processos de hidrólise de biomassa, embora ainda toleráveis. Os perfis de hidrólise dispostos na Figura 4.8 ajudam a fazer um julgamento mais consciente a respeito da qualidade do ajuste fornecido pela modelagem proposta.

Figura 4.8. Perfis de concentração de glicose em função do tempo segundo a modelagem proposta para a hidrólise com reciclo usando como substrato: (a) BH; (b) BAD. As linhas tracejadas indicam o início de uma nova reação de hidrólise utilizando substrato fresco e o hidrolisado reciclado.





Conforme evidenciado pela Figura 4.8, o modelo reestimado apresenta uma capacidade muito limitada de descrição dos dados experimentais. Os perfis de concentração de glicose preditos sugerem uma inibição da reação mais severa que a verificada nos ensaios. Ademais, nos processos realizados com intervalos de 48 h, a curva inicial (entre 0 e 48 h) indica uma redução na taxa de reação em função do aumento da conversão menos abrupta do que a observada experimentalmente (tanto para o BH quanto para o BAD). Dessa forma, pode-se concluir que a modelagem apresentada na Tabela 4.7 é inadequada para a representação da estratégia de hidrólise com reciclo de hidrolisado.

Entretanto, é importante destacar que as discrepâncias observadas entre os comportamentos predito e experimental podem resultar do fato de que ocorre transferência de parte da carga enzimática (que fica no hidrolisado) entre um sistema reacional e outro, o que não está previsto nos modelos. Assim, seria interessante repetir os ensaios dessa estratégia quantificando a carga enzimática real presente no início de cada nova reação, permitindo incorporar esse fenômeno na modelagem.

4.3 Avaliação de Diferentes Estratégias de Hidrólise

Tendo em vista o desempenho da modelagem proposta após a etapa de reestimação (vide Seção 4.2), optou-se por realizar a otimização das condições operacionais de duas das estratégias de hidrólise enzimática: operação em batelada alimentada e operação em etapas.

4.3.1 Estratégia de hidrólise em batelada alimentada

A análise da operação em batelada alimentada foi realizada de forma a definir novos esquemas de alimentação que maximizassem a concentração final de glicose obtida. Para tanto, foram consideradas como variáveis a carga inicial de sólidos (S_0), o intervalo entre as alimentações (t_i) e a quantidade de substrato fresco alimentado (S_{alim}). As Tabelas 4.8 e 4.9 exibem os esquemas de alimentação determinados, assim como os resultados das simulações para cada substrato em estudo. Diferentes números de alimentações (N_{alim}) foram testados, variando entre 1 e 5 (resultados gerados com $N_{alim} > 5$ diferiram por menos de 0,5% e, portanto, não são apresentados).

Tabela 4.8. Resultados da otimização da estratégia de hidrólise enzimática em batelada alimentada usando BH como substrato.

Esquema de alimentação				Resultados preditos		
N_{alim}	S_0 (%)	t_i (h)	S_{alim} ^a (g)	Sólidos ^b (%)	Glicose (g/L)	Rendimento (%)
1	20,00	58,2	77,10	27,28	120,11	64,89
2	20,00	37,6	49,27	29,27	126,89	63,90
3	20,00	26,3	35,27	29,93	129,34	63,68
4	20,00	21,0	27,49	30,32	130,54	63,47
5	19,99	17,0	22,41	30,50	131,24	63,43

^a Massa de bagaço (em base seca) considerando volume reacional inicial de 1 L.

^b Carga de sólidos acumulada durante o processo.

Tabela 4.9. Resultados da otimização da estratégia de hidrólise enzimática em batelada alimentada usando BAD como substrato.

Esquema de alimentação				Resultados preditos		
N_{alim}	S_0 (%)	t_i (h)	S_{alim}^a (g)	Sólidos ^b (%)	Glicose (g/L)	Rendimento (%)
1	20,00	103,8	104,08	29,78	129,18	54,83
2	19,96	51,2	58,64	30,94	130,76	53,40
3	19,96	33,7	40,22	31,26	131,17	53,03
4	19,95	25,9	30,58	31,40	131,35	52,87
5	19,91	20,4	24,74	31,48	131,46	52,77

^a Massa de bagaço (em base seca) considerando volume reacional inicial de 1 L.

^b Carga de sólidos acumulada durante o processo.

As Tabelas 4.8 e 4.9 indicam que as simulações realizadas com os novos esquemas de alimentação são capazes de atingir concentrações de glicose superiores às obtidas experimentalmente (vide Anexo II).

No entanto, esse aumento no teor de açúcar é mais significativo para os sistemas operando com o bagaço submetido ao pré-tratamento hidrotérmico: com $N_{\text{alim}} = 1$ (pior cenário) o esquema de alimentação sugerido produz um hidrolisado com 120,11 g/L de glicose, o que corresponde a um aumento de 8% na concentração final atingida com essa estratégia. Ainda analisando as simulações com BH, o cenário mais promissor (com $N_{\text{alim}} = 5$) prevê um hidrolisado com concentração de glicose de 131,24 g/L, o que é 18% a mais que o obtido nos ensaios em laboratório. Ainda assim, é importante notar que os rendimentos das reações das simulações foram menores que o observado experimentalmente (65-63% contra 67,56%). Porém essa diferença pode ser atribuída à inibição por produto.

No caso das simulações realizadas considerando o bagaço deslignificado, foram verificados aumentos percentuais muito pequenos na concentração final de glicose, próximos da ordem de grandeza do erro do modelo. Na melhor situação (com $N_{\text{alim}} = 5$) o teor de glicose atingido (131,46 g/L) foi apenas 3,5% superior ao medido experimentalmente. Além disso, os rendimentos preditos para as reações

diminuíram consideravelmente, passando de 66,16% para 55-52%. Também é possível observar que os cinco esquemas de alimentação propostos na Tabela 4.9 levam a teores finais de açúcar que diferem entre si por menos de 2%, indicando que a estratégia de batelada alimentada de BAD sofre com as limitações resultantes da diminuição da conversão com o aumento da carga de sólidos nos sistemas operando com esse substrato (efeito sólido).

Portanto, de acordo com as simulações realizadas, a adoção dos novos esquemas de alimentação pode levar a hidrolisados com maiores concentrações de glicose (especialmente para o BH). Ademais, os dados expostos nas Tabelas 4.8 e 4.9 mostram que a recuperação final de glicose obtida usando os dois bagaços em estudo é muito similar (ambos chegando a atingir aproximadamente 131 g/L de glicose). Esse resultado sugere que, apesar do processo de deslignificação melhorar a digestibilidade da biomassa quando comparado ao hidrotérmico (AITA *et al.*, 2011), ele pode não ser suficiente para garantir uma maior eficiência de hidrólise quando a reação é conduzida em batelada alimentada com alta carga acumulada de sólidos. Uma possível saída seria procurar alternativas para minimizar a inibição por produto, como conduzir a hidrólise em batelada alimentada junto à etapa de fermentação (processo SSF). Contudo, é importante destacar que os resultados das simulações realizadas servem como um guia para direcionar estudos futuros, sendo imprescindível comprovar experimentalmente o desempenho dos esquemas de alimentação propostos antes de chegar a quaisquer conclusões.

