



UNICAMP

HELOISA TIBOLLA

**PRODUÇÃO DE NANOFIBRAS DE CELULOSE POR
HIDRÓLISE ENZIMÁTICA**

CAMPINAS

2014



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

HELOISA TIBOLLA

**PRODUÇÃO DE NANOFIBRAS DE CELULOSE POR
HIDRÓLISE ENZIMÁTICA**

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Florencia Cecilia Menegalli

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Franciele Maria Pelissari Molina

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL
DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA
HELOISA TIBOLLA, E ORIENTADA PELA
PROF^a DR^a. FLORENCIA CECILIA MENEGALLI.**

CAMPINAS
2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Márcia Regina Garbelini Sevillano - CRB 8/3647

T434p Tibolla, Heloisa, 1989-
Produção de nanofibras de celulose por hidrólise enzimática / Heloisa Tibolla. –
Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Florencia Cecilia Menegalli.
Coorientador: Franciele Maria Pelissari Molina.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de
Engenharia de Alimentos.

1. Hidrólise enzimática. 2. Banana verde. 3. Nanofibras de celulose. 4.
Celulase. 5. Xilanase. I. Menegalli, Florencia Cecilia. II. Molina, Franciele Maria
Pelissari. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de
Alimentos. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Cellulose nanofibers produced by enzymatic hydrolysis

Palavras-chave em inglês:

Enzymatic hydrolysis

Unripe banana

Cellulose nanofibers

Cellulase

Xylanase

Área de concentração: Engenharia de Alimentos

Titulação: Mestra em Engenharia de Alimentos

Banca examinadora:

Florencia Cecilia Menegalli [Orientador]

Luciane Maria Colla

Rosemary Aparecida de Carvalho

Data de defesa: 26-03-2014

Programa de Pós-Graduação: Engenharia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Florencia Cecilia Menegalli
Orientadora

Prof^a Dr^a Luciane Maria Colla
Membro Titular
UPF – FEAR

Prof^a Dr^a Rosemary Aparecida de Carvalho
Membro Titular
USP - FZEA

Prof^a Dr^a Delia Rita Tapia Blácido
Membro Suplente
USP - FFCLRP

Prof Dr Francisco Maugeri Filho
Membro Suplente
UNICAMP - FEA

RESUMO

A presente dissertação objetivou estudar o potencial da técnica de hidrólise enzimática na produção de nanofibras de celulose (NFCs) a partir da casca de bananas verdes da variedade “Terra” (*Musa paradisiaca*). Na primeira etapa do trabalho, o farelo da casca da banana foi caracterizado com base em suas propriedades físico-químicas, funcional e estrutural. Na segunda etapa, testou-se combinações de tratamentos (químico, hidrólise enzimática e tratamento mecânico) para isolar nanofibras de celulose. Na terceira etapa do trabalho avaliou-se a influência das condições de processo (pH, temperatura, concentração de enzima e concentração de substrato) na hidrólise enzimática com xilanase. Os experimentos foram realizados empregando-se um planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} com três pontos centrais. As NFCs foram caracterizadas quanto ao diâmetro, distribuição do comprimento, potencial zeta, grupos funcionais por FTIR, cristalinidade por difração de raios-X (DRX), concentração de NFCs produzidas e característica morfológica por microscopia eletrônica de transmissão (MET). A quarta e última etapa, foi realizada com o intuito de estudar a adição de mais uma hidrólise enzimática, usando o complexo celulolítico, na produção de NFCs. O farelo apresentou uma estrutura irregular, com teor de celulose de 7,5% e índice de cristalinidade de 15%. A presença de componentes amorfos (hemicelulose e lignina) foi constatada no farelo através da análise de grupos funcionais. Como resultados da segunda etapa, foram obtidas partículas de celulose em dimensões micro e nanométricas, evidenciando que o tratamento com potencial para produzir NFCs foi o branqueamento do farelo com KOH 5%, hidrólise enzimática com xilanase e celulase e após, desintegração das fibrilas com homogeneização mecânica, obtendo-se partículas com diâmetro médio de 14,9 nm. Na terceira etapa da pesquisa, as imagens da microscopia confirmaram que o tratamento com a enzima xilanase foi eficaz no isolamento de fibras de celulose na escala nanométrica. O diâmetro médio apresentado pelas mesmas foi de 8,8 nm. Em água neutra, as suspensões de nanofibras apresentaram potencial zeta alto e negativo, na faixa de -22,8 e -29,5, o que minimiza as interações que levam à formação de agregados de nanofibras, colaborando para a formação de uma suspensão coloidal mais estável. O índice de cristalinidade do farelo foi de 15,0% e das nanofibras variou entre 48,5 e 61,0%, demonstrando que o tratamento utilizado promoveu a remoção das frações amorfas. Os

resultados obtidos a partir do planejamento fatorial mostrou que a enzima xilanase opera sobre o isolamento do NFCS em uma ampla faixa de condições do processo, dentro do intervalo de estudo. Os resultados encontrados na quarta etapa demonstraram que as cadeias de celulose das nanofibras foram reduzidas à monômeros de açúcares, principalmente glicose, visto que o complexo celulolítico atua de forma sinérgica na degradação total da celulose. O farelo da casca de banana é um resíduo agroindustrial com potencial uso para produção de nanopartículas. A hidrólise enzimática com xilanase mostrou-se ser uma técnica promissora na produção de nanofibras de celulose com alto desempenho como material de reforço em compósitos, sendo desnecessária a realização de um tratamento com a enzima celulase.

Palavras-chave: Casca de banana verde, Musa paradisiaca, nanofibras de celulose, pré-tratamento, celulase, xilanase.

ABSTRACT

This dissertation aimed to study the potential use of the technique of enzymatic hydrolysis in the production of cellulose nanofibers (CNFs) from peel unripe bananas of the variety "Terra" (*Musa paradisiaca*). In the first stage of the work, the bran of the peel banana was characterized on the basis of their physicochemical, structural and functional properties. In the second stage, to isolate cellulose nanofibers, we tested combination of treatments (chemical, enzymatic hydrolysis and mechanical treatment). In the third stage of the study was evaluate the influence of process conditions (pH, temperature, enzyme concentration and substrate concentration) on enzymatic hydrolysis with xylanase. The experiments were performed employing a fractional factorial design 2^{4-1} with three center points. The NFCS were characterized by diameter, length distribution, zeta potential, functional groups by FTIR, crystallinity by X-rays diffraction (XRD) and morphology features by transmission electron microscopy (TEM). The fourth and final stage was performed in order to study the efficiency of further enzymatic hydrolysis using cellulolytic complex to produce NFCS. The bran presented an irregular structure, with amount of cellulose of 7.5% and the crystallinity index of 15%. The presence of amorphous components (hemicellulose and lignin) was noted in the bran by functional groups analysis. As a result of the second stage, cellulose particles in micro and nanometric dimensions were obtained, indicating that the treatment with the potential to produce NFCS was bleaching bran with KOH 5%, enzymatic hydrolysis with cellulase and xylanase and after mechanical homogenization for disintegration of the fibrils, yielding particles with an average diameter of 14.9 nm. In the third step of research, the images of the microscope confirmed that the treatment with enzyme xylanase was effective in the isolation of cellulose fibers in the nanoscale. The average diameter presented by the same was 8.8 nm. In neutral water, suspensions of nanofibers showed high and negative zeta potential in the range of -22.8 and -29.5, which minimizes the interactions that lead to the formation of aggregates of nanofibers, contributing to the formation of a colloidal suspension more stable. The crystallinity index of the bran was 15.0% and the nanofibers was between 48.5 and 61.0%, demonstrating that the treatment promoted the removal of the amorphous fractions. Results obtained from the factorial design showed that xylanase enzyme operates on the isolation of the NFCS in a

wide range of process conditions, within the evaluated range. The results found in the fourth step showed that the cellulose chains of the nanofibers were reduced to monomers sugars, especially glucose, since the cellulolytic complex acts synergistically in overall degradation of cellulose. The bran banana peel is an agricultural waste with potential use for production of nanoparticles. The enzymatic hydrolysis with xylanase was shown to be a promising technique for producing cellulose nanofibers with high performance as reinforcing material in composites, due to its ability to make it unnecessarily performing a treatment with cellulase enzyme, which was detrimental to the formation of NFCS.

Keywords: Peel unripe banana, Musa paradisiaca, cellulose nanofibers, pretreatment, cellulase, xylanase.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	1
OBJETIVOS	5
CAPÍTULO 1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
1. 1 A BANANA	7
1. 2 AGENTES DE REFORÇO	8
1. 2. 1 Fibras vegetais lignocelulósicas	9
1. 2. 1. 1 <i>Celulose</i>	12
1. 2. 1. 2 <i>Hemicelulose</i>	13
1. 2. 1. 3 <i>Lignina</i>	14
1. 2. 2 Nano e microfibras de celulose	14
1. 2. 3 Isolamento de nanofibras de celulose	16
1. 2. 3. 1 <i>Pré-tratamento</i>	16
1. 2. 3. 2 <i>Hidrólise enzimática</i>	20
1. 3 CONCLUSÃO	29
CAPÍTULO 2 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA PARA PRODUÇÃO DE NANOFIBRAS DE CELULOSE	31
2. 1 INTRODUÇÃO	31
2. 2 MATERIAL E MÉTODOS	32
2. 2. 1 Obtenção da matéria-prima	32
2. 2. 2 Caracterização da matéria-prima	34
2. 2. 2. 1 <i>Microestrutura do farelo da casca de banana</i>	34
2. 2. 2. 2 <i>Distribuição de tamanho e diâmetro médio das partículas do farelo</i>	34
2. 2. 2. 3 <i>Determinação da composição química</i>	35
2. 2. 2. 4 <i>Análise dos grupos funcionais do farelo por Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR)</i>	38
2. 2. 2. 5 <i>Cristalinidade do farelo por Difração de Raios-X (DRX)</i>	39
2. 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
2. 3. 1 Caracterização da matéria-prima	39

2. 3. 1. 1 <i>Microestrutura</i>	39
2. 3. 1. 2 <i>Distribuição de tamanho e diâmetro médio das partículas do farelo</i>	40
2. 3. 1. 3 <i>Determinação da composição química</i>	41
2. 3. 1. 4 <i>Análise dos grupos funcionais do farelo por Espectroscopia de Absorção na região do infravermelho (FTIR)</i>	43
2. 3. 1. 5 <i>Cristalinidade do farelo por Difração de Raios-X (DRX)</i>	45
2. 4 CONCLUSÃO	46

CAPÍTULO 3 DETERMINAÇÃO DA METODOLOGIA PARA PRODUÇÃO DE NANOFIBRAS DE CELULOSE POR HIDRÓLISE ENZIMÁTICA	49
--	-----------

3. 1 INTRODUÇÃO	49
3. 2 MATERIAL E MÉTODOS	50
3. 2. 1 Produção de nanofibras	50
3. 2. 2 Caracterização das suspensões	53
3. 2. 2. 1 <i>Nano e microestrutura</i>	53
3. 2. 2. 2 <i>Potencial zeta e determinação do comprimento das nanofibras</i>	54
3. 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
3. 3. 1 Caracterização das suspensões	54
3. 3. 1. 1 <i>Aparência das suspensões coloidais</i>	54
3. 3. 1. 2 <i>Nano e microestrutura</i>	61
3. 3. 1. 3 <i>Potencial zeta</i>	65
3. 4 CONCLUSÃO	66

CAPÍTULO 4 ESTUDO DAS CONDIÇÕES DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA COM XILANASE	69
---	-----------

4. 1 INTRODUÇÃO	69
4. 2 MATERIAL E MÉTODOS	70
4. 2. 1 Produção de nanofibras	70
4. 2. 2 Caracterização da suspensão obtida após pré-tratamento e das NFCs	72
4. 2. 2. 1 <i>Morfologia e Diâmetro das nanofibras</i>	72

4. 2. 2. 2	<i>Concentração das suspensões de nanofibras</i>	73
4. 2. 2. 3	<i>Análise dos grupos funcionais por FTIR</i>	73
4. 2. 2. 4	<i>Índice de cristalinidade</i>	73
4. 2. 2. 5	<i>Potencial zeta e determinação do comprimento dos filamentos celulósicos</i>	74
4. 2. 2. 6	<i>Determinação de açúcares redutores totais (DNS)</i>	74
4. 2. 2. 7	<i>Análise estatística</i>	75
4. 3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
4. 3. 1	Caracterização da suspensão obtida após pré-tratamento e das NFCs	75
4. 3. 1. 1	<i>Morfologia, tamanho, potencial zeta</i>	75
4. 3. 1. 2	<i>Análise dos grupos funcionais</i>	87
4. 3. 1. 3	<i>Índice de cristalinidade</i>	90
4. 3. 1. 4	<i>Teor de açúcares redutores totais (ART)</i>	95
4. 4	CONCLUSÃO	99
<hr/>		
CAPÍTULO 5 EFEITO DA ENZIMA CELULASE SOBRE AS PROPRIEDADES DAS NANOFIBRAS DE CELULOSE		101
<hr/>		
5. 1	INTRODUÇÃO	101
5. 2	MATERIAL E MÉTODOS	102
5. 2. 1	Produção de nanofibras	102
5. 2. 2	Caracterização das suspensões	104
5. 2. 2. 1	<i>Morfologia das nanofibras</i>	104
5. 2. 2. 2	<i>Concentração das suspensões de nanofibras</i>	104
5. 2. 2. 3	<i>Análise dos grupos funcionais por FTIR</i>	105
5. 2. 2. 4	<i>Índice de cristalinidade</i>	105
5. 2. 2. 5	<i>Potencial zeta e determinação</i>	105
5. 2. 2. 6	<i>Determinação de açúcares redutores totais (DNS)</i>	105
5. 2. 2. 7	<i>Determinação do teor de glicose nas suspensões coloidais por UPLC</i>	105
5. 2. 3	Análise estatística	106
5. 3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	106
5. 3. 1	Aparência e concentração das suspensões coloidais	106

5. 3. 2 Caracterização das suspensões.....	108
5. 3. 2. 1 <i>Morfologia das nanofibras</i>	<i>108</i>
5. 3. 2. 2 <i>Análise dos grupos funcionais por FTIR.....</i>	<i>109</i>
5. 3. 2. 3 <i>Índice de cristalinidade (Icr%).....</i>	<i>111</i>
5. 3. 2. 4 <i>Determinação de açúcares redutores totais (ART).....</i>	<i>114</i>
5. 4 CONCLUSÃO	118

CONCLUSÕES GERAIS.....	121
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	123
REFERÊNCIAS	125
APÊNDICES.....	136

*Pai nosso, que estás nos céus, santificado seja o
Vosso nome. Venha a nós o Vosso Reino. Seja
feita a Vossa vontade, assim na terra como no
céu. O pão nosso de cada dia nos daí hoje.
Perdoai as nossas ofensas, assim como nós
perdoamos a quem nos tem ofendido. E não nos
deixei cair em tentação, mas livrai-nos de todo
mal.*

(Jesus Cristo, Mateus, 6:9-13)

*Dedico este trabalho aos meus pais Ari Vitorio e
Salette, e aos meus irmãos Gustavo e Igor pelo
amor imensurável, apoio e palavras de conforto.
Longe de mim, mas perto do coração.
Amo vocês!*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, que me dá inspiração e força interior, por me amparar nos momentos difíceis, por ser meu grande mentor e me suprir em todas as minhas necessidades.

A minha orientadora Profa. Dra. Florencia Cecilia Menegalli, pela orientação que elevou meus conhecimentos científicos e muito estimulou o meu desejo de fazer o melhor e querer aprender sempre mais. Agradeço também a oportunidade que me deu de me integrar no seu grupo de pesquisa, a confiança em mim depositada e por acreditar no futuro deste projeto, sendo um exemplo de profissional que sempre fará parte da minha vida.

A minha co-orientadora e amiga Profa Dra. Franciele Maria Pelissari, agradeço a total disponibilidade e dedicação, pela orientação, conselhos, apoio constante, palavras de incentivo e conhecimentos transmitidos para meu crescimento profissional.

Aos membros da minha banca examinadora, pelas observações e contribuições dadas que enriqueceram este trabalho. Ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado, e a CAPES pelo apoio financeiro.

Aos professores e funcionários do Departamento de Engenharia de Alimentos (DEA/FEA/UNICAMP). As colegas e amigas do grupo de pesquisa, Kali, Talitão, Fran, Lady e Tana.

As técnicas do laboratório LEP, Zil e Pati, pela ajuda na realização de análises e por tornar o ambiente de trabalho mais alegre. Ao professor Francisco Maugeri Filho e a amiga Cris do laboratório LEB. Ao Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano) e ao técnico Carlos Alberto Ospina.

Aos meus amados familiares (Dal Piva e Tibolla) que torceram por mim. Em especial aos meus pais, Ari Vitorio e Salete, pela educação, por todos os ensinamentos da

vida e pelo modo como sabem deixar nossa família sempre unida. Por acreditarem sempre em mim, pelo apoio nos momentos de tomar decisões, obrigada por não me deixarem desistir dos meus sonhos. Mãe linda, meu exemplo de mulher forte e guerreira, obrigada pelo carinho que acalma. Pai ídolo, meu exemplo de pessoa batalhadora, obrigada pela ajuda, apoio e proteção. Vocês foram a sustentação para que este trabalho fosse possível.

Ao meu maior tesouro, meus irmãos, Gustavo e Igor, pelo amor, carinho, companheirismo, brincadeiras e risadas. Mesmo com a distância, obrigada por manterem o laço de união que sempre nos acompanha. Amo vocês.

A minha querida amiga e companheira de todas as horas Tanara, Tana, Tanajura, Tanarinha. Agradeço tua companhia 24 h por dia, pela ajuda em todas as etapas do meu trabalho, pelos conselhos de irmã. Obrigada por me mostrar como levar a vida a sério, mas não ficar sério para a vida. Vou ter você guardada pra sempre no meu coração.

As minhas amigas de infância, em especial à Ana Caroline, Mariane e a prima Nati, pelos intermináveis desabafos ao telefone, pela partilha dos bons e “menos bons” momentos. Obrigada pela amizade sincera que dura a 24 anos, pelas palavras de apoio, conselhos, puxões de orelha e o amor indestrutível. A Bruna, por sempre me esperar de braços abertos com o chimarrão pronto para horas de conversa. E também, as amigas da faculdade Elenizi, Tamires e Gabizona, pessoas especiais na minha caminhada até aqui.

Aos colegas de mestrado Larissa, Davi e Guilherme, pelo companheirismo e agradável convívio que me proporcionaram a amizade compartilhada.

As pessoas especiais que conheci em Campinas e que sabem deixar a vida mais divertida, Mayara, Iza, Nessa, Laís, Manu, Amanda, Carol Rossilho e Clau. A Gi e Ju Mori pela amizade, por divertirem as aulas de tecido acrobático, pelo carinho e apoio.

Enfim, a todos aqueles que, embora não mencionados, estiveram envolvidos e de uma forma ou de outra, contribuíram e participaram para a execução desse trabalho.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1.1 -	Estrutura dos principais componentes de uma fibra vegetal.....	10
Figura 1.2 -	Organização estrutural de uma fibra vegetal (fibra de madeira).....	12
Figura 1.3 -	Hidrólise seletiva das regiões amorfas das fibrilas de celulose	17
Figura 1.4 -	Efeito do pré-tratamento na estrutura de materiais lignocelulósicos	19
Figura 1.5 -	Mecanismo de ação da xilanase sobre a cadeia de xilana.....	22
Figura 1.6 -	Mecanismo de ação das celulasas sobre a cadeia de celulose	23

Capítulo 2

Figura 2.1 -	Fluxograma do processo de obtenção do farelo da casca de banana	33
Figura 2.2 -	Fluxograma do processo de extração de materiais não estruturais da biomassa.....	36
Figura 2.3 -	Microestrutura do farelo da casca de banana verde (a) 1400 x (b) 500 x...	40
Figura 2.4 -	Distribuição do tamanho do diâmetro dos grânulos do farelo da casca de banana.....	41
Figura 2.5 -	Espectro de absorção na região do infravermelho para o farelo da casca de banana.....	45
Figura 2.6 -	Difratograma de Raio-X para o farelo da casca de banana.....	46

Capítulo 3

Figura 3.1 -	Esquema de cada tratamento avaliado para produção de nanofibras de celulose: método 1, método 2, método 3 e método 4.	51
Figura 3.2 -	Etapas de processo para obtenção de NFCs pelo método 1	56
Figura 3.3 -	Etapas de processo para obtenção de NFCs pelo método 2.....	57
Figura 3.4 -	Etapas de processo para obtenção de NFCs pelo método 3.....	58
Figura 3.5 -	Suspensão final após tratamento alcalino e dez lavagens com água deionizada (método 4)	59

Figura 3.6 - Licor obtido após o tratamento alcalino do farelo e após as lavagens com água deionizada (esquerda para direita)	60
Figura 3.7 - Etapas de processo para obtenção de NFCs pelo método 4.....	61
Figura 3.8 - Microscopia eletrônica de transmissão (TEM) das suspensões coloidais obtidas dos diferentes tratamentos: N1 (método 1), N2 (método 2), N3 (método 3) e N4 (método 4).....	62
Figura 3.9 - Distribuição do tamanho (comprimento) das nanofibras de celulose obtidas pelo método 4.....	64
Figura 3.10 - Imagens da microscopia óptica das microfibras de celulose obtidas pelos diferentes tratamentos: N1 (método 1), N2 (método 2), N3 (método 3).....	65

Capítulo 4

Figura 4.1 - Espectro de difração de DRX de uma amostra de celulose I, ilustrando o método da altura de pico.....	74
Figura 4.2 - Distribuição do tamanho dos filamentos celulósicos após tratamento alcalino	76
Figura 4.3 - Imagens TEM obtidas para as amostras de NFCs: N1 (T= 35 °C, pH 4,0, [E] 30 U/g e [S] 15 %), N2 (T= 55 °C, pH 4,0, [E] 30 U/g e [S] 35 %), N3 (T= 35 °C, pH 6,0, [E] 30 U/g e [S] 35 %), N4 (T= 55 °C, pH 6,0, [E] 30 U/g e [S] 15 %), sendo U definido como 1 µmol de xilose liberada por minuto por mL de enzima (1000x, escala = 100 nm). 77	77
Figura 4.4 - Imagens TEM obtidas para as amostras de NFCs: N5 (T= 35 °C, pH 4,0, [E] 70 U/g e [S] 35 %), N6 (T= 55 °C, pH 4,0, [E] 70 U/g e [S] 15 %), N7 (T= 35 °C, pH 6,0, [E] 70 U/g e [S] 15 %), N8 (T= 55 °C, pH 6,0, [E] 70 U/g e [S] 35 %), PC (T= 45 °C, pH 5,0, [E] 50 U/g e [S] 25 %), sendo U definido como 1 µmol de xilose liberada por minuto por mL de enzima (1000x, escala = 100 nm).	78
Figura 4.5 - Espectro de FTIR obtido para as amostras de farelo não tratado (FNT) e farelo tratado com KOH 5% (FTA)	89
Figura 4.6 - Espectro de FTIR obtido para as amostras de NFCs (N1, N2, N3, N4 e N5) .	89
Figura 4.7 - Espectro de FTIR obtido para as amostras de NFCs (N6, N7, N8, N9, N10 e N11).....	90

