

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

**“OBTENÇÃO DE NANOCRISTAIS DE CELULOSE A PARTIR
DO RESÍDUO DA PRODUÇÃO DE ETANOL DO BAGAÇO
DE CANA-DE-AÇÚCAR PELA ROTA ENZIMÁTICA”**

Lais Angelice de Camargo*

Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do título
de MESTRE EM QUÍMICA

Orientador: Luiz Henrique Capparelli Mattoso

*** bolsista CAPES**

**São Carlos - SP
2015**

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C172o Camargo, Lais Angelice de
Obtenção de nanocristais de celulose a partir do resíduo da produção de etanol do bagaço de cana-de-açúcar pela rota enzimática / Lais Angelice de Camargo. -- São Carlos : UFSCar, 2016.
74 p.

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

1. Obtenção de nanocristais de celulose. 2. Bagaço de cana-de-açúcar. 3. Resíduo da produção de Etanol 2G. 4. Reaproveitamento de resíduo. 5. Hidrólise enzimática. I. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

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

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Lais Angelice de Camargo, realizada em 30/07/2015:

Prof. Dr. Luiz Henrique Capparelli Mattoso
Embrapa

Prof. Dr. Eduardo Ximenes
Purdue

Profa. Dra. Elaine Cristina Paris
Embrapa

Dedico este trabalho a minha mãe Gislene, a minha avó Iracema e sobre tudo ao meu tio Luiz Carlos pela ajuda em todos os momentos difíceis incondicionalmente. Aos meus tios e padrinhos Marcos e Carmen por ter sempre acreditado em meu potencial. Sem vocês eu não teria chegado tão longe nesta caminhada!

***“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará
ao seu tamanho original.”
Albert Einstein***

AGRADECIMENTOS

A toda minha família, por sempre investir em mim acreditando em minha capacidade. Mãe, a pessoa mais forte que conheço seu cuidado e dedicação foi o que me deram, em alguns momentos, a esperança para seguir e me inspiraram a ser como você. Pai, em todos os momentos você esteve comigo, sempre em meus pensamentos, me protegendo e guiando em cada escolha. Tio Luiz Carlos, sua presença significou segurança e certeza de que não estou sozinha nessa caminhada e agradeço também ao seu amor sincero e incondicional por nós.

Ao meu irmão Gilberto pelas opiniões, experiências e infinita ajuda com a complexa matemática. Ao meu noivo Tiago, pessoa com quem amo partilhar a vida. Obrigada pelo carinho, pela paciência e por sua capacidade de me trazer paz na correria do dia-a-dia.

Agradeço a minha avó Iracema, tia Gisele e minha prima/irmã Lívia pela paciência, pelo incentivo, pela força e principalmente pelo carinho. Aos meus amigos/primos, Nayara, Alany, Glaucia, Marcos, Henrique, Patrícia, Murilo, Rafael, Vanessa, Igor, Cléo, Matheus, Aline L., Lucas, Aline P., Leandro entre vários outros, e não menos importantes, ao qual levaria uma eternidade para citar, pelas alegrias, tristezas e dores compartilhadas. Com vocês, as pausas entre um parágrafo e outro melhoraram tudo o que tenho produzido na vida. Agradeço até à minha cachorra de estimação, Penélope, pelo amor incondicional e por renovar minhas energias nos momentos de fraqueza. Enfim, à minha família pelo amor e compreensão sempre.

Gostaria de agradecer aos meus orientadores Dr. Luiz Henrique, Dr. José Manoel e Dra. Cristiane pela oportunidade de trabalhar com vocês. Por todo conhecimento e experiências acadêmicas adquiridas e por toda ajuda e empenho durante esta caminhada me deixando um grande exemplo de professores e pesquisadores.

Agradeço às minhas colegas Carol e Kelcilene pela ajuda, seja no laboratório ou na teoria, sempre prontas a me auxiliar, contribuindo imensamente para este trabalho.

Agradeço especialmente aos meus eternos orientadores e amigos Francys e Sandra, ao qual me deram a base de grande parte de meus

conhecimentos científicos, me auxiliando em todos os momentos, incondicionalmente, e me fazendo crescer como pessoa e profissional. A cientista e pesquisadora que estou me tornando, devo em grande parte a vocês. Serão eternamente exemplos de pessoas, cientistas, pesquisadores e provedores do conhecimento para mim. Desejo ser 1/3 do profissional que vocês são. Muito obrigada!

Aos funcionários da Embrapa Instrumentação, em especial a Silviane, pelo auxílio nas atividades laboratoriais. A todos aqueles que de alguma forma estiveram e estão próximos a mim, fazendo esta vida valer cada vez mais a pena.

LISTA DE ABREVIATURAS

NaOH – Hidróxido de sódio

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

H₂SO₄ – Ácido sulfúrico

CH₃COOH – Ácido acético

NaClO₂ – Clorito de sódio

Amostras

NCCs – Nanocristais de celulose

BIN – Bagaço *in natura*

BEX – Bagaço com pré-tratamento por explosão a vapor

BH - Bagaço com pré-tratamento hidrotérmico

RHE – Resíduo da hidrólise enzimática

RHEP - Resíduo da hidrólise enzimática purificado

RHE-7 - Resíduo da hidrólise enzimática usando carga enzimática de 7mg de proteína/g de celulose

RHE-12 - Resíduo da hidrólise enzimática usando carga enzimática de 12mg de proteína/g de celulose

RHE-22 - Resíduo da hidrólise enzimática usando carga enzimática de 22mg de proteína/g de celulose

Técnicas

MEV-FEG – Microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo

DRX - Difração de Raios X

MET ou STEM – Microscopia eletrônica de varredura por transmissão

AFM – Microscopia de força atômica

FTIR-ATR - Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier e Reflectância total atenuada

Termos

IC – Índice de cristalinidade da celulose

IC% - Índice de cristalinidade da celulose em %

TG/DTG – Termogravimetria/Termogravimetria derivada

T_i - Temperatura de início de degradação

T máx.- Temperatura de máxima taxa de perda de massa em função da temperatura

LISTA DE TABELAS

TABELA 2.1 - Composição de fibras vegetais de diferentes fontes	5
TABELA 2.2 - Comprimento e diâmetro de NCCs produzidos por diferentes materiais lignocelulósicos	19
TABELA 5.1 - Composição (m/m, base seca) do bagaço in natura (BIN), pré-tratado por explosão a vapor (BEX) e dos diferentes resíduos das reações de hidrólise enzimática realizadas com diferentes cargas enzimáticas com os respectivos dados de conversão enzimática.....	34
TABELA 5.2 - Composição (m/m, base seca) do bagaço in natura (BIN), pré-tratado hidrotermicamente (BH) e dos diferentes resíduos das reações de hidrólise enzimática realizadas com diferentes cargas enzimáticas com os respectivos dados de conversão enzimática.....	35
TABELA 5.3 - IC (%) para os nanocristais de celulose (NCCs) com 30, 60 e 90 min. de extração.....	44
TABELA 5.4 - IC (%) das amostras obtidas a partir do bagaço explodido para o resíduo da hidrólise enzimática (RHE), resíduo da hidrólise enzimática purificado (RHEP) e nanocristais de celulose (NCCs).....	46
TABELA 5.5 - IC (%) das amostras obtidas a partir do bagaço hidrotérmico para o resíduo da hidrólise enzimática (RHE), resíduo da hidrólise enzimática purificado (RHEP) e nanocristais de celulose (NCCs).....	46
TABELA 5.6 - Propriedades térmicas do bagaço explodido e das amostras de resíduo da hidrólise enzimática (RHE) e nanocristais de celulose (NCCs) para as cargas enzimáticas de 7, 12 e 22 mg de proteína/g de celulose realizadas em ar sintético	55
TABELA 5.7 - Propriedades térmicas do bagaço hidrotérmico e das amostras de resíduo da hidrólise enzimática (RHE) e nanocristais de celulose (NCCs) para as cargas enzimáticas de 7, 12 e 22 mg de proteína/g de celulose realizadas em ar sintético	55
TABELA 5.8 - Comprimento e diâmetro em nm para os nanocristais de celulose do bagaço explodido	58
TABELA 5.9 - Comprimento e diâmetro em nm para os nanocristais de celulose do bagaço hidrotérmico.....	58

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 2.1 - Ilustração da disposição da celulose, hemicelulose e lignina da parede celular de fibras lignocelulósicas	4
FIGURA 2.2 - Proporção média dos constituintes de fibras	5
FIGURA 2.3 - Esquema da estrutura das fibras celulósicas: (A) fontes de celulose nas plantas (B) fibras e microfibrilas (C) microfibrilas com as regiões amorfas e cristalinas (D) nanocristais de celulose	6
FIGURA 2.4 - Estrutura da hemicelulose presente em materiais lignocelulósicos	7
FIGURA 2.5 - Estrutura da lignina presente em materiais lignocelulósicos	8
FIGURA 2.6 - Estrutura polimérica da celulose representando os dímeros (celobiose) e os monômeros (glicose)	9
FIGURA 2.7 - Possibilidade de ligações de hidrogênio dos monômeros de glicose na molécula de celulose intra e intermoleculares	9
FIGURA 2.8 - Estrutura cristalina dos polimorfos de celulose tipo I: (A) I_{α} e (B) I_{β}	10
FIGURA 2.9 - Interconversão de polimorfos de celulose	11
FIGURA 2.10 - Cana-de-açúcar e o bagaço após processamento pela usina sucroalcooleira	13
FIGURA 2.11 - Esquema da produção de etanol 2G	14
FIGURA 2.12 - Esquema de pré-tratamento de materiais lignocelulósicos.....	16
FIGURA 2.13 - (A) nanofibras de celulose (B) nanocristais de celulose	18
FIGURA 2.14 - Hidrólise ácida da celulose em NCCs.....	19
FIGURA 2.15 - Bagaço de cana-de-açúcar antes e depois do processo de purificação.....	21
FIGURA 2.16 - Reações de hidrólise ácida (A) hidrólise com ácido sulfúrico (B) esterificação da superfície dos nanocristais de celulose (C) hidrólise com ácido clorídrico.....	23
FIGURA 4.1 - Fluxograma que descreve a sequência das etapas realizadas a partir do bagaço de cana-de-açúcar com pré-tratamento hidrotérmico (BH) e a explosão a vapor (BEX), obtendo o resíduo da hidrólise enzimática (RHE) e os nanocristais de celulose (NCCs)	29
FIGURA 4.2 - Sistema mecânico utilizado para extração de nanocristais de celulose	31

FIGURA 4.3 - Método onset para obtenção da temperatura inicial de degradação (Ti)	32
FIGURA 5.1 - Correlação linear entre a carga enzimática e a conversão de celulose na etapa de sacarificação do bagaço com pré-tratamento por explosão a vapor e hidrotérmico.....	36
FIGURA 5.2 - Comparação do teor de glicose para as cargas enzimática de 7, 12 e 22 mg de proteína/g de celulose entre o bagaço com pré-tratamento por explosão a vapor e hidrotérmico.....	37
FIGURA 5.3 - Micrografia de MEV do bagaço de cana: <i>in natura</i> (BIN), pré-tratamento a explosão a vapor (BEX) e pré-tratamento hidrotérmico (BH)	38
FIGURA 5.4 - Micrografia de MEV dos resíduos das hidrólises enzimáticas com carga de 12 mg de proteína/g de celulose do bagaço com pré-tratamento por explosão a vapor e hidrotérmico	39
FIGURA 5.5 - Difratoograma de Raios-X para o RHE e para os métodos de purificação I (NaOH/H ₂ O ₂), II (NaOH/H ₂ O ₂ repetido), III (CH ₃ COOH/NaClO ₂) e IV (CH ₃ COOH/ HNO ₃)	40
FIGURA 5.6 - Micrografia de MEV dos resíduos da hidrólise enzimáticas de 12 mg de proteína/g de celulose purificados do bagaço explodido (RHEP-BEX) e do bagaço hidrotérmico (RHEP-BH)	42
FIGURA 5.7 - IC (%) para os nanocristais de celulose (NCCs) com 30, 60 e 90 min. de extração.....	44
FIGURA 5.8 - Difratoograma de Raios-X para o bagaço com pré-tratamento por explosão a vapor e hidrotérmico	45
FIGURA 5.9- Aspecto visual das amostras de: (A) Bagaço (B) RHE em 0 e 24h de reação (C) RHE – congelados e secos (D) RHEP (E) NCCs secos e em suspensão	48
FIGURA 5.10 - Espectros de infravermelho para o bagaço explodido (BEX), no qual se encontram os dados espectrais dos resíduos da hidrólise (RHE), do resíduo purificado (RHEP) e dos nanocristais de celulose (NCCs) com as cargas enzimáticas de (a) - 7, (b) -12 e (c) -22.....	49
FIGURA 5.11 - Espectros de infravermelho para o bagaço hidrotérmico (BH), no qual se encontram os dados espectrais dos resíduos da hidrólise (RHE), do resíduo purificado (RHEP) e dos nanocristais de celulose (NCCs) com as cargas enzimáticas de (a) - 7, (b) -12 e (c) -22.....	50

FIGURA 5.12 - Comparação entre os espectros de infravermelho dos nanocristais de celulose (NCCs) do bagaço explodido com AVICEL.....	51
FIGURA 5.13 - Comparação entre os espectros de infravermelho dos nanocristais de celulose (NCCs) do bagaço hidrotérmico com AVICEL	52
FIGURA 5.14 -Curvas TG/DTG para as amostras de bagaço explodido: (A) TG (B) DTG.....	53
FIGURA 5.15 - Curvas TG/DTG para as amostras de bagaço hidrotérmico: (A) TG (B) DTG.....	54
FIGURA 5.16 - Micrografia de MET para os nanocristais de celulose: (A) Bagaço explodido (B) Bagaço hidrotérmico	58
FIGURA 5.17 - Comprimento dos nanocristais de celulose produzidos a partir do bagaço explodido e do bagaço hidrotérmico com cargas enzimáticas de 7, 12 e 22 mg de proteína/ g de celulose	59
FIGURA 5.18 - Distribuição de frequência (un.) em relação ao comprimento (nm) dos nanocristais de celulose do bagaço explodido de 7, 12 e 22 mg de proteína/g de celulose	60
FIGURA 5.19 - Distribuição de frequência (un.) em relação ao diâmetro (nm) dos nanocristais de celulose do bagaço hidrotérmico de 7, 12 e 22 mg de proteína/g de celulose	61
FIGURA 5.20 - Micrografia de AFM para os NCCs do BEX (A) NCCs (B) Fase (C) 3D	63
FIGURA 5.21 - Micrografia de AFM para os NCCs do BH (A) NCCs (B) Fase (C) 3D	63

RESUMO

OBTENÇÃO DE NANOCRISTAIS DE CELULOSE A PARTIR DO RESÍDUO DA PRODUÇÃO DE ETANOL DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR PELA ROTA ENZIMÁTICA. O presente estudo avaliou o emprego dos resíduos sólidos do processo de produção de etanol celulósico a partir da hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de nanocristais de celulose (NCCs). Bagaço submetido a dois tipos de pré-tratamentos (explosão a vapor - BEX e hidrotérmico - BH) foi hidrolisado com duas diferentes cargas enzimáticas utilizando um extrato enzimático comercial. Os resíduos sólidos gerados após a hidrólise foram purificados com NaOH 5% (m/m) a 55°C e H₂O₂ 35% (v/v) seguido de uma hidrólise ácida a 45°C com H₂SO₄ 60% (m/m) e extração de 30 min, visando a obtenção dos NCCs. As amostras de BEX e BH apresentaram teores de 61 e 54% de celulose, respectivamente. A conversão na etapa de hidrólise enzimática variou de 25 a 55% para o BEX e de 33 a 59% para o BH, com o aumento da carga enzimática. Assim, além da liberação da glicose para a fase líquida, na etapa de hidrólise enzimática foi gerado um resíduo sólido com quantidade significativa de celulose para os processos subsequentes de obtenção de NCCs. Devido à diminuição dos índices de cristalinidade da celulose (IC%) dos sólidos residuais, foi necessário um procedimento de purificação que elevou o IC% em aproximadamente 30% para os resíduos do BEX e aproximadamente 25% para os resíduos do BH. A partir disso, os NCCs apresentaram características físico-químicas adequadas, como temperatura de degradação superior a 230°C e cristalinidade próxima de 79% para ambas as matrizes. Os NCCs obtidos apresentaram formato de agulha com comprimento entre 193 e 246 nm e diâmetro entre 17 e 30 nm. Esses resultados indicam que os NCCs produzidos a partir das correntes residuais da rota enzimática de produção de etanol celulósico a partir do bagaço de cana-de-açúcar possuem as características adequadas para esse tipo de produto. Portanto, a utilização desses resíduos sólidos para a produção de novos materiais, tais como os NCCs para aplicações em diversos setores industriais, mostrou-se potencialmente promissora para a agregação de valor ao setor de bioenergia.

ABSTRACT

OBTAINING CELLULOSE NANOCRYSTALS FROM THE RESIDUE OF ETHANOL PRODUCTION FROM SUGARCANE BAGASSE BY ENZYMATIC ROUTE. This study addressed the use of solid residues from the process of cellulosic ethanol production using the enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse for the production of cellulose nanocrystals (CNCs). Bagasse submitted to two types of pretreatments (steam explosion - SESB and hydrothermal - HSB) was hydrolyzed with two different enzymatic loads using a commercial enzymatic extract. The solid residues generated after the hydrolysis were purified with NaOH 5% (w/w) at 55 °C and H₂O₂ 35% (v/v) followed by an acid hydrolysis at 45 °C with H₂SO₄ 60% (w/w) and extraction of 30 min in order to obtain the CNCs. The samples of SESB and HSB presented cellulose contents of 61 and 54%, respectively. The conversion in the enzymatic hydrolysis step ranged from 25 to 55% for SESB and 33 to 59% for HSB, along with the increase of enzymatic loading. And besides the release of glucose into the liquid phase, it was also generated solid residues with significant quantity of cellulose to be used for CNCs production. Due to decreasing of the cellulose crystallinity indexes (CI%) of the residual solid, a purification procedure was necessary, which raised the CI by about 30% for SESB residues and approximately 25% for HSB residues. The resulting CNCs presented proper physical and chemical characteristics, such as degradation temperature exceeding 230°C and crystallinity around 79% for both matrices. The CNCs obtained feature of needle with length between 193 and 246 nm and diameter of between 17 and 30 nm. These results indicate that CNCs produced from the residual streams of enzymatic route of cellulosic ethanol production from the sugarcane bagasse have the characteristics suitable for this type of product. Therefore, the use of these solids residues for new materials production, such as NCCs for use in different applications proved to be potentially promising for adding value to the bioenergy sector.

SUMÁRIO

1 -Introdução	1
1.1 - Considerações gerais	1
1 -Fundamentos teóricos	3
2.1 - Fibras vegetais	4
2.2 - Celulose	8
2.3 - Etanol celulósico.....	12
2.4 - Nanocristais de celulose (NCCs)	18
2.5 - Obtenção de nanocristais de celulose	20
2.5.1 - Purificação	20
2.5.2 – Hidrólise ácida	22
3 - Objetivo	25
4 - Materiais e métodos	27
4.1 - Preparação da biomassa.....	28
4.2 - Hidrólise enzimática do bagaço de cana.....	29
4.3 - Purificação do resíduo da hidrólise enzimática	30
4.4 - Hidrólise ácida do resíduo purificado	30
4.5 - Caracterização	31
5 - Resultados e discussão.....	33
5.1 - Composições das amostras e conversão enzimática	34
5.2 - Purificação dos resíduos da hidrólise enzimática.....	39
5.3 - Análise físico-química dos materiais.....	43
5.4 - Estabilidade Térmica das amostras	52

5.5 Rendimentos dos processos de obtenção dos nanocristais de celulose	57
5.6 - Análises morfológicas dos materiais.....	57
6 - Conclusões.....	65
7 - Sugestões para trabalhos futuros	67
8 - Referências bibliográficas.....	69
Anexo i	74

Capítulo 1

Introdução

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - Considerações gerais

Nos últimos anos, o impacto causado pelo aquecimento global aliado à crescente demanda energética e à escassez das reservas de combustíveis fósseis trouxeram para o primeiro plano a necessidade da substituição de matéria-prima não renovável por fontes renováveis e, como consequência, acarretaram um maior desenvolvimento do setor de produção de biocombustíveis que podem ser produzidos a partir da utilização de biomassa lignocelulósica^{1,2}. O Brasil é um grande exemplo da abundância desta biomassa lignocelulósica, por ser o maior produtor mundial de cana-de-açúcar e juntamente com os Estados Unidos da América lideram a produção global de etanol, gerando enormes quantidades de resíduos lignocelulósicos. Dentre esses resíduos, no Brasil se destaca o bagaço, que já vem sendo amplamente estudado na produção de etanol celulósico, e o palhiço, que é constituído por folhas secas (palha) e ponteiros, resultantes do processo moderno de colheita mecanizada da cana-de-açúcar não queimada. Recentemente, o palhiço tem sido introduzido nas pesquisas sobre produção de etanol celulósico, com resultados promissores³. Atualmente, a maior parte do bagaço é utilizada para geração de energia elétrica nas usinas^{4,5}. No entanto, existe uma quantidade excedente desses resíduos que possui potencial para ser utilizada na produção de etanol celulósico e outros bioprodutos, dentro do conceito de biorrefinarias^{3,6}.

O bagaço de cana-de-açúcar é composto principalmente por dois carboidratos (40-45% de celulose e 25-30% de hemicelulose), embebidos em uma matriz amorfa hidrofóbica de lignina (15-20%), além de outros componentes extraíveis presentes em menores quantidades⁷⁻⁹. Devido à sua composição peculiar, a estrutura nativa da matéria-prima lignocelulósica é complexa, sendo que a sua desestruturação é reconhecida como um dos mais importantes desafios na economicidade do processo de produção de etanol celulósico, uma vez que a natureza amorfa de alguns compostos causa uma barreira, limitando e dificultando o acesso das enzimas celulolíticas à celulose durante a etapa de hidrólise enzimática. Portanto, na rota enzimática de produção de etanol celulósico, após a etapa de hidrólise da biomassa lignocelulósica, é gerado um resíduo fibroso sólido, constituído principalmente de celulose cristalina e lignina. Essa corrente de sólido residual pode

ser reaproveitada em outros processos, como a obtenção de nanocristais de celulose⁹. Atualmente, devido à propriedade de alto nível de organização estrutural, a celulose tornou-se uma matéria-prima atraente aos setores relacionados à ciência dos materiais, principalmente na produção em nanoescala, como por exemplo, os nanocristais de celulose¹⁰.

Os nanocristais de celulose (NCCs) são materiais cristalinos, amplamente ordenados e de pequenos diâmetros cilíndricos e alongados obtidos a partir de uma variedade de recursos naturais, geralmente pela rota de hidrólise ácida¹. Atualmente, grande parte dos NCCs é produzida em escala laboratorial a partir de fontes naturais. As propriedades destes materiais dependem muito das condições administradas na hidrólise ácida, como o tempo de reação e a temperatura. De acordo com Chen et al. 11, a utilização de ácido sulfúrico ao redor de 60% (m/m) possibilita a produção de nanocristais de celulose com comprimento entre 200 a 400 nm e 10 nm de diâmetro. Além disso, o tempo de reação varia, dependendo da fonte de celulose. Dentre as possíveis aplicações industriais desses nanomateriais, destacam-se a produção de compósitos poliméricos diversos utilizados em embalagens biodegradáveis, percolativos géis e aerogéis, dentre outras^{10,12-14}.

Nesse contexto, o reaproveitamento dos resíduos lignocelulósicos provenientes da etapa de degradação enzimática do bagaço de cana-de-açúcar no processo do etanol de segunda geração para a produção de novos materiais, tais como os nanocristais de celulose, se destacam como uma potencial alternativa para contribuir com a economicidade global desse processo, agregando valor ao setor de bioenergia. Destaca-se que ainda não há relatos na literatura relacionados à utilização dos resíduos do bagaço de cana-de-açúcar da produção de etanol celulósico para a obtenção de NCCs, até o melhor de nosso conhecimento. Com esta motivação, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a utilização dos resíduos sólidos da etapa de hidrólise enzimática do processo de produção de etanol celulósico a partir do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de nanocristais de celulose. Para isso, estudou-se a influência do tipo de pré-tratamento do bagaço (explosão a vapor e hidrotérmico) e da carga enzimática na liberação de glicose e na composição e propriedades físico-químicas dos NCCs.

Capítulo 2

Fundamentos Teóricos

2 - FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1 - Fibras vegetais

A parede celular das fibras vegetais é estruturada em múltiplas camadas, e de modo geral, são as seguintes: Lamela média (M), parede principal (P) e parede secundária (S)¹⁵. Os constituintes majoritários destas fibras vegetais são a celulose, hemicelulose e lignina, além de outros compostos em menor proporção como pectina etc. A Figura 2.1 apresenta a disposição desses três componentes da parede celular de fibras vegetais.

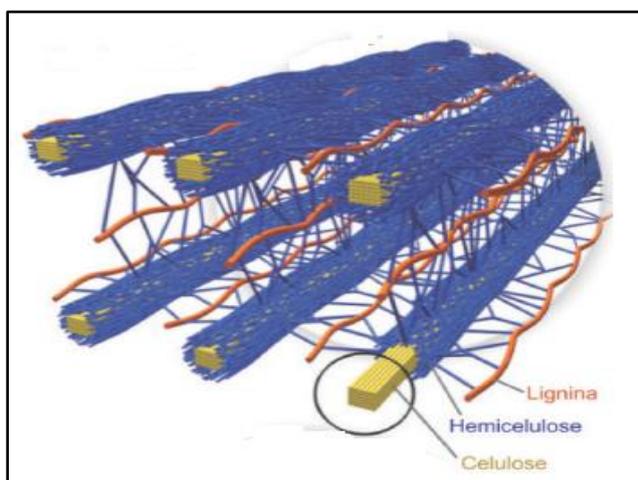


FIGURA 2.1 - Ilustração da disposição da celulose, hemicelulose e lignina da parede celular de fibras lignocelulósicas

Fonte: Adaptado de SANTOS et al.¹⁶

A composição química de biomassas lignocelulósicas é de aproximadamente 35-50% de celulose, 20-35% de hemicelulose, 15-20% de lignina e o pequeno percentual restante são principalmente cinzas, ceras entre outros, porém diferentes espécies de plantas têm muitas vezes variações significativas nas proporções destes componentes principais^{15,16}. A Figura 2.2 apresenta um gráfico com a proporção média dos principais constituintes da parede vegetal de materiais lignocelulósicos.

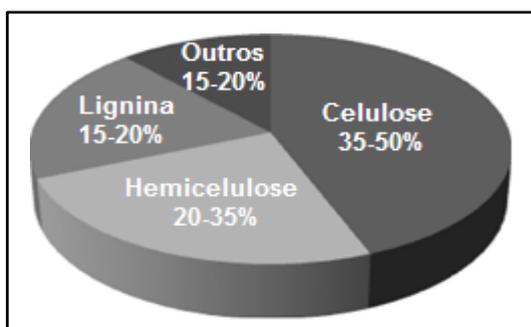


FIGURA 2.2 - Proporção média dos constituintes de fibras

Fonte: Adaptado de MOOD et al. ¹⁷

A quantidade de celulose, hemicelulose e lignina variam de acordo com as fontes lignocelulósicas. Assim, a cristalinidade destes materiais está fortemente ligada a sua composição, sendo que a hemicelulose e a lignina são consideradas estruturas amorfas, já a celulose apresenta cristalinidade. Portanto, o índice de cristalinidade (IC%) das biomassas lignocelulósicas é representado apenas pela cristalinidade da celulose presente¹⁸.

Além disso, grandes quantidades de hemicelulose e lignina impedem o acesso à celulose, causando baixos rendimentos em qualquer reação procedida com o intuito de atingi-la. A Tabela 2.1 apresenta a variação das composições de diferentes fibras.