4.3.2 Estratégia de hidrólise em etapas

A avaliação da hidrólise em etapas foi feita determinando-se os valores de quatro variáveis do processo, visando maximizar a concentração final de glicose obtida com essa estratégia. Foram consideradas quatro variáveis: a carga inicial de sólidos da primeira etapa (S_1), o tempo de reação da primeira etapa (t_1), a carga inicial de sólidos da segunda etapa (S_2) e o tempo de reação da segunda etapa (t_2).

As restrições impostas durante a otimização incluíram o tempo total de hidrólise ($t_1 + t_2 \leq 72$ h) e as cargas de sólidos: 20% (m/v) e 25% (m/v) para o BH e

20, 25 e 30% (m/v) para o BAD (limites impostos considerando os valores atingidos experimentalmente após as operações de filtração de cada substrato).

A Tabela 4.10 apresenta as condições de operação calculadas, assim como os resultados das simulações para cada substrato em estudo.

Tabela 4.10. Resultados da otimização da estratégia de hidrólise enzimática em etapas.

Sistema ^a	Condições operacionais				Predição
	S ₁ (%)	t ₁ (h)	S ₂ (%)	t ₂ (h)	Glicose (g/L)
BH, 20%	20,00	22,6	20,00	49,4	82,27
BH, 25%	25,00	20,9	25,00	51,1	102,16
BAD, 20%	20,00	27,6	20,00	44,4	108,34
BAD, 25%	25,00	26,1	25,00	45,9	133,81
BAD, 30%	30,00	24,3	30,00	47,7	158,33

^a Substrato, restrição de carga de sólidos (% , m/v).

A análise da Tabela 4.10 mostra que as simulações realizadas com os sistemas limitados a 20% (m/v) de sólidos atingiram concentrações de glicose similares às obtidas nos ensaios de hidrólise em batelada após 72 h (82,27 g/L e 108,34 g/L contra 85,14 g/L e 106,97 g/L, vide Anexo I). Assim, a estratégia de hidrólise em etapas parece ser interessante apenas quando as cargas de sólidos são mais elevadas.

Avaliando a proposta de hidrólise de BH com carga de sólidos limitada a 25% (m/v) é possível verificar um aumento significativo (16,8%) na concentração final de glicose, quando são comparados os valores predito (102,16 g/L) e medido no ensaio em laboratório (87,45 g/L, vide Anexo III). De forma análoga, a proposta de operação com BAD limitada a 30% (m/v) de sólidos sugere a possibilidade de atingir 158,33 g/L de glicose no hidrolisado, o que representa um aumento de 13,2% sobre o valor obtido experimentalmente (139,92 g/L).

Logo, as novas condições determinadas para a estratégia de hidrólise enzimática em etapas indicam a possibilidade de obter hidrolisados mais concentrados em açúcar (para ambos os substratos em estudo). Porém, assim como

mencionado na Subseção 4.3.1, é importante ressaltar que os resultados preditos necessitam de comprovação experimental.

Ademais, apesar do potencial apresentado pelo processo de hidrólise em etapas, devem ser consideradas as limitações impostas pelos estágios de filtração (necessários para concentrar o meio reacional). Dessa forma, essa estratégia de operação prevê um volume de hidrolisado rico em glicose inferior ao produzido através de outros processos e, além disso, os estágios de filtração representam um custo adicional ao processo, o que é relevante, especialmente pensando em aplicação industrial. Outro ponto a ser levado em conta é o custo energético associado à agitação, uma vez que as simulações realizadas indicam que os resultados promissores em termos de concentração final de glicose só ocorrem em sistemas operando com cargas de sólidos muito elevadas (25% e 30%, m/v).

CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES

Conclui-se que foi possível desenvolver um modelo matemático para a descrição da hidrólise enzimática de bagaço de cana em sistemas operando com uma ampla faixa de concentração de sólidos (5-20%, m/v). No caso, a modelagem proposta está baseada em um esquema de uma única reação e cinco parâmetros, incorporando fatores como a reatividade do substrato, a inibição competitiva por glicose e o aumento do grau de severidade da inibição em função do teor de açúcar do meio. Essa abordagem conseguiu ajustar satisfatoriamente os dados de hidrólise enzimática em batelada de dois substratos (BH e BAD), ainda que a presença de parâmetros altamente correlacionados tenha contribuído para a existência de problemas de identificabilidade (conforme verificado pelos intervalos de confiança dos parâmetros).

Após a etapa de reestimação, a robustez do modelo foi comprovada pela sua capacidade de descrever com acurácia aceitável os dados de hidrólise obtidos por diferentes estratégias de operação (batelada alimentada e processo em etapas). Ademais, intervalos de confiança mais estreitos foram determinados após a reestimação. Contudo, no caso da estratégia de reação com reciclo do hidrolisado, observou-se que o comportamento dos dados experimentais não foi reproduzido adequadamente, indicando a necessidade de contabilizar o aumento da carga enzimática ao longo do processo.

Por fim, a análise das diferentes estratégias de hidrólise enzimática permitiu apontar futuras direções a serem tomadas por projetos na área de hidrólise enzimática de bagaço de cana. As simulações de processos em batelada alimentada permitiram concluir que a adoção dos novos esquemas de alimentação pode levar a um aumento significativo da concentração de glicose obtida quando BH é utilizado como substrato. Mesmo assim, a conversão final verificada com essa estratégia é relativamente baixa, sugerindo que uma alternativa interessante seria investir na busca por estratégias que minimizem a inibição por produto. O resultado da otimização do processo em etapas, por sua vez, aponta a possibilidade de aumento do teor de açúcar nos hidrolisados gerados tanto com BH como com BAD. Porém, o

potencial de aplicação dessa estratégia ainda precisa ser estudado, tendo em vista questões como o volume de hidrolisado produzido e o custo de operação.

5.1 Sugestões para Trabalhos Futuros

Diante dos resultados encontrados neste trabalho, são apresentadas as seguintes sugestões para continuidade e desdobramentos do projeto:

