

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

**THALITA JESSIKA BONDANCIA**

**ROTAS VERDES PARA OBTENÇÃO DE NANOCELULOSE EM BIORREFINARIAS:  
DESENVOLVIMENTO DE ESTRATÉGIAS VIA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA E COM  
ÁCIDOS ORGÂNICOS**

**SÃO CARLOS  
2020**

**THALITA JESSIKA BONDANCIA**

**ROTAS VERDES PARA OBTENÇÃO DE NANOCELULOSE EM BIORREFINARIAS:  
DESENVOLVIMENTO DE ESTRATÉGIAS VIA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA E COM  
ÁCIDOS ORGÂNICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Química, área de concentração Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos.

Orientadora: Dra. Cristiane Sanchez Farinas

SÃO CARLOS

2020





## UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

---

### Folha de Aprovação

---

Defesa de Tese de Doutorado da candidata Thalita Jessika Bondancia, realizada em 29/05/2020, com o título: Rotas verdes para obtenção de nanocelulose em biorrefinarias: desenvolvimento de estratégias via hidrólise enzimática e com ácidos orgânicos

#### Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Cristiane Sanchez Farinas (EMBRAPA), participando à distância

Prof. Dr. Francys Kley Vieira Moreira (UFSCar), participando à distância

Profa. Dra. Henriette Monteiro Cordeiro de Azeredo (EMBRAPA), participando à distância

Prof. Dr. Caio Gomide Otoni (UNICAMP), participando à distância

Prof. Dr. Luiz Henrique Capparelli Mattoso (EMBRAPA), participando à distância

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

A Ata de Defesa, assinada pelos membros da Comissão Julgadora, consta no Sistema Eletrônico de Informações da UFSCar (SEI) e na Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

**DEDICATÓRIA**

À minha mãe, Maria (*in memoriam*), minha base,  
às minhas irmãs, Lilyann e Michelly, meu apoio,  
aos meus sobrinhos Gabriel, Maria, Teresa, Francisco e Maria Luiza, minha alegria,  
ao meu amado Rafael, minha companhia,  
aos amigos, minha motivação,  
com todo meu amor,  
dedico.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida;

à minha mãe (*in memoriam*) por ter me permitido sonhar, por toda motivação - por ser minha inspiração;

às minhas irmãs Lilyann e Michelly, por serem minha base e meu apoio incondicional, aos meus sobrinhos Gabriel, Maria, Teresa, Francisco e Maria Luiza pela inocência e pelo amor puro e verdadeiro - agradeço pela compreensão nas ausências atribuídas ao trabalho;

ao Rafael, por todo companheirismo, amor e incentivo – agradeço pelo suporte e por todos os anos de cumplicidade, essenciais em minha jornada;

à Dr<sup>a</sup>. Cristiane pela orientação, por me ajudar a colher os frutos científicos e pelos anos de convivência – agradeço pelo conhecimento compartilhado;

ao Dr. Luiz Mattoso, minha inspiração como ser humano e cientista - agradeço por todo auxílio, incentivo, pela sabedoria de cada palavra e por ser exemplo de grandeza e humildade – agradeço por ter me iniciado na pesquisa;

à Dr<sup>a</sup>. Eliangela – por todas as conversas e experiências;

às grandes amigas de graduação, Paula e Bianca que ainda se fazem presentes em todos os momentos – agradeço por todos os anos de amizade e parceria;

aos colegas de Embrapa, de maneira especial ao Jhony, Lili, Carla, Aniele, Amanda Giroto, Rodrigo Scheneider, Vítor, Max, Pedro Ivo, Alex, Paulo, Augusto, Gelson, João, Ana Carolina Côrrea e Adriana de Campos - por todos os cafés, ciência, conversas e churrascos;

aos colegas de sala (Sibéria ou sala 34), ao Marcos Lorevice, por todas as conversas, estadias em Campinas e por tantos anos de parceria, à Dra. Camila Florencio, pelas trocas de experiência e pela disposição em me auxiliar nas indefinidas situações de trabalho; à Jéssica de Aguiar, minha parceira de

laboratório, por tantas conversas, todo auxílio e paciência – agradeço por tornarem tudo mais leve;

aos colegas de DEQ em especial, a Letícia, Taíse, Mariane - por todos os futsais jogados às terças-feiras, pelos conselhos, pelos encontros e pelas risadas, também agradeço à Mayara, Laiane, Carolzita, Manu, Naty, Eduardo Alexandrina, Flávia e Guilhermina – agradeço por todos os momentos partilhados;

aos colegas do laboratório de Agroenergia, em especial a Mariana Brondi, Ludimila, Grazi, Rodrigo Klaic, Roger e Marina Maluf – por tantas conversas e apoio;

aos analistas, pesquisadores e funcionários da Embrapa Instrumentação, de maneira especial a Vivi, Silviane, Adriana Thomazy, Alice Raabe, Joana Bresolin, Paulo Lasso, Luiz Matteo, Godoy, Rene, Jaque, Ana Maria Felicori, Elita, Marisa, Dr<sup>a</sup>. Ette e Dr. Marconcini – por todo suporte e dedicação;

à Embrapa Instrumentação, pela estrutura de pesquisa – por todo o aprendizado, desde a época de ensino médio;

ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química (PPGEQ), aos professores e secretários, à Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) – agradeço pela formação;

ao LNNano - Laboratório Nacional de Nanotecnologia, CNPEM/MCTIC – por disponibilizar estrutura para análises de AFM;

à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 – pela bolsa concedida e pelo fomento à pesquisa;

ao CNPq e à FAPESP – pelo fomento à pesquisa;

a todos que contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho – gratidão!

*“O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada.  
Caminhando e semeando, no fim terás o que colher”  
(Cora Coralina)*



## RESUMO

A demanda crescente por materiais obtidos de fontes sustentáveis com potencial de substituir polímeros à base de petróleo em aplicações tecnológicas coloca a biomassa lignocelulósica como uma matéria-prima promissora. Nesse contexto, a nanocelulose tem atraído interesse por suas inúmeras propriedades e funcionalidades. Neste trabalho, foram estudadas diferentes rotas verdes associadas ao conceito de biorrefinaria para obtenção de nanocristais de celulose (NCC) e nanofibrilas de celulose (NFC) em biorrefinarias. Inicialmente foi investigada a utilização de diferentes coquetéis enzimáticos para a obtenção de nanocelulose a partir da polpa de celulose de eucalipto (material modelo). Os resultados mostraram que os coquetéis com maiores atividades das enzimas xilanases e endoglucanases favoreceram a obtenção de estruturas nanométricas mais uniformes. Em contrapartida, a liberação de glicose foi superior para a hidrólise enzimática realizada por complexos contendo a classe de enzimas monoxigenases líticas de polissacarídeos (LPMO), que também resultou em nanoestruturas com maiores índices de cristalinidade. A polpa de celulose de eucalipto também foi usada para estudar a obtenção de nanocelulose via hidrólise com ácido cítrico, um ácido orgânico que pode ser produzido na biorrefinaria. Essa abordagem é capaz de realizar a extração e a esterificação das nanoceluloses em uma única etapa, produzindo nanomateriais com grupos superficiais que favoreceram a estabilidade coloidal das suspensões em meio aquoso. Outra vantagem desse método foi a maior estabilidade térmica dos nanomateriais em comparação aos obtidos usando ácido sulfúrico. Com bases nesses resultados, avaliou-se o emprego da rota enzimática e com ácido cítrico para o bagaço de cana-de-açúcar. O primeiro estudo envolveu o tratamento hidrotérmico, organossolve e posteriormente passou por um processo de branqueamento por uma mistura de peróxido de hidrogênio e hidróxido de sódio no bagaço de cana. Após a etapa de pré-tratamento, foi realizada a hidrólise enzimática utilizando complexo celulolítico comercial para obtenção de glicose integrada à liberação de nanoestruturas. O segundo estudo envolveu a hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado pelo processo hidrotérmico, que após a liberação dos açúcares fermentescíveis foi tratado pelo método organossolve e sucessivamente branqueado. O material residual branqueado foi então submetido a três diferentes tratamentos ácidos: ácido sulfúrico, ácido cítrico e mistura destes dois ácidos. Em ambos estudos, após os tratamentos organossolve, 55% da lignina residual foi recuperada com potencial de ser utilizada em outras aplicações. A rota enzimática permitiu a obtenção de nanoestruturas com elevada estabilidade térmica associadas à elevada liberação de glicose, que pode ser usada na produção de etanol, ácidos orgânicos e outros bioprodutos. Já a extração usando ácido cítrico e a mistura de ácidos resultaram em materiais de elevada estabilidade térmica e boa estabilidade coloidal, atribuída à presença de grupos funcionais carregados na superfície do material. Além disso, todos os métodos resultaram em materiais nanocelulósicos com elevado índice de cristalinidade. Os resultados obtidos usando diferentes rotas verdes de obtenção de nanocelulose poderão contribuir para a seleção do método de acordo com a aplicação desejada de forma a agregar valor aos resíduos das biorrefinarias.

**Palavras-Chave:** Nanocelulose, biorrefinaria, hidrólise enzimática, hidrólise com ácidos orgânicos, produtos de biorrefinaria.

## ABSTRACT

The growing demand for materials from sustainable sources with potential to replace petroleum-based polymers in technological applications projects lignocellulosic biomass as a promising raw material. In this context, nanocellulose has attracted interest due to its numerous properties and functionalities. In this work, different green routes associated with the concept of biorefinery to obtain cellulose nanocrystals (NCC) and cellulose nanofibrils (NFC) in biorefineries were studied. Initially, the use of different enzymatic cocktails was investigated obtain nanocellulose from eucalyptus cellulose pulp (model material) were evaluated. The results showed that cocktails with greater activity of the enzymes xylanases and endoglucanases favored the achievement of more uniform nanometric structures. In contrast, higher glucose release was reached when the enzymatic hydrolysis was performed by complexes containing the class of polysaccharide lytic monooxygenase enzymes (LPMO), which also resulted in nanostructures with higher crystallinity levels. Another method evaluated for nanocellulose extraction was the hydrolysis with citric acid, an organic acid that can be obtained in a biorefinery concept. This approach resulted in a single-step extraction and esterification of the nanocelluloses. Also, the charged surface groups of these nanomaterials improved the colloidal stability of the suspensions in aqueous medium. Another advantage of this method was the higher thermal stability of these nanomaterials compared to those obtained by using sulfuric acid. Based on these results, the use of the enzymatic route and citric acid for sugarcane bagasse was evaluated. Initially, study involved hydrothermal treatment, organosolv followed by the sugarcane bagasse bleaching by a mixture of hydrogen peroxide and sodium hydroxide. After these treatments, the bagasse was hydrolyzed by a commercial cellulolytic cocktail in order to obtain the glucose release integrated with the production of nanostructures. The subsequent study involved the enzymatic hydrolysis of the pre-treated bagasse by the hydrothermal process, which after the release of fermentable sugars was treated by the organosolve method and successively bleached submitted. The bleached residual material was then submitted to three different acid treatments: sulfuric acid, citric acid and a mixture of both acids. In both studies, after the organosolv treatment, 55.8% of the residual lignin was recovered with the potential to be used in other applications. The enzymatic route allowed the obtention of nanostructures with high thermal stability associated with a high glucose release, which can be used in the production of ethanol, organic acids and other bioproducts. The extraction by citric acid and by using a mixture of acids resulted in a nanocellulose with high thermal stability and good colloidal stability, attributed to the presence of charged functional groups on the material surface. In addition, all methods resulted in nanocellulosic materials with a high crystallinity index. Finally, the results here obtained by using different green routes for nanocellulose production may contribute to the selection of the method according to the desired application, in order to add value to the biorefineries residues.

**Keywords:** Nanocellulose, biorefinery, enzymatic hydrolysis, hydrolysis by organic acids, biorefinery products.

## PUBLICAÇÕES

### *Artigos científicos publicados em revista especializada*

BONDANCIA, T.J.; AGUIAR, J.; BATISTA, G.; CRUZ, A.J.G.; MARCONCINI, J.M.; MATTOSO, L.H.C.; FARINAS, C.S. Production of nanocellulose using citric acid in a biorefinery concept: effect of the hydrolysis reaction time and techno-economic analysis. *Industrial and Engineering Chemistry Research*. v.59, p.11505-11516, 2020. DOI: [10.1021/ACS.IECR.0C01359](https://doi.org/10.1021/ACS.IECR.0C01359).

BONDANCIA, T.J.; MATTOSO, L.H.C.; MARCONCINI, J.M.; FARINAS, C.S. A new approach to obtain cellulose nanocrystals and ethanol from eucalyptus cellulose pulp via the biochemical pathway. *Biotechnology Progress*, v.33, p.1085-1095, 2017. DOI: [10.1002/BTPR.2486](https://doi.org/10.1002/BTPR.2486).

BONDANCIA, T.J.; CORREA, L.J.; CRUZ, A.J.G.; BADINO, A.C.; MARCONCINI, J.M.; MATTOSO, L.H.C.; FARINAS, C.S. Enzymatic production of cellulose nanofibers and sugars in a stirred-tank reactor: determination of impeller speed, power consumption and rheological behavior. *Cellulose*, v. 25, p.4499-4511, 2018. DOI: [10.1007/S10570-018-1876-2](https://doi.org/10.1007/S10570-018-1876-2).

AGUIAR, J.; BONDANCIA, T.J.; CLARO, P.I.C.; MATTOSO, L.H.C.; FARINAS, C.S.; MARCONCINI, J.M. Enzyme deconstruction of sugarcane bagasse and straw to obtain cellulose nanomaterials. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, v8, p. 2287-2299, 2020. DOI: [10.1021/ACSSUSCHEMENG.9B06806](https://doi.org/10.1021/ACSSUSCHEMENG.9B06806).

### *Trabalhos publicados em anais de eventos científicos*

BONDANCIA, T.J.; CORREA, L.J.; CRUZ, A.J.G.; BADINO, A.C.; MARCONCINI, J.M.; MATTOSO, L.H.C.; FARINAS, C.S. Production of cellulose nanofibers by enzymatic hydrolysis in a stirred tank reactor. XXI Simpósio Nacional de

Bioprocessos (SINAFERM), 2017, Aracaju. Anais do XXI Simpósio Nacional de Bioprocessos.

BONDANCIA, T.J.; MATTOSO, L.H.C.; MARCONCINI, J.M.; FARINAS, C.S. An integrated approach to obtain cellulose nanocrystals and ethanol using Eucalyptus cellulose pulp as feedstock. 39th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals. 2017, São Francisco. Anais do 39th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, 2017.

BATISTA, G.; BONDANCIA, T.J.; FARINAS, C.S.; CRUZ, A.J.G. Effect of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> recovery on the economic feasibility of nanocellulose production in a sugarcane biorefinery. XXII Simpósio Nacional de Bioprocessos (SINAFERM), 2019, Uberlândia, MG. Anais do XXII Simpósio Nacional de Bioprocessos.

BONDANCIA, T.J.; MARCONCINI, J.M.; MATTOSO, L.H.C.; FARINAS, C.S. Obtenção de nanocelulose integrada à produção de etanol 2G. XXI Congresso Brasileiro de Engenharia Química (COBEQ), 2016, Fortaleza – CE. Anais do XXI Congresso Brasileiro de Engenharia Química.

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 4. 1 Perfil enzimático de atividade, avaliação de proteína e FPASE de coquetéis comerciais.....	36
Tabela 4. 2 $\zeta$ -potencial de nanocelulose obtida após 96h de hidrólise enzimática com diferentes complexos comerciais .....	50
Tabela 5. 1 Índice de cristalinidade, dimensões e rendimentos para amostras de nanocelulose obtidas após diferentes tempos de hidrólise ácida.....	60
Tabela 5. 2 Potencial $\zeta$ aparente e grau de substituição obtido por RMN para NCC produzido após diferentes tempos de hidrólise ácida.....	62
Tabela 5. 3 Temperatura inicial de degradação, temperatura máxima de degradação e resíduo para amostras obtidas após diferentes tempos de hidrólise ácida .....	66
Tabela 6. 1 Composição química do bagaço de cana-de-açúcar antes dos tratamentos e após tratamento hidrotérmico, organosolve e branqueamento .....	78
Tabela 7. 1 Tamanho médio de partícula (Zd), índice de polidispersividade (PDI) e carga líquida superficial ( $\zeta$ -potencial) para nanocelulose obtida por diferentes métodos de extração para a biomassa de cana-de-açúcar pré-tratada .....	103
Tabela 8. 1 Tamanho médio de partícula (Zd), índice de polidispersividade (PDI) e carga líquida superficial ( $\zeta$ -potencial) para nanocelulose obtida por diferentes métodos de extração para a biomassa de cana-de-açúcar pré-tratada .....	113

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3. 1 – Exemplos de produtos de valor agregado que podem ser produzidos no cenário das biorrefinarias. Adaptado de De Paula et al., 2019. ....	8
Figura 3. 2 – Estrutura da biomassa lignocelulósica e seus principais componentes – Adaptado de Isikgor & Becer, 2015 e de Zhang & Lynd, 2004. ....	12
Figura 3. 3 - Esquema representativo da desconstrução da celulose por ação de enzimas hidrolíticas. Abreviações: CBH – celobiohidrolases, CBM – módulo de ligação a carboidrato, CDH – celobiose desidrogenase, EG – endoglucanase, AA9 – auxiliary activity 9. Adaptado de Horn et al., 2012. ....	15
Figura 3. 4 – (a) Desintegração da madeira para formação de nanocelulose (b) representação de nanocristais de celulose e nanofibrilas de celulose; (c) e (d) microscopia eletrônica de transmissão de NCC – adaptado de Kontturi et al., 2018; (e) NFC de polpa kraft (Tonoli et al., 2012); (f) NFC de bagaço de cana-de-açúcar (Campos et al., 2013).....	16
Figura 4. 1 Perfil temporal de hidrólise enzimática da polpa de celulose em teor de sólidos de 5% (m/v) e carga de enzima de 20 mg/g celulose - (a) liberação de glicose; (b) conversão de celulose .....	39
Figura 4. 2 Açúcar redutor total - ART (g/L) para hidrólise enzimática em função do tempo para diferentes complexos comerciais .....	41
Figura 4. 3 Microscopia de Força Atômica para nanocelulose obtida por hidrólise enzimática em teor de sólidos 5% (m/v) e carga de enzimas de 20 mg/ g celulose da polpa de celulose (a) Cellic ctec 3; (b) Cellic Ctec 2; (c) Serzym 50; (d) Carezyme..	43
Figura 4. 4 Histograma de distribuição de tamanho e diâmetro (nm) para as medidas de nanocelulose obtidas após hidrólise enzimática com diferentes coquetéis enzimáticos .....	45
Figura 4. 5 DRX deconvoluído para nanocelulose obtida após hidrólise enzimática para diferentes complexos enzimáticos após 96 h - (a) Cellic Ctec 3; (b) Cellic Ctec 2; (c) Serzym; (d) Carezyme. (e) Evolução do índice de cristalinidade em função do tempo .....	48
Figura 4. 6 Proposta de formação de nanocelulose por rota enzimática e mecanismo de oxidação por enzimas do tipo AA9 – Arquivo próprio .....	51

Figura 5. 1 AFM para nanocelulose obtida após reação com ácido cítrico em diferentes tempos de hidrólise: (a) 1,5h; (b) 3h; (c) 4,5h e (d) 6h.....	58
Figura 5. 2 Difratoogramas de raio-x deconvoluídos para nanocelulose obtida após diferentes tempos de hidrólise com ácido cítrico (a) 1.5 h (b) 3 h (c) 4.5 h e (d) 6 h	61
Figura 5. 3 Espectros de FT-IR para NCC obtida para diferentes tempos de hidrólise (1,5h, 3h, 4,5h, e 6 h), em comparação com a polpa de celulose de partida .....	63
Figura 5. 4 (a) Espectros Multi-CP para polpa de cellulose e CNC produzido usando diferentes tempos de hidrólise com ácido cítrico; (b) zoom da região espectral entre 134 e 124 ppm .....	64
Figura 5. 5 Análise termogravimétrica da polpa de cellulose (●) e do CNC produzido em diferentes tempos de reação: 1,5h (■), 3 h (◆), 4.5 h (☆), and 6 h (▲) (b)variação da massa em função da temperatura.....	66
Figura 6. 1 Bagaço de cana-de-açúcar antes e após os diferentes pré-tratamentos: (a) bagaço in natura; (b) tratamento hidrotérmico (HT); (c) tratamento organossolve (OS); (d) tratamento hidrotérmico, organossolve, branqueado (HT+OS+B); (e) tratamento hidrotérmico, hidrólise enzimática, organossolve, branqueado (HT+HE+OS+B); (e) Lignina recuperada do tratamento organossolve.....	80
Figura 6. 2 Microscopia Eletrônica de Varredura (a) e (b) bagaço in natura; (c) e (d) bagaço após tratamento hidrotérmico (HT); (e) e (f) bagaço após tratamentos hidrotérmico + organossolve (HT+OS).....	82
Figura 6. 3 Fator de severidade calculado para diferentes tratamentos: (a) hidrotérmico - 195°C por 10 minutos; (b) organossolve - 200 °C por 90 minutos.....	84
Figura 6. 4 Hidrólise enzimática da celullignina em teor de sólido de 15% e 20% (m/v), enzima cellic Ctec 3 em 10 FPU/ g biomassa a pH 5, 50°C - (a) liberação de glicose; (b) conversão de celulose .....	85
Figura 6. 5 Hidrólise enzimática após diferentes testes de concentração de peróxido usado na etapa de branqueamento após tratamento hidrotérmico (5%, 11% - 1 e 2x, 24% v/v) .....	87
Figura 6. 6 Difratoograma de raio-X: (a) Bagaço in natura; (b) bagaço com tratamento hidrotérmico (HT); (c) Bagaço após tratamento hidrotérmico, tratamento organossolve e branqueamento com mistura de peróxido de hidrogênio e hidróxido de sódio (HT+OS+B); (d) Bagaço hidrotérmico após hidrólise enzimática com posterior tratamento organossolve e branqueamento (HT+HE+OS+B) .....	88

Figura 7. 1 Fluxograma de produção de nanocelulose por hidrólise enzimática após as diferentes etapas de tratamento .....	91
Figura 7. 2 – Hidrólise enzimática após 96h em teor de sólidos 15% (m/v) e carga de enzima 10 FPU/ g biomassa em bagaço HT+OS+B (a) liberação de glicose; (b) conversão de celulose.....	94
Figura 7. 3 - Microscopia de Força Atômica (AFM) para nanocelulose obtida por hidrólise enzimática em reação com teor de sólidos 15% (m/v) e carga enzimática de 10 FPU/ g biomassa em bagaço branqueado - (a) 48h; (b) 96h .....	95
Figura 7. 4 DRX – (a) bagaço após tratamento hidrotérmico, seguido de organossolve e branqueado prévio a hidrólise enzimática (HT+OS+B); (b) bagaço HT+OS+B após 48 h de hidrólise enzimática; (c) bagaço HT+OS+B após 96h de hidrólise enzimática.....	97
Figura 7. 5 - Espectros de FTIR para o bagaço de cana in natura, bagaço tratado e branqueado (HT+OS+B) e submetido à hidrólises enzimáticas em diferentes tempos; .....	98
Figura 7. 6 - Espectros de multiCP (a) Bagaço tratado e branqueado e após as respectivas hidrólises enzimáticas em diferentes tempos;.....	100
Figura 7. 7 – (a) Curvas de análise termogravimétrica (TGA) obtida para atmosfera de N <sub>2</sub> ; (b) Derivada termogravimétrica (DTG) para bagaço HT+OS+B (■) e NCC obtido após 96 h de hidrólise enzimática (▼).....	101
Figura 8. 1 Fluxograma da obtenção de nanocelulose por hidrólise ácida após diferentes etapas de tratamento.....	106
Figura 8. 2 Microscopia de Força Atômica para nanocelulose obtida por hidrólise ácida do bagaço branqueado (HT+HE+OS+B) com diferentes ácidos: (a) NCC extraído por ácido sulfúrico a 45 °C por 1 h; (b) NCC extraído por ácido cítrico a 120°C e 4,5 h de reação; (c) NCC extraído por mistura de ácido cítrico e ácido sulfúrico a 100 °C por 4,5h de reação .....	111
Figura 8. 3 DRX (a) Bagaço pós tratamento hidrotérmico, submetido a hidrólise enzimática, tratamento organossolve e branqueamento (HT+HE+OS+B); (b) NCC extraído com ácido sulfúrico; (c) NCC obtido por extração com ácido cítrico; (d) NCC extraído com mistura de ácido cítrico e sulfúrico.....	115



Figura 8. 4 Espectros de FTIR para bagaço pós tratamento hidrotérmico, submetido a hidrólise enzimática, tratamento organossolve e branqueamento (HT+HE+OS+B); (b) hidrólise do bagaço (HT+HE+OS+B) com ácido sulfúrico 45°C por 1h; (c) hidrólise do bagaço (HT+HE+OS+B) com ácido cítrico a 120°C por 4,5h de reação; (d) hidrólise do bagaço (HT+HE+OS+B) com mistura de ácido cítrico e sulfúrico a 100°C por 4,5h .....	117
Figura 8. 5 Espectros de multiCP - Bagaço tratado e branqueado com posterior hidrólise ácida usando diferentes ácidos com zoom da região espectral de 190 a 160 ppm .....	118
Figura 8. 6 (a) Curvas de análise termogravimétricas (TGA) obtida para atmosfera de N <sub>2</sub> em forma ácida; (b) Derivada termogravimétrica (DTG) para bagaço após tratamento hidrotérmico hidrolisado, organossolve e branqueado (♦) NCC extraído por ácido sulfúrico (●); NCC extraído por ácido cítrico (▲) e NCC extraído por mistura de ácido cítrico e ácido sulfúrico (★) .....	119

## LISTA DE ABREVIATURAS

- AA9 - Auxiliary Activity 9 (atividade auxiliar 9)
- AFM – Microscopia de Força Atômica
- B – Branqueamento
- BSA – Soro albumina bovina
- BCA – Ácido biocinconínico
- CBH – Celobiohidrolase
- CBM – Módulo de ligação a carboidrato
- Cit-NCC – Nanocristais de celulose obtidos por ácido cítrico
- Cit-S-NCC – Nanocristais de celulose obtidos por mistura de ácido cítrico e sulfúrico
- CMC – Carboximetil celulose
- DNS – Ácido dinitrosalicílico
- DS – Grau de substituição
- DRX – Difração de raio-X
- DTG – Derivada termogravimétrica
- FPU – Unidade de papel filtro
- FPA – Atividade de papel filtro
- FS – Fator de severidade
- FTIR – Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier
- GOD – Glicose oxidase
- HE – Hidrólise enzimática
- HT – Hidrotérmico
- IC – Índice de cristalinidade
- LPMO – Monoxigenases lítica de polissacarídeos
- LS – Lignina solúvel
- MA – Massa amostra
- MAH – Massa de alfacelulose
- MC – Massa do cadinho
- MCA – Massa do cadinho com amostra

MCE – Massa do charuto com extrativos

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

MF – Massa do funil

MFC – Massa do funil contendo amostra

MFH – Massa do funil contendo holocelulose

NCC – Nanocristais de celulose

NFC – Nanofibrilas de celulose

POD – Peróxido de hidrogênio

OS – Organossolve

ss-RMN – Ressonância Magnética Nuclear no estado sólido

S-NCC – Nanocristais de celulose obtidos por ácido sulfúrico

$T_i$  – Temperatura inicial

$T_{ref}$  – Temperatura de referência

TC – Teor de cinzas

TE – Teor de extrativos

TGA – Análise termogravimétrica

TL – Teor de lignina

TS – Teor de sólidos

UI – Unidade Internacional

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS .....	iii
RESUMO.....	vi
ABSTRACT .....	vii
PUBLICAÇÕES.....	viii
LISTA DE TABELAS .....	x
ÍNDICE DE FIGURAS .....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xv
1 INTRODUÇÃO .....	1
2 OBJETIVOS .....	5
2.1 Objetivos específicos .....	5
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
3.1 Biorrefinaria para produção integrada de nanocelulose e etanol 2G .....	6
3.2 Estruturas da biomassa lignocelulósica .....	11
3.3 Hidrólise enzimática e ação de enzimas celulolíticas .....	13
3.4 Nanocelulose: Propriedades e aplicações .....	15
3.5 Obtenção de nanocelulose via rota química .....	18
3.6 Obtenção de nanocelulose via rota enzimática .....	21
3.7 Obtenção de nanocelulose via outros processos alternativos e/ou verdes .....	24
4 DESCONSTRUÇÃO ENZIMÁTICA DA POLPA KRAFT DE EUCALIPTO PARA OBTENÇÃO DE NANOESTRUTURAS DE CELULOSE POR DIFERENTES CELULASES E ENZIMAS AUXILIARES.....	27
4.1 MATERIAIS .....	27
4.2 MÉTODOS .....	28
4.2.1 Atividades das enzimas presentes nos complexos comerciais.....	28

4.2.2 Atividade de endoglucanase .....	28
4.2.3 Atividade de $\beta$ -glicosidase .....	29
4.2.4 Atividade de xilanase .....	29
4.2.5 Atividade de exoglucanase (celobioidrolases) .....	30
4.2.6 Determinação da atividade total das celulases (FPASE) .....	32
4.2.7 Determinação de proteínas totais .....	33
4.2.8 Hidrólise enzimática para produção de nanocelulose .....	33
4.3 CARACTERIZAÇÕES .....	34
4.3.1 Medida de liberação de glicose e conversão de celulose .....	34
4.3.2 Avaliação da morfologia das nanoceluloses por Microscopia de Força Atômica (AFM) .....	34
4.3.3 Avaliação do índice de cristalinidade por Difração de Raios-X (DRX) .....	35
4.3.4 Avaliação da carga líquida superficial por potencial $\zeta$ aparente .....	35
4.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	36
4.4.1 Perfil de atividades dos complexos enzimáticos .....	36
4.4.2 Influência do complexo enzimático na liberação de açúcares .....	38
4.4.3 Influência do complexo enzimático na morfologia da nanocelulose .....	42
4.4.4 Avaliação do índice de cristalinidade .....	47
4.4.5. Potencial $\zeta$ aparente .....	50
4.5 CONSIDERAÇÕES PARCIAIS .....	52
5. PRODUÇÃO DE NANOFIBRILAS E NANOCRISTAIS DE CELULOSE USANDO O ÁCIDO CÍTRICO NO CONCEITO DE BIORREFINARIA: IMPACTO DO TEMPO DE HIDRÓLISE NAS PROPRIEDADES .....	53
5.1. MATERIAIS .....	53
5.2 MÉTODOS .....	53
5.2.1 Produção de nanofibrilas e nanocristais de celulose .....	53
5.2.2. Rendimentos de NCC e NFC .....	54

5.2.3 Microscopia de Força Atômica (AFM).....	55
5.2.4. Avaliação do Índice de Cristalinidade por Difração de Raios-X (DRX) .....	55
5.2.5 Potencial $\zeta$ aparente .....	55
5.2.6 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) .....	56
5.2.7 Ressonância Magnética Nuclear de $^{13}\text{C}$ no estado sólido (ss-NMR).....	56
5.2.8 Análise Termogravimétrica (TGA) .....	56
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	58
5.3.1 Efeito do tempo de reação da hidrólise na produção de NFC e NCC.....	58
5.3.2 Carga líquida superficial e química dos NCC .....	62
5.3.3 Estabilidade térmica.....	65
5.4. CONCLUSÕES PARCIAIS.....	68
6 ESTUDO DO PRÉ-TRATAMENTO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR VISANDO APROVEITAMENTO PARA PRODUÇÃO DE NANOCELULOSE .....	69
6.1 MATERIAIS .....	69
6.2 MÉTODOS .....	70
6.2.1 Pré-tratamento hidrotérmico .....	70
6.2.2 Pré-tratamento organossolve.....	70
6.2.3 Branqueamento .....	71
6.2.4 Hidrólise enzimática do bagaço após tratamento hidrotérmico.....	71
6.2.5 Caracterização química de constituintes .....	73
6.2.6 Determinação de cinzas .....	73
6.2.7 Determinação de teor de extrativos .....	73
6.2.8 Determinação de lignina .....	74
6.2.9 Determinação de holocelulose.....	75
6.2.10 Determinação de alfacelulose.....	76
6.2.11 Análise morfológica por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	76
6.2.12 Determinação do fator de severidade .....	76

6.2.13 Avaliação do índice de cristalinidade por Difração de Raios-X (DRX) .....	77
6.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	78
6.3.1 Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar .....	78
6.3.2 Caracterização química de constituintes .....	78
6.3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura do bagaço <i>in natura</i> e após tratamentos .....	81
6.3.4 Fator de severidade dos pré-tratamentos .....	83
6.3.5 Seleção das condições de hidrólise enzimática e otimização das condições de branqueamento .....	85
6.3.6 Avaliação do índice de cristalinidade por Difração de Raios-X (DRX) .....	87
6.4 CONSIDERAÇÕES PARCIAIS .....	89
7 APROVEITAMENTO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR NA PRODUÇÃO DE AÇÚCARES E NANOCELULOSE PARA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA: ESTUDO DAS PROPRIEDADES .....	90
7.1 MATERIAIS .....	90
7.2 MÉTODOS .....	90
7.2.1 Produção de nanocelulose por rota enzimática .....	90
7.2.2 Obtenção de nanocelulose por hidrólise enzimática .....	91
7.3 CARACTERIZAÇÕES .....	92
7.3.1 Medida de liberação de glicose e conversão de celulose .....	92
7.3.2 Avaliação da morfologia das nanocelulose por Microscopia de Força Atômica (AFM) .....	92
7.3.3 Avaliação do índice de cristalinidade por Difração de Raio-X (DRX) .....	92
7.3.4 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) .....	92
7.3.5 Ressonância Magnética Nuclear de <sup>13</sup> C no estado sólido (ss-NMR) .....	92
7.3.6 Análise Termogravimétrica (TGA) .....	93
7.3.7 Avaliação da carga líquida superficial por potencial ζ aparente .....	93
7.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	94

7.4.1	Produção de nanocelulose e açúcares fermentescíveis por hidrólise enzimática.....	94
7.4.2	Avaliação do índice de cristalinidade por Difração de Raios-X (DRX) .....	96
7.4.3	Avaliação dos grupos funcionais por Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho (FTIR) .....	98
7.4.4	Avaliação dos grupos funcionais por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) .....	99
7.4.5	Avaliação térmica por análise termogravimétrica (TGA).....	101
7.4.6	Avaliação da estabilidade coloidal e carga líquida superficial por Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e potencial $\zeta$ aparente.....	102
7.5	CONSIDERAÇÕES PARCIAIS .....	104
8	APROVEITAMENTO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR PARA PRODUÇÃO DE NANOCRISTAIS DE CELULOSE POR uma combinação de ácidos orgânicos e minerais.....	105
8.1	MATERAIS .....	106
8.2	MÉTODOS .....	106
8.2.1	Obtenção de nanocelulose por hidrólise ácida com diferentes ácidos .....	106
8.2.2	Obtenção de nanocelulose por hidrólise com ácido sulfúrico .....	107
8.2.3	Hidrólise com ácido cítrico .....	107
8.2.4	Hidrólise com mistura de ácido sulfúrico e ácido cítrico.....	108
8.3	CARACTERIZAÇÕES .....	108
8.3.1	Avaliação da morfologia das nanocelulose por Microscopia de Força Atômica (AFM).....	108
8.3.2	Avaliação da carga líquida superficial por potencial $\zeta$ aparente.....	108
8.3.3	Avaliação do índice de cristalinidade por Difração de Raios-X (DRX) .....	108
8.3.4	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) ....	109
8.3.5	Ressonância Magnética Nuclear de $^{13}\text{C}$ no estado sólido (ss-NMR).....	109
8.3.6	Análise Termogravimétrica (TGA).....	109



8.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	110
8.4.1 Avaliação da morfologia das nanocelulose por Microscopia de Força Atômica (AFM).....	110
8.4.2 Avaliação da estabilidade coloidal e carga líquida superficial por Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e potencial $\zeta$ aparente .....	113
8.4.3 Avaliação do índice de cristalinidade por Difração de Raios-X (DRX) .....	114
8.4.4. Avaliação dos grupos funcionais por Espectroscopia de absorção na região do Infra vermelho (FTIR).....	116
8.4.5. Ressonância Magnética Nuclear (RMN) para avaliação de grupos funcionais e índice de cristalinidade .....	118
8.4.6. Avaliação térmica por análise termogravimétrica (TGA).....	119
8.5 CONSIDERAÇÕES PARCIAIS .....	121
9 CONCLUSÕES .....	123
9.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....	125
10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	126

## 1 INTRODUÇÃO

Há uma crescente demanda por materiais obtidos de fontes sustentáveis com capacidade de substituir polímeros à base de petróleo em aplicações tecnológicas. Dada a sua natureza renovável, a biomassa lignocelulósica se destaca como matéria-prima promissora para substituir recursos fósseis nas biorrefinarias. Análogo ao conceito de refinaria de petróleo, as biorrefinarias englobam o processamento sustentável da biomassa para a obtenção de uma gama de produtos comerciais e vêm como uma das opções mais viáveis para as indústrias no futuro (Chandel et al., 2019; Ribeiro et al., 2019). No entanto, para viabilização econômica das biorrefinarias é fundamental o desenvolvimento de processos que integrem a produção de biocombustíveis e outros produtos de elevado valor agregado.

No cenário brasileiro, a cana-de-açúcar, principal insumo da produção de etanol, se destaca como uma matéria-prima capaz de atender à demanda emergente de novos produtos de base biológica. Segundo dados da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), foram colhidas 642,7 milhões de toneladas de cana-de-açúcar na safra de 2019/2020 (CONAB,2020). As usinas sucroalcooleiras podem ser consideradas exemplos de uma biorrefinaria, já que sua produção pode se basear na obtenção de etanol, açúcar e a cogeração de energia a partir da queima do bagaço, visando o uso total da biomassa (Leal et al., 2013; Nizami et al., 2017). No processamento da cana nas usinas, cada tonelada pode produzir em torno de 250 kg de bagaço e 200 kg de palha. Atualmente estes subprodutos são destinados principalmente para queima na geração de calor e eletricidade da usina (Santos et al., 2019). No entanto, devido a sua diversificada matriz lignocelulósica, é possível reformular o papel econômico da cana, transformando o que seria considerado resíduo em matéria-prima para fabricação de novos produtos através de diferentes rotas de conversão. Como exemplo, parte do bagaço pode ser destinado para produção de etanol de segunda geração (2G).

No processo de produção de etanol 2G, a hidrólise enzimática constitui uma importante rota para a obtenção de açúcares solúveis. O principal objetivo neste processo é a desconstrução da parede celular, liberando polissacarídeos como uma fonte de açúcares fermentescíveis (de Paula et al., 2019). Apesar disso, devido à elevada recalcitrância da biomassa, elevadas cargas de enzima são necessárias

para atingir a completa sacarificação. Assim, o custo da enzima afeta significativamente a viabilidade econômica do processo (Farinas et al., 2018).

Uma das estratégias que pode minimizar o impacto econômico causado pela utilização de enzimas na produção de etanol 2G é a associação com processos que gerem produtos de alto valor agregado, como a nanocelulose. Os materiais nanocelulósicos se destacam por serem renováveis, apresentarem elevada razão de aspecto, alta área superficial, propriedades de baixo peso molecular, biodegradabilidade, considerável rigidez e resistência mecânica (Dufresne, 2019). Segundo o Global Market Insights, Inc. o mercado de nanocelulose deve ultrapassar U\$ 1 bilhão até 2024. Dentre os principais setores que devem impulsionar este mercado, estão o processamento de papel, revestimentos e principalmente uma forte demanda por materiais de embalagens sustentáveis e ecológicas da indústria de bebidas e de alimentos (Keeper, 2019).

A nanocelulose pode ser produzida na forma de nanofibrilas de celulose (NFC) ou nanocristais de celulose (NCC). Os métodos tradicionais de produção de nanocelulose incluem a rota química, utilizando ácidos inorgânicos como o ácido sulfúrico (Teixeira et al., 2011a). Porém, esse método tem a dificuldade de recuperação do ácido, neutralização da nanocelulose e menor estabilidade térmica frente a extração com outros ácidos. Assim, o estudo de novos métodos de produção de nanocelulose que sejam mais ambientalmente amigáveis são necessários. A rota enzimática é uma metodologia verde de extração, que tem como vantagem a produção de nanoestruturas com elevada estabilidade térmica, sem a utilização de reagentes tóxicos, baixo consumo de água no processo e a liberação de açúcares que podem ser usados na obtenção de biocombustíveis e outros bioprodutos (Bondancia et al., 2017; de Aguiar et al., 2020). No entanto, esta rota tem como desafios a variedade de tamanhos das estruturas obtidas, sendo importante estudar a atuação de diferentes classes de enzimas visando a melhor combinação para liberação de partículas mais cristalinas e uniformes (Hu et al., 2018; Siqueira et al., 2019).

Outra rota verde que permite a produção de nanocelulose no contexto de biorrefinarias é sua obtenção usando ácidos orgânicos. Dentre os diferentes ácidos reportados para extração de nanocelulose destaca-se o uso de ácido maleico (Bian et al., 2017; Wang et al., 2017), ácido oxálico (Li et al., 2017), ácido malônico

(Spinella et al., 2016), ácido cítrico em combinação com ultrassom (Ji et al., 2019) e ácido cítrico misturado com ácido clorídrico (Yu et al., 2019; Yu et al., 2016).

O ácido cítrico é um ácido orgânico biodegradável e relativamente barato que pode ser produzido por processos fermentativos, por exemplo, pelo fungo *Aspergillus niger* (Santos et al., 2019). A hidrólise da celulose com ácido cítrico pode contribuir para uma nova geração de nanomateriais anfífilos, uma vez que os grupos carboxila e hidroxila nas cadeias de celulose amorfa fornecem características hidrofílicas, enquanto os grupos carbonila incorporados nas regiões cristalinas conferem comportamento hidrofóbico (Malaspina & Farauo, 2019). Além disso, o baixo pKa (pKa1 de 3,15) do ácido cítrico permite que duas reações ocorram simultaneamente: a hidrólise da celulose amorfa e a esterificação de Fischer na superfície do material (Yu et al., 2016). O uso de ácidos orgânicos, como o ácido cítrico, permite obter materiais nanocelulósicos com elevada estabilidade coloidal e térmica (considerando processos com outros ácidos) e se apresenta como uma estratégia promissora, sustentável e ecológica. Portanto, é de grande interesse o estudo de condições do processo que permitiriam sua implementação em larga escala em futuras biorrefinarias.

Diante do exposto, torna-se claro o potencial de exploração que uma biorrefinaria permite, sendo possível a produção de uma ampla gama de produtos a partir da matéria-prima da agroindústria da cana-de-açúcar. Faz-se necessário, no entanto, que as propriedades dos materiais obtidos sejam comparáveis ou superiores aos já encontrados. Fato este que vem incentivando a busca por métodos mais amigáveis de extração e a partir de fontes renováveis. A produção de nanocelulose por rotas enzimáticas e com ácidos orgânicos, integrando também ao processo a obtenção de açúcares que podem ser usados para geração de outros produtos se torna uma alternativa.

A tese aqui apresentada foi estruturada nos seguintes capítulos:

Capítulo 1 – Introdução e contextualização do problema;

Capítulo 2 – Elucidação dos objetivos traçados frente aos problemas apresentados;

Capítulo 3 – Apresentação do estado da arte da obtenção de nanocelulose no contexto de biorrefinaria;

Capítulo 4 – Estudos de obtenção de nanocelulose para a rota usando diferentes coquetéis enzimáticos comerciais, visando elucidar a atuação de cada classe de enzima na desconstrução da celulose, tendo como substrato modelo a polpa de celulose;

Capítulo 5 – Estudo da produção de nanocelulose por uma rota verde com ácido cítrico em polpa de celulose. Neste capítulo foi estudada a influência do tempo de hidrólise nas propriedades físico-químicas do nanomaterial produzido;

Capítulo 6 – Estudo do pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar visando métodos mais ambientalmente corretos e buscando o menor custo associado ao processo. Nesta etapa também foi realizada a recuperação e a quantificação da lignina com capacidade de ser utilizada em outros processos.

Capítulo 7 – Estudos de obtenção e caracterização da nanocelulose por rota enzimática partindo de um bagaço de cana pré-tratado e apresentado no capítulo 6. Aqui a produção foi feita em uma rota integrada a produção de açúcares que podem ser fermentados para produção de ácidos orgânicos, biocombustíveis e outros produtos;

Capítulo 8 – Relação das etapas de produção de nanoestruturas por rota química tendo previamente o bagaço de cana sido tratado e apresentado no capítulo 6. Dentre as rotas utilizadas, a extração com ácido cítrico foi apresentada por se tratar de um ácido mais ambientalmente amigável;

Capítulo 9 – Conclusões do trabalho, bem como novas perspectivas a partir dos resultados aqui obtidos;

Capítulo 10 – Referências utilizadas como embasamento, elucidação e discussões apresentadas.

## 2 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o emprego de rotas verdes para obtenção de nanocelulose dentro do conceito de biorrefinaria, com foco na hidrólise enzimática e com ácidos orgânicos. Nessas estratégias, a produção de nanocelulose integrada à produção de açúcares solúveis foi avaliada visando a geração de produtos de interesse em aplicações industriais.

### 2.1 Objetivos específicos

- Estudar a interação de diferentes coquetéis enzimáticos contendo diferentes celulases e enzimas auxiliares na desconstrução da polpa de celulose (material modelo) visando entender a importância de cada classe de enzima na produção de nanocelulose;
- Obter nanocelulose por meio de um ácido orgânico com potencial de ser produzido a partir de açúcares produzidos na biorrefinaria e estudar as propriedades das nanoestruturas obtidas a partir da polpa de celulose buscando rotas mais verdes na produção, principalmente de nanocristais de celulose;
- Definir estratégias de pré-tratamentos mais ambientalmente amigáveis para o bagaço de cana-de-açúcar que contemplem a possibilidade de recuperação de produtos (como a lignina) com potencial de utilização em outros processos;
- Avaliar a produção de nanocelulose a partir do bagaço de cana em variadas configurações de processo tendo como metodologias as rotas enzimáticas e os processos com diferentes ácidos.
- Caracterizar as propriedades de todas as nanoestruturas produzidas sempre buscando elevados rendimentos de produção de nanocelulose associada à geração de estruturas puras e uniformes objetivando sempre os menores custos em cada etapa.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Biorrefinaria para produção integrada de nanocelulose e etanol 2G

Devido às questões de sustentabilidade econômica e preocupações ambientais, o interesse do mercado global pela produção de combustíveis, produtos químicos, energia e outros materiais têm sido direcionado para o uso de fontes renováveis, buscando substituir os insumos advindos de derivados de petróleo. Nesse contexto, a biomassa lignocelulósica se destaca como uma importante matéria-prima disponível a custos moderados e que apresenta menor concorrência com alimentos (Saini et al., 2019).

O conceito de biorrefinaria engloba a ideia de integração de processos de conversão sustentável da biomassa em carboidratos, visando a produção de combustíveis, energia e produtos químicos (Cherubini et al., 2009). Neste conceito, uma gama de processos físico-químicos, bioquímicos e microbianos podem ser usados nas operações de biorrefinaria, direcionadas à obtenção de produtos na indústria farmacêutica, alimentícia, saúde, dentre outros setores. Considerando o contexto de biorrefinaria, é possível se obter a valorização simultânea de diferentes produtos partindo de uma matéria-prima de baixo valor.

Atualmente, a maioria dos biocombustíveis e bioquímicos são produzidos em cadeias únicas, ou seja fora do conceito de biorrefinaria e geralmente fazem uso de materiais concorrentes à indústria de alimentação animal, tornando limitada sua possibilidade de exploração (Menon & Rao, 2012). Por outro lado, o contexto de biorrefinaria tem como biomassa de processamento, matérias-primas não pertencentes ao nicho de alimentação, como os resíduos agroindustriais. Outra vantagem de adoção do conceito de biorrefinaria é que as biomassas lignocelulósicas localmente disponíveis podem ser exploradas, favorecendo a economia de cada país (de Assis et al., 2017a; Menon & Rao, 2012; Nizami et al., 2017).

A completa conversão da biomassa em produtos de maior valor agregado envolve processos específicos e requer três etapas principais, sendo: 1) o pré-tratamento para a desconstrução da biomassa em cadeias menores, aumentando o acesso à celulose; 2) hidrólise enzimática para liberação de açúcares e finalmente 3)

fermentação e conversão dos açúcares monoméricos e bioproductos (de Paula et al., 2019).