TABELA 2.1 - Composição de fibras vegetais de diferentes fontes

Fibras	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Referências
Algodão	97	0,5	0,4	TEIXEIRA et al. ¹⁹
Curauá	70	18	9	CORRÊA et al. ²⁰
Bagaço de cana	43	29	23	PEREIRA et al. ⁸
Palha de trigo	43	34	22	ALEMDAR e SAIN ²¹
Capim	34	26	19	MARTINS, et al. ²²
Casca de arroz	35	33	23	JOHAR et al. ²³
Sisal	54	13	18	TEODORO et al. ²⁴

Observa-se que o bagaço de cana-de-açúcar, palha de trigo, capim e casca de arroz possuem grande quantidade de lignina e hemicelulose, ao contrário

do algodão e do curauá que possuem elevado teor de celulose em comparação aos outros componentes, mostrando assim a diversidade das composições entre as diferentes fontes lignocelulósicas exemplificadas.

A celulose é encontrada na parede vegetal das plantas sob a forma de microfibrilas longas embebidas em substâncias amorfas que as protegem da degradação por ataque de microrganismos e de enzimas, sendo essas em grande parte lignina e hemicelulose²⁵. A Figura 2.3 apresenta um esquema da estrutura das fibras celulósicas ilustrando as fontes de celulose nas plantas, suas fibras e microfibrilas com as regiões amorfas e cristalinas e os nanocristais de celulose obtidos a partir delas.

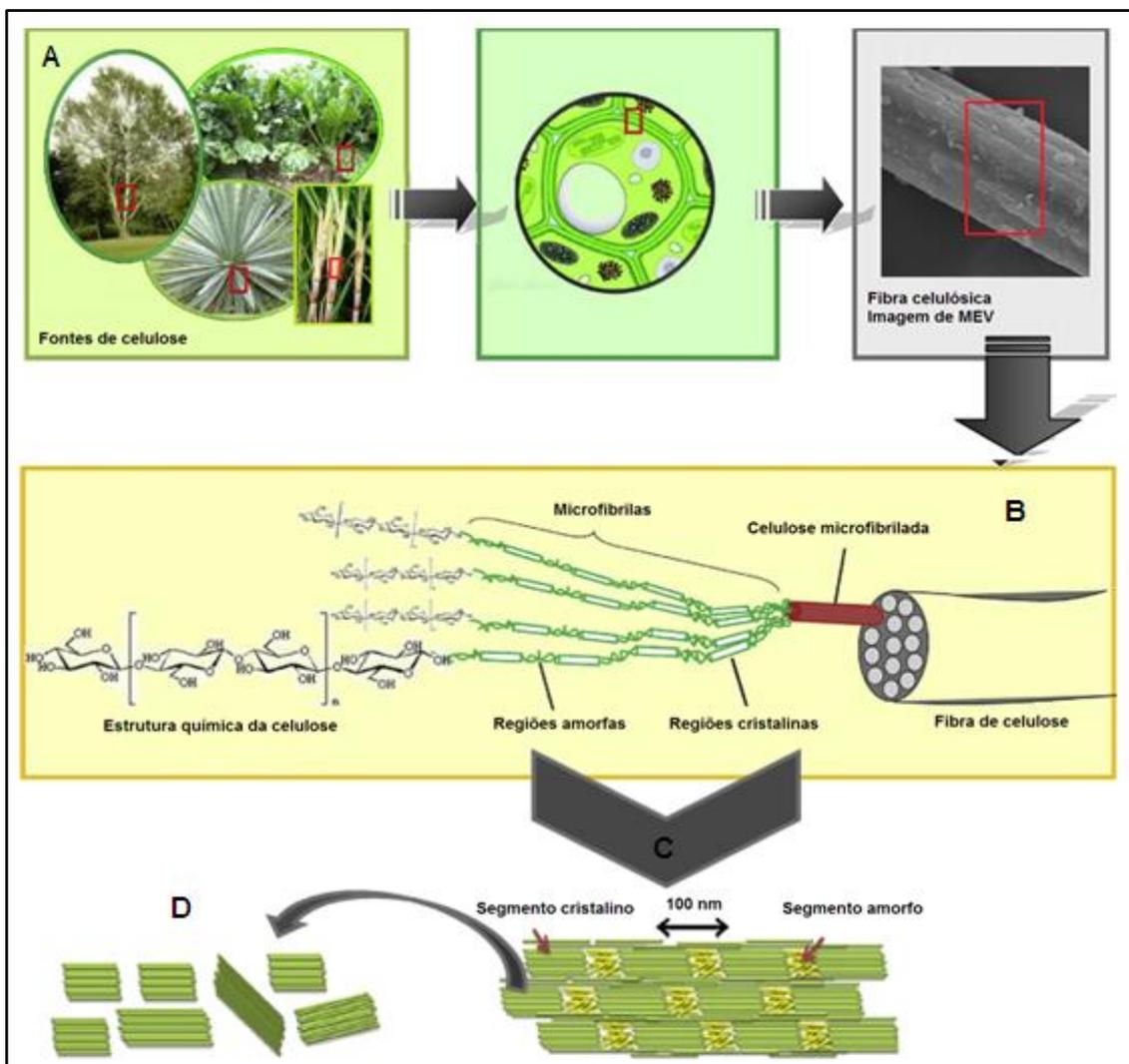


FIGURA 2.3 - Esquema da estrutura das fibras celulósicas: (A) fontes de celulose nas plantas (B) fibras e microfibrilas (C) microfibrilas com as regiões amorfas e cristalinas (D) nanocristais de celulose

Fonte: Adaptado de NG et al.²⁶

Quando separado o segmento cristalino do segmento amorfo das microfibrilas é possível obter celulose cristalina isolada em dimensões nanométricas, como mostrados na Figura 2.3 (D).

A hemicelulose é um polissacarídeo composto por D-glucose, D-galactose, D-manose, D-xilose, L-arabinose, ácido D-glucurônico e ácido 4-O-metilglucurônico. Sua estrutura apresenta ramificações que possibilitam a ligação com a celulose proporcionando maior estabilidade. Devido ao caráter amorfo costuma ser mais susceptível a hidrólise ácida, oferecendo maior acessibilidade do ácido ao interior das microfibrilas¹⁶. A Figura 2.4 apresenta a estrutura da hemicelulose presente em fibras vegetais.

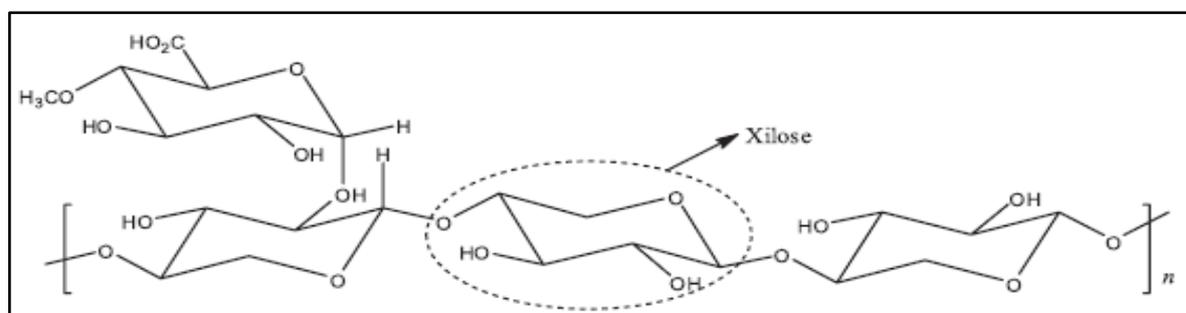


FIGURA 2.4 - Estrutura da hemicelulose presente em materiais lignocelulósicos

Fonte: SANTOS et al.¹⁶

A lignina é uma macromolécula abundante entre os materiais lignocelulósicos e diferente da celulose é um heteropolímero amorfo. Ela é constituída principalmente por três unidades de fenilpropanos: álcool *p*-cumarílico, álcool coferílico, álcool sinapílico e sal, onde sua composição varia de uma espécie para outra, dependendo da matriz lignocelulósica¹⁶. A Figura 2.5 ilustra a estrutura da lignina de fontes lignocelulósicas.

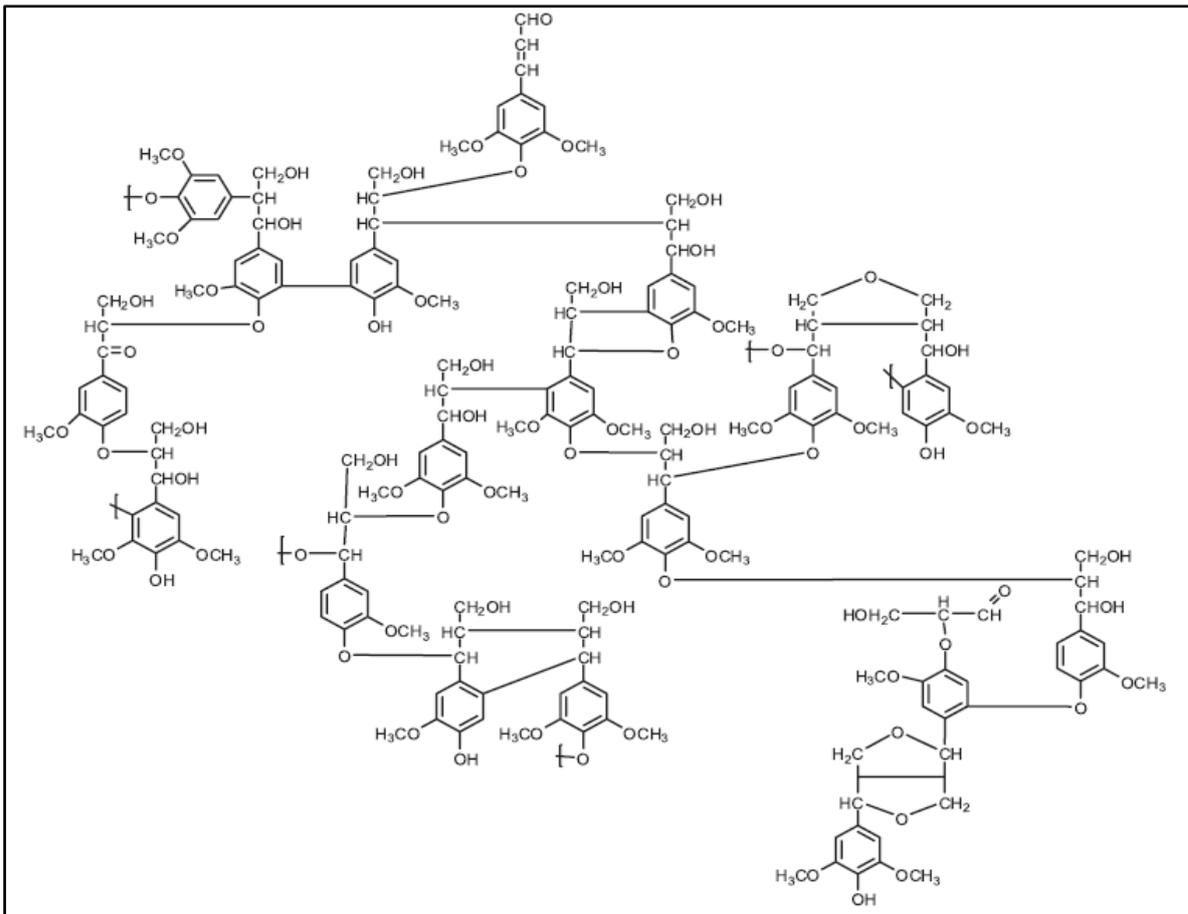


FIGURA 2.5 - Estrutura da lignina presente em materiais lignocelulósicos

Fonte: SANTOS et al. ¹⁶

2.2 - Celulose

A celulose é o principal constituinte da biomassa lignocelulósica, sendo um polissacarídeo formado pelo encadeamento de moléculas de β -D-glucopiranoses em ligações 1,4-glicosídicas, tendo como resultado um polímero de cadeia longa e linear. Essas cadeias de celulose possuem três grupos hidroxilas (OH) em cada unidade de glucopiranoses formando ligações de hidrogênio entre as cadeiais (2 por glucopiranosose) e intracadeias (2-3 por glucopiranosose), organizando-as em uma estrutura altamente ordenada²⁶. Devido a isso, a celulose apresenta uma estrutura com alto índice de cristalinidade e boa estabilidade térmica²⁶⁻²⁸. A Figura 2.6 apresenta a estrutura polimérica da celulose.

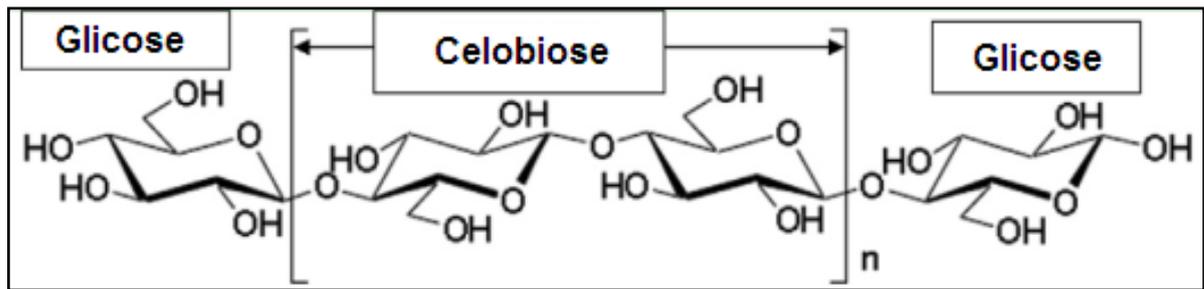


FIGURA 2.6 - Estrutura polimérica da celulose representando os dímeros (celobiose) e os monômeros (glicose)

Fonte: NG et al.²⁶

Na Figura 2.6 estão identificados os monômeros de glicose (unidades básicas da celulose) e os dímeros de celulose, conhecidos como unidades de repetição (celobiose).

Os segmentos desordenados, denominados amorfos, são segmentos holocelulósicos formados por partes da cadeia que não podem estabilizar-se lateralmente por ligações de hidrogênio intramolecular, tendo as cadeias mais afastadas e com menor densidade, tornando-se disponível para ligações de hidrogênio com outras moléculas, como a água²⁶. Essas regiões amorfas podem ser hidrolizadas facilmente gerando um resíduo altamente cristalino conhecido como nanocristais de celulose, com características dependentes da natureza da matéria-prima empregada no processo, dos pré-tratamentos e condições de hidrólise ácida. Esse material será mais amplamente abordado nos tópicos seguintes. A Figura 2.7 apresenta as possibilidades de ligações de hidrogênio intra e intermoleculares.

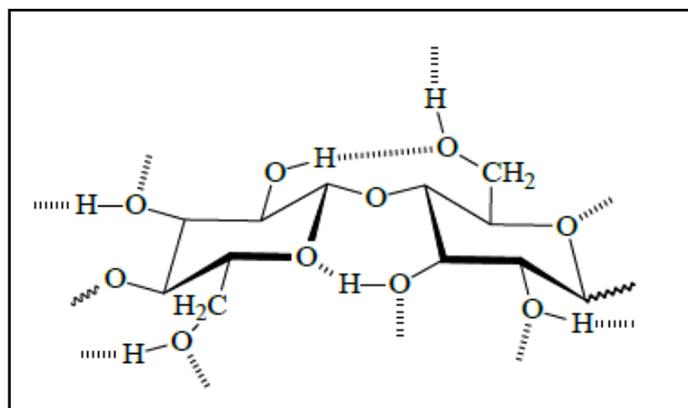


FIGURA 2.7 - Possibilidade de ligações de hidrogênio dos monômeros de glicose na molécula de celulose intra e intermoleculares

Fonte: MESQUITA,²⁸

Devido ao amplo ordenamento das moléculas de celulose ela é insolúvel em água e em alguns solventes orgânicos, salvo pequenas exceções¹⁷. As moléculas de celulose estão organizadas na parede celular das plantas formando microfibrilas com orientações características que diferem de acordo com sua fonte²⁹.

A estrutura polimérica que forma a celulose é conhecida como uma das mais simples dentre os polímeros naturais²⁹. São conhecidos seis principais tipos de polimorfos de celulose (I, II, III_I, III_{II}, IV_I e IV_{II}). Dentre essas estruturas, a mais facilmente encontrada é a celulose (C₆H₁₀O₅)_n tipo I, que é a celulose encontrada na natureza, denominada celulose nativa^{20,30}. A celulose tipo I é uma mistura de dois polimorfos, I_α e I_β, onde a I_α (parâmetros de célula: a=6,717 Å, b=5,962 Å, c=10,400 Å, α=118,08°, β=114,80° e γ=80,37°) é formada por uma única cadeia de estrutura cristalina triclínica e é predominantemente produzida por organismos mais primitivos e a I_β (parâmetros de célula: a=7,784 Å, b=8,201 Å, c=10,38 Å, α=β=90°, e γ=96,5°) formada por duas cadeias paralelas e células unitárias com estrutura monoclínica (Figura 2.8) e predominantemente formada por plantas superiores^{28,30}.

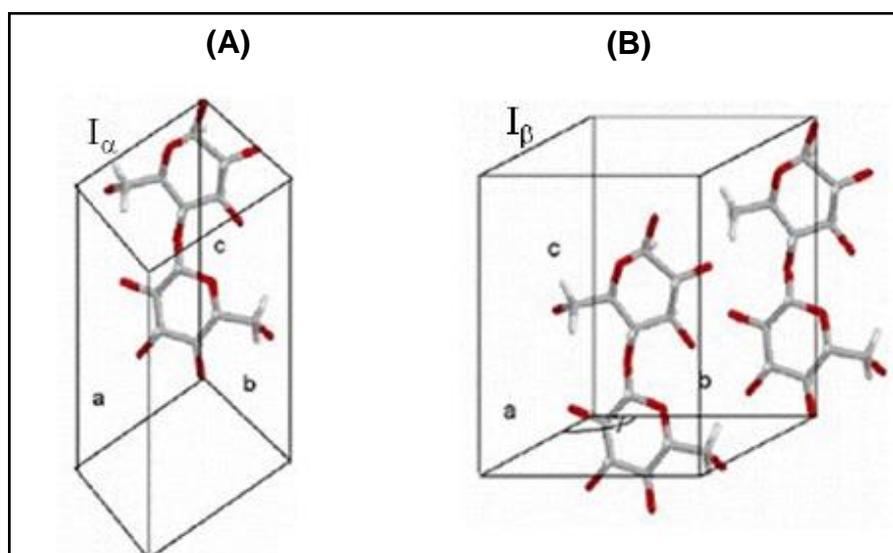


FIGURA 2.8 - Estrutura cristalina dos polimorfos de celulose tipo I: (A) I_α e (B) I_β

Fonte: Adaptado de MESQUITA,²⁸

Essas estruturas podem se interconverter como mostrado na Figura 2.9 e a partir da celulose I é possível obter a celulose II, seguindo os processos de regeneração, solubilizando a celulose I em solvente seguida de reprecipitação em água ou por mercerização utilizando hidróxido de sódio (NaOH). As celulosas III_I e III_{II} são formadas a partir de celulosas I e II, respectivamente, por tratamento com

amônia e os polímeros IV_I e IV_{II} são preparados por aquecimento das celulosas III_I e III_{II} respectivamente^{28,30}.

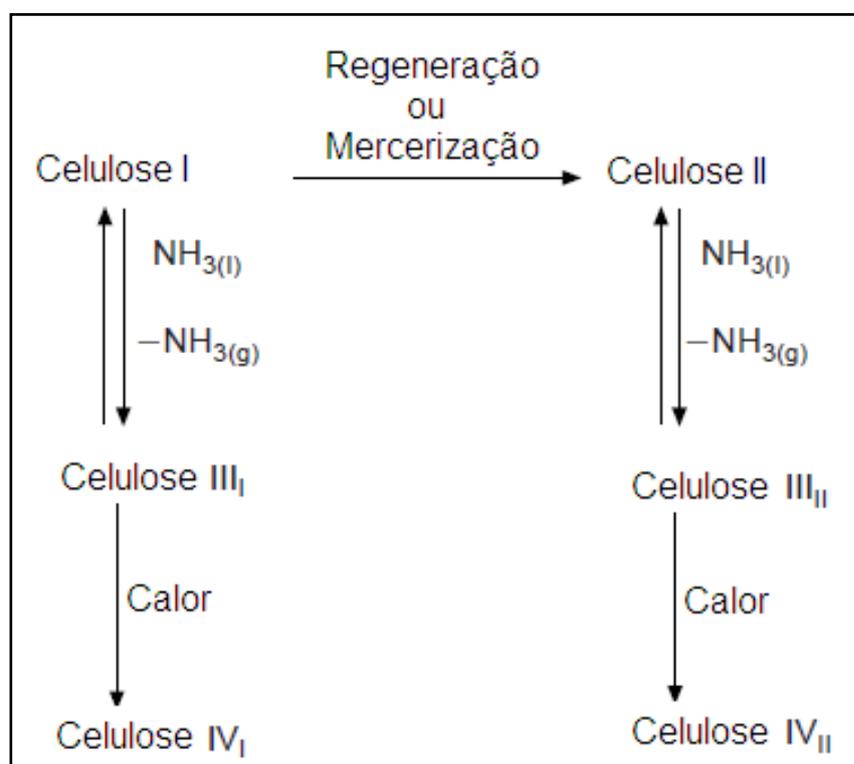


FIGURA 2.9 - Interconversão de polímeros de celulose

Fonte: O'SULLIVAN et al.³⁰

A celulose pode vir de diferentes fontes, como de algas, bactérias, algodão, polpa de celulose, bagaço de cana-de-açúcar, entre outros, e dependendo da fonte pode conter proporções diferentes dos polímeros de celulose tipo I, além de diferenças na cristalinidade e no tamanho²⁸.

Esse biopolímero tem aumentado a competitividade em diversos setores devido às demandas econômicas e ambientais por ser uma fonte renovável de matéria-prima, sendo amplamente utilizado para a produção de papel, combustíveis como o etanol, bem como revestimentos, laminados, aditivos em materiais de construção, produtos farmacêuticos, entre outras aplicações. Novas aplicações têm surgido no mercado para este polímero natural devido a sua biocompatibilidade, sendo essas na imobilização de proteínas e anticorpos, como também participando da formação de compósitos²⁹.

2.3 - Etanol celulósico

A composição de materiais lignocelulósicos chega a ser de até 75% carboidratos fermentáveis que podem ser utilizados para produção de energia entre outros materiais químicos e biodegradáveis³¹. Este fato é extremamente relevante para o cenário mundial atual, onde há uma crescente crise energética e ambiental. Devido a isto, os materiais lignocelulósicos irão tornar-se uma fonte essencial de açúcares fermentáveis para a produção de biocombustíveis, como o etanol¹⁵.

O etanol de primeira geração (1G) pode ser obtido a partir do caldo de cana-de-açúcar, que contém água, sacarose, melação e insolúveis¹⁶. Existe uma ampla diversidade de fontes das quais o etanol 1G também pode derivar. Podemos citar como exemplo, além da cana-de-açúcar, o milho, o trigo, entre outras³².

No Brasil, a grande geração e consumo de etanol de primeira geração fez do país um dos líderes na produção de biocombustíveis no mundo. Atualmente no Brasil, 90% dos automóveis produzidos já são à base de dois tipos de combustíveis (automóveis flex), sendo estes a gasolina e o biocombustível etanol⁴.

Em 10 anos, o Brasil quase dobrou a produção de etanol em bilhões de litros por ano a partir de cana-de-açúcar, passando de 15 bilhões de litros em 2004 para 25,5 bilhões de litros em 2013, ficando atrás apenas de países como os Estados Unidos, com uma produção de 50,3 bilhões de litros em 2013. Porém, a fonte de produção do bioetanol dos Estados Unidos é prioritariamente o milho³².

Atualmente, há uma grande demanda para a geração de novos processos, economicamente mais viáveis, assim a reutilização dos resíduos da produção de etanol 1G como o bagaço e palhico de cana, palha de trigo, resíduos de milho entre outros tem sido adotada para a produção de energia¹⁶. Grande parte do favorecimento comercial do bagaço de cana provém de sua pouca competitividade com o setor alimentício, a acessibilidade ao transporte desta biomassa, custo mais atrativo, além de sua vasta abundância^{33,34}.

Assim, o bagaço de cana-de-açúcar é um resíduo agroindustrial extremamente abundante, principalmente no Brasil, que é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar. Somente na safra 2014/2015, 671,69 milhões de toneladas de cana-de-açúcar serão processadas pelas usinas brasileiras. Deste total, estima-se que 1/3 seja correspondente à geração de bagaço, que é a principal fonte para a produção de bioetanol no país^{35,36}. A cana-de-açúcar e seu respectivo bagaço estão

apresentados na Figura 2.10. O bagaço é utilizado atualmente como fonte de geração de energia para suprir a demanda energética das linhas de produção nas próprias usinas⁴. Essa biomassa lignocelulósica, mesmo depois do processamento nas indústrias sucroalcooleiras, ainda é rica em celulose e materiais amorfos, sendo estes principalmente a lignina e hemicelulose, como mostrado na Tabela 2.1.

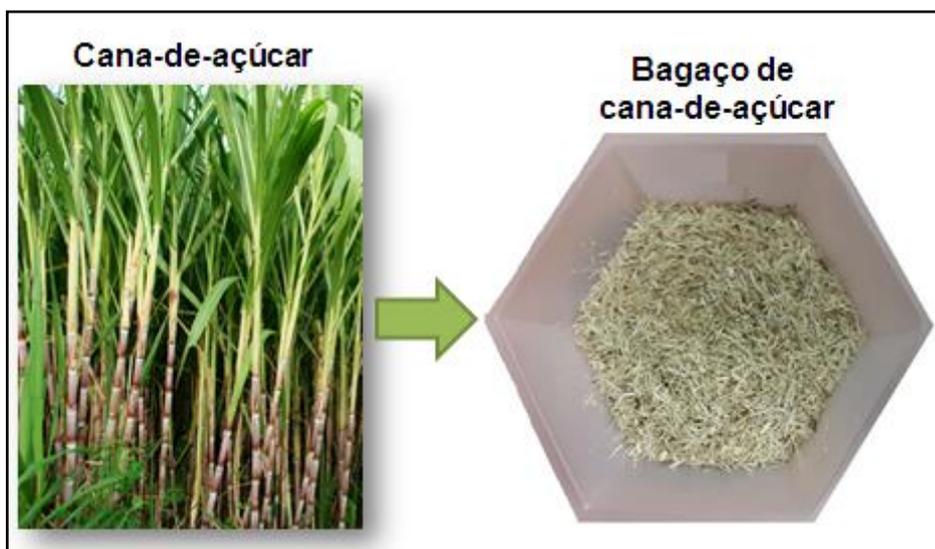


FIGURA 2. 10 - Cana-de-açúcar e o bagaço após processamento pela usina sucroalcooleira

Fonte: Adaptado de El MIRI et al. ³⁷

Entre as formas de energia possíveis de se gerar a partir dessas biomassas, podemos citar a produção de etanol de segunda geração (2G), ou também denominado etanol celulósico. O etanol 2G é gerado a partir do pré-tratamento da biomassa vegetal, seguido da hidrólise enzimática e da fermentação dos açúcares (hexoses e pentoses) presentes na fração líquida obtida³⁸.

A Figura 2.11 apresenta um esquema do processo de obtenção de etanol de segunda geração.