1. Repetir a estimação de parâmetros dos Modelos #1 e #2 utilizando novos dados experimentais, se possível incluindo resultados de ensaios de hidrólise com variação na concentração inicial de celobiose.
2. Repetir os ensaios da estratégia de hidrólise enzimática com reciclo efetuando a quantificação da concentração de enzimas no hidrolisado, de forma a permitir a avaliação do desempenho da modelagem proposta (Modelo #4) após incorporar o aumento da carga enzimática entre uma reação e outra ao longo do processo.
3. Realizar ensaios de hidrólise em batelada alimentada considerando os novos esquemas de alimentação sugeridos para os dois substratos estudados, visando à validação dos resultados obtidos nas simulações.
4. Investigar novas estratégias de hidrólise, nas quais seja possível minimizar a inibição por produto (sistemas SSF, por exemplo).
5. Realizar ensaios de hidrólise em etapas considerando as novas condições operacionais propostas para os substratos estudados, objetivando validar os resultados das simulações e também avaliar a aplicabilidade dessa estratégia, em termos dos volumes de hidrolisado produzidos e do consumo energético do processo.
6. Testar o desempenho do Modelo #4 para a descrição da hidrólise enzimática de bagaço de cana submetido a outros tipos de pré-tratamentos, ou até mesmo para o ajuste de dados de hidrólise enzimática de outras biomassas. É possível considerar também a generalização do modelo utilizando *cross-validation*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AITA, G.A.; SALVI, D.A.; WALKER, M.S. Enzyme hydrolysis and ethanol fermentation of dilute ammonia pretreated energy cane. **Bioresour. Technol.**, v. 102, p. 4444-4448, 2011.
- AMIRI, H.; KARIMI, K. Pretreatment and hydrolysis of lignocellulosic wastes for butanol production: Challenges and perspectives. **Bioresour. Technol.**, v. 270, p. 702-721, 2018.
- ANDRIĆ, P.; MEYER, A.S.; JENSEN, P.A.; DAM-JOHANSEN, K. Reactor design for minimizing product inhibition during enzymatic lignocellulose hydrolysis: I. Significance and mechanism of cellobiose and glucose inhibition on cellulolytic enzymes. **Biotechnol. Adv.**, v. 28, n. 3, p. 308-324, 2010.
- 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. **Biochem. Eng. J.**, v. 104, p. 10-19, 2015.
- BANSAL, P.; HALL, M.; REALFF, M.J.; LEE, J.H.; BOMMARIUS, A.S. Modeling cellulase kinetics on lignocellulosic substrates. **Biotechnol. Adv.**, v. 27, n. 6, p. 833-848, 2009.
- BATTISTA, F.; ALMENDROS, M.G.; ROUSSET, R.; BOIVINEAU, S.; BOUILLON, P.A. Enzymatic hydrolysis at high dry matter content: The influence of the substrates' physical properties and of loading strategies on mixing and energetic consumption. **Bioresour. Technol.**, v. 250, p. 191-196, 2018.
- BEZ, E.T. **Procedimento de representação de soluções em otimização global: Aplicação em modelos de interação espacial**. 2005. 224 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Produção), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2005.
- BONOMI, A.; SCHMIDELL, W. Modelagem matemática e simulação de processos fermentativos. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. (Org.). **Biotecnologia industrial**. São Paulo: Edgard Blucher, 2001, v. 2, p. 123-178.

BRADFORD, M.M. A rapid sensitive method for a quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRASIL. Ministério de Minas e Energia. Empresa de Pesquisa Energética. **Balanco Energético Nacional**. 2017. Disponível em: <<http://www.epe.gov.br/pt/publicacoes-dados-abertos/publicacoes/Balanco-Energetico-Nacional-2017>>. Acesso em: 17 set. 2018.

CARA, C.; MOYA, M.; BALLESTEROS, I.; NEGRO, M.J.; GONZÁLEZ, A.; RUIZ, E. Influence of solid loading on enzymatic hydrolysis of steam exploded or liquid hot water pretreated olive tree biomass. **Process Biochem.**, v. 42, p. 1003-1009, 2007.

CARPIO, L.G.T.; SIMONE DE SOUZA, F. Optimal allocation of sugarcane bagasse for producing bioelectricity and second generation ethanol in Brazil: Scenarios of cost reductions. **Renew. Energy**, v. 111, p. 771-780, 2017.

CHANDEL, A.K.; GARLAPATI, V.K.; SINGH, A.K.; ANTUNES, F.A.F.; DA SILVA, S.S. The path forward for lignocellulose biorefineries: Bottlenecks, solutions, and perspective on commercialization. **Bioresour. Technol.**, v. 264, p. 370-381, 2018.

CHAPRA, S.C. Optimization. In: _____. **Applied numerical methods with MATLAB for engineers and scientists**. 3. Ed. New York: McGraw-Hill, 2012. cap. 7, p. 182-204.

CHAPRA, S.C. Optimization. In: _____. **Numerical methods for engineers**. Coautoria de Raymond P. Canale. 6. Ed. New York: McGraw-Hill, 2010. p. 341-437.

DA ROS, S.; COLUSSO, G.; WESCHENFELDER, T.A.; DE MARSILLAC TERRA, L.; DE CASTILHOS, F.; CORAZZA, M.L.; SCHWAAB, M. A comparison among stochastic optimization algorithms for parameter estimation of biochemical kinetic models. **Appl. Soft Comput.**, v. 13, p. 2205-2214, 2013.

DAS, S.; ABRAHAM, A.; CHAKRABORTY, U.K.; KONAR, A. Differential evolution using a neighborhood-based mutation operator. **IEEE Trans. Evol. Comput.**, v. 13, n. 3, p. 526-553, 2009.

DE OLIVEIRA MOUTTA, R.; SILVA, M.C.; REIS CORRALES, R.C.N.; SANTOS CERULLO, M.A.; FERREIRA-LEITÃO, V.S.; DA SILVA BON, E.P. Comparative response and structural characterization of sugarcane bagasse, straw and bagasse-straw 1:1 mixtures subjected to hydrothermal pretreatment and enzymatic conversion. **J. Microb. Biochem. Technol.**, S12:005, 2013.

DIAS, J.M.C.S.; SOUZA, D.T.; BRAGA, M.; ONOYAMA, M.M.; MIRANDA, C.H.B.; BARBOSA, P.F.D.; ROCHA, J.D. **Produção de briquetes e péletes a partir de resíduos agrícolas, agroindustriais e florestais**. Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2012. 130 p.

DRIEMEIER, C.; OLIVEIRA, M.M.; CURVELO, A.A.S. Lignin contributions to the nanoscale porosity of raw and treated lignocelluloses as observed by calorimetric thermoporometry. **Ind. Crop. Prod.**, v. 82, p. 114-117, 2016.

FLORES-SÁNCHEZ, A.; FLORES-TLACUAHUAC, A.; PEDRAZA-SEGURA, L.L. Model-based experimental design to estimate kinetic parameters of the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Ind. Eng. Chem. Res.**, v. 52, p. 4834-4850, 2013.

FOCKINK, D.H.; URIO, M.B.; SÁNCHEZ, J.H.; 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, n. 6, p. 6211-6220, 2017.

GHOSE, T.K. Measurement of cellulase activities. **Pure Appl. Chem.**, v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.

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

HASSAN, S.S.; WILLIAMS, G.A.; JAISWAL, A.K. Emerging technologies for the pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresour. Technol.**, v. 262, p. 310-318, 2018.

HICK, S.M.; GRIEBEL, C.; RESTREPO, D.T.; TRUITT, J.H.; BUKER, E.J.; BYLDA, C.; BLAIR, R.G. Mechanocatalysis for biomass-derived chemicals and fuels. **Green Chem.**, v. 12, p. 468-474, 2010.

HODGE, D.B.; KARIM, M.N.; SCHELL, D.J.; MCMILLAN, J.D. Model-based fed-batch for high-solids enzymatic cellulose hydrolysis. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 152, n. 1, p. 88-107, 2009.

HODGE, D.B.; KARIM, M.N.; SCHELL, D.J.; MCMILLAN, J.D. Soluble and insoluble solids contributions to high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Bioresour. Technol.**, v. 99, p. 8940-8948, 2008.

HOSSEINI, S.A.; SHAH, N. Enzymatic hydrolysis of cellulose part II: Population balance modelling of hydrolysis by exoglucanase and universal kinetic model. **Biomass Bioenergy**, v. 35, p. 3830-3840, 2011.