Dentre os processos de pré-tratamentos com maior potencial de uso em biorrefinarias, destaca-se o hidrotérmico. Este tratamento visa principalmente a remoção da hemicelulose presente na biomassa. O método consiste na utilização de pressão para manter a água em estado líquido sob elevadas temperaturas (160 – 220 °C). A água então penetra na biomassa clivando ligações O-acetila e ácidos urônicos presentes na hemicelulose, levando à formação de ácido acético e outros ácidos orgânicos. Esses ácidos então promovem a solubilização de grande parte da hemicelulose e o rompimento de ligações glicosídicas dos polissacarídeos. Com a redução do pH do meio, parte dos açúcares dissolvidos dão origem a compostos como furfural e 5-hidroximetilfurfural (HMF), componentes inibitórios em etapas de fermentação (Alvira et al., 2010; Kim et al., 2009; Mosier et al., 2005). Apesar disso, esse tratamento tem como grande vantagem a utilização de água como reagente e a baixa corrosão de equipamentos, sendo interessante em termos econômicos e ambientais.

Outro pré-tratamento que se enquadra no conceito de biorrefinaria é o organossolve. Este processo ocorre na presença de solventes orgânicos em solução aquosa com elevada temperatura e pressão, porém apresenta um custo mais elevado que outros tratamentos. Ainda assim, a possibilidade de recuperação de seus subprodutos o torna interessante para o contexto de biorrefinaria. Dentre as vantagens deste método frente a processos com reagentes químicos estão a fácil recuperação do solvente por destilação, a recuperação da lignina como um sólido, a presença de carboidratos C5 e C6 em solução que podem ser usados como precursores em outros processos e a celulose em sua forma sólida (Kumar et al., 2009; Zhao et al., 2009). O mecanismo neste tratamento envolve as seguintes etapas: 1) hidrólise das ligações internas da lignina, bem como das estruturas de lignina-hemicelulose; 2) hidrólise das ligações glicosídicas nas hemiceluloses e em menor extensão da celulose; 3) formação de inibidores como furfural e 5-hidroximetilfurfural, seguida de reação de condensação entre lignina e aldeídos reativos. A clivagem das ligações éter é a principal responsável pela quebra da lignina. Portanto, o processo organossolve é eficiente para remoção da lignina e da



hemicelulose que dificultam etapas seguintes de hidrólise (Ferreira & Taherzadeh, 2020; McDonough, 1993; Zhao et al., 2009).

Conforme apresentado na Figura 3.1, a lignina e os açúcares C5 e C6 podem ser convertidos em vários produtos de interesse.

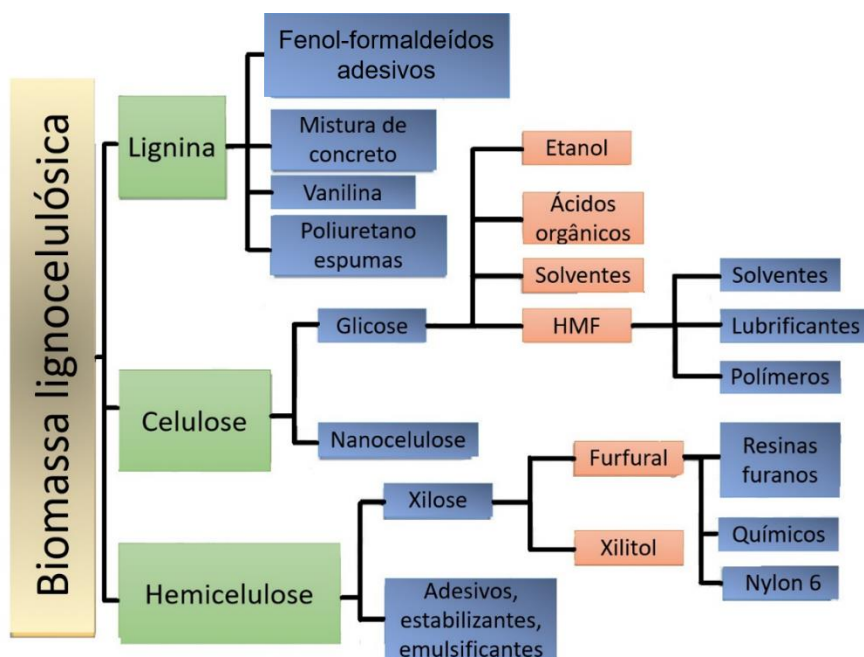


Figura 3. 1 – Exemplos de produtos de valor agregado que podem ser produzidos no cenário das biorrefinarias. Adaptado de De Paula et al., 2019.

Uma das rotas que levam a conversão dos carboidratos complexos em açúcares solúveis é a hidrólise enzimática. Devido à elevada recalcitrância da biomassa, a sacarificação completa dos carboidratos não é facilmente alcançada, resultando em um resíduo sólido com características de nanocelulose ou com potencial para sua produção (Bondancia et al., 2017; Camargo et al., 2016; de Aguiar et al., 2020). Alguns trabalhos têm demonstrado a viabilidade de integração de rotas para obtenção de açúcares fermentescíveis com produção associada de nanocelulose (Bondancia et al., 2018; de Aguiar et al., 2020; Teixeira et al., 2015; Zhu et al., 2011). Após a biomassa ser submetida à hidrólise enzimática, processos mecânicos podem ser usados para completar a fibrilação, já que a obtenção de nanoestruturas é facilitada pela prévia ação das celulasas e enzimas auxiliares (Cui et al., 2016; Filson et al., 2009; Paakko et al., 2007). A etapa enzimática prévia aos métodos mecânicos auxilia na redução do gasto em etapas de fibrilação,

evidenciando que o pré-tratamento com enzimas, geralmente endoglucanases, reduz as forças de cisalhamento necessárias para levar a celulose até a escala nanométrica (Liu et al., 2018). O sólido residual da etapa de hidrólise enzimática também pode ser utilizado para obtenção de nanocelulose por rotas ácidas, agregando valor a um resíduo de uma das etapas de obtenção de etanol 2G (Camargo et al., 2016; Mathew et al., 2014).

Um dos custos inerentes à produção de nanocelulose está relacionado à matéria-prima. Em escalas industriais, a polpa de celulose é a mais usada e pode representar até 60% dos custos do processo (de Assis et al., 2017b). Os custos relativamente altos da produção de nanocristais de celulose são derivados principalmente das etapas de purificação e reciclagem do ácido sulfúrico utilizado no processo. Considerando o processo, os custos de produção de nanocristais variam de 3632 a 4420 USD por tonelada seca de NCC tendo um preço mínimo de venda do produto (MPSP) de 7200 USD por tonelada de NCC seco (de Assis et al., 2017b). Já o custo referente à produção de nanofibrilas de celulose (NFC) em diferentes cenários tem valores entre 1893 a 2440 USD por tonelada de NFC seca, sendo os maiores custos associados à produção de NFC foram relacionados à polpa de celulose e à energia gasta nos processos de fibrilação (de Assis et al., 2018b). Assim, a utilização de novos materiais pode reduzir os custos, abrindo um caminho para o uso de resíduos agroindustriais como matéria-prima. A exploração de novas rotas de extração, como a integração de processos para obtenção associada de produtos, também é um fator que pode ser investigado visando à diminuição no custo de produção de nanocelulose em um contexto geral.

Considerando a integração de processos, o etanol 2G pode ser obtido pela fermentação dos açúcares liberados pela hidrólise enzimática utilizada na produção de nanocelulose. Economicamente, o etanol 2G ainda não é competitivo com o etanol de primeira geração (1G). Apesar disso, as matérias-primas do etanol 1G (cana-de-açúcar, milho, dentre outras) competem direta ou indiretamente com a indústria de alimento, enquanto o etanol 2G produzido a partir de resíduos, tem capacidade de produção em torno de 50% maior na produção dos açúcares. Na obtenção do etanol 1G os açúcares extraídos da cana por um processo físico são levados à fermentação por microrganismos. Já na rota 2G, uma desconstrução da matriz lignocelulósica é necessária, sendo que a celulose e a hemicelulose são

degradadas a açúcares e posteriormente podem ser fermentados para produção de etanol ou mesmo utilizado em outros setores da indústria. A atuação em conjunto das rotas 1G e 2G permite melhorar os custos do processo, principalmente em relação a gastos energéticos da etapa de destilação (Chandel et al., 2019; Macrelli et al., 2014).

Outra opção proposta para aumentar a viabilidade econômica da produção de etanol é incorporar a lignina como uma matéria-prima a ser vendida. Considerando a lignina com um valor 50% superior ao do bagaço, um retorno de 4% no processo global de produção de etanol é esperado. Apesar de um retorno considerado baixo, a lignina ainda não tem um mercado consolidado. Neste sentido, tem aumentado o número de pesquisas que a colocam como matéria-prima de vários produtos, o que pode elevar no futuro seu valor comercial (Chandel et al., 2019; de Assis et al., 2018a).

Por fim, aqui destaca-se a utilização dos açúcares celulósicos para produção de ácidos orgânicos. Ácidos orgânicos encontram-se no bloco dos bioquímicos que podem agregar valor à produção de açúcares partindo de fontes lignocelulósicas. Recentemente foi demonstrada a produção de ácido itacônico, um ácido orgânico que pode ser produzido pela fermentação dos carboidratos (Nieder-Heitmann et al., 2018; Zhao et al., 2018). O ciclo metabólico de produção dos ácidos cítrico, láctico e succínico envolve a utilização de moléculas de açúcar. Para se tornar economicamente viável, a produção dos ácidos orgânicos por fermentação microbiana envolve os custos da matéria-prima e também do processo *downstream* (Chen & Nielsen, 2016). O mercado de ácidos orgânicos tem potencial de atingir US\$ 29 milhões até 2023, com destaque para o potencial de crescimento do ácido láctico no mercado mundial (Santos et al., 2019). Dentre os ácidos orgânicos que foram reportados como sendo produzidos a partir do resíduo ou subprodutos da indústria da cana incluem-se o ácido itacônico (Nieder-Heitmann et al., 2018), succínico (Xi et al., 2013), cítrico (Oliveira et al., 2012), láctico (Peng et al., 2014), butírico (Wei et al., 2013) e o propiônico (Raveendran et al.). Assim, a produção de ácidos orgânicos no conceito de biorrefinaria tem potencial embasado em seu aspecto econômico e biotecnológico.

As biorrefinarias oferecem mais benefícios do que a produção independente de produtos. Como opção, o uso em comum de equipamentos e máquinas, serviços

e mão de obra, podem ser opções visando maximizar os benefícios ambientais e minimizar os custos de capital para produção. Deste modo, a integração de processos para produzir produtos de alto valor agregado será um fator decisivo para a operação bem sucedida de uma biorrefinaria. A abordagem de bioeconomia circular implica em indústrias, processos e tecnologias cada vez mais integrados, o que eleva o potencial do conceito de biorrefinaria.

### **3.2 Estruturas da biomassa lignocelulósica**

A estrutura da biomassa lignocelulósica é complexa, composta por microfibrilas de celulose empacotadas por uma matriz de hemicelulose e lignina (Figura 3.2). Além dos componentes principais, a matriz possui extrativos (lipídeos, proteínas e sais) e pectinas (Somerville et al., 2004). A elevada recalcitrância da biomassa lignocelulósica dificulta o ataque de microrganismos e/ ou enzimas. A recalcitrância deriva da cristalinidade da celulose, da hidrofobicidade da lignina e do envolvimento da celulose com a matriz de hemicelulose e lignina (Isikgor & Becer, 2015).

Os componentes celulose, hemicelulose e lignina não são uniformemente distribuídos na biomassa. A presença dos componentes pode variar na parede celular de acordo com as espécies, tecidos e maturidade da planta. Nas biomassas lignocelulósicas os valores de composição dos materiais variam de 35 a 50% de celulose, 20 a 35% de hemicelulose e entre 10 a 25% de lignina (Cherubini, 2010; Isikgor & Becer, 2015).

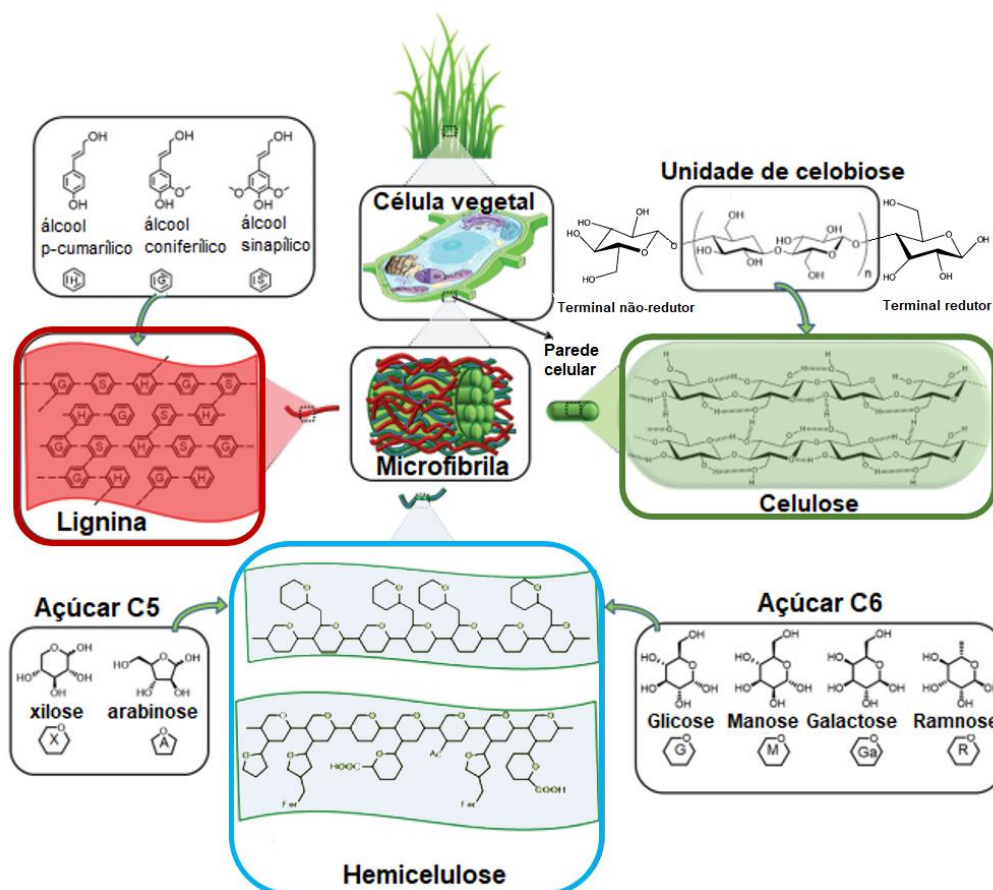


Figura 3. 2 – Estrutura da biomassa lignocelulósica e seus principais componentes – Adaptado de Isikgor & Becer, 2015 e de Zhang & Lynd, 2004.

A celulose é o componente em maior proporção, mais simples e mais ordenado na estrutura lignocelulósica (Zhou et al., 2011). A estrutura é formada por redes de cadeias de glicose unidas por ligações de hidrogênio intermolecular e intramoleculares. A formação da celulose se dá por unidades de  $\beta$ -D-glucopiranosose, unidas por ligações 1,4 glicosídicas, sendo o dissacarídeo celobiose a unidade de repetição da celulose. Nas extremidades da celulose são encontrados um terminal redutor e um não-redutor. As cadeias de celulose se organizam em microfibrilas, contendo regiões cristalinas (altamente rígidas e organizadas) alternadas com regiões amorfas (menos organizadas) (Zhang & Lynd, 2004).

Diferente da celulose, a hemicelulose possui um segmento aleatório e amorfo e constitui o segundo componente mais abundante na biomassa. A formação da hemicelulose é composta por xilanas, mananas, galactomananas, xiloglucanas, arabinoxilanas e glucoroxilanas (Isikgor & Becer, 2015). As ligações da hemicelulose são do tipo  $\beta$ -1,4 entre os blocos constituintes. As estruturas presentes na hemicelulose dividem-se em açúcares pentoses C<sub>5</sub> (xilose e arabinose) e hexoses

(glicose, manose e galactose) e açúcares acetilados (Scheller & Ulvskov, 2010). A principal atuação deste polissacarídeo é estabelecer a resistência estrutural, formando uma rede complexa de ligações, transformando fibras de celulose em microfibrilas reticuladas com a lignina, formando uma estrutura recalcitrante (Isikgor & Becer, 2015).

O terceiro componente, a lignina, é uma estrutura rica em anéis aromáticos e mais complexa dentre os componentes da biomassa lignocelulósica. Em termos de polímeros industriais, a lignina é uma excelente oportunidade de matéria para produção de compostos aromáticos. A lignina é quimicamente recalcitrante para a maioria dos microrganismos por sua estrutura complexa. É formada pelo acoplamento de três componentes principais: álcool p-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico (Abdel-Hamid et al., 2013). As unidades monoméricas são compostas por p-hidroxifenil (H), guaiacil (G) e sinergil (S). A quantidade dos componentes varia de acordo com as espécies e tecidos vegetais.

### **3.3 Hidrólise enzimática e ação de enzimas celulolíticas**

A hidrólise da celulose por ação de enzimas requer atuação sinérgica de três grupos principais de enzimas: exoglucanases, composta por exo-1,4- $\beta$ -D-glucanases, também conhecidas como celobiohidrolases (CBH) e 1,4- $\beta$ -D-glucanohidrolases ou celodextrinas; endo-1,4- $\beta$ -D-glucanases ou endoglucanases e 1,4- $\beta$ -D-glicosidases, também chamadas de celobiasas (Arantes & Saddler, 2010; Lynd et al., 2002).

Exoglucanases atuam em terminais redutores e não-redutores da celulose de maneira processiva, liberando glicose, celobiose e celodextrinas como produtos. Elas também podem atuar tanto na celulose cristalina quanto amorfa (Lynd et al., 2002). As celobiohidrolases participam da hidrólise primária da celulose, atuando no processo de amorfogênese (transformação da celulose cristalina em celulose amorfa), facilitando o acesso das celulases (Arantes & Saddler, 2010; Horn et al., 2012). As celobiohidrolases são divididas em CBHI, que atuam nos terminais redutores, e as CBHII que processam os terminais não-redutores (Teeri, 1997). Esta classe de enzimas possui estrutura tridimensional em formato de túnel fechado, e

apenas terminais da celulose são capazes de alcançar os aminoácidos responsáveis pelo processo catalítico (Davies & Henrissat, 1995).

A atuação das endoglucanases ocorre aleatoriamente no interior da celulose, reduzindo seu grau de polimerização e produzindo celobiose e oligossacarídeos de baixa massa molecular. O sítio ativo das endoglucanases tem formato de fenda aberta, permite que a catálise ocorra em qualquer uma das ligações glicosídicas da celulose, inclusive em regiões cristalinas, porém não tão efetivamente quanto em regiões amorfas. A sinergia endo-exo acontece com endoglucanases fornecendo terminais para atuação de exoglucanases (Teeri, 1997).

A glicose não é eficientemente liberada pelas enzimas endo e exoglucanases, sendo necessária a atuação de enzimas do tipo  $\beta$ -glicosidases, responsáveis por hidrolisar oligossacarídeos solúveis e celobiose. Além disso, essa classe de enzimas é responsável pela redução da inibição causada pelo acúmulo de celobiose (Lynd et al., 2002).

Muitas enzimas que participam da hidrólise de carboidratos como celulases (endoglucanases e exoglucanases) e xilanases apresentam além do módulo catalítico, os módulos de ligação a carboidratos (CBM). O CBM são domínios não catalíticos, com elevada afinidade pelos polissacarídeos, fazendo com que a celulase adsorva rapidamente em substratos celulósicos formando um complexo termodinamicamente favorável. Esses módulos são responsáveis pela eficiente adsorção das celulases nas cadeias de celulose, aumentando a concentração de enzima na superfície do polissacarídeo (Arantes & Saddler, 2010; Lynd et al., 2002).

Além dos catalisadores já mencionados, uma importante classe de enzimas auxiliares participa do processo de amorfogênese. Dentre essas auxiliares tem-se as AA9 (*Auxiliary Activity 9*), que pertencem à classe das monoxigenases líticas de polissacarídeos (LPMO) (Horn et al., 2012). As enzimas AA9 atuam sinergicamente com as celulases, potencializando a ação das enzimas hidrolíticas, principalmente na redução da cristalinidade da celulose. Elas atuam gerando novos sítios para ação das celobiohidrolases. Para atuação, as AA9 necessitam de cofatores redutores, pela doação de elétrons, que podem ser componentes fenólicos solúveis, ligninas e possivelmente hemiceluloses. Uma classe conhecida como celobiose desidrogenase (CDH) atua como redutor sintético de pequenas moléculas (Hu et al., 2014). A

Figura 3.3 é uma representação de como atuam enzimas hidrolíticas e as AA9 na desconstrução da celulose.

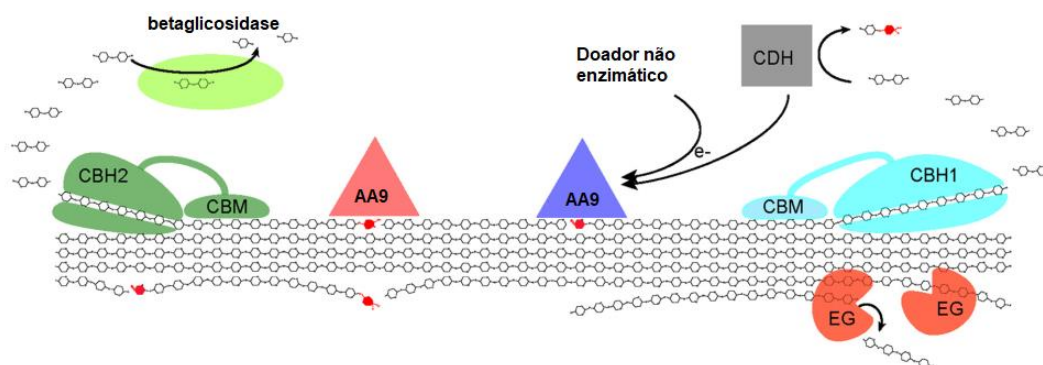


Figura 3. 3 - Esquema representativo da desconstrução da celulose por ação de enzimas hidrolíticas. Abreviações: CBH – celobiohidrolases, CBM – módulo de ligação a carboidrato, CDH – celobiose desidrogenase, EG – endoglucanase, AA9 – *auxiliary activity 9*. Adaptado de Horn et al., 2012.

Por fim, a desconstrução completa da estrutura lignocelulósica é mais facilmente alcançada pela presença de ligninases (manganês peroxidase, lignina peroxidase e lacase) e de hemicelulases (xilanases, xilosidades, mananases, arabinases, dentre outras) (Gupta et al., 2016; Hu et al., 2011). A presença das enzimas acessórias tem função facilitadora na hidrólise da celulose, melhorando a atuação das celulases.

### 3.4 Nanocelulose: Propriedades e aplicações

A celulose é um polímero altamente funcionalizável e com muitas aplicações industriais. Uma elevada gama de aplicações podem ser encontradas quando as cadeias de celulose são agrupadas formando estruturas altamente ordenadas e em escalas nanométrica (Foster et al., 2018). Os nanomateriais de celulose englobam uma série de materiais que exibem características estruturais como elevada cristalinidade, boa resistência mecânica, biocompatibilidade, biodegradabilidade, transparência óptica, alta área superficial e estrutura fibrilar reticulada (Klemm et al., 2011). Dentre as classes, os nanomateriais incluem nanocristais de celulose (NCC), nanofibrilas de celulose (NFC), NCC de tunicatos (t-NCC), celulose de algas (CA) e celulose bacteriana (BC) (Foster et al., 2018). Neste trabalho destaca-se a importância da nanocelulose como NFC e NCC.



A nanocelulose possui características estruturais superiores a celulose microcristalina e pode ter sua superfície facilmente modificada por diferentes estratégias já que possui elevada quantidade de grupos hidroxilas, que a tornam altamente hidrofílica (Klemm et al., 2011). Considerando sua elevada biocompatibilidade, renovabilidade e alta resistência mecânica, a nanocelulose se enquadra como um material ideal para gerar novos produtos de elevado valor agregado. Na Figura 3.4 são apresentadas as estruturas que compõem as nanoceluloses oriundas da biomassa vegetal: os nanocristais e as nanofibrilas de celulose.

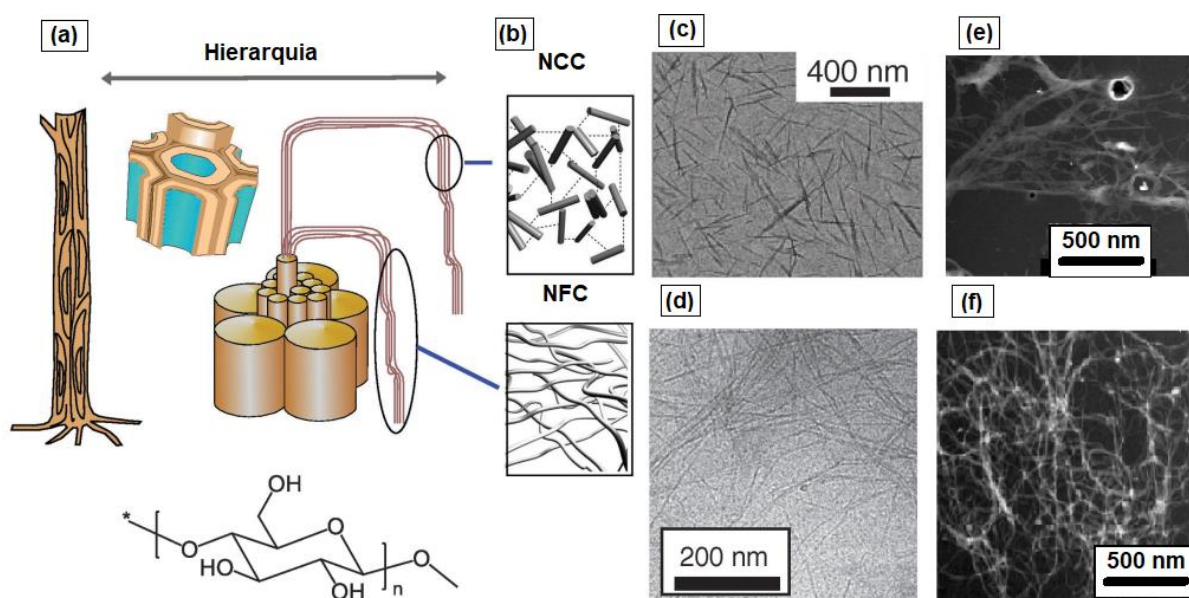


Figura 3. 4 – (a) Desintegração da madeira para formação de nanocelulose (b) representação de nanocristais de celulose e nanofibrilas de celulose; (c) e (d) microscopia eletrônica de transmissão de NCC – adaptado de Kontturi et al., 2018; (e) NFC de polpa kraft (Tonoli et al., 2012); (f) NFC de bagaço de cana-de-açúcar (Campos et al., 2013)

Os NCC são estruturas com comprimento entre 50 e 350 nm para plantas e de 100 nm até micrometros para tunicatos, algas e bactéria. O diâmetro dessas estruturas variam de 5 a 70 nm (Foster et al., 2018). A extração dessas estruturas é principalmente realizada por hidrólise ácida, cuja principal função é degradar seletivamente as cadeias de celulose amorfa, resultando na liberação de estruturas altamente cristalinas. A metodologia usada para extração dos NCC determina a química de superfície do material (Klemm et al., 2018). Além do ácido sulfúrico, comumente usados para extração de NCC, a obtenção dessas estruturas pode ser

realizada com outros métodos, como hidrólise enzimática (Filson et al., 2009), líquidos iônicos (Man et al., 2011), oxidação mediada por TEMPO (N-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina) (Hirota et al., 2010), oxidação por periodato (Yang et al., 2013), oxidação por persulfato de amônio (Leung et al., 2011), água subcrítica (Novo et al., 2015), hidrólise catalisada por  $\text{FeCl}_3$  assistida por ultrassom (Lu et al., 2014).

As NFC compreendem estruturas de 0,1 a 2  $\mu\text{m}$  de comprimento e diâmetros entre 5 e 60 nm. Os principais métodos de extração de NFC envolvem desintegrações mecânicas, cujo objetivo é manter a forma cristalina e um elevado grau de polimerização (Klemm et al., 2018). Essas estruturas possuem regiões desordenadas agregando regiões cristalinas. Outras associações de métodos podem ser usados para desintegração das estruturas celulósicas, como hidrólise enzimática associada a métodos mecânicos de refino e homogeneização (Paakko et al., 2007), oxidação mediada por TEMPO (Saito et al., 2007) e carboximetilação seguida de homogeneização (Siro et al., 2011).

Devido às propriedades das nanoceluloses, existe um vasto campo de utilizações desses materiais, sendo que as características das nanoestruturas devem ser determinadas de acordo com a aplicação de interesse. O reforço em materiais poliméricos é uma das principais aplicações da celulose nanométrica, sendo resultado da característica estrutural da celulose, além das fortes interações de hidrogênio entre nanomaterial e matriz (Dufresne, 2018). Outra aplicação, principalmente atribuída a NFC é no reforço mecânico de papel e papelão. Sua propriedade de reforço pode ser relacionada à união entre as fibras, melhorando a resistência à tração, força de ruptura, permeabilidade, dentre outras (Volkel et al., 2017).

A nanocelulose tem aplicações no campo da medicina, como excipientes, carreadores de fármacos, implantes, como reparadores de ossos e peles, dentre outros (Rajinipriya et al., 2018). Dentre algumas funções, a nanocelulose fibrilada oxidada foi reticulada com alginato e aplicada como carreadores de fármacos. Outro método é a utilização de NFC com alginato, combinando células vivas para impressão 3D de tecidos moles (Markstedt et al., 2015).

Um setor em crescimento que a nanocelulose pode ser aplicada é nas embalagens de alimentos e bebidas. As nanoestruturas podem ser usadas para evitar a deterioração de alimentos, prolongando a validade e a qualidade dos

produtos através da restrição de troca de oxigênio e principalmente, com importante efeito nas propriedades mecânicas das embalagens (Dufresne, 2019).

Além das aplicações já relatadas, a nanocelulose como NCC tem funcionalidade na remoção de corantes aquosos (Mohammed et al., 2015), sistemas de filtração (Mautner et al., 2015) e sensores absorventes de metais pesados (Mohammed et al., 2016). O potencial atribuído à filtração e capturas de partículas é devido a elevada área superficial da nanocelulose, alta capacidade de retenção e também a presença de grupamentos hidroxilas que permitem a incorporação de estruturas químicas que melhoram a eficiência de ligação de poluentes a superfície do material (Dufresne, 2019). Por fim, destaca-se a aplicação de nanocelulose na obtenção de *nanopapers*, visando a obtenção de filmes flexíveis. Os substratos eletrônicos impressos podem ser produzidos com base nas propriedades de elevada transparência, com baixo coeficiente de expansão térmica, além de resistente e flexível (Dufresne, 2019; Jung et al., 2015).

### **3.5 Obtenção de nanocelulose via rota química**

Dentre os métodos químicos para obtenção de nanocelulose, a utilização de ácido sulfúrico é um dos meios mais estudados na literatura e também o mais utilizado industrialmente. Os NCC são extraídos pela exposição da celulose com ácido sulfúrico (cerca de 64% de concentração), que hidrolisa porções desordenadas da celulose deixando as regiões ordenadas na forma de bastonetes. Este método introduz grupos semi-éster ( $\text{OSO}_3^-$ ) na superfície do NCC, que estabiliza eletrostaticamente a suspensão aquosa. Estudos buscando a otimização das condições de hidrólise ácida e de como elas interferem nas dimensões das partículas, a densidade de carga superficial e o rendimento mostraram que temperaturas mais altas e maiores tempo de reação produzem estruturas com menor tamanho e maior densidade de carga de grupos sulfatos (Dong et al., 2016; Dong et al., 1998). Além disso, o tempo de reação, a concentração de ácido e a temperatura do processo influenciam no rendimento. Dong e colaboradores alcançaram rendimento máximo entre 66 e 69% com concentração entre 57 e 58% de ácido sulfúrico de 64 a 67 °C de temperatura e tempo de reação entre 134 e 157 min para a polpa de celulose (Dong et al., 2016). A principal desvantagem das

propriedades dos NCC obtidos por ácido sulfúrico é a estabilidade térmica reduzida. Visando aumentar as propriedades térmicas dos NCC obtidos por ácido sulfúrico, a forma sódica foi proposta. Vanderfleet e colaboradores alcançaram temperatura inicial de degradação de 272 °C para NCC extraído do algodão com ácido sulfúrico tendo e que teve as cargas ácidas neutralizadas com a utilização de NaOH, modificando-as para forma sódica (com Na<sup>+</sup>). Em contrapartida, o NCC na forma ácida apresentou temperatura inicial de degradação de 166 °C (Vanderfleet et al., 2019). A estratégia diminui o impacto da utilização de ácido sulfúrico nas propriedades térmicas dos NCC, principalmente considerando aplicações em materiais poliméricos.

O uso de ácidos minerais na obtenção de nanocelulose também envolve ácidos como o clorídrico. O método de extração é similar ao ácido sulfúrico, com variação na concentração do ácido entre 2,5 a 6 mol/L. Este método tem como desvantagem a baixa estabilidade coloidal, porém resulta em estruturas com elevada estabilidade térmica (Correa et al., 2010). Para se obter melhorias na estabilidade coloidal, a associação na etapa de hidrólise do ácido clorídrico com outros ácidos que introduzam grupos funcionais carregados na superfície da nanocelulose pode ser empregada (Yu et al., 2019).

Nanocristais com elevada estabilidade coloidal e boas propriedades térmicas foram obtidos pela extração com ácido fosfórico. Neste método, a hidrólise ácida introduz grupos carregados, formando NCC ligeiramente fosforilados. Os grupos geram repulsão iônica entre os grupos carregados na superfície da nanocelulose, conferindo-lhes melhor dispersão das partículas. Em relação às propriedades térmicas, trabalhos na literatura revelaram a obtenção de NCC com temperatura inicial de degradação acima de 200 °C. Outra vantagem é em relação à capacidade de reforço dos NCC obtidos por ácido fosfórico, que são comparáveis a NCC obtidos por rotas com outros ácidos minerais como o sulfúrico e o clorídrico (Espinosa et al., 2013).

Outra rota que vem sendo explorada na extração de nanocelulose é pela utilização de ácidos orgânicos. Este método tem a vantagem de obtenção de NCC por matéria-prima renovável, reagentes atóxicos, possibilidade de recuperação do ácido, extração simultânea à esterificação, baixa corrosão de reatores além de serem ácidos mais seguros de se trabalhar. Este método gera NCC com grupos

ésteres adsorvidos na superfície, resultantes da interação com ácidos carboxílicos. Além disso, é uma vantagem na estabilidade térmica dos materiais é observada quando a análise termogravimétrica é feita na forma ácida, apresentando temperaturas iniciais de degradação entre 267 °C e 311 °C, variando de acordo com o ácido orgânico empregado. Dentre os ácidos orgânicos estudados, tem-se o maleico (Bian et al., 2017), ácido oxálico (Chen et al., 2016), ácido malônico (Spinella et al., 2016), ácido cítrico combinado com ultrassom (Ji et al., 2019) e também com ácido clorídrico (Yu et al., 2019) e misturas de ácido acético e clorídrico (Braun & Dorgan, 2009).

O ácido na sua forma gasosa também pode ser usado na preparação de NCC. Neste método, a celulose com umidade de até 80% é hidrolisada na presença de um gás ácido. A fibra então adsorve o gás, elevando a concentração de ácido local, hidrolisando os domínios amorfos. Dentre os ácidos que podem ser empregados tem-se o ácido clorídrico (Lorenz et al., 2017), nítrico e trifluoroacético (Nuopponen et al., 2012). Este método tem como vantagem a omissão da etapa de diálise, além da reciclagem do ácido ser mais fácil que nas hidrólises ácidas clássicas. Outra vantagem desta técnica é em relação a elevados rendimentos, já que a perda de matéria-prima no processo de hidrólise gasosa é baixa.

Destacam-se também os métodos de oxidação para obtenção de nanocelulose carboxilada. Dentre estes métodos, os NCCs obtidos pela reação TEMPO-oxidação (pelo reagente N-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina) apresentam vantagens de dispersão em água pela incorporação de um elevado número de grupos carboxilados na celulose. As partículas isoladas por este método exibem tamanhos reduzidos e alta viscosidade de suspensão (Hirota et al., 2010). O processo de oxidação ocorre preferencialmente em cadeias amorfas, podendo levar a sua dissolução e consequente liberação de estruturas cristalinas. No trabalho de Yang e colaboradores (Yang et al., 2013) a polpa de celulose foi oxidada por periodato e clorito de sódio, resultando em um material com duas fases. O precipitado apresentou estruturas com comprimento entre 0,6 e 1,8 µm e diâmetro de 120 nm. O sobrenadante resultou em estruturas com 91% de índice de cristalinidade, comprimentos entre 100 e 200 nm e diâmetro em torno de 13 nm. Como vantagem, este método apresentou NCC dicarboxilado, característica importante na estabilidade coloidal da suspensão. Por fim, destaca-se o método de

oxidação por persulfato de amônio, um reagente de elevada solubilidade em água e baixa toxicidade a longo prazo. Ao submeter diferentes materiais celulósicos a oxidação com persulfato de amônio, Leung e colaboradores (Leung et al., 2011) obtiveram estruturas com diâmetro entre 3,8 e 6,7 nm e comprimentos entre 121 e 294 nm, variando de acordo com o substrato de partida. Polpa de celulose, celulose microcristalina e papel de filtro apresentaram índices de cristalinidade de 81, 83 e 91% respectivamente. Além disso, a extração por este método resultou em estruturas carboxiladas, que oferecem grande potencial para modificação superficial, imobilização de enzimas e síntese de nanopartículas magnéticas.

### **3.6 Obtenção de nanocelulose via rota enzimática**

A rota enzimática tem sido principalmente relatada como um pré-tratamento da celulose visando redução de energia gasta em processos mecânicos de produção de nanocelulose. Janardhnan e colaboradores (2006) usaram um tratamento com enzimas produzidas pelo fungo OS1 na polpa kraft seguido por uma etapa de fibrilação para produção de microfibrilas (Janardhnan & Sain, 2006). No ano seguinte, Pääkkö e colaboradores (2007) desintegraram fibras de polpa de celulose realizando inicialmente um refino para aumentar a intumentação da celulose, tornando-a mais acessível para ação das enzimas. A hidrólise enzimática com endoglucanases para facilitar a etapa de fibrilação. Por fim, a fibra hidrolisada foi homogeneizada em 2% de suspensão aquosa e microfluidizada, chegando a estruturas com diâmetros entre 5 e 6 nm e agregados com diâmetros entre 20 e 30 nm (Paakko et al., 2007). Henriksson e colaboradores (2007) propuseram tratamento similar para a polpa de celulose, aplicando diferentes concentrações de endoglucanases. Ao final, observaram um aumento no índice de cristalinidade e uma redução no grau de polimerização após o tratamento enzimático (Henriksson et al., 2007) Seguindo a mesma linha de estudos, Filson e colaboradores (2009) obtiveram estruturas nanocelulósicas com comprimento entre 100 nm e 1,8 µm e diâmetros variando de 30 a 80nm. O estudo foi realizado com hidrólise por endoglucanases assistida com micro-ondas para homogeneização da polpa reciclada (1% de lignina). Os rendimentos de produção de NCC foram maiores na presença de endoglucanases (Filson et al., 2009).

Os estudos iniciais apresentados foram seguidos por diversos trabalhos, integrando o tratamento enzimático com endoglucanase e exoglucanase com refino mecânico ou hidrólise ácida para a produção de NCC e NFC (Anderson et al., 2014; Teixeira et al., 2015; Wang et al., 2015). Neste sentido, Zhu e colaboradores em 2011 usando endoglucanase comercial em associação com um complexo de celulases para hidrolisar a polpa kraft, demonstraram a integração de produção de nanocelulose e glicose, que foi fermentada para produção de etanol. Uma elevada concentração de glicose foi alcançada, mostrando que o efeito aditivo entre as enzimas favoreceu o processo de sacarificação do substrato, gerando um resíduo sólido com características favoráveis para a produção de um material nanoestruturado. Para garantir a homogeneização da nanocelulose, o sólido residual foi submetido a microfluidização, resultando em estruturas com 500 nm de comprimento e diâmetro em torno de 20 nm (Zhu et al., 2011). Com o melhoramento dos coquetéis enzimáticos visando a maior liberação de glicose como precursor principalmente para a obtenção de etanol 2G, tem aumentado também estudos que avaliam o efeito conjunto das enzimas na liberação de nanoestruturas. Song e colaboradores avaliaram a hidrólise de duas diferentes polpas de celulose, usando uma mistura de complexos comerciais Cellic ctec 2, rico em endoglucanases, exoglucanases,  $\beta$ -glicosidasas e enzimas auxiliares e o complexo Cellic Htec 2, rico em endoxilanase. Este estudo revelou que o efeito aditivo das enzimas favoreceu a liberação de glicose associada a um sólido residual que teve o comprimento significativamente reduzido. A obtenção de NFC foi finalizada com 2 h de sonicação, sendo obtidas estruturas com comprimento superior a 1  $\mu$ m e diâmetro entre 5 e 10 nm (Song et al., 2014). Por fim, um método de extração de nanocelulose usando o complexo Cellic Ctec 3, rico em celulases, enzimas auxiliares e acessórias foi utilizado para obtenção de alta concentração de glicose associada à liberação de um resíduo sólido com estrutura de nanocelulose a partir da polpa kraft. O complexo utilizado é o mais desenvolvido existente no mercado para conversão de celulose e pode alcançar uma eficiência de até 1,5 vezes maior que o complexo antecessor (Cellic Ctec 2). Devido a essa alta eficiência atribuída ao complexo enzimático, não foram utilizados métodos mecânicos para homogeneização do material que resultou em um resíduo sólido com presença de nanofibrilas e nanocristais de celulose. A nanocelulose produzida apresentou elevada estabilidade térmica, se mostrando

interessante para aplicações como reforço em materiais poliméricos. Os açúcares neste trabalho foram eficientemente fermentados, mostrando a viabilidade da integração de obtenção de nanocelulose e etanol 2G (Bondancia et al., 2017). O mesmo coquetel foi usado na obtenção de nanocelulose integrada a produção de açúcares tendo como matéria-prima o bagaço e a palha de cana-de-açúcar pré-tratados. Os autores verificaram que com o decorrer temporal da hidrólise enzimática, foram alcançados menores diâmetros e comprimentos de nanocristais de celulose, juntamente com maiores rendimentos de reação (de Aguiar et al., 2020).

Visando à obtenção de NCC a partir de celulose bacteriana, Rovera e colaboradores obtiveram os melhores resultados com a ação sinérgica de endoglucanases e exoglucanases. Os autores evidenciaram partículas com várias morfologias, demonstrando a natureza heterogênea da hidrólise enzimática. Neste estudo, foi sugerida a utilização da glicose resultante do processo hidrolítico como meio de crescimento para as bactérias produzirem as membranas de celulose. Ao final do processo, um rendimento de 25% de produção de NCC foram alcançados (Rovera et al., 2018).

Apesar de estudos terem mostrado a liberação de nanocelulose associadas à produção de açúcares, as formulações comerciais existentes têm como foco principal a redução da recalcitrância da celulose, reduzindo sua cristalinidade. Em contrapartida, alguns estudos têm sido realizados visando à adição de enzimas que tenham como principal função a redução do material amorfo da biomassa lignocelulósica, visando auxiliar na formulação de coquetéis direcionados para a liberação de nanocelulose. Recentemente, foi demonstrado que a adição de LPMO e de xilanases facilitam a nanofibrilação, reduzindo potencialmente a quantidade energética na etapa de refino mecânico e resultando em nanofibrilas mais uniformes. Foi evidenciado que a presença da hemicelulose dificulta a obtenção de nanocelulose, assim as enzimas LPMO e xilanase atuaram em sinergia com endoglucanase na polpa kraft foram eficientes na remoção desse componente e facilitaram a acessibilidade ao substrato. A atuação seletiva das enzimas demonstrou o potencial que elas têm na produção de NCC e NFC, resultando em estruturas mais puras e uniformes de elevado valor (Hu et al., 2018). Outros trabalhos também demonstraram que a atuação das LPMO facilitaram as etapas de



fibrilação além de resultar em distribuições de tamanho mais homogêneas com estruturas de elevados índices de cristalinidade (Koskela et al., 2019; Moreau et al., 2019).

Por fim, estudos demonstraram a atuação de enzimas do tipo xilanase na melhoria da eficiência das celulases na hidrólise enzimática. Um dos principais objetivos da presença das xilanases é atuar em cooperação sinérgica com as endoglucanases (Long et al., 2017; Penttila et al., 2013). O sinergismo entre endoglucanase e xilanase permite que as estruturas das fibras sejam abertas, aumentando a acessibilidade das celulases. Long e colaboradores (2017) mostraram a atuação de diferentes tipos de xilanase em sinergia com endoglucanases na hidrólise enzimática da polpa de celulose seguida de nanofibrilação por ultrassom. A etapa de hidrólise enzimática permitiu que as fibras fossem nanofibriladas com sonicação muito mais suave em comparação ao material não hidrolisado. Quando enzimas xilanases foram aplicadas, o processo de fibrilação foi facilitado, gerando estruturas com diâmetros entre 50 e 150 nm. Além disso, a presença da xilanase aumentou a transparência da suspensão das fibras, evidenciando que a celulose foi reduzida até a escala nanométrica pela etapa de fibrilação (Long et al., 2017). O estudo da atuação de diferentes classes de enzimas abre precedentes para a formulação de coquetéis enzimáticos mais eficientes, contendo enzimas acessórias para facilitar a produção de nanocelulose.

### **3.7 Obtenção de nanocelulose via outros processos alternativos e/ou verdes**

Diversos são os métodos que visam a obtenção de nanocristais de celulose por rotas mais verdes ou alternativas aos processos com ácido sulfúrico. Dentre esses métodos, destaca-se a obtenção de nanocristais de celulose a partir da celulose microcristalina (avicel) usando água subcrítica (120 °C, 20,3 MPa – 60 min) para hidrolisar os domínios amorfos por meio da difusão e ionização da água. O rendimento de nanocristais foi de 21,9%, índice de cristalinidade de 79% além de nanocristais com elevada estabilidade térmica (em torno de 300°C). O uso exclusivo de água como reagente mostrou-se promissor por suas características verdes, como baixa corrosão de equipamentos, efluentes mais limpos e também baixo custo associado a reagentes químicos (Novo et al., 2016; Novo et al., 2015).

Outro método verde apresentado na literatura é a extração usando líquidos iônicos. Este método faz uso de sais orgânicos com ponto de fusão abaixo de 100 °C. Dentre as atraentes propriedades do reagente, destaca-se sua estabilidade química e térmica, baixa pressão de vapor e não inflamabilidade do reagente. Um estudo fez o uso do líquido iônico 1-butil-3-metilimidazólio hidrogênio sulfato (bmimHSO<sub>4</sub>), um reagente semelhante ao ácido sulfúrico, reagindo com a celulose microcristalina similar às rotas ácidas. O líquido iônico atua na clivagem das ligações glicosídicas entre unidades anidroglicose sendo capaz de dissolver porções amorfas, liberando regiões cristalinas. Posteriormente foi realizada a desintegração mecânica que garantiu a presença de nanocristais de celulose, com comprimentos entre 50 e 300 nm e diâmetros entre 14 e 22 nm. Os líquidos iônicos foram recuperados, podendo ser usados em outros processos (Man et al., 2011).

Seguindo na linha de estudos verdes de obtenção de nanocristais de celulose, Lu e colaboradores realizaram uma hidrólise assistida por ultrassom com cloreto férrico (FeCl<sub>3</sub>). O reagente foi testado como um catalisador na obtenção de nanocelulose de bambu. O cloreto de ferro é considerado um reagente de baixo custo e eficiente na desestruturação da celulose amorfa. Foram obtidos nanocristais de celulose com comprimentos entre 100 e 200 nm e diâmetros variando entre 10 e 20 nm, com índice de cristalinidade de 79,4% e rendimento da reação de 22%. A hidrólise assistida por ultrassom catalisada com FeCl<sub>3</sub> mostrou ser um processo de simples realização e que pode ser preparada em um curto período de tempo (máximo de 120 min) (Lu et al., 2014).

Recentemente, um estudo usando um método ecológico combinando gás ozônio, luz ultravioleta e peróxido de hidrogênio foi proposto para oxidar a celulose visando a produção de nanofibrilas de celulose a partir da polpa kraft de madeira macia. Os resultados levaram a uma redução no grau de polimerização, aumentando grupos carboxílicos na superfície da celulose e conferindo cargas superficiais com potencial  $\zeta$  aparente de -32 mV contra -9 mV da fibra controle. Para produção de nanofibrilas de celulose, o material oxidado foi submetido a homogeneização de alta pressão, que teve seu gasto energético reduzido em 80% para a fibra oxidada em comparação com o material controle. Após a etapa de fibrilação, comprimentos de 11  $\mu$ m e diâmetros de 20 nm. Este método produziu fibras comparáveis com o método TEMPO de oxidação (Wen et al., 2020).