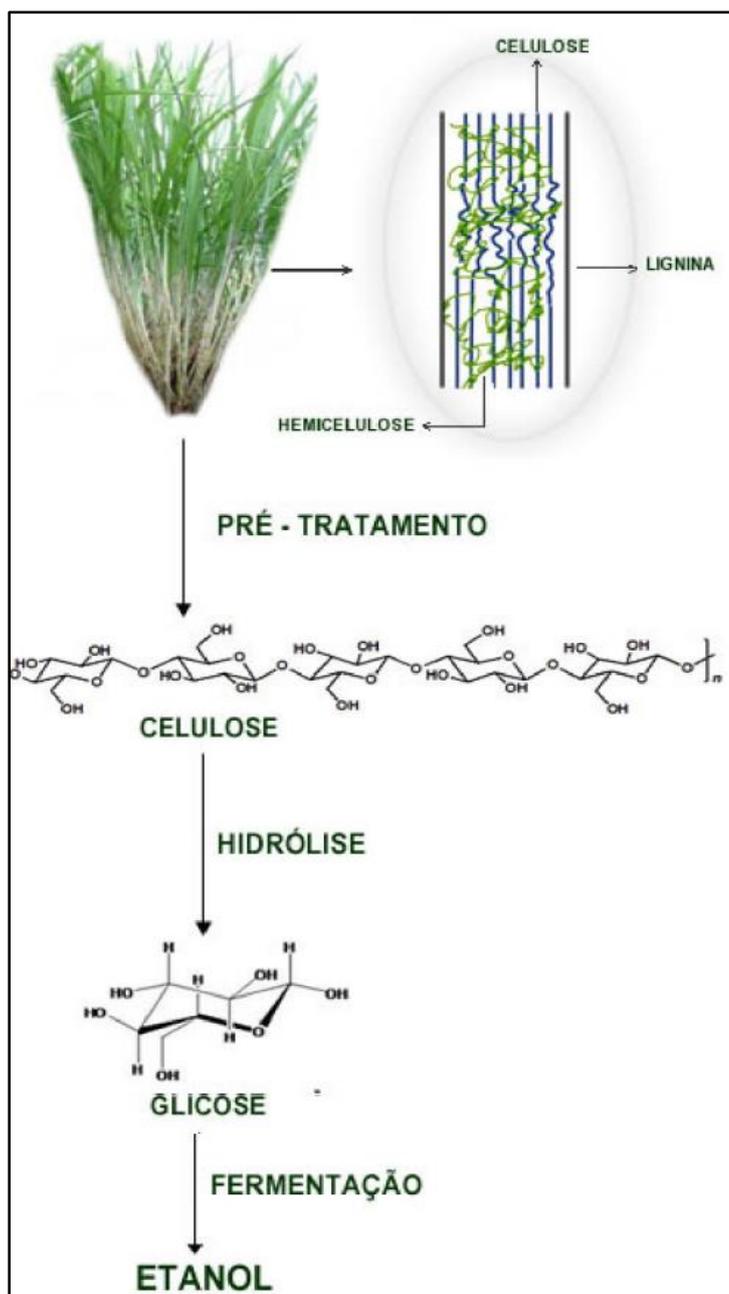


FIGURA 2.11 - Esquema da produção de etanol 2G

Fonte: SANTOS et al. ¹⁶

A rota de produção de etanol celulósico a partir da hidrólise enzimática possui uma menor demanda energética e um menor impacto ambiental, quando comparado ao processo de hidrólise química convencional.

Autores como SEABRA et al. ³⁹ e DIAS et al. ⁴⁰ avaliaram a viabilidade econômica e ambiental do processo de produção de etanol 2G em comparação com a produção de energia elétrica pelas usinas sucroalcooleiras. Quanto à viabilidade

econômica, a produção de energia ainda apresenta vantagens, porém a produção de etanol de 2G tem um menor impacto ambiental.

Os principais fatores que podem afetar a reação de hidrólise enzimática na produção de etanol 2G são os estruturais como a composição química e física dos materiais lignocelulósicos. Dentre eles podemos citar mais detalhadamente a presença de lignina e hemicelulose na parede vegetal, cristalinidade da celulose, grau de polimerização, superfície acessível entre outros¹⁵.

O rendimento da hidrólise enzimática depende da disponibilidade da celulose. No caso da produção de etanol a partir do bagaço e da palha de cana-de-açúcar, o rendimento da hidrólise enzimática apresenta maior rendimento na palha do que no bagaço, isto porque a celulose se encontra mais disponível para a reação enzimática¹⁸.

O etanol pode apresentar uma boa competitividade de mercado a partir de novas tecnologias para aumentar o rendimento do processo. A produção integrada entre o etanol 1G e 2G por biorrefinarias pode ser uma das alternativas para o baixo rendimento do etanol celulósico. Desta forma a biorrefinaria teria flexibilidade para a escolha de produção de etanol 1G seguido de etanol 2G, ou a produção de energia, de acordo com os interesses econômicos da mesma^{40,41}.

Segundo MOUTTA, et al.¹⁸, outra estratégia seria a partir da mistura do bagaço de cana e da palha, a qual não apresentou efeito significativo na obtenção de açúcares fermentáveis, sugerindo que estes materiais podem ser misturados em qualquer proporção, e de acordo com a disponibilidade.

No entanto, a forte associação da lignina e da hemicelulose a celulose é ainda o fator que mais contribui no menor rendimento da reação enzimática, sendo necessários pré-tratamentos que possibilitem a remoção destes componentes da biomassa^{17,20,21,23-25}.

A Figura 2.12 apresenta um esquema de pré-tratamento de materiais lignocelulósicos, exemplificando como ficam as microfibrilas e seus componentes como a celulose, a hemicelulose e a lignina.

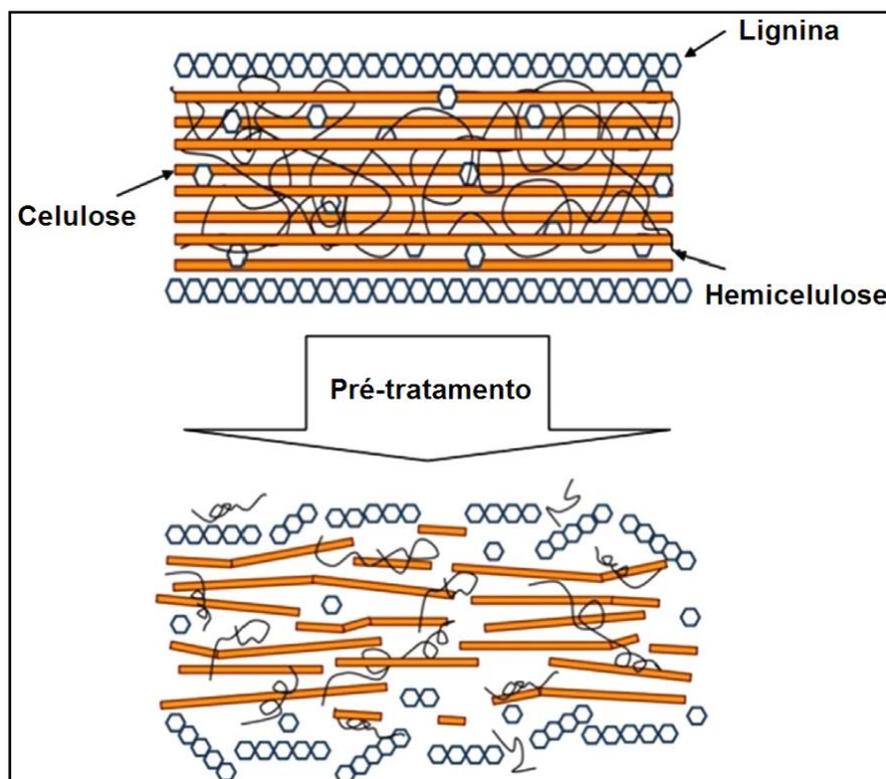


FIGURA 2.12 - Esquema de pré-tratamento de materiais lignocelulósicos

Fonte: MOOD et al. ¹⁷

Assim a escolha destes pré-tratamentos é um grande desafio, em que seu objetivo é romper a estrutura de lignina e hemicelulose tornando a estrutura da celulose mais acessível às enzimas durante a etapa de hidrólise enzimática, melhorando assim o rendimento do processo^{9,42,43}. No entanto, em alguns casos o pré-tratamento pode causar mudanças estruturais na parede celular e gerar efeito contrário, contribuindo assim para aumentar o efeito de barreira de algumas substâncias na biomassa, sendo necessário um estudo minucioso da fonte lignocelulósica e o pré-tratamento mais adequado¹⁵.

Alguns pré-tratamentos utilizados são os físicos, como trituração mecânica, os químicos como tratamentos alcalinos, ácidos e os físico-químicos como explosão a vapor, hidrotérmico, ultrassom, entre outros³⁴.

A explosão a vapor é o tratamento físico-químico mais amplamente utilizado em biomassas lignocelulósicas, em que modifica quimicamente a composição da biomassa e fisicamente causa fraturas na estrutura da parede celular⁴⁴. Neste pré-tratamento a biomassa é submetida ao vapor pressurizado durante um período de tempo e despressurizada hidrolisando a hemicelulose aumentando assim a acessibilidade das microfibrilas. No caso da lignina ela não é

removida e sim parcialmente solubilizada e redistribuída na superfície das fibras⁴⁵. É um processo considerado termo-mecano-químico sendo: termo, pois o vapor aquecido rompe a estrutura da fibra, mecânico devido à força de cisalhamento e químico devido à quebra de algumas ligações glicosídicas⁴⁴.

Algumas desvantagens deste pré-tratamento são que em condições extremas a parte amorfa da celulose pode ser hidrolisada e alguns componentes gerados neste processo podem afetar as etapas de hidrólise e a fermentação subsequente por inibir a ação de microorganismos⁴²⁻⁴⁴. Quanto ao grau de cristalinidade da biomassa, após este pré-tratamento a explosão a vapor, tende a aumentar devido à remoção de hemicelulose⁴⁴.

O hidrotérmico é outro atrativo processo de pré-tratamento, uma vez que utiliza, em geral, água em seu meio reacional. O processo é geralmente efetuado a temperaturas relativamente altas (140-220 °C) em comparação a outros pré-tratamentos de biomassas, em presença de íons hidrônio, gerados pela autoionização da água, funcionando como catalisador, causando mudanças estruturais na lignina e na celulose e a solubilização da hemicelulose, reduzindo a recalcitrância da biomassa^{46,47}. Em outras partes da reação, os íons hidrônio formados a partir da autoionização do ácido acético previamente formado na degradação da hemicelulose, também agem como catalizadores na degradação de polissacarídeos⁴⁶.

Neste pré-tratamento, devido a sua severidade, ocorre primeiramente à degradação do complexo lignina-carboidrato, posteriormente a quebra nas ligações glicosídicas da hemicelulose, em que dependendo das condições, também ocorre em parte da fase amorfa da celulose, além da quebra de ligações na lignina ocorrendo sua despolimerização para grupos menores⁴⁴.

Após os pré-tratamentos e diminuição da recalcitrância do material, é possível realizar então a hidrólise enzimática, com a adição de enzimas hidrolisando a celulose e outros polissacarídeos a açúcares fermentáveis. Assim, enzimas também agem se ligando aos domínios catalíticos da estrutura da celulose e quebrando as ligações de hidrogênio intra e intermoleculares. Neste processo gera uma fase líquida que posteriormente será fermentada para obtenção do etanol e ainda um resíduo fibroso sólido rico em celulose que pode ser reutilizado para diversos fins, como a produção de celulose purificada, nanocristais de celulose etc.

2.4 - Nanocristais de celulose (NCCs)

As cadeias poliméricas de celulose organizam-se nas microfibrilas em uma fase amorfa e em nanocristais alongados e de pequenos diâmetros. Procedimentos que envolvam a digestão dos domínios amorfos das fibras vegetais são capazes de liberar estes nanocristais obtendo-se estruturas de morfologia acicular e nanométrica denominadas nanowhiskers, nanofibras ou nanocristais de celulose (NCCs)^{25,48}. A Figura 2.13 ilustra a estrutura das nanofibras e dos nanocristais de celulose.

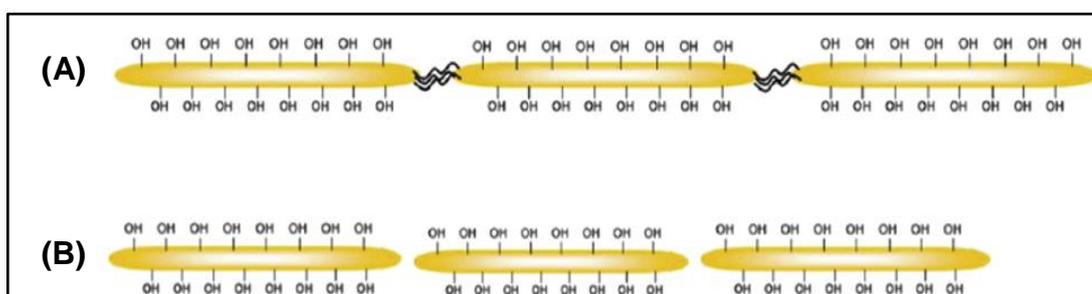


FIGURA 2.13 - (A) nanofibras de celulose (B) nanocristais de celulose

Fonte: NG et al.²⁶

A morfologia e as propriedades dos NCCs dependem da origem da fonte de celulose utilizada e das condições de processamento²⁸. O conhecimento das propriedades dos NCCs produzidos é de grande importância, pois essas influenciam na aplicação futura desses materiais, como por exemplo, materiais de reforço em polímero, em que o tamanho pode modificar o efeito produzido²⁶.

Partindo-se de diferentes fibras vegetais podem ser extraídas diferentes nanoestruturas, as quais apresentam comprimentos e diâmetros variados, dependendo da celulose de origem⁴⁹. De modo geral, os tratamentos químicos de produção de nanocristais de celulose podem ser divididos em purificação e hidrólise das fibras. Atualmente, os NCCs são obtidos por diferentes métodos de hidrólise, como a partir da hidrólise das fibras em presença de ácido, hidrólise enzimática, hidrólise por ultrassom, entre outros²⁸.

Nessas reações, os domínios amorfos são velozmente atacados restando apenas os domínios cristalinos em pequenos pedaços separados formando os micro ou nanocristais de celulose como ilustrados na Figura 2.14.

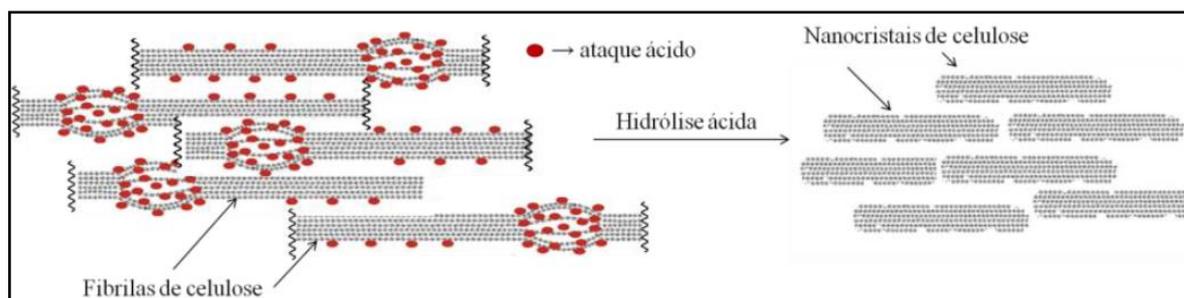


FIGURA 2.14 - Hidrólise ácida da celulose em NCCs

Fonte: MESQUITA,²⁸

Um grande desafio na utilização de NCCs em aplicações comerciais é a sua disponibilidade limitada e baixo rendimento quando isolados, sendo estes produzidos em grande parte em escala laboratorial a partir de fontes naturais como: algodão¹⁹, bagaço de cana-de-açúcar^{37,50}, bagaço de mandioca¹³, fibras de sisal⁴⁸, capim²², casca de coco⁵¹, entre outras.

As propriedades desses materiais dependem muito das condições usadas na hidrólise ácida, como o tempo e a temperatura. Além disso, as fontes lignocelulósicas também influem drasticamente em propriedades como, por exemplo, a cristalinidade e a morfologia (formatos e tamanhos) dos NCCs obtidos. A Tabela 2.2 apresenta o comprimento e o diâmetro de NCCs produzidos a partir de diferentes fontes lignocelulósicas. Nessa podemos observar uma grande variação dos comprimentos e tamanhos conforme é alterada a origem da celulose. Isto ocorre devido a grande diferença de composição entre os materiais lignocelulósicas corroborando os dados apresentados na Tabela 2.1.

TABELA 2.2 - Comprimento e diâmetro de NCCs produzidos por diferentes materiais lignocelulósicos

Origem	Comprimento (nm)	Diâmetro (nm)	Referência
Curauá	80-70	6-10	CORREA, et al. ²⁰
Casca de ervilha	240-400	7-12	CHEN, et al. ¹¹
Bagaço de cana	200-310	2-6	TEIXEIRA, et al. ⁵⁰
Algodão	85-255	6-18	TEIXEIRA, et al. ¹⁹
Bagaço de mandioca	1150	76	PASQUINI, et al. ¹³
Capim	205-305	4-7	MARTINS, et al. ²²
Sisal	210	5	TEODORO, et al. ²⁴

Além da produção de NCCs a partir de materiais naturais, outros trabalhos estudaram a produção de NCCs a partir do reuso de materiais como reutilização de papéis usados na extração de NCCs avaliada por DANIAL et al.⁵². GHAFARROKHI et al.⁵³ estudaram a utilização do resíduo da indústria cervejeira produzindo NCCs a partir da cevada. No caso de OKSMAN et al.⁹, os autores avaliaram a utilização do resíduo da produção de etanol da madeira para a produção de NCCs, sendo um dos poucos trabalhos de conhecimento atualmente na reutilização de resíduo da produção de um biocombustível.

Dentre as possíveis aplicações industriais desses nanomateriais, destacam-se a produção de compósitos poliméricos diversos utilizados em embalagens, percolativos géis e aerogéis, dentre outras¹⁰. ARRIETA et al.¹² estudaram a incorporação dos NCCs em poli(ácido láctico)(PLA), com a adição de acetilo (tributilcitrato) (ATBC) e Poli (hidroxibutirato) (PHB) para melhorar a processabilidade e cristalinidade, formando assim o bionanocompósito PLA-PHB-NCCs-ATBC, com aplicação na indústria de embalagens biodegradáveis. Também podemos citar a incorporação de NCCs em filmes de borracha natural e amido de ervilha com intuito de melhorar a propriedade mecânica das matrizes¹²⁻¹⁴.

2.5 - Obtenção de nanocristais de celulose

2.5.1 - Purificação

Alguns métodos de purificação do resíduo fibroso são necessários com o intuito de isolar a celulose para subseqüentes tratamentos químicos como a produção de celulose purificada, nanocristais de celulose, entre outros. Segundo SUN et al.⁷, vários processos foram testados para o isolamento da celulose, porém alguns utilizavam produtos muito tóxicos causando preocupações ambientais.

Os tratamentos costumam ser feitos a partir de peróxido de metais alcalinos, clorito de sódio acidificado, mistura de ácidos e misturas alcalinas denominadas mercerização, entre outros^{20,30,50}. O processo possibilita, por exemplo, um maior rendimento na produção de celulose purificada e nanofibras de celulose, porém o desempenho desses tipos de tratamento e sua escolha variam de material para material. No caso da produção de nanofibras, dependendo da recalcitrância do material de partida, é necessário um tratamento mais drástico, e algumas vezes

realizado em mais de uma etapa gerando materiais mais puros, melhorando a acessibilidade da fibra.

Diversos compostos têm sido testados para a purificação de materiais lignocelulósicos com o intuito de obtenção de celulose, principalmente de baixo custo, como o hipoclorito de sódio (NaOCl), que é um agente oxidante, ou como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que atua na quebra das ligações entre os compostos amorfos presentes na composição do material, como a lignina e a hemicelulose. As Equações 1 e 2 apresentam as dissociações do peróxido de hidrogênio e a equação 3 apresenta a reação de componentes da dissociação do peróxido com substâncias amorfas de fibras vegetais. Estas simulam uma reação de purificação de materiais lignocelulósicos em presença de peróxido de hidrogênio²⁶.



Onde o I = impurezas, ou seja, as impurezas são os compostos amorfos de barreira presente na fibra como a lignina e a hemicelulose. Portanto, ocorre a hidrólise dos íons hidrogênio, liberando mais átomos de oxigênio no meio que reagem com as impurezas, eliminando-as. Para obtenção de altos desempenhos nesta etapa de purificação, muitas vezes é necessária à realização destas reações repetidas vezes até que as fibras apresentem coloração esbranquiçada significando à quase total remoção da lignina, substância que proporciona a cor destes materiais, e assim obtendo uma celulose com maior grau de pureza²⁶. A Figura 2.15 ilustra o bagaço de cana-de-açúcar antes e depois do processo de purificação.



FIGURA 2.15 - Bagaço de cana-de-açúcar antes e depois do processo de purificação.

Assim, é possível notar a diferença de coloração do bagaço, marrom antes da purificação com a presença de grande porcentagem de lignina, e depois da purificação com coloração clara, próxima de amarelo/branco. Devido a coloração esbranquiçada este processo pode ser também denominado de branqueamento, devido à coloração adquirida pelo produto proveniente da remoção da lignina e outros compostos amorfos.

2.5.2 – Hidrólise ácida

Para a geração de celulose cristalina em tamanhos nanométricos (Nanocristais de celulose - NCCs) é necessária uma etapa subsequente à purificação. Para isso é realizada uma hidrólise nas fibras com diferentes ácidos em diferentes proporções, dependendo da natureza do material, e sua eficiência depende das condições administradas durante essa reação. No caso de materiais lignocelulósicos já submetidos ao processo de purificação, as fibras apresentam-se mais expostas, com maior superfície de contato devido à remoção de substâncias amorfas, proporcionando maior eficiência no contato entre a celulose e o ácido²⁶.

A eficiência da hidrólise ácida depende do precursor e das condições de hidrólise. O pré-tratamento realizado nas fibras, como, por exemplo, a purificação, pode influenciar na hidrólise ácida.

Outros materiais podem ser utilizados como precursor para a hidrólise ácida com o intuito do isolamento de celulose, como fibras de madeira, polpa de plantas, celulose microcristalina comercial (MCC) entre outros²⁶. Esta pode ser realizada com diversos tipos de ácidos, como por exemplo, o ácido sulfúrico (mais utilizado) e o ácido clorídrico. Os mecanismos destas reações de hidrólise com ácido sulfúrico e clorídrico para a obtenção de NCCs esta ilustrada na Figura 2.16.

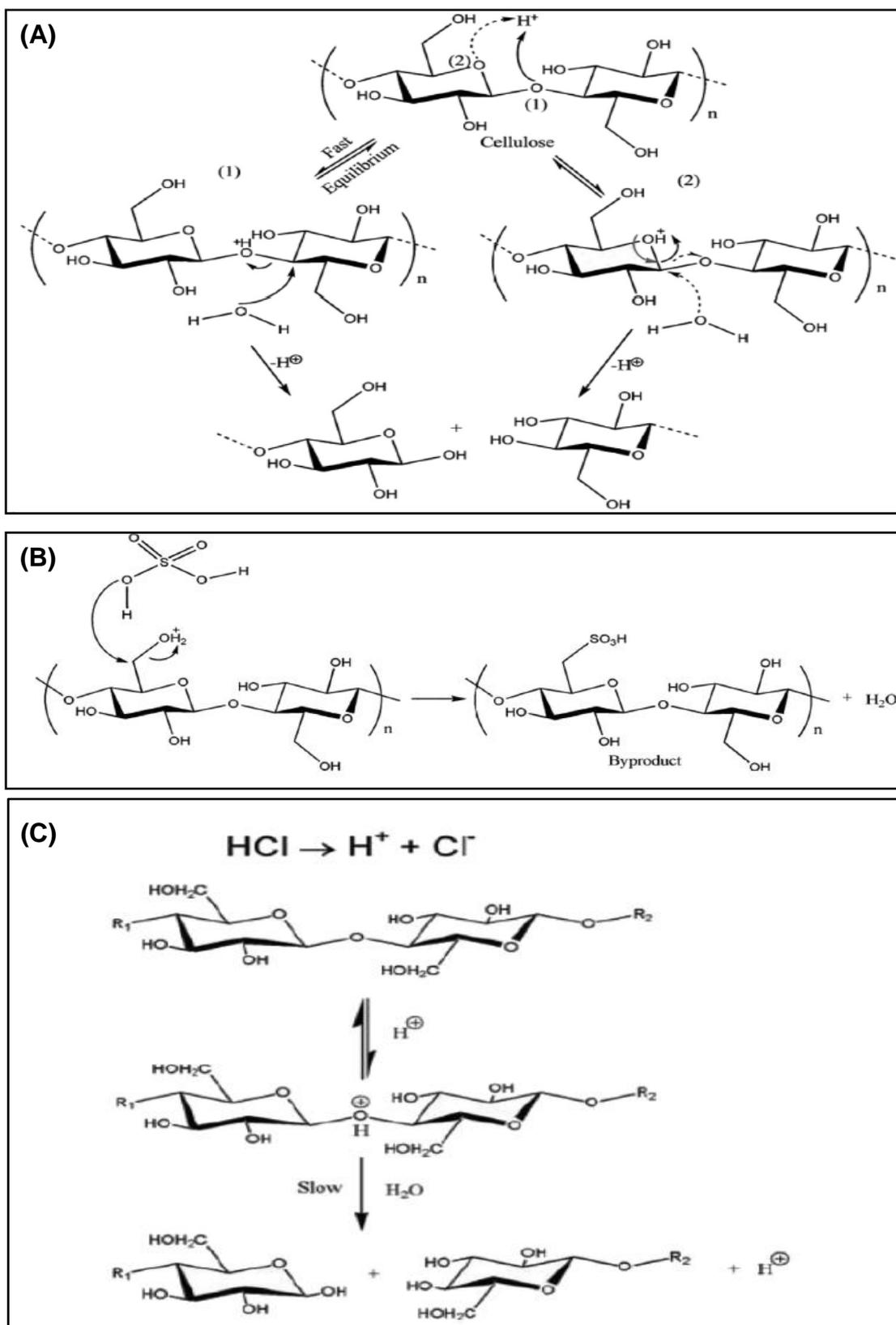


FIGURA 2.16 - Reações de hidrólise ácida (A) hidrólise com ácido sulfúrico (B) esterificação da superfície dos nanocristais de celulose (C) hidrólise com ácido clorídrico

Fonte: NG et al. ²⁶

Quando utilizado ácido sulfúrico na reação de hidrólise, grupos sulfato ancoram na superfície dos cristais produzidos a partir da esterificação dos grupos hidroxila. Estes grupos promovem a oxidação da superfície, deixando-as carregadas negativamente e com um pH ácido, criando certa repulsão entre os nanocristais prevenindo aglomerações hidrofílicas, portanto fácil dispersão em água e interessantes propriedades ópticas^{26,28}. Porém, estes grupos sulfatos ancorados nos nanocristais causam uma diminuição em sua estabilidade térmica. Quando utilizado o HCl, obtemos nanocristais com limitada dispersão em solução aquosa²⁸. Devido a isso, os NCCs produzidos a partir da hidrólise com ácido sulfúrico resultam em cristais mais estáveis e bem definidos do que em relação aos produzidos com ácido clorídrico. Na obtenção destes cristais com melhor estabilidade térmica tem-se utilizado também, além de apenas o ácido puro, uma mistura de ácidos para a realização da hidrólise^{28,26}.

Portanto, o isolamento de celulose a partir da hidrólise ácida via ácido sulfúrico é uma rota promissora na produção dos nanocristais de celulose a partir de materiais lignocelulósicos como o bagaço de cana-de-açúcar ou mesmo o resíduo do bagaço da produção de etanol de 2G, que é a fonte de celulose utilizada no presente estudo.

Capítulo 3

Objetivo

3 - OBJETIVO

Este trabalho teve como objetivo avaliar a viabilidade da utilização dos resíduos sólidos da etapa de hidrólise enzimática do processo de produção de etanol celulósico a partir do bagaço de cana-de-açúcar para a obtenção de nanocristais de celulose. Para isso, estudou-se a influência do tipo de pré-tratamento do bagaço (explosão a vapor e hidrotérmico) e da carga enzimática na liberação de glicose e na composição e propriedades físico-químicas dos NCCs. Os nanocristais de celulose foram obtidos via hidrólise ácida e estes foram caracterizados quanto à estrutura, estabilidade térmica e cristalinidade.

Capítulo 4

Materiais e Métodos

4 - MATERIAIS E MÉTODOS

O bagaço de cana-de-açúcar *in natura* (BIN) e o bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor (BEX) foram cedidos por usinas locais. O bagaço de cana-de-açúcar com pré-tratamento hidrotérmico (BH) foi cedido pelo CTBE (Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol, Campinas, SP), tendo sido preparado nas condições de 90°C por 10 min. O extrato enzimático comercial de celulases Cellic[®] CTec2 (Novozymes) foi usado na etapa de hidrólise enzimática.

4.1 - Preparação da biomassa

Primeiramente, o bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor (BEX) e o bagaço de cana com pré-tratamento hidrotérmico (BH) foram exaustivamente lavados e secos à temperatura ambiente até umidade inferior a 10%. Por fim, os materiais foram processados até granulometria inferior a 2 mm.