Figura 4.8 - Padrão da difração de raios-X do farelo da casca de banana não tratado e com tratamento alcalino	93
Figura 4.9 - Padrão da difração de raios-X das amostras de NFCs (N1, N2, N3 e N4) obtidas através do planejamento fatorial fracionado 2^{4-1}	94
Figura 4.10 - Padrão da difração de raios-X das amostras de NFCs (N5, N6, N7 e N8) obtidas através do fatorial fracionado 2^{4-1}	94
Figura 4.11 - Padrão da difração de raios-X das amostras de NFCs dos pontos centrais (N9, N10 e N11) obtidas através do fatorial fracionado 2^{4-1}	95
Figura 4.12 - Concentração de açúcar redutor em função do tempo de hidrólise	99

Capítulo 5

Figura 5.1 - Esquema da produção de nanofibras de celulose por hidrólise enzimática com xilanase e celulase.....	103
Figura 5.2 - Suspensões coloidais obtidas pelos diferentes métodos de hidrólise enzimática com xilanase (T= 55 °C, pH 6,0, [E] 30 U/g e [S] 15%) e celulase: NC1 (T= 40 °C, pH 4,0, [E] 20 U/g e [S] 15%); NC2 (T= 50 °C, pH 5,0, [E] 30 U/g e [S] 15%) e NC3 (T= 60 °C, pH 6,0, [E] 40 U/g e [S] 15%). Sendo que U é definido como 1 µL de xilose/glicose liberada por mL de enzima	107
Figura 5.3 - Imagens MET das suspensões coloidais obtidas pela hidrólise com enzimas xilanase (T= 55 °C, pH 6,0, [E] 30 U/g e [S] 15%) e celulase: NC1 (T= 40 °C, pH 4,0, [E] 20 U/g e [S] 15%); NC2 (T= 50 °C, pH 5,0, [E] 30 U/g e [S] 15%) e NC3 (T= 60 °C, pH 6,0, [E] 40 U/g e [S] 15%). Sendo que U é definido como 1 µL de xilose/glicose liberada por mL de enzima.....	109
Figura 5.4 - Espectros de FTIR obtidos para as amostras obtidas da hidrólise com enzimas xilanase (T= 55 °C, pH 6,0, [E] 30 U/g e [S] 15%) e celulase: NC1 (T= 40 °C, pH 4,0, [E] 20 U/g e [S] 15%); NC2 (T= 50 °C, pH 5,0, [E] 30 U/g e [S] 15%) e NC3 (T= 60 °C, pH 6,0, [E] 40 U/g e [S] 15%). Sendo que U é definido como 1 µL de xilose/glicose liberada por mL de enzima	111
Figura 5.5 - Padrão da difração de raio-X das amostras obtidas por hidrólise enzimática com xilanase (T= 55 °C, pH 6,0, [E] 30 U/g e [S] 15%) e celulase: NC1 (T= 40 °C, pH 4,0,	

[E] 20 U/g e [S] 15%); NC2 (T= 50 °C, pH 5,0, [E] 30 U/g e [S] 15%) e NC3 (T= 60 °C, pH 6,0, [E] 40 U/g e [S] 15%). Sendo que U é definido como 1 µL de xilose/glicose liberada por mL de enzima	112
Figura 5.6 - Padrão da difração de raio-X da amostra obtida por hidrólise enzimática com xilanase: N6 (T = 55 °C, pH 4,0, [E] 70 U/g e [S] 15%), sendo U definido como quantidade de xilose liberada por minuto por mL de enzima.....	113
Figura 5.7 - Sobrenadante após hidrólise do farelo com xilanase (24 h) e celulase (2 h).....	115
Figura 5.8 - Cromatograma da presença de glicose na amostra NC1 (T= 40 °C, pH 4,0, [E] 20 U/g e [S] 15%), sendo que U é definido como 1 µL de xilose/glicose liberada por mL de enzima.....	116
Figura 5.9 - Cromatograma da presença de glicose na amostra NC2 (T= 50 °C, pH 5,0, [E] 30 U/g e [S] 15%), sendo que U é definido como 1 µL de xilose/glicose liberada por mL de enzima.....	117
Figura 5.10 - Cromatograma da presença de glicose na amostra NC3 (T= 60 °C, pH 6,0, [E] 40 U/g e [S] 15%), sendo que U é definido como 1 µL de xilose/glicose liberada por mL de enzima.....	118

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1.1 - Estado polimérico e função dos componentes principais das fibras vegetais.....	10
Tabela 1.2 - Composição típica da biomassa de diferentes fibras	11
Tabela 1.3 - Composição percentual em massa seca dos resíduos da bananeira	11
Tabela 1.4 - Dimensões de diferentes formas de nano e microfibras de celulose	15

Capítulo 2

Tabela 2.1 - Composição química do farelo da casca de banana verde (<i>M. paradisíaca</i>) em base seca.....	42
---	----

Capítulo 3

Tabela 3.1 - Avaliação da aparência das suspensões coloidais.....	55
Tabela 3.2 - Diâmetros das nanofibras produzidas por diferentes autores	63

Capítulo 4

Tabela 4.1 - Matriz de experimentos do Planejamento Fatorial Fracionado 2^{4-1} resolução IV, com três pontos centrais	71
Tabela 4.2 - Tamanhos, potencial zeta e concentração das NFCs produzidas através do planejamento fatorial fracionado 2^{4-1}	80
Tabela 4.3 - Análise de variância e efeitos estimados das variáveis pH, temperatura, concentração de enzima e substrato sobre o comprimento dos filamentos celulósicos nos experimentos do Planejamento Fracionado 2^{4-1} , com três pontos centrais.....	81
Tabela 4.4 - Valores da distribuição de comprimento em volume das nanofibras de celulose.....	83
Tabela 4.5 - Análise de variância e efeitos estimados das variáveis pH, temperatura, concentração de enzima e substrato sobre a relação de aspecto nos experimentos do Planejamento Fracionado 2^{4-1} , com três pontos centrais	84

Tabela 4.6 - Análise de variância dos resultados do potencial zeta das NFCs obtidos nos experimentos do Planejamento Fracionado 2^{4-1} , com três pontos centrais.....	85
Tabela 4.7 - Efeitos estimados das variáveis pH, temperatura, concentração de enzima e substrato sobre o potencial zeta das NFCs nos experimentos do Planejamento Fracionado 2^{4-1} , com três pontos centrais.....	85
Tabela 4.8 - Análise de variância dos resultados da concentração das NFCs obtidos nos experimentos do Planejamento Fracionado 2^{4-1} , com três pontos centrais.....	86
Tabela 4.9 - Análise de variância e efeitos estimados das variáveis pH, temperatura, concentração de enzima e substrato sobre a concentração das NFCs nos experimentos do Planejamento Fracionado 2^{4-1} , com três pontos centrais.....	87
Tabela 4.10 - Índice de cristalinidade (I_{cr}) do FNT, FTA e das NFCs produzidas através do planejamento fatorial fracionado 2^{4-1}	91
Tabela 4.11 - Análise de variância e efeitos estimados das variáveis pH, temperatura, concentração de enzima e substrato sobre a cristalinidade das NFCs nos experimentos do Planejamento Fracionado 2^{4-1} , com três pontos centrais.....	92
Tabela 4.12 - Concentração de açúcar redutor formado durante a hidrólise enzimática com xilanase na produção de NFCs através do planejamento fatorial fracionado 2^{4-1}	96
Tabela 4.13 - Análise de variância dos resultados da concentração de açúcar redutor formado nos experimentos do Planejamento Fracionado 2^{4-1} , com três pontos centrais.....	97
Tabela 4.14 - Análise de variância e efeitos estimados das variáveis pH, temperatura, concentração de enzima e substrato sobre a concentração de açúcar redutor formado nos experimentos do Planejamento Fracionado 2^{4-1} , com três pontos centrais.....	98

Capítulo 5

Tabela 5.1 - Concentração de sólidos totais nas suspensões (g de sólidos/100 g de suspensão).....	107
Tabela 5.2 - Potencial zeta das suspensões obtidas por hidrólise enzimática com xilanase e celulase.....	114
Tabela 5.3 - Concentração de açúcar redutor formado após hidrólise enzimática com xilanase e celulase.....	115

Tabela 5.4 - Concentração de glicose formada após hidrólise enzimática com xilanase e celulase.....115

LISTA DE QUADROS

Capítulo 1

Quadro 1.1 - Técnicas de pré-tratamentos para a separação dos componentes amorfos dos materiais lignocelulósicos 18

Quadro 1.2 - Estudos sobre obtenção de nanopartículas de celulose por hidrólise enzimática.....26

INTRODUÇÃO GERAL

É crescente o interesse de diferentes pesquisadores pelo estudo e utilização de fontes naturais renováveis, com características e propriedades que ofereçam alternativas de aplicação em diferentes áreas e, que também atendam à necessidade de se preservar o meio ambiente. (KAUSHIK et al., 2010). A partir do ano de 2009, políticas governamentais têm incentivando a utilização das fibras naturais, em virtude da enorme variedade de fontes disponíveis, principalmente as de origem vegetal (SILVA et al., 2009).

Neste enfoque, o grupo de pesquisa de filmes e coberturas comestíveis do laboratório de Engenharia de Processos (DEA/FEA/UNICAMP) tem desenvolvido pesquisas na área de embalagens biodegradáveis a partir de fontes promissoras de origem vegetal. Além de trabalhos direcionados a esta área, o grupo de pesquisa desenvolve estudos com fibras vegetais de dimensão nanométrica, visando sua utilização como material de reforço para os filmes (nanocompósitos). Apesar de ser uma linha de pesquisa recente, os resultados de estudos anteriores se mostram muito promissores e incentivam a continuação e evolução das pesquisas.

A celulose, componente principal das paredes celulares das fibras vegetais, tem sido explorada por apresentar características comparáveis aos polímeros sintéticos e ter potencial para substituí-los, além de ser um recurso biodegradável. Isto torna este material ideal para produção de nanopartículas usadas como agente de reforço em compósitos, pois apresenta boa resistência mecânica, térmica, rigidez e alto grau de cristalinidade (SIQUEIRA et al., 2010a).

O principal interesse nesta pesquisa é a aplicação das nanofibras em filmes que serão utilizados para embalagens. Os nanocompósitos tem aplicação em diversas áreas de estudo e, quando empregados como materiais de embalagem, podem impedir a migração de umidade, proteger os produtos alimentícios durante seu transporte, evitando danos mecânicos e conservando sua integridade física. Esses materiais têm demonstrado serem promissores no controle da respiração de frutas e hortaliças, funcionando como uma embalagem de atmosfera modificada que favorece a conservação das características sensoriais e pode prolongar o período de armazenamento dos produtos (MALI et al., 2010).

São inúmeras as vantagens oferecidas pelas nanofibras de celulose como agente de reforço (NFCs), visto que promovem melhorias nas propriedades dos compósitos: aumentam a barreira à luz, diminuem a absorção de água, a permeabilidade ao vapor de água e a solubilidade (BONDESON et al., 2006). Além disso, oferecem vantagens econômicas e estratégicas, aumentando o seu potencial comercial (SIQUEIRA et al., 2009).

Diante disto, é crescente o número de pesquisas relacionadas ao uso de resíduos agrícolas para obtenção de produtos de maior valor agregado. O Brasil é um país que possui a maior biomassa do mundo e maior extensão territorial cultivável e, este potencial deve ser mais explorado, buscando a melhor utilização dos recursos existentes e a identificação de espécies vegetais com propriedades interessantes. Em virtude da disponibilidade de fontes vegetais, é crescente a motivação pelo estudo para a obtenção de fibras de celulose em tamanho nanométrico. Por sua vez, o cultivo e industrialização da banana gera uma considerável quantidade de resíduos em base lignocelulósica (ELANTHIKKAL et al., 2010). Uma fonte pouco pesquisada é a casca da banana que, além de ser uma fonte rica em celulose, e apresentam características funcionais ideais, seu processamento agregará valor a este subproduto.

O desafio atual é o desenvolvimento de novas técnicas de processamento para a obtenção das NFCs, visto que as condições de processo para atingir dimensões nanométricas afetam as características morfológicas das nanopartículas e consequentemente, seu desempenho como material de reforço em compósitos. O emprego de diversos métodos físicos, químicos, biológicos ou a combinação destes para a separação de NFCs tem sido avaliado (ROSA et al., 2010). A hidrólise enzimática é um método que está em rápido desenvolvimento, ainda não é comercializada e é pouco estudada, mas acredita-se que a hidrólise enzimática tem uma abordagem mais promissora e pode ser utilizada no isolamento das fibrilas de celulose, fornecendo condições de hidrólise mais suaves. Além disso, é considerada ambientalmente amigável, visto que não envolve solventes ou reagentes químicos (SIQUEIRA et al., 2010a).

Em geral, os materiais lignocelulósicos são resistentes à bioconversão e requerem um pré-tratamento para aumentar a sua digestibilidade e tornar a celulose mais acessível à hidrólise. A destruição das regiões amorfas ao redor e entre as microfibrilas de celulose pode ser feito por tratamento químico (alcalino) ou por hidrólise com enzimas xilanolíticas.

Este processo deve ser realizado sob condições controladas, pois a cinética da hidrólise da região amorfa é mais rápida do que da região cristalina, em virtude da maior permeabilidade desta, visando manter os cristalitos de celulose intactos (CASTRO e PEREIRA JR, 2010).

Na hidrólise enzimática, as enzimas xilanases e celulases são comumente utilizadas. As enzimas atacam as regiões amorfas das fibras lignocelulósicas, que possuem menor densidade e maior área de contato, causando uma clivagem hidrolítica das ligações glicosídicas β -1,4 localizadas entre as unidades de glicose que formam a celulose. As xilanases são enzimas hidrolíticas que catalisam aleatoriamente os compostos de hemicelulose presentes na fibra vegetal, resultando numa hidrólise seletiva das fibrilas, levando à formação das nanofibras de celulose, geralmente em suspensões coloidais (PÄÄKKO et al., 2007). A celulase é um complexo celulolítico formado por três enzimas que atuam em sinergismo (endoglucanase, exoglucanase e β -glicosidase). Este complexo tem a capacidade de degradar totalmente a celulose à monômeros de açúcares, entretanto, para produção de NFCs o ideal é a utilização somente da enzima endoglucanase, a qual age especificamente iniciando a hidrólise nas extremidades da cadeia de celulose (OGEDA e PETRI, 2010).

A produção de NFCs de fibras vegetais partiu da seleção de um método eficaz, capaz de isolar fibras de celulose em tamanho nanométrico, uma vez que na preparação de compósitos, sua elevada área superficial específica, lhes permite interagir de forma mais efetiva com a fase contínua dos compósitos, quando comparadas com aquelas que possuem dimensões micrométricas. O presente trabalho visa o estudo e valorização de um resíduo agrícola (casca de banana) como matéria-prima para elaboração de subprodutos (nanofibras de celulose) que serão aplicados como agente de reforço em compósitos poliméricos. Além disso, a pesquisa busca avaliar a eficiência de diferentes formas de obtenção de nanofibras de celulose, destacando o uso da hidrólise enzimática.



OBJETIVOS

Objetivo geral

Produção de nanofibras de celulose a partir da casca de banana verde.

Objetivos específicos

Parte 1: Obtenção da matéria-prima

- Produção de um farelo a partir da casca de banana verde da variedade Terra (*Musa paradisiaca*);
- Caracterização da matéria-prima quanto a sua composição química, microestrutura, distribuição de tamanho dos grânulos, grupos funcionais e índice de cristalinidade.

Parte 2: Determinação da metodologia para produção de nanofibras de celulose por hidrólise enzimática

- Avaliar diferentes métodos de pré-tratamento (químico) do farelo, a fim de remover os compostos amorfos da estrutura vegetal;
- Avaliar o uso das enzimas xilanase e celulase para o isolamento de nanofibras de celulose;
- Caracterizar as suspensões coloidais obtidas a fim de definir a aplicabilidade quanto ao tamanho de diâmetro das partículas obtidas, potencial zeta e comprimento dos filamentos celulósicos.

Parte 3: Estudo das condições de hidrólise com enzima xilanase

- Determinar a influência das condições de processo (pH, temperatura, concentração de enzima e concentração de substrato) na produção de nanofibras de celulose,

- Caracterizar as nanofibras de celulose quanto ao diâmetro, distribuição do comprimento, potencial zeta, análise de grupos funcionais, índice de cristalinidade e características morfológicas;

Parte 4: Estudo das condições de hidrólise com enzima celulase

- Avaliar o efeito da adição da etapa de hidrólise enzimática com celulase, na produção de nanofibras de celulose;
- Avaliar as nanofibras de celulose quanto às suas características ideais para serem utilizadas como agente de reforço em compósitos.

Capítulo 1 Revisão Bibliográfica

1.1 A BANANA

A bananeira é um vegetal herbáceo completo que possui várias partes que podem ser utilizadas como matéria-prima (pseudocaule, folhas, flores, frutos e sementes). O ciclo vegetativo da bananeira é contínuo e acelerado, permitindo dizer que os bananais têm vida permanente. A banana pertence à divisão *Agiospermae*, classe *Monocotyledoneae*, ordem *Scitaminae* e família *Musaceae*, sendo constituída por dois gêneros: *Musa* (banana comestível) e *Ensete* (banana silvestre) (SILVA, 2009).

A banana é uma das frutas mais populares da terra e seu cultivo está disseminado na maioria dos países tropicais. Atualmente, entre os cinco maiores produtores mundiais de banana, o Brasil é o quinto colocado, com uma produção anual de 7,19 milhões de toneladas, sendo superado pela Índia, Filipinas, China e Equador. No Brasil, esta produção está distribuída por todo o país, participando com significativa importância na economia de vários estados brasileiros (OLIVEIRA et al., 2009; SILVA NETO e GUIMARÃES, 2011). Contudo, de acordo com dados levantados em uma empresa de alimentos no estado de Santa Catarina, a bananicultura gera considerável quantidade de resíduos, visto que para cada tonelada de bananas colhidas, são gerados aproximadamente 4 t de resíduos lignocelulósicos, sendo 3 t de pseudocaule, 160 kg de engaços, 480 kg de folhas e 440 kg de cascas (GONÇALVES, 2011).

O aproveitamento dessa biomassa, além de permitir a redução da poluição ambiental, também agrega valor a este subproduto, incentivando assim pesquisas relacionadas ao desenvolvimento sustentável. Algumas práticas já têm sido utilizadas há muito tempo nos países produtores da fruta, como a fabricação de cordas, chapéus e tapetes. A casca da banana é uma potencial fonte de fibra celulósica, material de destaque na produção de papel e roupa e que recentemente tem atraído interesse na produção de nanomateriais (ELANTHIKKAL et al., 2010).

1. 2 AGENTES DE REFORÇO

Os compósitos são materiais que consistem de, pelo menos, dois ou mais componentes (a matriz e o agente de reforço), e suas propriedades são definidas pela compatibilidade química e física entre estes constituintes. A produção de partículas nanométricas rígidas tem despertado interesse nos últimos anos, pois estas atuam como agentes de reforço quando aplicadas em materiais compósitos (SILVA et al., 2009).

O sucesso comercial de nanocompósitos, como embalagens de alimentos, ainda é um pouco limitado devido estes apresentarem deficiência na barreira contra umidade, nas propriedades mecânicas e sensoriais. Uma alternativa para aprimorar as características destes é aumentar consideravelmente o seu potencial comercial incorporando agentes de reforço nanométricos, como as nanofibras de celulose (KANG e MIN, 2010). Este tipo de material apresenta muitas vantagens em comparação com materiais inorgânicos, que atualmente são utilizados na produção de compósitos. Dentre todas, pode-se incluir o baixo custo, baixa densidade, não promovem abrasão do equipamento de processamento, boas propriedades térmicas, mecânicas e de biodegradação (BHATNAGAR, 2005).

A nanopartícula de reforço exibe pelo menos, uma de suas dimensões menor que 100 nm e essa característica particular, fornece aos compósitos propriedades únicas e excepcionais (SIQUEIRA et al., 2010a). Nas duas últimas décadas, as pesquisas estão voltadas para a obtenção desses nanomateriais a partir de recursos naturais, tais como as fibras vegetais. O componente principal das paredes celulares das fibras é a celulose, biopolímero de interesse para esta prática, pois apresenta boa resistência mecânica, rigidez e elevado grau de cristalinidade, além de ser proveniente de fontes renováveis, biodegradável, abundante na natureza e de baixo custo (BHATTACHARYA et al., 2008). A eficiência do agente de reforço está relacionada com a natureza do biopolímero (celulose) e da sua cristalinidade (JOHN e THOMAS, 2008). As fibras de celulose são consideradas um material promissor na substituição de fibras de reforço convencionais (fibra de vidro) (KAUSHIK e SINGH, 2011).

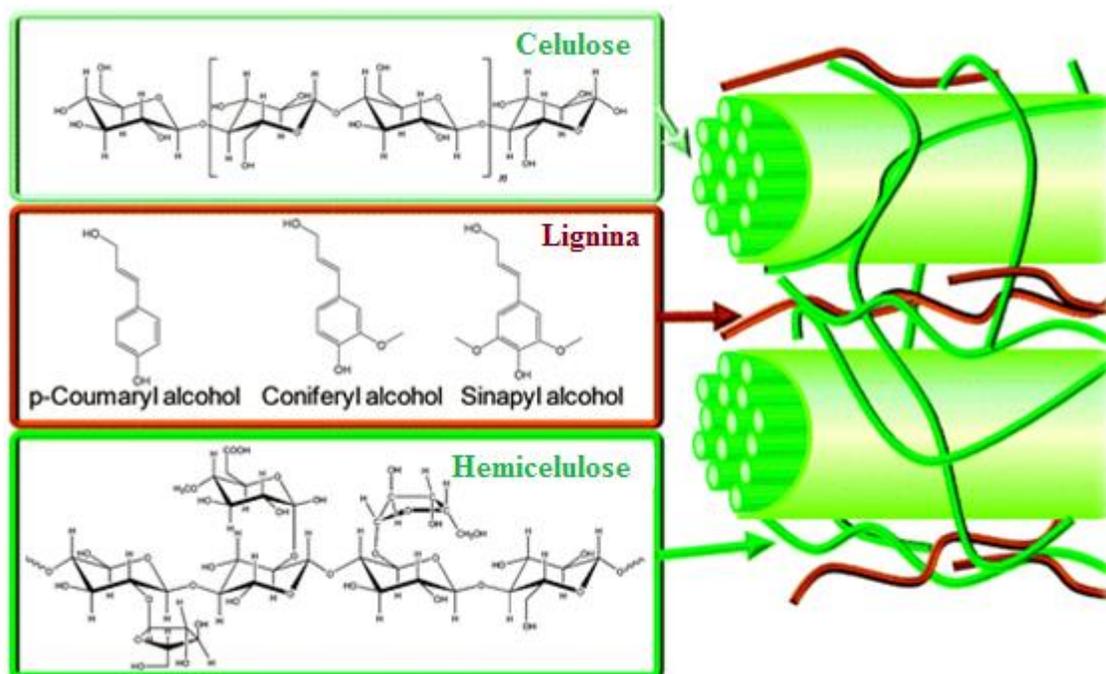
As primeiras patentes da utilização de fibras vegetais em compósitos datam da década de 60, porém o assunto começou a ganhar mais importância a partir da década de 90, quando uma visão mais realista e ambientalmente correta para processos industriais,

motivou o interesse em fontes renováveis, tais como: fibras e óleos vegetais. Combinados aos aspectos ecológicos, existem também os tecnológicos e as vantagens econômicas ao uso destes materiais (ESMERALDO, 2006).