JUNQUEIRA, T.; GOUVEIA, V.; SAMPAIO, I.; MORAIS, E.; BONOMI, A. Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol. Memorando Técnico. **Sugarcane biomass composition for the industrial simulations in the Virtual Sugarcane Biorefinery (VSB)**. 2015. Disponível em: <<http://ctbe.cnpem.br/sugarcane-biomass-composition-industrial-simulations/>>. Acesso em: 18 set. 2018.

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

KOOTSTRA, A.M.J.; BEEFTINK, H.H.; SCOTT, E.L.; SANDERS, J.P.M. Optimization of the dilute maleic acid pretreatment of wheat straw. **Biotechnol. Biofuels**, v. 2, n. 1, p. 31, 2009.

KRISTENSEN, J.B.; FELBY, C.; JØRGENSEN, H. Yield-determining factors in high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Biotechnol. Biofuels**, v. 2, n. 1, p. 11, 2009.

KUMAR, D.; MURTHY, G.S. Stochastic molecular model of enzymatic hydrolysis of cellulose for ethanol production. **Biotechnol. Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 63, 2013.

LEE, Y.H.; FAN, L.T. Kinetic studies of enzymatic hydrolysis of insoluble cellulose: (II). Analysis of extended hydrolysis times. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 25, n. 4, p. 939-966, 1983.

LENIHAN, P.; OROZCO, A.; O'NEILL, E.; AHMAD, M.N.M.; ROONEY, D.W.; WALKER, G.M. Dilute acid hydrolysis of lignocellulosic biomass. **Chem. Eng. J.**, v. 156, p. 395-403, 2010.

LEVINE, S.E.; FOX, J.M.; BLANCH, H.W.; CLARK, D.S. A mechanistic model of the enzymatic hydrolysis of cellulose. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 107, n. 1, p. 37-51, 2010.

LIMA, M.A.; GOMEZ, L.D.; STEELE-KING, C.G.; SIMISTER, R.; BERNARDINELLI, O.D.; CARVALHO, M.A.; REZENDE, C.A.; LABATE, C.A.; DE AZEVEDO, E.R.; MCQUEEN-MASON, S.J.; POLIKARPOV, I. Evaluating the composition and processing potential of novel sources of Brazilian biomass for sustainable biorenewables production. **Biotechnol. Biofuels**, v. 7, n. 1, p. 10, 2014.

LUDWIG, D.; MICHAEL, B.; HIRTH, T.; RUPP, S.; ZIBEK, S. High solids enzymatic hydrolysis of pretreated lignocellulosic materials with a powerful stirrer concept. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 172, n. 3, p. 1699-1713, 2014.

LUTERBACHER, J.S.; PARLANGE, J.Y.; WALKER, L.P. A pore-hindered diffusion and reaction model can help explain the importance of pore size distribution in enzymatic hydrolysis of biomass. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 110, n. 1, p. 127-136, 2013.

LYND, L.R.; LIANG, X.; BIDDY, M.J.; ALLEE, A.; CAI, H.; FOUST, T.; HIMMEL, M.E.; LASER, M.S.; WANG, M.; WYMAN, C.E. Cellulosic ethanol: Status and innovation. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 45, p. 202-211, 2017.

LYND, L.R.; WEIMER, P.J.; VAN ZYL, W.H.; PRETORIUS, I.S. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 66, n. 3, p. 506-577, 2002.

MACHADO, D.L. **Estratégias para melhorar o desempenho da hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar em altas concentrações de sólidos.** 2018. 184 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2018.

MARTINS, L.H.S. **Avaliação de diferentes pré-tratamentos do bagaço de cana-de-açúcar considerando altas cargas de sólidos.** 2015. 260 f. Tese (Doutorado

em Engenharia Química), Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2015.

MATHEW, A.K.; PARAMESHWARAN, B.; SUKUMARAN, R.K.; PANDEY, A. An evaluation of dilute acid and ammonia fiber explosion pretreatment for cellulosic ethanol production. **Bioresour. Technol.**, v. 199, p. 13-20, 2016.

MILANEZ, A.Y.; NYKO, D.; VALENTE, M.S.; SOUSA, L.C.; BONOMI, A.; JESUS, C.D.F.; WATANABE, M.D.B.; CHAGAS, M.F.; REZENDE, M.C.A.F.; CAVALETT, O.; JUNQUEIRA, T.L.; GOUVÊIA, V.L.R. De promessa a realidade: Como o etanol celulósico pode revolucionar a indústria da cana-de-açúcar uma avaliação do potencial competitivo e sugestões de política pública. **BNDES Setorial**, Rio de Janeiro, n. 41, p. 237-294, mar. 2015.

MODENBACH, A.A.; NOKES, S.E. Enzymatic hydrolysis of biomass at high-solids loadings - A review. **Biomass Bioenergy**, v. 56, p. 526-544, 2013.

MOHD ZAIN, M.Z.b.; KANESAN, J.; KENDALL, G.; CHUAH, J.H. Optimization of fed-batch fermentation processes using the Backtracking Search Algorithm. **Expert Syst. Appl.**, v. 91, p. 286-297, 2018.

MOREIRA NETO, J. **Modelagem matemática do processo de hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar**. 2016. 202 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2016.

MOREIRA NETO, J. **Modelagem matemática do processo de hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar submetido a diferentes pré-tratamentos**. 2011. 213 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2011.

NAG, A.; SPRAGUE, M.A.; GRIGGS, A.J.; LISCHESKE, J.J.; STICKEL, J.J.; MITTAL, A.; WANG, W.; JOHNSON, D.K. Parameter determination and validation for a mechanistic model of the enzymatic saccharification of cellulose- I_{β} . **Biotechnol. Prog.**, v. 31, n. 5, p. 1237-1248, 2015.

NIU, H.; SHAH, N.; KONTORAVDI, C. Modelling of amorphous cellulose depolymerisation by cellulases, parametric studies and optimization. **Biochem. Eng. J.**, v. 105, p. 455-472, 2016.

NYKO, D.; GARCIA, J.L.F.; MILANEZ, A.Y.; DUNHAM, F.B. A corrida tecnológica pelos biocombustíveis de segunda geração: Uma perspectiva comparada. **BNDES Setorial**, Rio de Janeiro, n. 32, p. 5-48, set. 2010.

OCTAVE. **Function Reference - de_min: Global optimization using differential evolution**. 2018. Disponível em: <https://octave.sourceforge.io/optim/function/de_min.html>. Acesso em: 06 jun. 2018.

PERI, S.; KARRA, S.; LEE, Y.Y.; KARIM, N.M. Modeling intrinsic kinetics of enzymatic cellulose hydrolysis. **Biotechnol. Prog.**, v. 23, n. 3, p. 626-637, 2007.

PIHLAJANIEMI, V.; SIPPONEN, M.H.; PASTINEN, O.; LEHTOMÄKI, I.; LAAKSO, S. Yield optimization and rational function modeling of enzymatic hydrolysis of wheat straw pretreated by NaOH-delignification, autohydrolysis and their combination. **Green Chem.**, v. 17, p. 1683–1691, 2015.

PRUNESCU, R.M.; SIN, G. Dynamic modeling and validation of a lignocellulosic enzymatic hydrolysis process – A demonstration scale study. **Bioresour. Technol.**, v. 150, p. 393-403, 2013.