## 4 DESCONSTRUÇÃO ENZIMÁTICA DA POLPA KRAFT DE EUCALIPTO PARA OBTENÇÃO DE NANOESTRUTURAS DE CELULOSE POR DIFERENTES CELULASES E ENZIMAS AUXILIARES

As diferenças nas estruturas primárias de enzimas de diferentes famílias têm influência no arranjo estrutural dessas proteínas, permitindo que ocorram mecanismos distintos e a geração de diferentes produtos. Assim, a formulação de complexos com proporções e composições de classes de enzimas específicas para o isolamento de nanocelulose, principalmente em sua forma mais cristalina (como NCC) é de grande importância dada a complexidade dos substratos lignocelulósicos. Uma vez compreendida a ação de cada enzima na obtenção de nanocelulose, é possível escolher ou mesmo suplementar os complexos enzimáticos, já que desejam-se enzimas que atuem com grande eficiência e alta seletividade na remoção de regiões amorfas, preservando ou ampliando a presença de regiões cristalinas visando à liberação de nanoestruturas com elevada pureza (Siqueira et al., 2019). Nesta seção foram avaliadas a influência de enzimas endoglucanases, exoglucanases, xilanases,  $\beta$ -glicosidase na hidrólise enzimática da polpa de celulose, um material modelo, com o objetivo de estudar como a proporção de cada uma atua na degradação da celulose para obtenção de nanoestruturas.

### 4.1 MATERIAIS

Polpa branqueada de celulose comercial de eucalipto (*Eucalyptus urograndis*) foi cedida pela empresa Suzano Papel e Celulose com composição de  $75,6 \pm 2,3\%$  de celulose,  $14,6 \pm 0,6\%$  de hemicelulose,  $6,7\% \pm 1,2\%$  de lignina e  $1,1 \pm 0,2\%$  de cinzas, previamente caracterizado por Bondancia e colaboradores (2017). Complexos enzimáticos Cellic Ctec 3 e Cellic Ctec 2, contendo celulases, hemicelulases, ligninases, betaglicosidases e monoxigenases (G6H61) (ambos da Novozymes<sup>®</sup> - Dinamarca), Serzyme 50 (Sertec 20<sup>®</sup> - Espanha) contendo principalmente celulases endo- $\beta$ -1,4-glucanase e Carezyme 1000L - C2605 (Sigma-Aldrich - Brasil) com celulases de *Aspergillus sp.* Para determinação das atividades enzimáticas foram utilizados os substratos carboximetilcelulose - CMC (Sigma-Aldrich - Brasil), celobiose (Sigma-Aldrich - Brasil), xilana *beechwood* (Sigma-Aldrich

- Brasil), avicel (Sigma-Aldrich - Brasil) e papel de filtro nº 1 (Whatman – Sigma-Aldrich). Para quantificação da glicose foi utilizado o kit enzimático GOD-POD (labtest<sup>®</sup>, Brasil). Para determinação de proteínas foi usado o kit para medidas de proteínas BCA (Pierce - ThermoScientific<sup>®</sup>).

## 4.2 MÉTODOS

### 4.2.1 Atividades das enzimas presentes nos complexos comerciais

### 4.2.2 Atividade de endoglucanase

O substrato carboximetilcelulose (CMC) 2% foi preparado pesando 2 g de CMC e dissolvendo em 80 mL de tampão citrato de sódio (50 mM, pH 4,8). A solução foi deixada em agitador magnético *overnight*. Posteriormente, o substrato foi transferido para um balão volumétrico de 100 mL e o volume ajustado com tampão e a solução homogeneizada.

A reação de 50 µL do substrato CMC 2% com 50 µL do complexo enzimático em diferentes diluições foi realizada. Controles foram feitos incubando 50 µL de substrato sem o extrato enzimático. Neste procedimento, as misturas foram incubadas em 50 °C por 10 min e agitadas a 300 rpm em thermomixer (Eppendorf). Após este tempo, 100 µL de DNS foram adicionados a cada poço da microplaca contendo as amostras e o controle. No poço dos controles adicionou-se 50 µL do complexo enzimático e em seguida foi adicionado 100 µL do reagente DNS. O branco da reação foi feito usando 100 µL de água e 100 µL de DNS. Em seguida, as misturas contendo o reagente foram incubadas a 100 °C por 10 min em thermomixer. Após este tempo, a microplaca foi deixada por 5 min resfriando. Então 100 µL do meio reacional foi transferida para uma microplaca de fundo redondo e então mensurada em leitor de microplacas (Epoch 2), a 540 nm com referência em 800 nm. Uma unidade de atividade (UI) de endoglucanase é definida como a quantidade de enzima necessária para que seja liberado 1 µmol de açúcar redutor por minuto nas condições da reação. A atividade enzimática foi definida pelas Equação 4.1 e Equação 4.2. As absorbâncias obtidas foram convertidas em concentração de açúcar (µmol).

$$UI \left( \frac{\mu\text{mol}}{\text{mL}\cdot\text{min}} \right) = \frac{\text{diluição} \times \text{Concentração} \left( \frac{\mu\text{mol}}{\text{mL}} \right) \times \text{Volume total da mistura reacional (mL)}}{\text{Tempo (minuto)}} \quad (4.1)$$

A atividade foi então expressa em UI/mL

$$UI \left( \frac{\mu\text{mol}}{\text{minuto}\cdot\text{mL}} \right) = \frac{\text{diluição} \times \text{Concentração} \left( \frac{\mu\text{mol}}{\text{mL}} \right) \times \text{Volume total da mistura reacional (mL)}}{\text{Tempo (minuto)} \times \text{Volume de enzima (mL)}} \quad (4.2)$$

#### 4.2.3 Atividade de $\beta$ -glicosidase

Os ensaios para avaliação da atividade de  $\beta$ -glicosidase dos diferentes complexos enzimáticos foram medidos em uma mistura reacional com 1 mL de solução enzimática em diferentes diluições e 1 mL de uma solução contendo 15 mM do substrato celbiose (Sigma). A mistura em tampão citrato de sódio 50 mM e pH 4,8 foi incubada a 50 °C por 30 min. Uma unidade de atividade (UI) de  $\beta$ -glicosidase foi definida como a concentração de enzima necessária para liberar 1  $\mu\text{mol}$  de glicose por minuto nas condições do ensaio. A glicose liberada foi avaliada pelo kit enzimático GOD-POD (Labtest, Brasil) conforme especificações do fabricante. Foi adicionado 10  $\mu\text{L}$  de amostra contendo a enzima incubada com o substrato em 1 mL do reagente. Foram feitos padrões contendo 10  $\mu\text{L}$  glicose vindo com o kit enzimático e 1 mL do reagente. O branco da reação foi preparado adicionando ao reagente 10  $\mu\text{L}$  de água. As amostras foram agitadas em vortex e incubada em banho termostático a 37 °C por 10 min. A leitura foi então feita em espectrofotômetro a 510 nm.

#### 4.2.4 Atividade de xilanase

Inicialmente o substrato xilana foi preparado a 1,5% em tampão acetato de sódio (0,1 M, pH 5). A dissolução de 1,5 g de xilana foi feita em 25 mL de NaOH (1N). Em seguida a solução foi ajustada até pH 5 com HCl (2N). O volume foi

completado com água destilada até 50 mL em um balão volumétrico. Por fim, 50 mL de tampão acetato de sódio foi adicionado à solução.

A reação de 90  $\mu$ L do substrato xilana 1,5% com 10  $\mu$ L do complexo enzimático em diferentes diluições foi realizada. Para os controles foram adicionados 90  $\mu$ L de substrato sem o extrato enzimático. Neste procedimento, as misturas foram incubadas em 50 °C por 5 min e agitadas a 300 rpm em thermomixer (Eppendorf). Após este tempo, 100  $\mu$ L de DNS foram adicionados a cada poço da microplaca contendo as amostras e o controle. No poço dos controles adicionou-se 50  $\mu$ L do complexo enzimático e em seguida foi adicionado 100  $\mu$ L do reagente DNS. O branco da reação foi feito usando 100  $\mu$ L de água e 100  $\mu$ L de DNS. Em seguida, as misturas contendo o reagente foram incubadas a 100 °C por 10 min em thermomixer. Após este tempo, a microplaca foi deixada por 5 min resfriando. Então 100  $\mu$ L do meio reacional foi transferida para uma microplaca de fundo redondo e então mensurada em leitor de microplacas (Epoch 2), a 540 nm com referência em 800 nm. Uma unidade de atividade (UI) de xilanase é definida como a quantidade de enzima necessária para que seja liberado 1  $\mu$ mol de açúcar redutor por minuto nas condições da reação. A atividade enzimática foi definida pelas Equação 4.1 e Equação 4.2, previamente descritas.

#### **4.2.5 Atividade de exoglucanase (celobioidrolases)**

O substrato foi preparado homogeneizando 1 g de avicel em 100 mL de tampão citrato de sódio (50 mM, pH 4,8).

Para a reação, 1 mL da solução contendo o substrato foi adicionada com 1 mL do complexo enzimático nas devidas diluições em tubos de ensaio (15 cm de altura e 1,6 cm de diâmetro) e agitado em vortex (Gehaka). Um tubo controle por amostra foi preparado com 1 mL do substrato. Os testes e os controles foram incubados em banho termostatizado a 50 °C por 60 min. Após o tempo reacional, 1 mL do complexo enzimático foi adicionado em cada tubo de controle e agitado em vortex. O branco da reação foi preparado pela adição de 1 mL de água e 1 mL do reagente DNS. Para cada tubo foi adicionado 1 mL de DNS e a solução incubada por 5 min a 100 °C em banho termostatizado. Os tubos foram então deixados por 5 min em banho de gelo. Para finalização da reação foram adicionados 13 mL de

água. A leitura foi procedida em espectrofotômetro em absorvância 540 nm. Uma unidade de atividade (UI) de celobiohidrolase é definida como a quantidade de enzima necessária para que seja liberado 1  $\mu\text{mol}$  de açúcar redutor por minuto nas condições da reação. A atividade enzimática foi definida pelas Equação 4.1 e Equação 4.2, previamente descritas.



#### 4.2.6 Determinação da atividade total das celulases (FPASE)

Para medida de atividade enzimática, foi usado o método proposto por Ghose (1987). Este método se baseia em encontrar a concentração da enzima de interesse capaz de liberar 2,0 mg de açúcar redutor pela hidrólise por 60 min de 50 mg de papel de filtro Whatman nº 1. O ensaio de atividade foi feito em tampão citrato de sódio 50 mM e pH 4,8. A medida de atividade das celulases é expressa como unidade de papel de filtro por volume de enzima – Filter paper Unit (FPU).

Para a análise, partiu-se de uma solução estoque contendo a enzima diluída (1:50) em tampão citrato de sódio (50 mM, pH 4,8). A partir desta solução foram feitas novas diluições. Em tubos de ensaio, foram adicionados 1 mL de tampão citrato contendo uma tira de 1,0 x 6,0 cm de papel de filtro enrolado e incubado com 0,5 mL de enzima diluída. O branco consistiu na adição de 1 mL de tampão citrato contendo apenas a tira de papel de filtro. Para cada diluição de enzima foi realizado uma reação controle. Para tal, foram adicionados 1 mL de tampão citrato. Todos os tubos reacionais foram levados em banho termostatizado com agitação a 50 °C por 60 min. Ao final da reação, em cada tubo controle adicionou-se 0,5 mL do complexo enzimático nas suas respectivas diluições. Dentre as diluições escolhidas, uma deveria produzir concentrações em torno de 2 mg.mL<sup>-1</sup> de glicose e outra abaixo deste valor. Ao final da reação, em um tubo contendo 1 mL de reagente DNS foi adicionado 1 mL de solução contendo a enzima, controle e branco. Em seguida a reação foi feita por 5 min a 100 °C em banho termostatizado. A reação então foi resfriada em banho de gelo por 5 min. Após resfriamento à temperatura ambiente, foram adicionados 13 mL de água a fim de finalizar a reação. Foram retiradas alíquotas para determinação de absorbância a 540 nm em espectrofotômetro.

Em resumo, os conjuntos de tubos foram formados por:

- Branco para leitura em espectrofotômetro: 1,5 ml de tampão citrato;
- Controle da enzima: 1,0 mL de tampão citrato + 0,5 da solução enzimática diluída (adicionada após incubação);
- Amostra: 1,0 mL de tampão citrato + 0,5 da solução enzimática diluída

A concentração de enzima necessária para liberar 2,0 mg de glicose foi calculada usando um gráfico semi logarítmico relacionando glicose liberada x

concentração de enzima. Com o valor de enzima obtido, obtiveram-se as unidades com Equação 4.3:

$$FPU = \frac{0,37}{\text{concentração de enzima que libera 2,0 mg de glicose}} \cdot \text{unidades} \cdot \text{mL}^{-1} \quad (4.3)$$

A unidade de FPU é baseada na Unidade Internacional (UI)

**Em que:** 1 UI = 1  $\mu\text{mol}/\text{min}$  de substrato convertido;

1 UI = 1  $\mu\text{mol}/\text{min}$  de glicose formado durante a reação

1 UI = 0,18 mg/min quando o produto é glicose

Assim, a quantidade em FPU produzida por 0,5 mL de enzima em 60 min de reação em FPU é dada pela Equação 4.4:

$$2,0 \text{ mg de glicose} = \frac{2}{0,18 \mu\text{mol} * 0,5 \cdot \text{mL} * 60 \text{min}} = 0,37 \frac{\mu\text{mol}}{\text{minuto} * \text{mL}} \left( \frac{\text{UI}}{\text{mL}} \right) \quad (4.4)$$

#### 4.2.7 Determinação de proteínas totais

Para determinação de proteínas foi usado o kit para medidas de proteínas pelo ácido biocinconínico (BCA) Pierce - ThermoScientific®, seguindo as recomendações de microensaio do fabricante. A curva padrão foi obtida pela diluição do soro albumina bovina (BSA), em concentrações de proteína entre 0,5 e 200  $\mu\text{L}/\text{mL}$ . Para quantificação das proteínas presentes nos complexos enzimáticos comerciais foram pipetados 25  $\mu\text{L}$  da amostra teste ou padrão (contendo a solução de BSA) nos respectivos poços. Em seguida foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  do reagente composto por 50 partes do reagente A e 1 parte do reagente B (presente no kit de análises). A leitura foi realizada em 570 nm em leitor de microplacas (Epoch 2).

#### 4.2.8 Hidrólise enzimática para produção de nanocelulose

A hidrólise enzimática foi feita em incubadora shaker (New Brunswick – Inova 42R) partindo da polpa de celulose cominuída em partículas menores que 2 mm em moinho de facas (Solab – 500 W). Os ensaios foram conduzidos em frascos erlenmeyer de 250 mL contendo polpa de celulose a 5% (m/v) e 20 mg de proteína/g

de celulose de cada complexo enzimático. A reação foi feita em tampão citrato de sódio (0,1M – pH 5,0) e incubada por 96 h a 50 °C, 200 rpm. A cada 24 h uma alíquota foi retirada, centrifugada para separar o material sólido do líquido e a glicose avaliada pelo método GOD-POD já descrito no item 5.2.12. Ao final das 96 h a glicose foi separada por centrifugação (Hanil – R30) a 2603 g (10 000 rpm) por 10 min. O sólido separado foi suspenso em água e deixado em banho a 100 °C por 10 min para inativação da enzima.

O material contendo a nanocelulose foi então lavado por pelo menos quatro vezes e centrifugado novamente para remoção da glicose residual. Parte do material teve a nanocelulose separada por centrifugação a 1038 g (3000 rpm) (Hettich Universal). A cada remoção de sobrenadante, o precipitado era suspenso novamente em água ultrapura e submetido a centrifugação. Ao final, todo o material (sobrenadante e precipitado e amostras sem separação) foi congelado e liofilizado.

### 4.3 CARACTERIZAÇÕES

#### 4.3.1 Medida de liberação de glicose e conversão de celulose

As medidas de liberação de glicose foram descritas no item 4.2.3. O cálculo da conversão de celulose é apresentado na Equação 4.5.

$$Convers\tilde{a}o = \left( \frac{m_{glicose}^t - m_{glicose}^{0h}}{m_{celulose}^{0h} * 1,11} \right) * 100 \quad (4.5)$$

Sendo  $m^t$  a massa de glicose ao final de cada tempo,  $m^{0h}_{glicose}$  é a massa inicial de glicose,  $m^{0h}_{celulose}$  presente na polpa de celulose.

#### 4.3.2 Avaliação da morfologia das nanoceluloses por Microscopia de Força Atômica (AFM)

Os NCCs foram dispersos em água ultrapura, sob ultrassonificação (sonicador Branson Modelo 250) e uma alíquota foi depositada em um substrato de mica. As imagens AFM foram obtidas utilizando um instrumento Multimode VIII (Bruker AXS GmbH, Alemanha) equipado com controlador NanoScope V e Si/ Au probe, modelo ScanAsyst-Fluid (Bruker AXS GmbH). Operado no modo de

derivação PeakForce, frequência de ressonância de 150 kHz e força constante de 0,7N/m. O software Gwyddion v. 2.53 foi utilizado para tratamento e mensuração das imagens.

#### **4.3.3 Avaliação do índice de cristalinidade por Difração de Raios-X (DRX)**

Os valores do índice de cristalinidade (IC) das amostras foram determinados por difração de raios X (DRX), utilizando um difratômetro (Modelo 6000, Shimadzu, Japão) operado na faixa  $2\theta$  de  $5^\circ$  a  $40^\circ$ , a uma taxa de varredura de  $2^\circ/\text{min}$ , com radiação  $\text{Cu K}\alpha$  ( $\lambda = 1,54 \text{ \AA}$ ), tensão de 30 kV e corrente de 30 mA. O IC foi calculado usando as áreas sob os picos cristalino e amorfo, obtidas por deconvolução usando funções Gaussianas, depois de feita a correção apropriada da linha de base. Este é o método mais apropriado para este tipo de avaliação (Park et al., 2010). O IC foi obtido dividindo a área somada de todos os picos cristalinos pela área total.

#### **4.3.4 Avaliação da carga líquida superficial por potencial $\zeta$ aparente**

A carga do potencial de superfície das amostras foi determinada usando um analisador Zetasizer Nano ZS (Malven Instruments, Reino Unido), no comprimento de onda de 633 nm. Uma suspensão de 0,1% m/v de NCC em solução de NaCl a 5 mM foi empregada nas medições.

## 4.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.4.1 Perfil de atividades dos complexos enzimáticos

A Tabela 4.1 apresenta a composição das três principais classes de celulases e de uma enzima auxiliar (xilanase) nos complexos comerciais.

Tabela 4. 1 Perfil enzimático de atividade, avaliação de proteína e FPASE de coquetéis comerciais

Enzima	Coquetel comercial			
	Cellic 3	Cellic 2	Serzym 50	Carezyme 1000L
Endoglucanase (UI/mL)	1548 ± 12	2479 ± 14	219 ± 3	335 ± 4
Xilanase (UI/mL)	7981 ± 223	12153 ± 145	1971 ± 8	48,6 ± 4
Avicelase (UI/mL)	61 ± 8	45 ± 6	9 ± 0,7	14 ± 4
β-glicosidase (UI/mL)	865 ± 6	380 ± 3,4	41 ± 3	1,4 ± 0,2
FPase (FPU/mL)	205 ± 3	167 ± 3	13 ± 0,1	---
Proteína (mg/mL)	292 ± 6	190 ± 4	151 ± 2	20 ± 2

O perfil enzimático apresentado na Tabela 4.1 para cada coquetel comercial mostra a presença de enzimas variadas com diferentes mecanismos de atuação, o que é relevante considerando que a hidrólise da celulose requer ação conjunta destes catalisadores. Destaca-se a presença de endoglucanase em grande proporção em relação à quantidade de exoglucanase (apresentada como avicelase). As endoglucanases hidrolisam principalmente estruturas não ordenadas da celulose, atuando na redução da razão de aspecto pela liberação de oligossacarídeos. Esta classe de enzimas atua preferencialmente no interior da moléculas, clivando aleatoriamente ligações β-1,4 glicosídicas da celulose (Zhang & Lynd, 2004). Por seu mecanismo preferencial de atuação, endoglucanases são requeridas para obtenção de nanocelulose, por ter reduzida atividade em regiões cristalinas quando

comparada às estruturas amorfas (Rahikainen et al., 2019). Apesar disso, a necessidade de sinergia enzimática para se alcançar eficientes hidrólises faz com que complexos apresentem outras classes de enzimas, como as exoglucanases e  $\beta$ -glicosidases.

As exoglucanases ou celobiohidrolases catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas ao longo da cadeia de celulose, liberando pequenas cadeias de oligossacarídeos a partir de extremidades reductoras e não reductoras de fragmentos liberados por endoglucanases (Arantes & Saddler, 2010). Em ação sinérgica com as endoglucanases, as exoglucanases são capazes de hidrolisar estruturas cristalinas com elevada atividade, assim a quantidade requerida nos coquetéis enzimáticos deve ser dosada para que a ação nessas estruturas seja mínima ou nula visando a produção de nanocelulose (Zhang et al., 2006).

Dentre os oligossacarídeos liberados pelas exoglucanases, tem-se a celobiose, estruturas processadas por  $\beta$ -glicosidases para liberação de glicose. Esta classe de enzimas libera glicose também a partir de celodextrinas com grau de polimerização até 6 (Zhang et al., 2006). A liberação de glicose maximiza uma corrente valiosa na produção de nanocelulose, já que trata-se de uma molécula comercialmente relevante, precursora de uma gama de produtos de interesse industrial (Siqueira et al., 2019).

Em adição à atuação sinérgica das celulases, a presença de hemicelulases como xilanases e mananases auxiliam na remoção da barreira física que a hemicelulose residual cria em torno da celulose aumentando o intumescimento e a porosidade da fibra (Hu et al., 2011; Hu et al., 2018). A ação de enzimas acessórias facilita o acesso das celulases à celulose, favorecendo a produção de nanocelulose (Penttila et al., 2013). Embora não atuem diretamente na celulose, as enzimas acessórias têm alta especificidade na modificação seletiva da rede de carboidratos (Hu et al., 2018).

Relacionando as atividades de enzimas dos complexos comerciais, apresentados na Tabela 4.1, notadamente observa que para a Cellic Ctec 2 uma maior atividade de endoglucanases e xilanases são vistas em relação a versão mais recente Cellic Ctec 3, que por sua vez apresenta maior atividade de exoglucanases e  $\beta$ -glicosidases. A suplementação dos complexos com maior atividade de exoglucanase evidenciam coquetéis adaptados para que a máxima sacarificação da

biomassa seja alcançada, objetivando inclusive a hidrólise de estruturas cristalinas da celulose (Sun et al., 2015). Outro complexo avaliado foi a Serzym 50, um complexo obtido de *Trichoderma reesei*, rico em endoglucanases e xilanases. Para auxiliar na sinergia da hidrólise, este coquetel enzimático também possui exoglucanases e  $\beta$ -glicosidases, porém com menor atividade em relação às outras enzimas. Este complexo tem como principal mercado indústrias de papel e celulose, cuja principal função é auxiliar nas etapas de refino e taxa de drenagem deste setor (Gonzalez et al., 2013). Por fim, o complexo Carezyme 1000L possui em sua composição maior atividade de enzimas endoglucanase e xilanase quando comparada as atividades de exoglucanase e  $\beta$ -glicosidases.

Outra análise relevante feita para os complexos comerciais foi em relação às medidas de atividade FPAse. Estes valores referem-se à ação sinérgica de celulases, considerando a combinação de endoglucanases, celobiohidrolases e  $\beta$ -glicosidases. Apesar disso não leva em consideração a presença de enzimas auxiliares de grande importância no processo de desconstrução da celulose (Sun et al., 2015). Em contrapartida, as concentrações de proteína total dos complexos evidenciam uma grande variedade nos valores apresentados, indício da presença de outras enzimas acessórias, de grande importância na hidrólise, mas que acabam negligenciadas na avaliação de FPA.

#### **4.4.2 Influência do complexo enzimático na liberação de açúcares**

A liberação de açúcar durante a reação de hidrólise enzimática da polpa de celulose usando os diferentes coquetéis comerciais apresentou perfil semelhante, diferindo principalmente em termos de valores de concentração (Figura 4.1 (a)). Os resultados de conversão de celulose fornecem informações a respeito da digestibilidade do substrato e conseqüente formação de glicose (Figura 4.1 (b)).

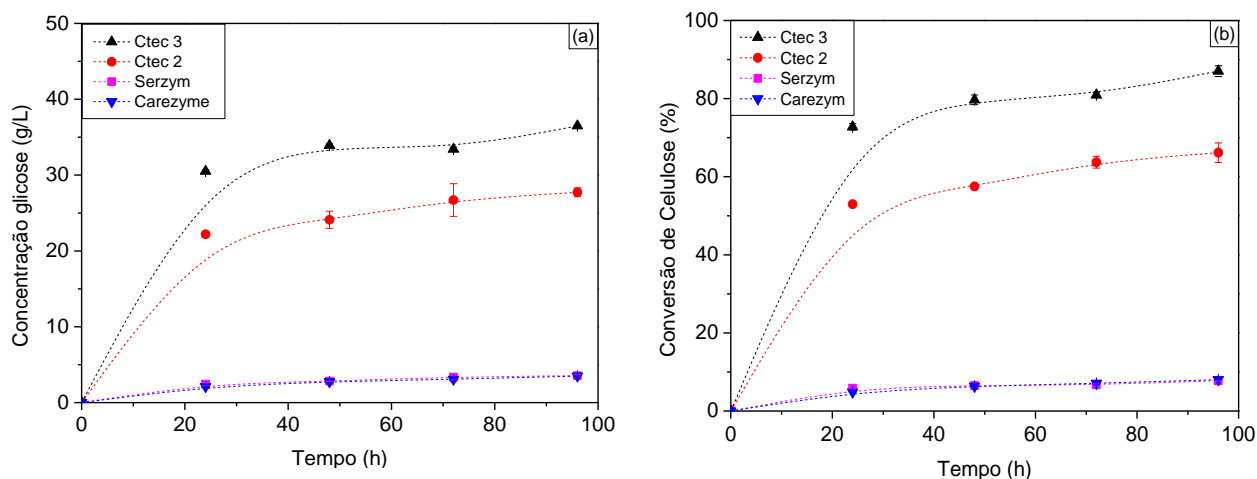


Figura 4. 1 Perfil temporal de hidrólise enzimática da polpa de celulose em teor de sólidos de 5% (m/v) e carga de enzima de 20 mg/g celulose - (a) liberação de glicose; (b) conversão de celulose

Observa-se para os complexos Cellic Ctec 3 e Cellic Ctec 2 uma maior quantidade de glicose liberada frente aos demais preparados enzimáticos, chegando respectivamente a concentrações de 36,5 e 27,8 g/L em 96h, respectivamente. Uma vez que estas enzimas derivam do mesmo fabricante, é evidente que as atualizações decorrem de adição de novas enzimas acessórias, visando fortalecer sua cooperação sinérgica. Dentre as enzimas acessórias presentes, principalmente no complexo Cellic Ctec 3, destaca-se as AA9 (*Auxiliary Activity 9*), pertencente à família das monoxigenases de polissacarídeos líticas (LPMO). A presença dessas enzimas auxiliares melhora o desempenho das celulases e contribui para a melhoria na liberação de glicose (Sun et al., 2015). Apesar disso, essa classe de enzimas participa ativamente da desestruturação da amorfogênese da celulose, ou seja, facilita a diminuição da cristalinidade da celulose, pois a ação das AA9 resulta na geração de novos sítios de ação para as exoglucanases (Arantes & Saddler, 2010). Ambos os complexos são ricos em LPMO (Chylenski et al., 2017; Sun et al., 2015) e o elevado rendimento de glicose, evidenciou que houve uma cooperação com as celulases para desconstrução do substrato. Previamente, foi relatado por Hu e colaboradores (2018) que a presença de enzimas auxiliares AA9 resultou em um aumento em torno de 50% na hidrólise da celulose quando comparado a presença apenas de enzimas endoglucanase e endoxilanase. Os autores tinham por objetivo utilizar enzimas para redução de gasto energético e a obtenção de estruturas mais uniformes em etapas de fibrilação para produção de nanofibrilas de celulose a partir



da polpa de celulose. A presença de enzimas AA9 também resultou em aumentos significativos de xilana hidrolisada, estrutura presente em hemiceluloses.

Devido à variação na composição dos complexos, das misturas de celulasas e quantidade de enzimas acessórias, espera-se que a produção de açúcares não seja igual, mesmo que em substrato semelhantes e com mesma carga de proteína aplicadas nas etapas de hidrólise. Assim, para os complexos Serzym e Carezyme, a concentração de glicose liberada foi semelhante, 3,4 g/L e 3,5 g/L após 96 h, respectivamente. Apesar disso, os valores foram muito inferiores ao anteriormente apresentados para os complexos Cellic Ctec, atribuídos às diferentes atividades de celulasas presentes nos complexos. Não foram encontrados trabalhos que evidenciam a presença de LPMO nos complexos Serzym e Carezyme. Além disso, a baixa atividade de  $\beta$ -glicosidases faz com que os baixos valores de glicose liberada sejam previsíveis, já que o mecanismo de ação das endoglucanases não libera preferencialmente glicose. A presença de  $\beta$ -glicosidase também tem como importância a redução na concentração de celobiose, produto de inibição de endoglucanases, mais expressivamente do que por moléculas de glicose (Kristensen et al., 2009; Ladisch et al., 1983).

A mesma elucidação pode ser atribuída para os resultados de conversão de celulose em glicose, apresentados na Figura 4.1 (b). Observou-se diferença significativa (teste de Tukey 5% de significância) entre os valores de conversão para todos os experimentos, exceto para as hidrólises realizadas com os complexos Serzym e Carezyme (7,7% e 8,0% respectivamente, após 96 h). É desejado que ocorram elevadas conversões, buscando que todo material amorfo seja transformado em açúcar solúvel e apenas os segmentos cristalinos sejam liberados como nanocelulose. Apesar disso, a hidrólise deve ser controlada de maneira que celulose cristalina não seja convertida, principalmente em reações feitas com complexos mais completos em enzimas auxiliares.

Além da liberação de glicose (açúcar C6) como produto da degradação da celulose, a hidrólise enzimática na presença de enzimas auxiliares libera outros açúcares fermentescíveis como por exemplo a xilose (açúcar C5), além de oligossacarídeos (Longati et al., 2018). Na Figura 4.2 são apresentadas as curvas de liberação de açúcar redutor total (ART). Este método inclui em sua concentração valores de glicose, xilose e demais açúcares redutores.

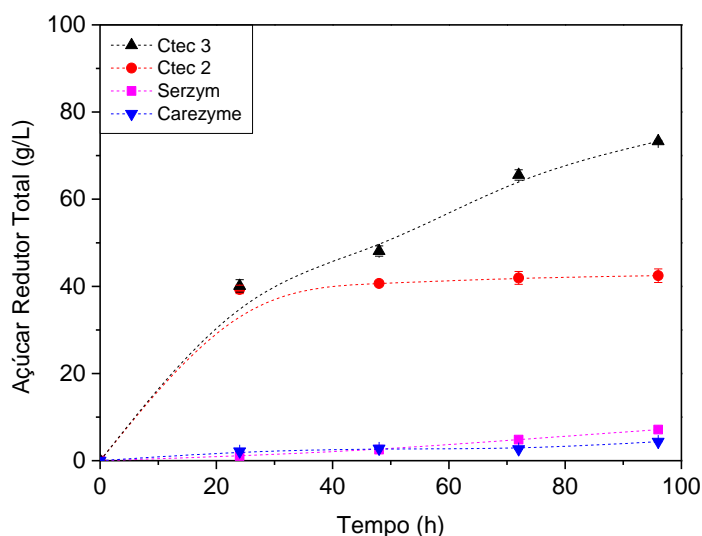


Figura 4. 2 Açúcar redutor total - ART (g/L) para hidrólise enzimática em função do tempo para diferentes complexos comerciais

Seguindo mesma tendência de liberação de glicose, coquetéis Cellic Ctec 3 e Cellic Ctec 2 apresentaram elevadas concentrações de açúcares liberados, com concentrações de 73,3 g/L e 42,5 de ART liberados após 96 h de hidrólise enzimática, respectivamente. Observa-se que nesta análise estão contabilizados os valores de glicose. Para a hidrólise feita com os complexos Serzym e Carezyme observa-se concentrações de açúcares liberados de 7,1 g/L e 4,3 g/L, respectivamente. Nesta análise, é possível associar a atuação de enzimas auxiliares como a xilanase na hidrólise enzimática. Sugere-se que a maior concentração de ART liberada no meio hidrolisado com a Serzym é relativo a maior atividade de xilanase em relação à endoglucanase neste complexo. Não é possível contabilizar o real efeito da xilanase na hidrólise devido à presença de outras enzimas no complexo, porém as melhorias referente a esta enzima já foi bastante explorada (Hassan et al., 2018; Huang et al., 2018; Kumar & Wyman, 2009; Penttila et al., 2013; Tibolla et al., 2017). Previamente foi relatado que o tipo de interação entre celulase e xilanase é dependente não somente da carga enzimática, mas também da proporção entre as enzimas (Hu et al., 2011). Além disso, um forte efeito sinérgico entre essas classes de enzimas foi evidenciado, mesmo em proporção reduzida de celulase e elevada quantidade de xilanase. A elevada carga de xilanase permitiu que fossem reduzidas as quantidades de celulases presentes no complexo para garantir uma hidrólise eficaz do substrato (Berlin et al., 2007; Hu et al., 2011).

Sabe-se que a atuação das enzimas de maneira conjunta tem maior eficiência do que em atuação individual. Ainda neste cenário, a atuação das xilanases também deve ser evidenciada como uma enzima de papel importante tanto na liberação de açúcares como na produção de nanocelulose. Além de aumentar a acessibilidade de celulasas por alterações na estrutura da fibra lignocelulósica, outra atuação sugerida para a xilanase é o aumento da proporção de substrato disponível para ser hidrolisado por celulasas por sua ligação improdutiva nos sítios de lignina (Penttila et al., 2013). Com base no mecanismo de atuação de xilanases e avaliando os valores de açúcar redutor total, observa-se que além da glicose pode-se sugerir a liberação xilose e de outros açúcares redutores proveniente da hemicelulose, um açúcar fermentescível que pode ser aproveitado na rota de produção de biocombustíveis (Milessi et al., 2018). Observa-se que para todos os complexos enzimáticos os valores de liberação de açúcar redutor total foram superiores a liberação de glicose, já que este método também avalia a presença de celobiose, oligossacarídeos, dentre outros.

#### **4.4.3 Influência do complexo enzimático na morfologia da nanocelulose**

Com base no modelo de atuação das enzimas, principalmente as endoglucanases e xilanases, espera-se que complexos com maior atividade de enzimas que hidrolisam componentes amorfos liberem nanoestruturas mais uniformes. Assim, o sobrenadante separado do material sólido após 96 h de hidrólise enzimática para os diferentes complexos comerciais foi avaliado por Microscopia de Força Atômica para constatar a presença de nanocelulose (Figura 4.3), bem como analisar valores de comprimento e diâmetro.

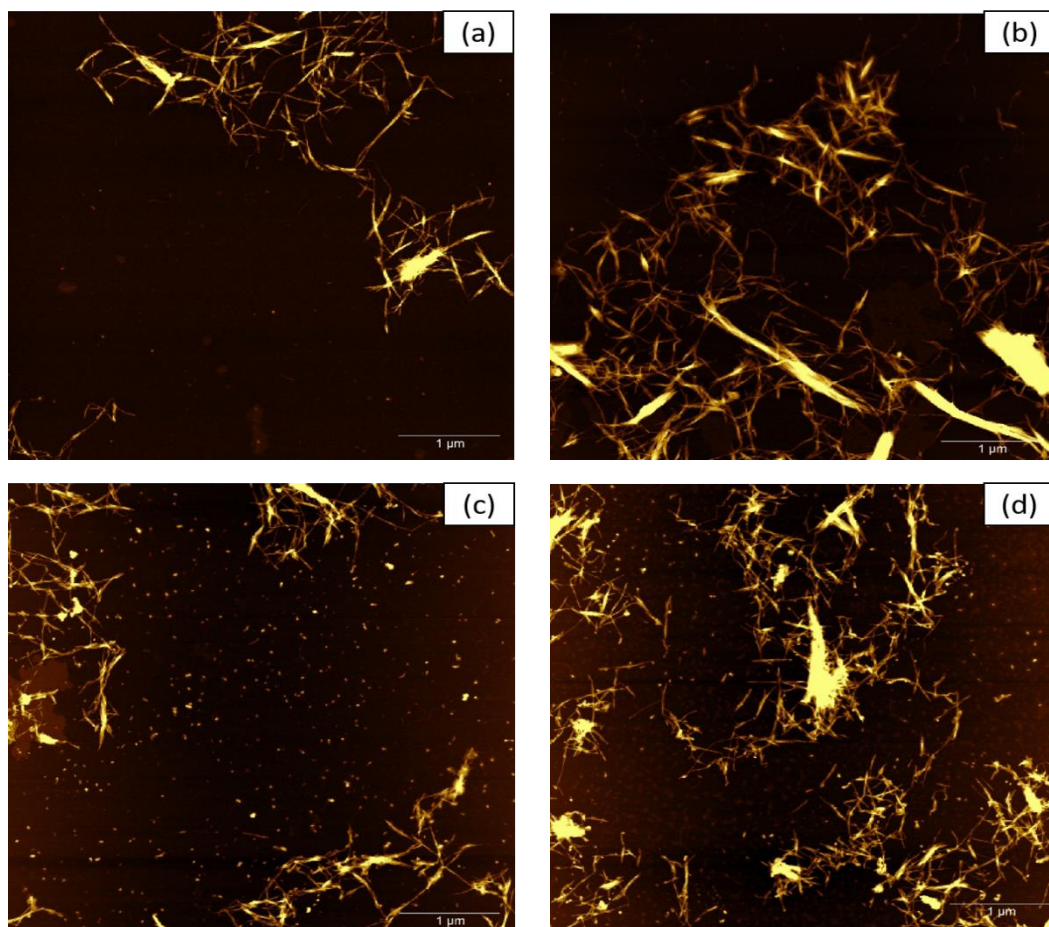


Figura 4.3 Microscopia de Força Atômica para nanocelulose obtida por hidrólise enzimática em teor de sólidos 5% (m/v) e carga de enzimas de 20 mg/g celulose da polpa de celulose (a) Cellic Ctec 3; (b) Cellic Ctec 2; (c) Serzym 50; (d) Carezyme

Os comprimentos das nanoestruturas variaram de acordo com o coquetel enzimático utilizado. Para os complexos Cellic Ctec 3 e Cellic Ctec 2 os valores de comprimento foram de  $193 \pm 56$  nm e  $226 \pm 73$  nm, respectivamente. Para os diâmetros, estes valores foram de  $8 \pm 3$  para Cellic Ctec 3 e  $10 \pm 3$  para o complexo Cellic Ctec 2. O teste de Tukey com 5% de significância não revelou diferença estatística entre essas amostras, tanto em comprimento quanto em diâmetro. A nanocelulose obtida por hidrólise enzimática para os complexos Serzym e Carezyme evidenciaram comprimentos  $170 \pm 58$  nm e  $461 \pm 141$  nm, respectivamente. Os diâmetros para estes complexos foram de  $8 \pm 3$  e  $13 \pm 4$ , respectivamente. Dentre todos os resultados analisados, somente encontrou-se diferença estatística (5% de significância) para os complexos Carezyme e Serzym em relação a medidas de comprimento. Para valores de diâmetro, as amostras não apresentaram diferenças significativas.

As estruturas obtidas após a hidrólise com os diferentes complexos enzimáticos, apresentadas na Figura 4.3 se mostraram finas e alongadas, características de nanocristais de celulose. Apesar disso, na rota enzimática, a distribuição de tamanho e diâmetro é mais heterogênea em relação a métodos ácidos. Os tamanhos atribuídos as estruturas obtidas por diferentes complexos enzimáticos aqui apresentadas foram maiores em relação à hidrólise com ácido sulfúrico por exemplo, que após a hidrólise do mesmo material foram relatados como uma faixa de comprimento de 50 a 300 nm, sendo 70% das estruturas menores que 200 nm após 60 min de extração (Tonoli et al., 2012). Considerando o mecanismo de atuação de celulasas, principalmente do tipo endoglucanases, sabe-se que elas atuam na redução da razão de aspecto da celulose, liberando oligômeros em detrimento da celulose amorfa hidrolisada por meio de cortes aleatórios na cadeia de celulose (Siqueira et al., 2019). Desta maneira, devido sua atuação mais suave na remoção da celulose amorfa em comparação aos métodos ácidos, estruturas de maior comprimento e diâmetro são obtidas.

Os histogramas apresentados na Figura 4.4 mostram a distribuição de comprimento e diâmetro para as amostras obtidas a partir da hidrólise com os diferentes complexos enzimáticos.

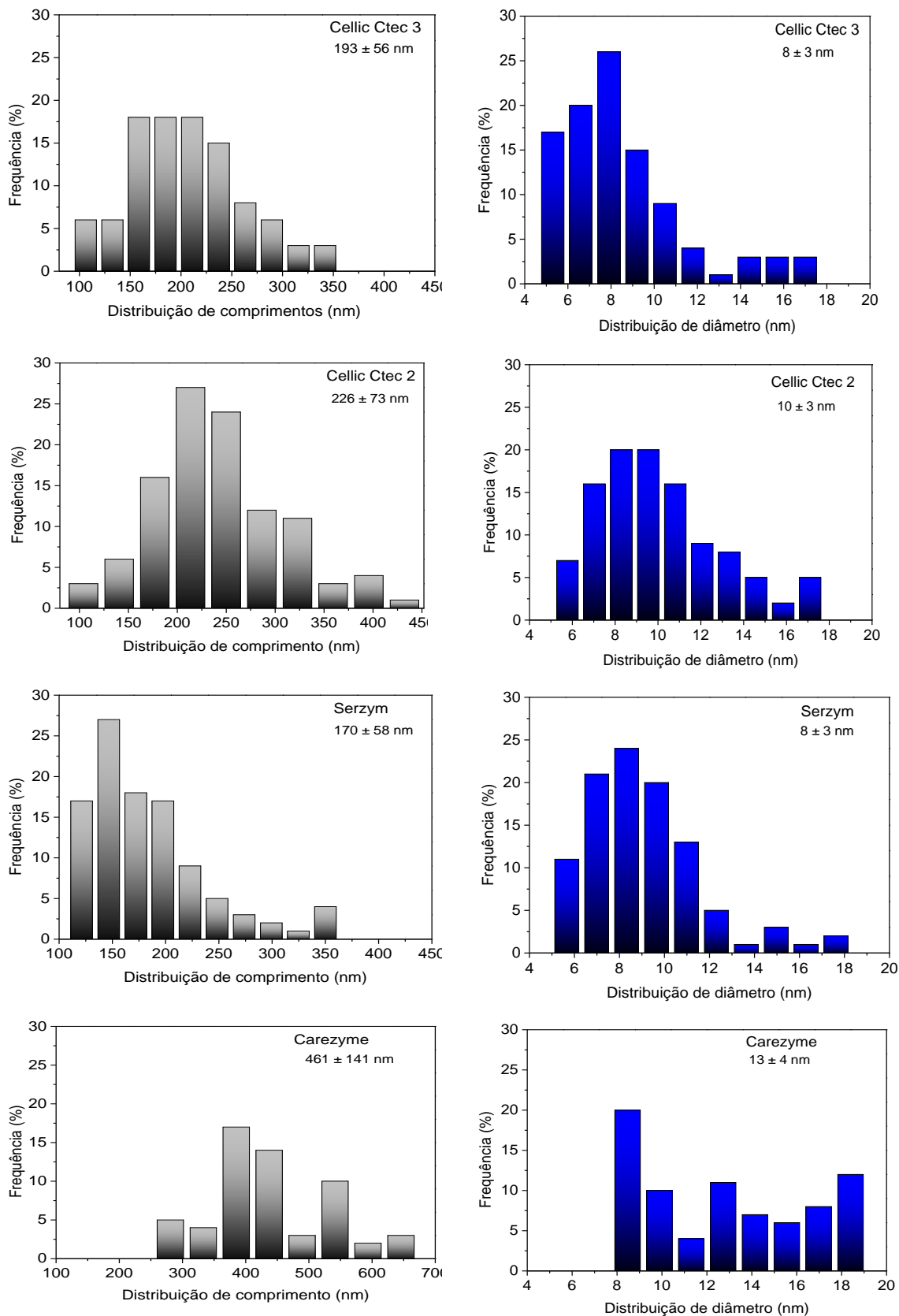


Figura 4.4 Histograma de distribuição de tamanho e diâmetro (nm) para as medidas de nanocelulose obtidas após hidrólise enzimática com diferentes coquetéis enzimáticos

Para os complexos Cellic 3 e Cellic 2, a variação de comprimentos foi de 80 até 350 nm e 67 até 430 nm, respectivamente. A composição de ambos os complexos tem como principal objetivo elevados rendimentos de liberação de açúcar solúvel, para a obtenção principalmente de biocombustíveis (Li et al., 2013). Ainda assim, relatos de liberação de nanoestruturas de celulose mostram que tem se buscado explorar o conceito de associação de processos, produzindo açúcares e nanocelulose. Uma ampla faixa de comprimento e diâmetros foram encontradas para tais coquetéis enzimáticos. As diferenças estão associadas a variações nas cargas de enzima, teor de sólidos, associação com processos mecânicos e tempo de hidrólise. Para a polpa de celulose foram encontrados valores de obtenção de nanocelulose em uma faixa de 262 nm até 1  $\mu$ m, com diâmetros entre 10 e 80 nm para os coquetéis Cellic Ctec 2 e Cellic Ctec 3 (Bondancia et al., 2017; Song et al., 2014; Xiang et al., 2016). Estudos também mostraram que a presença de enzimas AA9 associadas à endoglucanase e xilanases favoreceram a liberação de nanofibrilas mais uniformes e dispersas após etapas de fibrilação e sonicação (Hu et al., 2018). Assim, pode-se sugerir que a ação sinérgica das enzimas também favorece as etapas de obtenção de nanocelulose.

Observa-se que para a nanocelulose obtida para o complexo Serzym, os comprimentos variaram de 95 nm até 350 nm. Este complexo foi o que apresentou estruturas mais uniformes e com maior frequência na liberação de estruturas com dimensões dentro da faixa atribuída a nanocristais de celulose (de 50 – 350 nm). Sugere-se que a ação conjunta principalmente entre xilanases e endoglucanases, em maior proporção neste complexo, tenha favorecido a liberação de estruturas com maior pureza e uniformidade. Apesar disso, o coquetel tem como principal comércio o pré-tratamento para refino em indústrias de papel e celulose, logo, elevados rendimentos de nanocelulose com este complexo não são alcançados (Gonzalez et al., 2013). Em trabalhos encontrados na literatura, para aumento do rendimento a combinação de hidrólise enzimática com processos de fibrilação tem sido explorada, porém poucos são os trabalhos que usam exclusivamente a rota enzimática para a obtenção de nanocelulose. A associação de rotas enzimáticas com processos mecânicos visa principalmente a redução energia requerida na etapa de fibrilação. Assim, neste contexto após hidrólise enzimática com xilanase seguida por endoglucanase e posterior fibrilação mecânica, no qual diâmetros de 5 a 10 nm

foram encontrados para nanocelulose obtida a partir da polpa de celulose (Zhou et al., 2019).

Por fim, as nanoestruturas obtidas após a hidrólise com o complexo Carezyme apresentou distribuição de tamanho entre 228 nm e 750 nm. A presença de elevada atividade de endoglucanase em relação à exoglucanase,  $\beta$ -glicosidase e xilanase favoreceu a liberação de celulose em forma nanofibrilada, porém a produção de nanocristais não foi predominante. Previamente, Filson e colaboradores (2009) relataram distribuição de comprimento na faixa de 100 nm a 1,8  $\mu$ m e diâmetros entre 30 e 80 nm para hidrólises feitas com endoglucanase na polpa de celulose seguindo de fibrilação mecânica (Filson et al., 2009). Observa-se pela faixa de valores relatados que a presença de xilanase no complexo Carezyme favoreceu a liberação de estruturas menores em comprimento. Além de facilitar o acesso da endoglucanase até a celulose, a xilanase reduz as ligações entre as fibrilas, auxiliando na individualização das estruturas (Hu et al., 2018).

#### **4.4.4 Avaliação do índice de cristalinidade**

Para avaliar as possíveis alterações na estrutura cristalina da celulose, o material residual total após hidrólise com diferentes coquetéis enzimáticos foi investigado por DRX. Nas Figuras 4.5 (a) até (d) são apresentados os difratogramas deconvoluídos para cada amostra. Na Figura 4.5 (e) é apresentada a evolução do índice de cristalinidade em função do tempo para cada complexo enzimático.