1. 2. 1 Fibras vegetais lignocelulósicas

As fibras vegetais são amplamente distribuídas na natureza e podem ser classificadas em quatro classes, de acordo com sua origem anatômica: fibras originárias das folhas (sisal, palma, banana e palmeira), do talo ou tronco (juta, rami, linho e algodão), do lenho (bambu, bagaço de cana) e de superfície (coco e açai), que formam a camada protetora de caules, folhas, frutos e sementes (FAGURY, 2005).

As fibras vegetais são definidas pelo conjunto de células individuais (macrofibra) compostas por fibrilas alongadas de seção transversal arredondada, as quais são formadas por moléculas de celulose que se encontram alinhadas ao longo da fibra, o que torna máxima a tração e força de flexão, além de proporcionar rigidez (JOHN e THOMAS, 2008). As fibrilas de celulose estão ligadas pelos componentes amorfos lignina e hemicelulose, e este conjunto é o principal componente estrutural das paredes celulares das plantas, responsável pela sua alta resistência (LODISH et al., 2000). A Figura 1.1 apresenta a estrutura dos componentes principais das fibras vegetais.



Fonte: Alonso et al. (2012)

Figura 1.1 - Estrutura dos principais componentes de uma fibra vegetal

A Tabela 1.1 apresenta os componentes principais das fibras vegetais e seus respectivos estados poliméricos e funções.

Tabela 1.1 - Estado polimérico e função dos componentes principais das fibras vegetais

Componente	Estado polimérico	Função
Celulose	Cristalino	Fibra
Hemicelulose	Amorfo	Matriz
Lignina	Amorfo	Matriz

Fonte: Silva (2002)

Além desses componentes, podem ser encontrados nas fibras, em menores quantidades, compostos inorgânicos, pectinas, carboidratos simples, alcalóides, saponinas, terpenos, polifenóis, gomas, resinas, gorduras e ceras, entre outros (SONESSO, 2011).

A Tabela 1.2 apresenta o percentual da composição típica da biomassa lignocelulósica de diferentes fibras. A Tabela 1.3 apresenta a avaliação da composição química dos resíduos da bananeira

Tabela 1.2 - Composição típica da biomassa de diferentes fibras

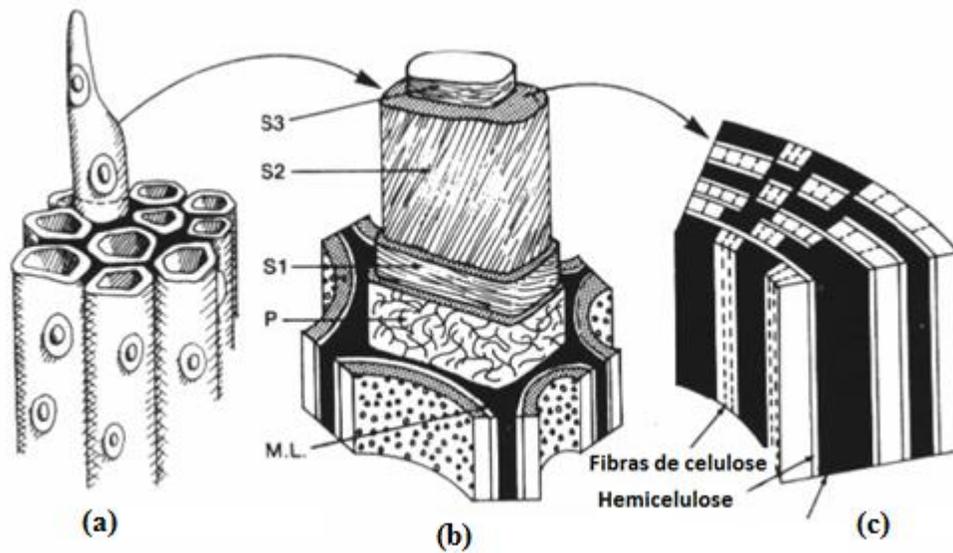
Fibras	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Fonte
Fibra da banana	63-64	19	5	Deepa et al. (2011)
Sisal	67-78	10-14,2	8-11	Esmeraldo (2006)
Palha de trigo	33-38	26-32	17-19	Silva (2009)
Bagaço de cana-de-açúcar	43,6	33,5	18,1	Sun (2004a)
Palha de cevada	37,6	34,9	18,8	Sun et al. (2005)

Tabela 1.3 - Composição percentual em massa seca dos resíduos da bananeira

Resíduo da bananeira	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Fonte
Nervura das folhas	39,5	23,2	18	Oliveira et al. (2007)
Casca	7,6-9,6	6,4-9,4	6-12	Mohapatra et al (2010)
Engaço	28,4	9,5	10,5	Oliveira et al. (2007)
Pseudocaule	37,1	12,6	13,3	Oliveira et al. (2007)

Cada fibra lignocelulósica tem uma estrutura de camadas complexas. A Figura 1.2 mostra a organização estrutural de uma fibra vegetal, onde: (a) células adjacentes, (b) parede de camadas de células. A camada P (primária) consiste de um arranjo desorganizado de fibrilas de celulose. A lamela média (ML) encontra-se no exterior da célula e é composta predominantemente de pectina, que atua de modo a consolidar as fibras em um feixe. As camadas S1, S2 e S3 são as secundárias, sendo S2 a camada dominante envolvida em uma

matriz de hemicelulose e lignina. O item (c) mostra a distribuição de celulose, hemicelulose e lignina na parede secundária (IOELOVICH, 2008).



Fonte: Pérez et al. (2002)

Figura 1.2 - Organização estrutural de uma fibra vegetal (fibra de madeira).

1. 2. 1. 1 Celulose

A celulose é um homopolissacarídeo linear não ramificado, formado por unidades de β -D-glicopiranoose, as quais são unidas por ligações do tipo β -1-4. Os monômeros de glicose se dispõem paralelamente, de modo a formar pontes de hidrogênio entre si. A unidade básica repetitiva da celulose é composta pela união de moléculas de glicose, sendo esta conhecida como celobiose, de estrutura linear ou fibrosa (LEHNINGER et al., 2002).

Cada monômero de glicose é composto por três grupos hidroxila livres e as cadeias de celulose tendem a formar ligações de hidrogênio intra e intermoleculares. As ligações intramoleculares ocorrem entre grupos hidroxila da mesma molécula, sendo responsável pela rigidez da cadeia de celulose, enquanto que as ligações intermoleculares ocorrem entre grupos hidroxila adjacentes (VOET et al., 2000). A partir da agregação das cadeias de celulose, sucessivas estruturas são formadas dando origem à parede celular da fibra vegetal. Devido a essas ligações de hidrogênio, as cadeias de celulose formam cristais que as tornam insolúvel em água (VOET et al., 2002).

As camadas de macrofibra, que compõe as fibras vegetais, são constituídas de regiões cristalinas ordenadas tridimensionalmente, que são resultantes da ação combinadas da biopolimerização e cristalização da celulose, sendo que estas se alternam com regiões amorfas desordenadas (SEDAN et al., 2007). A proporção entre essas regiões é o que determina o grau de cristalinidade e as dimensões típicas dos cristalinos, podendo essa, ser variável de acordo com a origem e processamento da celulose. A estrutura química da celulose, bem como o grau de polimerização, a orientação molecular e a cristalinidade influenciam nas propriedades físicas das fibras vegetais (GEORGE et al., 2001; FAGURY, 2005).

1. 2. 1. 2 Hemicelulose

A hemicelulose compreende um grupo de polissacarídeos normalmente associados à celulose, em paredes celulares vegetais. É constituída por vários monossacarídeos polimerizados, incluindo carboidratos de cinco carbonos (xilose e arabinose), carboidratos de seis carbonos (galactose, glicose e manose), ácido 4-O-metil glucurônico e resíduos de ácido galacturônico. O polissacarídeo mais encontrado na hemicelulose é a xilose (FENGEL e WEGENER, 1989).

A composição química e as características estruturais das hemiceluloses variam de acordo com a espécie da planta, estágio de desenvolvimento, localizações subcelulares e tipo de tecido. Deste modo, várias subclasses de hemiceluloses podem ser encontradas, como as xiloglicanas e β -glicanas, que possuem um importante papel na estrutura e função da parede celular, pois estão envolvidas no suporte e reticulação da matriz celulósica através de ligações de hidrogênio com a celulose e outras hemiceluloses (WHITNEY et al., 1999).

As hemiceluloses apresentam uma estrutura de natureza amorfa, contém considerável grau de ramificação entre suas cadeias, possuem baixo peso molecular e são bastante hidrofílicas, o que facilita a absorção de água e contribui para o intumescimento e flexibilidade das fibras. Estas se encontram intercaladas às microfibras de celulose e atuam como um elemento de ligação entre a celulose e a lignina, tornando-se um componente estrutural da parede celular de plantas (FENGEL e WEGENER, 1989).

1. 2. 1. 3 Lignina

A lignina é a segunda macromolécula orgânica mais abundante dentre os materiais lignocelulósicos, estando associada com a celulose e hemicelulose. Este polímero está presente na parede celular das plantas, conferindo-lhe suporte estrutural, impermeabilidade, resistência contra ataques microbianos e estresse oxidativo, além de também aumentar a resistência mecânica das plantas. Durante o desenvolvimento das células é incorporada como último componente na parede, interpenetrando as fibrilas e deste modo, fortalecendo e enrijecendo as paredes celulares e protege os carboidratos (açúcar) contra danos físicos, químicos e biológicos (LEHNINGER et al., 2002).

A lignina, estruturalmente, consiste em um heteropolímero amorfo, altamente complexo e ramificado tridimensionalmente, com constituintes aromáticos e alifáticos. É sintetizada através da geração de radicais livres que são liberados a partir da polimerização desidrogenativa dos alcoóis hidroxicinâmicos (VOET et al., 2000). A lignina é um material hidrofóbico e pode ser classificada como um polifenol, o qual é constituído de várias unidades de fenilpropano, unidas por diferentes tipos de ligações. As ligações éteres predominam na união entre as unidades da lignina, que apresenta um grande número de interligações (REGULY, 1996).

1. 2. 2 Nano e microfibras de celulose

Os diferentes métodos existentes para o isolamento das cadeias de celulose possibilitam a produção de partículas de diferentes formas e tamanhos. Na literatura encontram-se diferentes nomenclaturas aplicadas aos componentes da celulose. O termo “microfibrilas” é geralmente usado para descrever a celulose fibrosa de estrutura com diâmetro de 2-10 nm e o comprimento de várias dezenas de micrômetros, formados durante a síntese de celulose em plantas superiores (CLOWES e JUNIPER, 1968). Dependendo da sua origem, o diâmetro das microfibrilas pode variar. Como sinônimo de “microfibrilas” também são usados “nanofibrilas” e “nanofibras”. Este termo não pode ser confundido com celulose “microfibrilada”, pois esta é extraída de plantas por tratamento mecânico e/ou homogeneização a alta pressão e, consiste em agregados de “microfibrilas” de celulose

(SIRO e PLACKETT, 2010). Os “*whiskers*” são as nanopartículas obtidas a partir do tratamento químico, biológico e/ou físico das “microfibrilas de celulose” e apresentam dimensões nanométricas, iguais ou menores que 100 nm, e área superficial ao redor de 150 m²/g. A celulose “microcristalina” consiste em partículas cilíndricas e rígidas formadas pelos “*whiskers*” ainda não isolados (SILVA et al., 2009; ANDRADE-MAHECHA, 2012). As NFCs, também são conhecidas como “nanocristais de celulose”, “*whiskers*” ou “*nanorods*”, sendo estes os domínios cristalinos de alta pureza das fontes celulósicas (SILVA e D'ALMEIDA, 2009).

A Tabela 1.4 apresenta os parâmetros dimensionais para as várias formas de celulose citadas acima.

Tabela 1.4 - Dimensões de diferentes formas de nano e microfibras de celulose

Tipo de estrutura	Diâmetro (nm)	Comprimento (nm)	Relação de aspecto (L/d)
Microfibrilas	2 - 10	> 10.000	> 1.000
Celulose microfibrilada	10 - 40	> 1.000	100 - 150
“ <i>whiskers</i> ” de celulose	2 - 20	100 - 600	10 - 100
Celulose microcristalina	> 1.000	> 1.000	~1

Fonte: Siro & Plackett (2010)

As nanofibras de celulose (NFCs) tem atraído um interesse significativo nas últimas décadas devido sua sustentabilidade, disponibilidade abundante e às características únicas que dotam (KAUSHIK e SINGH, 2011). As suas potenciais propriedades são a elevada área de superfície em relação ao volume, alta relação de aspecto (razão entre comprimento e largura) e as boas propriedades mecânicas, dinâmicas, térmicas e elétricas, tais como: elevado módulo de Young, resistência à tração, rigidez, flexibilidade, coeficiente muito baixo de expansão térmica e formação da malha altamente porosa em comparação com outras fibras comerciais (CHERIAN et al., 2008b; DEEPA et al., 2011). Ainda, segundo Tholstrup Sejersen et al. (2007), uma característica importante para as NFCs é o potencial

zeta, este valor deve ser alto e negativo para obter uma suspensão estável, impedindo que esta flocule quando adicionadas em compósitos e forme agregados de nanofibras.

A obtenção de NFCs ainda é limitada devido à dificuldade de separação das fibras vegetais em componentes nanoestruturados (SIRO e PLACKETT, 2010). Nesse processo de separação, as microfibrilas de celulose podem ser clivadas transversalmente ao longo das regiões amorfas, resultando em um material similar a um bastonete (“*whiskers*” de celulose) (GARDNER et al., 2008).

1. 2. 3 Isolamento de nanofibras de celulose

O isolamento das nanofibras de celulose, a partir de matrizes lignocelulósicas, envolve uma série de processos. Diferentes métodos têm sido desenvolvidos desde a década de 80, os quais buscam por um processo adequado para obter partículas de celulose em nanoescala (BONDESON et al., 2006). Esses métodos têm sido relatados e agrupados em: tratamentos químicos, mecânicos e dissolução, podendo ser utilizados separadamente, em sequência ou combinação (HUBBE et al., 2008).

Apesar da diversidade de fontes para obter nanopartículas de celulose, os procedimentos para o seu isolamento, geralmente segue um esquema de três etapas: (1) pré-tratamento da matéria-prima, (2) hidrólise parcial (ácida ou enzimática) e (3) desintegração mecânica. Estas três etapas estão orientadas em produzir uma suspensão coloidal de nanofibras em água.(SUN, 2004b).

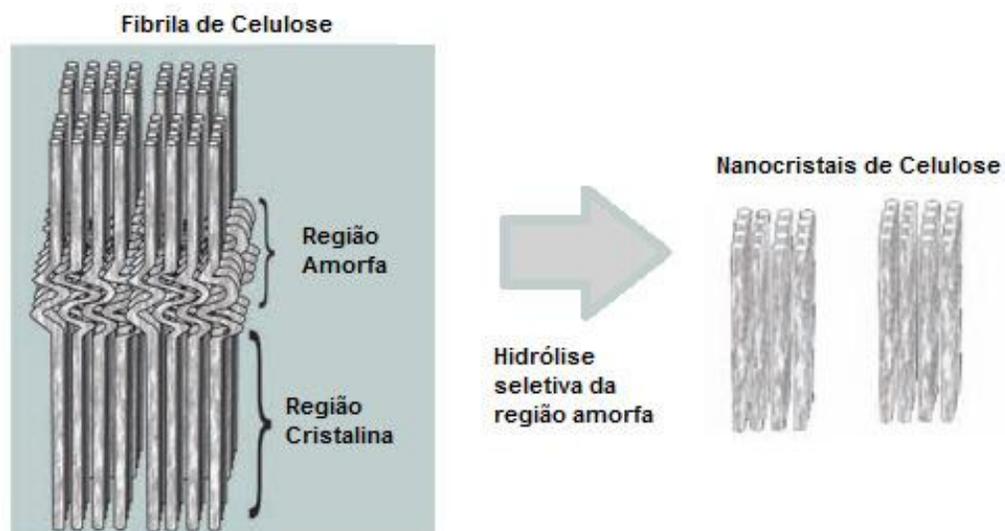
1. 2. 3. 1 Pré-tratamento

No processo de obtenção de nanofibras de celulose, a dificuldade na separação das fibrilas está atribuída às características químicas e morfológicas dos substratos lignocelulósicos. Estes materiais são constituídos de cadeias de celulose envolvidas em uma matriz amorfa de hemicelulose e lignina, a qual torna esses materiais estruturalmente resistentes à hidrólise e pouco reativos, pois age como uma barreira natural dificultando a acessibilidade dos agentes hidrolíticos à celulose nativa (LEHNINGER et al., 2002). Diante disto, é necessário um processamento prévio e adequado desses materiais para romper as

associações macromoleculares, a fim de aumentar a eficiência da próxima etapa (hidrólise) e o rendimento do produto desejado (OGEDA e PETRI, 2010).

A seleção de um pré-tratamento adequado das fibras vegetais é uma das etapas mais importantes de todo o processo de obtenção de NFCs, visto que a eficiência do ataque do agente hidrolítico às regiões amorfas depende de quão isolada a nanofibra de celulose está, pois uma quebra incompleta gera uma rede tridimensional, conhecida por hidrogel, sendo que a finalidade do processo é obter uma dispersão coloidal de NFCs (SANNINO et al., 2009). Os processos de separação dos componentes amorfos podem ser classificados em mecânicos, físicos e químicos ou uma combinação desses, dependendo do grau de separação requerido e do fim proposto (OGEDA e PETRI, 2010). Segundo Reguly (1996), qualquer que seja o processo, uma separação perfeita não pode ocorrer, pois os agentes atuam tanto sobre a celulose como sobre o sistema polimérico lignina-celulose.

A Figura 1.3 apresenta a hidrólise seletiva da região amorfa, atacada pelo agente hidrolítico, para posterior isolamento dos nanocristais de celulose.



Fonte: Silva & D'Almeida (2009)

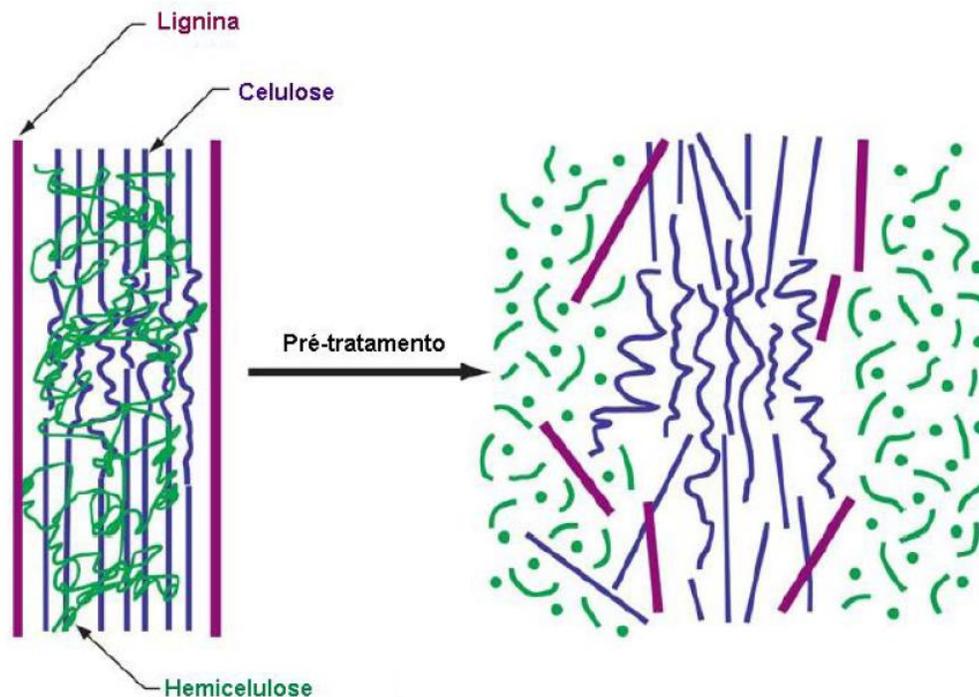
Figura 1.3 - Hidrólise seletiva das regiões amorfas das fibrilas de celulose

Atualmente, há um grande número de métodos de pré-tratamento disponíveis, o Quadro 1.1 apresenta os principais processos que estão sendo desenvolvidos, bem como suas características.

Quadro 1.1 - Técnicas de pré-tratamentos para a separação dos componentes amorfos dos materiais lignocelulósicos

Processo	Químico		Físico	Mecânico
Tipo	a) Ácido (ácido sulfúrico, clorídrico, fosfórico, nítrico e hidrolórico)	b) Alcalino (NaOH e Ca(OH) ₂)	Explosão a vapor	Moagem
Descrição	Utiliza condições de processo mais elevadas (temperatura e pressão)	Utiliza condições moderadas de operação (temperatura e pressão) Concentração de álcali até 4 % (material que sofreu algum tratamento) Concentração de álcali > 10 % (material (in natura))	Vapor a alta pressão e temperatura, com ou sem catalisador químico (aquecimento e rápida descompressão do material)	Utiliza apenas energia mecânica, não envolvendo emprego de reagentes químicos
Efeito	Remoção seletiva da hemicelulose Produz soluções sacarídicas com elevado teor de pentoses e reduzido teor de lignina	Maior fragmentação da lignina Capaz de remover frações de hemicelulose Promovendo maior reatividade da fibra e deixa a área cristalina mais exposta	Diminui o teor dos componentes amorfos (lignina e hemicelulose) Aumento da área superficial e da acessibilidade às fibras de celulose	Conversão da biomassa em pó fino Aumenta a superfície específica, facilitando a hidrólise
Observações	Efetivo Desvantagem: Formação de resíduos poluidores	Efetivo Desvantagem: Formação de resíduos poluidores	Efetivo	Elevado custo energético (Ineficaz)
Fonte	Silva (2009)	Fassanella (2008)	Ramos et al. (1993)	(FASSANELLA, 2008)

Na deslignificação, se procura preservar ao máximo a integridade da fibra celulósica, assim, a remoção da lignina pode ser realizada mediante o emprego de reagentes seletivos e sob condições brandas de processo, a fim de evitar a solubilização e degradação da celulose (ANDRADE-MAHECHA, 2012). A Figura 1.4 apresenta o efeito da deslignificação na estrutura de materiais lignocelulósicos.