RABELO, S.C. **Avaliação e otimização de pré-tratamentos e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração**. 2010. 447 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2010.

RIVERA, E.C.; RABELO, S.C.; DOS REIS GARCIA, D.; MACIEL FILHO, R.; DA COSTA, A.C. Enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse for bioethanol production: Determining optimal enzyme loading using neural networks. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, v. 85, p. 983–992, 2010.

ROCHA, G.J.M.; NASCIMENTO, V.M.; ROSSELL, C.E.V. Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol. Memorando Técnico. **Caracterização Físico-Química de Bagaço de Cana-de-Açúcar**. 2014. Disponível em: <

<http://ctbe.cnpem.br/publicacoes-ctbe/documentos-tecnicos/>>. Acesso em: 20 set. 2018.

ROCHA, M.; MENDES, R.; ROCHA, O.; ROCHA, I.; FERREIRA, E.C. Optimization of fed-batch fermentation processes with bio-inspired algorithms. **Expert Syst. Appl.**, v. 41, p. 2186-2195, 2014.

ROMERO, I.; RUIZ, E.; CASTRO, E.; MOYA, M. Acid hydrolysis of olive tree biomass. **Chem. Eng. Res. Des.**, v. 88, p. 633-640, 2010.

RYTIOJA, J.; HILDÉN, K.; YUZON, J.; HATAKKA, A.; DE VRIES, R.P.; MÄKELÄ, M.R. Plant-polysaccharide-degrading enzymes from basidiomycetes. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 78, n. 4, p. 614-649, 2014.

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

SCHÜTH, F.; RINALDI, R.; MEINE, N.; KÄLDSTRÖM, M.; HILGERT, J.; KAUFMAN RECHULSKI, M.D. Mechanocatalytic depolymerization of cellulose and raw biomass and downstream processing of the products. **Catal. Today**, v. 234, p. 24-30, 2014.

SCOTT, F.; LI, M.; WILLIAMS, D.L.; CONEJEROS, R.; HODGE, D.B.; AROCA, G. Corn stover semi-mechanistic enzymatic hydrolysis model with tight parameter confidence intervals for model-based process design and optimization. **Bioresour. Technol.**, v. 177, p. 255-265, 2015.

SILVEIRA, M.H.L.; MORAIS, A.R.C.; DA COSTA LOPES, A.M.; OLEKSZYSZEN, D.N.; BOGEL-ŁUKASIK, R.; ANDREAUS, J.; RAMOS, L.P. Current pretreatment technologies for the development of cellulosic ethanol and biorefineries. **Chem. Sus. Chem.**, v. 8, p. 3366-3390, 2015.

STORN, R.; PRINCE, K. Differential evolution – A simple and efficient heuristic for global optimization over continuous spaces. **J. Glob. Optim.**, v. 11, p. 341-359, 1997.

SUAREZ, C.A.G.; CAVALCANTI-MONTAÑO, I.D.; DA COSTA MARQUES, R.G.; FURLAN, F.F.; DA MOTA E AQUINO, P.L.; DE CAMPOS GIORDANO, R.; DE SOUSA JR., R. Modeling the kinetics of complex systems: Enzymatic hydrolysis of

lignocellulosic substrates. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 173, n. 5, p. 1083-1096, 2014.

SUN, S.; SUN, S.; CAO, X.; SUN, R. The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. **Bioresour. Technol.**, v. 199, p. 49-58, 2016.

TAHERZADEH, M.J.; KARIMI, K. Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: A review. **BioRes.**, v. 2, n. 3, p. 472-499, 2007.

TEJIRIAN, A.; XU, F. Inhibition of enzymatic cellulolysis by phenolic compounds. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 48, p. 239-247, 2011.

TERVASMÄKI, P.; SOTANIEMI, V.; KANGAS, J.; TASKILA, S.; OJAMO, H.; TANSKANEN, J. A discretized model for enzymatic hydrolysis of cellulose in a fed-batch process. **Bioresour. Technol.**, v. 227, p. 112-124, 2017.

TIAN, S.-Q.; ZHAO, R.-Y.; CHEN, Z.-C. Review of the pretreatment and bioconversion of lignocellulosic biomass from wheat straw materials. **Renew. Sustain. Energy Rev.**, v. 91, p. 483-489, 2018.

UNICA, União da Indústria de Cana-de-açúcar. **Unicadata**. 2018. Disponível em: <<http://www.unicadata.com.br/>>. Acesso em: 07, agosto, 2018.

VAN DYK, J.S.; PLETSCHE, B.I. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes - Factors affecting enzymes, conversion and synergy. **Biotechnol. Adv.**, v. 30, n. 6, p. 1458-1480, 2012.

VANI, S.; SUKUMARAN, R.K.; SAVITHRI, S. Prediction of sugar yields during hydrolysis of lignocellulosic biomass using artificial neural network modeling. **Bioresour. Technol.**, v. 188, p. 128-135, 2015.

VÁSQUEZ, P.C.H. **Cinética de inibição por produto e substrato da hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar**. 2017. 160 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2017.

XUE, Y.; RUSLI, J.; CHANG, H.; PHILLIPS, R.; JAMEEL, H. Process evaluation of enzymatic hydrolysis with filtrate recycle for the production of high concentration sugars. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 166, n. 4, p. 839-855, 2012a.

XUE, Y.; JAMEEL, H.; PHILLIPS, R.; CHANG, H. Split addition of enzymes in enzymatic hydrolysis at high solids concentration to increase sugar concentration for bioethanol production. **J. Ind. Eng. Chem.**, v. 18, n. 2, p. 707-714, 2012b.

WANG, R.; UNREAN, P.; FRANZÉN, C.J. Model-based optimization and scale-up of multi-feed simultaneous saccharification and co-fermentation of steam pre-treated lignocellulose enables high gravity ethanol production. **Biotechnol. Biofuels**, v. 9, n. 1, p. 13, 2016.

WANG, W.; ZHUANG, X.; YUAN, Z.; YU, Q.; QI, W.; WANG, Q.; TAN, X. High consistency enzymatic saccharification of sweet sorghum bagasse pretreated with liquid hot water. **Bioresour. Technol.**, v. 108, p. 252-257, 2012.

WIJAYA, Y.P.; PUTRA, R.D.D.; WIDYAYA, V.T.; HA, J.-M; SUH, D.J.; KIM, C.S. Comparative study on two-step concentrated acid hydrolysis for the extraction of sugars from lignocellulosic biomass. **Bioresour. Technol.**, v. 164, p. 221-231, 2014.

YANG, J.; ZHANG, X.; YONG, Q.; YU, S. Three-stage enzymatic hydrolysis of steam-exploded corn stover at high substrate concentration. **Bioresour. Technol.**, v. 102, p. 4905-4908, 2011.

ZHANG, H.; WU, S.; XIE, J. Evaluation of the effects of isolated lignin on enzymatic hydrolysis of cellulose. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 101, p. 44-50, 2017.

ZHANG, Y.; XU, B.; ZHOU, W. On a novel mechanistic model for simultaneous enzymatic hydrolysis of cellulose and hemicellulose considering morphology. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 111, n. 9, p. 1767-1781, 2014.