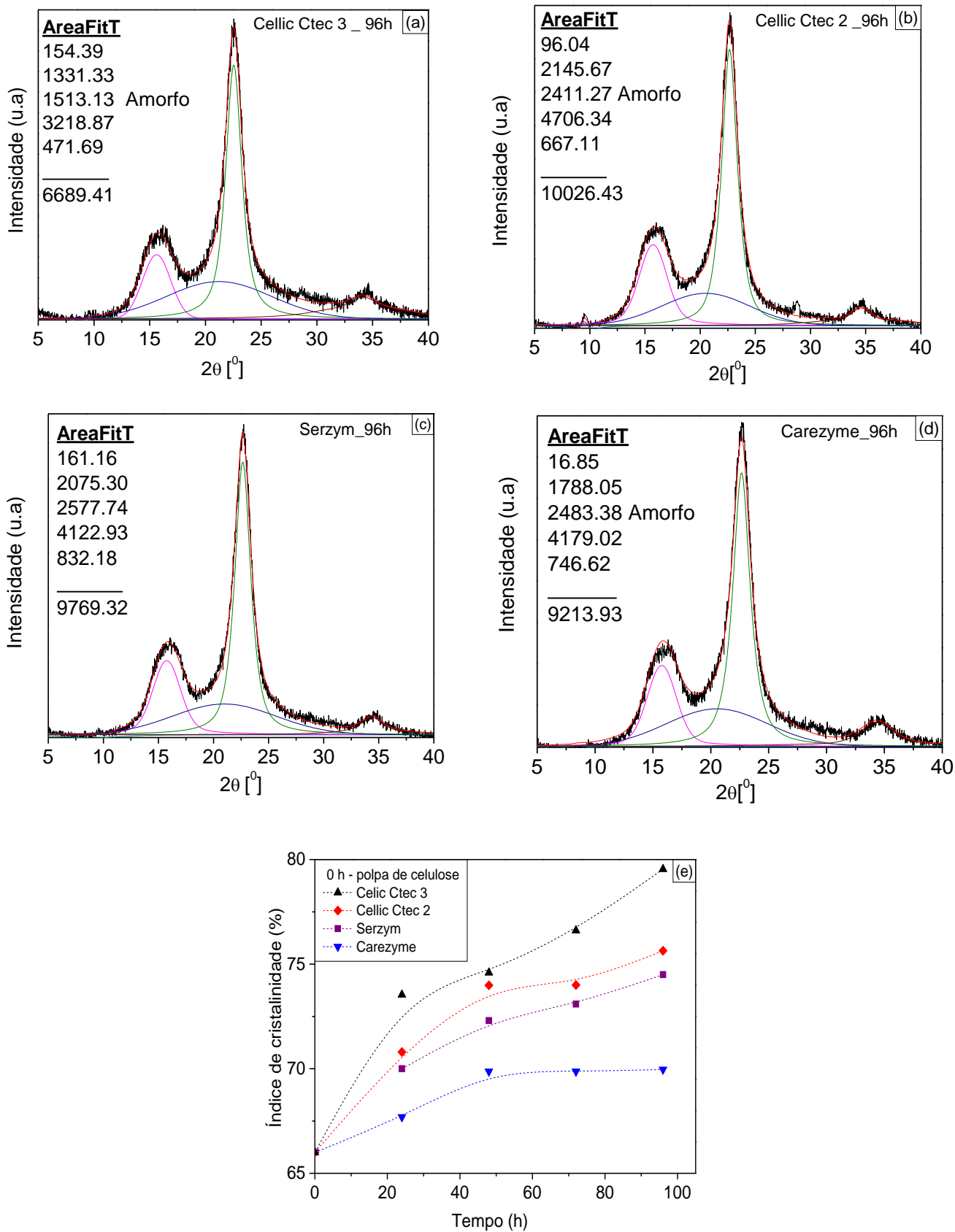


Figura 4.5 DRX deconvoluido para nanocelulose obtida após hidrólise enzimática para diferentes complexos enzimáticos após 96 h - (a) Cellic Ctec 3; (b) Cellic Ctec 2; (c) Serzym; (d) Carezyme. (e) Evolução do índice de cristalinidade em função do tempo

Em comparação com estruturas amorfas, como hemicelulose e lignina, a celulose possui estruturas cristalinas bem pronunciadas, devido a suas ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals, existentes entre moléculas de celulose adjacentes (Chirayil et al., 2014). Assim, após a etapa de hidrólise enzimática, houve um aumento nos índices de cristalinidade devido à remoção dos componentes amorfos, sendo este efeito mais pronunciado nos materiais hidrolisados com coquetéis Cellic Ctec. Os aumentos mais pronunciados nestes coquetéis corroboram os resultados de liberação de açúcares, mostrados anteriormente nas Figuras 4.1 e 4.2, nos quais sugere-se que tenha ocorrido principalmente a sacarificação de componentes amorfos do material, aumentando o teor de celulose cristalina. Hu e colaboradores reportaram que a presença somente de endoglucanase na etapa de hidrólise foi responsável por um aumento no índice de cristalinidade em torno de 7% na hidrólise da polpa de celulose, após a adição de enzimas AA9 ou xilanases aos coquetéis, esse valor foi intensificado. A presença das monoxigenases da família 9 clivam o carbono 4 da celulose, gerando grupos carbonilas presentes em cetonas que posteriormente são convertidos em cetoaldoses, melhorando a rede de hidrogênio intermolecular das cadeias e conseqüentemente aumentando o índice de cristalinidade (Hu et al., 2018). Assim, pode-se dizer que neste trabalho, que devido à menor atividade em xilanase, as estruturas obtidas pela hidrólise com o coquetel Carezyme apresentaram menor alteração nos índices de cristalinidade em relação aos demais coquetéis que continham enzimas auxiliares. Os valores dos índices de cristalinidade para cada tempo de hidrólise e diferentes coquetéis estão apresentados na Figura 4.5 (e).

O material final hidrolisado pelo complexo Serzym apresentou mudanças nos índices de cristalinidade superior ao material hidrolisado com o complexo Carezyme. A presença da xilanase em maior atividade no coquetel possivelmente influenciou na etapa de hidrólise enzimática, evidenciando as alterações na proporção de celulose cristalina no sólido final. O mesmo foi evidenciado por Nie e colaboradores (2018), que atribuíram índices de cristalinidades mais elevados quando a hidrólise foi realizada na presença de maiores atividades de xilanase, que contribuiu na remoção amorfa do material, principalmente de estruturas presentes na hemicelulose.

Por fim, observa-se que para todos os materiais, após as etapas de hidrólise enzimática não foram observadas alterações nos planos cristalinos característicos da celulose tipo I ou nativa, com picos cristalográficos exibidos em  $2\theta = 22,5^\circ$ ,  $16^\circ$  e  $34,5^\circ$  que correspondem respectivamente a (002), (110) e (040) (Saelee et al., 2016).

#### 4.4.5. Potencial $\zeta$ aparente

Visando avaliar a presença de carga líquida superficial nas amostras de nanocelulose após 96 h de hidrólise com diferentes complexos comerciais, foram realizadas medidas de potencial  $\zeta$  pela mobilidade eletroforética das partículas, apresentados na Tabela 4.2.

Tabela 4. 2 Potencial  $\zeta$  aparente de nanocelulose obtida após 96h de hidrólise enzimática com diferentes complexos comerciais

Coquetel enzimático	Potencial $\zeta$ aparente (mV)
Cellic Ctec 3	$-30,9 \pm 0,24$
Cellic Ctec 2	$-26,2 \pm 1,90$
Serzym	$-21,9 \pm 0,56$
Carezyme	$-15,8 \pm 1,01$

Suspensões com potencial  $\zeta$  acima de 30 (positivo ou negativo) estabelecem estruturas com boa estabilidade coloidal, reduzindo a possibilidade de aglomeração (Bhattacharjee, 2016). Conforme relatado por Hu e colaboradores (2018), o potencial  $\zeta$  aparente das estruturas hidrolisadas com o complexo contendo enzimas AA9 resultaram em valores superiores aos complexos que não apresentam tais categorias enzimáticas (Hu et al., 2018). Isso foi observado neste trabalho, já que a presença dessa enzima facilitou a geração da carga líquida, associada à exposição de grupos carregados (Figura 4.6). Os grupos carregados podem ser introduzidos pela clivagem oxidativa no carbono C1 ou C4 da celulose pela da enzima AA9 ou mesmo pela melhoria da rede de ligação de hidrogênio incluindo a exposição de hidroxilas (Forsberg et al., 2014; Hu et al., 2018).

Para a nanocelulose obtida pelo complexo contendo elevada atividade de xilanase (Serzym), observam-se valores superiores ao complexo contendo maior atividade de endoglucanase em relação à xilanase (Carezyme). Previamente foi relatado que a presença de xilanase na etapa de hidrólise facilita a exposição de grupos carboxílicos carregados na superfície das fibras, gerando nanoestruturas mais eletrostaticamente repulsivas, garantindo melhorias nos aspectos coloidais das suspensões (Nie et al., 2018). Tibolla e colaboradores (2017) reportaram entre -21,2 até -29,5 mV os valores de potencial  $\zeta$  aparente para as suspensões de nanocelulose obtidas por rota enzimática com xilanases partindo de casca de banana.

A partir dos resultados aqui apresentados em analogia a trabalhos de mecanismos de fibrilação enzimática, propõe-se a etapa de formação de nanocelulose por rota enzimática o esquema da Figura 4.6. O mecanismo apresentado se baseia na desconstrução mediada pela enzima e ocorre como um “descascamento de cebola”, em que camadas na superfície da celulose, contendo regiões amorfas e cristalinas, são sistematicamente hidrolisadas. Com o decorrer da hidrólise, são removidas camadas mais externas da celulose e expostas as camadas com morfologias superficial similar à camada anterior (Hu et al., 2014).

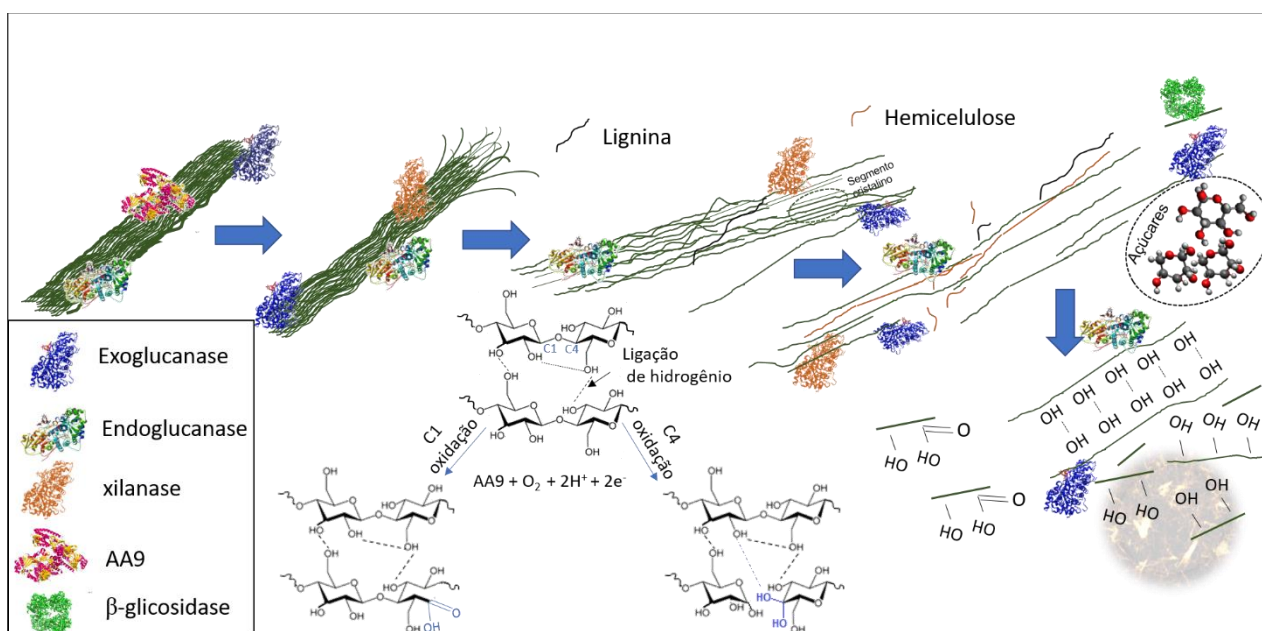


Figura 4. 6 Proposta de formação de nanocelulose por rota enzimática (arquivo próprio) e mecanismo de oxidação por enzimas do tipo AA9 – mecanismo de oxidação adaptado de Hu et al., 2018

O mecanismo de oxidação por famílias AA9 depende de doadores de elétrons, neste caso advindos de compostos fenólicos ou mesmo da lignina presente na matriz celulósica. A oxidação no carbono C1 tem como principal produto a formação do ácido aldônico, com a geração de um terminal redutor. Para a oxidação do carbono C4 ocorre a geração da forma cetoaldose, com a formação de um terminal não-redutor na cadeia de celulose (Beeson et al., 2015). Observa-se que ambas as oxidações são capazes de oferecer a celulose a formação de grupamentos carregados, contribuindo para a estabilidade coloidal das suspensões. De maneira similar, neste trabalho, pelas microscopias apresentadas na Figura 4.3, é sugerido que a hidrólise da celulose para formação de nanoestruturas ocorreu pela remoção das camadas superiores da biomassa, com posterior desfibrilação, em que as fibras foram desagregadas e depois reduzidas em segmentos menores, porém não como nanocristais. Com o decorrer da hidrólise, as estruturas menores foram sendo reduzidas e os nanocristais liberados. Por fim, sugere-se que a lignina presente na polpa de celulose atuou como doadora de elétrons para atuação das enzimas AA9 contidas nos coquetéis Cellic Ctec.

#### **4.5 CONSIDERAÇÕES PARCIAIS**

Como conclusões parciais, pode-se dizer que todos os complexos enzimáticos levaram à formação de nanocelulose, sejam nanocristais ou nanofibrilas de celulose. Foi possível identificar que a presença de enzimas auxiliares em ação sinérgica com celulasas permitiu a produção de nanocelulose com maior índice de cristalinidade associado à maior liberação de açúcares na etapa de hidrólise. Dentre as enzimas auxiliares de grande importância para a etapa de formação de nanoestruturas por rota enzimática, destacou-se a presença das xilanases como fundamental para a liberação de estruturas mais puras e uniformes. Por fim, sugere-se que uma composição adequada de coquetéis enzimáticos é capaz de liberar com mais facilidade estruturas cristalinas da celulose associada a elevados rendimentos de sacarificação e liberação de açúcares para utilização em outras rotas comerciais.

## **5. PRODUÇÃO DE NANOFIBRILAS E NANOCRISTAIS DE CELULOSE USANDO O ÁCIDO CÍTRICO NO CONCEITO DE BIORREFINARIA: IMPACTO DO TEMPO DE HIDRÓLISE NAS PROPRIEDADES**

O desenvolvimento de processos sustentáveis, usando fontes renováveis para produzir materiais ambientalmente amigáveis tem sido explorado com o objetivo de contribuir para a transição de uma economia de produtos fósseis para uma de base biológica. Neste cenário, a utilização de ácido cítrico para a produção de nanofibrilas e nanocristais de celulose tem como vantagem um processo usando um ácido biodegradável, que pode ser obtido dentro do conceito de biorrefinaria. Além disso, o uso do ácido cítrico para produção de nanomateriais pode contribuir para a geração de estruturas esterificadas, resultantes de seu pKa (3,15) que contribui para que duas reações simultâneas ocorram: a hidrólise da celulose amorfa e a esterificação de Fischer. Como resultado dessas reações, ganhos na estabilidade térmica e coloidal das suspensões contendo a nanocelulose são esperados. Por fim, o uso de ácidos orgânicos para extração de matérias nanocelulósicas merecem investigação mais aprofundada, visando determinar as condições de processo que permitirão sua implementação no futuro em larga escala em biorrefinarias.

### **5.1. MATERIAIS**

Polpa kraft de celulose de Eucalipto, fornecida pela empresa Suzano Papel e Celulose (Brasil), foi utilizada como matéria prima para a produção de nanocelulose. A polpa foi reduzida a um tamanho de partícula menor do que 2 mm, utilizando-se um moinho de facas do tipo Willey, 500 W (Solab). O ácido cítrico (99% PA) foi adquirido da empresa Sigma-Aldrich.

### **5.2 MÉTODOS**

#### **5.2.1 Produção de nanofibrilas e nanocristais de celulose**

A extração de NFC e NCC a partir da polpa de celulose de Eucalipto foi realizada usando uma solução aquosa de ácido cítrico a 65% (m/v) (Chen et al., 2016). Esta solução (100 mL) foi aquecida a 120 °C (usando banho de glicerol) com a adição de 6g de polpa de celulose. A reação de produção foi realizada em um reator do tipo tanque agitado (a 450 rpm) com um impelidor e tampa de Teflon, em diferentes tempos de reação (1,5 h; 3 h; 4,5 h e 6 h). A reação foi finalizada pela adição de 500 mL de água deionizada, a 80 °C para evitar a cristalização, seguida por centrifugação a 2603 g por 10 min. O precipitado foi lavado com água deionizada (25 °C) para a remoção do excesso de ácido cítrico. A suspensão resultante foi dispersa em 1000 mL de água deionizada e passou por diálise durante 7 dias até atingir pH neutro. Finalmente, as amostras foram submetidas a ultrassom por 3 min, em banho de gelo, usando sonicador Branson 250 com 10% de amplitude. O precipitado (contendo NFC) foi separado do sobrenadante (contendo NCC) por centrifugação a 1038 g por 10 min. O sobrenadante foi armazenado e o precipitado foi suspenso novamente em água fresca. Este processo foi repetido até a suspensão ficar transparente. O precipitado (com 1% m/v de concentração) foi então sonificado (50% de amplitude) por 20 min em banho de gelo, a fim de garantir maior uniformidade das nanofibrilas. As frações separadas de NCC e NFC, bem como parte do material antes da separação, foram resfriadas e liofilizadas para obter os produtos finais.

### 5.2.2. Rendimentos de NCC e NFC

O rendimento do NCC foi calculado com base no método feito por Novo e colaboradores (2016). Uma suspensão de 5 mL a NCC e NFC a 0,05% após hidrólise ácida (sem separação) foi preparada em água ultrapura e dispersa por ultrassonografia (sonicador Branson 250, amplitude de 50%, pulso de 3 min). A suspensão foi filtrada usando um filtro de membrana de ésteres de celulose misturados (tamanho de poro de 1 µm, 47 mm de diâmetro; Startech) e o material não retido ( $m_{NCC}$ ) foi usado para determinar o rendimento do NCC. O cálculo do rendimento do NCC considerou a massa total de polpa de celulose para a hidrólise ácida. O rendimento do NCC foi calculado usando a Equação 5.1:

$$Rendimento_{NCC} = \left[ \frac{\left(\frac{m_{NCC}}{0.25g}\right) * m_{AHA}}{m_{polpa\ de\ celulose}} \right] \times 100 \quad (5.1)$$

O rendimento de CNF foi determinado com base no material retido ( $m_{NFC}$ ) na membrana após a filtração. O rendimento de NFC foi calculado usando a Equação 5.2:

$$Rendimento_{NFC} = \left[ \frac{\left(\frac{m_{CNF}}{0.25}\right) * m_{AHA}}{m_{cellulose\ pulp}} \right] \times 100 \quad (5.2)$$

Onde,  $m_{AHA}$  é a massa total após a hidrólise ácida,  $m_{polpa\ de\ celulose}$  é massa inicial de polpa de celulose e 0,25 g é a massa NCC e NFC na suspensão filtrada.

### 5.2.3 Microscopia de Força Atômica (AFM)

Os NCCs foram dispersos em água ultrapura, sob ultrassonificação (sonicador Branson Modelo 250), para que fosse obtido uma suspensão de 0,001% (m/v), posteriormente uma alíquota foi depositada em um substrato de mica. As imagens AFM foram obtidas utilizando um instrumento Dimension V (Veeco, EUA) operado no modo de derivação, a uma taxa de varredura de 1 Hz, com força constante de 48 N/m e frequência de ressonância de 190 kHz. O software Gwyddion v. 2.53 foi utilizado para tratamento e mensuração das imagens.

### 5.2.4. Avaliação do Índice de Cristalinidade por Difração de Raios-X (DRX)

Os índices de cristalinidade foram obtidos conforme procedimento apresentado no item 4.3.3.

### 5.2.5 Potencial $\zeta$ aparente

A carga do potencial de superfície das amostras foi determinada conforme o procedimento apresentado no item 4.3.4.



### 5.2.6 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A identificação dos grupos carboxila nos NCCs obtidos foi realizada por espectroscopia FTIR, utilizando um instrumento Bruker Vertex 70 operado no modo ATR, na faixa de 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ , com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$  e total de 32 varreduras.

### 5.2.7 Ressonância Magnética Nuclear de $^{13}\text{C}$ no estado sólido (ss-NMR)

As alterações nos domínios amorfos e o grau de substituição por grupos carboxila foram avaliados usando  $^{13}\text{C}$  ss-NMR no estado sólido com uma sequência de pulsos Multi-CP. Os espectros da polpa de celulose bruta e do produto obtido após a hidrólise com ácido cítrico foram obtidos usando um espectrômetro Bruker AVANCE III HD 400 MHz equipado com uma sonda MAS de estado sólido, com dois canais configurados para frequências  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de 100,5 e 400 MHz, respectivamente. As amostras foram embaladas em rotores cilíndricos MAS de zircônia de 4 mm. Foram utilizadas as seguintes condições operacionais: 1024 varreduras, tempo de aquisição de 20 ms, taxa de rotação de 14 kHz, tempo de contato de 1 ms para a sequência Multi-CP e tempo de contato de 0,8 ms para o último CP do ciclo.

Os valores do grau de substituição (GS) foram calculados como a razão de integrais, conforme mostrado na Equação 5.3 (Berlioz et al., 2009):

$$\text{GS}_{\text{NMR}} = \frac{6I_{\text{CO}}}{I_{\text{C}}}$$

(5.3)

Onde, a integral de pico da  $I_{\text{CO}}$  corresponde as ligações de carbonilas de ésteres,  $I_{\text{C}}$  corresponde à soma das áreas de todos os carbonos da celulose e o número 6 no numerador refere-se ao número de átomos de carbono em uma molécula de celulose anidro glucose.

### 5.2.8 Análise Termogravimétrica (TGA)

As análises termogravimétricas da polpa de celulose e do NCC liofilizado foram realizadas utilizando um analisador TA Instruments Q500, sob uma atmosfera inerte de nitrogênio (a 40 mL/min), com aquecimento da amostra em um cadinho de platina a partir da temperatura ambiente até 700 °C, a uma taxa de 10 °C/min.

## 5.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.3.1 Efeito do tempo de reação da hidrólise na produção de NFC e NCC

O tempo de reação da hidrólise pode ter um efeito importante nas propriedades do material nanocelulósico. Portanto, foi realizada uma investigação da morfologia do nanomaterial de celulose isolado obtido da polpa de celulose após 1,5, 3, 4,5 e 6 h de hidrólise a 120 °C, empregando 65% (m/v) de ácido cítrico, utilizando imagens de AFM (Figura 5.1).

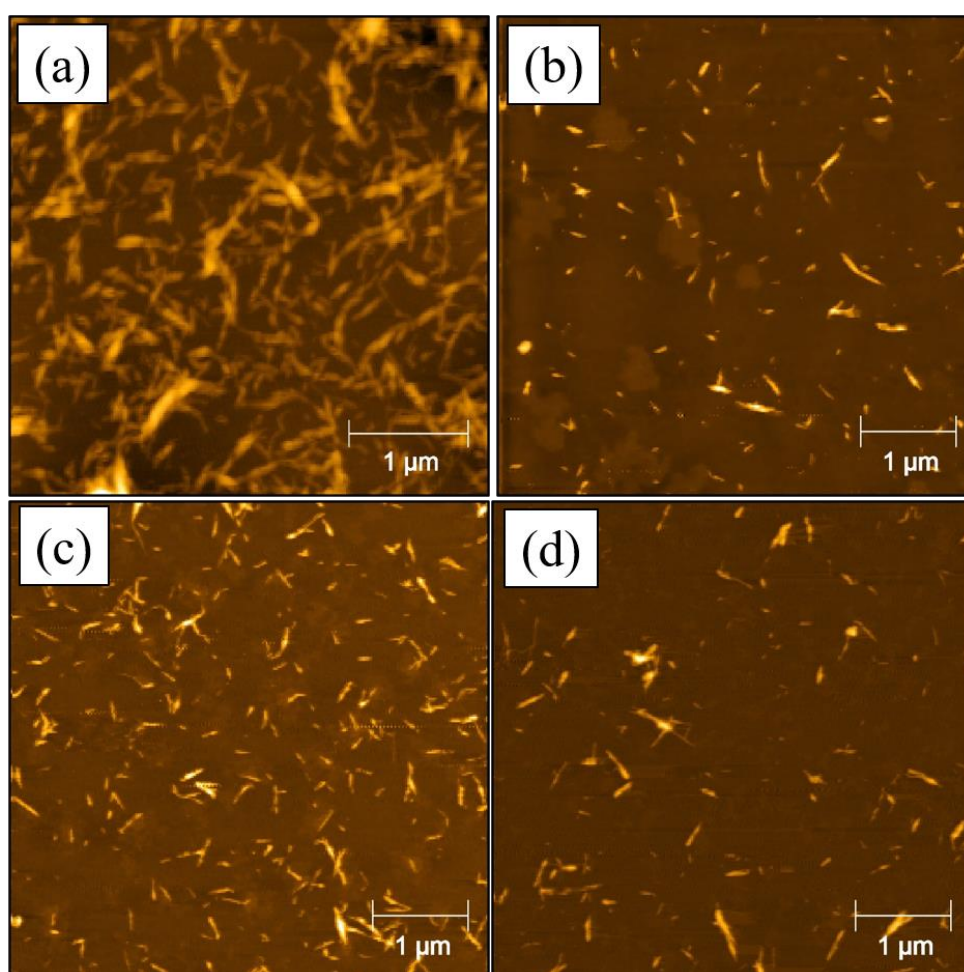


Figura 5. 1 AFM para nanocelulose obtida após reação com ácido cítrico em diferentes tempos de hidrólise: (a) 1,5h; (b) 3h; (c) 4,5h e (d) 6h

Para as amostras obtidas após 1,5 h de reação (Figura 5.1 (a)), as imagens de AFM mostraram estruturas finas e longas, características da nanocelulose, contendo nanocristais de celulose (NCC). Para as amostras obtidas após 3 h, observou-se predominância de nanocristais de celulose (NCC) no sobrenadante da

suspensão (Figura 5.1 (b) - (d)). Os resultados obtidos indicaram que a hidrólise estava incompleta quando foi utilizado um tempo de reação mais curto (1,5 h), uma vez que uma mistura de fibras não hidrolisadas de diferentes tamanhos pôde ser observada nas imagens de AFM, juntamente com a nanocelulose (Figura 5.1 (a)).

As imagens de AFM também foram utilizadas para estimar as dimensões dos materiais nanocelulósicos (Tabela 5.1). Os comprimentos das nanoestruturas dos NCCs variaram de  $270 \pm 98$  nm, a  $215 \pm 89$  nm, nos períodos de 1,5 e 6 h da reação de hidrólise por ácido cítrico, respectivamente. Os diâmetros das estruturas obtidas foram semelhantes, variando de 9 a 10 nm. Portanto, foi possível obter NCC para todos os períodos de reação propostos, com a observação de que períodos de hidrólise mais longos resultaram em estruturas mais homogêneas e maiores rendimentos em termos de produção (Tabela 5.1). Além disso, o aumento do tempo de reação da hidrólise ácida reduziu o comprimento médio do NCC e contribuiu para maiores rendimentos. Neste trabalho, a escolha do uso de alta temperatura ( $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) também contribuiu para a produção de nanocelulose. A combinação de alta temperatura e elevada concentração de ácido resultou em uma hidrólise mais eficiente das hemiceluloses presentes na matéria-prima e contribuiu para a despolimerização da celulose, devido à sua maior solubilidade nessas condições de reação, resultando em maior cristalinidade e formação de estruturas homogêneas (Chen et al., 2016).

Em um estudo anterior, Spinella e colaboradores (2016) relataram a formação de estruturas de NCCs em torno de 220 nm em comprimentos a partir das fibras de rami, usando ácidos orgânicos na hidrólise, incluindo ácido cítrico. Yu e colaboradores (2019) relataram NCCs com comprimentos de 230 a 248 nm (variando de acordo com o tempo de extração), utilizando uma mistura de ácido cítrico e ácido clorídrico para aumentar o rendimento e obter melhor homogeneidade das nanoestruturas. Portanto, as dimensões dos materiais nanocelulósicos obtidos no presente trabalho podem ser consideradas muito satisfatórias, considerando que apenas o ácido cítrico foi utilizado. Outro ponto a ser destacado é que o rendimento do NCC obtido aqui foi de até  $23,1 \pm 0,9\%$  em 6 h de reação de hidrólise, utilizando apenas um ácido orgânico que atenda aos requisitos do conceito de biorrefinaria. Os valores de rendimento foram encorajadores, quando comparados a outras rotas verdes de extração como a água subcrítica (Novo et al., 2016) e a hidrólise

enzimática (de Aguiar et al., 2020), porém no processo convencional com ácido sulfúrico, os rendimentos máximos alcançados podem chegar em até 75% (Chen et al., 2015). Uma grande vantagem do uso do ácido cítrico é que os açúcares liberados em outros processos da biorrefinaria podem ser utilizados como matéria-prima nos processos de cultivo microbiano para obtenção de produtos de base biológica, incluindo ácidos orgânicos. Essa abordagem se encaixaria bem no conceito de biorrefinaria, onde a produção do nanomaterial de celulose usando ácido orgânico contemplaria gargalos apresentados dentro do processo.

Tabela 5. 1 Índice de cristalinidade, dimensões e rendimentos para amostras de nanocelulose obtidas após diferentes tempos de hidrólise ácida

<b>Tempo (h)</b>	<b>Índice de cristalinidade (%)</b>	<b>Comprimento de NCC (nm)</b>	<b>Diâmetro de NCC (nm)</b>	<b>Rendimento de NCC (%)</b>	<b>Rendimento de NFC (%)</b>
1,5	73	270 ± 98	11 ± 4	8,2 ± 1,1	71 ± 1
3,0	81	229 ± 92	9 ± 3	13,3 ± 0,5	64 ± 2
4,5	83	231 ± 59	10 ± 5	17,1 ± 0,2	58 ± 1
6,0	83	215 ± 89	9 ± 3	23,1 ± 0,9	52 ± 1

Os valores do índice de cristalinidade das nanoceluloses obtidas utilizando diferentes períodos de reação da hidrólise com ácido cítrico foram estimados por difração de raios-X pelo método de deconvolução. Os difratogramas (Figura 5.2) mostraram picos típicos de celulose a  $2\theta$  de  $14,7^\circ$  (101),  $16,5^\circ$  (101),  $22,6^\circ$  (002) e  $34,5^\circ$  (040). Os planos cristalinos são característicos da celulose I (Otoni et al., 2018a), indicando que a fração de celulose cristalina não foi afetada pela reação de hidrólise ácida (Park et al., 2010), mesmo durante os maiores períodos de reação.

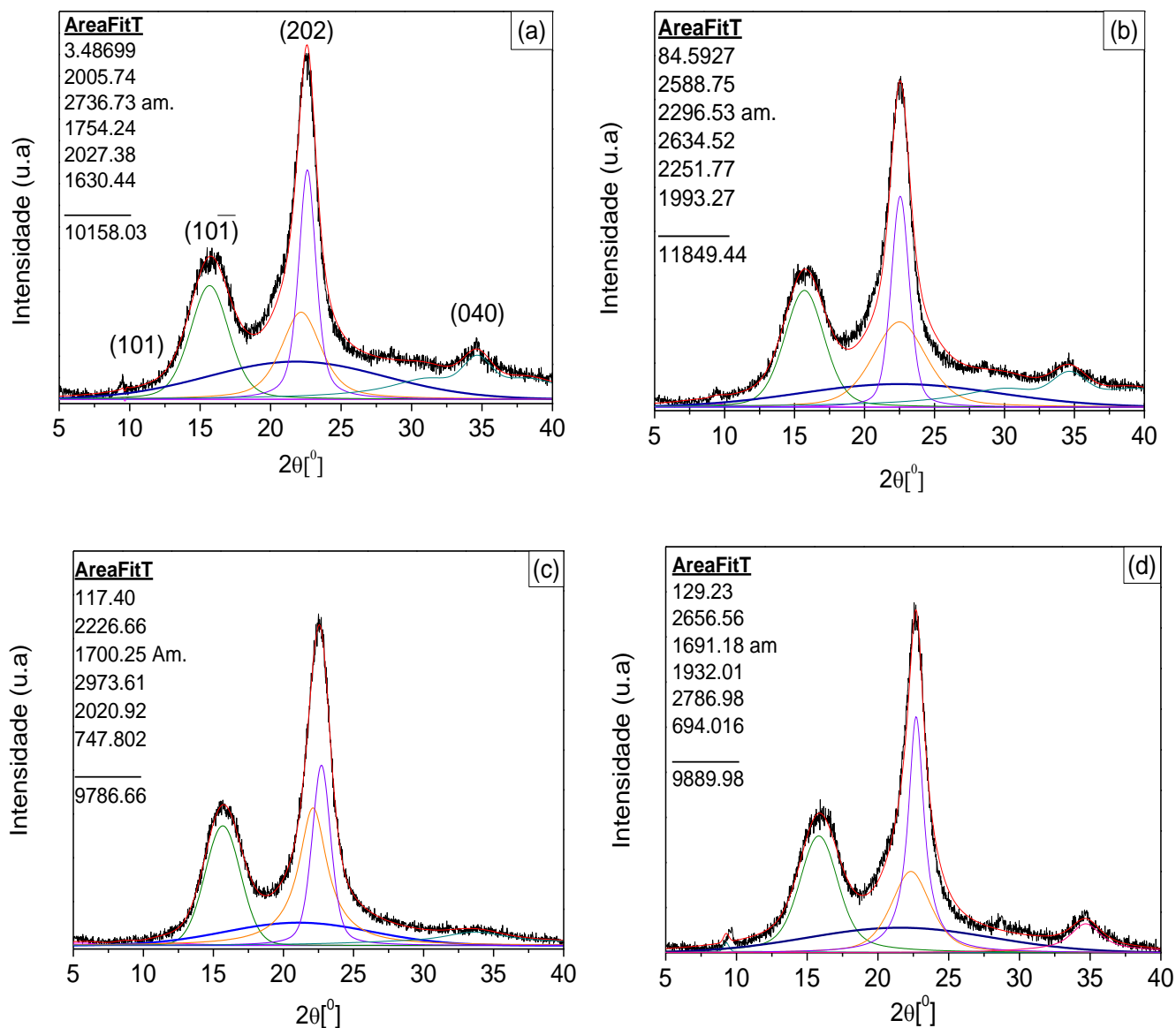


Figura 5. 2 Difractogramas de raio-x deconvoluídos para nanocelulose obtida após diferentes tempos de hidrólise com ácido cítrico (a) 1.5 h (b) 3 h (c) 4.5 h e (d) 6 h

O aumento do índice de cristalinidade (IC) e a ausência de alterações na fração celulose I foram observados em todas as amostras, quando comparados à polpa de celulose original. A matéria-prima apresentou cristalinidade aparente de 63%, enquanto a cristalinidade aumentou para 83%, de acordo com o tempo de reação (Tabela 5.2). O aumento do IC foi associado a uma diminuição do conteúdo amorfo no material. Usando ácido cítrico, a celulose amorfa foi preferencialmente hidrolisada, enquanto o processo de hidrólise mais agressiva com ácido sulfúrico podem causar danos à estrutura da celulose cristalina (Teixeira et al., 2011a). Os

valores de cristalinidade obtidos estão de acordo com o trabalho de Yu e colaboradores (2019), que relataram IC em torno de 83 % para NCC obtido por hidrólise com ácido cítrico da polpa de eucalipto. Além disso, a comparação dos valores de IC obtidos aqui com os relatados por Tonoli e colaboradores (2012), que obtiveram IC de 76-82% para a hidrólise de celulose com ácido sulfúrico, indicaram boa eficiência da hidrólise com ácido cítrico, considerando que o ácido sulfúrico é considerado mais agressivo do que ácidos orgânicos.

### 5.3.2 Carga líquida superficial e química dos NCC

A carga superficial líquida e a química dos materiais nanocelulósicos obtidos após a hidrólise do ácido cítrico por diferentes tempos de reação foram avaliadas. Os resultados das medições do potencial  $\zeta$  aparente e as análises de RMN do grau de substituição podem ser encontrados na Tabela 5.2.

Tabela 5. 2 Potencial  $\zeta$  aparente e grau de substituição obtido por RMN para NCC produzido após diferentes tempos de hidrólise ácida

Tempo (h)	Potencial $\zeta$ aparente (mV)	Grau de substituição por RMN (DS)
1,5	-36,7 $\pm$ 2,7	0,15
3,0	-37,6 $\pm$ 0,9	0,18
4,5	-47,6 $\pm$ 2,1	0,31
6,0	-48,7 $\pm$ 0,6	0,27

O potencial  $\zeta$  aparente indica a mobilidade eletroforética das partículas, que é afetada pela dispersão ou aglomeração de partículas causada por forças repulsivas eletrostáticas. O potencial  $\zeta$  tornou-se cada vez mais negativo à medida que o tempo de reação foi aumentando, com valores entre -36,7  $\pm$  2,7 mV (1,5 h de hidrólise) e -48,7  $\pm$  0,6 mV (6h de hidrólise). Os valores de potencial  $\zeta$  para NCC obtidos por hidrólise ácida geralmente estão entre -20 e -50 mV (exceto quando se utiliza ácido clorídrico, devido à ausência de grupos carregados) (Foster et al., 2018). Os valores obtidos para o NCC neste trabalho estão próximos do potencial  $\zeta$  para NCC obtido

com ácido sulfúrico (cerca de -40 mV, valor com magnitude desejável para uma suspensão coloidal) (Abitbol et al., 2018; Vanderfleet et al., 2019). Esses valores foram indicativos de uma suspensão coloidal estável que possivelmente evitou a agregação de celulose, o que é uma característica importante para muitas aplicações em potencial que precisam usar o NCC em suspensão (Bhattacharjee, 2016). Os grupos carboxilas na superfície da nanocelulose são responsáveis pela estabilidade da suspensão coloidal, de modo que a estabilidade pode variar de acordo com o teor destes grupos (Isogai et al., 2011).

A presença de aniônicos (grupos carboxila) na superfície do NCC leva a uma maior repulsão eletrostática, o que aumenta a estabilidade da suspensão coloidal. Portanto, os espectros de FT-IR foram utilizados para avaliar a presença de grupos carboxila (COOH) nas amostras obtidas após hidrólise com ácido cítrico por diferentes períodos de reação (Figura 5.3).

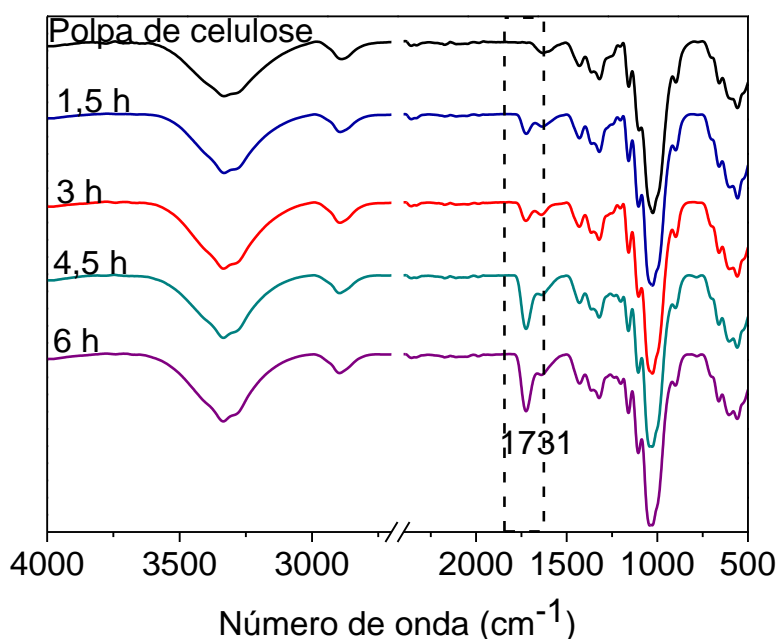


Figura 5. 3 Espectros de FT-IR para NCC obtida para diferentes tempos de hidrólise (1,5h, 3h, 4,5h, e 6 h), em comparação com a polpa de celulose de partida

Bandas intensas a  $3332\text{ cm}^{-1}$  para a amostra de celulose e a  $3345\text{ cm}^{-1}$  para as amostras de NCC obtidas usando diferentes tempos de reação foram típicas da vibração de estiramento dos grupos hidroxila (OH). Os espectros mostraram uma banda a  $1731\text{ cm}^{-1}$ , atribuída às vibrações C = O das funções éster dos ácidos



carboxílicos. Esta banda não foi observada no espectro da polpa de celulose original. No caso do NCC, essa banda intensa ocorreu devido à reação de esterificação que envolve a interação entre os grupos hidroxila dos grupos celulose com os grupos carbonila (C = O) ou carboxila (COOH) do ácido carboxílico (Ji et al., 2019; Yu et al., 2016). A banda em  $1731\text{ cm}^{-1}$  aumentou em intensidade para as amostras obtidas utilizando tempos de reação de hidrólise mais longos, sugerindo que uma maior exposição da celulose ao ácido cítrico resultou em esterificações mais eficientes. Estudos anteriores relataram uma banda em  $1735\text{ cm}^{-1}$  para NCC modificado com ácido cítrico, que foi atribuída a grupos carboxila na superfície do NCC, gerada por reações de esterificação entre os grupos hidroxila da celulose e os grupos carboxila do ácido cítrico (Ji et al., 2019; Yu et al., 2019; Yu et al., 2016).

Para uma investigação mais aprofundada do grau de substituição do NCC, as amostras de nanocelulose foram analisadas por RMN Multi-CP (Figura 5.4).

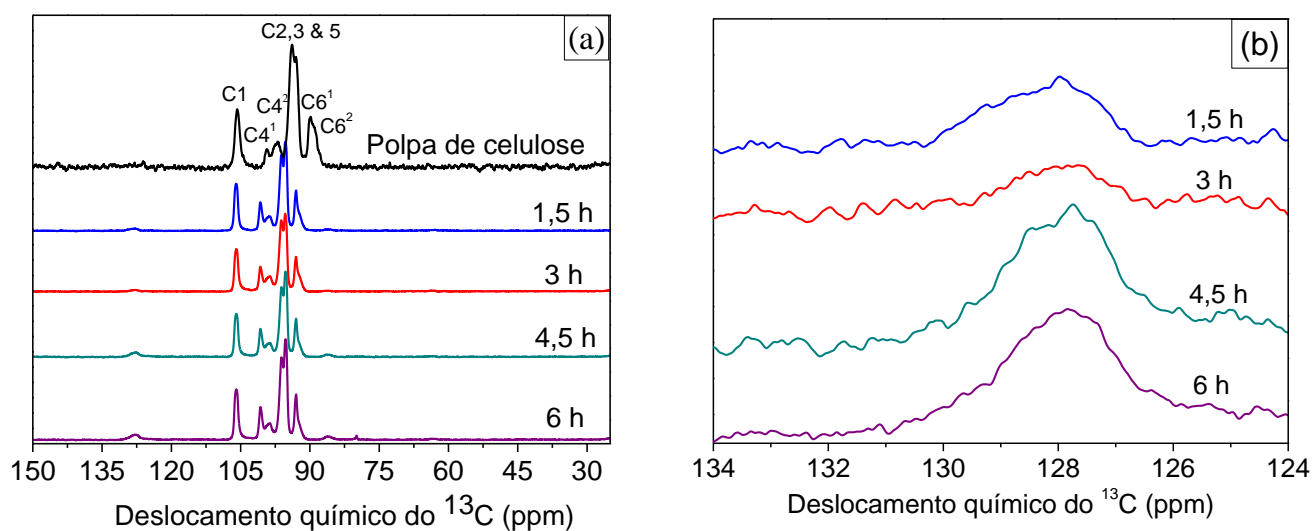


Figura 5. 4 (a) Espectros Multi-CP para polpa de celulose e CNC produzido usando diferentes tempos de hidrólise com ácido cítrico; (b) zoom da região espectral entre 134 e 124 ppm

Um aumento dos domínios cristalinos foi evidenciado por alterações relacionadas aos carbonos  $\text{C}_4$  e  $\text{C}_6$ . Os espectros (Figura 5.4 (a)) mostraram que a hidrólise com ácido cítrico levou a alterações associadas às características do espectro da polpa de celulose a 89-82 ppm, relacionadas ao carbono  $\text{C}_4^1$ , e no espectro do NCC a 89 ppm (fração cristalina) e 83 ppm ( $\text{C}_4^2$ , fração amorfa). O

espectro do NCC mostrou fortes mudanças nos sinais  $C_6^1$  (66 ppm), associado à fração cristalina, e  $C_6^2$  (63 ppm), associado à fração amorfa na polpa de celulose. O desaparecimento do  $C_6^2$  e um ligeiro aumento da resolução espectral na região  $C_6^1$  (66 ppm) correspondeu a um domínio cristalino importante após a hidrólise com ácido cítrico. Para as amostras obtidas após a hidrólise com ácido cítrico, novos sinais foram identificados a 173 ppm, atribuídos as carbonilas do éster e do ácido carboxílico. Cetin e colaboradores (2009) atribuíram a região em 170 ppm a uma banda lateral de grupos carbonila enxertados em NCC por acetilação. Os resultados obtidos neste trabalho evidenciaram a presença de grupos carbonila (C = O) na superfície do NCC, sendo esta característica de modificação da superfície significativamente mais intensa nos espectros para as amostras obtidas após 4,5 e 6 h de reação.

O grau de substituição (DS) foi estimado a partir dos sinais integrais da região carbonila, mostrados na Figura 5.4 (b) (Berlioz et al., 2009). O DS indica o número médio de substituições dos grupos hidroxila do anel glicosídico que são os principais responsáveis pelas reações da celulose, com um valor de DS = 3,0 correspondente à substituição de três grupos OH (Roy et al., 2009). Neste trabalho, o DS do NCC variou de 0,15 a 0,31 (Tabela 5.2). Períodos mais longos de hidrólise levaram a valores mais altos de DS, com uma diferença significativa observada entre as amostras obtidas em 1,5 e 6 h de reação. Os valores obtidos estão de acordo com o trabalho de Spinella e colaboradores (2016), relataram DS de 0,22 após 3 h de reação para NCCs obtidos a partir da fibra de rami, indicando substituição na superfície do material.

### 5.3.3 Estabilidade térmica

A estabilidade térmica é um parâmetro importante para o NCC, uma vez que uma das principais aplicações desse material é no reforço de compósitos, em que é necessária alta temperatura no processamento (Yu et al., 2016). Os resultados para as análises térmicas das amostras obtidas em diferentes tempos de reação são apresentados na Figura 5.5 (a) para análise gravimétrica térmica (TGA) e na Figura 5.5 (b) para análise gravimétrica térmica diferencial (DTG).