Fonte: Silva (2009)

Figura 1.4 - Efeito do pré-tratamento na estrutura de materiais lignocelulósicos

As polpas de celulose, em geral, apresentam coloração castanho-escuro. Neste sentido, a deslignificação também é conhecida como uma técnica de branqueamento e, utilizada para atingir maiores níveis de alvura, sem que haja modificações das propriedades físico-mecânicas da polpa (VÁRNAI et al., 2010). O objetivo geral do processo de deslignificação é a remoção das frações de hemicelulose e lignina. A eliminação dos componentes amorfos confere a cor clara à fibra, a qual tem maior valor agregado (CHERIAN et al., 2008b).

As principais tecnologias, que estão ganhando destaque nessa área de estudo, estão associadas aos métodos químicos (ácidos ou alcalinos) (MUSSATTO et al., 2008). O

tratamento alcalino é o método químico mais utilizado na deslignificação de fibras naturais. (FARUK et al., 2012). O tratamento mais recorrente é a imersão do substrato em meio alcalino diluído, muitas vezes, submetido à alta pressão e temperatura (CHERIAN et al., 2008b). Fatores como concentração da solução, proporção fibra/solução, tempo de exposição, temperatura e pressão, influenciam na eficiência do processo (SILVA, 2009). Esses fatores podem ser exemplificados pelo processo realizado por Bhattacharya et al (2008), que procederam a deslignificação de bagaço seco imerso em solução de hidróxido de sódio (4%), por 4 h na temperatura de 80 °C. Segundo esses autores o método utilizado removeu a maior parte da lignina. O pré-tratamento realizado por Hubbe et al (2008), consistiu na imersão de aparas de madeira em solução de NaOH, sob alta pressão e temperatura, sendo que a estrutura da lignina foi progressivamente solubilizada. Vale ressaltar, que em ambos os processos a maior parte da celulose foi preservada.

O pré-tratamento é uma das etapas mais caras do processo como um todo, no entanto, esta etapa é essencial para preparar eficazmente NFCs. Embora muitos métodos tenham sido pesquisados, constata-se a necessidade em desenvolver alternativas ecologicamente corretas e com tecnologias eficientes em termos de custo global e competitividade econômica (FASSANELLA, 2008). Diante disto, para minimizar os custos do processamento, deve ser evitado o elevado consumo de reagentes químicos, a alta demanda energética e a intensa degradação dos materiais lignocelulósicos (WYMAN et al., 2005).

1. 2. 3. 2 Hidrólise enzimática

No processo de obtenção de nanopartículas de celulose, as fibras vegetais, após passarem pela etapa de pré-tratamento, são submetidas a um processo para individualizar as fibrilas de celulose da parede celular (TONOLI et al., 2012). Os métodos mais comumente utilizados para a preparação das nanofibras de celulose são a hidrólise ácida ou a hidrólise enzimática (SUKUMARAN et al., 2009).

O tratamento enzimático está ganhando destaque nas pesquisas atuais, pois é um processo que oferece condições de hidrólise mais suaves comparado com o tratamento mais agressivo da hidrólise ácida. Pode ser considerado um processo ambientalmente correto,

visto que não envolve solventes ou reagentes químicos (SIQUEIRA et al., 2010a). A hidrólise enzimática é um método que está em rápido desenvolvimento e apresenta imenso potencial de melhoria em termos de custo e eficiência (SUKUMARAN et al., 2009).

No processo de hidrólise as enzimas atacam as regiões amorfas das fibras lignocelulósicas, que apresentam menor densidade e maior área de contato, causando uma clivagem hidrolítica das ligações glicosídicas β -1,4 localizadas entre as unidades de glicose que formam a celulose (HUBBE et al., 2008). O processo da hidrólise deve ser realizado sob condições controladas para assegurar que apenas as regiões amorfas estejam acessíveis ao ataque enzimático, enquanto que as regiões cristalinas devem permanecer intactas, evitando a degradação completa da celulose (ZHU et al., 2011). A eficiência da hidrólise enzimática depende de vários fatores, tais como o tempo de hidrólise (h), a concentração de substrato (%), a concentração de enzima (U/g). O controle desses fatores pode gerar um efeito significativo na melhoria da produtividade do processo (MEYABADI e DADASHIAN, 2012).

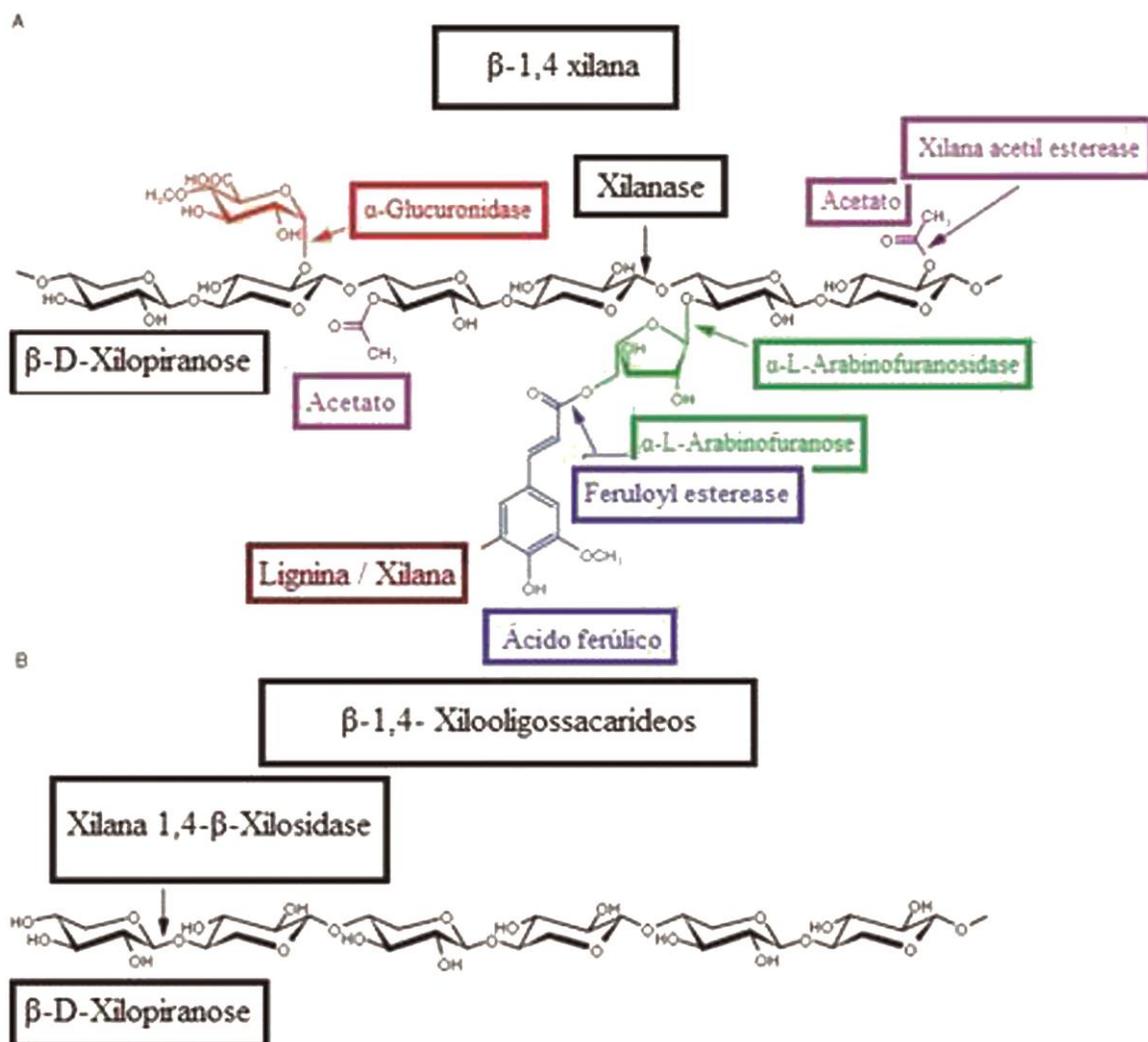
Segundo Satyamurthy et al (2011), a obtenção das NFCs sem degradação grave e com custos razoáveis ainda é difícil. Diante disso, ressalta-se a importância da hidrólise enzimática que é um processo altamente específico, o qual proporciona muitas vantagens em relação à hidrólise ácida ou alcalina, como o baixo consumo de energia e menor perda de material (PIRANI e HASHAIKEH, 2013). No entanto, um dos fatores limitantes deste tipo de tratamento é o alto custo da produção de enzimas e para minimizá-lo, sugere-se a produção a partir da fermentação de substrato por fungos filamentosos (GIORDANO et al., 2011; SONESSO, 2011). A hidrólise enzimática ainda não é comercializada, mas é reconhecida como uma tecnologia mais promissora da atualidade (YU et al., 2008; MEYABADI e DADASHIAN, 2012).

As enzimas são bastante específicas quanto à sua função e, podem ser encontrados diversos tipos de enzimas para catalisar diferentes tipos de reações bioquímicas (LEHNINGER *et al.*, 2002)

A xilanase (1,4-BD-xilano xilanohidrolase EC 3.2.1.8) é o principal componente de um grupo de enzimas que atua na despolimerização de moléculas de xilana em monômeros de açúcar (xilose, xilobiose, xilotriose e xilo-oligossacarídeos). O sistema xilanolítico é compreendido por endoxilanases (1,4-b-Dxilan xilanohidrolase, EC 3.2.1.8), β -xilosidases

(β -D-xiloside xilohidrolase, EC 3.2.1.37) e várias outras enzimas adicionais, tais como arabinofuranosidase e acetilxilan esterase (MOHANA et al., 2008). Na maioria dos processos a xilana é, primeiramente, convertida em xilose ou xilo-oligossacarídeos.

Em geral, estas enzimas hidrolíticas catalisam aleatoriamente os compostos de hemicelulose presentes na fibra vegetal. A Figura 1.5 apresenta o mecanismo de ação das enzimas xilanolíticas sobre a cadeia de xilana, principal componente da hemicelulose.



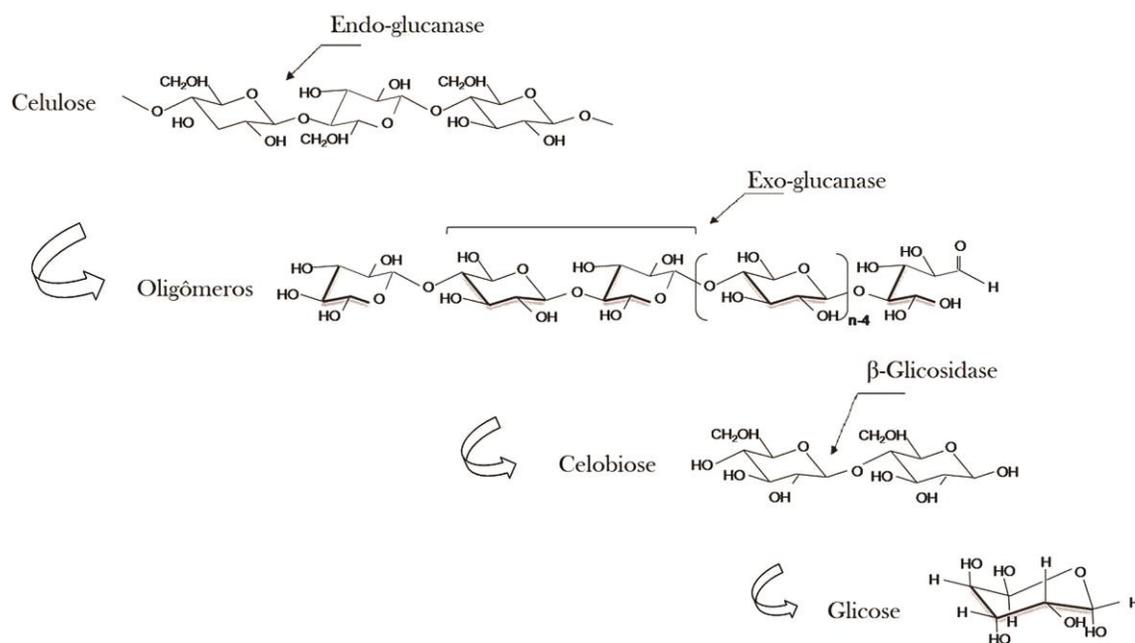
Fonte: Yeoman et al. (2010)

Figura 1.5 - Mecanismo de ação da xilanase sobre a cadeia de xilana

Estas enzimas são usadas comercialmente no processo industrial de papel e celulose, na indústria têxtil e, além disso, os produtos da hidrólise da xilana têm possíveis aplicações

em indústrias químicas, de alimentos e de bebidas. A enzima xilanase possui potencial aplicação na etapa de branqueamento de polpas lignocelulósicas, seja na produção de papel ou em outros processos que necessitem desta etapa. Tal aplicação resulta em maior brilho no produto final, além de ser um processo sustentável, pois reduz o uso de produtos químicos (GOULART et al., 2005; ISIL e NILUFER, 2005).

A celulase é uma enzima formada por um complexo celulolítico compreendido por endo-glucanases, exoglucanases e β -glicosidases (ZHANG et al., 2006). Os três tipos atuam em sinergismo, em uma associação cooperativa, produzindo substratos uma para a outra. O mecanismo de ação do complexo celulolítico sobre a celulose é ilustrado na Figura 1.6 (YEOMAN et al., 2010).



Fonte: Yeoman et al. (2010)

Figura 1.6 - Mecanismo de ação das celulases sobre a cadeia de celulose

As celulases são enzimas de grande interesse industrial, como, por exemplo, no processamento de papel e celulose, na indústria de alimentos, bem como na agricultura (TOLAN e FOODY, 1999; BHAT, 2000). O objetivo, no processo de obtenção de nanofibras de celulose, é atingir um rendimento elevado de sólidos celulósicos. Diante

disto, estudos mostram que para tal, a hidrólise enzimática pode ser realizada utilizando apenas a enzima endo-glucanase, por um período de tempo muito curto a fim de evitar a sacarificação da celulose (ZHU et al., 2011).

As endo-glucanases (EC 3.2.1.4) são também chamadas, na literatura, de endo-1,4- β -D-glicana, glicanahidrolases, endo- β -1,4-glucanases ou carboximetilcelulases. Estas consistem de um grande núcleo proteico e um pequeno domínio ligante de celulose unido por sequências longas de aminoácidos, sendo que este domínio tem a função de aproximar o núcleo catalítico da superfície da celulose. O sítio ativo da endo-glucanase se encontra no exterior e possui forma de chave, o que possibilita a ação da mesma ao longo da cadeia de celulose, reduzindo, de maneira considerável, o grau de polimerização (LEHNINGER et al., 2002).

As enzimas endo-glucanases são conhecidas por hidrolisar as regiões amorfas de longas cadeias de celulose, sendo estas responsáveis por iniciar a hidrólise das regiões terminais não redutoras, das ligações β -1,4-D-glicosídicas, aleatoriamente. Devido a fragmentação da celulose em moléculas menores, ocorre rápida solubilização do polímero celulósico, pela redução do grau de polimerização (WYMAN et al., 2005; GEORGE et al., 2011). As regiões amorfas são mais facilmente atacadas por apresentar menor grau de organização e por possuir cadeias que não estão envolvidas em interações intermoleculares tão fortes quanto as que ocorrem na celulose cristalina (SANTOS, 2008).

Pääkko et al (2007), demonstraram que o uso da endo-glucanase proporcionou uma hidrólise seletiva da celulose. Este processo facilitou a desfibrilação da parede celular, e permitiu a obtenção de nanofibras de celulose com alta relação de aspecto. O tratamento enzimático com endo-glucanase proposto por Henriksson et al (2007), apresentou um aumento significativo na reatividade das fibras de celulose e no intumescimento das mesmas em suspensão aquosa.

Um novo conceito para preparar as nanofibras de celulose está sendo pesquisado, em que a hidrólise enzimática é usada em combinação com a agitação mecânica ou homogeneização a alta pressão, para que ocorra a desfibrilação da parede celular vegetal, facilitando o isolamento das NFCs (DURÁN et al., 2011).

O Quadro 1.2 apresenta diferentes métodos de hidrólise enzimática para obtenção de nanofibras de celulose. A celulose bacteriana apresenta uma estrutura diferente da estrutura

da celulose originária de plantas. A celulose produzida por bactérias pode ser facilmente transformada em celulose pura em comparação com o tratamento mais agressivo e complicado usado para purificar a celulose a partir da biomassa da planta, uma vez que esta contém outros polímeros tais como a lignina, hemicelulose e pectina (GEORGE et al., 2011). Conforme os resultados de Hassan et al. (2010), as nanofibras de celulose produzidas pelas diferentes enzimas, xilanases e celulases, apresentaram características semelhantes, a principal diferença é na atuação destas sobre a fibra vegetal. O tratamento com enzimas xilanases ocasiona a remoção parcial das hemiceluloses, enquanto que no tratamento com complexo celulolítico, o ideal seria a utilização da enzima pura, endoglucanase, penetra a fibra vegetal clivando as cadeias de celulose em nanopartículas.

Quadro 1.2 - Estudos sobre obtenção de nanopartículas de celulose por hidrólise enzimática

Autor	Woehl et al. (2010)	Satyamurthy et al. (2011)
Concentração enzima/ substrato	<ul style="list-style-type: none"> - Celulose bacteriana - Enzima comercial: Endoglucanase - Atividade enzimática: 23,73 U/mg 	<ul style="list-style-type: none"> - Celulose: Fibra de algodão - Enzima: complexo celulase produzido a partir do fungo: <i>T. reesei</i> (ATCC 13.631) OBS: Fungo utilizado produz baixo nível de enzima, visto que o objetivo é evitar a hidrólise completa da celulose - Atividade enzimática (U*/ml) - Endoglucanase: 0,07 U/ml - Celulases totais (endo e exoglucanase): 0,7 U/ml - β-glicosidase: 69,89 U/ml
Condições de hidrólise	<p><u>Pré-tratamento</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Homogeneização - Refrigeração com 0,1 mg/mL de ázida sódica <p><u>Hidrólise</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Enzima: 10 mg/g_{substrato} - 0,5 % em peso de substrato - 10 % (v/v) tampão citrato (pH 4,8) - Temperatura: 45 °C - Agitação: 150 rpm - Tempo: 20 min a 240 min - Inativação da enzima 	<p><u>Pré-tratamento</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Imersão em ácido clorídrico (4 N) - Peneiramento <p><u>Hidrólise</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Caldo contendo o inóculo fermentado submetido à diferentes forças de centrifugação - Ultrafiltração do sobrenadante à 100 kDa - Nanowhiskers de celulose presos na superfície da membrana foram removidos com jato de água destilada - Liofilização
Resultado	<ul style="list-style-type: none"> - Nanocristais <ul style="list-style-type: none"> Largura média: 100- 300 nm - Vantagens em comparação com hidrólise ácida: <ul style="list-style-type: none"> Menos perda de material Melhores propriedades de reforço - Potencial aplicação em filmes biodegradáveis: <ul style="list-style-type: none"> - Facilidade de homogeneização (fibras dispersas no filme) - Melhorou as propriedades térmicas e mecânicas 	<ul style="list-style-type: none"> - Nanofibras <ul style="list-style-type: none"> - Comprimento: 120,27 nm - Espessura: 40,74 nm - Grau de polimerização: 293 (DP) - Potencial zeta: 15,57 mV - Índice de cristalinidade: 78,3 % - Redução de 10 % na cristalinidade - Vantagens em comparação com hidrólise ácida: <ul style="list-style-type: none"> - Cristalinidade dos nanowhiskers reduzida - Superfície nos nanowhiskers: <ul style="list-style-type: none"> - Enzimática: Inalterada (melhora o desempenho de agente de reforço em compósitos) - Ácida: Sulfatação da superfície

Continua

* U = 1 μ mol de glicose liberada por minuto

Autor	Paakko et al. (2007)	George et al. (2011)
Concentração enzima/ substrato	<ul style="list-style-type: none"> - Celulose de madeira macia - Enzima comercial: Endoglucanase - Atividade enzimática: 17,6 U/ mL 	<ul style="list-style-type: none"> - Celulose bacteriana - Enzima celulase comercial: ATCC26921 - Atividade enzimática: 0,7 U/mg
Condições de hidrólise	<p><u>Pré-tratamento da polpa</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Branqueamento - Moagem <p><u>Hidrólise</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Enzima: 0,17 μL celulase por grama de fibra - 100 g polpa refinada (peso seco) - 250 ml tampão fosfato (0,1 M, pH 7,0) - Manutenção da suspensão (T = 50 °C por 2 h) - Agitação suave (manual) a cada 30 min - Lavagem com água deionizada - Desnaturação da enzima <p><u>Refino mecânico (moagem)</u></p> <p><u>Homogeneização à alta pressão (105- 170 MPa)</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Diluição e Filtração - Misturador intensivo (4.000 rpm por 15 s) - Inativação da enzima 	<p><u>Pré-tratamento</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Imersão em solução de NaOH 2 M por 30 min - Lavagens sucessivas com água destilada(pH neutro) - Agitação (5.000 rpm por 30 min) - Filtração <p><u>Hidrólise</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Enzima: 1 ml celulase - 25 g pasta úmida (substrato) - 250 ml tampão acetato (0,1 M, pH 5,0) - Agitação suave - Manutenção da suspensão: <ul style="list-style-type: none"> Temperatura: 50 °C Tempo: 24 h - Inativação da enzima
Resultado	<ul style="list-style-type: none"> - Nanocristais <ul style="list-style-type: none"> - Diâmetro médio: 5- 6 nm - Agregados de fibrilas: 10- 20 nm - Vantagens em comparação com hidrólise ácida: <ul style="list-style-type: none"> - Melhores propriedades mecânicas e térmicas - Reduz o consumo de energia - Apresentaram potencial aplicação em filmes biodegradáveis: 	<ul style="list-style-type: none"> - Nanocristais <ul style="list-style-type: none"> Comprimento: 100- 300 nm Diâmetro médio: 10- 15 nm - Vantagens em comparação com hidrólise ácida: <ul style="list-style-type: none"> - Melhores propriedades mecânicas e térmicas - Degradação dos nanocristais: <ul style="list-style-type: none"> - Enzimática: 379 °C - Ácida: 184 °C - Potencial aplicação em filmes biodegradáveis: <ul style="list-style-type: none"> Mesmo com baixas concentrações melhorou as propriedades térmicas e mecânicas

Continuação do Quadro 1.2

Autor	Hassan et al. (2010)	Hassan et al. (2010)
Concentração enzima/ substrato	<ul style="list-style-type: none"> - Celulose: Bagaço de cana branqueado - Enzima: Celulase de <i>T. reesei</i> - Atividade enzimática: 	<ul style="list-style-type: none"> - Celulose: Bagaço de cana branqueado - Enzima: Xilanase de <i>T. reesei</i> - Atividade enzimática:
Condições de hidrólise	<p><u>Hidrólise</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - 20 g de bagaço branqueado (frasco de 500 mL) - 10 % do volume de tampão citrato pH 5,3 - Concentração de enzima: 2,5 - 10,5 UX**/g - Rotação: 200 rpm - T: 50 °C - 4 h - Lavagens sucessivas com água destilada - Moagem - Homogeneização a alta pressão 	<p><u>Hidrólise</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - 20 g de bagaço branqueado (frasco de 500 mL) - 10 % do volume de tampão citrato pH 5,3 - Concentração de enzima: 15 - 60 UX**/g - Rotação: 200 rpm - T: 50 °C - 4 h - Lavagens sucessivas com água destilada - Moagem - Homogeneização a alta pressão
Resultado	<ul style="list-style-type: none"> - Nanofibras <ul style="list-style-type: none"> - Diâmetro: 9-39 - Agregados de fibrilas: > 92 nm - Índice de cristalinidade: 76,4 % - Vantagens em comparação com hidrólise química: <ul style="list-style-type: none"> - Menor consumo de energia - Ambientalmente correta - Apresentaram potencial aplicação em filmes biodegradáveis: 	<ul style="list-style-type: none"> - Nanofibras <ul style="list-style-type: none"> - Diâmetro médio: 9-25 nm - Agregados de fibrilas: > 90 nm - Índice de cristalinidade: 73,9 % - Vantagens em comparação com hidrólise ácida: <ul style="list-style-type: none"> - Menor consumo de energia - Ambientalmente correta - Aplicação em filmes biodegradáveis: <ul style="list-style-type: none"> - Filmes com maior resistência à tração - Filmes com maior módulo de elasticidade

** UX = 1 μmol de xilose liberada por minuto

1.3 CONCLUSÃO

Os estudos citados neste capítulo sobre a exploração de fontes vegetais evidenciaram que este recurso é um material promissor para produção de partículas de celulose em escala nanométrica, visto que este biopolímero dota de características ideais para ser utilizado como agente de reforço em compósitos, além de ser um recurso sustentável. Diante da necessidade em desenvolver métodos ambientalmente amigáveis, uma alternativa potencial para obter nanofibras de celulose é o uso de enzimas xilanólíticas para remoção de compostos amorfos (hemicelulose) presente na fibra, bem como o uso de enzimas celulasas para agir na região cristalina e isolar as nanopartículas da parede celular vegetal. Entretanto, o complexo celulolítico é um tratamento mais agressivo às fibras de celulose, podendo ocasionar a degradação completa da celulose à glicose. Assim, o ideal para produção de NFCs, é a utilização da enzima pura, endoglucanase. Além disso, não há relatos na literatura sobre produção de nanofibras de celulose isoladas da casca de banana a partir de hidrólise enzimática, o que comprova o grande caráter inovador desta pesquisa científica.