ZHANG, Y.-H.P.; LYND, L.R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 88, n. 7, p. 797-824, 2004.

ZHAO, X.; ZHANG, L.; LIU, D. Biomass recalcitrance. Part I: The chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Biofuels, Bioprod. Bioref.**, v. 6, p. 465-482, 2012.

ZHENG, Y.; PAN, Z.; ZHANG, R.; JENKINS, B.M. Kinetic modeling for enzymatic hydrolysis of pretreated creeping wild ryegrass. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 102, n. 6, p. 1558-1569, 2009.

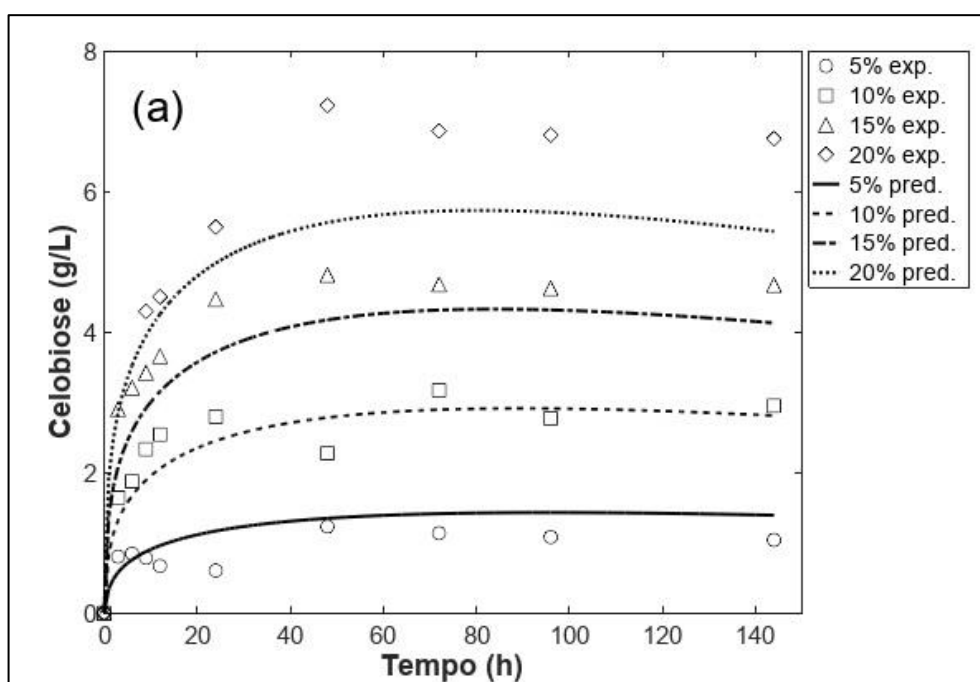
APÊNDICES

Apêndice A

Neste apêndice são apresentados os perfis de concentração de celobiose em função do tempo de hidrólise preditos pelos Modelos #1 e #2.

A inspeção visual desses perfis serve de auxílio na avaliação da capacidade de ajuste dos modelos, complementando a análise já realizada na Seção 4.1. No caso, as Figuras A.1 e A.2 mostram, respectivamente, os perfis obtidos com os Modelos #1 e #2.

Figura A.1. Perfis de concentração de celobiose em função do tempo segundo o Modelo #1 para a hidrólise de: (a) BH; (b) BAD. Cargas de sólidos usadas no ajuste: 5, 15 e 20% (m/v). Validação: 10% (m/v).



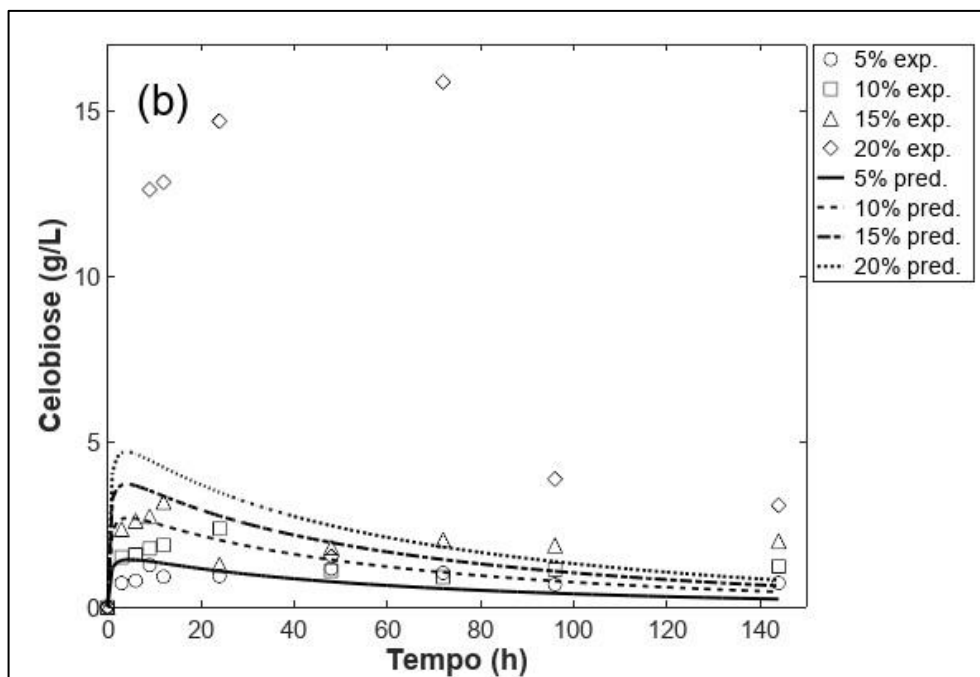
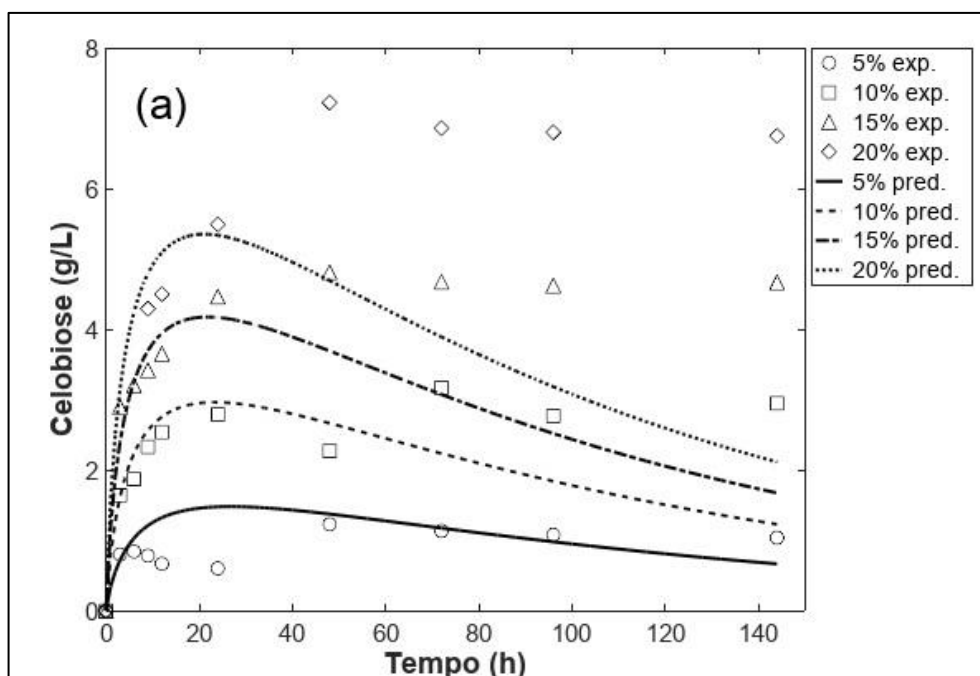
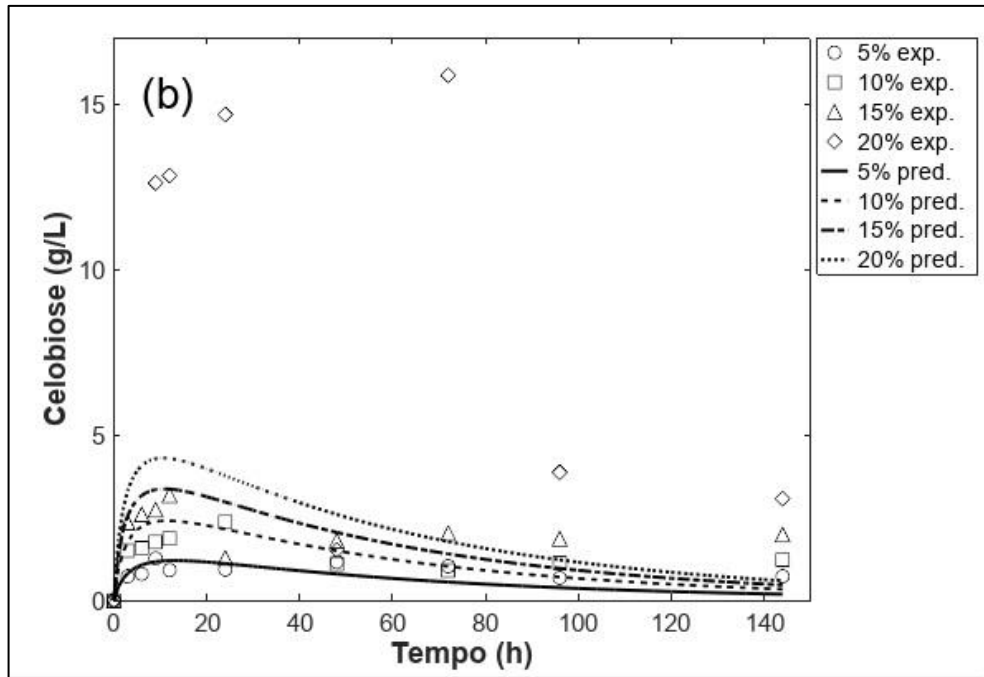