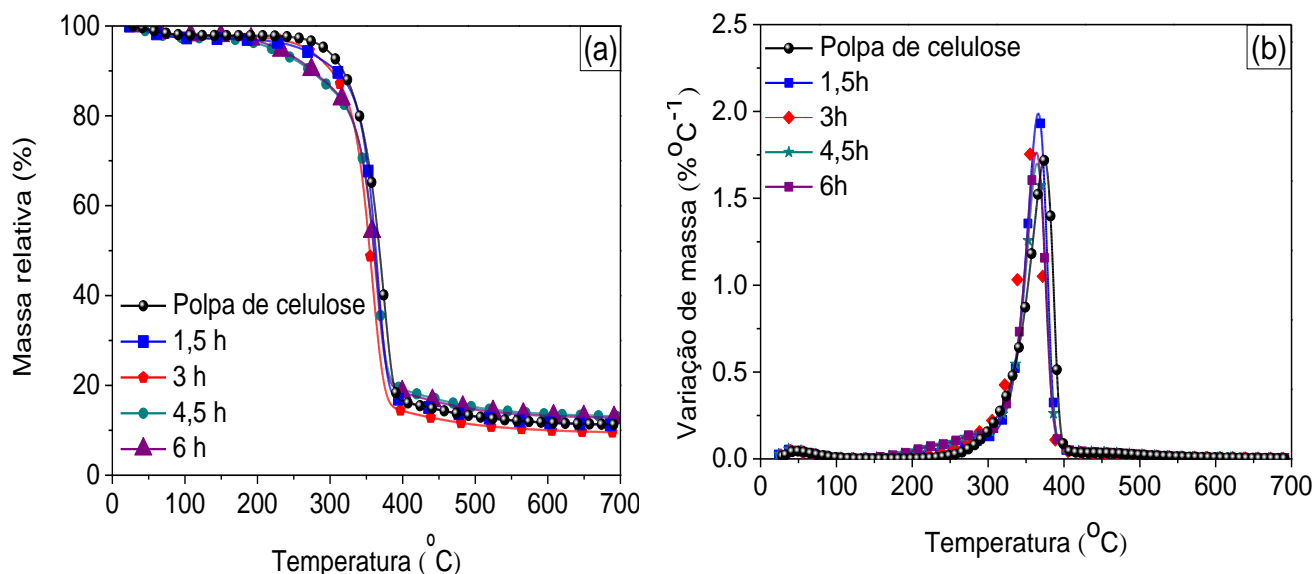


Figura 5. 5 Análise termogravimetrica da polpa de cellulose (●) e do CNC produzido em diferentes tempos de reação: 1,5h (■), 3 h (◆), 4.5 h (☆), and 6 h (▲) (b)variação da massa em função da temperatura

A temperatura inicial de degradação térmica ( $T_{\text{onset}}$ ) diminuiu com o aumento do tempo de reação Figura 5.5 (a), Tabela 5.3. As maiores estabilidades térmicas para os NCC obtidos por ácidos orgânicos, em comparação com o método convencional com ácido sulfúrico, podem ser atribuídas ao maior grau de polimerização, devido às condições de hidrólise menos severas, sugerindo que o processo de hidrólise determina as propriedades térmicas do material. O NCC derivado do ácido cítrico aqui relatado, apresentou temperatura inicial de degradação maior em comparação com o NCC obtido por ácido sulfúrico, para o qual o início da degradação foi em torno de 166 °C (Alemdar & Sain, 2008; Vanderfleet et al., 2019).

Tabela 5. 3 Temperatura inicial de degradação, temperatura máxima de degradação e resíduo para amostras obtidas após diferentes tempos de hidrólise ácida

Tempo (h)	Temperatura inicial de degradação (°C)	Temperatura Máxima de degradação (°C)	Resíduo (%)
1,5	291	368	9
3,0	289	357	11
4,5	275	362	13

6,0	273	364	13
-----	-----	-----	----

Os picos da curva termogravimétrica derivada (DTG) são mostrados na Figura 5.5 (b). Os valores máximos de temperatura de degradação e de rendimento de carvão são fornecidos na Tabela 5.3. Os resultados indicaram que a temperatura máxima de degradação diminuiu à medida que o tempo de reação aumentou, provavelmente devido à maior inserção de grupos carboxílicos na superfície do NCC. Sugere-se que o aumento da quantidade de resíduo foi possivelmente atribuído à maior funcionalização da superfície, devido a uma maior ocorrência de eventos de reticulação em temperaturas elevadas (Spinella et al., 2016). No entanto, os grupos carboxílicos nas amostras dos NCC não influenciaram na estabilidade térmica, demonstrando uma potencial adequação deste material para aplicações futuras envolvendo processamento a altas temperaturas.

#### **5.4. CONCLUSÕES PARCIAIS**

Os resultados deste trabalho revelaram que a definição de condições operacionais adequadas do processo de hidrólise é um fator chave para permitir o uso de ácido cítrico na obtenção de nanocelulose. Ao variar o tempo de reação da hidrólise, foi possível obter principalmente NCC com superfície funcionalizada com grupos carboxila, utilizando uma única etapa de extração e funcionalização. Os NCCs formaram suspensões estáveis com boa estabilidade térmica, favorecendo potenciais aplicações no processamento de polímeros. Esses resultados indicaram que a produção de NCC usando ácido cítrico poderia ser explorada em um conceito de biorrefinaria, oferecendo uma rota sustentável e ecológica para obter um nanomaterial de alto valor agregado.

## 6 ESTUDO DO PRÉ-TRATAMENTO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR VISANDO APROVEITAMENTO PARA PRODUÇÃO DE NANOCELULOSE

Objetivando a utilização metodologias que se enquadrem no contexto de biorrefinaria, aqui foram propostos pré-tratamentos que permitam a fácil recuperação de produtos para uso em outras rotas. O primeiro método foi o tratamento hidrotérmico, que tem como vantagem a possibilidade da utilização em outros processos os açúcares da hemicelulose, liberados na fração líquida. Dentre as possibilidades, destaca-se a utilização dos açúcares C5 na obtenção de etanol 2G. Além disso, os oligômeros da xilose, conhecidos como xilooligossacarídeos, podem ser empregados na indústria alimentícia para produção de alimentos saudáveis (por favorecer a proliferação de bactérias probióticas), bebidas e ativos de preparação simbiótica (Kabel et al., 2002; Vazquez-Olivo et al., 2019). Outro tratamento usado foi o organossolve, que permite a recuperação da lignina, que pode ser matéria-prima de diferentes rotas, como a produção de vanilina, formadeídos e espumas de poliuretano (Isikgor & Becer, 2015).

### 6.1 MATERIAIS

Bagaço de cana-de-açúcar *in natura* foi doado pela usina Ipiranga (Descalvado-SP). O material seco foi submetido a pré-tratamentos para remoção de constituintes não celulósicos. Para branqueamento, foi utilizado etanol 95% (Reatec), peróxido de hidrogênio (Synth) e hidróxido de sódio (Chemis). Na etapa de hidrólise enzimática, foi utilizado o complexo enzimático Cellic CTec 3<sup>®</sup> (Novozymes, Dinamarca) com atividade de 205 FPU/mL. A glicose liberada foi monitorada pelo kit de análise enzimática GOD-POD (labtest<sup>®</sup>). Para as hidrólises ácidas foi usado ácido cítrico (Synth) e ácido sulfúrico (Synth).

## 6.2 MÉTODOS

### 6.2.1 Pré-tratamento hidrotérmico

O bagaço de cana *in natura* foi submetido a um tratamento hidrotérmico em reator de 5,5L (Parr, modelo 4584, Instrument company, EUA) contendo impelidor para agitação e controle de temperatura. Este tratamento tem como principal objetivo a remoção de hemicelulose. As condições de tratamento foram 150 g de bagaço em massa seca e água destilada na proporção 1:10 (m/v), com 200 rpm de agitação, a 195 °C por 10 min. Após este tempo, a temperatura do reator foi reduzida até 50 °C e o reator aberto. A fase líquida foi separada do bagaço por filtração. A fase sólida foi lavada em água corrente até pH neutro. Por fim, o material foi seco em estufa com circulação de ar a 40 °C. O rendimento mássico foi determinado comparando o valor final da massa de bagaço tratado e o valor inicial de bagaço *in natura*.

### 6.2.2 Pré-tratamento organossolve

Após passar pelo tratamento hidrotérmico, o bagaço foi submetido a um tratamento organossolve. Este tratamento consiste principalmente na remoção de lignina do bagaço. Partiu-se de 70 g de bagaço hidrotérmico em condições 1:1 (v/v) de água e etanol, em teor de sólidos de 1:15 (massa seca sólido: volume de solução). O tratamento foi feito em reator (Parr, modelo 4584, Instrument company, EUA) a 200 °C por 2 h em 200 rpm de agitação. Ao final desta etapa, o reator foi despressurizado e a temperatura reduzida até 50 °C. O reator foi aberto e a fase sólida foi separada da fase líquida. O material sólido foi lavado com uma solução de 1 L NaOH 1% (m/v) por 2 min em agitador mecânico a 2000 rpm. Posteriormente o sólido foi lavado em água corrente até pH neutro. A fase sólida foi seca em estufa com circulação de ar a 40 °C. A partir da fase líquida (antes da lavagem com NaOH) foi possível fazer a recuperação da lignina.

Para recuperar a lignina da fase líquida do pré-tratamento, a solução teve o pH ajustado para 3 e mantida em banho a 60 °C por 1 h. Em seguida a solução contendo a lignina foi centrifugada a 10 000 rpm por 8 min a 20 °C.

### 6.2.3 Branqueamento

Após a etapa de tratamento organossolve o material foi submetido a um branqueamento usando uma mistura de hidróxido de sódio 4% (m/v) e peróxido de hidrogênio em diferentes concentrações (5%, 11% e 24% v/v). Este método consiste em remover o resíduo de lignina e conferir alvura ao material. O tratamento foi feito partindo de 80 g de bagaço em 1 L de solução, sendo composta por 500 mL de hidróxido de sódio e 500 mL de peróxido na concentração anteriormente apresentada. O material foi tratado sob agitação em 450 rpm a 55 °C por 90 min após a adição de todo o volume de peróxido. A espuma formada na reação foi controlada com pequenas adições de ácido acético P.A. Ao final da reação, a fase sólida foi separada por filtração da fase líquida. O bagaço branqueado foi lavado em água corrente até pH neutro e seco em estufa a 40 °C com circulação de ar. Após seco, o material foi moído em moinho de facas (Wiley) para redução da granulometria (menor que 2 mm).

### 6.2.4 Hidrólise enzimática do bagaço após tratamento hidrotérmico

Nesta etapa, o bagaço submetido ao tratamento hidrotérmico foi hidrolisado para obtenção de açúcares. A hidrólise enzimática foi por 48 h de hidrólise usando o complexo comercial Cellic Ctec 3<sup>®</sup>. Para esta etapa foi utilizado tampão citrato de sódio em pH 5 e 0.1 M com 15% (m/v) de teor de sólidos e carga de enzima de 10 FPU/g sólidos e 250 rpm de agitação. A reação foi feita em reator do tipo tanque agitado encamisado, conectado a um banho de água a 50 °C. O impelidor utilizado foi do tipo orelha de elefante e o volume máximo do reator de 200 mL, tendo trabalhado com 100 mL de meio reacional (Florencio et al., 2019). Três hidrólises independentes foram realizadas para cada material. Alíquotas foram retiradas para quantificação dos açúcares. O material sólido foi separado do líquido por centrifugação a 10 000 rpm (centrífuga eppendorf 5418 R) para separação da glicose e da fase sólida. Análise de liberação de glicose foi realizada para cada alíquota retirada, utilizando o kit de análise enzimática glicose oxidase (GOD) e



posterior formação de peróxido de hidrogênio (POD), conforme apresentado no item 4.2.3.

### 6.2.5 Caracterização química de constituintes

O bagaço *in natura*, após os tratamentos hidrotérmico, organossolve e branqueamento foram caracterizados quanto aos constituintes celulose, hemicelulose e lignina. O procedimento foi baseado nas normas TAPPI T 412 om-16, TAPPI T 211 om-02, TAPPI T 204 cm-97, TAPPI T 222 om-02, TAPPI T 203 cm-99. Todas as etapas foram realizadas em triplicatas e quando necessário repetidas também em triplicata.

A amostra a ser caracterizada foi processada em moinho de facas na malha de granulometria menor que 2 mm. Em seguida foi determinada a umidade do material em uma balança de teor de umidade.

### 6.2.6 Determinação de cinzas

As cinzas de todas as amostras caracterizadas foram determinadas. Para isso cadinhos foram previamente calcinados em uma mufla com rampa de aquecimento até 600 °C por 30 min. Após resfriados e pesados, 2 g de material foram adicionados aos cadinhos e aquecidos em mufla com rampa de 9,6 °C/min de temperatura ambiente até 600 °C. O cadinho contendo as amostras foram deixados para resfriar em dessecador e posteriormente pesados. A determinação das cinzas seguiu a Equação 6.1:

$$TC (\%) = \frac{MCA-MA}{MA} \times 100 \quad (6.1)$$

Sendo MC a massa do cadinho calcinado sem amostra, MCA a massa do cadinho contendo a amostra calcinada e MA a massa inicial de amostra.

### 6.2.7 Determinação de teor de extrativos

Os extrativos das amostras foram removidos em um extrator de gordura Soxhlet. Foram feitos charutos contendo 6 g em massa seca e submetidos a 150 mL de acetona no extrator. O charuto contendo a amostra foi deixado em refluxo por 6 horas e posteriormente o solvente foi trocado para uma mistura 1:1 de hexano-

etanol. Ao final o charuto foi colocado em uma estufa a 105 °C por 1h. Em seguida o material foi deixado em repouso por 30 min e a massa aferida. O teor de extrativos foi determinado de acordo com Equação 6.2.

$$TE (\%) = \frac{MA - MC}{MCE} \times 100 \quad (6.2)$$

Sendo MC a massa do charuto sem amostra, MA a massa da amostra e MCE a massa do charuto contendo a amostra.

### 6.2.8 Determinação de lignina

A amostra seca e sem extrativos foi utilizada para determinação de lignina. Nesta etapa 1 g de material foi submetido a hidrólise 17 mL de ácido sulfúrico 72% (m/m) em um almofariz e macerado por 15 min a temperatura ambiente. O material então foi deixado em digestão no ácido por 24 h.

A etapa seguinte consistiu em transferir o material presente no almofariz para um balão de fundo redondo, diluindo o ácido para 4% e deixando em um condensador com refluxo por 4 h, contado a partir do início da fervura. Decorridas as 4 h de reação, o condensador foi desligado e aguardado que atingisse a temperatura ambiente. Em seguida a solução contendo a lignina foi filtrada em funil sinterizado de abertura de poro de 10 a 16 µm previamente seco a 105 °C. O material filtrado foi lavado até pH neutro e levado para ser seco em estufa. Após seco o material foi deixado em dessecador por 30 min para resfriar e a massa aferida em uma balança de precisão analítica. O teor de lignina (%) é dado pela Equação 6.3.

$$TL (\%) = \frac{MFC - MF}{MA} \times 100 - TC (\%) \quad (6.3)$$

Sendo TL o teor de lignina, MFC a massa do funil seco com amostra, MF a massa do funil sem amostra, MA a massa inicial de fibra e TC o teor de cinzas.

Uma alíquota da parte líquida foi retirada para avaliação da lignina solúvel. A determinação foi feita fazendo a varredura da absorbância de 280 até 215 nm e determinada conforme Equação 6.4.

$$LS (\%) = \frac{4,53 \times A_{215} - A_{280}}{300} \quad (6.4)$$

Sendo LS o teor de lignina solúvel,  $A_{215}$  a absorvância em 215 nm e  $A_{280}$  a absorvância em 280 nm.

Para determinação da massa de lignina solúvel, a Equação 6.4 foi multiplicada pelo volume final de líquido após diluição do ácido a 4% (317 mL) e então a massa de lignina solúvel determinada. Este valor foi então descontado da Equação 6.3 e o teor real determinado.

### 6.2.9 Determinação de holocelulose

A determinação de holocelulose (hemicelulose + celulose) foi feita a partir do material seco, sem extrativos, cinzas e lignina. Em frascos do tipo Erlenmeyer foram adicionados 3 g de material e 120 mL de água deionizada a 70 °C. Foram adicionados 2,5 g de clorito de sódio de 80% de pureza e 1 mL de ácido acético, com pureza  $\geq 99,85\%$ . A reação deve ser controlada por 1 h e então uma nova adição dos reagentes deve ser feita. Após uma 1 h o procedimento deve ser repetido e então a reação conduzida por mais 3 h. Durante toda a reação o frasco Erlenmeyer foi mantido fechado com outro recipiente de menor tamanho.

Ao final de 5 h de reação e degradação oxidativa da lignina, o frasco deve então foi submetido a um banho de gelo por 30 min, cobrindo todo o volume com o reagente. Após atingir a temperatura ambiente o material foi então filtrado em funil sinterizado de tamanho de poro de 40  $\mu\text{m}$  previamente lavado e seco em estufa a 105 °C. A determinação de holocelulose se deu pela Equação 6.5.

$$TH (\%) = \frac{MFH - MF}{MA} \times 100 \quad (6.5)$$

Sendo TH o teor de holocelulose, MFH a massa do funil contendo holocelulose, MF massa do funil e MA a massa da amostra.

### 6.2.10 Determinação de alfacelulose

Nesta etapa, partiu-se de 1 g de holocelulose seca e foi adicionado 15 mL de solução de NaOH (17,5%) em um almofariz. O material foi deixado em repouso na solução por 2 min e em seguida macerado por 8 min. Posteriormente foi adicionado 40 mL de água destilada e o conteúdo transferido para um funil sinterizado de poro 40 µm previamente seco em estufa a 105 °C. O material foi filtrado com auxílio de uma bomba a vácuo e lavado até atingir o pH neutro. O teor de alfacelulose foi calculado pela Equação 6.6.

$$TA (\%) = \frac{MFA-MF}{MAH} \times 100 \quad (6.6)$$

Sendo TA o teor de alfacelulose, MFA a massa do funil contendo a amostra, MF a massa do funil e MAH a massa de holocelulose.

### 6.2.11 Análise morfológica por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A análise morfológica do bagaço *in natura* e após os tratamentos hidrotérmico e organossolve foi realizada em microscópio eletrônico de varredura JEOL (JSM-6510) com resolução de 3,0 nm (10kV) e filamento de tungstênio. Uma pequena quantidade da amostra foi depositada em uma fibra de carbono dupla face fixada em um porta amostra (*stubs*). As fitas de carbono com as amostras foram recobertas com fina camada de ouro.

### 6.2.12 Determinação do fator de severidade

O fator de severidade (FS) foi calculado pela Equação 6.7 seguindo a proposta de Overend e Chornet (1987).

$$FS = \log \sum_{i=1}^n \left[ t * \exp \left( \frac{T_i - T_{ref}}{14,75} \right) \right] \quad (6.7)$$

Em que  $n$  é o número de intervalos entre as medidas de temperatura durante a etapa de pré-tratamento;  $t$  é o tempo de residência no reator (min);  $T_i$  é a temperatura do pré-tratamento medida a cada instante de tempo;  $T_{ref}$  é a temperatura de referência (100 °C) e  $14,75 (\omega)$  é o valor que representa a energia de ativação associada com o pré-tratamento (Ko et al., 2015).

O FS descreve o efeito combinado do tempo e temperatura na etapa de pré-tratamento. Este fator se torna de suma importância, visto que não é possível avaliar o efeito de individual desses fatores (Overend & Chornet, 1987).

### **6.2.13 Avaliação do índice de cristalinidade por Difração de Raios-X (DRX)**

A avaliação dos índices de cristalinidade para os diferentes materiais antes e após os diferentes tratamentos foi realizado conforme descritos no item 5.2.4.

## 6.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 6.3.1 Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar

### 6.3.2 Caracterização química de constituintes

O bagaço de cana-de-açúcar *in natura* foi submetido a sucessivas etapas de pré-tratamento. O primeiro tratamento foi o hidrotérmico, cujo principal objetivo foi remover o componente hemicelulose. Este tratamento é realizado somente água como solvente, o que o torna ambientalmente amigável. Posteriormente foi aplicado o tratamento do tipo organossolve, para remoção do componente lignina, posteriormente precipitada para futuras aplicações. Por fim, um tratamento utilizando peróxido de hidrogênio foi realizado visando branqueamento da biomassa bem como a remoção da lignina residual. Na Tabela 6.1 são apresentados os valores dos constituintes lignocelulósicos presentes no bagaço *in natura* e após cada etapa do pré-tratamento.

Tabela 6. 1 Composição química do bagaço de cana-de-açúcar antes dos tratamentos e após tratamento hidrotérmico, organossolve e branqueamento

Fibra	Bagaço in natura	HT	HT + OS	HT + OS + B	HT + HE + OS + B
$\alpha$ -Celulose	42,6 $\pm$ 0,33	52,8 $\pm$ 2,2	80,6 $\pm$ 0,79	82,8 $\pm$ 0,65	82,2 $\pm$ 2,7
Hemicelulose	34,0 $\pm$ 1,4	8,8 $\pm$ 1,0	9,2 $\pm$ 0,61	10,2 $\pm$ 0,10	9,6 $\pm$ 0,42
Lignina	22,9 $\pm$ 0,76	27,9 $\pm$ 0,91	8,7 $\pm$ 0,13	2,9 $\pm$ 0,38	3,5 $\pm$ 0,10
Cinzas	1,95 $\pm$ 0,17	1,25 $\pm$ 0,15	1,15 $\pm$ 0,11	2,38 $\pm$ 0,86	4,95 $\pm$ 0,74
Extrativos	3,26 $\pm$ 0,14	15,9 $\pm$ 0,38	12,8 $\pm$ 0,13	4,36 $\pm$ 0,64	2,45 $\pm$ 0,18
Rendimento mássico (%)	—	58,7 $\pm$ 0,87	53,3 $\pm$ 0,63	63,78 $\pm$ 0,26	59,25 $\pm$ 0,59

HT – Tratamento hidrotérmico; OS – tratamento organossolve; HE – hidrólise enzimática e B – branqueamento com peróxido de hidrogênio e hidróxido de sódio

Visando facilitar as conversões na etapa de hidrólise e a consequente formação de nanocelulose, os constituintes não celulósicos foram removidos. O

tratamento hidrotérmico (HT) no bagaço de cana evidenciou em torno de 74% de redução no constituinte hemicelulose com um aumento em torno de 19% no teor de celulose. O aumento de celulose é relativo porcentagem de remoção dos constituintes hemicelulose e lignina. A remoção de hemicelulose tem influência nos rendimentos de hidrólise enzimática, já que com a redução desse constituinte o acesso da enzima à celulose é facilitado (Batista et al., 2019; Rocha et al., 2017). No tratamento hidrotérmico, a água é usada como solvente sob elevada temperatura e pressão, formando os íons hidrônios (a partir da auto ionização da água) responsáveis por solubilizar a hemicelulose, pela formação de ácido acético e outros ácidos orgânicos (Kim et al., 2014). Os resultados aqui apresentados corroboram com o estudo de Camargo e colaboradores (2016), que relataram aumentos no teor de celulose relativos à reduções nos teores de hemicelulose e lignina após tratamento hidrotérmico no bagaço *in natura*.

Apesar de favorecer a redução da hemicelulose, o tratamento hidrotérmico quando realizado em elevadas temperaturas promove a recondensação da lignina na matriz celulósica, aumentando o teor deste constituinte de 23% para 28%. A estrutura recondensada é chamada de pseudolignina, sendo derivada da formação de compostos furfural e hidroximetilfurfural como resultado da degradação de glicose e xilose, respectivamente, ou mesmo pela polimerização destes produtos com a lignina (Hu et al., 2012; Nitsos et al., 2016). A formação da pseudolignina é favorecida em tratamentos realizados com elevado fator de severidade (FS). Este tipo de estrutura afeta negativamente a etapa de hidrólise, principalmente a que envolve a rota enzimática por criar uma barreira física sobre a biomassa, inibindo o acesso da enzima ao substrato, sendo mais prejudicial do que a lignina nativa (Batista et al., 2019; Cheng et al., 2018). Métodos de tratamento que removam a lignina presente na biomassa lignocelulósicas são necessários visando subsequentes etapas de hidrólise.

A remoção da lignina foi realizada com as sequências de tratamentos organossolve (OS) e mistura de hidróxido de sódio e peróxido de hidrogênio (B). Após o tratamento organossolve (OS) foi observada redução de 62% do teor de lignina em relação ao bagaço *in natura*. No estudo de Santucci e colaboradores (2016), o tratamento hidrotérmico seguido de organossolve no bagaço de cana resultou em composição de 91% de celulose, 3,9% de hemicelulose e 2,9% de



lignina. As condições mais brandas de temperatura para o tratamento hidrotérmico (161 °C – 30 min) relatadas pelos autores impediram ou dificultaram que a lignina fosse recondensada na biomassa, facilitando a posterior remoção dessas estruturas. A lignina removida ficou solubilizada na fração líquida do tratamento organossolve, que posteriormente pode ser precipitada para utilização em outros processos dentro da biorrefinaria. Neste trabalho, houve uma recuperação de 55,8% de lignina (Figura 6.1).

Após ambos os tratamentos hidrotérmico e organossolve, foi observado o escurecimento da biomassa, atribuído à formação de produtos de degradação dos carboidratos (devido à acidificação do meio) ou mesmo pela caramelização dos polissacarídeos sobre a biomassa (Nitsos et al., 2016). O material antes e após as subsequentes etapas de tratamento estão apresentadas na Figura 6.1.

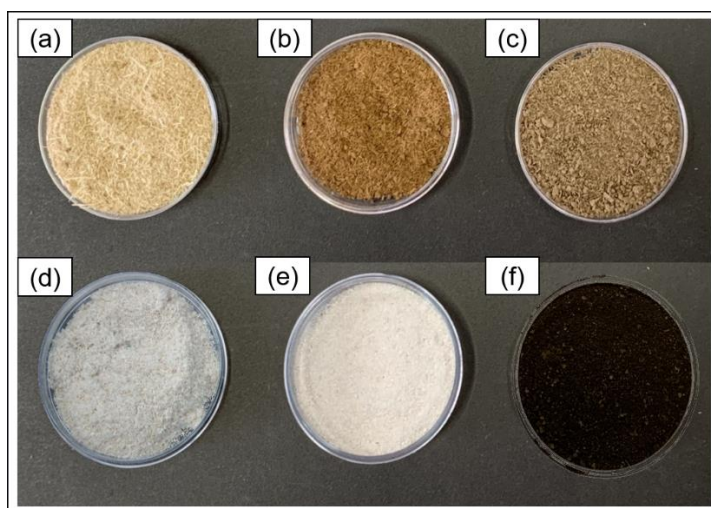


Figura 6.1 Bagaço de cana-de-açúcar antes e após os diferentes pré-tratamentos: (a) bagaço in natura; (b) tratamento hidrotérmico (HT); (c) tratamento organossolve (OS); (d) tratamento hidrotérmico, organossolve, branqueado (HT+OS+B); (e) tratamento hidrotérmico, hidrólise enzimática, organossolve, branqueado (HT+HE+OS+B); (f) Lignina recuperada do tratamento organossolve

A etapa de branqueamento foi aplicada com o propósito de remover a lignina que não foi totalmente extraída pelo tratamento organossolve. Após essa etapa, foi evidenciado o aumento no teor de celulose, seguido da redução do teor de lignina e hemicelulose, resultando em biomassas com 82% de celulose sendo o teor de lignina final de 3,5% para o bagaço HT+HE+OS+B e 2,8% para o bagaço HT+OS+B. Previamente, Oliveira e colaboradores (2016) relataram para o bagaço de cana

composição de 87% de celulose, 11% de hemicelulose e lignina em torno de 2% após o tratamento organossolve seguido de branqueamento com peróxido.

O peróxido de hidrogênio é usado em condições alcalinas como um agente oxidativo. A utilização deste reagente evita que seja necessária a utilização de compostos como clorito de sódio, sendo então uma reação isenta da formação de radicais cloro durante o processo (Sun et al., 2004). Neste tratamento ocorre a formação de radicais hidroperóxido ( $\text{HOO}^\cdot$ ), radicais hidroxila ( $\text{HO}^\cdot$ ) e ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ). Estes radicais são responsáveis pela oxidação e clivagem de anéis aromáticos, cadeias carbono-carbono e estruturas alifáticas, levando à degradação da lignina e da hemicelulose (Lee et al., 2009). Assim, sua utilização contribui para aplicação de um tratamento verde e eficiente de remoção dos constituintes não celulósicos do bagaço de cana-de-açúcar.

### **6.3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura do bagaço *in natura* e após tratamentos**

Para verificar mudanças morfológicas nos bagaços pré-tratados, a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foram realizadas e as imagens estão apresentadas na Figura 6.2.

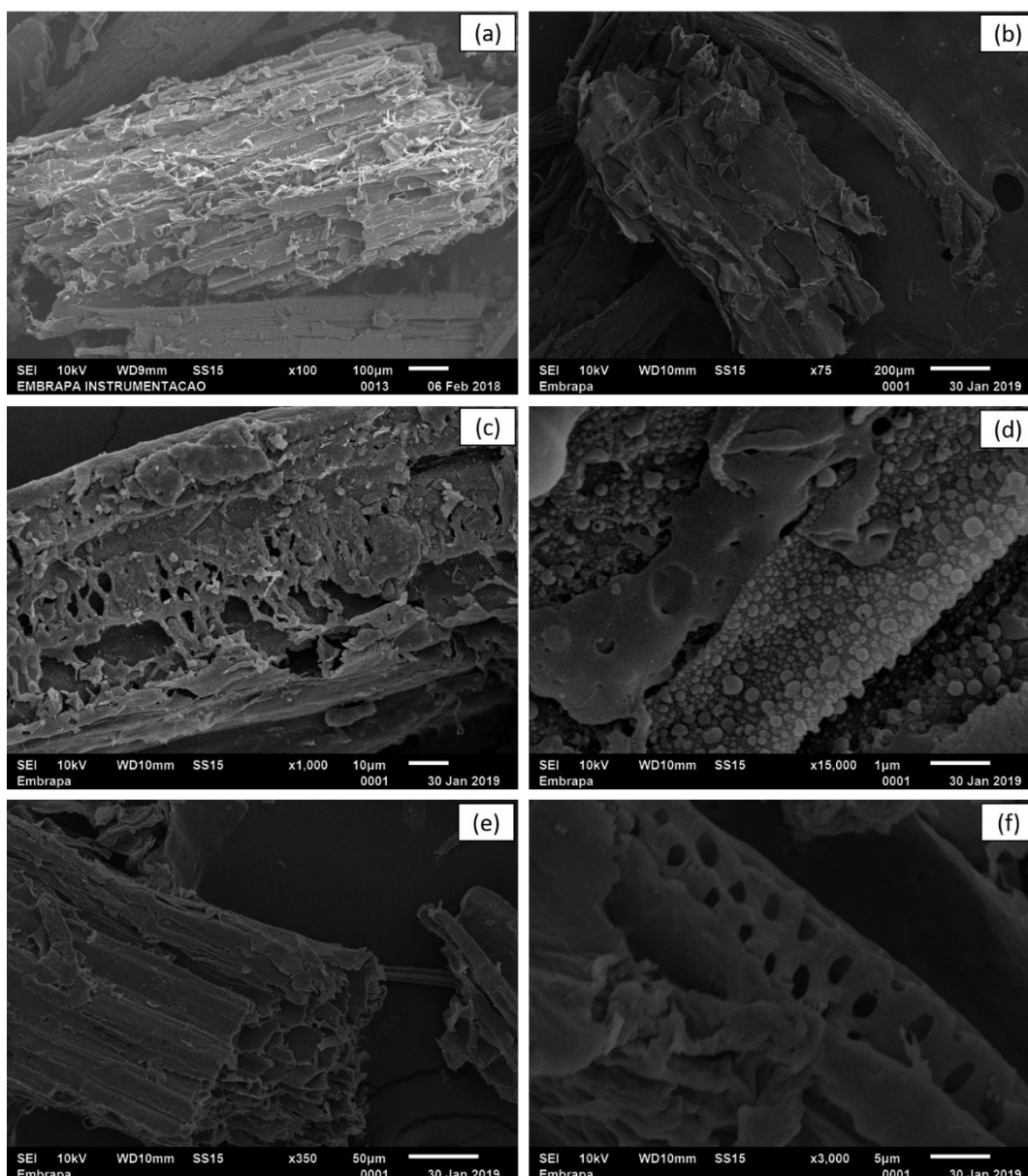


Figura 6.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (a) e (b) bagaço *in natura*; (c) e (d) bagaço após tratamento hidrotérmico (HT); (e) e (f) bagaço após tratamentos hidrotérmico + organosolve (HT+OS).

As Figuras 6.2 (a) e 6.2 (b) apresentam a morfologia do bagaço *in natura*. Observa-se que este material sugere uma estrutura compacta e recoberta por medulas (parênquima celular) (Rezende et al., 2011). Após o tratamento hidrotérmico, na Figura 6.2 (c), observa-se que para o material apresentou uma certa fragmentação devido à solubilização da hemicelulose, além da redução na medula presente na superfície da biomassa. Ainda para este material, na Figura 6.2 (d) observa-se a formação da pseudolignina, caracterizada por esferas depositadas

na estrutura da biomassa. Anteriormente, Sannigrahi e colaboradores (2011) relataram que durante o pré-tratamento da madeira *poplar* a lignina coalesceu migrando para a superfície da biomassa. Ko e colaboradores (2015) também associaram a formação da pseudolignina ao pré-tratamento, relatando que no material *in natura* (lascas de madeira *hardwood*) não foram observadas gotas de lignina adsorvida.

Após o pré-tratamento hidrotérmico seguido de organossolve (HT+OS) apresentado na Figura 6.2 (e), são observadas desestruturações dos feixes de fibras, resultando no aparecimento de poros na biomassa, fato também evidenciado na Figura 6.2 (f). A alteração observada pode estar associada à remoção da lignina, cuja função está em unir as fibras, tornando-as mais empacotadas. Com a remoção dos constituintes não celulósicos, a biomassa torna-se mais frágil (Rezende et al., 2011; Santo et al., 2018). Após o tratamento organossolve houve uma redução da lignina precipitada na superfície da biomassa, observado na Figuras 6.2 (f).

#### **6.3.4 Fator de severidade dos pré-tratamentos**

A formação da pseudolignina está associada à severidade do pré-tratamento (Ko et al., 2015). Na Figura 6.3 estão apresentadas as rampas de aquecimento do reator Parr até a temperatura de tratamento de 190 °C para tratamento hidrotérmico, e 200 °C para o tratamento organossolve com posterior resfriamento. A rampa de aquecimento foi obtida visando calcular o fator de severidade para ambos os tratamentos hidrotérmico (Figura 6.3 (a)) e organossolve (Figura 6.3 (b)).

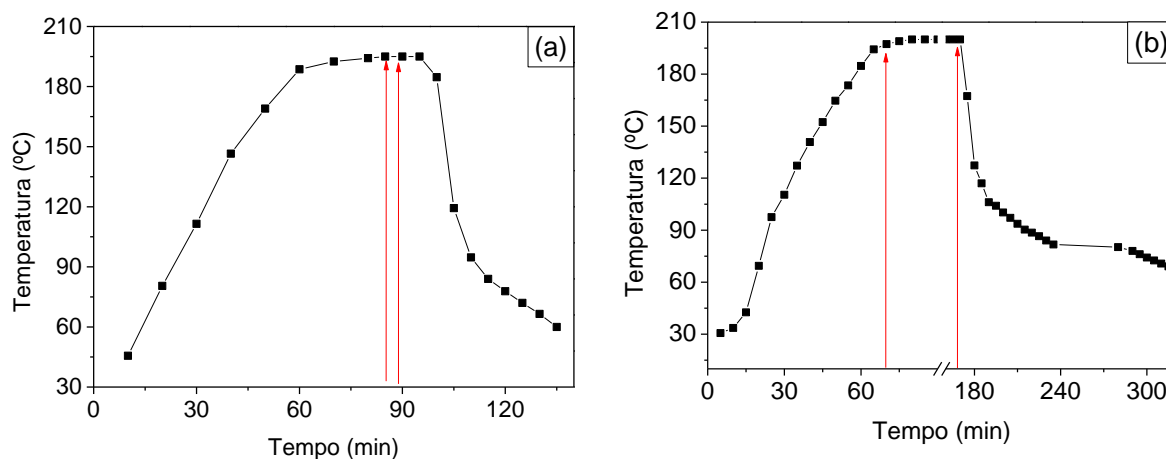


Figura 6. 3 Fator de severidade calculado para diferentes tratamentos: (a) hidrotérmico - 195°C por 10 min; (b) organossolve - 200 °C por 90 min

O fator de severidade (FS) calculado para o tratamento hidrotérmico foi de  $4,75 \pm 0,09$ , enquanto para o tratamento organossolve resultou em  $4,85 \pm 0,05$ . Kumar e colaboradores (2013), após realizar testes de degradação do avicel (celulose microcristalina) em reator Parr, relataram que a formação da pseudolignina não foi observada em fator de severidade menor que 2,95, sugerindo que abaixo dessa condição a severidade não é suficiente para formar produtos de degradação. Os autores relataram estudos com o mesmo método de cálculo de FS apresentado neste trabalho (Kumar et al., 2013). A severidade também está associada ao pH do tratamento. Uma relação entre essas duas variáveis revelou que quanto maior o fator de severidade, maior é a liberação de ácidos orgânicos no tratamento, o que leva à redução no pH do meio reacional (Batista et al., 2019; Jonsson & Martin, 2016). Ao final do tratamento hidrotérmico o pH foi de 3,03, enquanto para o tratamento organossolve o pH foi de 3,48. Batista e colaboradores (2019) encontraram valores de pH entre 3 e 3,5 para o FS entre 4,4 e 4,8 no tratamento hidrotérmico da palha de cana, mostrando uma relação linear entre as variáveis.

Outro ponto a se destacar é quanto ao rendimento mássico (massa de sólidos recuperada ao final do tratamento). Uma relação inversamente proporcional é observada entre fator de severidade e rendimento mássico. Quanto maior o fator de severidade, maior a perda de celulose no tratamento, afetando negativamente o rendimento ao final de cada etapa. O rendimento, apresentado na Tabela 6.1 apresentou valores de 58% e 53% para os tratamentos hidrotérmico e organossolve,

respectivamente. É importante salientar que a temperatura reacional tem um maior impacto no rendimento mássico do processo quando comparada ao tempo de residência, o que justifica valores próximos de rendimentos entre os tratamentos hidrotérmico e organossolve, mesmo considerando os diferentes tempos de reação (Batista et al., 2019).

### 6.3.5 Seleção das condições de hidrólise enzimática e otimização das condições de branqueamento

Pensando em um processo satisfatório para a etapa subsequente da produção de etanol 2G (fermentação alcoólica), elevados teores de sólidos são requeridos para sacarificação, visando à liberação de altas concentrações de açúcares. Assim, foram realizadas hidrólises enzimáticas da celulignina em condições de 15% e 20% (m/v) de teor de sólido (TS) por 48 h (Figura 6.4).

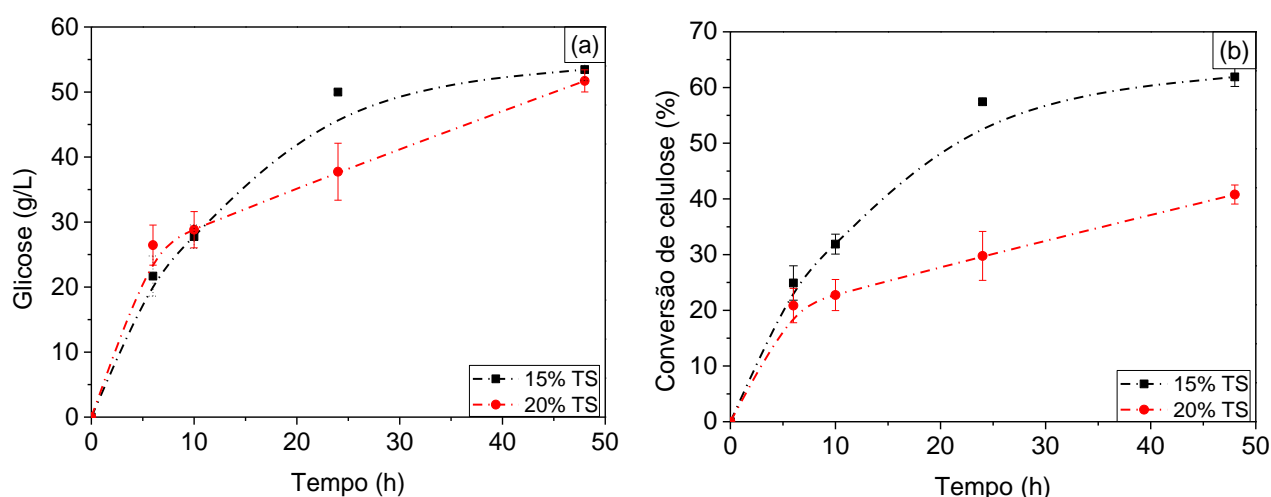


Figura 6.4 Hidrólise enzimática da celulignina em teor de sólido de 15% e 20% (m/v), enzima Cellic Ctec 3 em 10 FPU/g biomassa a pH 5, 50 °C - (a) liberação de glicose; (b) conversão de celulose

Observa-se que para TS de 20%, houve uma menor produção de glicose em comparação a TS 15%, principalmente nos pontos intermediários da reação, se aproximando ao final da hidrólise. O ensaio feito com TS de 15% liberou 53,5 g/L de glicose enquanto para TS de 20% este valor foi de 51,9 g/L após 48 h (Figura 6.4 (a)). Era esperado que na concentração de 20% de TS a produção de glicose fosse superior à obtida com a carga de 15%. Dentre os fatores que podem ter dificultado a

liberação de açúcares em um teor de sólidos superior estão a possibilidade de inibição enzimática, a dificuldade na transferência de calor e massa e também agitação reduzida pelo excesso teor de fibras, resultando em uma elevada viscosidade do meio reacional (Hsieh et al., 2014; Kristensen et al., 2009; Liu et al., 2016).

A Figura 6.4 (b) apresenta os valores de conversão de celulose. Observa-se que para TS de 15% a conversão foi de 61,9% e para 20% de carga este valor foi de 40,8%, apresentando uma redução de 21%. De maneira similar, Lopez-Linhares e colaboradores (2014) destacaram redução nos valores de conversão de celulose quando o teor de sólidos foi aumentado de 7,5% para 15% ou 20% na hidrólise da palha colza, usando o complexo enzimático Cellic Ctec 3 em 15 FPU/g substrato. Comportamento semelhante também foi relatado por Weiss, Felby e Thygesen (2019), que associaram à redução na difusividade (representada pelo coeficiente de auto-difusão da água) como impactando nos rendimentos da hidrólise em elevados teores de sólido. Os autores ainda afirmaram que o efeito do teor de sólidos na hidrólise só é sentido a partir do momento em que não há mais água livre na reação. A partir deste limiar, as interações intrínsecas da biomassa com o meio aquoso começam a influenciar na hidrólise, sendo que a difusão da água permite uma expansão dos poros, como consequência da osmose dos açúcares formados, sendo um fator importante nas reações enzimáticas por facilitar o acesso das enzimas ao substrato.

A partir daí, definiu-se o teor de sólidos de 15% para continuar os ensaios subsequentes. Na Figura 6.5 são apresentados testes de hidrólise enzimática do bagaço após tratamento hidrotérmico e branqueado em diferentes concentrações de mistura de peróxido de hidrogênio e hidróxido de sódio. Foram testadas diferentes condições de branqueamento visando reduzir a concentração de reagentes de estudos previamente relatados (de Oliveira et al., 2016; Huang et al., 2017; Teixeira et al., 2011a). Após cada condição de branqueamento, foram realizadas hidrolises enzimáticas com o objetivo de avaliar a influência na liberação de glicose e consequente interferência da presença de constituintes não celulósicos na atuação da enzima.

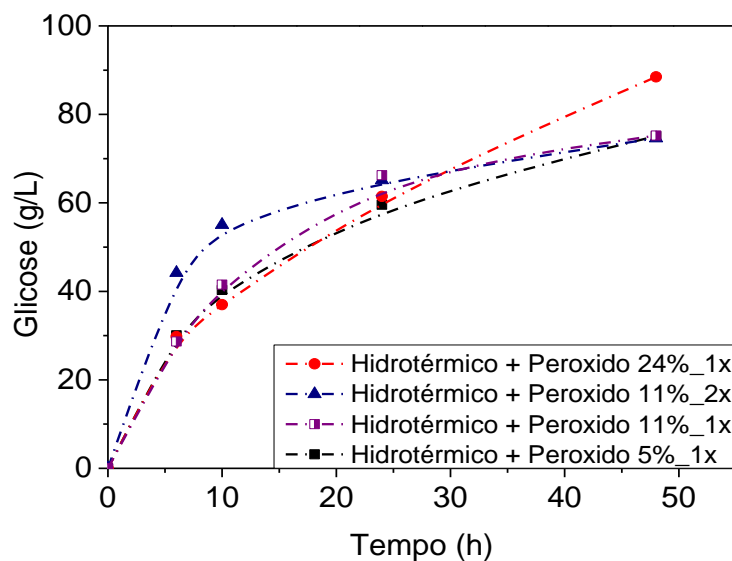


Figura 6. 5 Hidrólise enzimática após diferentes testes de concentração de peróxido usado na etapa de branqueamento após tratamento hidrotérmico (5%, 11% - 1 e 2x, 24% v/v)

Observa-se que entre as biomassas tratadas por diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio, não foram sugeridas interferências na liberação de glicose. Apenas para a biomassa submetida a duas etapas de branqueamento foi observado um aumento em torno de 20 g/L na concentração de glicose liberada. Apesar desse aumento, optou-se por trabalhar com a concentração reduzida de peróxido, com apenas uma etapa de branqueamento, visando sempre os menores gastos de reagentes nas etapas visando obter os menores custos no processo.

### 6.3.6 Avaliação do índice de cristalinidade por Difração de Raios-X (DRX)

Alterações no índice de cristalinidade após cada etapa de tratamento, foram avaliadas DRX e os resultados estão apresentados na Figura 6.6.



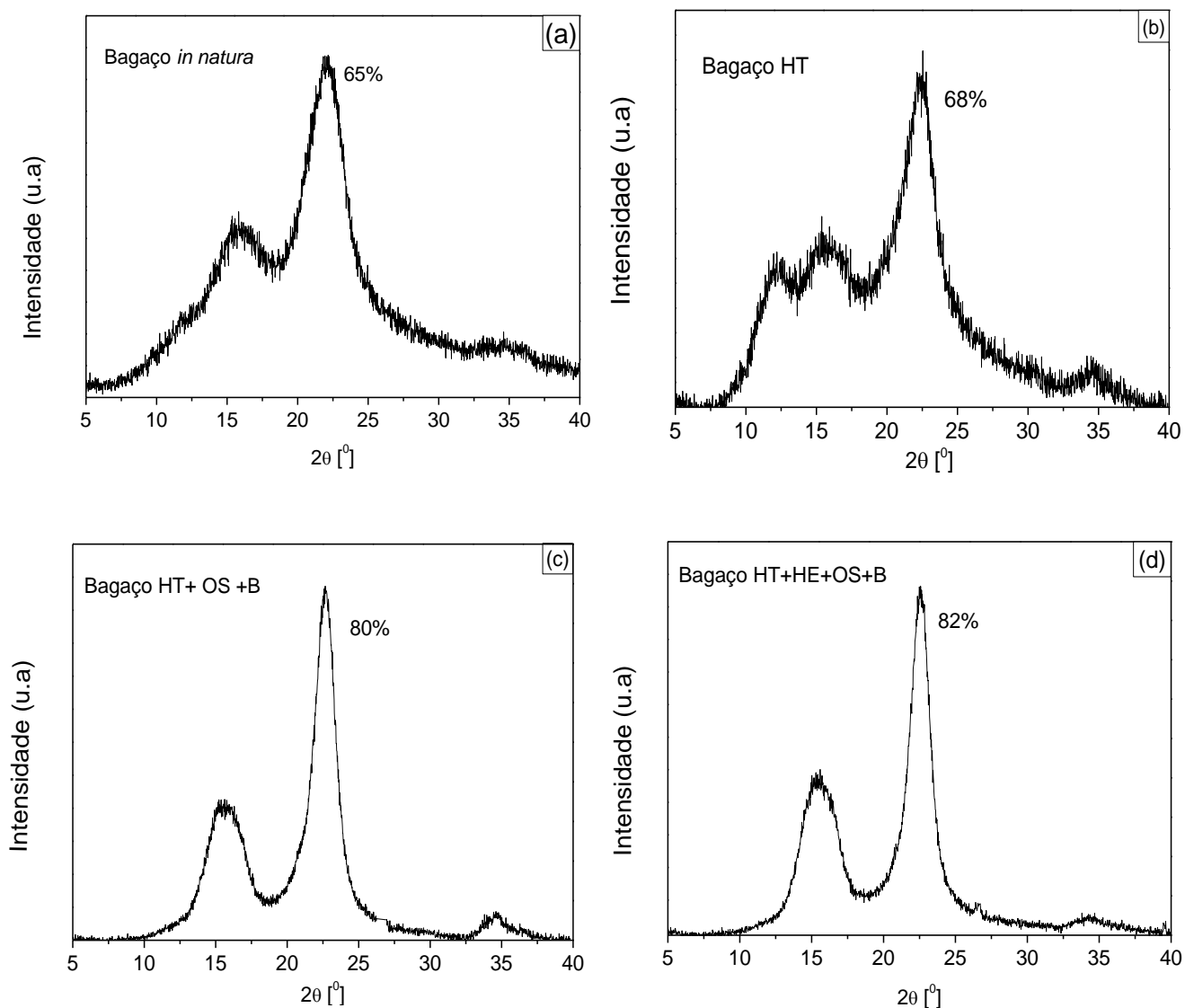


Figura 6. 6 Difratoograma de raio-X: (a) Bagaço *in natura*; (b) bagaço com tratamento hidrotérmico (HT); (c) Bagaço após tratamento hidrotérmico, tratamento organossolve e branqueamento com mistura de peróxido de hidrogênio e hidróxido de sódio (HT+OS+B); (d) Bagaço hidrotérmico após hidrólise enzimática com posterior tratamento organossolve e branqueamento (HT+HE+OS+B)

O difratograma de raios-x apresentado na Figura 6.6 (a) para o bagaço *in natura* sugere planos cristalinos com predominância de celulose tipo I, correspondente aos picos  $2\theta$  de  $15^\circ$  no plano 101,  $16,5^\circ$  no plano 101,  $21^\circ$  relativo ao plano 021,  $22,5^\circ$  no plano 200 e por fim o plano  $34,5^\circ$  referente ao plano 004 (Beck-Candanedo et al., 2005; de Aguiar et al., 2020; Novo et al., 2015). O bagaço *in natura* apresentou um índice de cristalinidade de 65%. Após a primeira etapa de tratamento hidrotérmico, observou-se uma alteração na estrutura da fibra, passando de índices relativos a celulose I, para a presença da estrutura de celulose tipo II,

sendo evidenciado pela aparência do pico 12,4<sup>o</sup> no plano cristalino de 1-10 (French, 2014). A formação da celulose II pode estar associada à solubilização e recristalização de constituintes degradados durante o pré-tratamento hidrotérmico (Park et al., 2010).