Capítulo 2 Obtenção e caracterização da matéria-prima para produção de nanofibras de celulose

O conhecimento sobre a matéria-prima utilizada para obtenção de nanofibras de celulose constitui uma importante etapa a ser abordada no desenvolvimento do presente estudo, a qual fornece informações importantes relacionadas aos nanomateriais obtidos a partir destas. O farelo da casca de banana verde da variedade “Terra” (*Musa paradisiaca*) foi obtido e caracterizado com base em suas propriedades físico-químicas, funcional e estrutural. As características morfológicas do farelo foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). A distribuição de tamanho e diâmetro médio das partículas foi analisada por aparelho de difração a laser (Mastersizer). A composição química do farelo foi quantificada quanto ao teor de celulose, hemicelulose, lignina e cinzas. A análise dos grupos funcionais foi realizada por espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR) de 4000 a 650 cm^{-1} e, o índice de cristalinidade do farelo foi determinado por difração de Raios-X (DRX). O farelo apresentou uma composição química em base seca de 7,5% de celulose, 7,9 % de lignina e 74,9 de hemicelulose e outros. Sua estrutura exibiu uma superfície irregular com grânulos de diferentes tamanhos, mostrando uma distribuição monomodal com diâmetro médio de 22,4 μm . A análise do espectro de absorção na região do infravermelho (FTIR) revelou a presença de bandas típicas dos grupos funcionais característicos de materiais lignocelulósicos. O baixo índice de cristalinidade encontrado (15%) foi atribuído a presença dos componentes amorfos (pectina, hemicelulose e lignina). O farelo da casca de banana apresentou características potenciais para ser utilizado na produção de materiais celulósicos em nanoescala.

2.1 INTRODUÇÃO

Originário do sudeste asiático, a banana é uma importante cultura alimentar cultivada em regiões tropicais e subtropicais. As perdas durante a produção de banana são muito altas, chegando a 40% do total, devido à sua natureza perecível e manuseio inadequado pós-colheita. Estas perdas podem ser reduzidas pelo processamento de frutas

excedentes e de partes impróprias para o consumo in natura (PELISSARI et al., 2012). A grande quantidade de resíduos de bananas verdes tem o potencial de ser utilizado industrialmente, melhorando questões econômicas na bananicultura e eliminando o grande problema ambiental apresentado por estes resíduos (ZHANG et al., 2005).

Diferentes autores têm indicado que a casca da banana é um resíduo agroindustrial que apresenta alto potencial como matéria-prima celulósica, além disso, as fibras vegetais possuem uma estrutura complexa e rígida (BARDIYA et al., 1996; HAPPI EMAGA et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2009). Desta forma, torna-se indispensável a caracterização e o estudo desta matéria-prima, visto a importância do conhecimento da estrutura para realizar os tratamentos necessários na obtenção de nanofibras de celulose.

Neste capítulo, apresenta-se a metodologia empregada para a obtenção do farelo da casca de banana e sua caracterização quanto à microestrutura, distribuição de tamanho dos grânulos, análise da composição química, grupos funcionais e índice de cristalinidade.

2. 2 MATERIAL E MÉTODOS

2. 2. 1 Obtenção da matéria-prima

A matéria-prima foi obtida a partir da casca de banana verde da variedade “Terra” (*M. Paradisiaca*). O procedimento para obtenção de matéria-prima pode ser observado na Figura 2.1. As cascas foram removidas manualmente e imersas durante 24 h em solução de metabissulfito de potássio 1%, para inibir a oxidação. Após este período, foram dispostas em bandejas de alumínio e submetidas à secagem em estufa de convecção forçada na temperatura de 60 °C por 24 h. As cascas secas foram moídas em um moinho de facas (Marconi, mod. MA 340, SP-Brasil). Realizou-se uma lavagem do farelo com álcool etílico a fim de eliminar as frações lipídicas e novamente secou-se em estufa a 60 °C por 24 h. O material obtido foi peneirado numa peneira de 200 mesh (abertura de 75 µm) de forma a obter micropartículas.

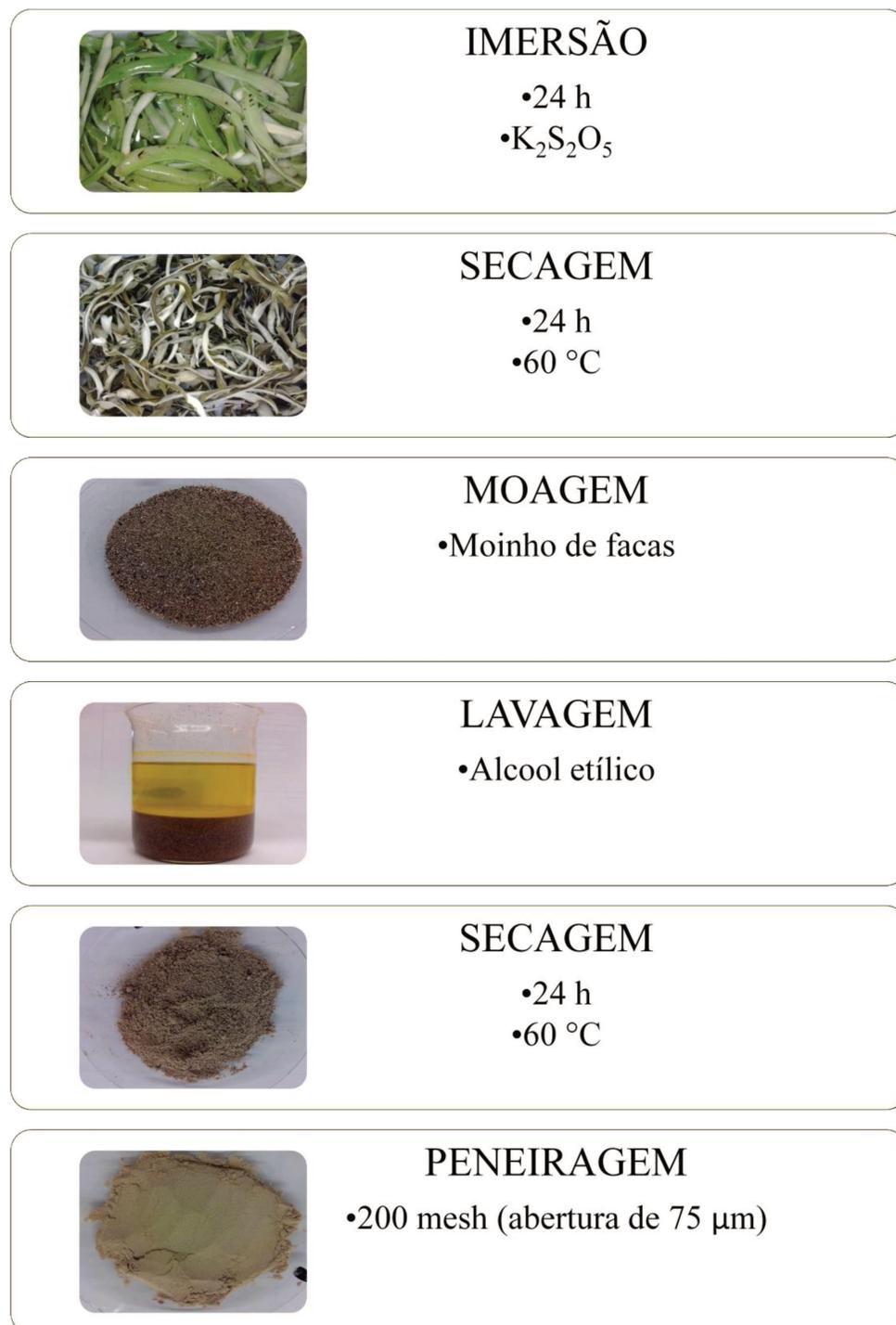


Figura 2.1 - Fluxograma do processo de obtenção do farelo da casca de banana

2. 2. 2 Caracterização da matéria-prima

2. 2. 2. 1 Microestrutura do farelo da casca de banana

A análise da microestrutura do farelo de casca de banana foi realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). A amostra foi disposta em um suporte de alumínio e coberta com uma camada de 92 Å de ouro (Sputter Coater, SCD050) para melhorar a condutividade. Foi utilizado um microscópio eletrônico de varredura marca JEOL modelo JSM-5800LV, sob voltagem de aceleração de 10 kV.

2. 2. 2. 2 Distribuição de tamanho e diâmetro médio das partículas do farelo

A distribuição do tamanho e o diâmetro médio das partículas foram determinados em um aparelho de difração a laser (Laser Scattering Spectrometer Mastersizer 2000, MALVERN Instruments Ltda.,U.K). As medidas foram realizadas em triplicata, na temperatura de 25°C. O meio dispersante usado foi etanol grau analítico e para aumentar a dispersibilidade da amostra empregou-se um ultrassom acoplado ao equipamento (PELLISSARI et al., 2014).

O diâmetro médio das partículas (DMP) foi determinado com base no diâmetro médio de uma esfera de mesmo volume da partícula (diâmetro médio de Brouckere $D_{4,3}$) conforme a Equação 2.1, utilizada para caracterizar partículas de pó (RAMALHO e OLIVEIRA, 1999)

$$DMP = D_{4,3} = \frac{n_i D_i^4}{n_i D_i^3} \quad (2.1)$$

Onde:

n = número de partículas

D = Diâmetro das partículas (µm)

2. 2. 2. 3 Determinação da composição química

A composição química do farelo da casca de banana foi determinada de acordo com Sluiter et al. (2008). Primeiramente a matéria-prima foi submetida a um processo de extração com diferentes solventes (água e álcool), para remover os materiais não estruturais da biomassa como: pectinas, carboidratos simples, terpenos, alcalóides, saponinas, polifenólicos, gomas, resinas, entre outros, de maneira a prevenir qualquer interferência nos passos analíticos posteriores. Todas as medidas da composição química foram realizadas em triplicata.

A extração foi realizada no soxhlet (4 a 5 ciclos de extração) em um período de 8 h, a partir de 7 g de amostra em base seca e 100 mL de solvente. O processo foi realizado em duas etapas, primeira extração em água e, depois em etanol. O solvente contido nos balões foi evaporado em um evaporador rotativo a 70 °C, conforme apresentado na Figura 2.2. Após os mesmos foram secos a 70 °C em estufa a vácuo por 24 h.

A massa final de amostra extraída ($g/g_{amostra}$) foi calculada de acordo com a Equação 2.2.

$$\%Ext = \frac{M_{bf} - M_{b0}}{M_{am}} \cdot 100 \quad (2.2)$$

Onde:

M_{am} = massa inicial de amostra (g)

M_{b0} = massa inicial do balão vazio (g)

M_{bf} = massa final do balão com amostra extraída (g)

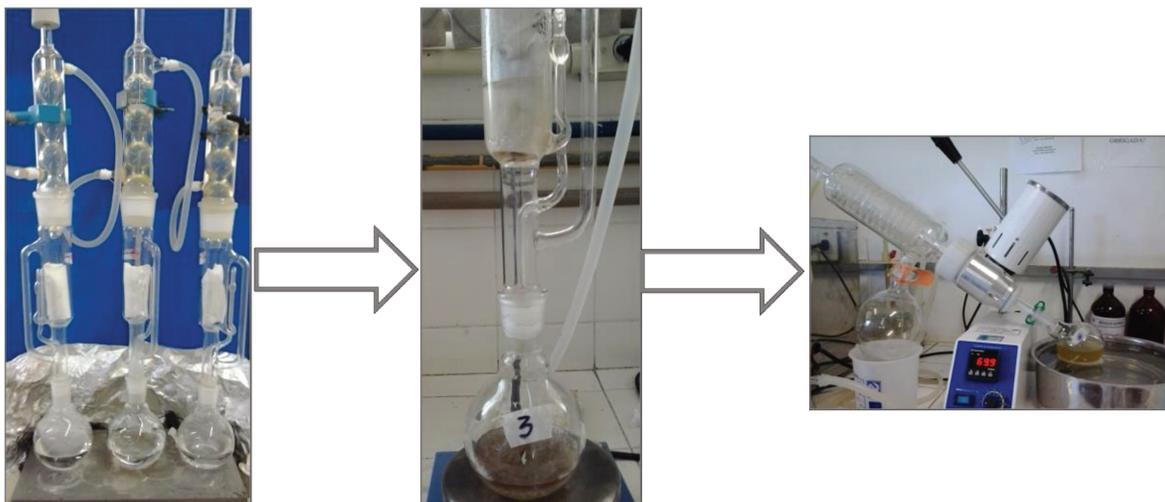


Figura 2.2 - Fluxograma do processo de extração de materiais não estruturais da biomassa.

2. 2. 2. 3. 1 Teor de celulose

O teor de celulose presente no farelo foi determinado por Sun (2004a). Pesou-se 5 g (amostra seca, livre de extrativos totais), a qual adicionou-se 100 mL de ácido acético aquoso 80 % e 10 mL de ácido nítrico 70 %. A mistura foi feita em tubo vedado com tampa de rosca, o qual foi submetido a banho de glicerina na temperatura de 110 °C por 20 min. Após, o mesmo foi resfriado em banho de gelo. Adicionou-se 60 mL de água destilada, neste ponto o reagente decantou e filtrou-se a vácuo o conteúdo do tubo. O resíduo decantado foi lavado várias vezes com água deionizada e etanol 95% de maneira a remover o ácido nítrico e os produtos gerados durante a extração. A amostra restante foi transferida para uma placa de petri, previamente tarada, e submetida à secagem em estufa a 70 °C por 24 h. O teor de celulose ($\text{g/g}_{\text{amostra}}$) foi calculado de acordo com a Equação 2.3.

$$\% \text{Celulose} = \frac{M_{p+am} - M_p}{M_{am}} \cdot 100 \quad (2.3)$$

Onde:

M_{p+am} = Massa da placa (g) + massa final da amostra (g)

M_p = Massa da placa vazia e tarada (g)

M_{am} = Massa inicial de amostra (g)

2. 2. 2. 3. 2 Teor de lignina e hemicelulose

A lignina foi quantificada em material insolúvel e solúvel em ácido, conforme o método adaptado por Sluiter et al. (2008). Para ambas as análises, foi adicionado aproximadamente 300 mg de amostra (livre de extrativos) em 3,0 mL de ácido sulfúrico 72 % em tubos autoclaváveis. A mistura foi incubada em banho-maria a 30 °C por 60 min, sendo agitada a cada 10 min para garantir tanto o contato do ácido com as partículas quanto uma hidrólise uniforme. Após, o ácido foi diluído com 84 mL de água deionizada e a mistura submetida à autoclavagem a 121 °C por 1 h. O hidrolisado foi resfriado lentamente em temperatura ambiente.

A análise da amostra para lignina insolúvel em ácido foi realizada a partir da filtração a vácuo da solução de hidrólise autoclavada. Do filtrado foi retirada uma alíquota e esta foi acondicionada sob refrigeração, para análise posterior. Os sólidos restantes da filtração foram lavados com 50 mL de água deionizada aquecida. O resíduo insolúvel foi transferido para uma placa de petri, previamente tarada e, levado a secagem em estufa a 105 °C, até peso constante. Após, a mesma amostra seguiu para a determinação de cinzas. A massa de lignina insolúvel em ácido ($g/g_{amostra}$) foi calculada a partir da Equação 2.4.

$$\%Lig_{insolúvel} = \frac{M_{p+am} - M_c}{M_{am}} \cdot 100 \quad (2.4)$$

Onde:

M_{p+am} = Massa da placa (g) + massa final da amostra (g)

M_c = Massa de cinzas (g)

M_{am} = Massa inicial de amostra (g)

A análise da amostra para lignina solúvel em ácido foi realizada a partir da leitura da absorbância do filtrado hidrolisado, em espectrofotômetro UV-visível no comprimento de onda de 240 nm. O teor de lignina solúvel em ácido foi calculado pela Equação 2.5.

$$\%Lig_{solúvel} = \frac{ABS \cdot V_f \cdot F_d}{\epsilon \cdot M_{am}} \cdot 100 \quad (2.5)$$

Onde:

ABS = Absorbância a 240 nm

V_f = Volume de filtrado

F_d = Fator de diluição

ϵ = Constante de absorvidade para biomassa versus comprimento de onda

M_{am} = Massa inicial de amostra (g)

A quantidade de lignina total foi calculada conforme a Equação 2.6.

$$\%Lig_{total} = \%Lig_{insolúvel} + \%Lig_{solúvel} \quad (2.6)$$

Após as análises do teor de celulose e lignina, a porcentagem de hemicelulose e dos demais compostos que são encontrados em menores quantidades nas fibras vegetais, como pectina, foi calculado pela Equação 2.7.

$$\%hemicelulose \ e \ outros = 100 - \%Lig_{total} - \%Celulose - \%cinzas \quad (2.7)$$

2. 2. 2. 4 Análise dos grupos funcionais do farelo por Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR).

A análise qualitativa de grupos funcionais presentes no farelo foi realizada por espectroscopia de absorção na região do infravermelho de 4000 a 650 cm^{-1} , com uma resolução de 4 cm^{-1} e 16 varreduras (VICENTINI et al., 2005). Foi utilizado um espectrofotômetro infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), marca Perkin Elmer, modelo Spectrum One, provido com o acessório UATR (atenuador de refletância total universal). Para o tratamento dos resultados foi utilizado o software Spectrum One B (versão 5.31).

2. 2. 2. 5 Cristalinidade do farelo por Difração de Raios-X (DRX)

O índice de cristalinidade do farelo foi determinado por difração de raios X (DRX) usando um difratômetro modelo D5005 (marca Siemens, Karlsruhe, Deutschland) equipado com um monocromador de grafite. Foi utilizado uma fonte de radiação $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 0.154$ nm) de 40kV e 30 mA. Os difratogramas foram obtidos à temperatura ambiente (25°C) sob ângulo 2θ variando de 5° a 70° em passos de $0,02^\circ/\text{seg}$, usando o software Diffrac Plus Evaluation 11. Os difratogramas foram suavizados usando o método de Savitsky-Golay (polinômio = 2, pontos = 15) (VAN SOEST et al., 1996). O índice de cristalinidade (Icr, %) do farelo foi calculado através do quociente entre a área cristalina (Ac) dos picos de maior difração e a área total (At) do difratograma (Equação 2.10), como descrito por Cheetham et al. (1998) e Nuwamanya et al. (2010). Para o cálculo da área correspondente aos picos característicos da região cristalina da amostra (Ac), uma linha na base desses picos foi plotada no difratograma, enquanto que para o cálculo da área total (At), a linha base foi plotada na faixa angular de 5° a 50° . O cálculo destas áreas foi realizado usando o software Origin v.8.5 (Northampton, MA, USA).

$$\% \text{Índice}_{\text{cristalinidade}} = \frac{\text{Área cristalina}}{\text{Área total}} \times 100 \quad (2.10)$$

2. 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2. 3. 1 Caracterização da matéria-prima

2. 3. 1. 1 Microestrutura

As micrografias eletrônicas de varredura (Figura 2.3) do farelo da casca de banana apresentou estrutura irregular, com grânulos compactos e de diferentes tamanhos. Pode-se observar a presença de grânulos de amido provenientes do contato da casca da banana com a da polpa (ver setas na Figura 2.3 a). Os resultados foram muito semelhante ao encontrado por Pelissari et al. (2014). A irregularidade da estrutura do farelo está relacionada com a etapa de moagem no preparo da amostra. De acordo com Fagury (2005) na utilização de

fibras como material de reforço em compósitos, as irregularidades superficiais conferem às fibras uma melhor ancoragem na matriz polimérica.

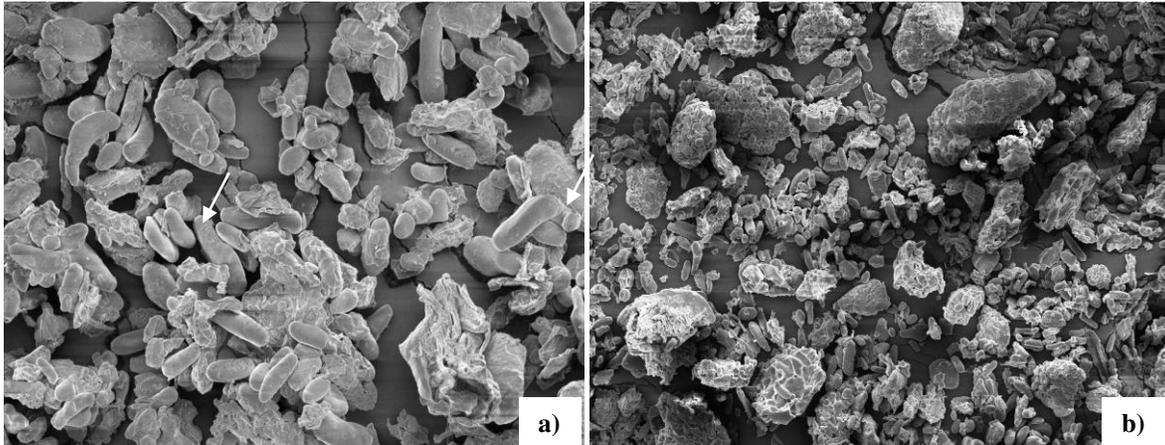


Figura 2.3 - Microestrutura do farelo da casca de banana verde (a) 1400 x (b) 500 x

2. 3. 1. 2 Distribuição de tamanho e diâmetro médio das partículas do farelo

A análise de distribuição de tamanho de partícula mostra que há uma grande variação no diâmetro dos grânulos do farelo. Na Figura 2.4 pode-se observar que o tamanho é predominante na faixa de 13 a 26 μm . O farelo da casca de banana apresentou uma distribuição modal, com diâmetro médio de 22,4 μm ., similar ao encontrado por Pelissari et al. (2014) para banana verde da variedade “Terra”.