As demais etapas realizadas neste estudo para a obtenção dos NCCs estão esquematizadas no fluxograma da Figura 4.1 e serão descritos nos tópicos seguintes.

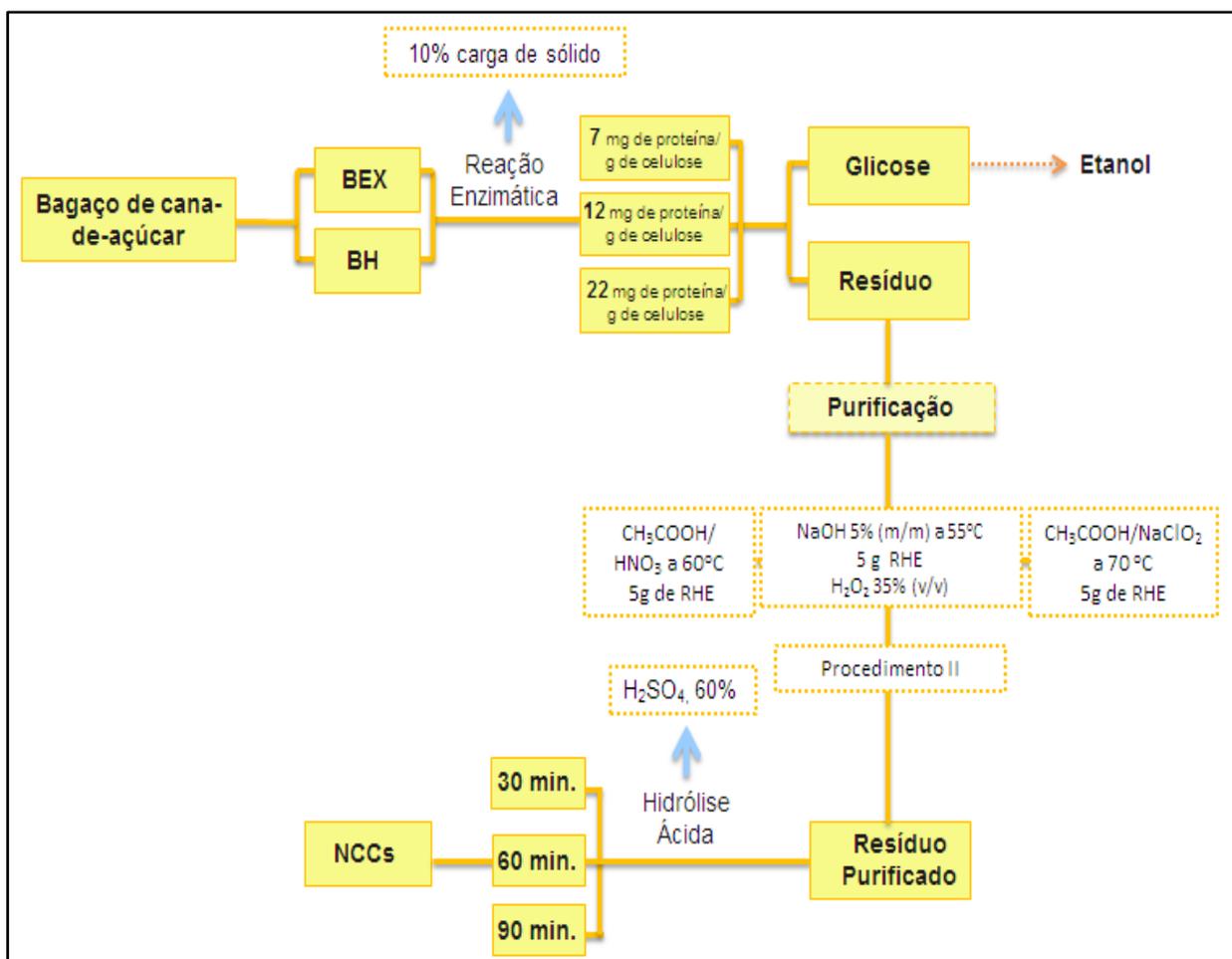


FIGURA 4.1 - Fluxograma que descreve a sequência das etapas realizadas a partir do bagaço de cana-de-açúcar com pré-tratamento hidrotérmico (BH) e a explosão a vapor (BEX), obtendo o resíduo da hidrólise enzimática (RHE) e os nanocristais de celulose (NCCs)

4.2 - Hidrólise enzimática do bagaço de cana

Os bagaços de cana pré-tratados (BEX e BH) foram submetidos à hidrólise enzimática em tampão citrato 0,1 M, pH 5,0 com uma carga de sólidos de 10% (m/v). Utilizou-se as cargas enzimáticas de 7, 12 e 22 mg de proteína por grama de celulose. Os ensaios foram realizados a 50°C e 200 rpm durante 24 h. A concentração de proteínas em mg/mL foi determinada pelo método de Bradford⁵⁴. A atividade enzimática foi previamente determinada de acordo com Ghose⁵⁵. A produção de glicose foi monitorada utilizando um kit enzimático GOD-POD (Doles, Brasil).

4.3 - Purificação do resíduo da hidrólise enzimática

A etapa de purificação seguiu as metodologias de Teixeira et al.⁵⁰. O RHE foi submetido a quatro métodos de purificação: I) Adicionou-se 100 mL de NaOH 5% (m/m) a 55°C. Em seguida, adicionou-se 5 g do resíduo da hidrólise enzimática (RHE) do BEX e do BH e 43 mL de H₂O₂ 35% (v/v) sob agitação magnética por 1,5 h e em seguida uma amostra foi coletada; II) o mesmo procedimento foi repetido para o resíduo restante do procedimento I; III) solução 10:1 (v/v) de 105 mL de ácido acético (CH₃COOH) e ácido nítrico (HNO₃) a 60°C e 5 g de fibra, sob agitação por 30 min; IV) reação com solução de 1 mL de CH₃COOH glacial e 2 g de clorito de sódio (NaClO₂) a 70°C sob agitação de 1 hora. Após este tempo, o procedimento foi repetido duas vezes e em seguida a solução foi deixada sob agitação por mais 3 horas. Todas as soluções foram filtradas a vácuo em funil de Buchner, lavando-se o resíduo até pH neutro (pH=7). Todos os materiais foram secos a 70 °C em estufa para as análises de caracterização e escolha do melhor método, para a seguir aplicar em ambos os bagaços pré-tratados.

4.4 - Hidrólise ácida do resíduo purificado

A etapa de hidrólise ácida seguiu a metodologia de Teixeira et al.⁵⁰. Assim, 5 g do resíduo da hidrólise enzimática após a purificação (RHEP) foi disperso em 100 mL de H₂SO₄ 60% (m/m) a 45°C, sob agitação vigorosa por 30, 60 e 90 min. Em seguida, adicionou-se 500 mL de água deionizada a baixa temperatura para interromper a reação de hidrólise. O H₂SO₄ foi parcialmente removido por centrifugação a 10.000 rpm durante 10 min, seguida de diálise em água com uma membrana de celulose até pH 7. A suspensão foi sonicada durante 5 min, congelada e liofilizada para posterior análise. A Figura 4.2 ilustra o sistema utilizado para extração dos nanocristais de celulose via hidrólise ácida.

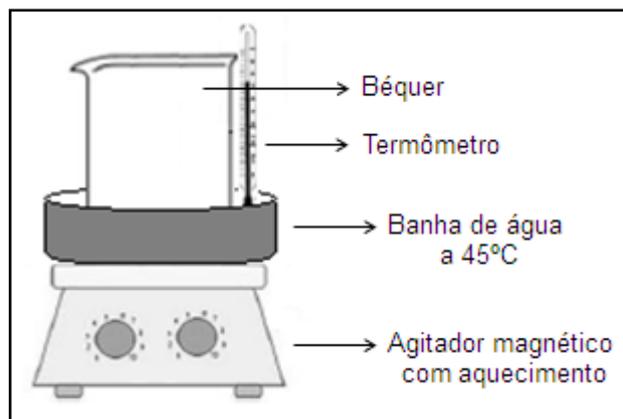


FIGURA 4.2 - Sistema mecânico utilizado para extração de nanocristais de celulose

Fonte: Adaptado de TEODORO ²⁵

4.5 - Caracterização

A composição química das amostras de BIN, BEX, BH, e RHE foram determinadas de acordo com metodologia validada por Gouveia et al. ⁵⁶. O índice de cristalinidade da celulose (IC%) foi calculado com base no método de Segal et al. ⁵⁷, empregando-se a análise de Difração de Raios X (DRX) realizada em um equipamento Shimadzu 6000 com radiação CuK α ($\lambda = 1,54 \text{ \AA}$). Os valores de IC% foram calculados a partir dos espectros de DRX com o auxílio do programa Origin (versão 8.0), segundo a Equação 4:

$$Ic = 1 - \frac{I_1}{I_2} * 100 \quad (4)$$

Onde: I_1 corresponde à intensidade referente à fase amorfa ($2\theta \sim 18,0^\circ$) e I_2 corresponde à altura referente à fase cristalina ($2\theta \sim 22,6^\circ$) em relação à linha base. O rendimento dos processos foi calculado por diferença de massa em base seca, antes e após cada etapa do processo de obtenção dos NCCs.

A identificação de grupos funcionais de todas as amostras foram realizadas em um Espectrômetro de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR-ATR) usando um equipamento Bruker modelo Vertex 70, medido em ATR com cristal de diamante, de 4000 a 400 cm^{-1} em resolução de 4 cm^{-1} e varredura de 32 scans. As análises microscópicas foram realizadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) equipada com um canhão de emissão de campo (FEG). Para as análises por MEV, as amostras de BIN, BEX, BH, RHE e RHEP foram previamente fixadas em *stubs* de alumínio com fita de carbono e revestidos com ouro. A

morfologia dos NCCs foi estudada a partir de imagens de Microscopia de transmissão (MET- modo STEM), obtidas em equipamento Tecnai™ G2 F20 com um detector de campo escuro (DF). As amostras foram preparadas com a deposição de uma gota da suspensão diluída e depositada num grid de carbono (400 mesh), e foi corada com uma solução a 1,5% de acetato de uranila e secou-se à temperatura ambiente. A Microscopia de Força Atômica (AFM) Dimension V (Veeco, EUA) teve suas imagens obtidas em modo tapping™ com velocidade de varredura de 1Hz, constante de força de 48N/m e frequência de ressonância de 190 kHz.

A caracterização do perfil térmico das amostras utilizadas neste estudo foram realizadas em um equipamento de termogravimetria (TG/DTG), marca TA Instruments, modelo Q500, com aproximadamente 7-8 mg de amostra em panela de platina. O experimento foi programado com rampa de aquecimento de 25 a 600 °C com razão de aquecimento de 10 °C/min⁻¹ com vazão de 60 mL/min⁻¹ em atmosfera de ar sintético. Os seguintes parâmetros foram extraídos da curva de TG/DTG: Volatilidade (% H₂O) que é a estimativa da perda de massa a 150 °C, T_i (temperatura de início da degradação) foi obtida a partir do método onset, fazendo-se o prolongamento da região linear após a liberação dos voláteis do primeiro patamar com a região linear de perda de massa da primeira termo-oxidação. A Figura 4.3 exemplifica este método utilizado para obtenção do valor da temperatura inicial de degradação (T_i) das amostras estudadas.

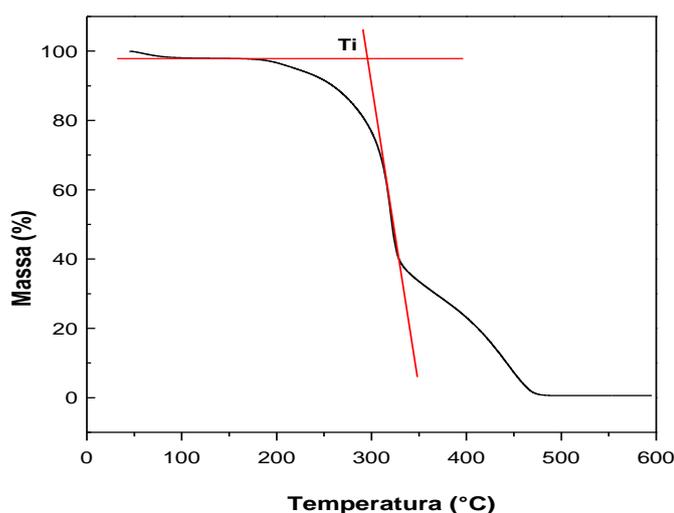


FIGURA 4.3 - Método onset para obtenção da temperatura inicial de degradação (T_i)

O rendimento dos processos foi calculado a partir da diferença de massa do material de partida e de produto final obtido, além das massas obtidas ao longo dos processos.

Capítulo 5

Resultados e Discussão

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 - Composições das amostras e conversão enzimática

Neste trabalho foram utilizados como matéria-prima os bagaços de cana-de-açúcar submetidos aos pré-tratamentos por explosão a vapor (BEX) e hidrotérmico (BH). Estes materiais foram submetidos à reação de hidrólise enzimática utilizando diferentes cargas de enzima de um preparado comercial de celulasas (7, 12 e 22 mg de proteína/g de celulose). Os diferentes tipos de bagaço, bem como os sólidos residuais obtidos após a etapa de hidrólise enzimática foram caracterizados quimicamente quanto à sua composição. A Tabela 5.1 apresenta os teores de celulose, hemicelulose e lignina para os seguintes materiais: bagaço *in natura* (BIN), bagaço pré-tratado por explosão a vapor (BEX) e para os resíduos das reações de hidrólise enzimática de BEX realizadas com as cargas enzimáticas de 7 mg de proteína/g de celulose (RHE-7), 12 mg de proteína/g de celulose (RHE-12) e 22 mg de proteína/g de celulose (RHE-22).

TABELA 5.1 - Composição (m/m, base seca) do bagaço *in natura* (BIN), pré-tratado por explosão a vapor (BEX) e dos diferentes resíduos das reações de hidrólise enzimática realizadas com diferentes cargas enzimáticas com os respectivos dados de conversão enzimática

	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Conversão (%)	Glicose (g/L)
BIN	46,6	26,5	21,7	-	-
BEX	61,5	4,5	32,0	-	-
RHE-7	48,3	3,1	39,8	25,9	18,1
RHE-12	39,3	2,9	43,0	38,9	27,0
RHE-22	25,2	2,0	49,6	55,5	38,9

Paralelamente, a Tabela 5.2 apresenta os resultados da análise de composição obtidos a partir de bagaço hidrotérmico (BH). A comparação entre os dois tipos de bagaço pré-tratados (BEX e BH) e o BIN mostra que o pré-tratamento resultou na remoção da fração hemicelulósica, levando a um enriquecimento da biomassa em celulose e lignina (Tabelas 5.1 e 5.2).

TABELA 5.2 - Composição (m/m, base seca) do bagaço in natura (BIN), pré-tratado hidrotêrmicamente (BH) e dos diferentes resíduos das reações de hidrólise enzimática realizadas com diferentes cargas enzimáticas com os respectivos dados de conversão enzimática

	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Conversão (%)	Glicose (g/L)
BIN	46,6	26,5	21,7	-	-
BH	54,6	6,5	33,4	-	-
RHE-7	53,6	4,8	30,6	33,5	20,5
RHE-12	49,1	4,4	34,4	45,3	27,9
RHE-22	42,9	4,0	34,5	59,9	37,8

Devido a isto, é de grande importância a escolha de uma tecnologia adequada de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica, pois esta etapa proporciona aumento da fração celulósica e também uma maior acessibilidade das enzimas ao substrato, resultando em uma elevação do rendimento de açúcares fermentescíveis^{9,42,43}.

No presente estudo os pré-tratamentos da biomassa avaliados foram o de explosão a vapor e o hidrotêrmico, onde ambos os pré-tratamentos apresentaram a eficiência desejada quanto à remoção de componentes da matriz lignocelulósica melhorando a acessibilidade da fibra para as etapas subsequentes.

Adicionalmente, conforme esperado observa-se para os diferentes RHE's uma diminuição da quantidade de celulose na medida em que se aumentou a carga enzimática na etapa de hidrólise, como resultado da ação das enzimas na sacarificação da celulose, com ligeiro decréscimo no teor de hemicelulose e um enriquecimento em lignina (Tabelas 5.1 e 5.2). Esse dado é decorrente da maior conversão enzimática de celulose em relação ao BEX (Tabela 5.1) com o aumento da carga enzimática, e o mesmo pode ser observado para o BH (Tabela 5.2).

Além da conversão, a Tabela 5.1 e 5.2 apresentam os teores de glicose para cada carga enzimática em ambos os bagaços utilizados. Utilizando ambos os materiais de partida (BEX e BH) para a hidrólise enzimática, alcançaram-se maiores de conversão e teor de glicose nas mais altas cargas de enzimas, com destaque ligeiramente superior para o BH em relação ao BEX, como pode ser observado nas Figuras 5.1 e 5.2. Na Figura 5.1 também pode ser observada a

dependência linear entre a conversão enzimática de celulose e a carga enzimática, dentro da faixa avaliada no presente estudo, sendo que tanto o BEX, quanto o BH apresentaram altas correlações lineares ($R^2 \sim 0,98$ para ambas as matrizes). A Figura 5.2 apresenta uma comparação para as cargas enzimáticas usadas entre o BEX e o BH em relação ao teor de glicose liberado na fase líquida (em g/L), no qual apresentou também uma dependência entre a quantidade de glicose liberada e a carga enzimática utilizada.

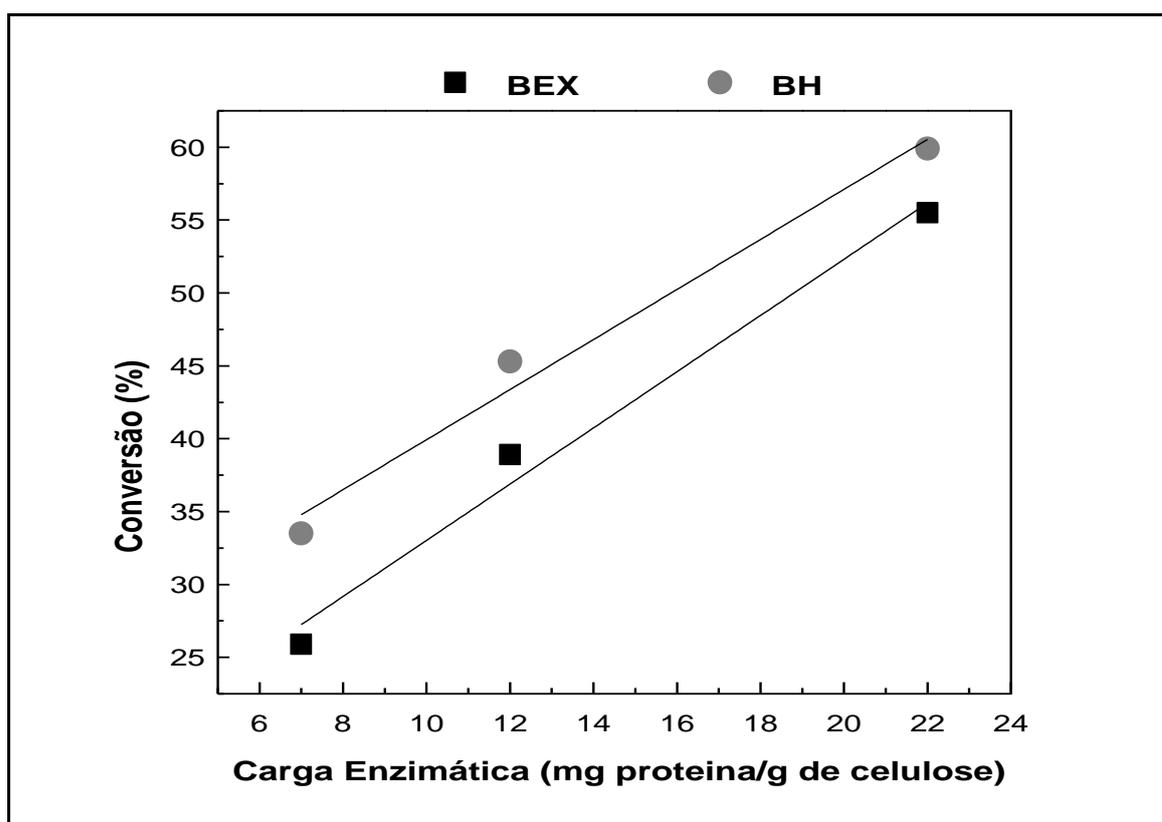


FIGURA 5.1 - Correlação linear entre a carga enzimática e a conversão de celulose na etapa de sacarificação do bagaço com pré-tratamento por explosão a vapor e hidrotérmico

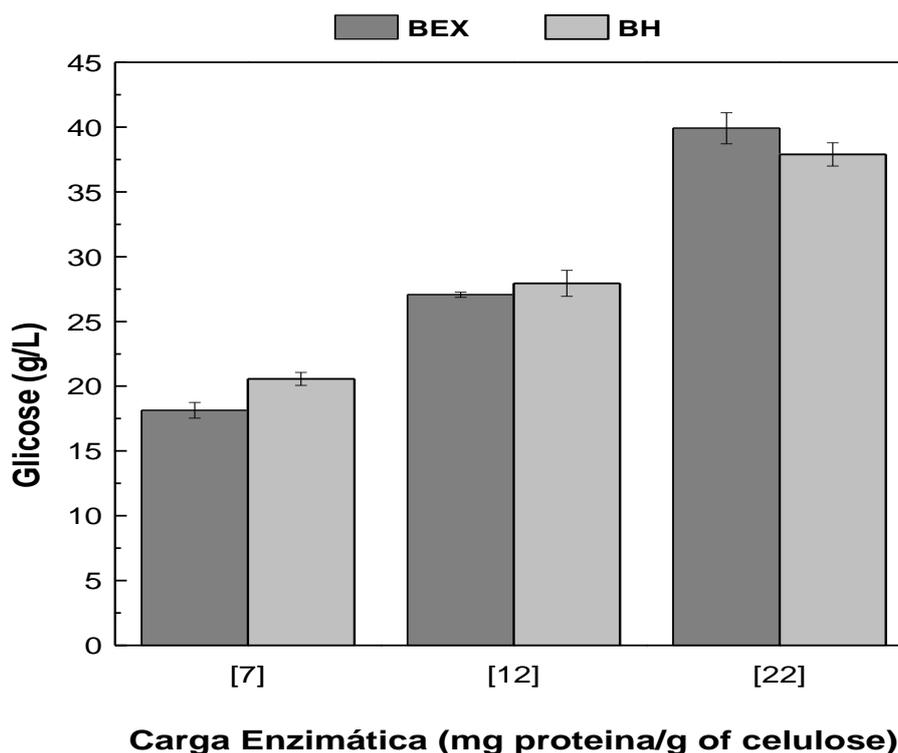


FIGURA 5.2 - Comparação do teor de glicose para as cargas enzimática de 7, 12 e 22 mg de proteína/g de celulose entre o bagaço com pré-tratamento por explosão a vapor e hidrotérmico

O hidrolisado (fase líquida) obtido após a hidrólise apresentou teores de glicose de até 38,9 g/L para o BEX e 37,8 g/L para o BH. Estes resultados mostram que podem ser obtidas quantidades consideráveis de glicose disponível para a produção de etanol. Conforme a quantidade de enzimas aumenta a quantidade de glicose disponível também aumenta sucessivamente, podendo estar mais de acordo com os interesses da indústria sucroalcooleira. Ainda assim, como podemos observar nas Tabelas 5.1 e 5.2, mesmo com os maiores teores enzimáticos, o resíduo ainda apresenta celulose para a produção de NCCs.

Estruturalmente, sabe-se que a porção amorfa da celulose é mais facilmente hidrolisada pela ação das enzimas. Portanto, as maiores cargas enzimáticas promoveram as maiores conversões, como resultado da maior quantidade de enzimas disponível para atuar sobre a porção mais susceptível da celulose à sacarificação no mesmo intervalo de tempo (24 horas). Por este motivo, esperava-se que os resíduos das reações de hidrólise apresentassem uma

composição rica em celulose mais cristalina, o que foi corroborado adiante pela determinação dos índices de cristalinidade.

As Figuras 5.3 e 5.4 apresentam as micrografias obtidas por MEV para os bagaços de cana-de-açúcar (BIN, BEX e BH) e para os resíduos da hidrólise enzimática respectivamente.

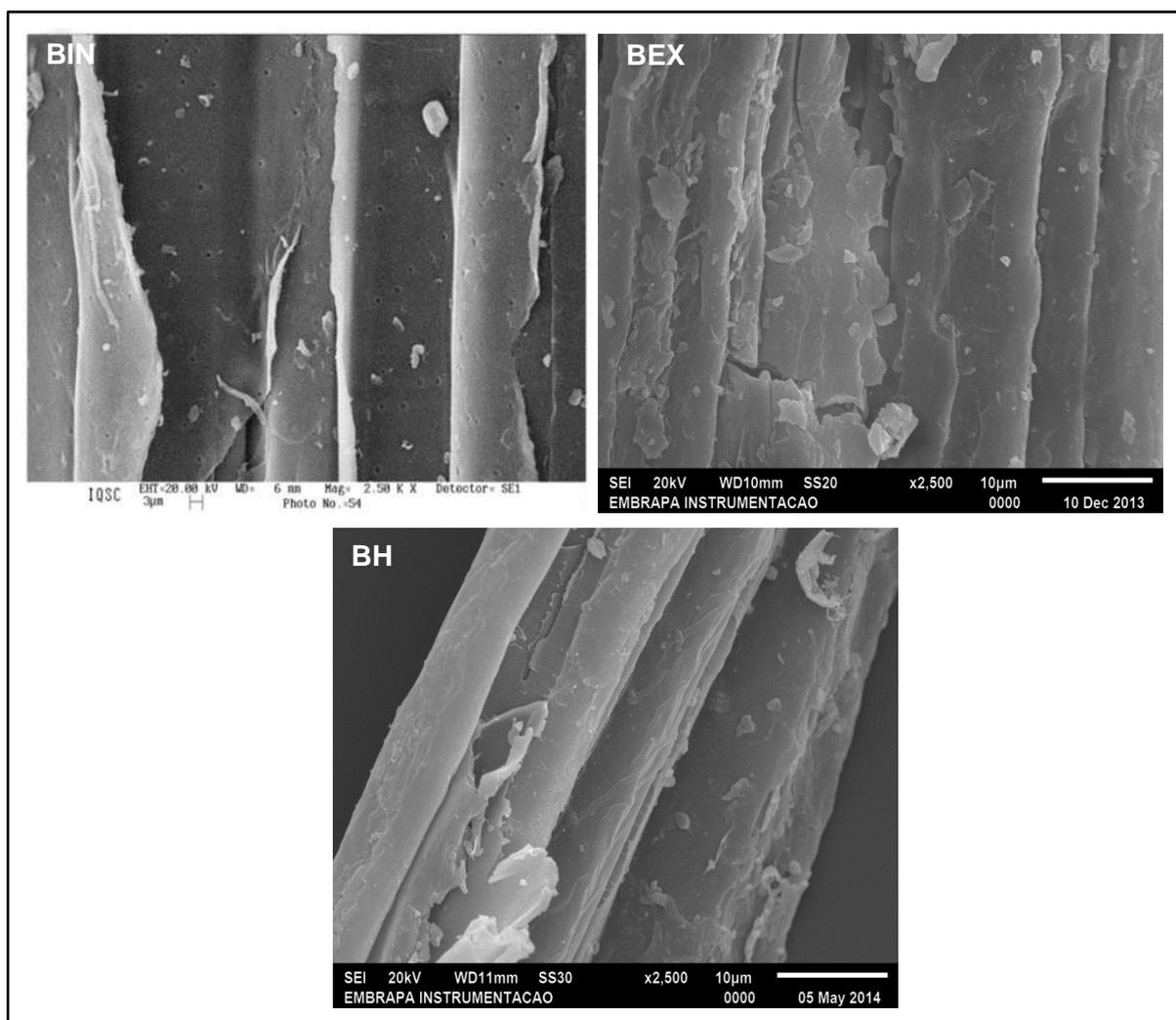


FIGURA 5.3 - Micrografia de MEV do bagaço de cana: *in natura* (BIN), pré-tratamento a explosão a vapor (BEX) e pré-tratamento hidrotérmico (BH)

O BIN (Figura 5.3) apresenta uma morfologia rígida e compactada, enquanto os outros materiais exibiram morfologia aparentemente de um agregado de fibras. A partir do teor de celulose e hemicelulose (Tabelas 5.1 e 5.2) e das Figuras 5.3 do BEX e do BH, pode-se sugerir que o pré-tratamento por explosão a vapor desestruturou mais a estrutura das fibras lignocelulósicas do que o pré-tratamento hidrotérmico. Apesar disso, as maiores conversões enzimáticas de celulose foram alcançadas para o BH em todas as cargas enzimáticas avaliadas no

presente estudo, como mostrado nas Tabelas 5.1 e 5.2. A explicação pode ser encontrada na possível geração diferencial de inibidores da atividade enzimática frente às diferentes tecnologias de pré-tratamento. Se por um lado, o pré-tratamento por explosão a vapor é capaz de causar uma maior modificação nos materiais lignocelulósicos, provavelmente ocasiona uma maior geração de compostos de degradação que agem inibindo a ação do complexo enzimático^{42,43}.