Figura A.2. Perfis de concentração de celobiose em função do tempo segundo o Modelo #2 para a hidrólise de: (a) BH; (b) BAD. Cargas de sólidos usadas no ajuste: 5, 15 e 20% (m/v). Validação: 10% (m/v).





ANEXOS

Anexo I

A seguir estão dispostos os dados de hidrólise enzimática em batelada utilizados no processo de estimação de parâmetros e validação dos modelos considerados neste trabalho.

As Tabelas I.1-I.4 foram construídas com base nos dados disponibilizados por Machado (2018) e apresentam as concentrações médias de glicose e celobiose medidas durante os experimentos em batelada de hidrólise enzimática de BH (bagaço de cana submetido a pré-tratamento hidrotérmico) e BAD (bagaço de cana pré-tratado com ácido diluído e deslignificado com NaOH).

Tabela I.1. Dados de hidrólise enzimática em batelada; carga inicial de sólidos de 5% (m/v) (MACHADO, 2018).

Tempo (h)	BH		BAD	
	Glicose (g/L)	Celobiose (g/L)	Glicose (g/L)	Celobiose (g/L)
0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
3	8,57 ± 0,74	0,80 ± 0,04	11,34 ± 0,52	0,73 ± 0,05
6	11,13 ± 0,42	0,84 ± 0,03	16,16 ± 0,77	0,80 ± 0,08
9	12,50 ± 0,09	0,78 ± 0,07	19,51 ± 0,31	1,27 ± 0,86
12	13,61 ± 0,38	0,67 ± 0,24	21,55 ± 0,95	0,92 ± 0,10
24	17,57 ± 0,14	0,60 ± 0,74	26,02 ± 0,19	0,94 ± 0,01
48	20,76 ± 0,80	1,23 ± 0,05	32,94 ± 2,26	1,16 ± 0,08
72	21,68 ± 0,19	1,14 ± 0,04	34,19 ± 1,68	1,03 ± 0,13
96	22,73 ± 0,86	1,08 ± 0,05	36,20 ± 0,70	0,68 ± 0,09
144	23,45 ± 0,00	1,04 ± 0,02	38,22 ± 1,23	0,73 ± 0,01

Tabela I.2. Dados de hidrólise enzimática em batelada; carga inicial de sólidos de 10% (m/v) (MACHADO, 2018).

Tempo (h)	BH		BAD	
	Glicose (g/L)	Celobiose (g/L)	Glicose (g/L)	Celobiose (g/L)
0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
3	15,99 ± 0,09	1,64 ± 0,18	22,80 ± 1,62	1,51 ± 0,10
6	20,92 ± 1,39	1,87 ± 0,52	29,20 ± 0,48	1,59 ± 0,04
9	23,35 ± 4,38	2,33 ± 0,12	35,07 ± 0,47	1,76 ± 0,07
12	26,94 ± 2,06	2,54 ± 0,10	39,35 ± 0,10	1,87 ± 0,00
24	32,00 ± 4,31	2,79 ± 0,24	52,04 ± 1,61	2,37 ± 0,15
48	38,52 ± 5,41	2,27 ± 0,94	60,09 ± 0,04	1,10 ± 0,22
72	43,45 ± 0,03	3,17 ± 0,24	64,10 ± 1,40	0,90 ± 0,09
96	44,02 ± 0,18	2,77 ± 0,17	65,32 ± 1,53	1,14 ± 0,14
144	47,21 ± 1,51	2,95 ± 0,00	72,10 ± 0,88	1,22 ± 0,01

Tabela I.3. Dados de hidrólise enzimática em batelada; carga inicial de sólidos de 15% (m/v) (MACHADO, 2018).

Tempo (h)	BH		BAD	
	Glicose (g/L)	Celobiose (g/L)	Glicose (g/L)	Celobiose (g/L)
0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
3	25,20 ± 1,06	2,90 ± 0,36	35,27 ± 2,54	2,35 ± 0,11
6	31,06 ± 0,17	3,21 ± 0,10	47,90 ± 0,48	2,60 ± 0,10
9	36,71 ± 2,33	3,42 ± 0,15	56,10 ± 1,79	2,74 ± 0,13
12	41,15 ± 0,92	3,66 ± 0,21	62,52 ± 1,04	3,18 ± 0,10
24	52,58 ± 1,06	4,47 ± 0,05	78,80 ± 1,46	1,29 ± 0,09
48	61,11 ± 0,95	4,81 ± 0,52	90,99 ± 2,99	1,80 ± 0,02
72	67,60 ± 0,11	4,68 ± 0,60	97,12 ± 0,20	2,03 ± 0,04
96	68,18 ± 0,34	4,62 ± 0,36	104,00 ± 0,85	1,86 ± 0,13
144	69,08 ± 0,58	4,67 ± 0,42	107,15 ± 1,44	1,99 ± 0,08

Tabela I.4. Dados de hidrólise enzimática em batelada; carga inicial de sólidos de 20% (m/v) (MACHADO, 2018).