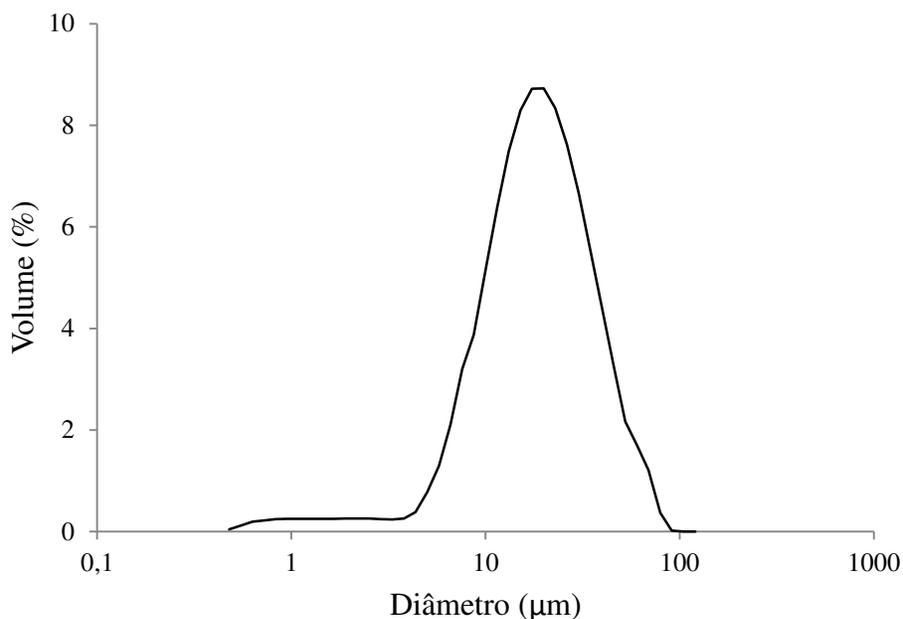


Figura 2.4 - Distribuição do tamanho do diâmetro dos grânulos do farelo da casca de banana

2. 3. 1. 3 Determinação da composição química

Os resultados obtidos na determinação da composição química no farelo da casca de banana verde são apresentados na Tabela 2.1. A partir dos valores encontrados nota-se que a porcentagem de celulose (7,5%) presente na casca de banana verde da variedade “Terra” é semelhante, porém menor, ao teor de lignina total na mesma (7,9%). Considerando também a fração de hemicelulose, fica evidente que o agente hidrolítico (enzima) encontrará dificuldade no acesso a fibra de celulose, visto que esses componentes amorfos, em maior quantidade Na composição química do farelo, formam uma barreira ao seu redor (SILVA, 2009).

Tabela 2.1 - Composição química do farelo da casca de banana verde (*M. paradisíaca*) em base seca

Composto	Teor (%)
Extrativos Totais	9,6 ± 0,3
Lignina total	7,9 ± 0,2
Lignina insolúvel	5,7 ± 0,1
Lignina solúvel	2,1 ± 0,1
Celulose	7,5 ± 2,6
Polissacarídeos (incluindo hemicelulose)	74,9 ± 0,4

Os teores lignocelulósicos encontrados na matéria-prima em estudo apresentaram semelhança com o descrito por diferentes autores. De acordo com Mohapatra et al. (2010), em geral, a casca de banana (*Musacea*) apresenta em sua composição uma quantidade de celulose em torno de (7,6 – 9,6%), hemicelulose de (6,4 - 9,4%) e lignina de (6 – 12%), além disso, é rica em vitaminas, pectinas e açúcares.

Happi Emaga et al. (2008) estudaram a composição química de casca de banana da variedade “Grande Naine” em três diferentes estágios de maturação. Segundo esses autores, entre os componentes a lignina apresentou maior teor, variando entre 6,0% e 12 %, confirmando o fato de que a casca é mais robusta que a polpa da banana. Durante o amadurecimento o teor de lignina teve um decréscimo significativo, ou seja, na casca de banana verde a lignina está presente em maior quantidade (12,0%). A partir destas informações observa-se que o valor obtido na presente pesquisa (7,9%) está de acordo com os resultados de demais autores, havendo uma variação devido à diferença nas espécies de banana estudadas em cada trabalho. Dentre os diferentes resíduos provenientes da bananicultura, a casca apresenta menor quantidade de lignina, conforme comparação feita com outros resíduos: pecíolo (18%), folhas (13,3 - 24,3%) e pseudocaule (10,7%), estudados por Oliveira et al. (2007). Este resultado é satisfatório, visto que um material menos robusto facilita a hidrólise e, conseqüentemente, o isolamento de nanofibras de celulose.

De acordo com a Tabela 2.1, observa-se que a matéria-prima em estudo é composta por 7,5% de celulose. Segundo Happi Emaga et al. (2008), os teores de celulose na casca de banana verde e na casca de banana madura (7,6% e 7,5%, respectivamente) não diferem significativamente e são menores que a quantidade encontrada para casca de banana no estágio intermediário de maturação (9,6%). Assim, pode-se confirmar que é mais apropriado o uso da casca de banana verde, visto que durante o amadurecimento ocorre a síntese enzimática, própria de frutas, e com isso, a degradação parcial da celulose em monossacarídeos. Bardiya et al. (1996), encontrou uma porcentagem de 11,1% de celulose para casca de banana proveniente da região de Delhi – Índia.

Em materiais lignocelulósicos, o teor de polissacarídeos encontrado (74,9%) inclui hemicelulose e outros compostos como carboidratos totais (23%), sólidos solúveis totais (35,9%), etc (BARDIYA et al., 1996). Conforme os dados obtidos por Happi Emaga et al. (2008), a casca da banana verde apresenta 6,4 % de hemicelulose, sendo que este teor aumenta conforme o amadurecimento da fruta. Bardiya et al. (1996) relatou em seus estudos um teor de hemicelulose de 5,4% na casca de banana madura.

A partir destes resultados, fica evidente a necessidade de realizar um pré-tratamento desta matéria-prima (farelo), com o intuito de remover as frações de hemicelulose e lignina para posterior ataque enzimático à celulose nativa e então, isolamento das nanopartículas.

2.3.1.4 Análise dos grupos funcionais do farelo por Espectroscopia de Absorção na região do infravermelho (FTIR).

O espectro de FTIR obtido para o farelo da casca de banana mostra qualitativamente bandas típicas dos grupos funcionais presentes em materiais lignocelulósicos e é apresentado na Figura 2.5. Observa-se um pico arredondado e de base larga na região de 3311 cm^{-1} , que conforme descrito por Zhao & Liu (2010), corresponde à deformação axial dos grupos hidroxilas associados quimicamente (-OH). Yang et al. (2007), analisaram isoladamente a celulose, hemicelulose e lignina, e de acordo com esses autores a maior absorção de grupos -OH foi obtida para a celulose. A pequena banda observada na região de 2925 cm^{-1} é originária de vibrações do estiramento das ligações C-H em grupos metila ou metileno, presente na celulose e hemicelulose (SUN et al., 2011). De acordo com

Siqueira et al (2010b), os picos observados nestas regiões citadas ($3300\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$ e 2900 cm^{-1}), são bandas bem conhecidas e específicas da celulose.

Os picos observados no espectro do farelo entre 1741 cm^{-1} e 1628 cm^{-1} resultam de vibrações dos grupos acetil e éster urônico de hemiceluloses ou deformação axial de grupos carboxílicos da lignina (ALEMDAR e SAIN, 2008; ZULUAGA et al., 2009). De acordo com Siqueira et al (2010b), bandas próximas a 1730 cm^{-1} são atribuídas à deformação de grupos C=O de grupos da xilana, componente principal da hemicelulose e também, de grupos químicos da lignina.

A banda situada em 1308 cm^{-1} pode ser atribuída à flexão C-H simétrica da celulose (SUN et al., 2011), ou então, aos grupos hidroxila fenólicos da lignina (ZHAO e LIU, 2010). Um pequeno pico observado em 1253 cm^{-1} é associado à deformação do grupo C-O aromático característico da lignina (XU et al., 2006; SUN et al., 2011). Os picos observados em 1154 cm^{-1} e 1079 cm^{-1} são característicos das vibrações C-O e C-H da celulose (ALEMDAR e SAIN, 2008). De acordo com Zuluaga et al (2009), a banda 1043 cm^{-1} (estiramento de C-O-C) é devido a presença de xilana associada a hemicelulose. Este resultado sugere que as xiloglicanas estão fortemente ligas as microfibrilas de celulose. As bandas próximas a região de 866 cm^{-1} indicam uma estrutura típica de celulose, incluindo a presença de ligações glicosídicas β -1,4 entre monossacarídeos (xilose) (WANG et al., 2007; ALEMDAR e SAIN, 2008). Em geral, os picos encontrados na região entre 1500 cm^{-1} e 800 cm^{-1} estão relacionados com a estrutura da celulose. Porém, o farelo não tratado ainda apresenta um pico na região próxima a 840 cm^{-1} , que é característico dos grupos C-H de anéis aromáticos presentes na lignina (MARCOVICH et al., 1996).

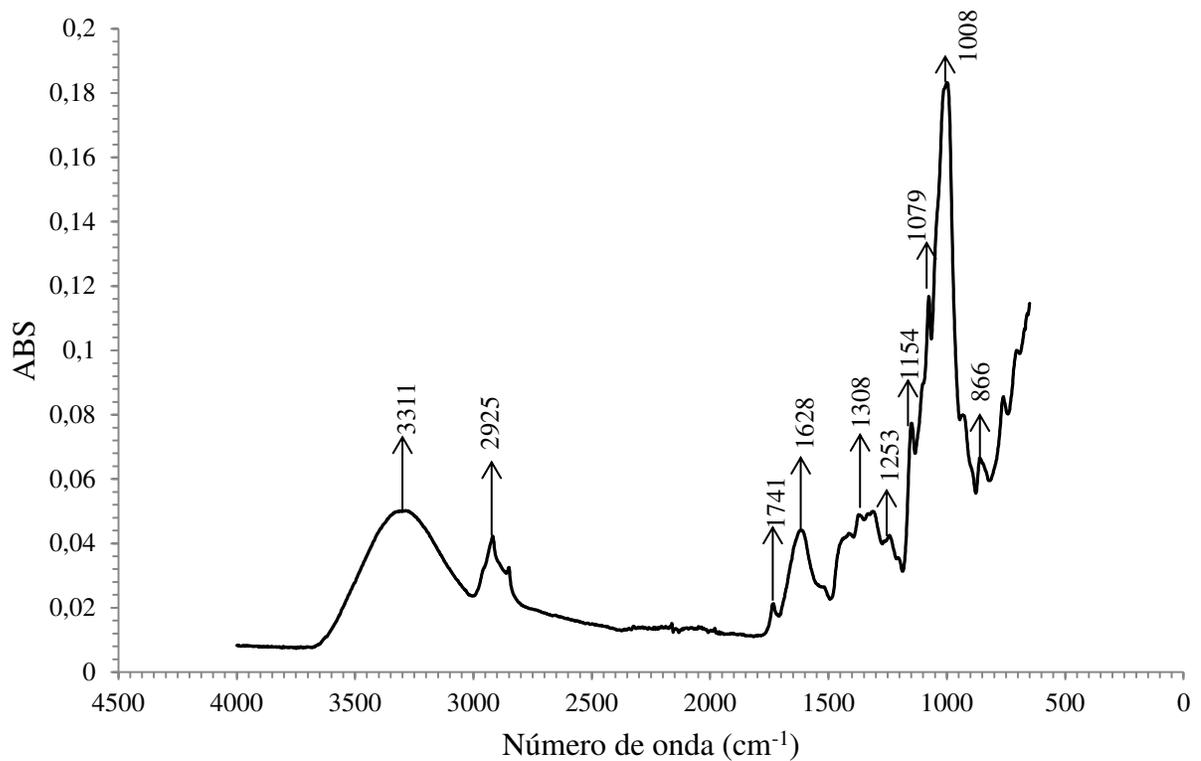


Figura 2.5 - Espectro de absorção na região do infravermelho para o farelo da casca de banana

2. 3. 1. 5 Cristalinidade do farelo por Difração de Raios-X (DRX)

O difratograma de raios-X do farelo da casca da banana é apresentado na Figura 2.6. O índice de cristalinidade (I_{c_r} , %) obtido foi de 15,0 %. O baixo valor de I_{c_r} apresentado pelo difratograma indica a presença de uma larga porção amorfa no farelo, representada por celulose amorfa, hemicelulose e lignina (ALEMDAR e SAIN, 2008). Moléculas de celulose desordenadas, bem como, hemiceluloses e lignina estão localizadas entre as microfibrilas das células vegetais. As hemiceluloses aparentemente estão orientadas na mesma direção das microfibrilas de celulose, entretanto, são consideradas componentes amorfos (WANG et al., 2007).

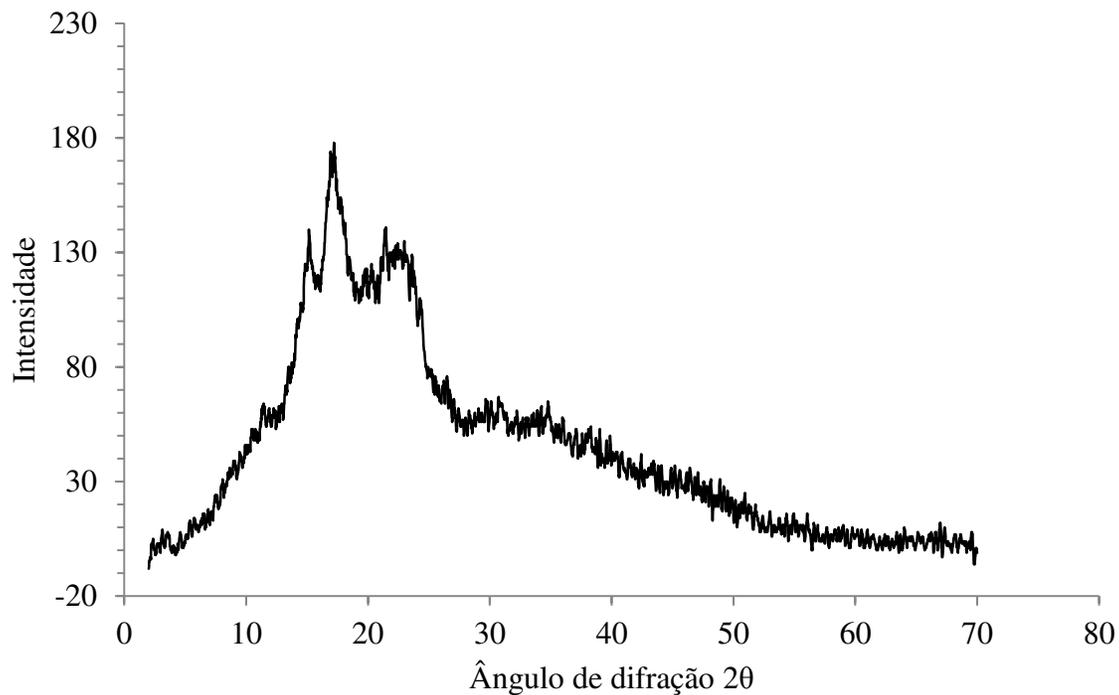


Figura 2.6 - Difratograma de Raio-X para o farelo da casca de banana

As propriedades mecânicas (resistência, rigidez, entre outros) dos materiais lignocelulósicos são dependentes do seu índice de cristalinidade, visto que este índice está relacionado com as ligações moleculares secundárias presentes nas regiões cristalinas e com o nível de compactação nas mesmas (SAO et al., 1994). A análise da cristalinidade evidenciou a necessidade da realização de um pré-tratamento no farelo, para reduzir a presença de componentes amorfos e aumentar a eficiência da hidrólise enzimática. Segundo Mussatto et al (2008), a remoção da hemicelulose e da lignina causa extensiva mudança na estrutura do farelo, aumentando a área superficial cristalina e, conseqüentemente, a acessibilidade da enzima à fibra de celulose. Entretanto, não é necessário promover a remoção completa dessas duas frações para alcançar alta fração cristalina.

2.4 CONCLUSÃO

O farelo obtido a partir das cascas de banana verde da variedade “Terra” pode ser considerado um material promissor para o isolamento de nanofibras de celulose. O teor de celulose (7,5%) presente no farelo confirmou essa potencialidade. Entretanto, o baixo

índice de cristalinidade (15%) e a presença de grupos funcionais característicos de materiais lignocelulósicos evidenciaram a necessidade de empregar tratamentos para eliminar os componentes amorfos do farelo como hemicelulose (16,0 a 14,2%) e lignina (9,6 a 7,9%), a fim de se obter um material mais cristalino. Mesmo presente em quantidades menores em relação à fração celulósica, a lignina confere limitação suficiente, retardando ou mesmo impedindo a atuação do agente hidrolítico sobre o material. O uso do farelo da casca da banana pode levar à elaboração de produtos competitivos no mercado, contribuindo com a redução de subprodutos (casca) rejeitados na natureza, agregando valor ao mesmo.

Capítulo 3 Determinação da metodologia para produção de nanofibras de celulose por hidrólise enzimática

Nanofibras de celulose (NFCs) foram isoladas a partir do farelo da casca de banana usando diferentes combinações de tratamento químico, hidrólise enzimática e tratamento mecânico. Foram desenvolvidos quatro métodos (1, 2, 3 e 4), os quais se diferenciavam entre si pelo agente químico utilizado na etapa de deslignificação (NaClO_2 1% ou KOH 5%), bem como o número de vezes que se repetiu a etapa. Em todos os métodos realizou-se hidrólise enzimática com xilanase e celulase, seguido de tratamento mecânico, por meio de um homogeneizador à alta pressão. Aparentemente, na sequência em que o farelo foi passando pelas etapas de tratamento, as suspensões coloidais obtidas nos métodos (2, 3 e 4) exibiram mudança na coloração, de marrom escura para branca. Tal fato indica que os compostos amorfos presentes na fibra vegetal foram removidos. Porém, através da microscopia eletrônica de transmissão (MET) foi possível observar que apenas o método 4 (tratamento alcalino + hidrólise com enzima xilanase + hidrólise com enzima celulase + tratamento mecânico) foi eficiente para isolar fibras de celulose em escala nanométrica. As NFCs obtidas a partir deste método foram então avaliadas quanto à morfologia, tamanho (comprimento e diâmetro) e carga superficial (potencial zeta). As NFCs apresentaram um diâmetro médio de 14,9 nm, comprimento das fibras em torno de 5257 nm e uma relação de aspecto de 352,82. O potencial zeta das NFCs foi um valor alto e negativo ($-38,6 \pm 0,7$), indicando que a suspensão coloidal obtida é estável. As micropartículas obtidas pelos demais métodos (1, 2 e 3) foram avaliadas estruturalmente por microscopia óptica e, apresentaram diâmetro entre 1,4 e 4,6 μm . No geral, fica evidente que o farelo precisa ser pré-tratado com agente alcalino para posterior tratamento com enzimas a fim de isolar fibras de celulose a partir da casca de banana na escala nanométrica.

3.1 INTRODUÇÃO

Na produção de nanofibras de celulose, diferentes metodologias têm sido desenvolvidas desde a década de 80 e, geralmente, consiste em três etapas (ROSA et al.,

2010). A etapa de pré-tratamento é de fundamental importância, visto que o isolamento da celulose requer, primeiramente, a remoção de componentes amorfos, tais como a hemicelulose e lignina. A etapa da hidrólise consiste na quebra da estrutura das fibras em cristais e, uma etapa adicional, tratamento mecânico, é utilizada para a separação das nanopartículas da parede celular vegetal, pelo uso de forças de cisalhamento (HUBBE et al., 2008).

Estes três tratamentos estão orientadas em produzir uma suspensão coloidal de nanofibras em água. Detalhes dos tratamentos, assim como as ordens das etapas (2) e (3) dependem da fonte da celulose (vegetal, animal ou biológica) (ANDRADE-MAHECHA, 2012). As diferentes condições de processo, seja na preparação das fibras ou na hidrólise para isolamento das nanofibras, podem afetar suas características morfológicas e conseqüentemente, seu desempenho como material de reforço (SILVA e D'ALMEIDA, 2009).

Neste contexto, objetivou-se produzir nanofibras de celulose a partir do farelo casca de banana. Com base na literatura, foram testados quatro métodos diferentes envolvendo tratamentos químico, enzimático e mecânico (PÄÄKKO et al., 2007; ZULUAGA et al., 2009; HASSAN et al., 2010).

3. 2 MATERIAL E MÉTODOS

3. 2. 1 Produção de nanofibras

No estudo de produção das nanofibras de celulose foram propostos quatro diferentes tratamentos. A seqüência de etapas que compõem os processos desenvolvidos para a obtenção de nanofibras de celulose a partir do farelo se encontra esquematizada na Figura 3.1 e é descrita a seguir.