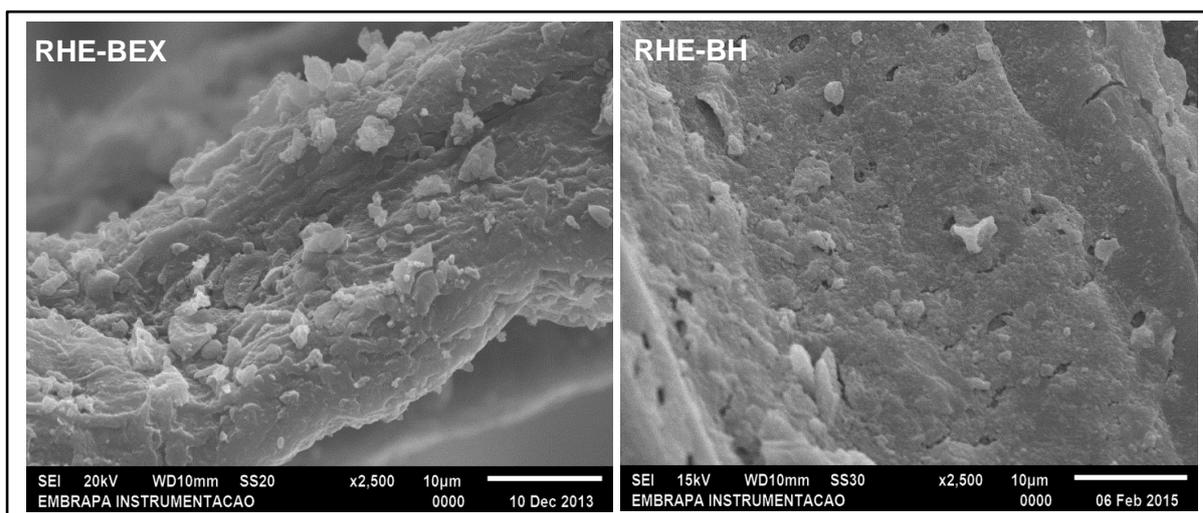


FIGURA 5.4 - Micrografia de MEV dos resíduos das hidrólises enzimáticas com carga de 12 mg de proteína/g de celulose do bagaço com pré-tratamento por explosão a vapor e hidrotérmico

A Figura 5.4 mostra as fibras resultantes da etapa de hidrólise enzimática com carga de 12 mg de proteína/g de celulose, tanto para o BEX quanto para o BH. Estas imagens possibilitam a visualização das fibras após a reação enzimática. Observando as Figuras 5.3 e 5.4 é possível notar que tanto para o BEX quanto para o BH as fibras apresentam-se pouco mais desconstruídas, isso se deve ao pré-tratamento e à ação enzimática no processo de hidrólise.

Portanto, tanto o pré-tratamento como a hidrólise enzimática causaram efeitos na estrutura rígida da biomassa lignocelulósica. No entanto, para a aplicação do resíduo sólido da hidrólise enzimática na produção de NCCs observou-se ser necessária uma purificação deste resíduo preliminar ao processo químico de hidrólise ácida.

5.2 - Purificação dos resíduos da hidrólise enzimática

A partir dos resultados apresentados anteriormente, os pré-tratamentos removeram a maior parte da fração hemicelulósica e a etapa de hidrólise enzimática

converteu uma porção de celulose em glicose, que são os principais componentes das camadas secundárias das paredes das células de fibras lignocelulósicas, no caso do presente estudo, o bagaço de cana-de-açúcar. Portanto, os resíduos gerados se tornaram materiais altamente ricos em lignina, como mostrado nas Tabelas 5.1 e 5.2. Ainda assim, a presença de lignina, que é uma substância amorfa hidrofóbica, impede a exposição da fibra a processos químicos, o que é estritamente necessário para obter alta eficiência na etapa de hidrólise ácida para a geração dos NCCs.

Quatro métodos de purificação do resíduo fibroso sólido foram realizados com o intuito de proporcionar a dissolução dos domínios amorfos da celulose³⁷. O primeiro utilizando NaOH 5% (m/m) e H₂O₂ 35% (v/v), o segundo foi repetido o procedimento anterior no material restante. O terceiro foi realizado a partir de uma mistura de ácidos, acético (CH₃COOH) e nítrico (HNO₃) e o quarto a partir de uma solução de ácido acético glacial e clorito de sódio (NaClO₂). A Figura 5.5 apresenta os difratogramas de Raios X para os métodos de purificação do RHE-12.

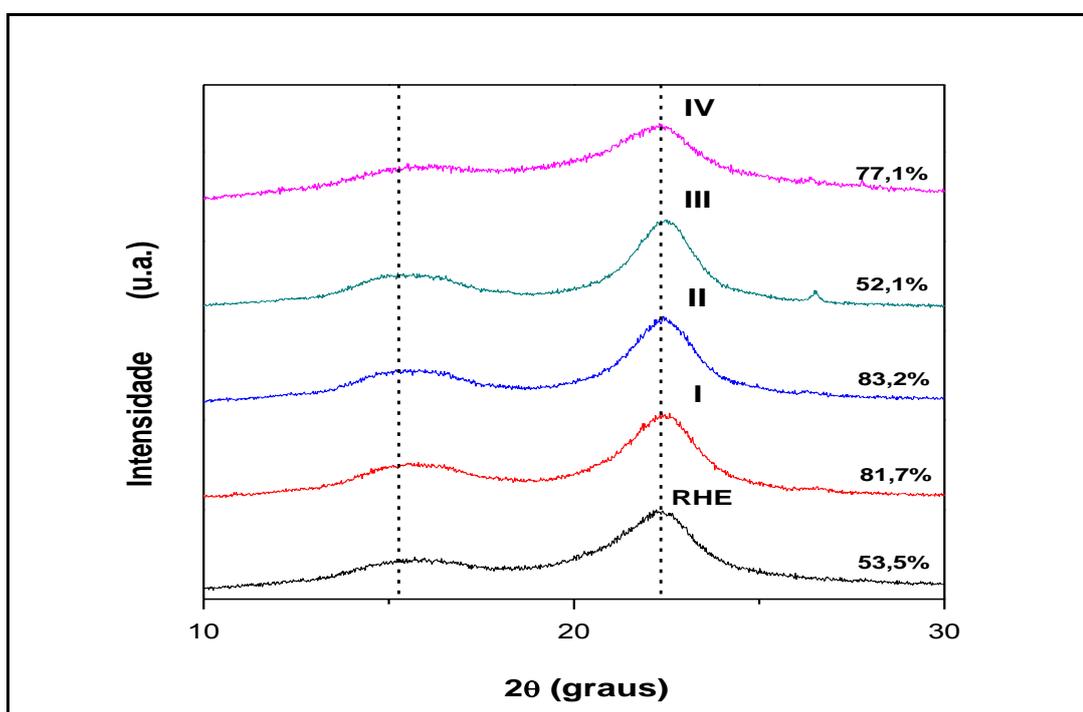


FIGURA 5.5 - Difratograma de Raios X para o RHE e para os métodos de purificação I (NaOH/H₂O₂), II (NaOH/H₂O₂ repetido), III (CH₃COOH/NaClO₂) e IV (CH₃COOH/ HNO₃)

Os índices de cristalinidade da celulose (IC%) encontrados para o resíduo da hidrólise enzimática (RHE) do bagaço pré-tratado por explosão a vapor

para a carga enzimática de 12mg de proteína/g de celulose, ao qual foi o material de partida para os métodos de purificação estudados, e para os quatro métodos de purificação estão apresentados no difratograma acima e foram obtidos pelo método de Segal et al.⁵⁷ descrito na seção 4.5.

No presente estudo, comparado com o RHE, que foi o material de partida para estes pré-tratamentos, com IC% de 53,5%, todos os quatro métodos testados de purificação do resíduo possibilitaram a remoção da lignina residual, permitindo uma maior exposição à celulose, com índices de cristalinidade semelhantes aos da literatura para as determinadas condições, sendo que o método que apresentou melhor resultado foi o de H₂O₂ (método II) em meio básico, com um IC% de 83,2%, apresentando um aumento de aproximadamente 30% no IC% em relação ao RHE.

Este processo gerou um material composto com alto teor de celulose cristalina, demonstrando que este resíduo sólido apresentou maior potencial para a etapa de hidrólise ácida. Sendo assim, os procedimentos de purificação subsequentes foram realizados segundo este método.

Estudos semelhantes relacionados à purificação do bagaço de cana-de-açúcar foram realizados por PEREIRA, et al.⁸. O autor utilizou um método de purificação diferente dos testados, sendo realizado com cloreto de sódio em meio ácido, onde a porcentagem de lignina passou de 23,4% do bagaço para 0,3% no resíduo purificado. Quanto à hemicelulose foi de 28,7% do bagaço para 6,4% no resíduo purificado, porém o IC% foi de 56%⁸. Este resultado é similar ao encontrado no método III deste presente trabalho, que foi de 52,1%, e no qual também se utilizou ácido acético.

Esses resultados encontrados por Pereira et al.⁸ e obtidos pelo método III mostraram eficiência na remoção de lignina e parte da hemicelulose. No entanto, o menor IC% poderia causar menor rendimento na reação de produção dos NCCs em relação ao método I, II e IV que apresentaram IC% superiores a 77%. Portanto, a utilização de métodos de purificação com a presença de ácido não seria viável para este trabalho.

No caso de TEIXEIRA et. al.⁵⁰, que realizou a purificação do bagaço de cana-de-açúcar, a porcentagem restante de lignina após a purificação foi de 5,8% porém com reação de peróxido de solução alcalina. Neste caso, os índices de cristalinidade ficaram próximos de 76%. EL MIRI, et al.³⁷ também realizaram este

método de purificação para o bagaço de cana-de-açúcar e o IC% encontrado foi de 77%.

A Figura 5.6 apresenta as micrografias obtidas por MEV destes resíduos da hidrólise enzimática de 12 mg de proteína/g de celulose após o processo de purificação II (RHEP).

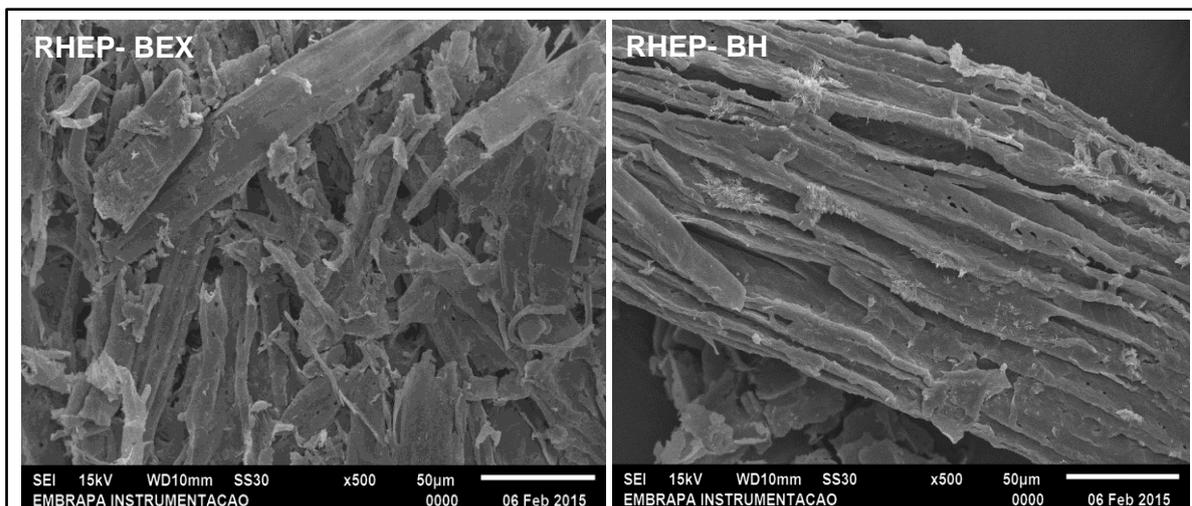


FIGURA 5.6 - Micrografia de MEV dos resíduos da hidrólise enzimáticas de 12 mg de proteína/g de celulose purificados do bagaço explodido (RHEP-BEX) e do bagaço hidrotérmico (RHEP-BH)

Como pode ser observado nas micrografias, o material apresenta leves fissuras em suas fibras, devido à remoção de parte do material amorfo ainda presente como também parte delas se mostraram um pouco mais quebradiças devido aos processos químicos sequenciais de pré-tratamento, hidrólise enzimática e purificação em que esta já foi submetida. Essas áreas de maior exposição permitem que o processo de hidrólise ácida seguinte possa apresentar melhor eficiência, pois possibilita que o ácido utilizado consiga penetrar na fibra por meio de suas aberturas, gerando um melhor aproveitamento da reação.

Segundo SUN et al. ⁷, vários processos já foram testados para o isolamento da celulose, mas alguns empregavam produtos considerados tóxicos. Na atualidade, os tratamentos são realizados a partir de diversos agentes, tais como, os peróxidos de metais alcalinos, clorito de sódio acidificado, misturas ácidas e misturas alcalinas, possibilitando um maior rendimento na produção de celulose purificada e nanocristalina. É válido ressaltar que o desempenho do tratamento e sua escolha são variáveis de acordo com o material. Para a produção de nanocristais de celulose, dependendo da recalcitrância do material de partida, é necessária a

realização de um tratamento mais severo e, em alguns casos, são realizados em mais de uma etapa, para que gere um material com elevada pureza, melhorando a acessibilidade da fibra, como foi o caso do presente estudo.

O processo de purificação utilizado neste trabalho é também chamado de mercerização (tratamento com NaOH), no qual a estrutura da celulose é mantida³⁰. Em altas concentrações de NaOH, os poros maiores da celulose são ocupados pelos cátions Na⁺, avançando até o espaçamento dos planos cristalinos da celulose. Após a lavagem com água, estes íons são removidos e outro tipo de retículo cristalino é formado nas etapas subsequentes originando a celulose tipo II^{20,30}. No caso do presente estudo como a concentração de NaOH foi de 5%, esta não seria o suficiente para transformar a celulose, porém teve influência no índice de cristalinidade das amostras aumentando-os, devido à remoção de porções amorfas como hemicelulose e lignina restantes nos materiais. Ambas as afirmações podem ser observadas e mais amplamente exploradas na sessão 5.3 nos difratogramas apresentados.

5.3 - Análise físico-química dos materiais

As propriedades dos NCCs produzidos esta diretamente ligada às condições e fonte de obtenção. Fatores como temperatura, reagente e tempo quando realizada a obtenção por hidrólise ácida podem afetar a cristalinidade e o tamanho dos nanocristais obtidos. Portanto a otimização destes parâmetros é de grande importância e varia conforme os pré-tratamentos já realizados no material lignocelulósico¹¹. Estudos realizados por BONDESON et al.⁵⁸ obtiveram NCCs a partir de celulose microcristalina com tamanhos entre 200 a 400 nm via hidrólise ácida a base de ácido sulfúrico com tempo de reação de 2 horas. CHEN et al.¹¹ realizou um estudo semelhante porém com tempos variando de 4 em 4 horas, até 24 horas de reação utilizando como matriz casca de ervilha. Ele obteve NCCs de 400 nm até 240 nm. Diferenças nos perfis cristalográficos foram observados por CHEN et al.¹¹ conforme ele aumentou o tempo de hidrólise ocorreu o aparecimento de outros perfis de celulose. O objetivo do trabalho de CHEN et al.¹¹ foi a aplicação destes NCCs em filmes de amido de ervilha, e os que apresentaram melhores propriedades para esta aplicação foram os produzidos com o tempo de 8 h. Assim, dependendo da aplicação e do material de partida os tempos de hidrólise podem variar entre grandes intervalos.

Portanto, neste trabalho foram estudados tempos variados de hidrólise ácida, com o intuito de prevenir que parte da celulose seja digerida no processo de obtenção dos NCCs devido aos diversos processos químicos aos quais o material já foi submetido. Os tempos de extração foram de 30, 60 e 90 minutos e só foi realizado nas amostras de BEX por ser um estudo prévio. A Figura 5.7 apresenta os difratogramas de Raios-X para estas amostras, onde as linhas pontilhadas apresentam picos característicos da celulose e a Tabela 5.3 apresenta os índices de cristalinidade das mesmas.

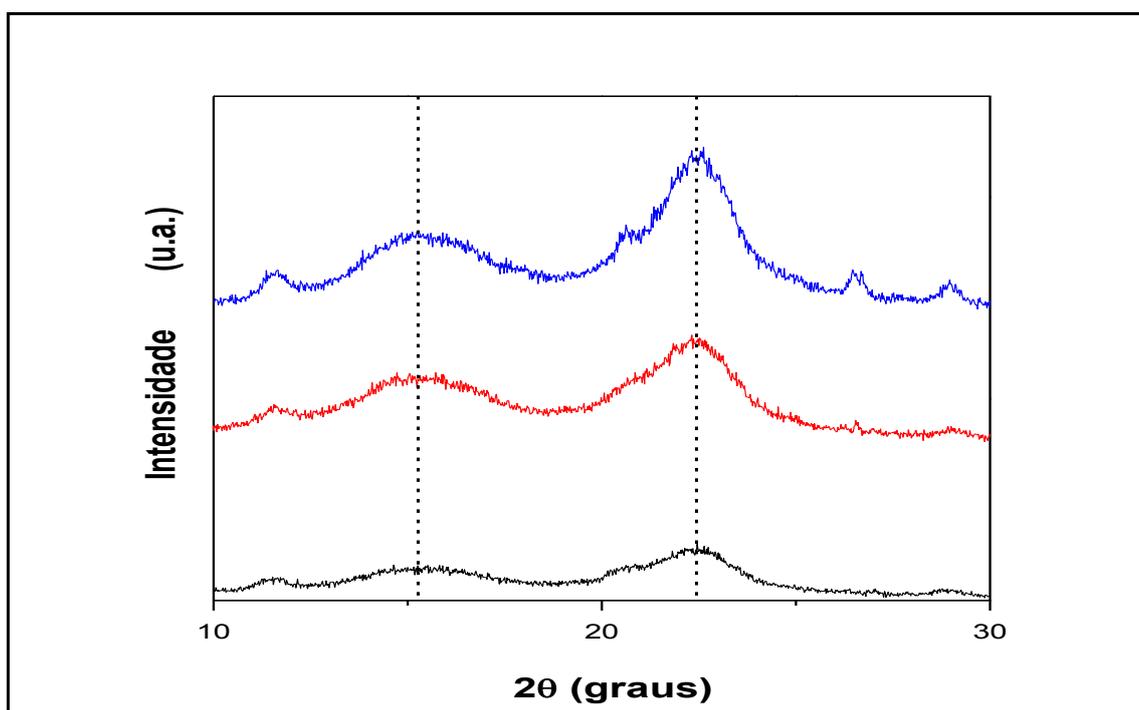


FIGURA 5.7 - IC (%) para os nanocristais de celulose (NCCs) com 30, 60 e 90 min. de extração

TABELA 5.3 - IC (%) para os nanocristais de celulose (NCCs) com 30, 60 e 90 min. de extração

	30min.	60min.	90min.
IC (%)	77,0	75,0	79,0

Comparando-se os difratogramas e observando os dados da Tabela 5.3, é possível notar que os IC encontrados são bem próximos. A Figura 5.8 apresenta os difratogramas de raios-X (DRX) para as amostras de BEX e BH, bem como para os resíduos das reações de hidrólise enzimática realizadas em diferentes cargas de enzimas, antes e após a purificação, e para os respectivos NCCs.

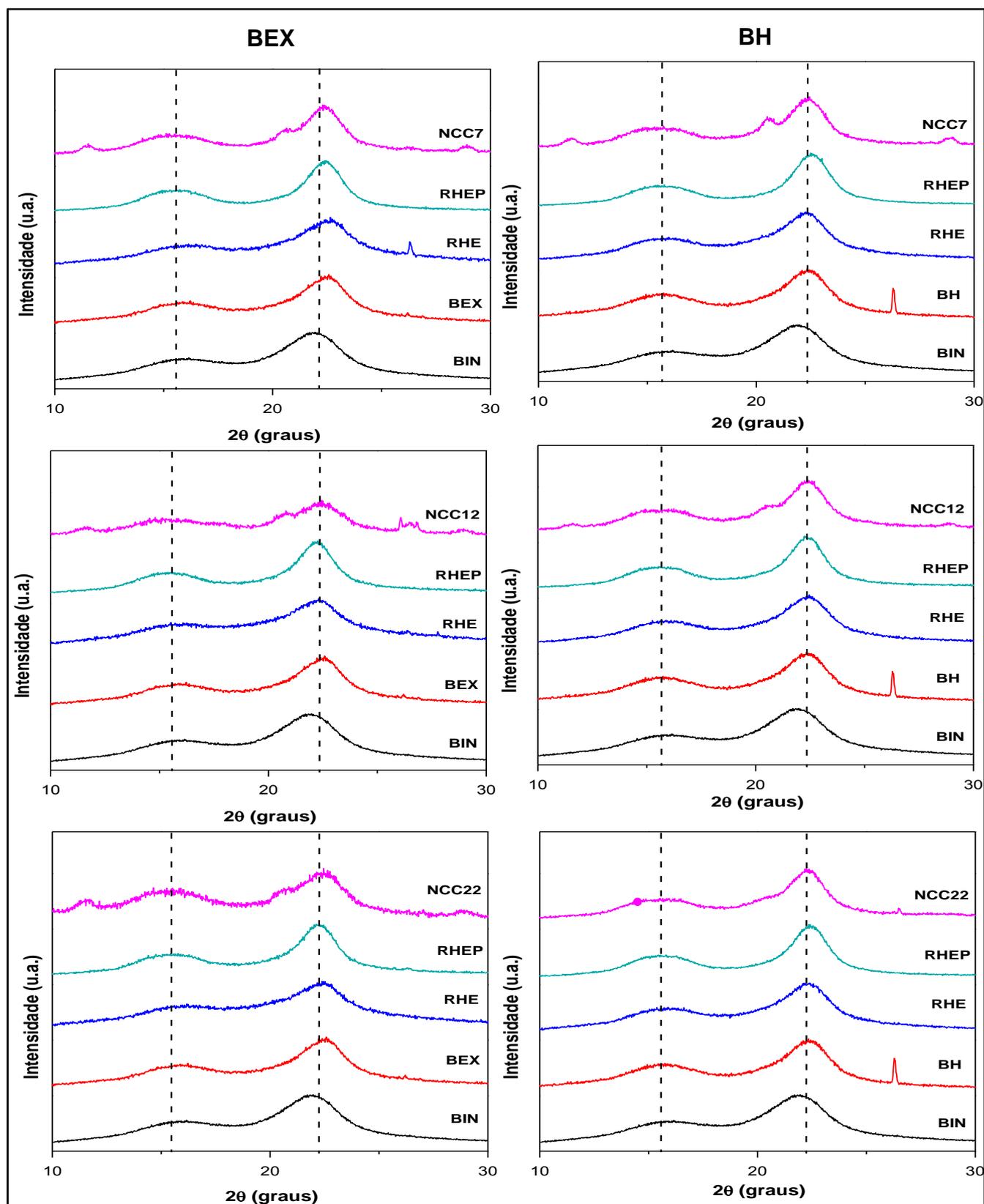


FIGURA 5.8 - Difratoograma de Raios-X para o bagaço com pré-tratamento por explosão a vapor e hidrotérmico

O DRX do BIN apresentou um IC de 55%. Por outro lado, o IC para o BEX foi de 65,0% e para o BH foi de 67,8%, o que indica preferencialmente a remoção de hemicelulose (substância amorfa) a partir dos pré-tratamentos por explosão a vapor e hidrotérmico. Na Tabela 5.4 e 5.5 são apresentados os índices de cristalinidade calculados a partir dos difratogramas acima de para os resíduos e NCCs de ambos os tipos de bagaço estudados.

TABELA 5.4 - IC (%) das amostras obtidas a partir do bagaço explodido para o resíduo da hidrólise enzimática (RHE), resíduo da hidrólise enzimática purificado (RHEP) e nanocristais de celulose (NCCs)

IC (%) - BEX			
	RHE	RHEP	NCCs
7	60,3	85,2	79,8
12	53,5	83,7	79,5
22	52,0	82,0	77,0

TABELA 5.5 - IC (%) das amostras obtidas a partir do bagaço hidrotérmico para o resíduo da hidrólise enzimática (RHE), resíduo da hidrólise enzimática purificado (RHEP) e nanocristais de celulose (NCCs)

IC (%) - BH			
	RHE	RHEP	NCCs
7	64,6	83,4	79,6
12	63,5	82,0	79,7
22	65,3	81,4	78,3

Entre os resíduos da etapa de hidrólise enzimática (RHE) e aqueles resultantes da etapa de purificação (RHEP), ocorreu uma relevante remoção da lignina, permitindo uma maior exposição de celulose. Os maiores índices de cristalinidade de celulose (IC, %) para as amostras obtidas a partir de BEX, foi na concentração de 7 mg de proteína/g de celulose variando de 60,3% para os RHE's e de 85,2% para os RHEP's (Tabela 5.4). Efeitos semelhantes foram observados, para as amostras obtidas a partir de BH, onde a variação foi de 64,3% para os RHE's e de 84,4% para os RHEP's (Tabela 5.5). Para maiores concentrações de enzimas, em ambas as matrizes, os índices de cristalinidade não tiveram uma grande

divergência em relação aos apresentados, diminuindo gradativamente tanto para os RHE's quanto para os RHEP's conforme as quantidades de enzimas aumentam. Índices de cristalinidade maiores para os resíduos com menores cargas enzimáticas já eram esperados devido a menor quantidade de enzima participando da reação, restando mais material cristalino na amostra, possibilitando IC mais elevados.

Portanto, como pode ser observado nos resultados da Tabela 5.4 e 5.5, ficou comprovada a efetividade dos tratamentos de purificação utilizados no presente estudo, gerando materiais com alto teor de celulose cristalina e, assim, com maior potencial para seguir para a etapa seguinte de hidrólise ácida e produção de nanocristais de celulose. Resultados semelhantes foram apresentados para NCCs preparados a partir de matrizes lignocelulósicas^{22,50}.

No caso dos NCCs, produzidos pela hidrólise ácida os difratogramas para ambas as matrizes (Figura 5.8) exibiram picos típicos de celulose I (a $2\theta \sim 15,7^\circ$ e $22,4^\circ$)^{29,56}. Leves alterações no perfil dos difratogramas de NCCs podem ser observados em aproximadamente $11,5^\circ$ e $20,4^\circ$ de 2θ como também em alguns casos em $29,2^\circ$ de 2θ apresentados na Figura 5.8. Este fato pode ter ocorrido devido à água decorrente do abastecimento público utilizada na etapa de diálise da hidrólise ácida, que poderia conter elevada quantidade de cálcio, sendo considerada água dura, reagindo com o ácido sulfúrico ainda presente nas amostras na etapa final da produção dos NCC, a diálise, formando gipsita. A gipsita, ou também conhecida como gesso, é constituída de sulfato de cálcio dihidratado ($\text{Ca}(\text{SO}_4) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e apresenta picos intensos característicos nas regiões de $11,5^\circ$, $20,4^\circ$, $29,2^\circ$ de 2θ , o que corresponde com a alteração encontrada nas amostras de NCCs obtidas via hidrólise ácida/diálise^{59,60}. Os picos característicos da gipsita encontrados nos NCCs são de menor intensidade e não apresentaram influência nas propriedades como tamanho, propriedade térmica e morfologia. O difratograma da gipsita esta apresentado em anexo.