Na Figura 6.6 (c) o índice de cristalinidade do bagaço hidrotérmico submetido ao tratamento organossolve e branqueamento (HT+OS+B) foi de 80%. Para o bagaço (HT+HE+OS+B), apresentado na Figura 6.6 (d) o índice de cristalinidade foi de 82%. Valores de índice de cristalinidade em torno de 80% foram relatados por Camargo e colaboradores (2016) após o tratamento hidrotérmico branqueado com mistura de hidróxido de sódio e peróxido de hidrogênio. O índice de cristalinidade foi gradualmente aumentado após cada estágio de pre-tratamento, sugerindo que ocorreu a remoção de hemicelulose e lignina, suportado pelo aumento do teor de celulose cristalina (Feng et al., 2018; Pimienta et al., 2019).

#### **6.4 CONSIDERAÇÕES PARCIAIS**

Após as diferentes etapas de pré-tratamento, bagaços branqueados apresentaram elevados índices de cristalinidade, evidenciando a remoção de constituintes amorfos da biomassa. A composição dos constituintes celulose, hemicelulose e lignina foi determinada pela caracterização química, que revelou um aumento em torno de 52% no teor de celulose ao final de todos os tratamentos em relação à biomassa inicial, relativos à redução de hemicelulose e lignina na biomassa. A variável fator de severidade foi analisada buscando minimizar a formação de pseudolignina e perdas no rendimento mássico após o pré-tratamento hidrotérmico e organossolve. Por fim, foram definidas as condições de branqueamento pela mistura de peróxido de hidrogênio e hidróxido de sódio, com concentrações reduzidas em relação aos estudos prévios apresentados na literatura. A redução de reagentes nas etapas é importante visando sempre menores custos no processo global de pré-tratamento.

## **7 APROVEITAMENTO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR NA PRODUÇÃO DE AÇÚCARES E NANOCELULOSE PARA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA: ESTUDO DAS PROPRIEDADES**

A produção de nanocelulose por reações enzimáticas tem como vantagens processos brandos de temperatura, o uso de reagentes não perigosos e também o baixo consumo de água (de Aguiar et al., 2020). Além disso, o processo enzimático possibilita a recuperação dos açúcares produzidos, podendo ser utilizados como precursores em diversas rotas com base biológica (Isikgor & Becer, 2015). A nanocelulose produzida em rotas enzimáticas apresentam características interessantes quanto a sua estabilidade térmica próxima da fibra de partida, a facilidade de funcionalização pela elevada proporção de hidroxilas expostas e também a elevada razão de aspecto (Anderson et al., 2014; Cui et al., 2016). A extração de nanocelulose associada à liberação de outros produtos a partir de resíduos agroindustriais ainda é pouco explorada na literatura. Assim, aqui foram estudadas as propriedades de estabilidade térmica, morfologia, índice de cristalinidade e estabilidade coloidal das estruturas obtidas por esta rota. Além disso, a obtenção de açúcares provenientes do processo enzimático foi quantificado.

### **7.1 MATERIAIS**

Na etapa de hidrólise enzimática, foi utilizado o complexo enzimático Cellic CTec 3<sup>®</sup> (Novozymes, Dinamarca) com atividade de 205 FPU/mL. A glicose liberada foi monitorada pelo kit de análise enzimática GOD-POD (labtest<sup>®</sup>). O material de partida para a etapa de hidrólise enzimática foi o bagaço HT+OS+B.

### **7.2 MÉTODOS**

#### **7.2.1 Produção de nanocelulose por rota enzimática**

A nanocelulose obtida pelo método enzimático foi produzida seguindo a metodologia apresentada na Figura 7.1.

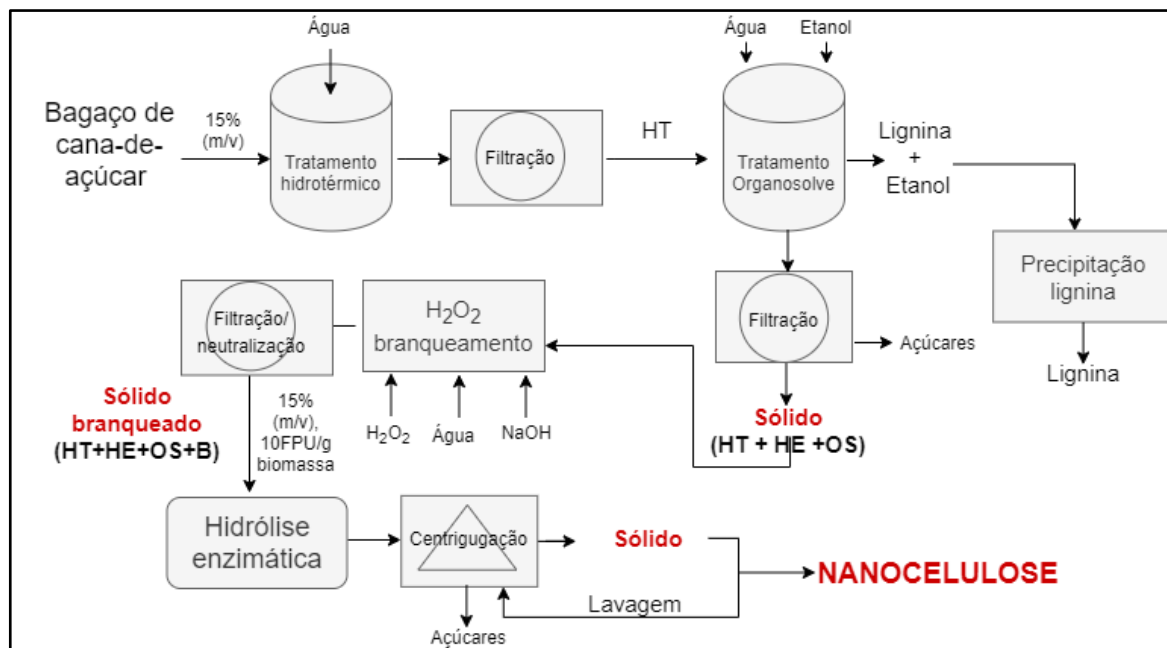


Figura 7. 1 Fluxograma de produção de nanocelulose por hidrólise enzimática após as diferentes etapas de tratamento

Nesta etapa, apresentada na Figura 7.1, o bagaço foi tratado pelo método hidrotérmico (item 6.2.1) e posteriormente submetido ao tratamento organosolve (item 6.2.2) e submetido ao branqueamento com peróxido de hidrogênio e hidróxido de sódio (item 6.2.3), tendo sido previamente apresentado no Capítulo 6 como HT+OS+B. Após as etapas, o material foi submetido a hidrólise enzimática, conforme será descrito na etapa 6.2.5.

## 7.2.2 Obtenção de nanocelulose por hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática para obtenção de nanocelulose foi realizada a partir do bagaço de cana submetido ao tratamento hidrotérmico, seguido de tratamento organosolve e branqueado com mistura de peróxido de hidrogênio 5% (v/v) e hidróxido de sódio 4% (m/v). A hidrólise enzimática foi realizada por 96 h de reação utilizando o complexo enzimático Cellic Ctec 3<sup>®</sup> usando tampão citrato de sódio em pH 5 e 0.1 M com 15% (w/v) de teor de sólidos e carga de enzima de 10 FPU/ g sólidos e 250 rpm de agitação. A cada 24 h de reação alíquotas de glicose foram retiradas para quantificação de glicose, conforme relatado no tópico 6.2.4.

Ao final da hidrólise enzimática, a fase líquida foi separada do material sólido por centrifugação (10 000 rpm - 2603 g 10 min) e lavada sucessivas vezes para retirada da glicose residual. O material sólido foi disperso em água ultrapura e posteriormente centrifugado (3 000 rpm – 1038 g por 10 min) para separação dos nanocristais de celulose. Após cada centrifugação o sobrenadante foi separado e o precipitado novamente diluído e centrifugado, este procedimento foi repetido até que o sobrenadante estivesse transparente. O sobrenadante foi então congelado e seco por liofilização.

## **7.3 CARACTERIZAÇÕES**

### **7.3.1 Medida de liberação de glicose e conversão de celulose**

As medidas de liberação de glicose foram descritas no item 4.2.3. O cálculo de conversão foi descrito no item 4.3.1.

### **7.3.2 Avaliação da morfologia das nanocelulose por Microscopia de Força Atômica (AFM)**

A avaliação da morfologia foi descrita no item 5.2.3.

### **7.3.3 Avaliação do índice de cristalinidade por Difração de Raio-X (DRX)**

A avaliação dos índices de cristalinidade para os diferentes materiais antes e após as hidrólises foram realizados conforme descritos no item 5.2.4.

### **7.3.4 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)**

A identificação dos grupos carboxila nos NCCs obtidos foi realizada por espectroscopia FTIR, conforme procedimento no item 5.2.6.

### **7.3.5 Ressonância Magnética Nuclear de $^{13}\text{C}$ no estado sólido (ss-NMR)**

A análise de RMN foi realizada conforme descrita no tópico 5.2.7. Os espectros de RMN foram usados para determinação dos índices de cristalinidade, diferenciando a região amorfa correspondente aos sinais  $C_6^1$  e  $C_4^1$  e a região cristalina, dada pelos sinais  $C_6^2$  e  $C_4^2$ . Para isto, duas Gaussianas entre as regiões apresentadas foram centradas e deconvoluídas foram utilizadas.

### **7.3.6 Análise Termogravimétrica (TGA)**

As estabilidades térmicas do bagaço após as etapas de tratamento, bem como após as hidrólises para obtenção de nanocelulose foram avaliadas por análise termogravimétrica foi apresentada no item 5.2.8.

### **7.3.7 Avaliação da carga líquida superficial por potencial $\zeta$ aparente**

A carga do potencial de superfície das amostras foi determinada usando um analisador Zetasizer Nano ZS (Malven Instruments, Reino Unido), conforme procedimento apresentado no item 5.2.5.

## 7.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 7.4.1 Produção de nanocelulose e açúcares fermentescíveis por hidrólise enzimática

A reação de hidrólise enzimática a partir do bagaço submetido ao tratamento hidrotérmico, organossolve e branqueado (HT+OS+B) foi monitorada por 96 h. A Figura 7.2 (a) e a 7.2 (b) mostra o perfil temporal de liberação de glicose e conversão de celulose, respectivamente.

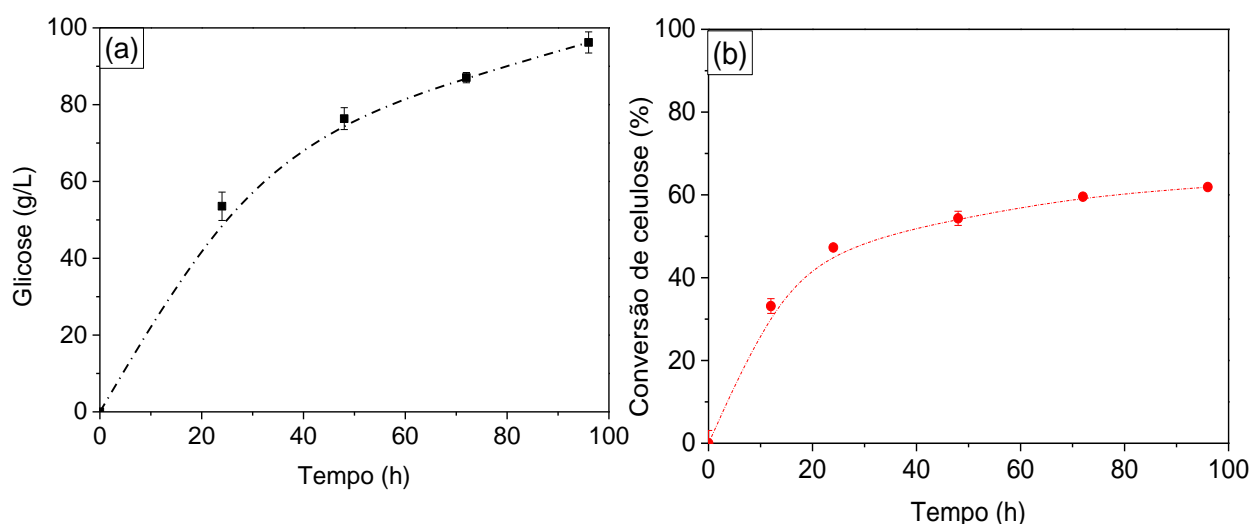


Figura 7. 2 – Hidrólise enzimática após 96h em teor de sólidos 15% (m/v) e carga de enzima 10 FPU/ g biomassa em bagaço HT+OS+B (a) liberação de glicose; (b) conversão de celulose

A concentração de glicose liberada após 96 h de hidrólise enzimática foi de 96 g/L de glicose, apresentando 62% de conversão de celulose. Esses valores sugerem que a etapa de branqueamento favoreceu a hidrólise enzimática, já que a concentração de glicose liberada foi superior aos métodos sem esta etapa de tratamento (53 g/L), já apresentada neste trabalho. Elevadas concentrações de glicose são objetivadas considerando que a sacarificação é preferencial nos constituintes amorfos da biomassa, liberando estruturas cristalinas uniformes após a hidrólise. Uma vez que as celulasas agem preferencialmente na região amorfa para liberação de glicose, Aguiar e colaboradores (2020) demonstraram a formação de

NCC integrados à liberação de 84 g/L de glicose com 96% de conversão após 96 h de hidrólise enzimática (pelo complexo Cellic Ctec 3 em carga de enzimas semelhantes às aqui apresentadas para 10% de bagaço de cana branqueado com clorito de sódio).

Após a hidrólise enzimática, foram evidenciadas a formação de estruturas nanocelulósicas, mostradas na Figura 7.3 (a) após 48 h de hidrólise e na Figura 7.3 (b), após 96 h de reação enzimática.

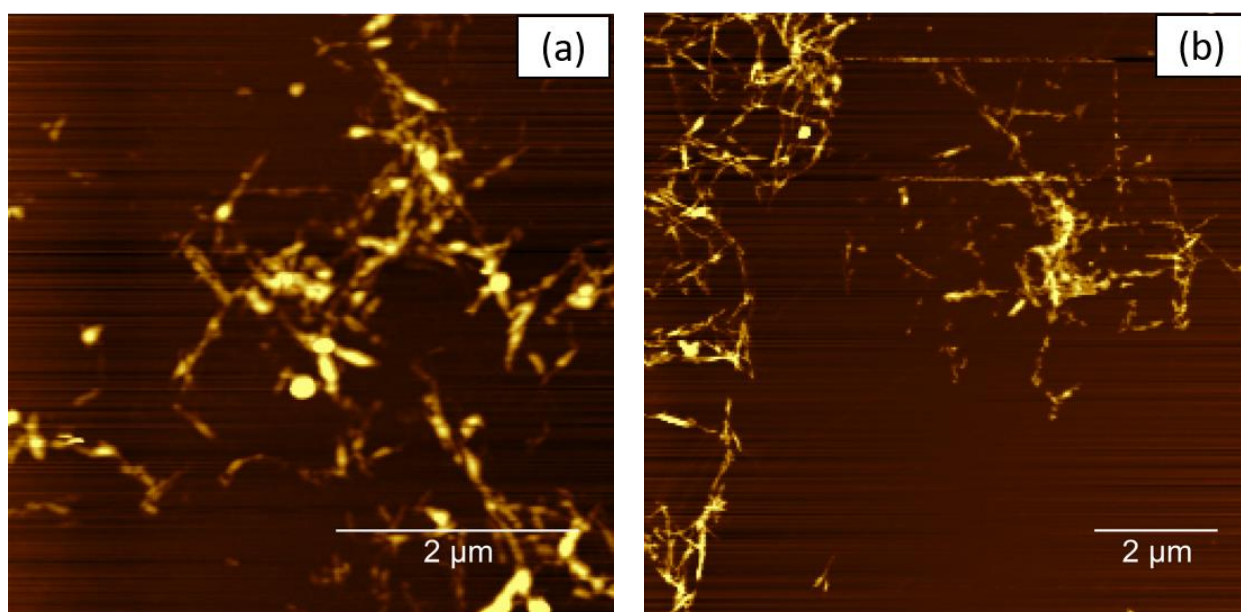


Figura 7.3 - Microscopia de Força Atômica (AFM) para nanocelulose obtida por hidrólise enzimática em reação com teor de sólidos 15% (m/v) e carga enzimática de 10 FPU/g biomassa em bagaço branqueado - (a) 48 h; (b) 96 h

Observou-se a formação de nanoestruturas com comprimentos médios de  $398 \pm 48$  nm, diâmetros de  $12 \pm 3$  nm e razão de aspecto  $29 \pm 1$ , após 48 h de hidrólise. Os valores médios associados ao comprimento e diâmetro após 96 h de reação foi  $350 \pm 47$  nm e  $11 \pm 2$  nm, respectivamente, sendo a razão de aspecto de após  $32 \pm 2$ . As estruturas formadas apresentaram formato alongado e fino, remetendo-se a nanocristais de celulose. A faixa de comprimentos reportados para nanocristais obtidos por hidrólise enzimática variam de 100 a 500 nm, porém envolvem principalmente a extração partindo de celulose com baixo teor de hemicelulose e lignina, sendo geralmente associados a outras rotas mecânicas para



facilitar a etapa de liberação das nanoestruturas (Cui et al., 2016). Poucos são os estudos que usaram exclusivamente rotas enzimáticas partindo de resíduos agroindustriais. Neste sentido, Aguiar e colaboradores (2020) reportaram NCC de celulose extraídos do bagaço de cana-de-açúcar com comprimentos de 465 nm e 12 nm de diâmetro após 48 h de hidrólise enzimática usando o complexo Cellic Ctec 3<sup>®</sup>. Com o decorrer do tempo de hidrólise, os autores relataram uma redução no comprimento e no diâmetro das nanoestruturas, relatando em torno de 351 nm e 9 nm, respectivamente após 96h de reação. Em tempos menores de reação, apesar de fora da faixa de comprimento relacionada aos nanocristais (50 – 350 nm), padronizados para NCC obtidos por rotas químicas, observa-se que as estruturas aqui apresentadas têm formatos característicos de nanocristais. Ainda assim, a razão de aspecto e os diâmetros para os NCC obtidos por rota enzimática estão dentro da faixa estabelecida na literatura, entre 5-30 e 5-20 nm, respectivamente (Foster et al., 2018).

A rota enzimática tem como vantagem condições suaves de trabalho quando comparada a métodos ácidos. É importante destacar que na rota enzimática para obtenção de nanocelulose, as estruturas formadas apresentam certa heterogeneidade, com a presença bem definida de nanocristais, mas também feixes de celulose remanescente, mostrando um modelo de substrato heterogêneo, assumindo a estrutura natural heterogênea da celulose, em que a hidrólise altera apenas a proporção de cada elemento presente na biomassa (Rovera et al., 2018).

#### **7.4.2 Avaliação do índice de cristalinidade por Difração de Raios-X (DRX)**

O índice de cristalinidade é um importante parâmetro a ser estudado na obtenção de nanocelulose. A técnica permite avaliar a remoção de constituintes amorfos e as eventuais modificações nos polimorfos da celulose. Assim, a Figura 7.4 estão apresentados os diferentes índices de cristalinidade para o material de partida da hidrólise enzimática (Figura 7.4 (a)), bem como o resíduo sólido após os diferentes tempos de hidrólise enzimática, sendo na Figura 7.4 (b) 48 h e na Figura 7.4 (c) o tempo de 96 h.

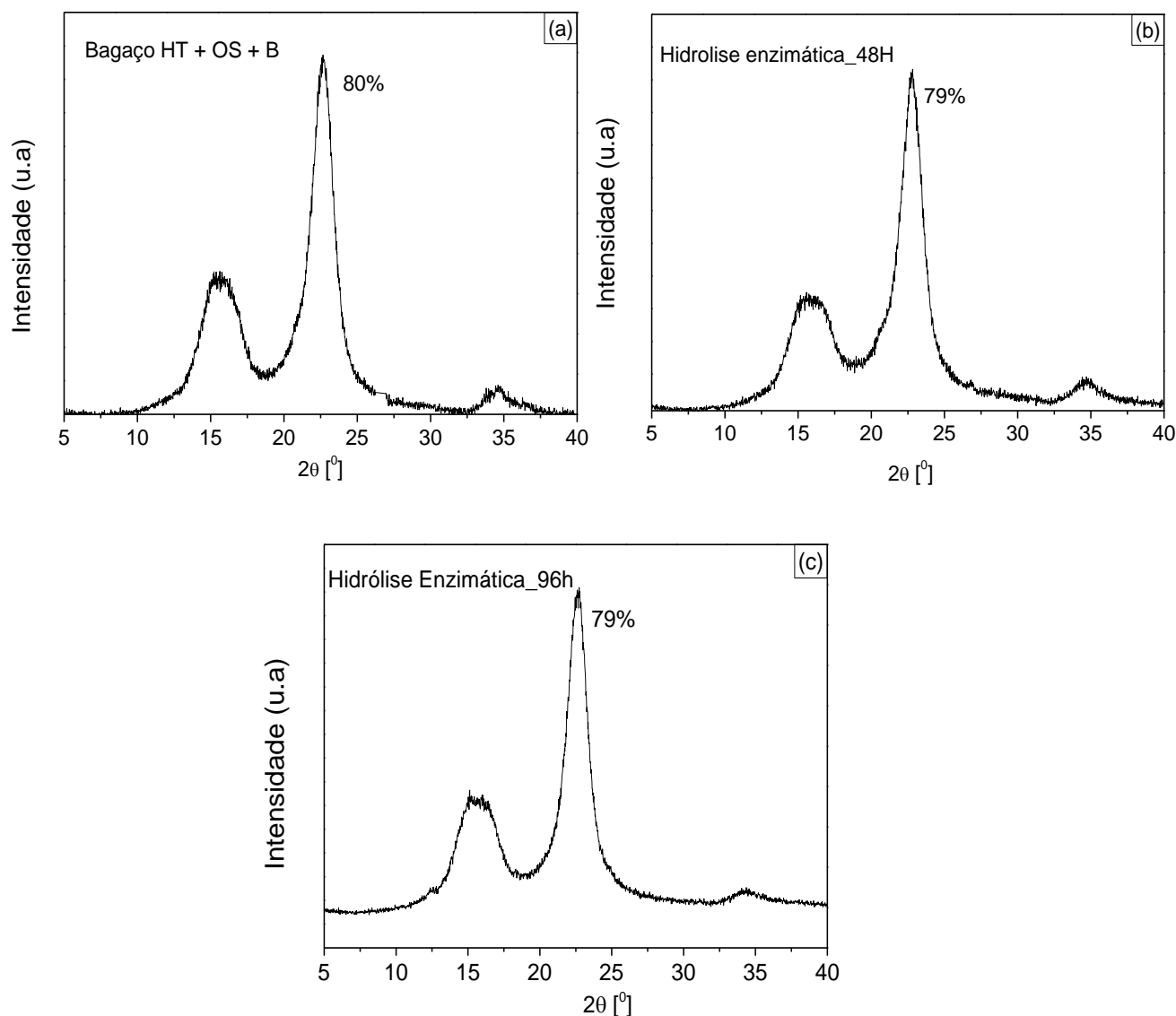


Figura 7. 4 DRX – (a) bagaço após tratamento hidrotérmico, seguido de organossolve e branqueado prévio a hidrólise enzimática (HT+OS+B); (b) bagaço HT+OS+B após 48 h de hidrólise enzimática; (c) bagaço HT+OS+B após 96h de hidrólise enzimática

Após a hidrólise enzimática, em ambos os tempos, é possível sugerir que a enzima agiu predominantemente na remoção da celulose amorfa, não causando alterações na estrutura tipo I do material. A discreta alteração nos índices de cristalinidade dos materiais após a rota enzimática é característica deste método. Na literatura foram evidenciados aumentos de no máximo 10% nos índices de cristalinidade em relação ao material de partida para nanoestruturas produzidas por rota enzimática (Bondancia et al., 2017; de Aguiar et al., 2020; Hu et al., 2018; Siqueira et al., 2019). Apesar de não ter sido observadas alterações nos índices de cristalinidade após as hidrólises enzimáticas, com base nos dados de liberação de

glicose (apresentados na Figura 7.2) e com base no mecanismo de atuação das enzimas, é sugerido que houve a remoção predominante de material amorfo, garantindo a presença de domínios cristalinos no material.

#### 7.4.3 Avaliação dos grupos funcionais por Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho (FTIR)

Os FTIR estão apresentados na Figura 7.5 para o bagaço *in natura*, após os subsequentes tratamentos (HT+OS+B) e após a etapa de hidrólise enzimática. Observa-se que todos os espectros apresentam semelhanças de natureza química, uma vez que são oriundos da mesma biomassa lignocelulósica, resultando na presença de grupos funcionais característicos a celulose, hemicelulose e lignina.

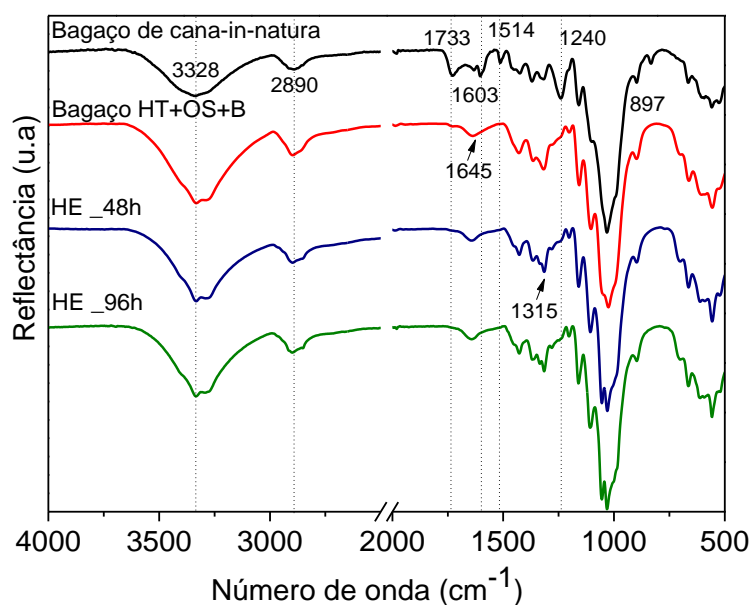


Figura 7. 5 - Espectros de FTIR para o bagaço de cana *in natura*, bagaço tratado e branqueado (HT+OS+B) e submetido a hidrólises enzimáticas em diferentes tempos;

Os espectros mostram absorções nas regiões  $3340\text{ cm}^{-1}$ , referente a deformação axial da ligação O-H e na região de  $2897\text{ cm}^{-1}$  associadas às estruturas alifáticas, designadas pela deformação axial da ligação C-H que podem ser atribuídas à lignina, celulose e hemicelulose. Ligações na região de  $1730\text{ cm}^{-1}$  representam os grupos ésteres acetil e uranil da hemicelulose ou ligações ésteres presentes em grupos p-cumárico e felúrico da lignina (Sun et al., 2005a). Bandas na

região de  $1639\text{ cm}^{-1}$  estão associadas à absorção de água e também à deformação axial nas carbonilas presentes nas ligações glicosídicas da celulose, sendo também relatada como o estiramento da ligação C=C do anel aromático da lignina, função também atribuída à banda  $1510\text{ cm}^{-1}$ . A absorção referente à deformação assimétrica de grupos C-H e C-O em  $1430\text{ cm}^{-1}$  e a deformação simétrica angular de C-H na cadeia  $\text{CH}_2$ , representada pela região  $1320\text{ cm}^{-1}$  podem ser atribuídas à regiões cristalinas das estruturas de celulose (Otoni et al., 2018b; Rosa et al., 2012; Sun et al., 2005b). A região entre  $1200$  e  $1100\text{ cm}^{-1}$  estão associadas à faixa de deformação das bandas de celulose, hemicelulose e lignina. Outra região característica da celulose é representada pela banda  $897\text{ cm}^{-1}$ , que se refere ao estiramento de C-O-C, atribuído à ligações glicosídicas  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) que ligam unidades de açúcar (Oh et al., 2005).

Após as subseqüentes etapas de pré-tratamento hidrotérmico, organossolve e branqueamento para remoção dos constituintes não celulósicos do bagaço de cana, foi observado o desaparecimento das bandas na região  $1514\text{ cm}^{-1}$  e também em  $1728\text{ cm}^{-1}$ , sugerindo que a etapa de remoção da lignina foi efetiva após o pré-tratamento. Outra evidência está na redução da banda  $1200\text{ cm}^{-1}$  e intensificação da banda  $1315\text{ cm}^{-1}$ , revelando o aumento da celulose cristalina, impulsionado pela remoção de constituintes amorfos como hemicelulose e lignina, em consonância com a caracterização química previamente apresentada na Tabela 6.1. Após as etapas de hidrólise enzimática em diferentes tempos (48 h e 96 h), observa-se a intensificação das bandas associadas à celulose cristalina ( $1318\text{ cm}^{-1}$ ). De maneira complementar, a banda em  $3328\text{ cm}^{-1}$  sugere a maior exposição das hidroxilas presentes na celulose, já que essa região é característica do estiramento desses grupos em polissacarídeos (de Aguiar et al., 2020).

#### **7.4.4 Avaliação dos grupos funcionais por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)**

A Figura 7.6 apresenta os espectros Multi-CP para o bagaço (HT+OS+B) com posterior hidrólise enzimática em diferentes tempos.

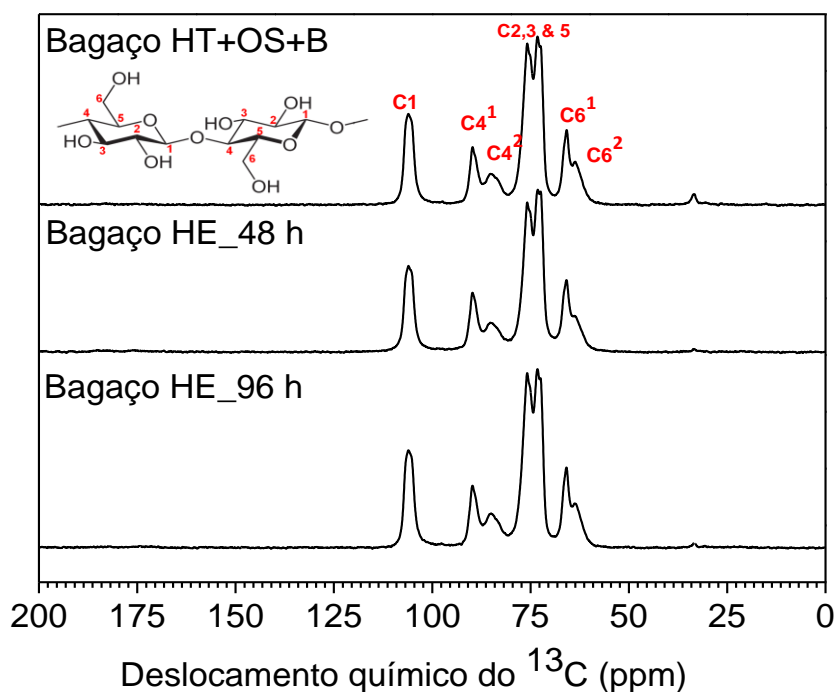


Figura 7. 6 - Espectros de multiCP (a) Bagaço tratado e branqueado e após as respectivas hidrólises enzimáticas em diferentes tempos;

Nos espectros, observa-se apenas sinais característicos dos carbonos da celulose, evidenciados para todas as amostras, atribuídos aos carbonos C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub> (Larsson et al., 1997). A frequência de cada carbono refere-se aos domínios cristalinos e amorfos na celulose. O C<sub>1</sub> refere-se a região de 105 ppm, e C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> e C<sub>5</sub> apresentam-se entre 72 a 75 ppm. Característico da celulose amorfa, o C<sub>4</sub><sup>2</sup> é apresentado no deslocamento químico 84 ppm, enquanto a região espectral de 89 ppm do C<sub>4</sub><sup>1</sup> é atribuída à domínios cristalinos (Park et al., 2010). Outra região característica dos domínios amorfos é apresentada pelos carbonos C<sub>6</sub><sup>2</sup> em 63 ppm, enquanto o C<sub>6</sub><sup>1</sup> está na região 66 ppm é típico da celulose cristalina. Não se observam alterações espectrais atribuídas à hidrólise enzimática, apenas sinais referentes à celulose.

A partir dos espectros, foram obtidos os índices de cristalinidade através da integração das regiões C<sub>4</sub><sup>1</sup> e C<sub>4</sub><sup>2</sup>, referentes a celulose amorfa e cristalina. Para isto, foram centradas duas Gaussianas ente a região espectral de 90 a 83 ppm (Park et al., 2010; Park et al., 2009). As amostras obtidas por rota enzimática apresentaram índice de cristalinidade de 59% para 48 h, 61% para 96 h de hidrólise e material inicial de 50%. Observam-se diferenças entre os índices de cristalinidade obtidos por

DRX e RMN. No DRX considera-se a orientação dos cristalitos, sendo importante se atentar ao preparo da amostra. Na técnica de RMN superfícies não são consideradas. Ambas as técnicas apresentam um modelo simplificado de análise, em que apenas a contribuição de componentes amorfos e cristalinos são considerados, enquanto algumas pesquisas relatam a presença de celulose paracristalina, não considerada em ambas as análises. Assim, a informação de qual método é o mais preciso não é simples de ser determinada (Ahvenainen et al., 2016; Park et al., 2010). A contribuição de um conjunto de técnicas auxilia no entendimento das características físico-química dos materiais obtidos.

#### 7.4.5 Avaliação térmica por análise termogravimétrica (TGA)

A fim de avaliar o comportamento de degradação térmica das nanoceluloses obtidas as curvas termogravimétricas bem como sua derivada são apresentados na Figura 7.7 (a) e 7.7 (b).

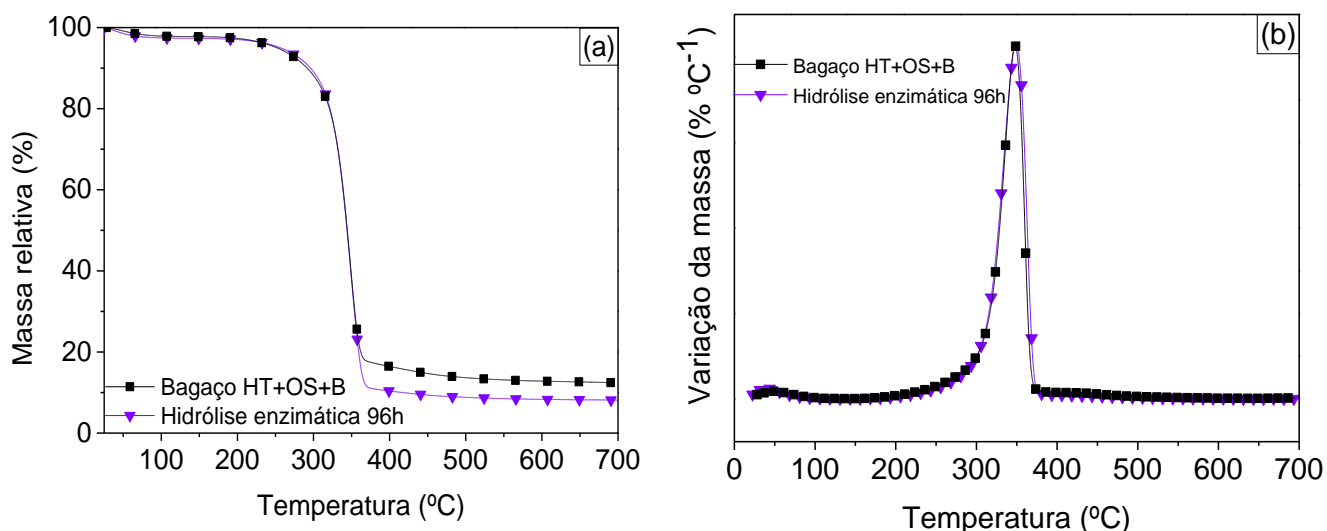


Figura 7. 7 – (a) Curvas de análise termogravimétricas (TGA) obtida para atmosfera de  $N_2$ ; (b) Derivada termogravimétrica (DTG) para bagaço HT+OS+B (■) e NCC obtido após 96 h de hidrólise enzimática (▼)

Nos termogramas são apresentados três eventos principais de perda de massa. O primeiro entre 30 °C e 150 °C, conhecido como desidratação intermolecular, referente à perda de água e materiais de baixo peso molecular remanescentes dos procedimentos de extração. (Abraham et al., 2011; Martins et

al., 2011). O segundo evento ocorre entre 220 °C e 315 °C, associado à despolimerização da hemicelulose. Um novo estágio de perda de massa entre 315 °C e 400 °C envolve a clivagem das ligações glicosídicas da celulose (Yang et al., 2007). Observa-se que para a amostra de bagaço HT+OS+B a temperatura inicial de degradação ( $T_{\text{onset}}$ ), foi de 293,8 °C enquanto a temperatura máxima de degradação obtida pela curva de DTG foi de 347,2 °C. Os valores refletem uma mistura de celulose, hemicelulose e lignina remanescentes na biomassa mesmo após etapas de pré-tratamento.

Observa-se que na curva para nanocelulose obtida por hidrólise enzimática após 96h de reação, a temperatura inicial de degradação ( $T_{\text{onset}}$ ) ocorreu em 287,1 °C. Para a amostra de bagaço HT+OS+B a  $T_{\text{onset}}$  foi evidenciada em 293,8 °C. As diferenças na estabilidade térmica dos materiais, embora pequenas, refletem alterações associadas à maior exposição de grupos hidroxilas, redução no peso molecular e aumento na área superficial da celulose após a etapa de hidrólise (Cui et al., 2016). Previamente, De Aguiar e colaboradores (2020), demonstraram valores entre 309 e 314 °C de  $T_{\text{onset}}$  para os NCC por hidrólise enzimática obtidos do bagaço de cana pré-tratado com clorito de sódio. Os resultados de estabilidade térmica dos NCC confirmam estruturas com temperatura inicial de degradação superior à métodos que utilizam ácido sulfúrico por exemplo (Cui et al., 2016).

#### **7.4.6 Avaliação da estabilidade coloidal e carga líquida superficial por Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e potencial $\zeta$ aparente**

Medidas de DLS para as nanoceluloses foram realizadas a fim de avaliar a presença de aglomerados e a distribuição de tamanho aparente das suspensões. Os valores de índice de polidispersividade (PDI)  $\leq 0,1$  revelam amostras altamente monodispersas, enquanto valores entre 0,1 e 0,4 são indicativos de suspensões moderadamente polidispersa e  $< 0,4$  indica a presença uma elevada polidispersividade (Bhattacharjee, 2016). Já as medidas de potencial  $\zeta$  aparente, realizadas pela mobilidade eletroforética das partículas, indicam a presença de carga líquida superficial, responsável pela estabilidade coloidal das suspensões. Na Tabela 7.1, são apresentados os valores de DLS e potencial  $\zeta$  aparente para os NCC obtidos após 48 h e 96 h de hidrólise enzimática.

Tabela 7. 1 Tamanho médio de partícula ( $Z_d$ ), índice de polidispersividade (PDI) e carga líquida superficial (potencial  $\zeta$  aparente) para nanocelulose obtida por diferentes métodos de extração para a biomassa de cana-de-açúcar pré-tratada

Condição	$Z_d$ (nm)	PDI	Potencial $\zeta$ aparente (mV)
<b>Hidrólise enzimática – 48 h</b>	$336,6 \pm 21,5$	$0,45 \pm 0,05$	$-18,0 \pm 0,21$
<b>Hidrólise enzimática – 96 h</b>	$267,8 \pm 15,3$	$0,40 \pm 0,03$	$-20,4 \pm 0,87$

Observa-se a tendência de redução do tamanho de partícula e do índice de polidispersividade com o passar do tempo de hidrólise, revelando a diminuição na tendência de aglomeração e maior homogeneidade das estruturas. Esta tendência é confirmada pelo aumento em módulo dos valores de potencial  $\zeta$  aparente, que devido à maior exposição de grupos negativamente carregados, resultam em suspensões com melhor estabilidade coloidal. O tamanho médio de partícula, reduzido com o decorrer da hidrólise enzimática, apresenta um indicativo de redução nos comprimentos e diâmetros das estruturas, confirmados também pelos AFM mostrados na Figura 7.3. Resultados semelhantes mostraram uma tendência na redução do tamanho de partícula com o decorrer do tempo de hidrólise enzimática (Ribeiro et al.2020). Ribeiro e colaboradores (2020) relataram valores de tamanho médio aparente de 533, 425 e 423 nm para nanoestruturas obtidas respectivamente após 24, 48 e 72 h por hidrólise enzimática da polpa de celulose. Apesar da técnica de DLS não ser adequada para afirmação do valor absoluto de comprimentos e diâmetros, por fornecer medidas de raios hidrodinâmicos e não valores reais, os resultados aqui apresentados são importantes para estimar a redução nos tamanhos com o decorrer das hidrólises, servindo como um estudo comparativo.

Assim, para entender o comportamento de agregação das nanoestruturas, os resultados de potencial  $\zeta$  aparente também foram avaliados. Ressalta-se que partículas com potencial  $\zeta$  aparente entre -10 mV a solução é considerada instável, relativamente estável para valores entre -10 e -20 mV, moderadamente estável para valores entre -20 mV e -30 mV e acima de -30 mV a suspensão é altamente estável,



condição desejada visando uma boa dispersão para posteriores aplicações (Bhattacharjee, 2016). Para as estruturas obtidas pela rota enzimática, os valores de potencial  $\zeta$  aparente foram de -18 mV a -20 mV. Nesta etapa de hidrólise, ocorre o rompimento das fibrilas e a exposição de grupos funcionais presentes na hemicelulose residual. Além disso, as hidroxilas da celulose que estavam interagindo entre si são expostas, induzindo a geração de cargas líquidas superficiais nas estruturas. Previamente, foram relatados valores entre -10 mV e -30 mV para processos de obtenção de nanoestruturas em ausência de ácidos, mostrando que somente com a exposição de grupamentos negativamente carregados presentes na biomassa lignocelulósica é possível se obter suspensões com alta estabilidade coloidal (Martelli-Tosi et al., 2018; Otoni et al., 2018a).

## **7.5 CONSIDERAÇÕES PARCIAIS**

Foi possível demonstrar que NCC por rota enzimática podem ser extraídos partindo da biomassa do bagaço de cana. A rota enzimática permitiu obter nanoestruturas associadas à liberação de elevadas concentrações de glicose, açúcar precursor da produção de etanol 2G e base para produção de outros produtos biotecnológicos de elevado valor. Os NCC obtidos apresentaram valores de temperatura inicial de degradação com valores próximos ao material de partida. Os resultados mostraram a produção de nanocelulose por uma rota alternativa aos métodos com ácidos minerais, com potencial de ser explorada no contexto de uma biorrefinaria, agregando valor a um resíduo agroindustrial.

## **8 APROVEITAMENTO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR PARA PRODUÇÃO DE NANOCRISTAIS DE CELULOSE POR UMA COMBINAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS E MINERAIS**

Nos últimos anos tem crescido o interesse em pesquisas que usam ácidos sólidos orgânicos na extração de nanomateriais, levando em conta a possibilidade de ser totalmente recuperado. Assim, o ácido cítrico, conforme já apresentado no capítulo 5, tem potencial de ser utilizado e obtido dentro dos conceitos de biorrefinaria. Visando à obtenção de nanocelulose de maneira mais amigável, NCC foram extraídos com uso deste ácido. Porém, dentre as lacunas ainda necessárias para se consolidar as rotas alternativas, tem-se as questões relacionadas ao baixo rendimento resultante nos processo. Diferentes trabalhos buscam associação com métodos tradicionais, buscando a redução do uso de ácidos minerais na extração de nanocristais (Yu et al., 2019; Yu et al., 2016). Neste estudo, visando melhorar a hidrólise das frações amorfas da celulose, foram realizadas extrações com mistura de ácido cítrico e sulfúrico. Ainda como um padrão de comparação, a hidrólise com ácido sulfúrico foi realizada. As extrações por ácido cítrico e mistura dos ácidos foram feitas sempre buscando estruturas com características próximas ou superiores aos NCC obtidos por ácidos minerais. As propriedades de índice de cristalinidade, temperatura inicial de degradação térmica, estabilidade coloidal foram utilizadas para comparar os nanocristais obtidos pelos diferentes métodos, sempre buscando propriedades próximas ou superiores a dos nanocristais obtidos por ácido sulfúrico.

## 8.1 MATERIAIS

Para as hidrólises ácidas foi usado ácido cítrico (Synth) e ácido sulfúrico (Synth). O material de partida para a etapa de hidrólise enzimática foi o bagaço HT+HE+OS+B.

## 8.2 MÉTODOS

### 8.2.1 Obtenção de nanocelulose por hidrólise ácida com diferentes ácidos

A obtenção de nanocelulose foi realizada com diferentes métodos ácidos, sendo o ácido sulfúrico, cítrico e mistura de cítrico e sulfúrico. A rota esquematizada é apresentada na Figura 8.1.

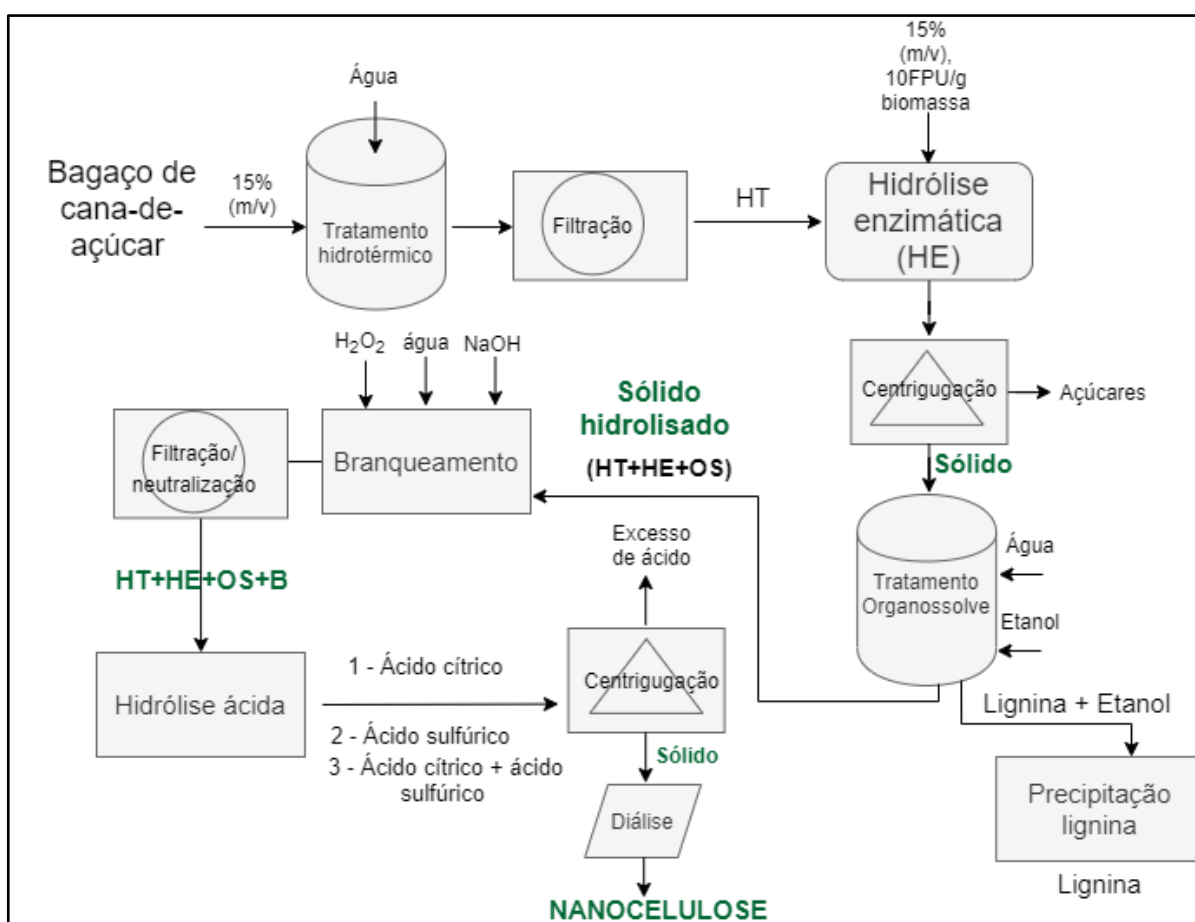


Figura 8. 1 Fluxograma da obtenção de nanocelulose por hidrólise ácida após diferentes etapas de tratamento

Após a etapa de hidrólise para extração dos açúcares, o material sólido foi submetido aos processos organossolve (item 4.3.2.2) e a etapa de branqueamento (item 4.3.2.3). Depois de passado pelas etapas de purificação, este material foi submetido a hidrólises ácidas com diferentes ácidos.