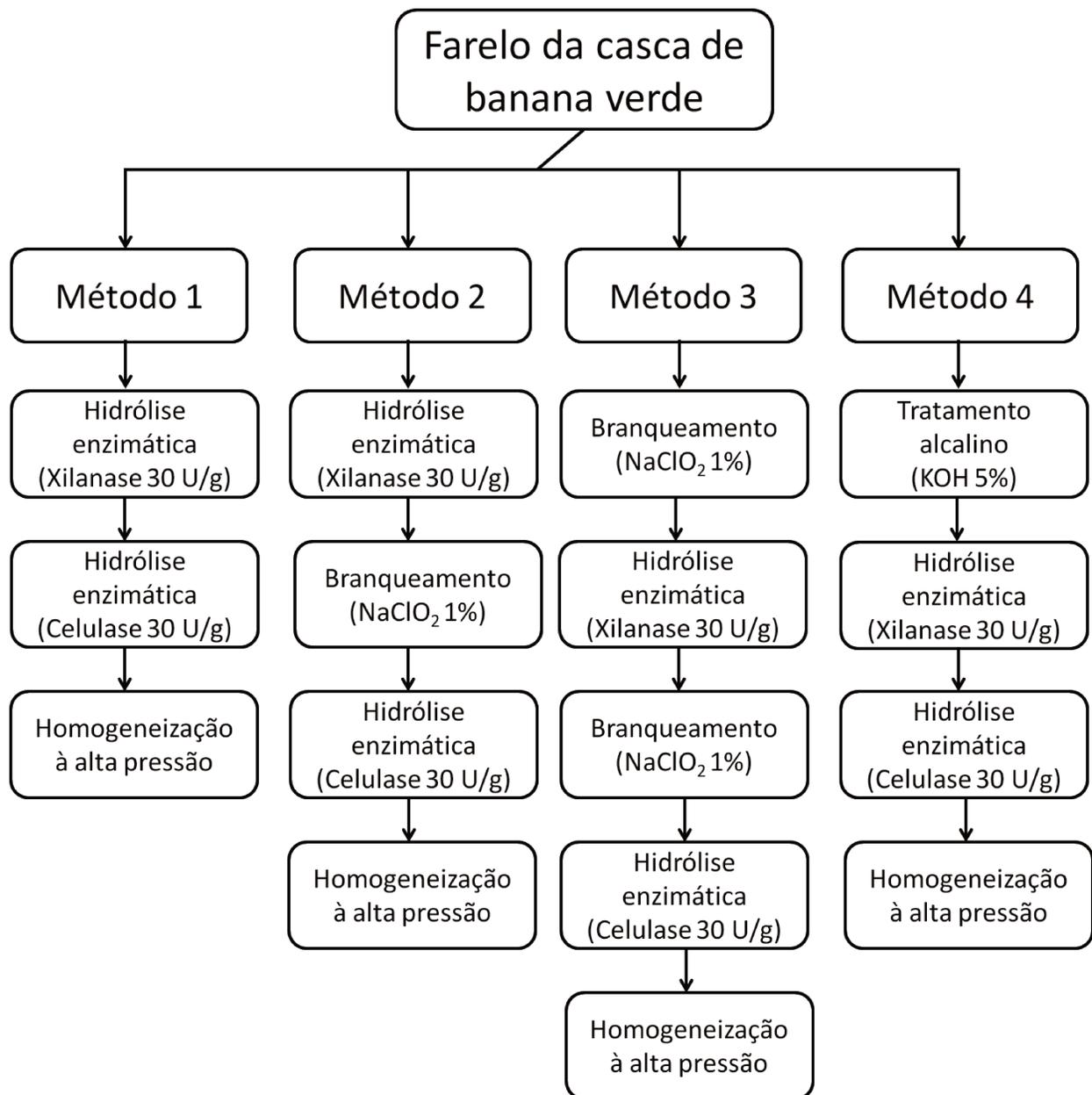


Figura 3.1 - Esquema de cada tratamento avaliado para produção de nanofibras de celulose: método 1, método 2, método 3 e método 4.

A metodologia 1 fundamentou-se em utilizar técnicas ambientalmente amigáveis, ou seja, sem utilização de reagente químico. A partir de 5 g de matéria-prima (farelo), primeiramente, realizou-se uma hidrólise com enzima xilanase (30 Ux/g), sendo Ux definido como 1 μmol de xilose liberada por minuto por mL de enzima. A suspensão foi mantida em pH 5,3 (tampão acetato), na temperatura de 50 °C por 24 h. A polpa úmida foi

separada por centrifugação (15 min/10.000 rpm/5 °C) e este mesmo mecanismo foi empregado para lavá-la sucessivamente com água deionizada. Após, realizou-se uma hidrólise com enzima celulase (30 U/g /50 °C / pH 5,3) no período de 2 h, sendo U definido como 1 µmol de glicose liberada por minuto por mL de enzima. Para inativação da enzima, a amostra permaneceu na temperatura de 80 °C por 30 min e novamente realizaram-se etapas de lavagem e centrifugação. Por fim, fez-se um tratamento mecânico utilizando um homogeneizador à alta pressão, a fim de individualizar as nanofibras de celulose, com base no método adaptado por Santana et al. (2011). A suspensão foi submetida a 5 passagens em um homogeneizador PANDA 2K NS1001L2K (Niro Soavi S.p.A., Parma, Italy), de alta pressão e dois estágios. As pressões no primeiro e segundo estágio foram de 500 bar e 50 bar, respectivamente. Durante este tratamento, a suspensão passa por um estreito orifício sob pressão elevada, sendo que o fluido acelera rapidamente alcançando uma velocidade de 300 m/s nos microcanais. A partícula é quebrada devido a energia fornecida pelo processo, a qual é resultado do cisalhamento, impacto e cavitação.

Para o método 2, além dos tratamentos realizados para a amostra 1, foi feito um tratamento químico. Entre as etapas de hidrólise enzimática foi adicionada uma etapa de branqueamento, com o intuito de remover os componentes amorfos da parede celular vegetal. O material resultante da primeira hidrólise, com enzima xilanase, foi diluído em água deionizada e o pH foi ajustado em 5,0 com solução de ácido acético a 10%. Em seguida, foi usado clorito de sódio 1% (NaClO₂), na temperatura de 70 °C por 1 h. Tradicionalmente o clorito de sódio é usado para deslignificar madeira como um passo inicial de isolamento de celulose pura e, também é usado na indústria como agente branqueador de polpas celulósicas (SUN, 2004a). Realizou-se a segunda hidrólise com enzima celulase e então a suspensão foi submetida a tratamento mecânico (homogeneização a alta pressão).

O terceiro método estudado foi formado por dois tratamentos químicos, dois enzimáticos e um mecânico. O farelo foi diluído em água deionizada e pH ajustado em 5,0 com solução de ácido acético a 10%. O primeiro branqueamento da amostra foi realizado com clorito de sódio 1% (NaClO₂ / 1 h / 70°C). Após, realizou-se a primeira hidrólise com enzima xilanase (30 U/g / 50 °C / pH 5,3). O segundo branqueamento foi realizado nas mesmas condições anteriores (NaClO₂), bem como, a seguinte hidrólise com enzima

celulase (30 U/g / 50 °C / pH 5,3). Por fim, a amostra foi submetida ao tratamento mecânico (homogeneização a alta pressão).

Para o método 4, o farelo foi submetido a um tratamento alcalino com solução de KOH 5% (1:20). Na sequência, a polpa úmida foi submetida à hidrólise com enzima xilanase e após, com enzima celulase, ambas sob as mesmas condições (30 U/g / 50 °C / pH 5,3). Por fim, a amostra passou pelo processo de individualização das fibras por homogeneização a alta pressão.

Entre os estágios que compõem as diferentes etapas de hidrólise enzimática, tratamento químico e tratamento mecânico, foram realizadas lavagens sucessivas com água deionizada em ciclos de centrifugação (15 min / 10.000 rpm / 5 °C) a fim de neutralizar o pH das amostras. Ao final de todos os processos obteve-se uma suspensão coloidal.

3. 2. 2 Caracterização das suspensões

As suspensões coloidais obtidas através dos quatro tratamentos realizados foram caracterizadas quanto às suas características morfológicas, distribuição de tamanho (comprimento), diâmetro e carga superficial (potencial zeta).

3. 2. 2. 1 Nano e microestrutura

Para visualizar a estrutura das partículas obtidas após os diferentes métodos empregados, realizaram-se técnicas de microscopia óptica e microscopia eletrônica de transmissão (MET). Empregaram-se duas técnicas para determinação da forma e do diâmetro das partículas, pelo fato de não ter conhecimento prévio sobre o tamanho das mesmas obtidas ao final de cada método.

3. 2. 2. 1. 1 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A técnica MET foi realizada conforme descrito por Pelissari et al. (2014). Cada suspensão foi colocada em ultrassom por 5 minutos e, a seguir, uma gota da suspensão foi depositada em uma micrograde de carbono e parlódio (300 mesh) e seca a 60°C, por 20

minutos. As imagens foram obtidas em um microscópio de transmissão ZEISS CEM 902, empregando uma tensão de aceleração de 80 kV. Os diâmetros das nanofibras foram determinados por um processo de análise das imagens obtidas por MET, usando o software ImageJ.

3. 2. 2. 1. 2 Microscopia óptica

A microscopia óptica foi realizada para visualizar a microestrutura das amostras, a fim de se obter informações sobre forma e diâmetro das microfibras obtidas. Cada suspensão foi depositada em lâminas de vidro para microscopia. A visualização da microestrutura foi realizada em um microscópio óptico ZEISS (modelo: SCOPE A1) com um aumento de 40.000 x.

3. 2. 2. 2 *Potencial zeta e determinação do comprimento das nanofibras*

A carga superficial e o comprimento das nanofibras, em suspensão aquosa, foram analisados por um Zetasizer (Malvern Instruments, Ltda., U.K) em temperatura ambiente (25 °C). Foram obtidas seis medidas do comprimento e seis medidas do potencial zeta, e os resultados foram apresentados como valores médios (PELLISSARI et al., 2014).

3. 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3. 3. 1 Caracterização das suspensões

3. 3. 1. 1 Aparência das suspensões coloidais

A Tabela 3.1 apresenta os resultados obtidos para cada metodologia realizada neste estudo.

Tabela 3.1 - Avaliação da aparência das suspensões coloidais

Método	Precipitado final	Observações	Diâmetro das partículas	Resultado
1	Coloração marrom escuro	Presença de lignina	Entre: 1,4 e 4,6 μm	Produção de micropartículas de celulose Não ocorre atuação das enzimas Necessidade de um pré-tratamento químico
2 e 3	Coloração branca	Remoção parcial da lignina após etapa de branqueamento (NaClO_2)	Entre: 1,4 e 4,6 μm	Produção de micropartículas de celulose Atuação prejudicada das enzimas
4	Coloração branca	Tratamento alcalino (KOH): Remoção da lignina Tratamento com xilanase: Remoção de frações hemicelulósicas Tratamento com celulase: Quebra das ligações β -1,4 que unem as cadeias de celulose Tratamento mecânico: Isolamento das NFCs	Entre: 5,1 e 71,9 nm	Método eficiente na produção de nanofibras de celulose

Na Figura 3.2 é apresentada a sequência das etapas do método 1 (N1) utilizada para a produção de nanofibras de celulose. A cor dos produtos permite verificar que há uma necessidade de se realizar um pré-tratamento químico antes da hidrólise enzimática, visto que as enzimas não conseguem acessar as cadeias de celulose, devido à barreira formada ao seu redor pelos componentes amorfos. O agente hidrolítico químico (ácido ou alcalino) tem como objetivo remover a lignina da lamela média (região entre as fibras, rica em lignina), a qual é responsável pela coloração marrom escura, observada no produto obtido (SILVA, 2009).

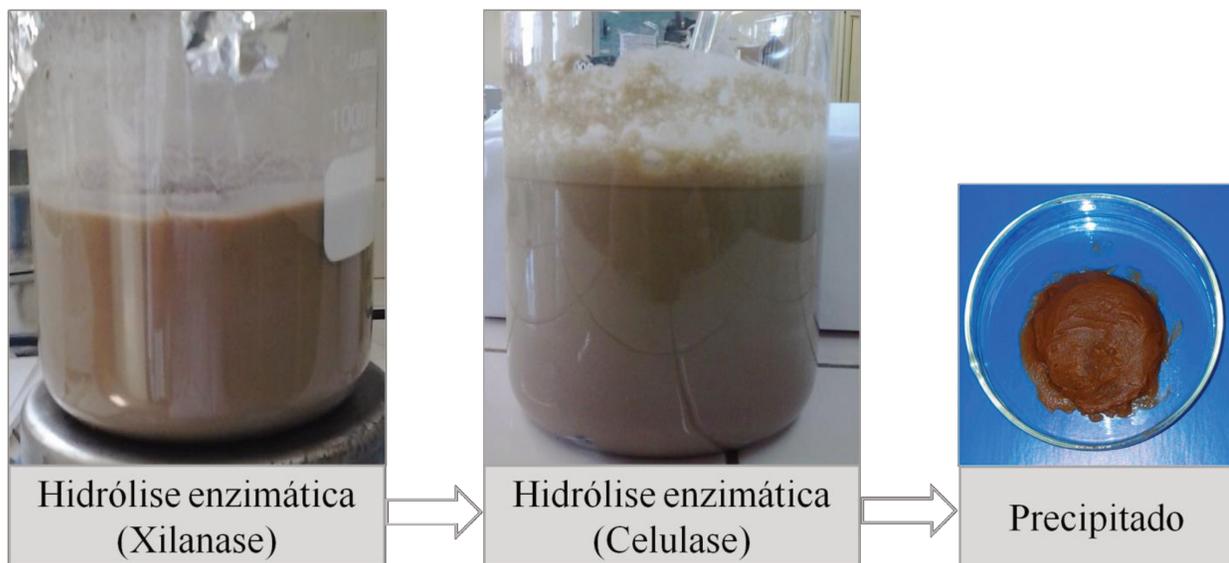


Figura 3.2 - Etapas de processo para obtenção de NFCs pelo método 1

Na metodologia 2 (N2), foi empregada uma etapa de branqueamento com clorito de sódio (NaClO_2) entre os processos de hidrólise enzimática. O clorito de sódio em meio ácido permite a extração da lignina e taninos, responsáveis pela cor marrom escura do farelo (DUFRESNE et al., 2000). A partir da Figura 3.3, novamente, nota-se que, no primeiro tratamento enzimático, a xilanase apresenta dificuldade de hidrólise das frações de hemicelulose, devido à estrutura robusta da fibra. Observa-se que a cor marrom do material, após o branqueamento, foi mudando para um tom muito mais claro e amarelado. Tal fato pode ser explicado devido a lignina ser formada por unidades de hidroxifenilpropano e este componente possuir caráter fenólico, ou seja, a etapa de branqueamento destina-se à oxidação dos grupos cromóforos (grupos funcionais que conferem cor às substâncias), principalmente da lignina residual, e/ou a degradação e dissolução das unidades moleculares que os contêm (VIAKARI et al., 1994). O tratamento com solução de clorito de sódio remove a maior parte da lignina, entretanto, muitas vezes, é necessário outro tratamento para branquear completamente a suspensão (DUFRESNE et al., 1997).

Segundo Dufresne et al. (1997), na etapa de branqueamento (NaClO_2) diferentes células da parede celular são individualizadas, mas as microfibrilas ainda estão associadas dentro da parede da célula. Neste contexto, realizou-se uma hidrólise enzimática com celulase e, observou-se que após o tratamento, a coloração foi perdendo o tom amarelo mudando para uma coloração branca. Com estas informações, pode-se afirmar que, além de

ocorrer remoção de resíduos lignocelulósicos, também foi possível individualizar as microfibrilas da parede celular.

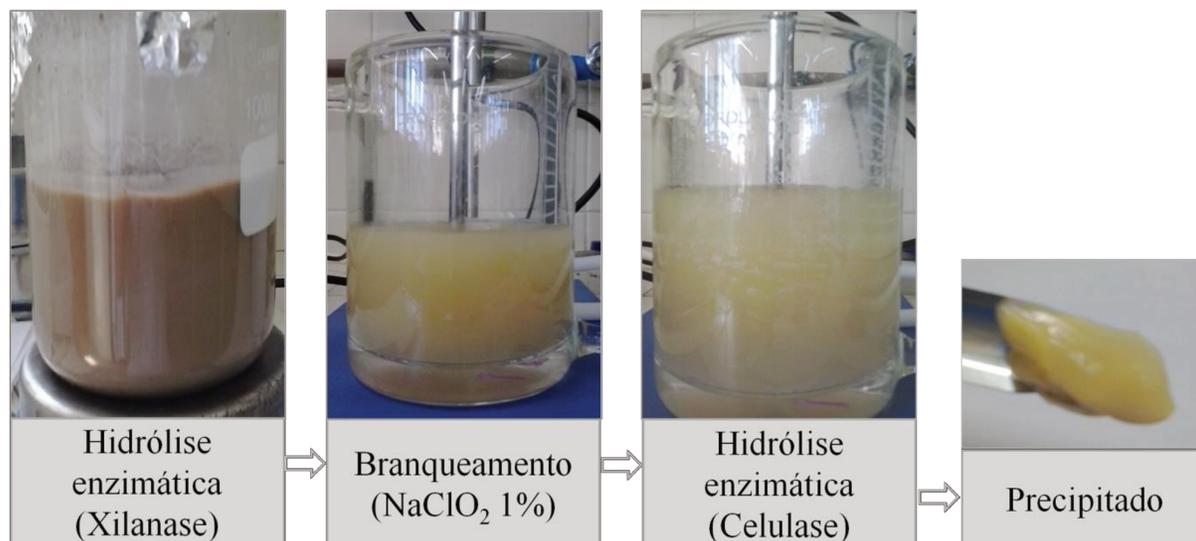


Figura 3.3 - Etapas de processo para obtenção de NFCs pelo método 2

O mesmo pode ser observado pelo método 3 (N3), na Figura 3.4, o qual consistiu de duas etapas deste mesmo branqueamento com NaClO₂. Nota-se que não houve mudanças apreciáveis na coloração com o acréscimo de mais uma etapa de branqueamento, não precisando esse tratamento ser repetido, visto que não há necessidade da remoção total de lignina e hemicelulose e sim, da quebra das ligações covalentes fortes. De acordo com Sun (2004a), em meio aquoso estas reações com materiais lignocelulósicos, resultam em uma substituição aromática, em alguns casos, acompanhada pelo deslocamento das cadeias laterais e de reações de oxidação que conduz a estruturas quinonóide (núcleo benzênico com duas ligações duplas). Entretanto, atualmente estão sendo desenvolvidas técnicas de branqueamento totalmente livre de clorito e, desta forma, deseja-se desenvolver técnicas ambientalmente amigáveis e que substituam reagentes com base em clorito.

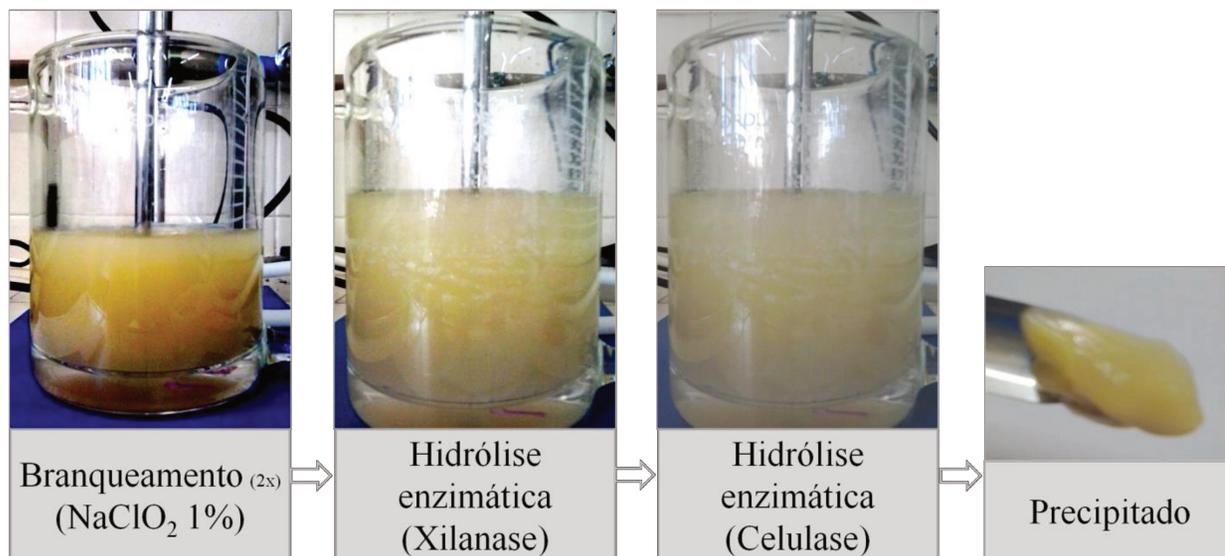


Figura 3.4 -Etapas de processo para obtenção de NFCs pelo método 3

O isolamento das NFCs depende do grau de ligações entre as microfibrilas que formam a fibra. O método 4 (N4) foi realizado empregando um tratamento alcalino com hidróxido de potássio 5% (KOH). Este tratamento foi realizado com o intuito de remover as frações de lignina da fibra vegetal. A polpa foi nitidamente branqueada e, tal fato fica evidente ao observarmos a Figura 3.5 que mostra a coloração final do precipitado após ser submetido a dez etapas de lavagens com água deionizada. Muitas pastas celulósicas parecem mais escuras quando em suspensão com solução alcalina, o que se atribui principalmente à ionização de grupos fenólicos ou enólicos (cromógenos) associados aos cromóforos. Os mais importantes grupos cromógenos entre os radicais das moléculas da lignina são as carbonilas conjugadas, as duplas ligações e a combinação destes (ANDRADE-MAHECHA, 2012). O tratamento alcalino provocou um inchamento das partículas, causando alterações físicas na estrutura da parede celular da fibra (VIAKARI et al., 1994). Porém, esse tratamento foi realizado em baixa concentração (KOH 5%) e por isso teve um efeito limitado sobre o inchaço das microfibrilas e, não sendo suficiente para a total remoção de hemiceluloses. Além disso, a xilana (componente principal da hemicelulose), provavelmente não está somente ligada na superfície das microfibrilas da parede celular, mas também se encontra aprisionada dentro das mesmas. Durante este pré-tratamento também são hidrolisados constituintes como amido, pectinas e frações hemicelulósicas (VIAKARI et al., 1994). O controle do pré-tratamento é essencial para a

produção de NFCs, pois concentrações muito altas de álcali podem diluir celulose de cadeia curta (alfa e gama) e, conseqüentemente, a α -celulose (HASSAN et al., 2011).