Os NCCs apresentaram altos índices de cristalinidade, apresentando como maior IC as amostras com 7mg de proteína /g de celulose, com IC de 79,8% para o BEX e 79,6% para o BH (Tabelas 5.4 e 5.5). Os menores valores de IC dos NCCs foram para as amostras de 22mg de proteína /g de celulose, com IC de 77,0% para o BEX e 79,3% para o BH (Figura 5.8, Tabelas 5.4 e 5.5).

Este efeito é semelhante ao que ocorreu para os RHE e RHEP e podem ser justificados pela quantidade de enzima disponível na reação de hidrólise

enzimática. As amostras com concentração de 12 mg de proteína/g de celulose apresentaram valores intermediários entre as das concentrações apresentadas, tanto para os NCCs quanto para o RHE e RHEP. Efeitos semelhantes para o índice de cristalinidade dos NCCs foram observados por TEIXEIRA, et al.⁵⁰ com NCCs de bagaço de cana-de-açúcar, CHEN et al.¹¹ para NCCs de fibras de casca de ervilha, CORREA, et al.²⁰ para NCCs de Curauá, LU et al.⁶¹ com NCCs de *Pennisetum Sinese* e MARTINS, et al.²² para NCCs de capim Mombaça.

Os índices de cristalinidade de celulose para estes estudos variaram de 70-80%, similar ao presente estudo. Portanto, os NCCs produzidos apresentaram alto IC e valores muito próximos aos encontrados na literatura, mesmo com diferentes materiais de partida. Estes resultados mostram que o método de obtenção se adequa a ambos os materiais estudados. Os tempos alteram o aspecto visual da amostra. Em 30 min como visualizado na Figura 5.9 (E) dos NCC em pó, o material apresenta coloração amarelo claro e com 90 min (Figura 5.9 (E)) do NCC em suspensão as amostras apresentam coloração castanha, provavelmente devido à ligeira degradação da celulose, como também foi observado por TEIXEIRA et al.⁵⁰. Assim, é possível obter NCCs com alto IC com menos tempo de extração, diminuindo a possibilidade de degradação da celulose e otimizando o processo.

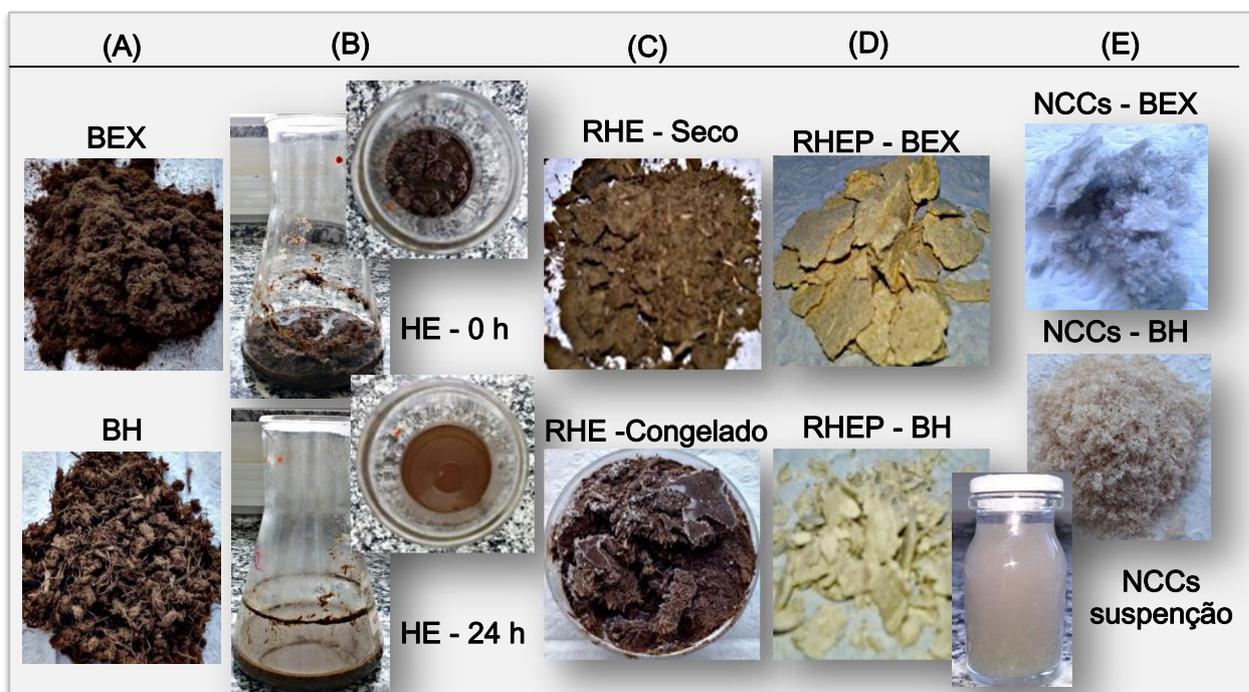


FIGURA 5.9- Aspecto visual das amostras de: (A) Bagaço (B) RHE em 0 e 24h de reação (C) RHE – congelados e secos (D) RHEP (E) NCCs secos e em suspensão

A coloração clara obtida após a purificação do resíduo indica a grande eficiência do processo de purificação, processo este que também é denominado branqueamento, pois altera a coloração do material para próxima de branco. Este resultado também foi encontrado por TEIXEIRA et al. ⁵⁰.

As Figuras 5.10 e 5.11 mostram que os espectros FTIR do BEX e do BH, bem como de seus respectivos RHE's, foram semelhantes ao do BIN, conforme discutido a seguir.

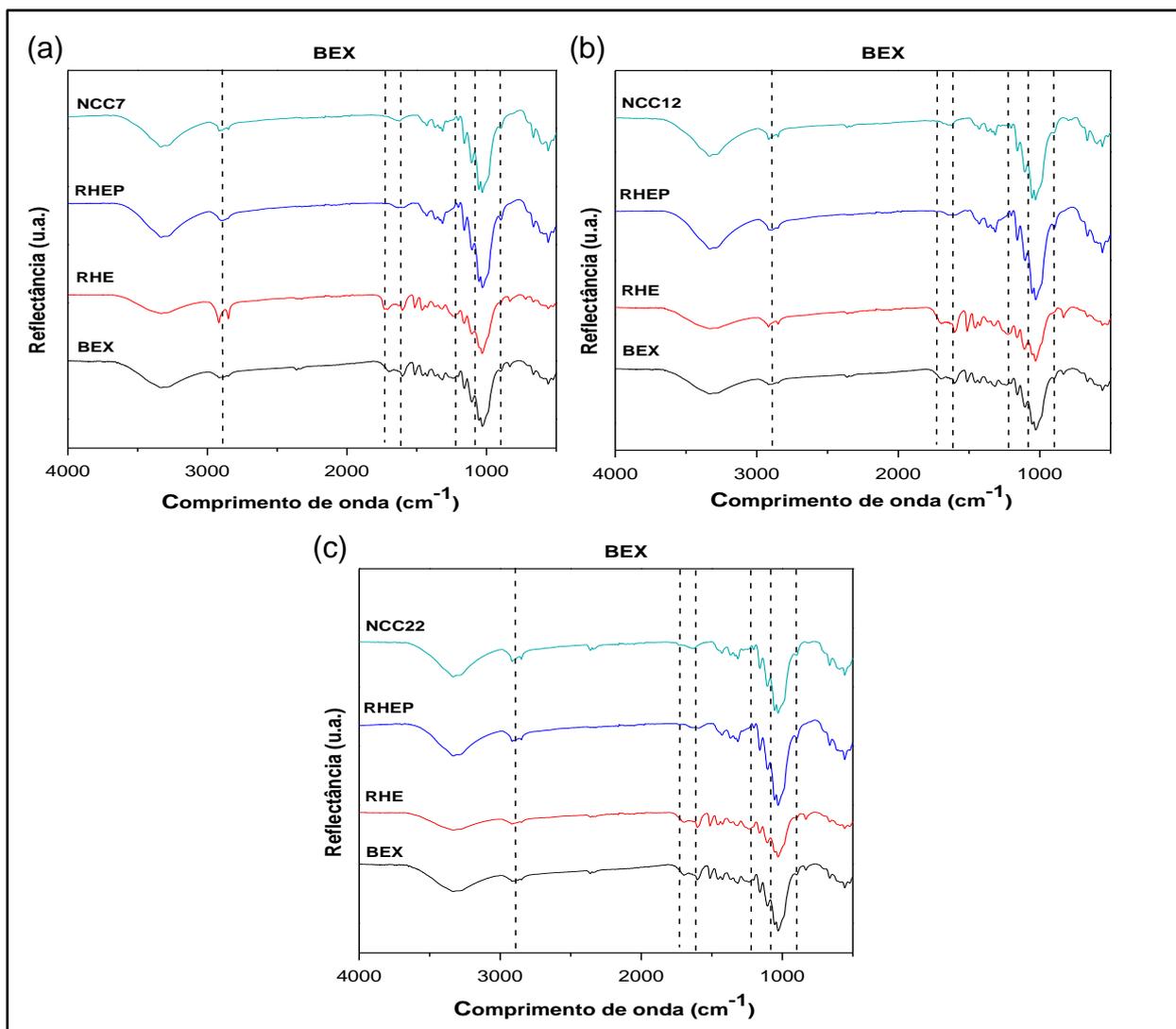


FIGURA 5.10 - Espectros de infravermelho para o bagaço explodido (BEX), no qual se encontram os dados espectrais dos resíduos da hidrólise (RHE), do resíduo purificado (RHEP) e dos nanocristais de celulose (NCCs) com as cargas enzimáticas de (a) - 7, (b) - 12 e (c) - 22

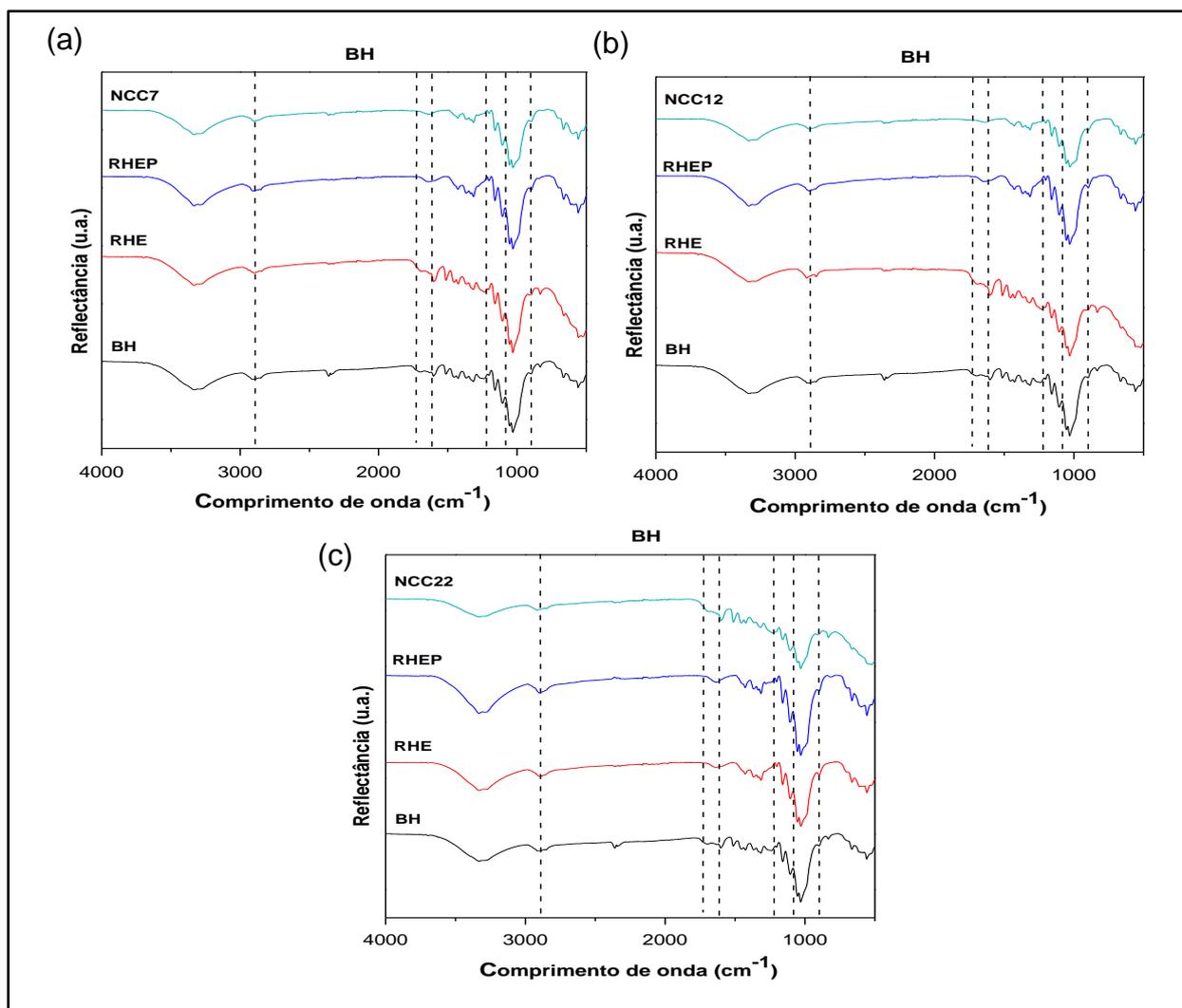


FIGURA 5.11 - Espectros de infravermelho para o bagaço hidrotérmico (BH), no qual se encontram os dados espectrais dos resíduos da hidrólise (RHE), do resíduo purificado (RHEP) e dos nanocristais de celulose (NCCs) com as cargas enzimáticas de (a) - 7, (b) - 12 e (c) - 22

Dentre as linhas pontilhadas, de 1026 a 1082 cm^{-1} , estão presentes as bandas características das ligações carbono-oxigênio dos anéis de piranoses e entre 1033 a 894 cm^{-1} aparecem bandas de celulose^{33,61}. Próximos de 1220 cm^{-1} podem se observar deformações axiais assimétricas =C-O-C e =C-O- de grupos ésteres, éteres e fenóis que após a purificação diminui significativamente sua intensidade²². A região de 1450 a 1300 cm^{-1} é uma região que envolve superposição de vários

modos de vibração, tanto da lignina quanto de hidratos de carbono. Próximo de 1458 e 1605 cm^{-1} apresentam bandas de ligações CH_2 e CH_3 e os alongamento $\text{C}=\text{C}$ e $\text{C}=\text{O}$ do anel aromático da lignina³³. Entre 2995 a 4000 cm^{-1} , estão representadas as ligações OH, que podem ser características tanto de celulose, quanto de lignina e hemicelulose^{33,48}.

Bandas relacionadas à lignina e hemicelulose não foram encontradas com grande intensidade nos espectros de FTIR dos nanocristais de celulose (NCCs), sendo que o último apresentou em grande parte as bandas características da celulose, mostrando que os NCCs foram produzidos com elevado grau de pureza. Outra forma de identificar a pureza do produto obtido é a comparação de seus espectros com o espectro da celulose microcristalina (Avicel®, CMC) com elevado grau de pureza.

A Figura 5.12 apresenta os espectros de FTIR concernentes a esta comparação para o BEX e a Figura 5.13 para o BH.

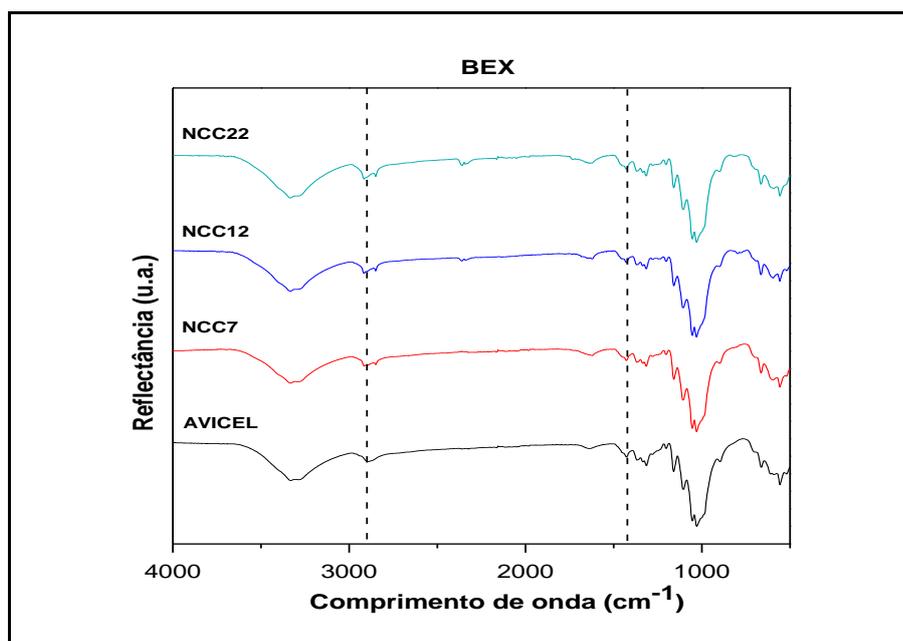


FIGURA 5.12 - Comparação entre os espectros de infravermelho dos nanocristais de celulose (NCCs) do bagaço explodido com AVICEL

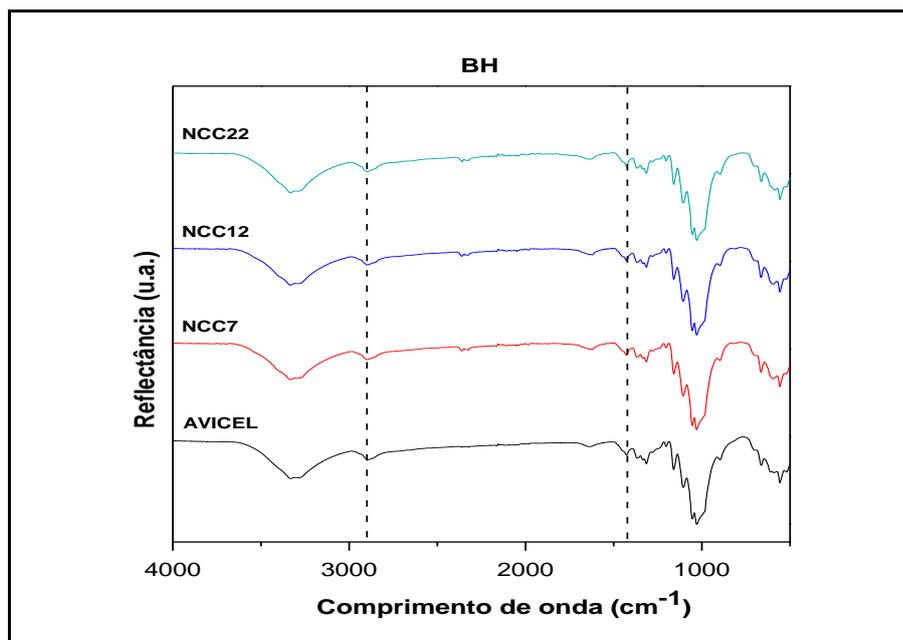


FIGURA 5.13 - Comparação entre os espectros de infravermelho dos nanocristais de celulose (NCCs) do bagaço hidrotérmico com AVICEL

Como podemos observar os espectros dos NCCs produzidos neste trabalho apresentaram bandas de absorção idênticas e com intensidades semelhantes, sugerindo que estes materiais sejam formados pelas mesmas ligações químicas.

A presença das bandas em 2905 cm^{-1} , nas Figuras 5.12 e 5.13, mostram uma vibração de alongamento C-H encontrada em ambas as amostras, mostra uma alta cristalinidade dos nanocristais de celulose. A banda em 1430 cm^{-1} correspondente a vibração simétrica de grupos CH_2 e aumenta em materiais microcristalinos e nanocristalinos, onde sua intensidade corresponde ao grau de cristalinidade do material. Por este motivo esta é denominada banda de cristalinidade e foi encontrada em ambos os NCCs produzidos neste estudo⁶². Estes dados corroboram com os índices de cristalinidade apresentados nas tabelas 5.3 e 5.4 para os NCCs produzidos.

5.4 - Estabilidade Térmica das amostras

As Figuras 5.14 e 5.15 exibem curvas termogravimetria (TG) e termogravimetria derivada (DTG) para as amostras de BEX e BH. Em geral, as curvas de TG e DTG mostraram três etapas de perda de massa: a liberação de água

adsorvida (45-150°C) que corresponde à perda de aproximadamente 5% em massa, decomposição de cadeias de celulose (200-350°C), à degradação da lignina residual e à oxidação e quebra do resíduo da degradação da celulose em produtos de baixo peso molecular ($T > 400^\circ\text{C}$). A DTG apresenta a temperatura máxima de degradação térmica, ou no caso dos NCCs, temperatura crítica para preparação de nanocompósitos (NCCs-polímero).

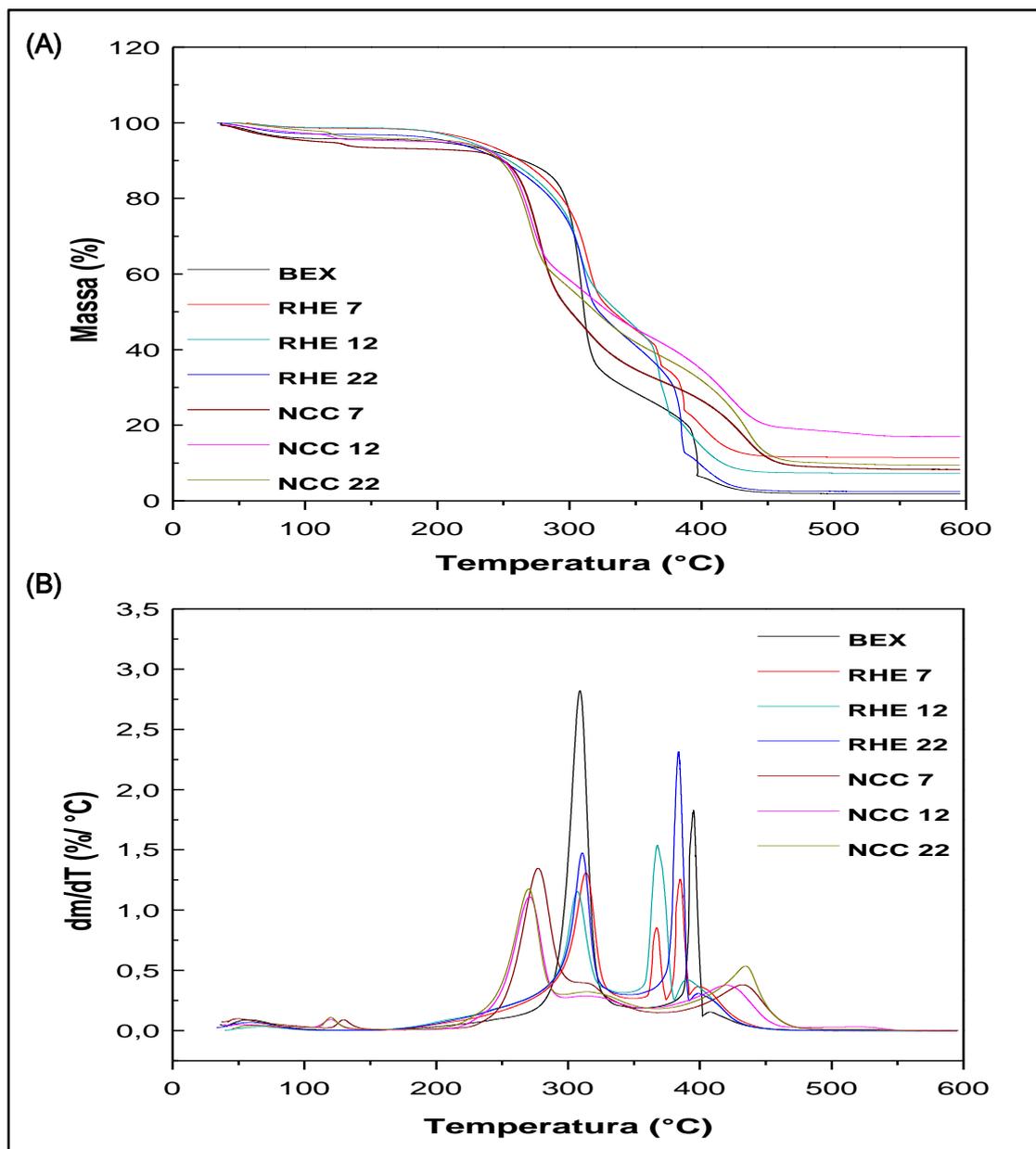


FIGURA 5.14 -Curvas TG/DTG para as amostras de bagaço explodido: (A) TG (B) DTG

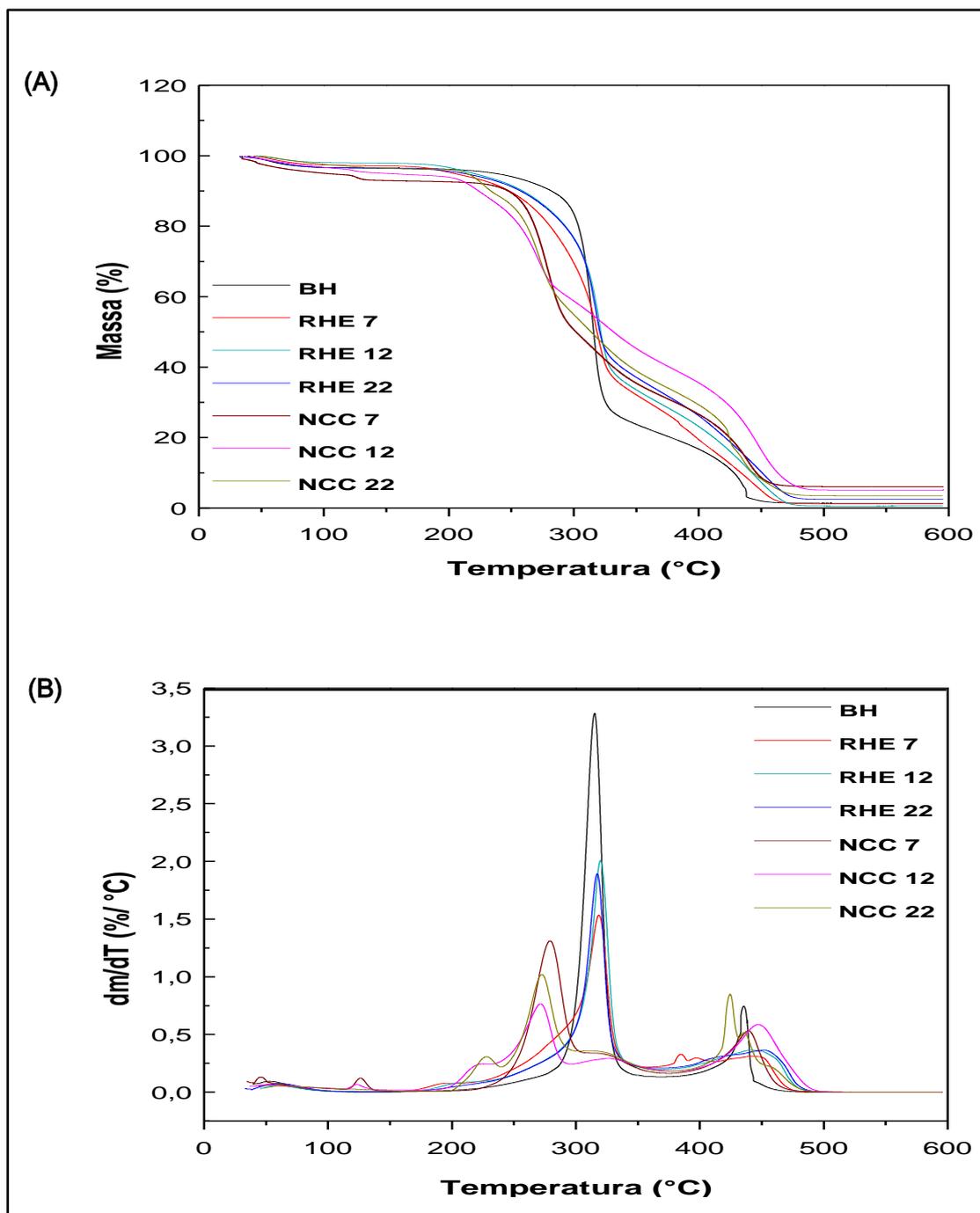


FIGURA 5.15 - Curvas TG/DTG para as amostras de bagaço hidrotérmico: (A) TG
(B) DTG

As amostras apresentaram curvas características de materiais lignocelulósicos, com picos intensos entre 270°C e 340°C aproximadamente, que se originam da degradação de lignina e celulose^{53,63}.