### **8.2.2 Obtenção de nanocelulose por hidrólise com ácido sulfúrico**

Nanocristais de celulose foram isolados por hidrólise com ácido sulfúrico, baseando-se no procedimento de Bondeson e colaboradores (2006). Após a etapa de branqueamento, o bagaço foi hidrolisado em ácido sulfúrico 64% (m/m) em proporção 1:100 (m/v) por 45 min em um reator encamisado do tipo tanque agitado com tampa e haste de teflon, conectado a um banho de água a 45 °C. A reação foi finalizada com 500 mL de água destilada (aproximadamente 5°C) e posteriormente centrifugada (10 000 rpm, 10 min) para remoção do ácido sulfúrico. O precipitado foi lavado sucessivas vezes com água destilada (25 °C) para retirada do ácido sulfúrico residual. Por fim o precipitado contendo os nanocristais de celulose foi disperso em 1000 mL de água destilada e deixado em diálise até que a suspensão atingisse o pH neutro (em torno de 5 dias). Ao final, parte da suspensão foi congelada e seca por liofilização.

### **8.2.3 Hidrólise com ácido cítrico**

A hidrólise com ácido cítrico foi feita baseando-se no procedimento de Chen e colaboradores (2016). Bagaço após a etapa de branqueamento foi submetido a hidrólise com ácido cítrico 60% (m/v) por 4,5 h a 120 °C (em banho de glicerina) e 250 rpm em reator do tipo tanque agitado com tampa e haste de teflon. Após o tempo de hidrólise, a reação foi finalizada com água destilada a 80 °C (para evitar a cristalização), seguida de centrifugação (10 000 rpm, 10 min). Foram realizadas sucessivas lavagens para remoção do ácido cítrico residual e posteriormente o precipitado foi suspenso em 1000 mL de água destilada e deixado em diálise até atingir o pH neutro. Por fim a suspensão foi congelada e seca por liofilização.

#### **8.2.4 Hidrólise com mistura de ácido sulfúrico e ácido cítrico**

Esta etapa foi feita com base no trabalho de Vanderfleet e colaboradores (2019). Nanocristais de celulose foram isolados usando uma mistura de ácido sulfúrico (64% m/m) e ácido cítrico (60% m/v) em razão molar de 1:8. A hidrólise foi feita a 100 °C (usando banho de glicerina) em reator do tipo tanque agitado com haste e tampa de teflon por 4,5 h. Ao final da reação, foi adicionado 500 mL de água destilada (80°C) e submetido a centrifugação (10 000 rpm, 10 min). O precipitado foi suspenso em água destilada (25 °C) e centrifugado para remoção do ácido residual. Foram feitas sucessivas lavagens e posteriormente o precipitado suspenso em 1000 mL de água e deixado em diálise para neutralização e remoção dos sais. Ao final da etapa de diálise o material foi congelado e seco por liofilização.

### **8.3 CARACTERIZAÇÕES**

#### **8.3.1 Avaliação da morfologia das nanocelulose por Microscopia de Força Atômica (AFM)**

A avaliação da morfologia foi descrita no item 5.2.3.

#### **8.3.2 Avaliação da carga líquida superficial por potencial $\zeta$ aparente**

A carga do potencial de superfície das amostras foi determinada usando um analisador Zetasizer Nano ZS (Malven Instruments, Reino Unido), conforme procedimento apresentado no item 5.2.5.

#### **8.3.3 Avaliação do índice de cristalinidade por Difração de Raios-X (DRX)**

A avaliação dos índices de cristalinidade para os diferentes materiais antes e após as hidrólises foram realizados conforme descritos no item 5.2.4.

### **8.3.4 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)**

A identificação dos grupos carboxila nos NCCs obtidos foi realizada por espectroscopia FTIR, conforme procedimento no item 5.2.6.

### **8.3.5 Ressonância Magnética Nuclear de $^{13}\text{C}$ no estado sólido (ss-NMR)**

A análise de RMN foi realizada conforme descrita no tópico 5.2.7. Os espectros de RMN foram usados para determinação dos índices de cristalinidade, diferenciando a região amorfa correspondente aos sinais  $\text{C}_6^1$  e  $\text{C}_4^1$  e a região cristalina, dada pelos sinais  $\text{C}_6^2$  e  $\text{C}_4^2$ . Para isto, duas Gaussianas entre as regiões apresentadas foram centradas e deconvoluídas foram utilizadas.

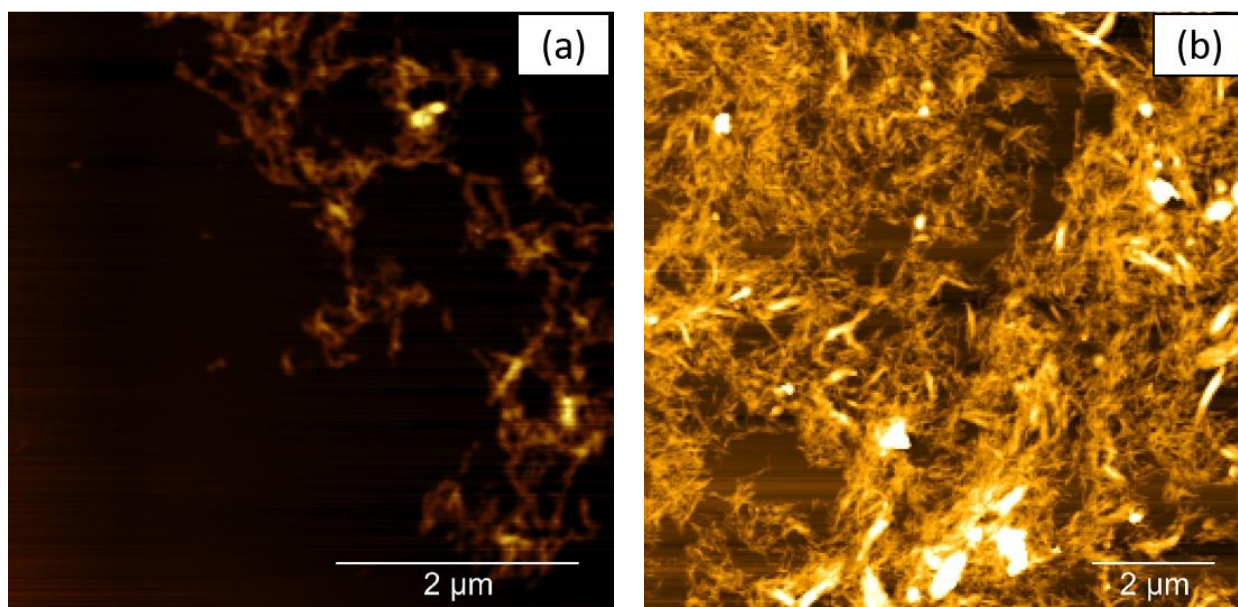
### **8.3.6 Análise Termogravimétrica (TGA)**

As estabilidades térmicas do bagaço após as etapas de tratamento, bem como após as hidrólises para obtenção de nanocelulose foram avaliadas por análise termogravimétrica foi apresentada no item 5.2.8.

## 8.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 8.4.1 Avaliação da morfologia das nanocelulose por Microscopia de Força Atômica (AFM)

Visando testar outros métodos de obtenção de nanocelulose no conceito de biorrefinaria, o bagaço HT+HE+OS+B foi submetido às etapas de hidrólises ácidas. Uma condição testada foi realizando a hidrólise com ácido sulfúrico (Figura 8.2.9 (a)), um método já consolidado na literatura para obtenção de nanocelulose, inclusive como um produto comercializável (Reid et al., 2017). Outro método pela utilização do ácido cítrico (Figura 8.2 (b)), um ácido orgânico que pode ser obtido como um produto de biorrefinaria por meio da fermentação microbiana dos açúcares produzidos na etapa de hidrólise enzimática (El Mekawy et al., 2013). Por fim, visando uma redução na quantidade de ácido sulfúrico utilizado no processo foi aplicada uma mistura de ácido cítrico e sulfúrico (Figura 8.2 (c)).



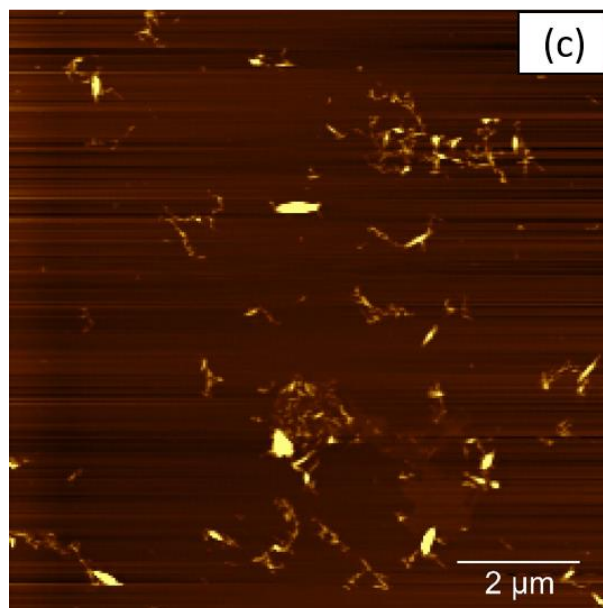


Figura 8. 2 Microscopia de Força Atômica para nanocelulose obtida por hidrólise ácida do bagaço branqueado (HT+HE+OS+B) com diferentes ácidos: (a) NCC extraído por ácido sulfúrico a 45 °C por 1 h; (b) NCC extraído por ácido cítrico a 120°C e 4,5 h de reação; (c) NCC extraído por mistura de ácido cítrico e ácido sulfúrico a 100 °C por 4,5h de reação

A Microscopia de Força Atômica (AFM) dos nanocristais obtidos por ácido sulfúrico (S-NCC) são apresentados na Figura 8.2 (a). Observa-se estruturas de formato acicular, finas e alongadas, com comprimento de  $201 \pm 49$  nm e diâmetro de  $10 \pm 4$  nm. Previamente, Camargo e colaboradores (2016), apresentaram nanoestruturas com comprimento 193 e 246 nm e diâmetros de 17 nm após extração com ácido sulfúrico para bagaço de cana de açúcar após tratamento hidrotérmico e branqueamento com peróxido. A produção de nanocristais de celulose por ácido sulfúrico a partir de um resíduo da produção de etanol tem como vantagem agregar valor a um material por uma rota de extração já consolidada (Oksman et al., 2011). A hidrólise com ácido sulfúrico envolve a esterificação de grupos hidroxilas presentes nas cadeias de celulose, grafitizando grupos semi-éster de sulfato ( $\text{OSO}_3^-$ ) na superfície dos nanocristais. Os grupos introduzidos são responsáveis por gerar repulsão eletrostática, resultando em maior dispersão das estruturas (Lu & Hsieh, 2010). Apesar disso, a extração com ácido sulfúrico tem como desvantagem a corrosão de equipamentos e também dificuldades no tratamento dos resíduos gerados (Chen et al., 2016; Xie et al., 2018).

Como alternativa aos ácidos minerais, NCC foram obtidos por ácido cítrico (cit-NCC). O AFM apresentado na Figura 8.2 (b) revela partículas em escala



nanométrica obtidas pela extração com ácido cítrico. As estruturas apresentam comprimento e diâmetro de  $255 \pm 89$  nm e  $10 \pm 4$  nm, respectivamente. O NCC extraído por um método verde tem o potencial de ser utilizado em indústrias de cosméticos e alimentos, com menor possibilidade de apresentar risco tóxico quando comparado ao NCC obtido via ácido sulfúrico (Ji et al., 2019). As propriedades morfológicas dos NCC são dependentes da concentração de ácido, temperatura e das interações entre estas variáveis (Vanderfleet et al., 2018). A maior temperatura leva a produção de NCC de comprimentos menores, atribuído à elevada constante de reação da hidrólise ácida (Vanderfleet et al., 2018). Desta maneira, Ji e colaboradores (2019) obtiveram estruturas com comprimentos maiores em comparação com o material aqui apresentado, já que realizaram a extração de NCC partindo de polpa de bagaço de cana em condições com menor concentração de ácido cítrico, temperatura e tempo (60%, 100 °C por 4 h). Apesar disso, os autores submeteram as estruturas a 10 min de ultrassom para liberar mais uniformemente estruturas não totalmente hidrolisadas, o que não foi relatado neste trabalho. A força do ácido tem grande influência na etapa de hidrólise. Ácidos mais fortes tem uma maior capacidade de dissociação e liberação de prótons, necessários para protonação de ligações glicosídicas e de oxigênios dos anéis da cadeia polimérica da celulose. Através disso, e por meio da adição de água, ocorre a quebra da celulose em cadeias menores. Nos processos com ácidos carboxílicos, simultaneamente à redução da cadeia de celulose, ocorre a esterificação das hidroxilas para formação de grupos superficiais carregados (Lu & Hsieh, 2010; Vanderfleet et al., 2019). Assim, pode-se dizer que o ácido cítrico tem um importante potencial a ser explorado, considerando ser um reagente que pode ser produzido dentro do cenário da biorrefinaria, a partir dos açúcares produzidos nas etapas de hidrólise enzimática.

Apesar do potencial, o rendimento associado à produção de nanocelulose usando somente ácidos orgânicos ainda é baixo, relatados entre 10 e 23% (Chen et al., 2016; Ji et al., 2019). Desta maneira, uma mistura dos ácidos orgânicos com o ácido sulfúrico permite aumentar a concentração de prótons no meio, potencializando a produção de NCC. A nanocelulose obtida pela mistura de ácido cítrico e sulfúrico (cit-S-NCC), apresentada na Figura 8.2 (c) resultou em um material com comprimento e diâmetro de  $298 \pm 64$  nm e  $10 \pm 5$  nm. No trabalho de

Vanderfleet e colaboradores (2019), a associação de ácidos teve influência na morfologia das partículas obtidas. Ácidos fracos não se dissociam completamente, o que resulta em uma concentração de prótons não tão elevada quanto seria em uma solução molar equivalente de ácido sulfúrico. Mesmo que em elevada concentração de ácido e maior temperatura de extração, a hidrólise em condições isentas ou em menor concentração de ácidos fortes não é tão efetiva, levando à formação de nanocristais maiores ou hidrólise incompleta quando comparado a obtenção apenas por ácido sulfúrico (Vanderfleet et al., 2019). Comportamento semelhante foi encontrado neste trabalho.

#### 8.4.2 Avaliação da estabilidade coloidal e carga líquida superficial por Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e potencial $\zeta$ aparente

Na Tabela 8.1, são apresentados os valores de DLS e potencial  $\zeta$  aparente para os nanocristais de celulose obtidos após a hidrólise com diferentes ácidos.

Tabela 8. 1 Tamanho médio de partícula ( $Z_d$ ), índice de polidispersividade (PDI) e carga líquida superficial (potencial  $\zeta$  aparente) para nanocelulose obtida por diferentes métodos de extração para a biomassa de cana-de-açúcar pré-tratada

Condição	$Z_d$ (nm)	PDI	potencial $\zeta$ aparente (mV)	Comprimento (nm)	Diâmetro (nm)	L/d
<b>S-NCC</b>	101,6 ± 1,45	0,35 ± 0,08	-35,2 ± 0,92	201 ± 4	10 ± 4	20
<b>Cit-NCC</b>	278,1 ± 2,86	0,48 ± 0,02	-31,1 ± 0,38	255 ± 89	10 ± 4	26
<b>Cit-S-NCC</b>	217,1 ± 3,15	0,49 ± 0,04	-33,5 ± 1,47	298 ± 64	10 ± 5	30

De maneira complementar às análises de AFM apresentadas no tópico 8.3.1, o tamanho médio aparente corrobora com estruturas menores quando a hidrólise foi realizada na presença de maiores proporções de ácido sulfúrico (Vanderfleet et al., 2019). Apesar disso, para os cit-S-NCC, o tamanho médio aparente foi inferior ao cit-NCC. Os valores podem ser referentes a redução nos valores absolutos, mas

também pode estar associado a maior agregação das estruturas nas imagens de AFM.

Para justificar a tendência de aglomeração, a avaliação de potencial  $\zeta$  aparente se faz necessária. Suspensões com valores entre -20 mV e -30 mV apresentam moderada estabilidade, enquanto acima de -30 mV refere-se a suspensões altamente estáveis (Bhattacharjee, 2016). A mesma tendência do tamanho médio aparente foi observada para os valores de potencial  $\zeta$  aparente. Suspensões para NCC contendo grupos sulfonados apresentaram os maiores valores em módulo de potencial  $\zeta$  aparente, sendo -35,2 mV para o S-NCC e -33,5 mV. Para o cit-NCC o valor foi inferior a demais estruturas -31,1 mV. Estes valores são relativos à presença de meio-éster atribuído aos grupos ( $\text{OSO}_3^-$ ) e também a presença de grupos carboxílicos (COOH) grafitados na superfície da nanocelulose. Os resultados corroboram com trabalhos prévios, que apresentaram suspensões estáveis, com potencial  $\zeta$  aparente acima de -30 mV, evidenciando que grupos carregados foram introduzidos na superfície dos NCC (Yu et al., 2019).

#### **8.4.3 Avaliação do índice de cristalinidade por Difração de Raios-X (DRX)**

Para avaliar possíveis alterações na estrutura cristalina da celulose, o bagaço HT+HE+OS+B e as estruturas nanocelulósicas obtidas pelos diferentes ácidos foram avaliadas por DRX e os difratogramas são apresentados na Figura 8.3.

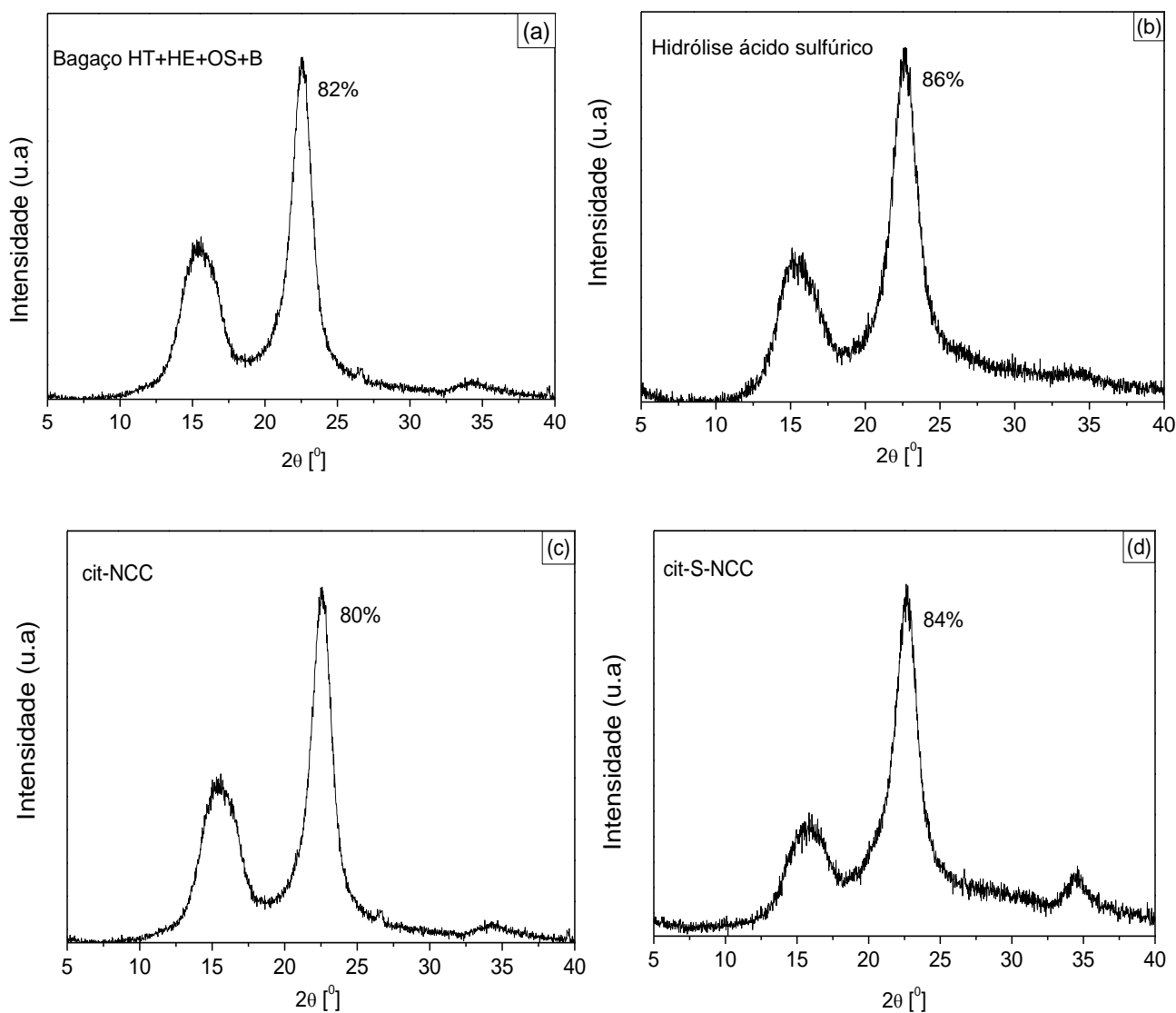


Figura 8. 3 DRX (a) Bagaço pós tratamento hidrotérmico, submetido a hidrólise enzimática, tratamento organossolve e branqueamento (HT+HE+OS+B); (b) NCC extraído com ácido sulfúrico; (c) NCC obtido por extração com ácido cítrico; (d) NCC extraído com mistura de ácido cítrico e sulfúrico

Os diferentes métodos ácidos de extração permitiram obter variações nos índices de cristalinidade, sugerindo a remoção de estruturas não ordenadas da biomassa. A variação nos valores de índice de cristalinidade dos materiais é atribuída principalmente à força do ácido usado na hidrólise. Os S-NCC e os cit-S-NCC apresentaram valores mais elevados em relação à cit-NCC, conforme mostrado nas Figuras 8.3 (b), 8.3 (c) e 8.3 (d). Os picos cristalinos foram observados entre  $15,8^{\circ}$  e  $22,5^{\circ}$ , enquanto os picos referentes a celulose amorfa estão localizados em  $18,5^{\circ}$ .

As reações com ácidos fortes podem levar a mudanças na estrutura cristalina da celulose. A Figura 8.3 (c), apresenta o DRX para o S-NCC que revelou um índice de cristalinidade de 86%. Além disso, os difratogramas sugerem que a estrutura referente a celulose I foi preservada, já que não são observadas alterações associadas aos planos cristalográficos deste polimorfo. A presença de picos de difração característicos de outros polimorfos da celulose também não foram evidenciados nos materiais extraídos pelo ácido cítrico e pela mistura de ácidos, evidenciando que a celulose I também não foi afetada.

O cit-NCC revelou que ácidos fracos também são capazes de desintegrar a celulose amorfa e liberar as estruturas nanocristalinas. Apesar disso, a mistura de ácidos favoreceu a obtenção de nanocelulose, já que por aumentar os prótons disponíveis no meio reacional para ataque das ligações glicosídicas, promove a remoção da celulose amorfa de maneira mais eficiente, evidenciado pela intensificação do pico  $2\theta$  22,5° quando comparado principalmente com o material de partida (Tarchoun et al., 2019). Assim, a obtenção de nanoestruturas por meio da mistura de um ácido carboxílico com ácido sulfúrico permitiu a obtenção nanocelulose mais cristalinas (em relação ao método apenas com ácido cítrico). Com a redução de ácido sulfúrico usado para extração de nanocelulose, processos mais brandos foram alcançados, sugerindo menor impacto na estrutura cristalina presente na celulose (Vanderfleet et al., 2019; Yu et al., 2019).

#### **8.4.4. Avaliação dos grupos funcionais por Espectroscopia de absorção na região do Infra vermelho (FTIR)**

A Figura 8.4 apresenta os espectros de FTIR do bagaço HT+HE+OS+B e também dos nanocristais obtidos após hidrólises ácidas. Os espectros mostram-se semelhantes, com diferenças pontuais atribuídos a mesma natureza química dos materiais avaliados.

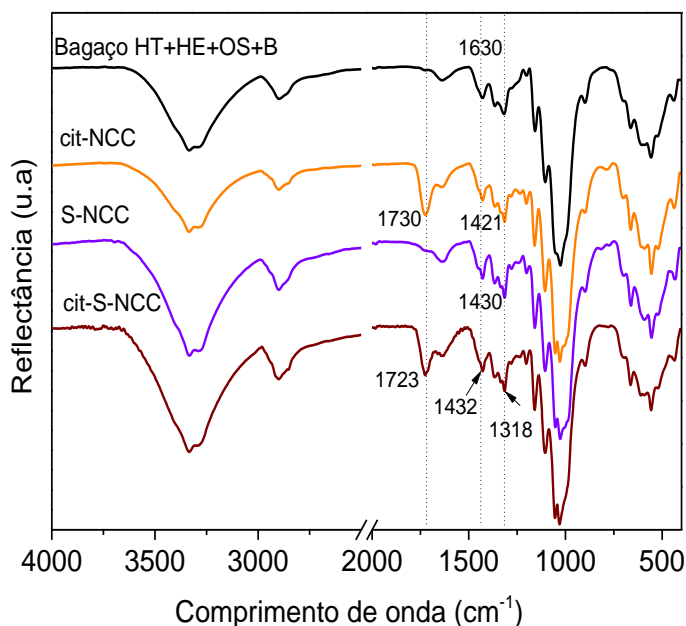


Figura 8. 4 Espectros de FTIR para bagaço pós tratamento hidrotérmico, submetido a hidrólise enzimática, tratamento organossolve e branqueamento (HT+HE+OS+B); (b) hidrólise do bagaço (HT+HE+OS+B) com ácido sulfúrico 45°C por 1h; (c) hidrólise do bagaço (HT+HE+OS+B) com ácido cítrico a 120°C por 4,5h de reação; (d) hidrólise do bagaço (HT+HE+OS+B) com mistura de ácido cítrico e sulfúrico a 100°C por 4,5h

Observa-se que após as sequentes etapas de pré-tratamento e branqueamento no bagaço HT+HE+OS+B não são evidenciadas bandas na região de  $1514\text{ cm}^{-1}$  e também em  $1728\text{ cm}^{-1}$ , evidenciando que o material apresenta baixo teor de lignina. A banda  $1315\text{ cm}^{-1}$  atribuída à celulose cristalina revela a remoção de constituintes hemicelulose e lignina após as etapas de pré-tratamento. A partir destes materiais, a avaliação dos espectros revelou diferenças pontuais, estimuladas por diferentes rotas de obtenção de nanocelulose.

As etapas de hidrólise ácida apresentaram a introdução de grupos funcionais carregados na superfície da celulose, representado no espectro cit-NCC pela intensificação da banda  $1730\text{ cm}^{-1}$ , sugerindo que grupos carboxílicos do ácido cítrico reagiram com grupamentos hidroxilas da celulose, resultando na formação de grupos ésteres na superfície do NCC (Chen et al., 2016). O deslocamento desta banda, que ocorreu em  $1723\text{ cm}^{-1}$ , sugere o mesmo efeito para cit-S-NCC. Em ambos os espectros, o aumento da celulose cristalina é sugerida pela intensificação da banda  $1421\text{ cm}^{-1}$  e  $1432\text{ cm}^{-1}$ . Para o S-NCC, tal banda foi observada em  $1430$

$\text{cm}^{-1}$ . A intensificação das bandas referente a celulose cristalina nos espectros sugere a contribuição das etapas de hidrólise em remover os domínios amorfos.

#### 8.4.5. Ressonância Magnética Nuclear (RMN) para avaliação de grupos funcionais e índice de cristalinidade

A Figura 8.5 apresenta os espectros Multi-CP para o bagaço HT+HE+OS+B e também para os NCC obtidos por hidrólise ácida.

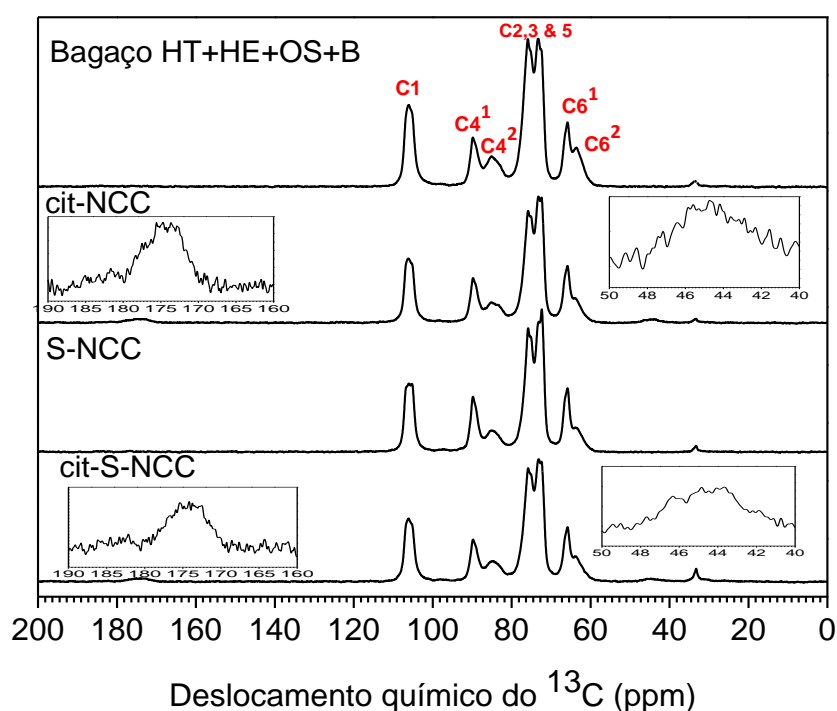


Figura 8. 5 Espectros de multiCP - Bagaço tratado e branqueado com posterior hidrólise ácida usando diferentes ácidos com zoom da região espectral de 190 a 160 ppm

O espectro da Figura 8.5 evidencia sinais de carbono C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>, referentes a molécula de celulose (Larsson et al., 1997). Conforme já relatado no tópico 7.3.6, o C<sub>4</sub><sup>2</sup> e C<sub>6</sub><sup>2</sup> são atribuídos à celulose amorfa, enquanto a região C<sub>4</sub><sup>1</sup> e C<sub>6</sub><sup>1</sup> são típicas de domínios cristalinos (Park et al., 2010).

Além dos sinais de carbonos característicos da celulose, no espectro cit-NCC observa-se a presença da região espectral em 174 ppm, atribuída à ligações ésteres e carbonilas, resultantes da interação de ácidos carboxílicos com a celulose (Spinella et al., 2016). O mesmo comportamento pode ser visto no espectro para o cit-S-NCC, que apresenta o sinal característico das porções de citrato ligados na celulose. Ambos os espectros apresentam um sinal de ressonância em 44 ppm,

característico de grupos metileno da molécula de ácido cítrico (He et al., 2018). Para o S-NCC não se observou sinais espectrais além dos definidos pelos carbonos da celulose. Neste espectro observa-se a região C4<sup>2</sup> sendo reduzida e a C4<sup>1</sup> aumentada em consonância com o maior domínio cristalino resultante da hidrólise ácida.

O aumento da região cristalina, permitiu encontrar índices de cristalinidade usando o método de Gaussianas, centradas na região espectral de 90 a 83 ppm (Park et al., 2010; Park et al., 2009). As deconvoluções resultaram em índices de cristalinidade de 53% para o bagaço HT+HE+S+B, 59% para o cit-NCC, 58% e 65% para o cit-S-NCC e S-NCC, respectivamente. Os resultados revelam que as modificações ocorreram principalmente superfície da celulose, sem que houvesse alterações na estrutura nativa da celulose cristalina (Spinella et al., 2016).

#### 8.4.6. Avaliação térmica por análise termogravimétrica (TGA)

As curvas termogravimétricas bem como sua derivada para os diferentes materiais obtidos são apresentadas na Figura 8.6 (a) e 8.6 (b).

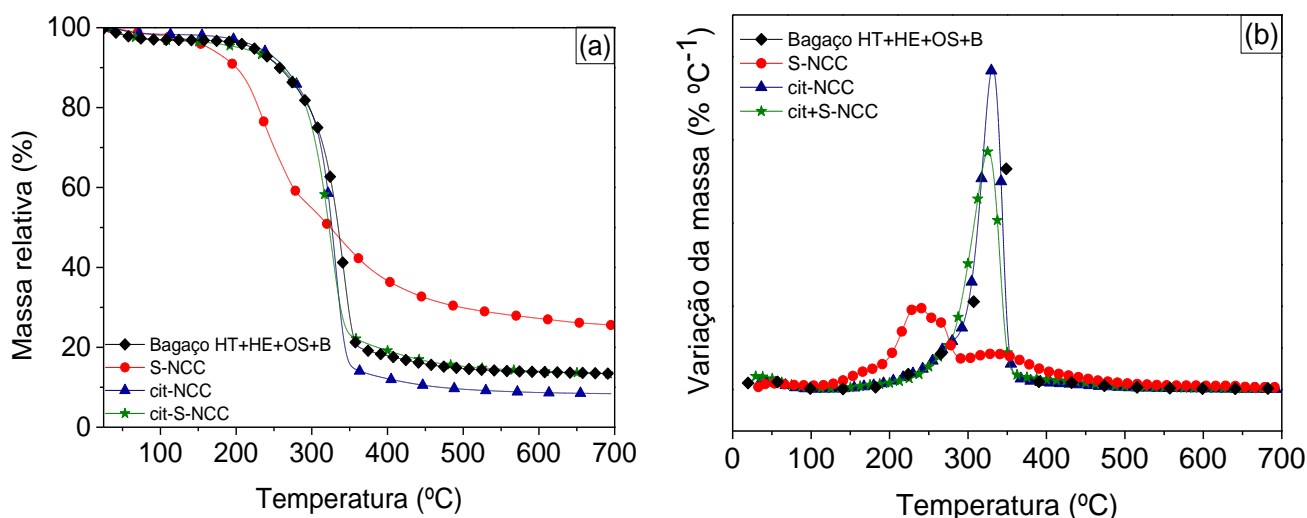


Figura 8. 6 (a) Curvas de análise termogravimétricas (TGA) obtida para atmosfera de N<sub>2</sub> em forma ácida; (b) Derivada termogravimétrica (DTG) para bagaço após tratamento hidrotérmico hidrolisado, organossolve e branqueado (♦) NCC extraído por ácido sulfúrico (●); NCC extraído por ácido cítrico (▲) e NCC extraído por mistura de ácido cítrico e ácido sulfúrico (★)



A análise das curvas obtidas após a obtenção de nanocelulose por ácido sulfúrico revelou a  $T_{\text{onset}}$  de 181,0°C. A redução em comparação ao material de partida é relativa a grupos sulfatos introduzidos na superfície da celulose (Roman & Winter, 2004). Considerando que a hidrólise com o ácido sulfúrico é um processo agressivo, não é possível controlar o tamanho dos cristais formados, assim a curva de DTG apresenta diversos eventos, referentes a nanocristais de diferentes tamanhos e pureza (de Oliveira et al., 2016). Diversos trabalhos relataram comportamentos semelhantes, sendo reportadas  $T_{\text{onset}}$  para hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar com ácido sulfúrico entre 187°C e 210°C (Leao et al., 2017; Teixeira et al., 2011b). Os grupos sulfatos presentes governam o comportamento de degradação térmica por exercerem efeito catalítico nos materiais. Previamente, foi definido que grupos sulfatos na superfície do NCC sofrem dessulfatação auto catalisada, processo que ocorre rapidamente em elevadas temperaturas, mas que também ocorre em condições ambientes (lentamente, mas que devem ser consideradas) (Beck & Bouchard, 2014; Lin & Dufresne, 2014). Outro fator que justifica a baixa estabilidade é a liberação da água presente na celulose que se liga a grupos sulfatos produzindo o ácido concentrado, responsável pela catálise da desesterificação adicional, decomposição e despolimerização da celulose, que são as etapas correspondentes ao processo de degradação da nanocelulose sulfonada (Espinosa et al., 2013; Vanderfleet et al., 2019).

A estabilidade térmica para cit-NCC foi superior aos resultados apresentados para o S-NCC. A  $T_{\text{onset}}$  para o cit-CNC foi de 268,9°C com temperatura máxima de degradação revelada pela DTG de 355,5°C. O bagaço HT+HE+OS+B apresentou 274,3 °C e DTG de 349,9 °C. A redução da estabilidade térmica do cit-NCC em relação ao material de partida foi de 5,4 °C, sugerindo que grupos carbonílicos e possivelmente carboxílicos introduzidos na superfície do NCC pouco influenciaram na estabilidade térmica do material produzido. A vantagem térmica dos cit-NCC em relação aos S-NCC, se deve a energia de ativação necessária para que ocorra a degradação de grupos introduzidos na superfície da celulose. Grupos carboxílicos tem maior energia de ativação, sendo requeridas maiores temperaturas para que a degradação ocorra. Em contrapartida, grupos sulfatos se degradam em energia de ativação bastante inferior, levando a uma menor estabilidade térmica frente a outros métodos ácidos (Yu et al., 2016).

Por fim, foi avaliada a estabilidade térmica dos nanocristais obtidos pela mistura de ácidos cítrico e sulfúrico. A  $T_{\text{onset}}$  para os cit-S-NCC foi de 262,6 °C e temperatura máxima de degradação de 331,5 °C. Quanto maior a quantidade de ácido sulfúrico usada para hidrólise, maior é introdução de grupos sulfatos na superfície da celulose, levando a redução na estabilidade térmica do CNC produzido, conforme já previamente discutido. Apesar disso, aqui observa-se que a redução na estabilidade térmica foi de 11,7 °C em relação ao material de partida, indicando que a influência dos grupos carregados introduzidos na superfície da celulose foi desprezível quando comparada com a obtenção apenas por ácido sulfúrico. Previamente, trabalhos que realizaram hidrólises com misturas de ácido para redução ou substituição do ácido sulfúrico apresentaram o mesmo comportamento de melhoria na estabilidade térmica (Correa et al., 2010; Vanderfleet et al., 2019; Yu et al., 2019). Isso implica que a utilização de outros métodos ácidos para obtenção de nanocristais de celulose dentro da biorrefinaria, são favoráveis em termos de estabilidade térmica e merecer ser explorados.

## 8.5 CONSIDERAÇÕES PARCIAIS

Foi possível obter nanocelulose a partir do bagaço de cana-de-açúcar utilizando diferentes rotas dentro do conceito de biorrefinaria. As propriedades dos nanomateriais variaram de acordo com o ácido usado na extração.

Os nanocristais obtidos pela extração com ácido cítrico apresentaram elevada estabilidade térmica. Comportamento similar foi apresentado pelas nanoestruturas obtidas pela mistura de ácidos cítrico e sulfúrico. As suspensões contendo os nanocristais obtidos pela extração ácido cítrico similarmente aos materiais extraídos por mistura de ácido cítrico e sulfúrico apresentaram comportamento estável, atribuído à introdução de grupos carregados na superfície da nanocelulose. A extração com ácido sulfúrico também apresentou uma elevada estabilidade coloidal, porém com reduzida estabilidade térmica. Apesar disso, esta rota apresentou estruturas com elevado índice de cristalinidade. Da mesma maneira, pela técnica de DRX foram reportados índices de cristalinidade acima de 80% para as estruturas obtidas com ácido cítrico e mistura de ácidos. Os diferentes métodos de extração permitem escolher qual rota utilizar de acordo com a propriedade desejada para a

aplicação, além disso, este estudo revelou a possibilidade de obtenção de nanocristais por rotas mais amigáveis, além de ser possível agregar valor a um resíduo agroindustrial.

## 9 CONCLUSÕES

Diante dos resultados apresentados, pode-se concluir que:

- Foram obtidas nanoestruturas de celulose usando coquetéis enzimáticos comerciais com diferentes formulações de enzimas. A faixa de nanocelulose obtida é reportada na variação de valores de nanocristais e nanofibrilas de celulose, variando de acordo com a proporção de enzimas hidrolíticas responsáveis por degradar as estruturas amorfas presente em cada coquetel. Em atuação conjunta com as celulasas foi possível concluir que dentre as enzimas auxiliares de grande importância para a formação de nanoestruturas por rota enzimática, a presença das xilanases foi fundamental para a liberação de estruturas mais uniformes em comprimento e diâmetro. Por fim, sugere-se que um coquetel com elevada proporção de enzimas como xilanases e endoglucanases pode promover a liberação de nanoestruturas em maior uniformidade. Como conclusão, pesquisas objetivando encontrar ou melhorar as formulações dos coquetéis enzimáticos, visando a produção de nanocelulose em elevados rendimentos ainda são necessárias.

- Posteriormente, como rota alternativa de obtenção de nanocristais, foi proposto um método usando o ácido cítrico em polpa de celulose. Os resultados revelaram que foi possível obter estruturas uniformes com métodos ácidos alternativos ao sulfúrico. As nanoestruturas obtidas por ácido cítrico apresentaram boa estabilidade coloidal e elevada estabilidade térmica. A variação do tempo de reação da hidrólise resultou na funcionalização da nanocelulose pela esterificação resultantes da interação das hidroxilas da celulose com o ácido cítrico, utilizando uma única etapa de extração e funcionalização. Os nanocristais obtidos resultaram em materiais com boa estabilidade coloidal em suspensão aquosa, favorecendo potenciais aplicações no processamento de polímeros. Esses resultados indicaram um método promissor de exploração da obtenção de nanocelulose usando um produto de biorrefinaria, oferecendo uma rota sustentável e ecológica para obter um nanomaterial de alto valor agregado.

- Por fim, os estudos prévios realizados na polpa de celulose foram aplicados para o bagaço de cana-de-açúcar. Neste trabalho, foi possível testar duas rotas de extração de nanocelulose, sendo a primeira exclusivamente por hidrólise enzimática, integrando em um único processo a liberação de açúcares e a obtenção de nanoestruturas de celulose. A rota enzimática apresentou nanocristais com estabilidade térmica próxima a temperatura inicial de degradação do material de extração de partida. A exposição de grupamentos hidroxila permitiu a obtenção de estruturas moderadamente estáveis. A segunda rota de obtenção de nanocristais de celulose foi pela extração com ácido sulfúrico, ácido cítrico e mistura desses ácidos. Estruturas com elevada estabilidade térmica foram obtidas para os nanocristais obtidos por ácido cítrico e pela mistura de ácidos, tendo sido reportadas temperatura inicial de degradação acima dos valores para a extração com ácido sulfúrico. Ainda para os nanocristais por ácido cítrico e mistura de ácidos. Os resultados dos nanocristais obtidos por extração com ácido cítrico e também com mistura dos ácidos cítrico e sulfúrico revelaram nanoceluloses com elevada estabilidade coloidal e índices de cristalinidade próximos aos obtidos por ácido sulfúrico. O pré-tratamento organossolve utilizado neste trabalho permitiu a recuperação da lignina residual do bagaço de cana, possibilitando sua utilização em outras rotas que a utilizem como matéria-prima. Como conclusão desta etapa, o conceito de biorrefinaria foi empregado na geração de diferentes produtos usando a biomassa da cana-de-açúcar. Foi possível estudar métodos mais verdes de obtenção de nanocelulose como prova de conceito, mas que apresentam potencial para ser empregados em alta escala. A integração de rotas na geração de diferentes produtos pode auxiliar na viabilização econômica de biorrefinarias, tornando-se alternativas para o futuro.

## 9.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Usar as nanocelulose obtidas pelas rotas verdes em diferentes aplicações, podendo ser sensores, material de reforço em compósitos dentre outras;
- Estudar métodos que gerem elevados rendimentos para métodos verdes de obtenção de nanocelulose, seja por associações de rotas ou com processos menos onerosos;
- Realizar análises tecno-econômicas e de ciclo de vida de diferentes processos de obtenção de nanocelulose, visando encontrar um balanço entre custo e sustentabilidade;
- Utilizar a lignina como matéria-prima para diferentes produtos, elevando o potencial de exploração da biomassa lignocelulósica;

## 10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Hamid, A.M., Solbiati, J.O., Cann, I.K.O. 2013. Insights into Lignin Degradation and its Potential Industrial Applications. *Advances in Applied Microbiology*, Vol 82, **82**, 1-28.
- Abitbol, T., Marway, H., Palermo, A., Kedzior, S., Yang, X., Franey, A., Gray, D., Moran-Mirabal, J., Cranston, E. 2018. Surface charge influence on the chemistry, colloidal stability, and self-assembly of cellulose nanocrystals. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, **255**.
- Abraham, E., Deepa, B., Pothan, L.A., Jacob, M., Thomas, S., Cvelbar, U., Anandjiwala, R. 2011. Extraction of nanocellulose fibrils from lignocellulosic fibres: A novel approach. *Carbohydrate Polymers*, **86**(4), 1468-1475.
- Ahvenainen, P., Kontro, I., Svedstrom, K. 2016. Comparison of sample crystallinity determination methods by X-ray diffraction for challenging cellulose I materials. *Cellulose*, **23**(2), 1073-1086.
- Alemdar, A., Sain, M. 2008. Isolation and characterization of nanofibers from agricultural residues - Wheat straw and soy hulls. *Bioresource Technology*, **99**(6), 1664-1671.
- Alvira, P., Tomas-Pejo, E., Ballesteros, M., Negro, M.J. 2010. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology*, **101**(13), 4851-4861.
- Anderson, S.R., Esposito, D., Gillette, W., Zhu, J.Y., Baxa, U., McNeil, S.E. 2014. Enzymatic preparation of nanocrystalline and microcrystalline cellulose. *Tappi Journal*, **13**(5), 35-42.
- Arantes, V., Saddler, J.N. 2010. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. *Biotechnology for Biofuels*, **3**.
- Batista, G., Souza, R.B.A., Pratto, B., dos Santos-Rocha, M.S.R., Cruz, A.J.G. 2019. Effect of severity factor on the hydrothermal pretreatment of sugarcane straw. *Bioresource Technology*, **275**, 321-327.
- Beck, S., Bouchard, J. 2014. Auto-catalyzed acidic desulfation of cellulose nanocrystals. *Nordic Pulp & Paper Research Journal*, **29**(1), 6-14.
- Beck-Candanedo, S., Roman, M., Gray, D.G. 2005. Effect of reaction conditions on the properties and behavior of wood cellulose nanocrystal suspensions. *Biomacromolecules*, **6**(2), 1048-1054.
- Beeson, W.T., Vu, V.V., Span, E.A., Phillips, C.M., Marletta, M.A. 2015. Cellulose Degradation by Polysaccharide Monooxygenases. *Annual Review of Biochemistry*, Vol 84, **84**, 923-946.
- Berlin, A., Maximenko, V., Gilkes, N., Saddler, J. 2007. Optimization of enzyme complexes for lignocellulose hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering*, **97**(2), 287-296.
- Berlioz, S., Molina-Boisseau, S., Nishiyama, Y., Heux, L. 2009. Gas-Phase Surface Esterification of Cellulose Microfibrils and Whiskers. *Biomacromolecules*, **10**(8), 2144-2151.
- Bhattacharjee, S. 2016. DLS and zeta potential - What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release*, **235**, 337-351.
- Bian, H.Y., Chen, L.H., Dai, H.Q., Zhu, J.Y. 2017. Effect of fiber drying on properties of lignin containing cellulose nanocrystals and nanofibrils produced through maleic acid hydrolysis. *Cellulose*, **24**(10), 4205-4216.