Tempo (h)	BH		BAD	
	Glicose (g/L)	Celobiose (g/L)	Glicose (g/L)	Celobiose (g/L)
0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
9	38,51 ± 2,78	4,29 ± 0,13	81,19 ± 1,56	12,62 ± 0,12
12	49,43 ± 2,35	4,50 ± 0,08	82,77 ± 2,25	12,84 ± 0,08
24	68,52 ± 0,87	5,49 ± 0,07	98,33 ± 0,21	14,68 ± 0,03
48	83,50 ± 0,52	7,23 ± 0,01	106,73 ± 0,01	1,52 ± 0,01
72	85,14 ± 0,96	6,86 ± 0,11	106,97 ± 0,72	15,87 ± 0,04
96	88,84 ± 0,70	6,80 ± 0,10	111,81 ± 2,19	3,87 ± 0,70
144	95,37 ± 2,34	6,75 ± 0,09	115,54 ± 2,92	3,07 ± 0,32

Anexo II

A seguir estão dispostos os dados de hidrólise enzimática em batelada alimentada utilizados no processo de reestimação de parâmetros dos modelos considerados neste trabalho.

A Tabela II.1 foi construída com base nos dados disponibilizados por Machado (2018) e apresenta as concentrações médias de glicose e celobiose medidas durante os experimentos em batelada alimentada de hidrólise enzimática de BH (bagaço de cana submetido a pré-tratamento hidrotérmico) e BAD (bagaço de cana pré-tratado com ácido diluído e deslignificado com NaOH).

Tabela II.1. Dados de hidrólise enzimática em batelada alimentada; carga de sólidos acumulada de 24% (m/v) (MACHADO, 2018).

Tempo (h)	BH		BAD	
	Glicose (g/L)	Celobiose (g/L)	Glicose (g/L)	Celobiose (g/L)
0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
3	18,71 ± 0,48	2,31 ± 0,03	23,76 ± 0,51	1,58 ± 0,02
6	23,96 ± 0,93	2,15 ± 0,45	31,61 ± 0,44	1,75 ± 0,07
9	33,53 ± 0,49	2,97 ± 0,02	45,80 ± 1,69	2,57 ± 0,04
12	36,93 ± 0,99	3,21 ± 1,75	55,86 ± 1,33	2,99 ± 0,01
18	55,95 ± 0,90	5,56 ± 0,12	83,64 ± 2,61	4,86 ± 0,20
24	73,42 ± 1,43	6,53 ± 0,07	104,96 ± 1,32	6,29 ± 0,15
48	94,75 ± 1,64	8,79 ± 0,16	108,02 ± 1,97	5,88 ± 0,07
72	103,40 ± 1,77	8,28 ± 0,47	122,35 ± 1,14	6,54 ± 0,88
96	108,04 ± 2,11	8,30 ± 0,18	125,26 ± 0,87	4,61 ± 0,25
144	111,19 ± 2,43	8,16 ± 0,30	127,00 ± 0,95	12,00 ± 0,53

Anexo III

A seguir estão dispostos os dados de hidrólise enzimática em múltiplas etapas que foram utilizados no processo de reestimação de parâmetros dos modelos considerados neste trabalho.

A Tabela III.1 foi construída com base nos dados disponibilizados por Machado (2018) e apresenta as concentrações médias de glicose medidas durante os experimentos de hidrólise enzimática em múltiplas etapas de BH (bagaço de cana submetido a pré-tratamento hidrotérmico) e BAD (bagaço de cana pré-tratado com ácido diluído e deslignificado com NaOH).

Tabela III.1. Dados de hidrólise enzimática em múltiplas etapas (MACHADO, 2018).

Tipo de teste	Tempo (h)	Glicose (g/L) - BH	Glicose (g/L) - BAD
12 h / 48 h	0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	12	33,40 ± 0,02	57,91 ± 0,92
	36	70,10 ± 0,87	112,02 ± 0,85
	60	80,77 ± 7,53	133,24 ± 0,07
24 h / 48 h	0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	12	33,40 ± 0,02	57,91 ± 0,92
	24	40,89 ± 0,56	66,59 ± 1,89
	48	76,10 ± 1,33	116,25 ± 0,31
	72	87,45 ± 2,23	139,92 ± 2,19

Anexo IV

A seguir estão dispostos os dados de hidrólise enzimática com reciclo que foram aplicados na reestimação de parâmetros dos modelos considerados neste trabalho.

A Tabela IV.1 foi construída com base nos dados disponibilizados por Machado (2018) e apresenta as concentrações médias de glicose medidas durante os experimentos de hidrólise enzimática com reciclo usando BH (bagaço de cana submetido a pré-tratamento hidrotérmico) e BAD (bagaço de cana pré-tratado com ácido diluído e deslignificado com NaOH).

Tabela IV.1. Dados de hidrólise enzimática com reciclo (MACHADO, 2018).

Tipo de teste	Tempo (h)	Glicose (g/L) - BH	Glicose (g/L) - BAD
4 × 12 h	12	39,00 ± 0,13	47,83 ± 0,98
	24	51,57 ± 0,91	58,08 ± 0,68
	36	62,79 ± 0,76	68,85 ± 0,32
	48	75,47 ± 0,41	84,99 ± 0,30
4 × 24 h	12	35,29 ± 0,08	49,59 ± 0,29
	24	47,12 ± 0,23	64,51 ± 1,37
	36	56,73 ± 0,27	75,25 ± 1,43
	48	62,10 ± 0,12	82,93 ± 0,38
	60	70,75 ± 0,08	85,34 ± 0,26
	72	73,04 ± 0,04	97,11 ± 1,11
	84	84,22 ± 0,66	109,61 ± 0,42
	96	86,96 ± 0,71	117,84 ± 3,56
4 × 48 h	12	36,06 ± 0,54	45,20 ± 2,75
	24	44,62 ± 0,20	57,09 ± 0,45
	36	50,74 ± 0,10	60,95 ± 0,11
	48	55,65 ± 1,67	69,41 ± 0,07
	60	63,02 ± 0,53	81,42 ± 0,59
	72	69,23 ± 0,59	86,16 ± 1,24
	84	73,25 ± 1,05	88,17 ± 0,42
	96	76,38 ± 0,00	90,50 ± 1,03
	108	80,52 ± 0,26	92,99 ± 0,23
	120	87,81 ± 1,70	94,10 ± 1,54
132	89,24 ± 0,17	98,05 ± 0,05	

Tabela IV.1. (continuação)

	144	91,22 ± 0,76	102,10 ± 0,29
	156	97,08 ± 0,56	108,13 ± 0,34
4 × 48 h	168	98,53 ± 0,55	110,75 ± 0,33
	180	104,05 ± 0,46	114,79 ± 1,37
	192	104,78 ± 0,18	122,48 ± 2,98