As propriedades térmicas do BEX e BH, dos respectivos materiais residuais de 7, 12 e 22 mg de proteína/g de celulose e dos NCCs estão apresentadas nas Tabelas 5.6 e 5.7.

TABELA 5.6 - Propriedades térmicas do bagaço explodido e das amostras de resíduo da hidrólise enzimática (RHE) e nanocristais de celulose (NCCs) para as cargas enzimáticas de 7, 12 e 22 mg de proteína/g de celulose realizadas em ar sintético

BEX				
	Voláteis (%)	Resíduo (%)	T_i (°C)	T máx. (°C)
BEX	4,2	1,9	296,0	309,0
RHE 7	1,7	11,4	280,2	313,7
RHE 12	1,2	7,3	276,7	307,2
RHE 22	3,0	2,4	285,3	310,6
NCCs 7	6,6	8,4	259,9	227,3
NCCs 12	4,6	16,9	252,2	271,5
NCCs 22	3,9	9,5	249,7	269,5

TABELA 5.7 - Propriedades térmicas do bagaço hidrotérmico e das amostras de resíduo da hidrólise enzimática (RHE) e nanocristais de celulose (NCCs) para as cargas enzimáticas de 7, 12 e 22 mg de proteína/g de celulose realizadas em ar sintético

BH				
	Voláteis (%)	Resíduo (%)	T_i (°C)	T máx. (°C)
BH	3,5	1,5	298,1	315,1
RHE 7	2,8	1,3	290,2	318,5
RHE 12	2,0	0,7	300,6	319,8
RHE 22	3,5	2,4	295,0	317,5
NCCs 7	7,2	6,1	262,0	279,4
NCCs 12	4,9	5,0	246,7	271,3
NCCs 22	3,4	3,4	238,5	272,3

A $T_{máx.}$ (temperatura de máxima taxa de perda de massa em função da temperatura) dos resíduos apresentam temperaturas mais elevadas do que comparado com os NCCs, para ambas as matrizes de biomassa, revelando que estes apresentam uma maior estabilidade térmica. A porcentagem de voláteis variou

na gama de 1-7,5% em massa. A T_i (temperatura de início de degradação) foi medida a partir do método onset, detalhado no capítulo 4.5.

As amostras de resíduo apresentaram valores maiores de T_i do que comparados com os NCCs. A T_i para os resíduos variou aproximadamente de 276°C a 286°C para o RHE-BEX e de 249°C a 259°C para o NCCs -BEX da menor para a maior carga enzimática, respectivamente. Para o RHE-BH variou aproximadamente de 290°C a 300°C e para o NCCs -BH de 238°C a 261°C. Estes dados mostram que os NCCs apresentam menor estabilidade térmica do que suas fibras de partida, o que de acordo com TEIXEIRA et al.¹⁹ e BOUJEMAOUI et al.⁶⁴ é atribuída à etapa de hidrólise com ácido sulfúrico que diminui a termoestabilidade dos cristais de celulose. Isto ocorre pois as cadeias de celulose que contêm grupos sulfato sofrem degradação em temperaturas mais amenas e, além disso, a substituição de grupos OH por grupos sulfato reduz a energia de ativação para a degradação da cadeia de celulose^{19,22,64,65}.

A porcentagem de resíduo de cada espécie após sua degradação difere conforme a natureza das amostras, sua composição e pré-tratamentos. Assim neste estudo as amostras apresentaram variações, devido aos diferentes tratamentos utilizados, onde as amostras de BEX apresentaram maior porcentagem de resíduo do que em relação às de BH⁶³.

Neste sentido, a investigação das propriedades térmicas dos NCCs é de grande importância a fim de avaliar a sua aplicabilidade para o processamento de biocompósitos, em que a temperatura de processamento, principalmente para polímeros termoplásticos, costuma ser alta ($T > 200^\circ\text{C}$) e com grande tempo de exposição²¹. Assim, a temperatura de degradação encontrada para os NCCs possibilitam a sua aplicação em processamentos que utilizam temperaturas mais extremas.

Em relação às cargas enzimáticas, não foi possível notar grande variação nas propriedades térmicas, sendo um efeito relevante já que diminuir ou aumentar esta carga não altera a estabilidade dos produtos. Sendo assim estas podem ser determinadas segundo outros fatores, como a economicidade do processo, por exemplo, ou segundo os interesses na obtenção de um produto específico.

5.5 Rendimentos dos processos de obtenção dos nanocristais de celulose

Partindo de 10g de bagaço, sendo este 9,84g em base seca para o BEX e 9,04g em base seca para o BH, o rendimento global do processo de obtenção de nanocristais de celulose foi de aproximadamente 30%. Portanto, houve uma perda de massa de 63,2% durante as diversas etapas de tratamento da biomassa até o produto final. Este rendimento já era esperado e pode ser justificado pela grande perda de massa nas etapas de tratamento do resíduo da hidrólise enzimática, onde, por exemplo, só na purificação já ocorre uma grande diminuição da massa residual que será utilizada nas etapas seguintes.

A hidrólise ácida apresentou rendimento de aproximadamente 70%, sendo este superior ao encontrado na literatura para NCCs de celulose produzidos a partir de outras fontes, mostrando que o processo adotado para a obtenção de nanocristais de celulose foi eficaz, independente do tratamento ao qual a fibra foi submetida anteriormente^{53,66}.

Com este rendimento, considerando as porcentagens de celulose presente no BEX e no BH apresentadas nas Tabelas 5.1 e 5.2, a partir de 100 g de bagaço em base seca, possibilitaria a produção de aproximadamente 18 g de NCCs. Estes resultados podem ser ainda otimizados com o intuito de maximizar o rendimento dos processos, minimizando erros experimentais nos diversos tratamentos realizados nos resíduos, alterações nas etapas de purificação, a qual se deve grande perda de massa das amostras, entre outros.

5.6 - Análises morfológicas dos materiais

A morfologia dos NCCs foi estudada a partir de micrografias de MET e AFM do BEX e o AFM do BH, como apresentado nas Figuras 5.16, 5.20 e 5.21 respectivamente. As análises por microscópio de transmissão foi realizada para caracterizar com maior precisão as dimensões dos NCCs, sendo apresentadas as micrografias dos NCCs do BEX e BH produzidos a partir dos resíduos com cargas enzimáticas de 12 mg de proteína/g de celulose.

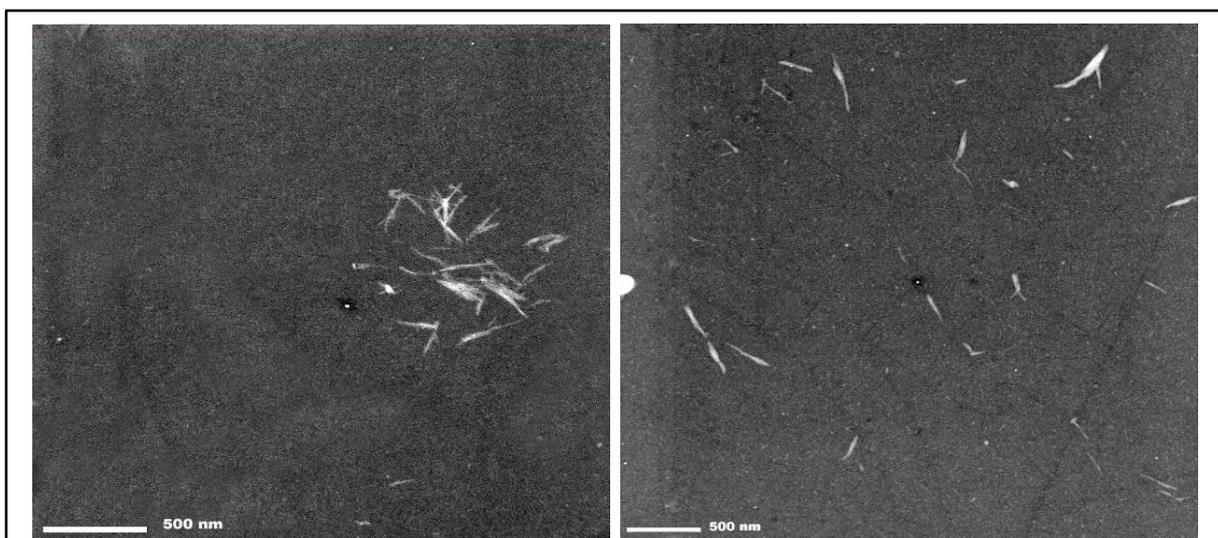


FIGURA 5.16 - Imagem de MET para os nanocristais de celulose: (A) Bagaço explodido (B) Bagaço hidrotérmico

Mesmo com as condições desfavoráveis para a MET, devido à fragilidade da amostra, às micrografias apresentadas para algumas amostras possibilitaram a visualização da morfologia de agulha dos NCCs produzidos (Figura 5.16). Os comprimentos (L) e diâmetros (D) dos NCCs bem como seus respectivos erros estão apresentados nas Tabelas 5.8 e 5.9. Os tamanhos foram calculados com o software ImageJ, com cerca de 50 medidas.

TABELA 5.8 - Comprimento e diâmetro em nm para os nanocristais de celulose do bagaço explodido

BEX			
	L (nm)	D (nm)	L/D (nm)
NCCs - 7	197±59	18±4	11±4
NCCs - 12	195±31	20±4	10±3
NCCs - 22	212±44	24±5	9±3

TABELA 5.9 - Comprimento e diâmetro em nm para os nanocristais de celulose do bagaço hidrotérmico

BH			
	L (nm)	D (nm)	L/D (nm)
NCCs - 7	193±48	17±5	11±2
NCCs - 12	209±57	20±6	11±3
NCCs - 22	246±35	30±5	10±2

Algumas diferenças nos NCCs produzidos e os da literatura, apresentados na Tabela 2.2, a partir de casca de ervilha, diretamente do bagaço de cana, capim entre outros, já eram esperadas devido aos consecutivos processos físico-químicos aos quais os materiais foram submetidos até chegar à etapa final.

Como mostrado nas Tabelas 5.8 e 5.9 e apresentado na Figura 5.16 os NCCs do BEX apresentaram comprimento entre 197-212 nm e diâmetro entre 18-24 nm. Já para o BH o comprimento ficou entre 193-246 nm e diâmetro dentro de 17-30 nm. A Figura 5.17 apresenta os comprimentos dos NCCs e seus respectivos desvios padrões já apresentados nas tabelas anteriores para ambas as matrizes, BEX e BH bem como as diferentes concentrações de enzima utilizada na etapa de hidrólise enzimática.

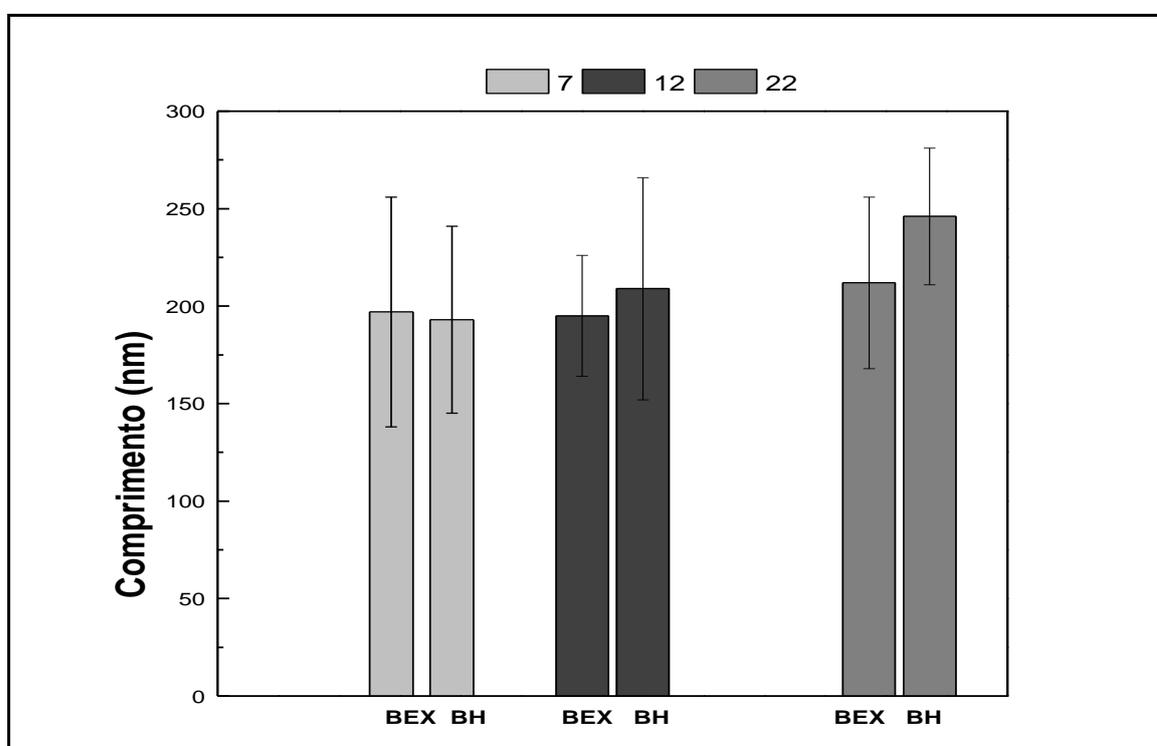


FIGURA 5.17 - Comprimento dos nanocristais de celulose produzidos a partir do bagaço explodido e do bagaço hidrotérmico com cargas enzimáticas de 7, 12 e 22 mg de proteína/ g de celulose

Como pode ser observado, se levarmos em consideração os desvios padrões de cada valor, os tamanhos são semelhantes para ambas as matrizes. Também não ocorreu grande diferença nos comprimentos dos NCCs em relação à alteração das cargas enzimáticas. Os valores de comprimentos e diâmetros também

são apresentados nos gráficos de distribuição por frequência na Figura 5.18 para o BEX e Figura 5.19 para o BH que foram obtidos a partir de MET.

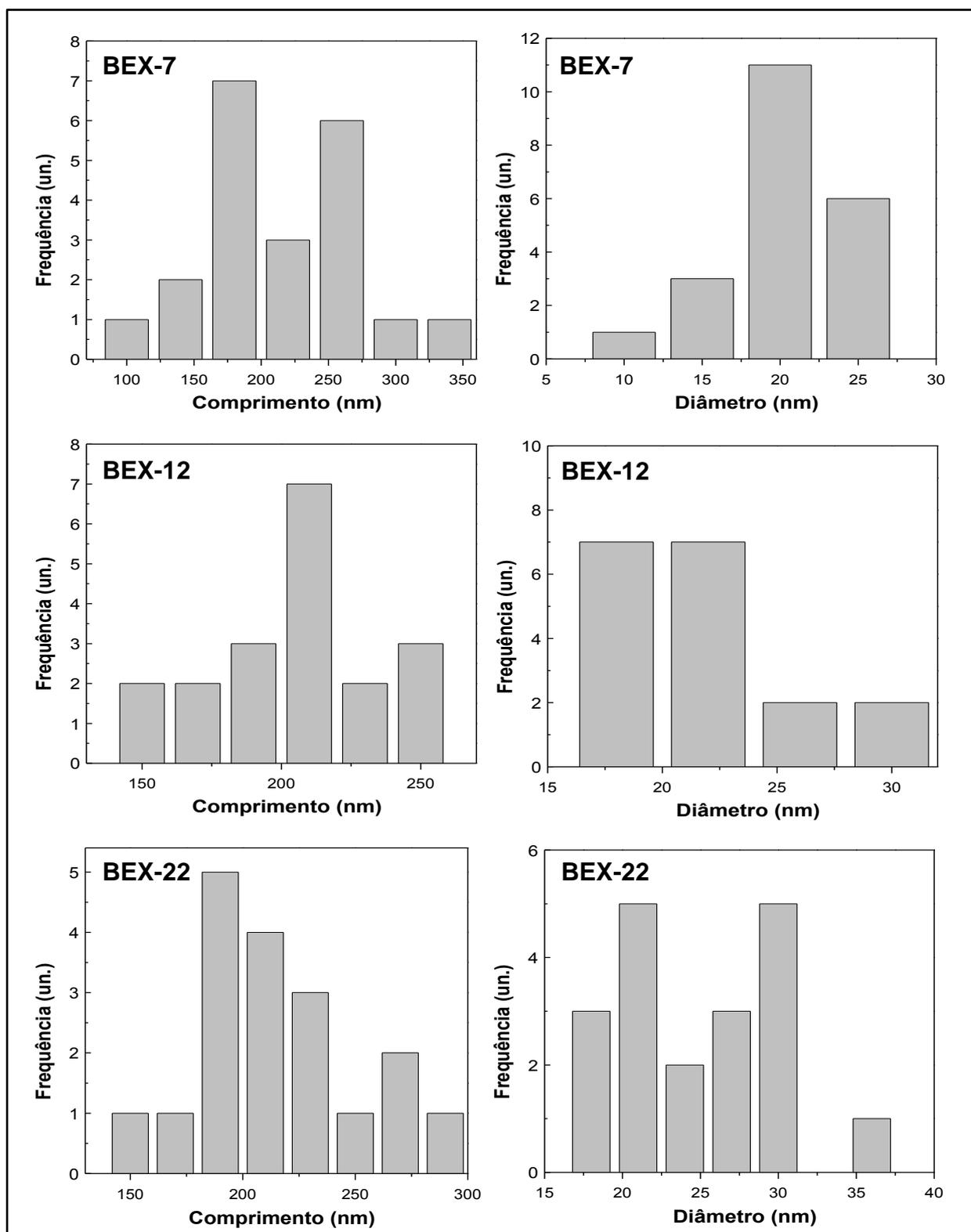


FIGURA 5.18 - Distribuição de frequência (un.) em relação ao comprimento (nm) dos nanocristais de celulose do bagaço explodido de 7, 12 e 22 mg de proteína/g de celulose

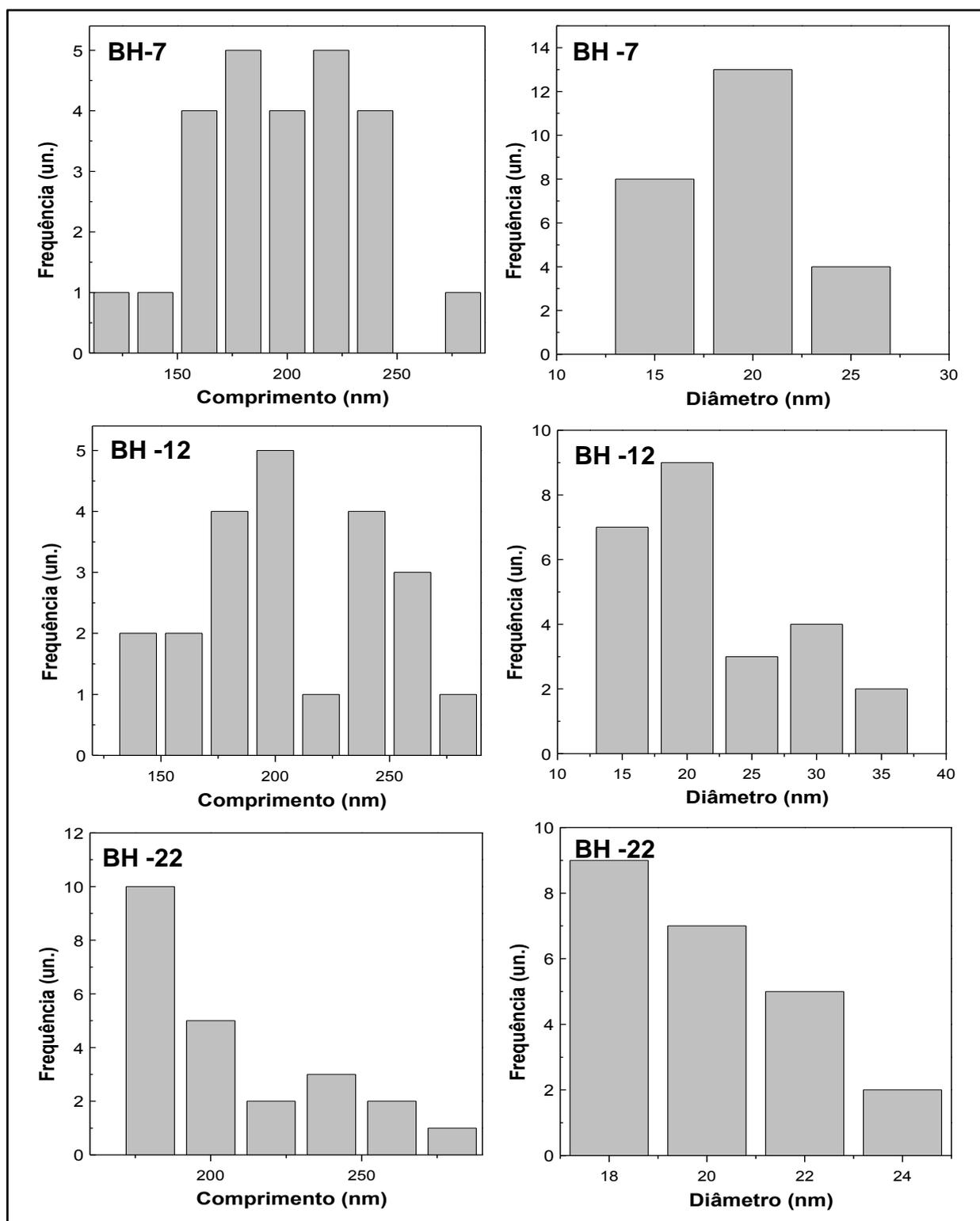


FIGURA 5. 19 - Distribuição de frequência (un.) em relação ao diâmetro (nm) dos nanocristais de celulose do bagaço hidrotérmico de 7, 12 e 22 mg de proteína/g de celulose

Segundo NG et al.²⁶, a distribuição de tamanho das partículas, o índice de cristalinidade e a morfologia dos NCCs obtidos dependem de condições adequadas de reação para minimizar a degradação da celulose tais como

temperatura, tempo, tratamentos químicos empregados e parâmetros de hidrólise a qual o material foi submetido além da morfologia e estrutura da fonte de celulose deste processo. Ainda assim os comprimentos medidos foram semelhantes às estruturas nanométricas derivadas de outras fontes de agrosíduos, como diretamente do bagaço de cana-de-açúcar ((L) = 255 ± 55 nm e (D) = 8 ± 3 nm)⁵⁰ e do bagaço de mandioca (2-11 nm)⁶⁷.

Mesmo no caso de outras fontes, os valores de comprimento dos NCCs são aproximados, porém com algumas diferenças nos diâmetros como no caso da produção de NCCs estudados por DANIAL et al.⁵² obtidos a partir de papel, no caso dos NCCs produzidos a partir dos resíduos de algodão estudado por TEIXEIRA et al.¹⁹ e os NCCs estudados por MARTINS et al.²² obtidos a partir de capim. Para o papel os NCCs apresentaram comprimentos entre 100-200 nm e diâmetros entre 3-10 nm e para o resíduo de algodão comprimento de 135 ± 5 nm e diâmetro de 14 ± 4 nm. Já para o capim os tamanhos dos NCCs produzidos nas mesmas condições deste estudo foram: comprimento de 255 ± 51 nm e diâmetro de $5,0 \pm 1,5$ nm²². Os NCCs produzidos por estes autores apresentaram comprimentos semelhantes, e diâmetros pouco diferentes aos dos NCCs obtidos neste estudo. Estes foram produzidos com condições de hidrólise ácida muito próxima, podendo esta diferença ser proveniente dos processos químicos seqüências aos quais o bagaço já havia sido submetido. Isto mostrando que a distinção da fonte utilizada resulta em NCCs com algumas diferenças mínimas nas características morfológicas. No entanto, dependendo das aplicações desejadas estas diferenças podem não ser significativas.

A Figura 5.20 e 5.21 apresenta as medições topográficas de AFM, onde (a) apresenta amostras de NCCs, (b) apresenta a imagem da fase e (c) apresenta as imagem em 3D para as matrizes de BEX (Figura 5.20) e BH (Figura 5.21) de 7, 12 e 22mg de proteína/g de celulose. Embora todas as imagens apresentarem a morfologia dos NCCs, as imagens da fase (Figura 5.20 e 5.21 (B)) de ambas as amostras possibilitaram melhor visualização do formato cilíndrico das amostras.