- Bondancia, T.J., Correa, L.J., Cruz, A.J.G., Badino, A.C., Mattoso, L.H.C., Marconcini, J.M., Farinas, C.S. 2018. Enzymatic production of cellulose nanofibers and sugars in a stirred-tank reactor: determination of impeller speed, power consumption, and rheological behavior. *Cellulose*, **25**(8), 4499-4511.
- Bondancia, T.J., Mattoso, L.H.C., Marconcini, J.M., Farinas, C.S. 2017. A New Approach to Obtain Cellulose Nanocrystals and Ethanol from Eucalyptus Cellulose Pulp via the Biochemical Pathway. *Biotechnology Progress*, **33**(4), 1085-1095.
- Bondeson, D., Mathew, A., Oksman, K. 2006. Optimization of the isolation of nanocrystals from microcrystalline cellulose by acid hydrolysis. *Cellulose*, **13**(2), 171-180.
- Braun, B., Dorgan, J.R. 2009. Single-Step Method for the Isolation and Surface Functionalization of Cellulosic Nanowhiskers. *Biomacromolecules*, **10**(2), 334-341.
- Camargo, L.A., Pereira, S.C., Correa, A.C., Farinas, C.S., Marconcini, J.M., Mattoso, L.H.C. 2016. Feasibility of Manufacturing Cellulose Nanocrystals from the Solid Residues of Second-Generation Ethanol Production from Sugarcane Bagasse. *Bioenergy Research*, **9**(3), 894-906.
- Campos, A., Correa, A.C., Cannella, D., Teixeira, E.d.M., Marconcini, J.M., Dufresne, A., Mattoso, L.H.C., Cassland, P., Sanadi, A.R. 2013. Obtaining nanofibers from curaua and sugarcane bagasse fibers using enzymatic hydrolysis followed by sonication. *Cellulose*, **20**(3), 1491-1500.
- Cetin, N.S., Tingaut, P., Ozmen, N., Henry, N., Harper, D., Dadmun, M., Sebe, G. 2009. Acetylation of Cellulose Nanowhiskers with Vinyl Acetate under Moderate Conditions. *Macromolecular Bioscience*, **9**(10), 997-1003.
- Chandel, A.K., Albarelli, J.Q., Santos, D.T., Chundawat, S.P.S., Puri, M., Meireles, M.A.A. 2019. Comparative analysis of key technologies for cellulosic ethanol production from Brazilian sugarcane bagasse at a commercial scale. *Biofuels Bioproducts & Biorefining-Biofpr*, **13**(4), 994-1014.
- Chen, L.H., Wang, Q.Q., Hirth, K., Baez, C., Agarwal, U.P., Zhu, J.Y. 2015. Tailoring the yield and characteristics of wood cellulose nanocrystals (CNC) using concentrated acid hydrolysis. *Cellulose*, **22**(3), 1753-1762.
- Chen, L.H., Zhu, J.Y., Baez, C., Kitin, P., Elder, T. 2016. Highly thermal-stable and functional cellulose nanocrystals and nanofibrils produced using fully recyclable organic acids. *Green Chemistry*, **18**(13), 3835-3843.
- Chen, Y., Nielsen, J. 2016. Biobased organic acids production by metabolically engineered microorganisms. *Current Opinion in Biotechnology*, **37**, 165-172.
- Cheng, B.G., Wang, X.H., Lin, Q.X., Zhang, X., Meng, L., Sun, R.C., Xin, F.X., Ren, J.L. 2018. New Understandings of the Relationship and Initial Formation Mechanism for Pseudo-lignin, Humins, and Acid-Induced Hydrothermal Carbon. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **66**(45), 11981-11989.
- Cherubini, F. 2010. The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energy Conversion and Management*, **51**(7), 1412-1421.
- Cherubini, F., Jungmeier, G., Wellisch, M., Willke, T., Skiadas, I., Van Ree, R., de Jong, E. 2009. Toward a common classification approach for biorefinery systems. *Biofuels Bioproducts & Biorefining-Biofpr*, **3**(5), 534-546.



- Chirayil, C.J., Joy, J., Mathew, L., Mozetic, M., Koetz, J., Thomas, S. 2014. Isolation and characterization of cellulose nanofibrils from *Helicteres isora* plant. *Industrial Crops and Products*, **59**, 27-34.
- Chylenski, P., Petrovic, D.M., Muller, G., Dahlstrom, M., Bengtsson, O., Lersch, M., Siika-aho, M., Horn, S.J., Eijsink, V.G.H. 2017. Enzymatic degradation of sulfite-pulped softwoods and the role of LPMOs. *Biotechnology for Biofuels*, **10**.
- CONAB, 2020. Acompanhamento da safra brasileira 2019/2020. Acompan. da Safra Bras. Grãos 2019/2020.
- Correa, A.C., Teixeira, E.d.M., Pessan, L.A., Capparelli Mattoso, L.H. 2010. Cellulose nanofibers from curaua fibers. *Cellulose*, **17**(6), 1183-1192.
- Cui, S., Zhang, S., Ge, S., Xiong, L., Sun, Q. 2016. Green preparation and characterization of size-controlled nanocrystalline cellulose via ultrasonic-assisted enzymatic hydrolysis. *Industrial Crops and Products*, **83**, 346-352.
- Davies, G., Henrissat, B. 1995. STRUCTURES AND MECHANISMS OF GLYCOSYL HYDROLASES. *Structure*, **3**(9), 853-859.
- de Aguiar, J., Bondancia, T.J., Claro, P.I.C., Mattoso, L.H.C., Farinas, C.S., Marconcini, J.M. 2020. Enzymatic Deconstruction of Sugarcane Bagasse and Straw to Obtain Cellulose Nanomaterials. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, **8**(5), 2287-2299.
- de Assis, C.A., Gonzalez, R., Kelley, S., Jameel, H., Bilek, T., Daystar, J., Handfield, R., Golden, J., Prestemon, J., Singh, D. 2017a. Risk management consideration in the bioeconomy. *Biofuels Bioproducts & Biorefining-Biofpr*, **11**(3), 549-566.
- de Assis, C.A., Greca, L.G., Ago, M., Balakshin, M.Y., Jameel, H., Gonzalez, R., Rojas, O.J. 2018a. Techno-Economic Assessment, Scalability, and Applications of Aerosol Lignin Micro- and Nanoparticles. *Acs Sustainable Chemistry & Engineering*, **6**(9), 11853-11868.
- de Assis, C.A., Houtman, C., Phillips, R., Bilek, E.M., Rojas, O.J., Pal, L., Peresin, M.S., Jameel, H., Gonzalez, R. 2017b. Conversion Economics of Forest Biomaterials: Risk and Financial Analysis of CNC Manufacturing. *Biofuels Bioproducts & Biorefining-Biofpr*, **11**(4), 682-700.
- de Assis, C.A., Iglesias, M.C., Bilodeau, M., Johnson, D., Phillips, R., Peresin, M.S., Bilek, E.M., Rojas, O.J., Venditti, R., Gonzalez, R. 2018b. Cellulose micro- and nanofibrils (CMNF) manufacturing - financial and risk assessment. *Biofuels Bioproducts & Biorefining-Biofpr*, **12**(2), 251-264.
- de Oliveira, F.B., Bras, J., Pimenta, M.T.B., Curvelo, A.A.D., Belgacem, M.N. 2016. Production of cellulose nanocrystals from sugarcane bagasse fibers and pith. *Industrial Crops and Products*, **93**, 48-57.
- de Paula, R.G., Antonieto, A.C.C., Ribeiro, L.F.C., Srivastava, N., O'Donovan, A., Mishra, P.K., Gupta, V.K., Silva, R.N. 2019. Engineered microbial host selection for value-added bioproducts from lignocellulose. *Biotechnology Advances*, **37**(6).
- Dong, S.P., Bortner, M.J., Roman, M. 2016. Analysis of the sulfuric acid hydrolysis of wood pulp for cellulose nanocrystal production: A central composite design study. *Industrial Crops and Products*, **93**, 76-87.
- Dong, X.M., Revol, J.F., Gray, D.G. 1998. Effect of microcrystallite preparation conditions on the formation of colloid crystals of cellulose. *Cellulose*, **5**(1), 19-32.

- Dufresne, A. 2018. Cellulose nanomaterials as green nanoreinforcements for polymer nanocomposites. *Philosophical Transactions of the Royal Society a-Mathematical Physical and Engineering Sciences*, **376**(2112).
- Dufresne, A. 2019. Nanocellulose Processing Properties and Potential Applications. *Current Forestry Reports*, **5**(2), 76-89.
- ElMekawy, A., Diels, L., De Wever, H., Pant, D. 2013. Valorization of Cereal Based Biorefinery Byproducts: Reality and Expectations. *Environmental Science & Technology*, **47**(16), 9014-9027.
- Espinosa, S.C., Kuhnt, T., Foster, E.J., Weder, C. 2013. Isolation of Thermally Stable Cellulose Nanocrystals by Phosphoric Acid Hydrolysis. *Biomacromolecules*, **14**(4), 1223-1230.
- Farinas, C.S., Marconcini, J.M., Mattoso, L.H.C. 2018. Enzymatic Conversion of Sugarcane Lignocellulosic Biomass as a Platform for the Production of Ethanol, Enzymes and Nanocellulose. *Journal of Renewable Materials*, **6**(2), 203-216.
- Feng, Y.H., Cheng, T.Y., Yang, W.G., Ma, P.T., He, H.Z., Yin, X.C., Yu, X.X. 2018. Characteristics and environmentally friendly extraction of cellulose nanofibrils from sugarcane bagasse. *Industrial Crops and Products*, **111**, 285-291.
- Ferreira, J.A., Taherzadeh, M.J. 2020. Improving the economy of lignocellulose-based biorefineries with organosolv pretreatment. *Bioresource Technology*, **299**.
- Filson, P.B., Dawson-Andoh, B.E., Schwegler-Berry, D. 2009. Enzymatic-mediated production of cellulose nanocrystals from recycled pulp. *Green Chemistry*, **11**(11), 1808-1814.
- Florencio, C., Badino, A.C., Farinas, C.S. 2019. Addition of Soybean Protein Improves Saccharification and Ethanol Production from Hydrothermally Pretreated Sugarcane Bagasse. *Bioenergy Research*, **12**(1), 81-93.
- Forsberg, Z., Mackenzie, A.K., Sorlie, M., Rohr, A.K., Helland, R., Arvai, A.S., Vaaje-Kolstad, G., Eijsink, V.G.H. 2014. Structural and functional characterization of a conserved pair of bacterial cellulose-oxidizing lytic polysaccharide monooxygenases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **111**(23), 8446-8451.
- Foster, E.J., Moon, R.J., Agarwal, U.P., Bortner, M.J., Bras, J., Camarero-Espinosa, S., Chan, K.J., Clift, M.J.D., Cranston, E.D., Eichhorn, S.J., Fox, D.M., Hamad, W.Y., Heux, L., Jean, B., Korey, M., Nieh, W., Ong, K.J., Reid, M.S., Renneckar, S., Roberts, R., Shatkin, J.A., Simonsen, J., Stinson-Bagby, K., Wanasekara, N., Youngblood, J. 2018. Current characterization methods for cellulose nanomaterials. *Chemical Society Reviews*, **47**(8), 2609-2679.
- French, A.D. 2014. Idealized powder diffraction patterns for cellulose polymorphs. *Cellulose*, **21**(2), 885-896.
- Gonzalez, I., Vilaseca, F., Alcalá, M., Pelach, M.A., Boufi, S., Mutje, P. 2013. Effect of the combination of biobeating and NFC on the physico-mechanical properties of paper. *Cellulose*, **20**(3), 1425-1435.
- Gupta, V.K., Kubicek, C.P., Berrin, J.G., Wilson, D.W., Couturier, M., Berlin, A., Filho, E.X.F., Ezeji, T. 2016. Fungal Enzymes for Bio-Products from Sustainable and Waste Biomass. *Trends in Biochemical Sciences*, **41**(7), 633-645.
- Hassan, M., Berglund, L., Hassan, E., Abou-Zeid, R., Oksman, K. 2018. Effect of xylanase pretreatment of rice straw unbleached soda and neutral sulfite pulps on isolation of nanofibers and their properties. *Cellulose*, **25**(5), 2939-2953.

- He, X.Y., Luzi, F., Yang, W.J., Xiao, Z.F., Torre, L., Xie, Y.J., Puglia, D. 2018. Citric Acid as Green Modifier for Tuned Hydrophilicity of Surface Modified Cellulose and Lignin Nanoparticles. *Acs Sustainable Chemistry & Engineering*, **6**(8), 9966-9978.
- Henriksson, M., Henriksson, G., Berglund, L.A., Lindstrom, T. 2007. An environmentally friendly method for enzyme-assisted preparation of microfibrillated cellulose (MFC) nanofibers. *European Polymer Journal*, **43**(8), 3434-3441.
- Hirota, M., Tamura, N., Saito, T., Isogai, A. 2010. Water dispersion of cellulose II nanocrystals prepared by TEMPO-mediated oxidation of mercerized cellulose at pH 4.8. *Cellulose*, **17**(2), 279-288.
- Horn, S.J., Vaaje-Kolstad, G., Westereng, B., Eijsink, V.G.H. 2012. Novel enzymes for the degradation of cellulose. *Biotechnology for Biofuels*, **5**.
- Hsieh, C.-w.C., Cannella, D., Jorgensen, H., Felby, C., Thygesen, L.G. 2014. Cellulase Inhibition by High Concentrations of Monosaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **62**(17), 3800-3805.
- Hu, F., Jung, S., Ragauskas, A. 2012. Pseudo-lignin formation and its impact on enzymatic hydrolysis. *Bioresource Technology*, **117**, 7-12.
- Hu, J., Arantes, V., Saddler, J.N. 2011. The enhancement of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates by the addition of accessory enzymes such as xylanase: is it an additive or synergistic effect? *Biotechnology for Biofuels*, **4**(36).
- Hu, J.G., Arantes, V., Pribowo, A., Gourlay, K., Saddler, J.N. 2014. Substrate factors that influence the synergistic interaction of AA9 and cellulases during the enzymatic hydrolysis of biomass. *Energy & Environmental Science*, **7**(7), 2308-2315.
- Hu, J.G., Tian, D., Renneckar, S., Saddler, J.N. 2018. Enzyme mediated nanofibrillation of cellulose by the synergistic actions of an endoglucanase, lytic polysaccharide monooxygenase (LPMO) and xylanase. *Scientific Reports*, **8**.
- Huang, C., Zhao, C., Li, H.L., Xiong, L., Chen, X.F., Luo, M.T., Chen, X.D. 2018. Comparison of different pretreatments on the synergistic effect of cellulase and xylanase during the enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse. *Rsc Advances*, **8**(54), 30725-30731.
- Huang, X.Y., De Hoop, C.F., Li, F., Xie, J.L., Hse, C.Y., Qi, J.Q., Jiang, Y.Z., Chen, Y.Z. 2017. Dilute Alkali and Hydrogen Peroxide Treatment of Microwave Liquefied Rape Straw Residue for the Extraction of Cellulose Nanocrystals. *Journal of Nanomaterials*.
- Isikgor, F.H., Becer, C.R. 2015. Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. *Polymer Chemistry*, **6**(25), 4497-4559.
- Isogai, A., Saito, T., Fukuzumi, H. 2011. TEMPO-oxidized cellulose nanofibers. *Nanoscale*, **3**(1), 71-85.
- Janardhnan, S., Sain, M.M. 2006. ISOLATION OF CELLULOSE MICROFIBRILS - AN ENZYMATIC APPROACH. *Bioresources*, **1**(2), 176-188.
- Ji, H., Xiang, Z.Y., Qi, H.S., Han, T.T., Pranovich, A., Song, T. 2019. Strategy towards one-step preparation of carboxylic cellulose nanocrystals and nanofibrils with high yield, carboxylation and highly stable dispersibility using innocuous citric acid. *Green Chemistry*, **21**(8), 1956-1964.

- Jonsson, L.J., Martin, C. 2016. Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. *Bioresource Technology*, **199**, 103-112.
- Jung, Y.H., Chang, T.H., Zhang, H.L., Yao, C.H., Zheng, Q.F., Yang, V.W., Mi, H.Y., Kim, M., Cho, S.J., Park, D.W., Jiang, H., Lee, J., Qiu, Y.J., Zhou, W.D., Cai, Z.Y., Gong, S.Q., Ma, Z.Q. 2015. High-performance green flexible electronics based on biodegradable cellulose nanofibril paper. *Nature Communications*, **6**.
- Kabel, M.A., Carvalheiro, F., Garrote, G., Avgerinos, E., Koukios, E., Parajo, J.C., Girio, F.M., Schols, H.A., Voragen, A.G.J. 2002. Hydrothermally treated xylan rich by-products yield different classes of xylo-oligosaccharides. *Carbohydrate Polymers*, **50**(1), 47-56.
- Keeper, H. 2019. Nanocellulose Market 2019 by regional trend, revenue e growth forecast.
- Kim, Y., Kreke, T., Mosier, N.S., Ladisch, M.R. 2014. Severity Factor Coefficients for Subcritical Liquid Hot Water Pretreatment of Hardwood Chips. *Biotechnology and Bioengineering*, **111**(2), 254-263.
- Kim, Y., Mosier, N.S., Ladisch, M.R. 2009. Enzymatic Digestion of Liquid Hot Water Pretreated Hybrid Poplar. *Biotechnology Progress*, **25**(2), 340-348.
- Klemm, D., Cranston, E.D., Fischer, D., Gama, M., Kedzior, S.A., Kralisch, D., Kramer, F., Kondo, T., Lindstrom, T., Nietzsche, S., Petzold-Welcke, K., Rauchfuss, F. 2018. Nanocellulose as a natural source for groundbreaking applications in materials science: Today's state. *Materials Today*, **21**(7), 720-748.
- Klemm, D., Kramer, F., Moritz, S., Lindstrom, T., Ankerfors, M., Gray, D., Dorris, A. 2011. Nanocelluloses: A New Family of Nature-Based Materials. *Angewandte Chemie-International Edition*, **50**(24), 5438-5466.
- Ko, J.K., Kim, Y., Ximenes, E., Ladisch, M.R. 2015. Effect of Liquid Hot Water Pretreatment Severity on Properties of Hardwood Lignin and Enzymatic Hydrolysis of Cellulose. *Biotechnology and Bioengineering*, **112**(2), 252-262.
- Kontturi, E., Laaksonen, P., Linder, M.B., Nonappa, Groschel, A.H., Rojas, O.J., Ikkala, O. 2018. Advanced Materials through Assembly of Nanocelluloses. *Advanced Materials*, **30**(24).
- Koskela, S., Wang, S.N., Xu, D.F., Yang, X., Li, K., Berglund, L.A., McKee, L.S., Bulone, V., Zhou, Q. 2019. Lytic polysaccharide monoxygenase (LPMO) mediated production of ultra-fine cellulose nanofibres from delignified softwood fibres. *Green Chemistry*, **21**(21), 5924-5933.
- Kristensen, J.B., Felby, C., Jorgensen, H. 2009. Yield-determining factors in high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Biotechnology for Biofuels*, **2**.
- Kumar, P., Barrett, D.M., Delwiche, M.J., Stroeve, P. 2009. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, **48**(8), 3713-3729.
- Kumar, R., Hu, F., Sannigrahi, P., Jung, S., Ragauskas, A.J., Wyman, C.E. 2013. Carbohydrate derived-pseudo-lignin can retard cellulose biological conversion. *Biotechnology and Bioengineering*, **110**(3), 737-753.
- Kumar, R., Wyman, C.E. 2009. Effects of Cellulase and Xylanase Enzymes on the Deconstruction of Solids from Pretreatment of Poplar by Leading Technologies. *Biotechnology Progress*, **25**(2), 302-314.

- Ladisich, M.R., Lin, K.W., Voloch, M., Tsao, G.T. 1983. Process considerations in the enzymatic-hydrolysis of biomass. *Enzyme and Microbial Technology*, **5**(2), 82-102.
- Larsson, P.T., Wickholm, K., Iversen, T. 1997. A CP/MAS C-13 NMR investigation of molecular ordering in celluloses. *Carbohydrate Research*, **302**(1-2), 19-25.
- Leal, M., Galdos, M.V., Scarpore, F.V., Seabra, J.E.A., Walter, A., Oliveira, C.O.F. 2013. Sugarcane straw availability, quality, recovery and energy use: A literature review. *Biomass & Bioenergy*, **53**, 11-19.
- Leao, R.M., Mileo, P.C., Maia, J., Luz, S.M. 2017. Environmental and technical feasibility of cellulose nanocrystal manufacturing from sugarcane bagasse. *Carbohydrate Polymers*, **175**, 518-529.
- Lee, Y.J., Chung, C.H., Day, D.F. 2009. Sugarcane bagasse oxidation using a combination of hypochlorite and peroxide. *Bioresource Technology*, **100**(2), 935-941.
- Leung, A.C.W., Hrapovic, S., Lam, E., Liu, Y.L., Male, K.B., Mahmoud, K.A., Luong, J.H.T. 2011. Characteristics and Properties of Carboxylated Cellulose Nanocrystals Prepared from a Novel One-Step Procedure. *Small*, **7**(3), 302-305.
- Li, D., Henschen, J., Ek, M. 2017. Esterification and hydrolysis of cellulose using oxalic acid dihydrate in a solvent-free reaction suitable for preparation of surface-functionalised cellulose nanocrystals with high yield. *Green Chemistry*, **19**(23), 5564-5567.
- Li, J., Li, S., Han, B., Yu, M., Li, G., Jiang, Y. 2013. A novel cost-effective technology to convert sucrose and homocelluloses in sweet sorghum stalks into ethanol. *Biotechnology for Biofuels*, **6**.
- Lin, N., Dufresne, A. 2014. Surface chemistry, morphological analysis and properties of cellulose nanocrystals with gradiented sulfation degrees. *Nanoscale*, **6**(10), 5384-5393.
- Liu, X.Y., Jiang, Y., Qin, C.R., Yang, S., Song, X.P., Wang, S.F., Li, K.C. 2018. Enzyme-assisted mechanical grinding for cellulose nanofibers from bagasse: energy consumption and nanofiber characteristics. *Cellulose*, **25**(12), 7065-7078.
- Liu, Y.Y., Xu, J.L., Zhang, Y., He, M.C., Liang, C.Y., Yuan, Z.H., Xie, J. 2016. Improved Ethanol Production Based on High Solids Fed-Batch Simultaneous Saccharification and Fermentation with Alkali-Pretreated Sugarcane Bagasse. *Bioresources*, **11**(1), 2548-2556.
- Long, L.F., Tian, D., Hu, J.G., Wang, F., Saddler, J. 2017. A xylanase-aided enzymatic pretreatment facilitates cellulose nanofibrillation. *Bioresource Technology*, **243**, 898-904.
- Longati, A.A., Lino, A.R.A., Giordano, R.C., Furlan, F.F., Cruz, A.J.G. 2018. Defining research & development process targets through retro-technoeconomic analysis: The sugarcane biorefinery case. *Bioresource Technology*, **263**, 1-9.
- Lopez-Linares, J.C., Romero, I., Cara, C., Ruiz, E., Moya, M., Castro, E. 2014. Bioethanol production from rapeseed straw at high solids loading with different process configurations. *Fuel*, **122**, 112-118.
- Lorenz, M., Sattler, S., Reza, M., Bismarck, A., Kontturi, E. 2017. Cellulose nanocrystals by acid vapour: towards more effortless isolation of cellulose nanocrystals. *Faraday Discussions*, **202**, 315-330.

- Lu, P., Hsieh, Y.L. 2010. Preparation and properties of cellulose nanocrystals: Rods, spheres, and network. *Carbohydrate Polymers*, **82**(2), 329-336.
- Lu, Q.L., Tang, L.R., Lin, F.C., Wang, S.Q., Chen, Y.D., Chen, X.R., Huang, B. 2014. Preparation and characterization of cellulose nanocrystals via ultrasonication-assisted FeCl<sub>3</sub>-catalyzed hydrolysis. *Cellulose*, **21**(5), 3497-3506.
- Lynd, L.R., Weimer, P.J., van Zyl, W.H., Pretorius, I.S. 2002. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **66**(3).
- Macrelli, S., Galbe, M., Wallberg, O. 2014. Effects of production and market factors on ethanol profitability for an integrated first and second generation ethanol plant using the whole sugarcane as feedstock. *Biotechnology for Biofuels*, **7**.
- Malaspina, D.C., Faraudo, J. 2019. Molecular insight into the wetting behavior and amphiphilic character of cellulose nanocrystals. *Advances in Colloid and Interface Science*, **267**, 15-25.
- Man, Z., Muhammad, N., Sarwono, A., Bustam, M.A., Kumar, M.V., Rafiq, S. 2011. Preparation of Cellulose Nanocrystals Using an Ionic Liquid. *Journal of Polymers and the Environment*, **19**(3), 726-731.
- Markstedt, K., Mantas, A., Tournier, I., Avila, H.M., Hagg, D., Gatenholm, P. 2015. 3D Bioprinting Human Chondrocytes with Nanocellulose-Alginate Bioink for Cartilage Tissue Engineering Applications. *Biomacromolecules*, **16**(5), 1489-1496.
- Martelli-Tosi, M., Masson, M.M., Silva, N.C., Esposto, B.S., Barros, T.T., Assis, O.B.G., Tapia-Blacido, D.R. 2018. Soybean straw nanocellulose produced by enzymatic or acid treatment as a reinforcing filler in soy protein isolate films. *Carbohydrate Polymers*, **198**, 61-68.
- Martins, M.A., Teixeira, E.M., Correa, A.C., Ferreira, M., Mattoso, L.H.C. 2011. Extraction and characterization of cellulose whiskers from commercial cotton fibers. *Journal of Materials Science*, **46**(24), 7858-7864.
- Mathew, A.P., Oksman, K., Karim, Z., Liu, P., Khan, S.A., Naseri, N. 2014. Process scale up and characterization of wood cellulose nanocrystals hydrolysed using bioethanol pilot plant. *Industrial Crops and Products*, **58**, 212-219.
- Mautner, A., Lee, K.Y., Tammel, T., Mathew, A.P., Nedoma, A.J., Li, K., Bismarck, A. 2015. Cellulose nanopapers as tight aqueous ultra-filtration membranes. *Reactive & Functional Polymers*, **86**, 209-214.
- McDonough, T.J. 1993. THE CHEMISTRY OF ORGANOSOLV DELIGNIFICATION. *Tappi Journal*, **76**(8), 186-193.
- Menon, V., Rao, M. 2012. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. *Progress in Energy and Combustion Science*, **38**(4), 522-550.
- Milessi, T.S., Aquino, P.M., Silva, C.R., Moraes, G.S., Zangirolami, T.C., Giordano, R.C., Giordano, R.L.C. 2018. Influence of key variables on the simultaneous isomerization and fermentation (SIF) of xylose by a native *Saccharomyces cerevisiae* strain co-encapsulated with xylose isomerase for 2G ethanol production. *Biomass & Bioenergy*, **119**, 277-283.
- Mohammed, N., Baidya, A., Murugesan, V., Kumar, A.A., Ganayee, M.A., Mohanty, J.S., Tam, K.C., Pradeep, T. 2016. Diffusion-Controlled Simultaneous Sensing and Scavenging of Heavy Metal Ions in Water Using Atomically Precise Cluster-Cellulose Nanocrystal Composites. *Acs Sustainable Chemistry & Engineering*, **4**(11), 6167-6176.

- Mohammed, N., Grishkewich, N., Berry, R., Tam, K. 2015. Cellulose nanocrystal-alginate hydrogel beads as novel adsorbents for organic dyes in aqueous solutions. *Cellulose*, **22**(6), 3725-3738.
- Moreau, C., Tapin-Lingua, S., Grisel, S., Gimbert, I., Le Gall, S., Meyer, V., Petit-Conil, M., Berrin, J.G., Cathala, B., Villares, A. 2019. Lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs) facilitate cellulose nanofibrils production. *Biotechnology for Biofuels*, **12**.
- Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y.Y., Holtzapple, M., Ladisch, M. 2005. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, **96**(6), 673-686.
- Nie, S.X., Zhang, K., Lin, X.J., Zhang, C.Y., Yan, D.P., Liang, H.M., Wang, S.F. 2018. Enzymatic pretreatment for the improvement of dispersion and film properties of cellulose nanofibrils. *Carbohydrate Polymers*, **181**, 1136-1142.
- Nieder-Heitmman, M., Haigh, K.F., Gorgens, J.F. 2018. Process design and economic analysis of a biorefinery co-producing itaconic acid and electricity from sugarcane bagasse and trash lignocelluloses. *Bioresource Technology*, **262**, 159-168.
- Nitsos, C.K., Choli-Papadopoulou, T., Matis, K.A., Triantafyllidis, K.S. 2016. Optimization of Hydrothermal Pretreatment of Hardwood and Softwood Lignocellulosic Residues for Selective Hemicellulose Recovery and Improved Cellulose Enzymatic Hydrolysis. *Acs Sustainable Chemistry & Engineering*, **4**(9), 4529-4544.
- Nizami, A.S., Rehan, M., Waqas, M., Naqvi, M., Ouda, O.K.M., Shahzad, K., Miandad, R., Khan, M.Z., Syamsiro, M., Ismail, I.M.I., Pant, D. 2017. Waste biorefineries: Enabling circular economies in developing countries. *Bioresource Technology*, **241**, 1101-1117.
- Novo, L.P., Bras, J., Garcia, A., Belgacem, N., Curvelo, A.A.D. 2016. A study of the production of cellulose nanocrystals through subcritical water hydrolysis. *Industrial Crops and Products*, **93**, 88-95.
- Novo, L.P., Bras, J., Garcia, A., Belgacem, N., Curvelo, A.A.S. 2015. Subcritical Water: A Method for Green Production of Cellulose Nanocrystals. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, **3**(11), 2839-2846.
- Nuopponen, M., Meriluoto, A., Kontturi, E. 2012. PROCESS FOR PREPARING MICRO- AND NANOCRYSTALLINE CELLULOSE.
- Oh, S.Y., Yoo, D.I., Shin, Y., Kim, H.C., Kim, H.Y., Chung, Y.S., Park, W.H., Youk, J.H. 2005. Crystalline structure analysis of cellulose treated with sodium hydroxide and carbon dioxide by means of X-ray diffraction and FTIR spectroscopy. *Carbohydrate Research*, **340**(15), 2376-2391.
- Oksman, K., Etang, J.A., Mathew, A.P., Jonoobi, M. 2011. Cellulose nanowhiskers separated from a bio-residue from wood bioethanol production. *Biomass & Bioenergy*, **35**(1), 146-152.
- Oliveira, A.F., Matos, V.D., Bastos, R.G. 2012. CULTIVATION OF *Aspergillus niger* ON SUGARCANE BAGASSE WITH VINASSE. *Bioscience Journal*, **28**(6), 889-894.
- Otoni, C.G., Carvalho, A.S., Cardoso, M.V.C., Bemardinelli, O.D., Lorevice, M.V., Colnago, L.A., Loh, W., Mattoso, L.H.C. 2018a. High-Pressure Microfluidization as a Green Tool for Optimizing the Mechanical Performance of All-Cellulose Composites. *Acs Sustainable Chemistry & Engineering*, **6**(10), 12727-12735.

- Otoni, C.G., Lorevice, M.V., de Moura, M.R., Mattoso, L.H.C. 2018b. On the effects of hydroxyl substitution degree and molecular weight on mechanical and water barrier properties of hydroxypropyl methylcellulose films. *Carbohydrate Polymers*, **185**, 105-111.
- Overend, R.P., Chornet, E. 1987. FRACTIONATION OF LIGNOCELLULOSICS BY STEAM-AQUEOUS PRETREATMENTS. *Philosophical Transactions of the Royal Society a-Mathematical Physical and Engineering Sciences*, **321**(1561), 523-536.
- Paakko, M., Ankerfors, M., Kosonen, H., Nykanen, A., Ahola, S., Osterberg, M., Ruokolainen, J., Laine, J., Larsson, P.T., Ikkala, O., Lindstrom, T. 2007. Enzymatic hydrolysis combined with mechanical shearing and high-pressure homogenization for nanoscale cellulose fibrils and strong gels. *Biomacromolecules*, **8**(6), 1934-1941.
- Park, S., Baker, J.O., Himmel, M.E., Parilla, P.A., Johnson, D.K. 2010. Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance. *Biotechnology for Biofuels*, **3**.
- Park, S., Johnson, D.K., Ishizawa, C.I., Parilla, P.A., Davis, M.F. 2009. Measuring the crystallinity index of cellulose by solid state C-13 nuclear magnetic resonance. *Cellulose*, **16**(4), 641-647.
- Peng, L.L., Xie, N.Z., Guo, L., Wang, L.M., Yu, B., Ma, Y.H. 2014. Efficient Open Fermentative Production of Polymer-Grade L-Lactate from Sugarcane Bagasse Hydrolysate by Thermotolerant Bacillus sp Strain P38. *Plos One*, **9**(9).
- Penttila, P.A., Varnai, A., Pere, J., Tammelin, T., Salmen, L., Siika-aho, M., Viikari, L., Serimaa, R. 2013. Xylan as limiting factor in enzymatic hydrolysis of nanocellulose. *Bioresource Technology*, **129**, 135-141.
- Pimienta, J.A.P., Papa, G., Rodriguez, A., Barcelos, C.A., Liang, L., Stavila, V., Sanchez, A., Gladden, J.M., Simmons, B.A. 2019. Pilot- scale hydrothermal pretreatment and optimized saccharification enables bisabolene production from multiple feedstocks. *Green Chemistry*, **21**(11), 3152-3164.
- Rahikainen, J., Ceccherini, S., Molinier, M., Holopainen-Mantila, U., Reza, M., Vaisanen, S., Puranen, T., Kruus, K., Vuorinen, T., Maloney, T., Suurnakki, A., Gronqvist, S. 2019. Effect of cellulase family and structure on modification of wood fibres at high consistency. *Cellulose*, **26**(8), 5085-5103.
- Rajinipriya, M., Nagalakshmaiah, M., Robert, M., Elkoun, S. 2018. Importance of Agricultural and Industrial Waste in the Field of Nanocellulose and Recent Industrial Developments of Wood Based Nanocellulose: A Review. *Acs Sustainable Chemistry & Engineering*, **6**(3), 2807-2828.
- Raveendran, S., Gnansounou, E., Binod, P., Pandey, A. Bioconversion of sugarcane crop residue for value added products - An overview, Vol. 98, Pergamon-Elsevier Science Ltd, pp. 203-215-203-215.
- Reid, M.S., Villalobos, M., Cranston, E.D. 2017. Benchmarking Cellulose Nanocrystals: From the Laboratory to Industrial Production. *Langmuir*, **33**(7), 1583-1598.
- Rezende, C.A., de Lima, M.A., Maziero, P., deAzevedo, E.R., Garcia, W., Polikarpov, I. 2011. Chemical and morphological characterization of sugarcane bagasse submitted to a delignification process for enhanced enzymatic digestibility. *Biotechnology for Biofuels*, **4**, 1-18.



- Ribeiro, R.S.A., Bojorge, N., Pereira, N. Statistical analysis of the crystallinity index of nanocellulose produced from Kraft pulp via controlled enzymatic hydrolysis. *Biotechnology and Applied Biochemistry*.
- Ribeiro, R.S.A., Pohlman, B.C., Calado, V., Bojorge, N., Pereira, N. 2019. Production of nanocellulose by enzymatic hydrolysis: Trends and challenges. *Engineering in Life Sciences*, **19**(4), 279-291.
- Rocha, M., Pratto, B., de Sousa, R., Almeida, R., da Cruz, A.J.G. 2017. A kinetic model for hydrothermal pretreatment of sugarcane straw. *Bioresource Technology*, **228**, 176-185.
- Roman, M., Winter, W.T. 2004. Effect of sulfate groups from sulfuric acid hydrolysis on the thermal degradation behavior of bacterial cellulose. *Biomacromolecules*, **5**(5), 1671-1677.
- Rosa, S.M.L., Rehman, N., de Miranda, M.I.G., Nachtigall, S.M.B., Bica, C.I.D. 2012. Chlorine-free extraction of cellulose from rice husk and whisker isolation. *Carbohydrate Polymers*, **87**(2), 1131-1138.
- Rovera, C., Ghaani, M., Santo, N., Trabattoni, S., Olsson, R.T., Romano, D., Farris, S. 2018. Enzymatic Hydrolysis in the Green Production of Bacterial Cellulose Nanocrystals. *Acs Sustainable Chemistry & Engineering*, **6**(6), 7725-7734.
- Roy, D., Semsarilar, M., Guthrie, J.T., Perrier, S. 2009. Cellulose modification by polymer grafting: a review. *Chemical Society Reviews*, **38**(7), 2046-2064.
- Saelee, K., Yingkamhaeng, N., Nimchua, T., Sukyai, P. 2016. An environmentally friendly xylanase-assisted pretreatment for cellulose nanofibrils isolation from sugarcane bagasse by high-pressure homogenization. *Industrial Crops and Products*, **82**, 149-160.
- Saini, J.K., Gupta, R., Hemansi, Verma, A., Gaur, P., Saini, R., Shukla, R., Kuhad, R.C. 2019. Integrated Lignocellulosic Biorefinery for Sustainable Bio-Based Economy. in: *Sustainable Approaches for Biofuels Production Technologies: From Current Status to Practical Implementation*, (Eds.) N. Srivastava, M. Srivastava, P.K. Mishra, S.N. Upadhyay, P.W. Ramteke, V.K. Gupta, Springer International Publishing. Cham, pp. 25-46.
- Saito, T., Kimura, S., Nishiyama, Y., Isogai, A. 2007. Cellulose nanofibers prepared by TEMPO-mediated oxidation of native cellulose. *Biomacromolecules*, **8**(8), 2485-2491.
- Sannigrahi, P., Kim, D.H., Jung, S., Ragauskas, A. 2011. Pseudo-lignin and pretreatment chemistry. *Energy & Environmental Science*, **4**(4), 1306-1310.
- Santo, M.E., Rezende, C.A., Bernardinelli, O.D., Pereira, N., Curvelo, A.A.S., Deazevedo, E.R., Guimaraes, F.E.G., Polikarpov, I. 2018. Structural and compositional changes in sugarcane bagasse subjected to hydrothermal and organosolv pretreatments and their impacts on enzymatic hydrolysis. *Industrial Crops and Products*, **113**, 64-74.
- Santos, F., Rabelo, S., De Matos, M., Eichler, P. 2019. *Sugarcane Biorefinery, Technology and Perspectives*. Elsevier Science & Technology.
- Santucci, B.S., Bras, J., Belgacem, M.N., Curvelo, A.A.D., Pimenta, M.T.B. 2016. Evaluation of the effects of chemical composition and refining treatments on the properties of nanofibrillated cellulose films from sugarcane bagasse. *Industrial Crops and Products*, **91**, 238-248.
- Scheller, H.V., Ulvskov, P. 2010. Hemicelluloses. *Annual Review of Plant Biology*, **61**(1), 263-289.

- Siqueira, G.A., Dias, I.K.R., Arantes, V. 2019. Exploring the action of endoglucanases on bleached eucalyptus kraft pulp as potential catalyst for isolation of cellulose nanocrystals. *International Journal of Biological Macromolecules*, **133**, 1249-1259.
- Siro, I., Plackett, D., Hedenqvist, M., Ankerfors, M., Lindstrom, T. 2011. Highly Transparent Films from Carboxymethylated Microfibrillated Cellulose: The Effect of Multiple Homogenization Steps on Key Properties. *Journal of Applied Polymer Science*, **119**(5), 2652-2660.
- Somerville, C., Bauer, S., Brininstool, G., Facette, M., Hamann, T., Milne, J., Osborne, E., Paredes, A., Persson, S., Raab, T., Vorwerk, S., Youngs, H. 2004. Toward a systems approach to understanding plant-cell walls. *Science*, **306**(5705), 2206-2211.
- Song, Q., Winter, W.T., Bujanovic, B.M., Amidon, T.E. 2014. Nanofibrillated Cellulose (NFC): A High-Value Co-Product that Improves the Economics of Cellulosic Ethanol Production. *Energies*, **7**(2), 607-618.
- Spinella, S., Maiorana, A., Qian, Q., Dawson, N.J., Hepworth, V., McCallum, S.A., Ganesh, M., Singer, K.D., Gross, R.A. 2016. Concurrent Cellulose Hydrolysis and Esterification to Prepare a Surface-Modified Cellulose Nanocrystal Decorated with Carboxylic Acid Moieties. *Acs Sustainable Chemistry & Engineering*, **4**(3), 1538-1550.
- Sun, F.F., Hong, J., Hu, J., Saddler, J.N., Fang, X., Zhang, Z., Shen, S. 2015. Accessory enzymes influence cellulase hydrolysis of the model substrate and the realistic lignocellulosic biomass. *Enzyme and Microbial Technology*, **79-80**, 42-48.
- Sun, J.X., Sun, X.F., Sun, R.C., Su, Y.Q. 2004. Fractional extraction and structural characterization of sugarcane bagasse hemicelluloses. *Carbohydrate Polymers*, **56**(2), 195-204.
- Sun, X.F., Xu, F., Sun, R.C., Fowler, P., Baird, M.S. 2005a. Characteristics of degraded cellulose obtained from steam-exploded wheat straw. *Carbohydrate Research*, **340**(1), 97-106.
- Sun, X.F., Xu, F., Sun, R.C., Geng, Z.C., Fowler, P., Baird, M.S. 2005b. Characteristics of degraded hemicellulosic polymers obtained from steam exploded wheat straw. *Carbohydrate Polymers*, **60**(1), 15-26.
- Tarchoun, A.F., Trache, D., Klapotke, T.M., Derradji, M., Bessa, W. 2019. Ecofriendly isolation and characterization of microcrystalline cellulose from giant reed using various acidic media. *Cellulose*, **26**(13-14), 7635-7651.
- Teeri, T.T. 1997. Crystalline cellulose degradation: New insight into the function of cellobiohydrolases. *Trends in Biotechnology*, **15**(5), 160-167.
- Teixeira, E.D., Bondancia, T.J., Teodoro, K.B.R., Correa, A.C., Marconcini, J.M., Mattoso, L.H.C. 2011a. Sugarcane bagasse whiskers: Extraction and characterizations. *Industrial Crops and Products*, **33**(1), 63-66.
- Teixeira, E.d.M., Bondancia, T.J., Ricardo Teodoro, K.B., Correa, A.C., Marconcini, J.M., Caparelli Mattoso, L.H. 2011b. Sugarcane bagasse whiskers: Extraction and characterizations. *Industrial Crops and Products*, **33**(1), 63-66.
- Teixeira, R.S.S., da Silva, A.S.A., Jang, J.-H., Kim, H.-W., Ishikawa, K., Endo, T., Lee, S.-H., Bon, E.P.S. 2015. Combining biomass wet disk milling and endoglucanase/beta-glucosidase hydrolysis for the production of cellulose nanocrystals. *Carbohydrate Polymers*, **128**, 75-81.

- Tibolla, H., Pelissari, F.M., Rodrigues, M.I., Menegalli, F.C. 2017. Cellulose nanofibers produced from banana peel by enzymatic treatment: Study of process conditions. *Industrial Crops and Products*, **95**, 664-674.
- Tonoli, G.H.D., Teixeira, E.M., Correa, A.C., Marconcini, J.M., Caixeta, L.A., Pereira-da-Silva, M.A., Mattoso, L.H.C. 2012. Cellulose micro/nanofibres from Eucalyptus kraft pulp: Preparation and properties. *Carbohydrate Polymers*, **89**(1), 80-88.
- Vanderfleet, O.M., Osorio, D.A., Cranston, E.D. 2018. Optimization of cellulose nanocrystal length and surface charge density through phosphoric acid hydrolysis. *Philosophical Transactions of the Royal Society a-Mathematical Physical and Engineering Sciences*, **376**(2112).
- Vanderfleet, O.M., Reid, M.S., Bras, J., Heux, L., Godoy-Vargas, J., Panga, M.K.R., Cranston, E.D. 2019. Insight into thermal stability of cellulose nanocrystals from new hydrolysis methods with acid blends. *Cellulose*, **26**(1), 507-528.
- Vazquez-Olivo, G., Gutierrez-Grijalva, E.P., Heredia, J.B. 2019. Prebiotic compounds from agro-industrial by-products. *Journal of Food Biochemistry*, **43**(6).
- Volkel, L., Ahn, K., Hahner, U., Gindl-Altmutter, W., Potthast, A. 2017. Nano meets the sheet: adhesive-free application of nanocellulosic suspensions in paper conservation. *Heritage Science*, **5**.
- Wang, R.B., Chen, L.H., Zhu, J.Y., Yang, R.D. 2017. Tailored and Integrated Production of Carboxylated Cellulose Nanocrystals (CNC) with Nanofibrils (CNF) through Maleic Acid Hydrolysis. *Chemnanomat*, **3**(5), 328-335.
- Wang, W., Mozuch, M.D., Sabo, R.C., Kersten, P., Zhu, J.Y., Jin, Y. 2015. Production of cellulose nanofibrils from bleached eucalyptus fibers by hyperthermostable endoglucanase treatment and subsequent microfluidization. *Cellulose*, **22**(1), 351-361.
- Wei, D., Liu, X.G., Yang, S.T. 2013. Butyric acid production from sugarcane bagasse hydrolysate by *Clostridium tyrobutyricum* immobilized in a fibrous-bed bioreactor. *Bioresource Technology*, **129**, 553-560.
- Weiss, N.D., Felby, C., Thygesen, L.G. 2019. Enzymatic hydrolysis is limited by biomass-water interactions at high-solids: improved performance through substrate modifications. *Biotechnology for Biofuels*, **12**, 13.
- Wen, Y.B., Yuan, Z.Y., Qu, J.L., Wang, C.P., Wang, A. 2020. Evaluation of Ultraviolet Light and Hydrogen Peroxide Enhanced Ozone Oxidation Treatment for the Production of Cellulose Nanofibrils. *Acs Sustainable Chemistry & Engineering*, **8**(7), 2688-2697.
- Xi, Y.L., Dai, W.Y., Xu, R., Zhang, J.H., Chen, K.Q., Jiang, M., Wei, P., Ouyang, P.K. 2013. Ultrasonic pretreatment and acid hydrolysis of sugarcane bagasse for succinic acid production using *Actinobacillus succinogenes*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, **36**(11), 1779-1785.
- Xiang, Z.Y., Gao, W.H., Chen, L.H., Lan, W., Zhu, J.Y., Runge, T. 2016. A comparison of cellulose nanofibrils produced from *Cladophora glomerata* algae and bleached eucalyptus pulp. *Cellulose*, **23**(1), 493-503.
- Xie, H.X., Du, H.S., Yang, X.G., Si, C.L. 2018. Recent Strategies in Preparation of Cellulose Nanocrystals and Cellulose Nanofibrils Derived from Raw Cellulose Materials. *International Journal of Polymer Science*.
- Yang, H., Alam, M.N., van de Ven, T.G.M. 2013. Highly charged nanocrystalline cellulose and dicarboxylated cellulose from periodate and chlorite oxidized cellulose fibers. *Cellulose*, **20**(4), 1865-1875.

- Yang, H., Yan, R., Chen, H., Lee, D.H., Zheng, C. 2007. Characteristics of hemicellulose, cellulose and lignin pyrolysis. *Fuel*, **86**(12-13), 1781-1788.
- Yu, H.Y., Abdalkarim, S.Y.H., Zhang, H., Wang, C., Tam, K.C. 2019. Simple Process To Produce High-Yield Cellulose Nanocrystals Using Recyclable Citric/Hydrochloric Acids. *Acs Sustainable Chemistry & Engineering*, **7**(5), 4912-4923.
- Yu, H.Y., Zhang, D.Z., Lu, F.F., Yao, J.M. 2016. New Approach for Single-Step Extraction of Carboxylated Cellulose Nanocrystals for Their Use As Adsorbents and Flocculants. *Acs Sustainable Chemistry & Engineering*, **4**(5), 2632-2643.
- Zhang, Y.H.P., Himmel, M.E., Mielenz, J.R. 2006. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnology Advances*, **24**(5), 452-481.
- Zhang, Y.H.P., Lynd, L.R. 2004. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems. *Biotechnology and Bioengineering*, **88**(7), 797-824.
- Zhao, C., Chen, S.L., Fang, H. 2018. Consolidated bioprocessing of lignocellulosic biomass to itaconic acid by metabolically engineering *Neurospora crassa*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **102**(22), 9577-9584.
- Zhao, X.B., Cheng, K.K., Liu, D.H. 2009. Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **82**(5), 815-827.
- Zhou, C.H., Xia, X., Lin, C.X., Tong, D.S., Beltramini, J. 2011. Catalytic conversion of lignocellulosic biomass to fine chemicals and fuels. *Chemical Society Reviews*, **40**(11), 5588-5617.
- Zhou, H.F., St John, F., Zhu, J.Y. 2019. Xylanase pretreatment of wood fibers for producing cellulose nanofibrils: a comparison of different enzyme preparations. *Cellulose*, **26**(1), 543-555.
- Zhu, J.Y., Sabo, R., Luo, X. 2011. Integrated production of nano-fibrillated cellulose and cellulosic biofuel (ethanol) by enzymatic fractionation of wood fibers. *Green Chemistry*, **13**(5), 1339-1344.