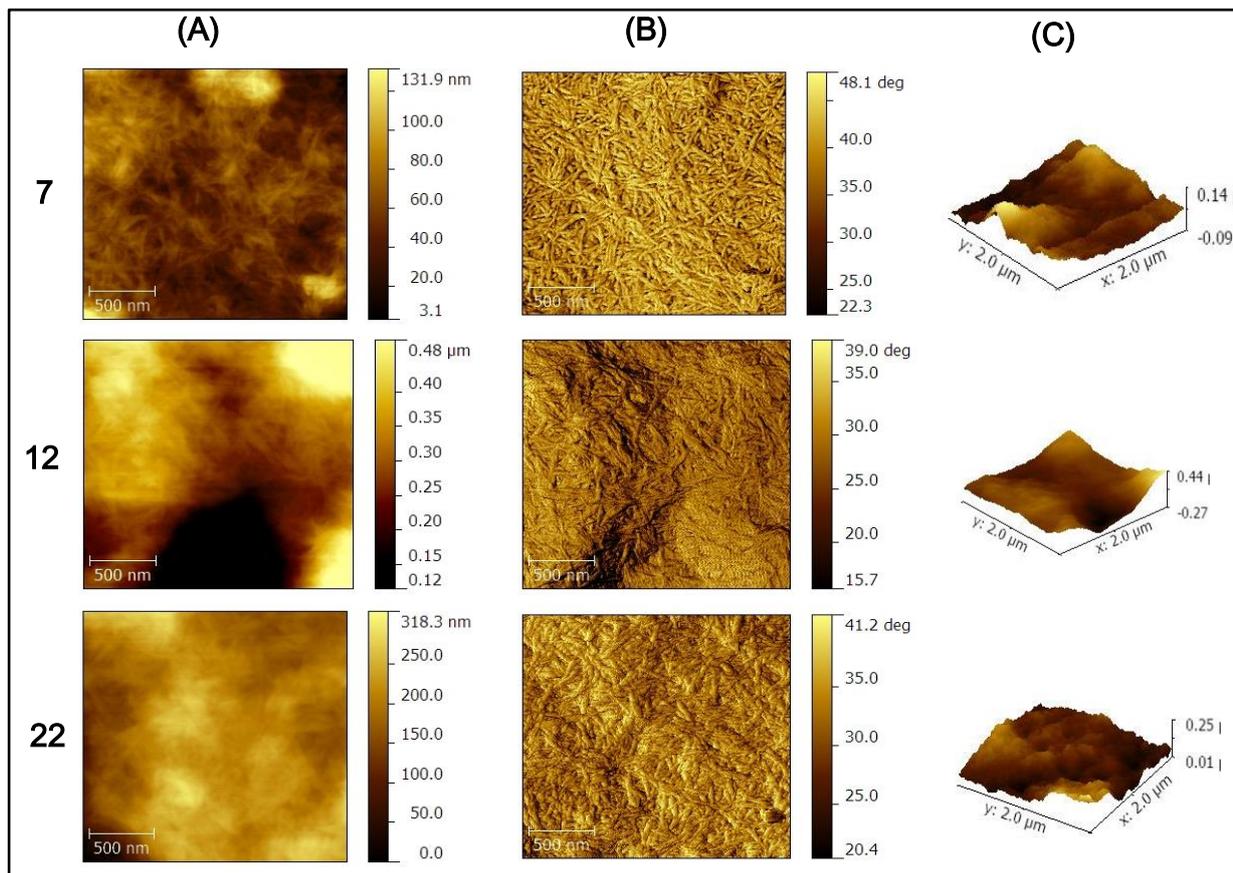


FIGURA 5.20 - Micrografia de AFM para os NCCs do BEX (A) NCCs (B) Fase (C) 3D

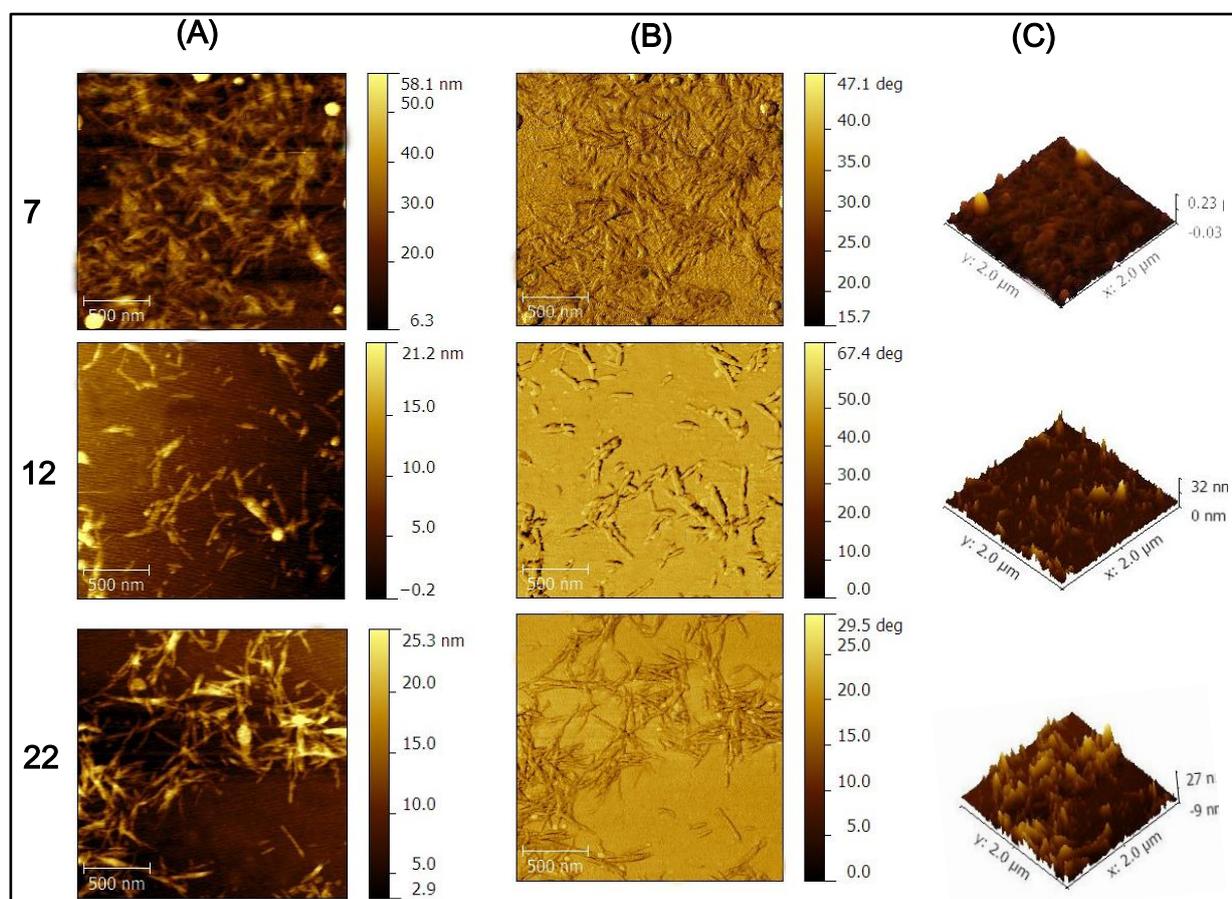


FIGURA 5. 21 - Micrografia de AFM para os NCCs do BH (A) NCCs (B) Fase (C) 3D

A partir das Figuras 5.20 e 5.21 podemos observar que as amostras de BEX continham maior concentração de NCCs, promovendo a agregação destas e apresentando regiões de relevos irregulares mais extensas, dificultando a visualização dos nanocristais nas imagens em 3D. Esta maior concentração de NCCs pode estar associada à preparação das amostras antes da análise. Já as micrografias do BH apresentaram os NCCs mais dispersos, estando em menor concentração, resultando em imagens 3D, com relevos irregulares de pouca extensão e mais dispersos, facilitando a visualização dos nanocristais de celulose.

Porém, ambas as amostras apresentaram pequenos aglomerados. Esta aglomeração dos cristais já era esperada para este tipo de material e também foi observado em outros trabalhos, como de EL MIRI, et al.³⁷. Isto ocorre devido a grande área superficial e a forte interação das ligações de hidrogênio entre os NCCs. Os NCCs apresentaram tamanhos pouco regulares, como pode ser observado nos desvios padrões da Tabela 5.8 e 5.9 e nos gráficos das Figuras 5.18 a 5.20. Este fator depende muito da matéria prima utilizada e das condições de pré-tratamento e hidrólise, variando de material para material³⁷.

Os formatos dos NCCs observados em ambas as matrizes estudadas pelas micrografias de AFM corrobora com as micrografias de MET e as dimensões encontradas, sendo possível notar com mais clareza em algumas imagens o sutil alargamento no diâmetro dos NCCs produzidos neste trabalho já descrito anteriormente, se comparados com os encontrados na literatura.

Assim, corroborando com os resultados apresentados, os NCCs produzidos via rota enzimática da produção de etanol 2G a partir do bagaço de cana-de-açúcar com pré-tratamento por explosão a vapor e hidrotérmico foram sintetizados com sucesso no presente estudo. Este fato possibilita a reutilização do resíduo da produção de etanol celulósico para a produção de NCCs com potencial para diversas aplicações industriais

Capítulo 6

Conclusões

6 - CONCLUSÕES

A partir dos resultados apresentados foi possível avaliar a utilização dos resíduos da hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para obtenção de nanocristais de celulose (NCCs).

A hidrólise enzimática do BEX apresentou um fator de conversão de aproximadamente 55 % para a maior carga enzimática avaliada e para o BH foi de aproximadamente 55%, gerando um resíduo sólido de grande potencial devido à quantidade de celulose cristalina presente. Portanto, para as condições utilizadas, o tipo de pré-tratamento não influenciou significativamente na conversão da celulose em açúcares fermentescíveis.

A investigação das propriedades térmicas e das micrografias dos NCCs mostrou que estes são estáveis a temperaturas inferiores a 200°C e os tamanhos variaram dentro do esperado para este tipo de matriz. Em relação a influência do pré-tratamento do bagaço na obtenção dos NCCs, ambos os bagaços utilizados apresentaram resultados similares nas diversas etapas de produção dos NCCs. Este resultado é de grande importância já que mostra a possibilidade de produzir NCCs com características semelhantes independente da escolha de um destes pré-tratamentos avaliados.

Quanto à carga enzimática, esta avaliação depende da finalidade do processo, se este focar apenas na produção dos NCCs e no menor custo, a menor carga enzimática de 7 mg de proteína/g de celulose seria mais vantajosa, pois gera NCCs semelhantes aos das outras cargas, utilizando menor quantidade de enzimas. Caso o foco seja a maior conversão, gerando mais açúcares para a produção de etanol, e a produção de NCCs seja apenas um subproduto de importância ambiental no reuso do resíduo, deve-se utilizar às cargas enzimáticas mais elevadas, que apresentaram maiores conversões.

Portanto, os NCCs obtidos a partir do resíduo da rota enzimática de produção de etanol celulósico do bagaço de cana-de-açúcar foram produzidos com sucesso neste trabalho. Os procedimentos realizados neste estudo possibilitaram a obtenção destes materiais de alto valor agregado e com potencial de aplicação em diversos setores, como por exemplo o de embalagens.

Capítulo 7

Sugestões para Trabalhos Futuros

7 - SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudo de condições para a incorporação dos NCCs produzidos via rota de hidrólise enzimática em polímeros naturais, como pectina e amido, com o intuito de reforço de matriz para a produção de embalagens biodegradáveis.
- Estudo de condições para a obtenção de fibras de carbono e outros materiais funcionais a partir de lignina extraída de bagaço de cana-de-açúcar da produção de etanol de 2G.

Capítulo 8

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. HAAFIZ, M. K. M.; HASSAN, A.; ZAKARIA, Z. & INUWA, I. M. "Isolation and characterization of cellulose nanowhiskers from oil palm biomass microcrystalline cellulose". *Carbohydrate Polymers*, **103** : 119, 2014.
2. TOQUERO, C. & BOLADO, S. "Effect of four pretreatments on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation of wheat straw. Influence of inhibitors and washing". *Bioresource Technology*, **157** : 68, 2014.
3. PEREIRA, S. C.; MAEHARA, L.; MONTEIRO MACHADO, C. M. & FARINAS, C. S. "2G ethanol from the whole sugarcane lignocellulosic biomass". *Biotechnology for Biofuels*, **8** : 44, 2015.
4. LIMA, M. A.; GOMEZ, L. D.; STEELE-KING, C. G.; SIMISTER, R.; BERNARDINELLI, O. D.; CARVALHO, M. A.; REZENDE, C. A.; LABATE, C. A.; DEAZEVEDO, E. R.; MCQUEEN-MASON, S. J. & POLIKARPOV, I. "Evaluating the composition and processing potential of novel sources of Brazilian biomass for sustainable biorenewables production". *Biotechnology for Biofuels*, **7** : 10, 2014.
5. LEAL, M. R. L. V.; GALDOS, M. V.; SCARPARE, F. V.; SEABRA, J. E. A.; WALTER, A. & OLIVEIRA, C. O. F. "Sugarcane straw availability, quality, recovery and energy use: A literature review". *Biomass and Bioenergy*, **53** : 11, 2013.
6. MACRELLI, S.; MOGENSEN, J. & ZACCHI, G. "Techno-economic evaluation of 2nd generation bioethanol production from sugar cane bagasse and leaves integrated with the sugar-based ethanol process". *Biotechnology for Biofuels*, **5** : 22, 2012.
7. SUN, J. X.; SUN, X. F.; ZHAO, H. & SUN, R. C. "Isolation and characterization of cellulose from sugarcane bagasse". *Polymer Degradation and Stability*, **84** (2): 331, 2004.
8. PEREIRA, P. H. F.; VOORWALD, H. C. J.; CIOFFI, M. O. H.; MULINARI, D. R.; DA LUZ, S. M. & DA SILVA, M. "Sugarcane bagasse pulping and bleaching: thermal and chemical characterization". *Bioresources*, **6** (3): 2471, 2011.
9. OKSMAN, K.; ETANG, J. A.; MATHEW, A. P. & JONOBI, M. "Cellulose nanowhiskers separated from a bio-residue from wood bioethanol production". *Biomass & Bioenergy*, **35** (1): 146, 2011.
10. PAAKKO, M.; VAPAAVUORI, J.; SILVENNOINEN, R.; KOSONEN, H.; ANKERFORS, M.; LINDSTROM, T.; BERGLUND, L. A. & IKKALA, O. "Long and entangled native cellulose I nanofibers allow flexible aerogels and hierarchically porous templates for functionalities". *Soft Matter*, **4** (12): 2492, 2008.
11. CHEN, Y.; LIU, C. H.; CHANG, P. R.; CAO, X. D. & ANDERSON, D. P. "Bionanocomposites based on pea starch and cellulose nanowhiskers hydrolyzed from pea hull fibre: Effect of hydrolysis time". *Carbohydrate Polymers*, **76** (4): 607, 2009.
12. ARRIETA, M. P.; FORTUNATI, E.; DOMINICI, F.; LOPEZ, J. & KENNY, J. M. "Bionanocomposite films based on plasticized PLA-PHB/cellulose nanocrystal blends". *Carbohydrate Polymers*, **121** : 265, 2015.
13. PASQUINI, D.; TEIXEIRA, E. M.; CURVELO, A. A. S.; BELGACEM, M. N. & DUFRESNEA, A. "Extraction of cellulose whiskers from cassava bagasse and their applications as reinforcing agent in natural rubber". *Industrial Crops and Products*, **32** : 486, 2010.
14. LI, X. J.; QIU, C.; JI, N.; SUN, C. X.; XIONG, L. & SUN, Q. J. "Mechanical, barrier and morphological properties of starch nanocrystals-reinforced pea starch films". *Carbohydrate Polymers*, **121** : 155, 2015.
15. ZHAO, X.; ZHANG, L. & LIU, D. "Biomass recalcitrance. Part I: the chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocellulose". *Biofuels Bioproducts & Biorefining-Biofpr*, **6** (4): 465, 2012.

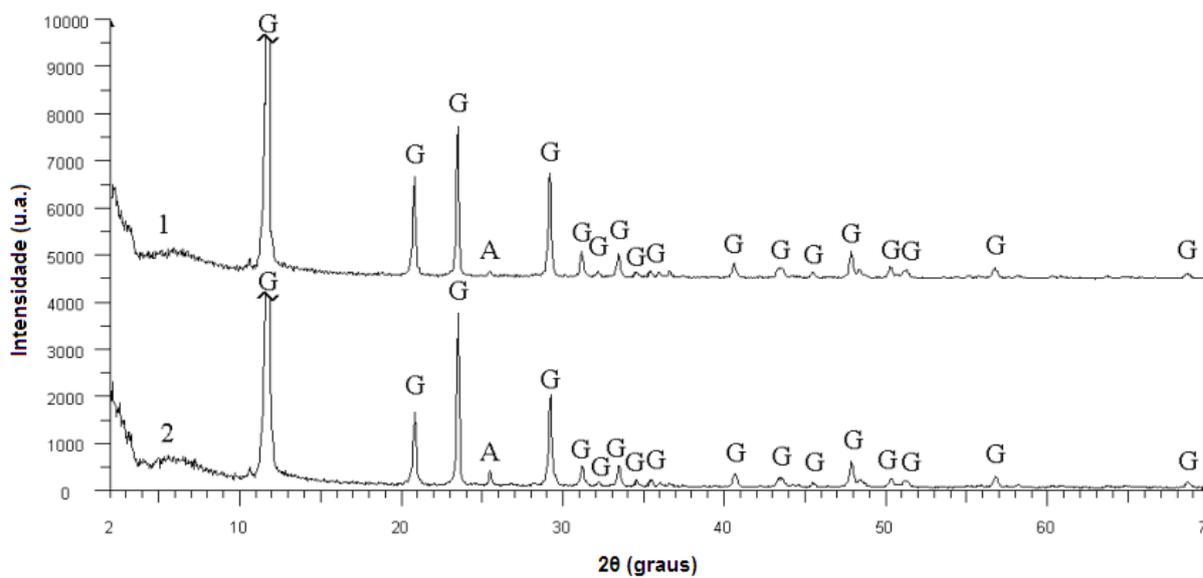
16. SANTOS, F., A.; QUEIRÓZ, J. H. D.; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, S. A.; GUIMARÃES, V. M. & REZENDE, S. T. "POTENCIAL DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR PARA PRODUÇÃO DE ETANOL". *Química Nova*, **35** : 1004, 2012.
17. MOOD, S. H.; GOLFESHAN, A. H.; TABATABAEI, M.; JOUZANI, G. S.; NAJAFI, G. H.; GHOLAMI, M. & ARDJMAND, M. "Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment". *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, **27** : 77, 2013.
18. MOUTTA, R. D. O.; FERREIRA-LEITAO, V. S. & DA SILVA BON, E. P. "Enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse and straw mixtures pretreated with diluted acid". *Biocatalysis and Biotransformation*, **32** (1): 93, 2014.
19. TEIXEIRA, E. D.; CORREA, A. C.; MANZOLI, A.; LEITE, F. L.; DE OLIVEIRA, C. R. & MATTOSO, L. H. C. "Cellulose nanofibers from white and naturally colored cotton fibers". *Cellulose*, **17** (3): 595, 2010.
20. CORREA, A. C.; TEIXEIRA, E. D.; PESSAN, L. A. & MATTOSO, L. H. C. "Cellulose nanofibers from curaua fibers". *Cellulose*, **17** (6): 1183, 2010.
21. ALEMDAR, A. & SAIN, M. "The influence of the cellulose hydrolysis process on the structure of cellulose nanocrystals extracted from capim mombac, a (*Panicum maximum*)". *Bioresource Technology*, **99** : 1664, 2008.
22. MARTINS, D. F.; DE SOUZA, A. B.; HENRIQUE, M. A.; SILVERIO, H. A.; NETO, W. P. F. & PASQUINI, D. "The influence of the cellulose hydrolysis process on the structure of cellulose nanocrystals extracted from capim mombaca (*Panicum maximum*)". *Industrial Crops and Products*, **65** : 496, 2015.
23. JOHAR, N.; AHMAD, I. & DUFRESNE, A. "Extraction, preparation and characterization of cellulose fibres and nanocrystals from rice husk". *Industrial Crops and Products*, **37** : 93, 2012.
24. TEODORO, K. B. R.; TEIXEIRA, E. D. M.; CORRÊA, A. C.; CAMPOS, A. D.; MARCONCINI, J. M. & MATTOSO, L. H. C. "Whiskers de fibra de sisal obtidos sob diferentes condições de hidrólise ácida: efeito do tempo e da temperatura de extração". *Polimeros*, **21** : 280, 2011.
25. TEODORO, K. B. R. Estudo de incorporação de whiskers de celulose em polietileno de baixa densidade (PEBD), São Carlos, Programa de Pós-graduação em Química - UFSCar, 2014. Dissertação de mestrado, 108p.
26. NG, H.-M.; SIN, L. T.; TEE, T.-T.; BEE, S.-T.; HUI, D.; LOW, C.-Y. & RAHMAT, A. R. "Extraction of cellulose nanocrystals from plant sources for application as reinforcing agent in polymers". *Composites Part B: Engineering*, **75** : 176, 2015.
27. YANG, H.; YAN, R.; CHEN, H.; LEE, D. H. & ZHENG, C. "Characteristics of hemicellulose, cellulose and lignin pyrolysis". *Fuel*, **88** : 1781, 2007.
28. MESQUITA, J. P. D. Nanocristais de celulose para preparação de bionanocompósitos com quitosana e carbonos nanoestruturados para aplicações tecnológicas e ambientais, Belo Horizonte, Programa de Pós-graduação em Química - UFMG, 2012. Tese de doutorado, 189p.
29. KLEMM, D.; HEUBLEIN, B.; FINK, H. P. & BOHN, A. "Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material". *Angewandte Chemie-International Edition*, **44** (22): 3358, 2005.
30. O'SULLIVAN, A. C. "Cellulose: the structure slowly unravels". *CELLULOSE*, **4** : 207, 1997.
31. GALBE, M. & ZACCHI, G. "Pretreatment: The key to efficient utilization of lignocellulosic materials". *Biomass & Bioenergy*, **46** : 70, 2012.
32. GUPTA, A. & VERMA, J. P. "Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: A review". *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, **41** : 550, 2015.
33. CHANDEL, A. K.; ANTUNES, F. A. F.; ANJOS, V.; BELL, M. J. V.; RODRIGUES, L. N.; POLIKARPOV, I.; DE AZEVEDO, E. R.; BERNARDINELLI, O. D.; ROSA, C. A.;

- PAGNOCCA, F. C. & DA SILVA, S. S. "Multi-scale structural and chemical analysis of sugarcane bagasse in the process of sequential acid-base pretreatment and ethanol production by *Scheffersomyces shehatae* and *Saccharomyces cerevisiae*". *Biotechnology for Biofuels*, **7** : **63**, 2014.
34. AITA, G. A.; SALVI, D. A. & WALKER, M. S. "Enzyme hydrolysis and ethanol fermentation of dilute ammonia pretreated energy cane". *Bioresource Technology*, **102** (6): 4444, 2011.
35. CONAB 2014; Vol. 2015.
36. RFA 2014; Vol. 2015.
37. EL MIRI, N.; ABDELOUAHDI, K.; ZAHOUILY, M.; FIIHRI, A.; BARAKAT, A.; SOLHY, A. & EL ACHABY, M. "Bio-nanocomposite films based on cellulose nanocrystals filled polyvinyl alcohol/chitosan polymer blend". *Journal of Applied Polymer Science*, **132** (22): 13, 2015.
38. MAEDA, R. N.; BARCELOS, C. A.; ANNA, L. M. M. S. & JR., N. P. "Cellulase production by *Penicillium funiculosum* and its application in the hydrolysis of sugar cane bagasse for second generation ethanol production by fed batch operation". **163** : 38, 2013.
39. SEABRA, J. E. A. & MACEDO, I. C. "Comparative analysis for power generation and ethanol production from sugarcane residual biomass in Brazil". *Energy Policy*, **39** (1): 421, 2011.
40. DIAS, M. O. S.; CUNHA, M. P.; JESUS, C. D. F.; ROCHA, G. J. M.; PRADELLA, J. G. C.; ROSSELL, C. E. V.; FILHO, R. M. & BONOMI, A. "Second generation ethanol in Brazil: Can it compete with electricity production?". *Bioresource Technology*, **102** (19): 8964, 2011.
41. FURLAN, F. F.; FILHO, R. T.; PINTO, F. H. P. B.; COSTA, C. B. B.; CRUZ, A. J. G.; GIORDANO, R. L. C. & GIORDANO, R. C. "Bioelectricity versus bioethanol from sugarcane bagasse: is it worth being flexible?". *Biotechnology for Biofuels*, **6** : 142, 2013.
42. ALVIRA, P.; TOMAS-PEJO, E.; BALLESTEROS, M. & NEGRO, M. J. "Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review". *Bioresource Technology*, **101** (13): 4851, 2010.
43. AGUIAR, R. S.; LUCIANO SILVEIRA, M. H.; PITARELO, A. P.; CORAZZA, M. L. & RAMOS, L. P. "Kinetics of enzyme-catalyzed hydrolysis of steam-exploded sugarcane bagasse". *Bioresource Technology*, **147** : 416, 2013.
44. ZHAO, X.; ZHANG, L. & LIU, D. "Biomass recalcitrance. Part II: Fundamentals of different pre-treatments to increase the enzymatic digestibility of lignocellulose". *Biofuels Bioproducts & Biorefining-Biofpr*, **6** (5): 561, 2012.
45. OLIVEIRA, F. M. V.; PINHEIRO, I. O.; SOUTO-MAIOR, A. M.; MARTIN, C.; GONCALVES, A. R. & ROCHA, G. J. M. "Industrial-scale steam explosion pretreatment of sugarcane straw for enzymatic hydrolysis of cellulose for production of second generation ethanol and value-added products". *Bioresource Technology*, **130** : 168, 2013.
46. GARROTE, G.; DOMÍNGUEZ, H. & PARAJO, J. C. "Hydrothermal processing of lignocellulosic materials". *European Journal Wood and Wood Products*, **57** : 91, 1999.
47. PU, Y. Q.; HU, F.; HUANG, F.; DAVISON, B. H. & RAGAUSKAS, A. J. "Assessing the molecular structure basis for biomass recalcitrance during dilute acid and hydrothermal pretreatments". *Biotechnology for Biofuels*, **6** : 13, 2013.
48. MORAN, J. I.; ALVAREZ, V. A.; CYRAS, V. P. & VAZQUEZ, A. "Extraction of cellulose and preparation of nanocellulose from sisal fibers". *Cellulose*, **15** (1): 149, 2008.
49. HUBBE, M. A. R., O. J.; LUCIA, L. A. & SAIN, M. "Cellulosic nanocomposites: A review". *BioResources*, **3** (3): 929, 2008.
50. TEIXEIRA, E. D.; BONDANCIA, T. J.; TEODORO, K. B. R.; CORREA, A. C.; MARCONCINI, J. M. & MATTOSO, L. H. C. "Sugarcane bagasse whiskers: Extraction and characterizations". *Industrial Crops and Products*, **33** (1): 63, 2011.

51. ROSA, M. F.; MEDEIROS, E. S.; MALMONGE, J. A.; GREGORSKI, K. S.; WOOD, D. F.; MATTOSO, L. H. C.; GLENN, G.; ORTS, W. J. & IMAM, S. H. "Cellulose nanowhiskers from coconut husk fibers: Effect of preparation conditions on their thermal and morphological behavior". *Carbohydrate Polymers*, **81** (1): 83, 2010.
52. DANIAL, W. H.; MAJID, Z. A.; MUHID, M. N. M.; TRIWAHYONO, S.; BAKAR, M. B. & RAMLI, Z. "The reuse of wastepaper for the extraction of cellulose nanocrystals". *Carbohydrate Polymers*, **118** : 165, 2015.
53. SHAHABI-GHAHAFARROKHI, I.; KHODAIYAN, F.; MOUSAVI, M. & YOUSEFI, H. "Preparation and Characterization of Nanocellulose from Beer Industrial Residues Using Acid Hydrolysis/Ultrasound". *Fibers and Polymers*, **16** (3): 529, 2015.
54. BRADFORD, M. M. "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding". *Analytical Biochemistry*, **72** : 12, 1976.
55. GHOSE, T. K. "MEASUREMENT OF CELLULASE ACTIVITIES". *Pure and Applied Chemistry*, **59** (2): 257, 1987.
56. GOUVEIA, E. R.; DO NASCIMENTO, R. T.; SOUTO-MAIOR, A. M. & DE MORAES ROCHA, G. J. "Validation of methodology for the chemical characterization of sugar cane bagasse". *Quimica Nova*, **32** (6): 1500, 2009.
57. SEGAL, L.; J.J., C.; A.E., M. & C.M., C. "An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer". *Text. Res. J.* , **29** : 786, 1959.
58. BONDESON, D.; MATHEW, A. & OKSMAN, K. "Optimization of the isolation of nanocrystals from microcrystalline cellulose by acid hydrolysis". *Cellulose*, **13** : 171 2006.
59. ARANHA, I. B. & OLIVEIRA, C. H. In *XIX ENTMME Recife*, Pernambuco, 2002.
60. NINDIYASARI, F.; GRIESSHABER, E.; ZIMMERMANN, T.; MANIAN, A. P.; RANDOW, C.; ZEHBE, R.; FERNANDEZ-DIAZ, L.; ZIEGLER, A.; FLECK, C. & SCHMAHL, W. W. "Characterization and mechanical properties investigation of the cellulose/gypsum composite". *JOURNAL OF COMPOSITE MATERIALS*, **0** (0): 1, 2015.
61. LU, Q.-L.; TANG, L.-R.; WANG, S.; HUANG, B.; CHEN, Y.-D. & CHEN, X.-R. "An investigation on the characteristics of cellulose nanocrystals from *Pennisetum sinense*". *biomass and bioenergy*, **70** : 267, 2014.
62. TRACHE, D.; DONNOT, A.; KHIMECHE, K.; BENELMIR, R. & BROSSE, N. "Physico-chemical properties and thermal stability of microcrystalline cellulose isolated from Alfa fibres". *Carbohydrate Polymers*, **104** : 223, 2014.
63. BREDU, M. & VASILE, C. "Thermal degradation of lignin – a review". *Cellulose Chemistry and Technology*, **44** : 353, 2010.
64. BOUJEMAOUI, A.; MONGKHONTREERAT, S.; MALMSTROM, E. & CARLMARK, A. "Preparation and characterization of functionalized cellulose nanocrystals". *Carbohydrate Polymers*, **115** : 457, 2015.
65. ROMAN, M. & WINTER, W. T. "Effect of sulfate groups from sulfuric acid hydrolysis on the thermal degradation behavior of bacterial cellulose". *Biomacromolecules*, **5** (5): 1671, 2004.
66. CORRÊA, A. C. *Preparação de nanofibras de celulose a partir de fibras de curauá para desenvolvimento de nanocompósitos poliméricos com EVA*, São Carlos, Programa de Pós-graduação em Engenharia de Materiais - UFSCar, 2010. Tese de doutorado, 153p.
67. TEIXEIRA, E. D. M.; PASQUINI, D.; CURVELO, A. A. S.; CORRADINI, E.; BELGACEM, M. N. & DUFRESNE, A. "Cassava bagasse cellulose nanofibrils reinforced thermoplastic cassava starch". *Carbohydrate Polymers*, **78** (3): 422, 2009.

ANEXO I

Difratogramas de raios X das gipsitas: 1) cocada e 2) disseminada. G – gipsita; A – anidrita.



Fonte: ARANHA et al. ⁵⁹