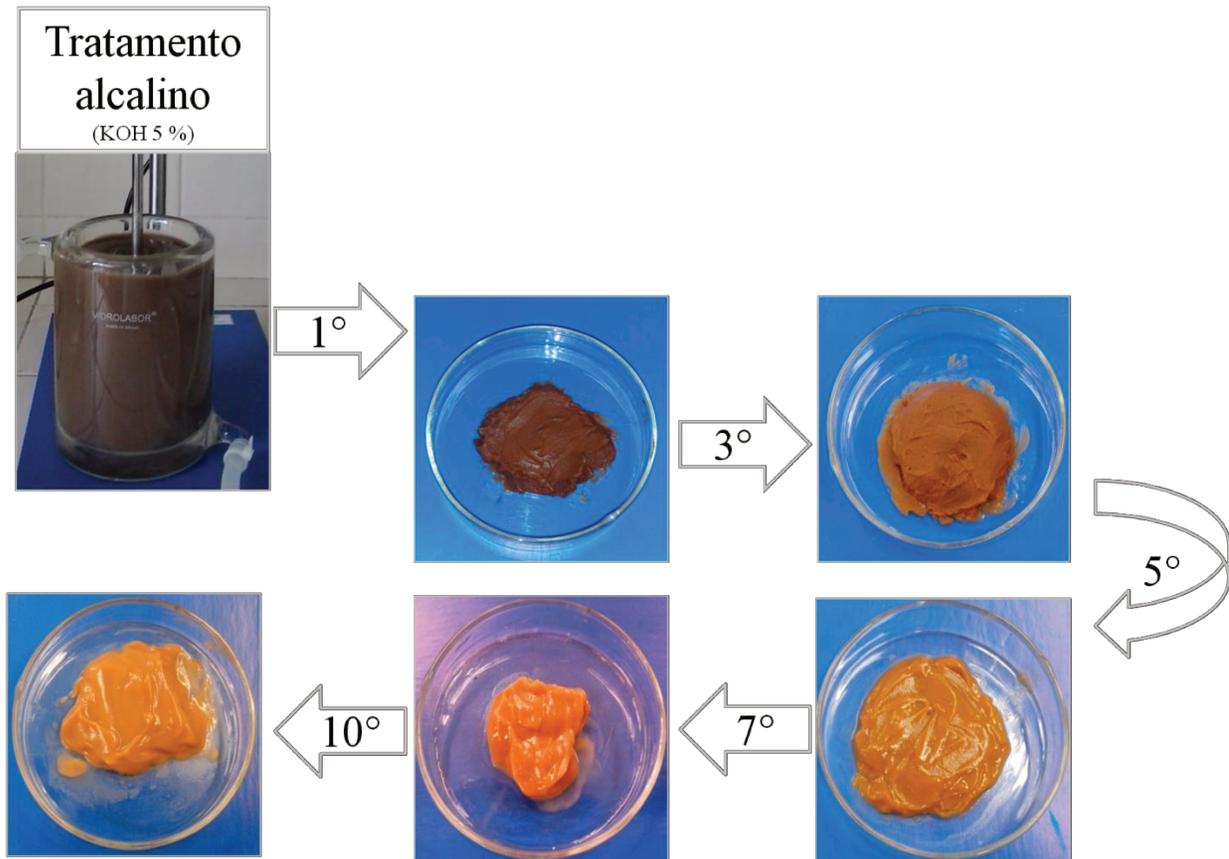


Figura 3.5 - Suspensão final após tratamento alcalino e dez lavagens com água deionizada (método 4)

O método 4 mostrou-se eficiente, além disso, segundo Ogeda & Petri (2010) é vantajoso ter uma formação mínima de inibidores de reação e necessitar de pouca energia para o processo. Durante o tratamento alcalino a lignina foi clivada e solubilizada em um licor, conforme apresentado na Figura 3.6.

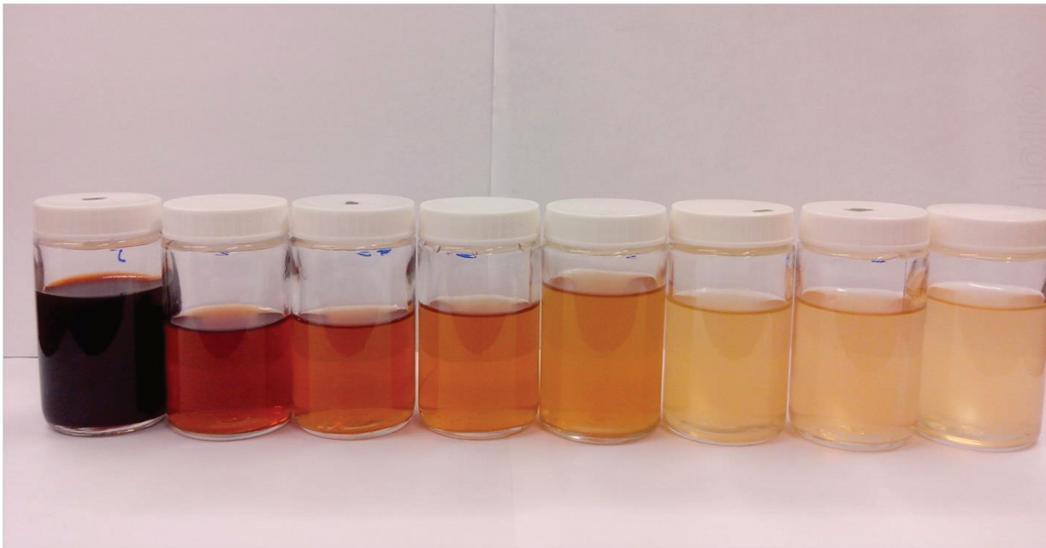


Figura 3.6 - Licor obtido após o tratamento alcalino do farelo e após as lavagens com água deionizada (esquerda para direita)

A hidrólise enzimática com xilanase foi realizada para remover as frações de hemicelulose, pois segundo Zuluaga et al (2009), açúcares não-celulósicos como xilose e manose, principais constituintes da hemicelulose, são resistentes à hidrólise com álcali devido a associação muito forte entre o xiloglicano e a celulose. Além disso, o xiloglicano provavelmente não só se liga à superfície das microfibrilas de celulose, mas também pode ser encontrado no interior delas. Xilanas, xiloglicanas, e glicomananas são todas capazes de se ligar as fibrilas de celulose de maneira idêntica à da ligação de intercadeias da própria celulose (HABIBI et al., 2010). Segundo Hassan et al. (2010), o tratamento de fibras vegetais com a enzima xilanase resulta na remoção parcial de hemiceluloses, isto porque age especificamente removendo frações de xilana, e trabalhando principalmente na solubilização de oligossacarídeos.

Finalmente após a hidrólise enzimática com celulase, a coloração foi perdendo o tom amarelo mudando para uma coloração branca (Figura 3.7). O tratamento químico e a hidrólise com xilanase facilitaram a penetração da enzima celulase às fibras de celulose, a qual é responsável pela quebra das ligações β -1,4, que unem as cadeias de glicose. Estes tratamentos concomitantes com o tratamento mecânico proporcionaram o isolamento de nanofibras de celulose.

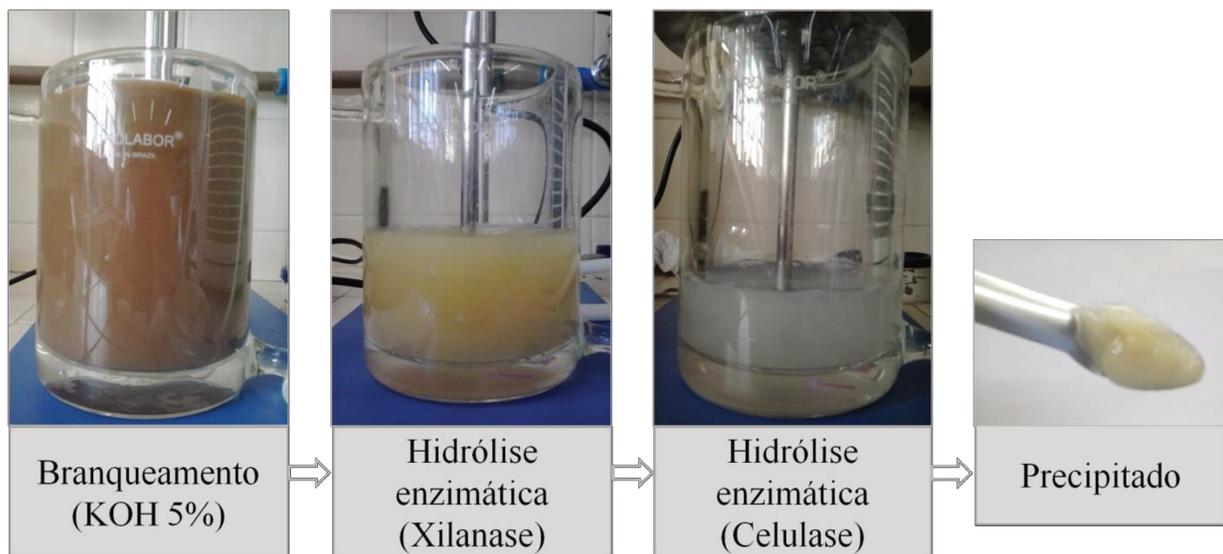


Figura 3.7 - Etapas de processo para obtenção de NFCs pelo método 4

3. 3. 1. 2 Nano e microestrutura

3. 3. 1. 2. 1 Microscopia eletrônica de transmissão (MET) e comprimento das fibras (Zetasizer)

A técnica de microscopia eletrônica de transmissão (MET) permitiu verificar se os processos realizados foram eficazes para a produção de nanofibras de celulose. A Figura 3.8 apresenta as imagens obtidas das suspensões coloidais diluídas em água deionizada. A partir desta, notou-se que somente o tratamento alcalino (N4), permitiu a obtenção de fibras de celulose em tamanho nanométrico. As NFCs obtidas por hidrólise enzimática apresentaram diâmetros variando entre 5,1 a 71,9 nm e diâmetro médio de 14,9 nm. Assim pode-se confirmar a eficiência do processo 4, visto que o diâmetro do farelo bruto, obtido no capítulo 2, foi de 22,4 μm . Os resultados obtidos são similares ao encontrado por diferentes autores, conforme apresentado na Tabela 3.2.

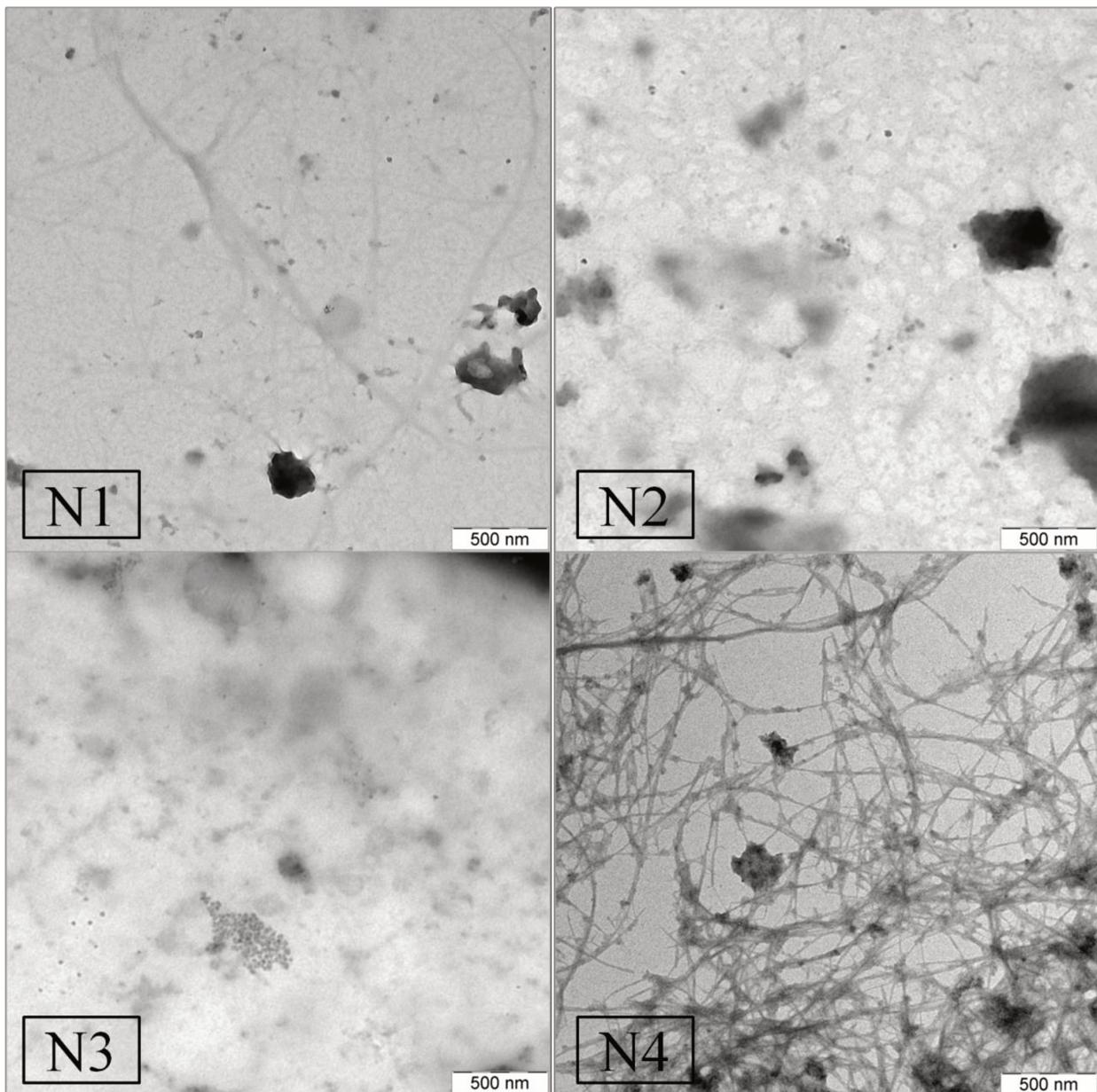


Figura 3.8 - Microscopia eletrônica de transmissão (TEM) das suspensões coloidais obtidas dos diferentes tratamentos: N1 (método 1), N2 (método 2), N3 (método 3) e N4 (método 4).

Tabela 3.2 - Diâmetros das nanofibras produzidas por diferentes autores

Autor	Substrato + tratamento	Diâmetro (nm)
Hassan et al. (2010)	Bagaço de cana-de-açúcar branqueado + hidrólise enzimática (xilanase)	9- 25
Hassan et al. (2010)	Bagaço de cana-de-açúcar branqueado + hidrólise enzimática (celulase)	9 -39
Paako et al. (2007)	Madeira macia branqueada + hidrólise enzimática (endoglucanase)	5 -6
Satyamurthy et al. (2011)	Fibra de algodão + hidrólise com HCl + hidrólise enzimática (celulase)	30-50

As imagens de MET sugerem que os compostos amorfos foram removidos após os tratamentos realizados na amostra N4 (alcalino, enzimático e mecânico), e também revelam que as NFCs possuem uma estrutura de rede, exibindo longos filamentos celulósicos emaranhados. A homogeneização a alta pressão melhorou a eficiência de isolamento de NFCs e assegurou um nível aceitável de dispersão da suspensão coloidal. De acordo com Pakko et al. (2007), a hidrólise enzimática usada em combinação com tratamento mecânico promove a delaminação da parede da fibra vegetal, facilitando a desintegração das fibras de celulose em tamanho nanométrico.

A Figura 3.9 ilustra a distribuição do comprimento das nanopartículas de fibras de celulose obtidas pelo método 4. A amostra apresentou uma distribuição modal e pode-se notar que o comprimento é predominante na faixa entre 5000 e 9000 nm, sendo o comprimento médio das nanofibras de 5750 nm. O valor encontrado na relação de aspecto (352,82) situa-se no intervalo ideal para utilização como agente de reforço em compósitos. De acordo com Hongming et al. (2003), para um reforço significativo em compósitos, as nanofibras devem estar idealmente orientadas e, para isso, as NFCs devem apresentar razão de aspecto maior que 100.

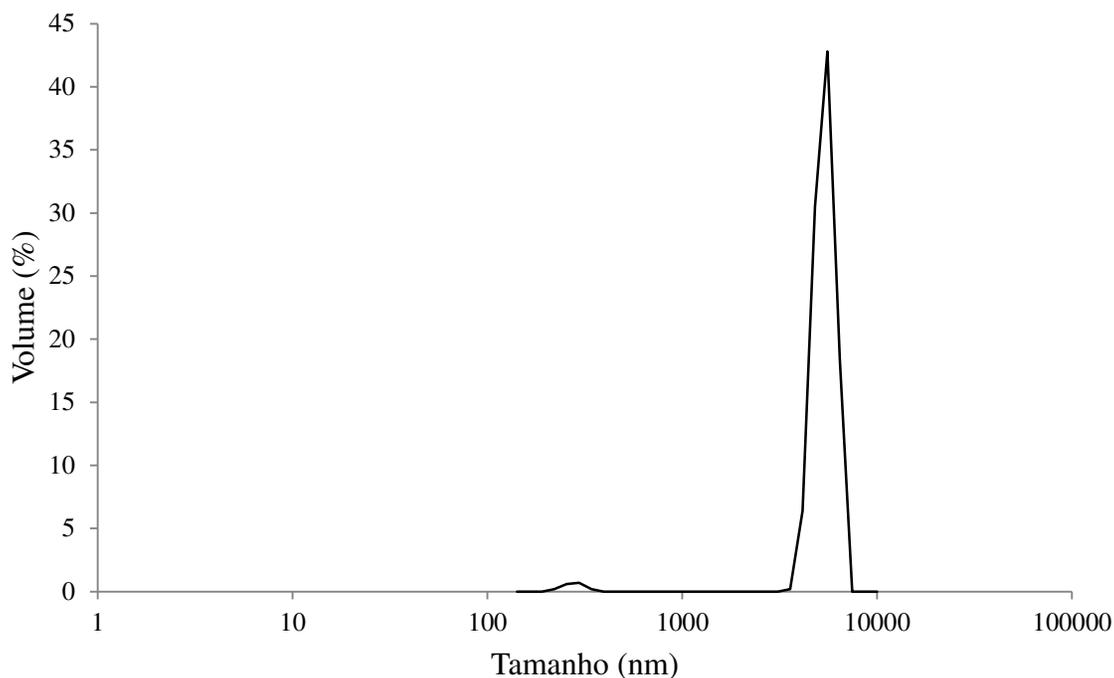


Figura 3.9 - Distribuição do tamanho (comprimento) das nanofibras de celulose obtidas pelo método 4

Através da Figura 3.8, observa-se que a amostra N1 (apenas hidrólise enzimática) aparenta ter algumas nanofibras, porém em pouquíssima quantidade. Além disso, muitas partículas escuras foram encontradas para esta amostra, bem como para a amostra N2 e N3. Isto pode ser um indício de que os tratamentos realizados (N1, N2 e N3) não foram eficazes na remoção das frações lignocelulósicas da fibra vegetal e, desta forma, a enzima celulase não foi capaz de atuar nas cadeias de celulose, não ocorrendo o isolamento de partículas de celulose em tamanho nanométrico. Também podem corresponder a traços de minerais remanescentes da etapa de deslignificação. Diante disso, essas referidas amostras foram analisadas por microscopia óptica para visualizar a microestrutura das fibras obtidas por tais processos. A Figura 3.10 apresenta as imagens das microestruturas das fibras vegetais tratadas pelos métodos 1, 2 e 3. A partir das imagens obtidas, nota-se que estes métodos não foram eficazes na produção de nanofibras de celulose, mas sim para produção de micropartículas. As partículas de formato redondo e escuras evidenciam que os pré-tratamentos realizados não foram suficientes para remover a lignina, prejudicando a ação da enzima xilanase e, conseqüentemente, da enzima celulase. Foram realizadas medidas do diâmetro das fibras através das imagens e, constatou-se valores entre 1,4 e 4,6 μm .

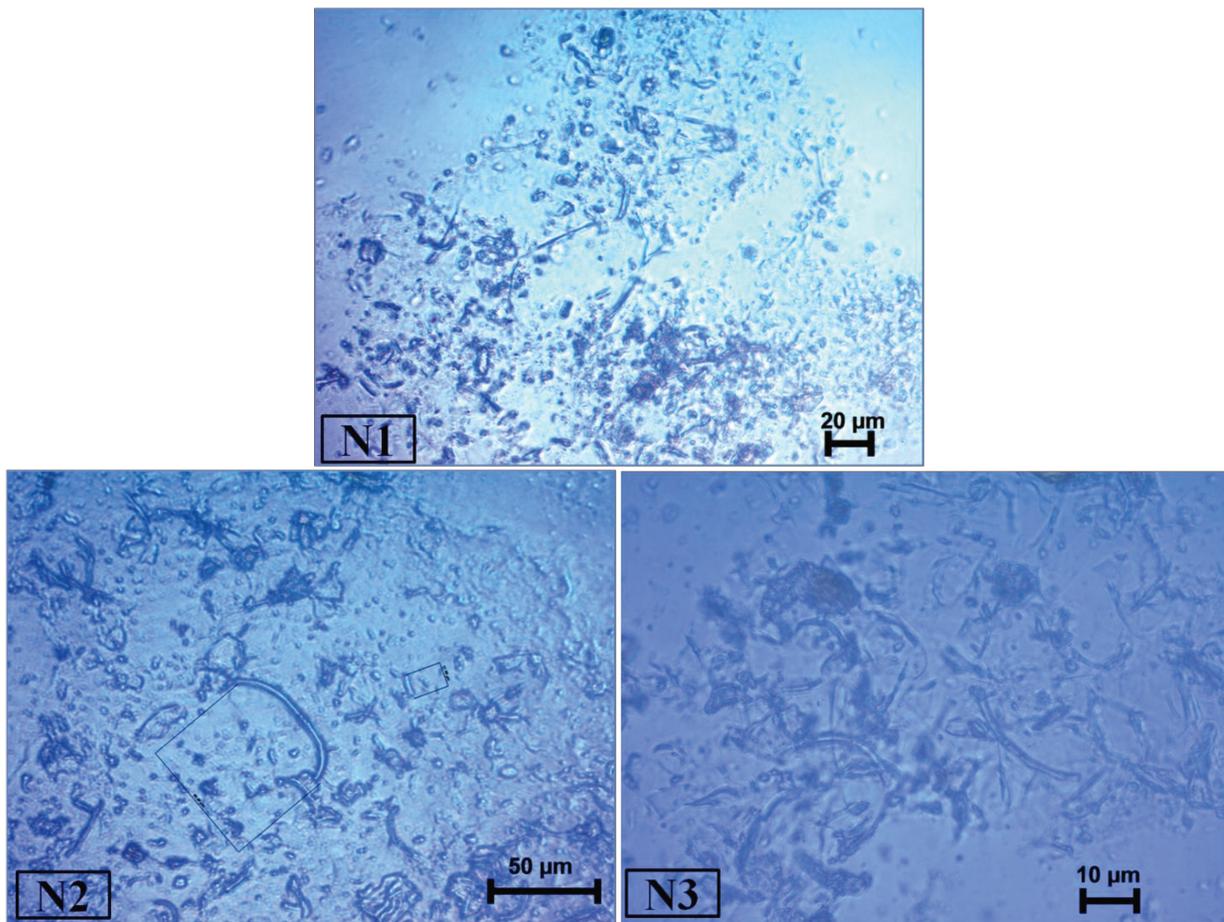


Figura 3.10 - Imagens da microscopia óptica das microfibras de celulose obtidas pelos diferentes tratamentos: N1 (método 1), N2 (método 2), N3 (método 3).

3. 3. 1. 3 Potencial zeta

O potencial zeta (PZ) é uma medida das interações elétricas entre as partículas, ou seja, pode ser referido como a estabilidade de uma suspensão coloidal. Na produção de nanofibras de celulose busca-se maximizar as forças repulsivas entre elas, a fim de evitar agregados que comprometem sua capacidade como agente de reforço em matrizes poliméricas (RÉFEGA, 2010). De acordo com Tholstrup Sejersen et al. (2007), para partículas pequenas (nm) é necessário que o valor de PZ seja alto, pois este irá conferir estabilidade, ou seja, a suspensão coloidal resistirá à agregação e aumentará o grau de dispersão em compósitos.

A suspensão de nanofibras de celulose (N4), apresentou um valor de potencial zeta alto e negativo ($-38,6 \pm 0,7$). As fibras de celulose, geralmente, possuem carga negativa quando em suspensão aquosa devido à presença e à ionização de grupos ácidos característicos das hemiceluloses e da lignina, tais como carboxílicos, ácido sulfônico, fenólicos e grupos hidroxila (CHEN et al., 2004). No entanto, a carga das fibras também depende da sua origem, do tipo de branqueamento da polpa e do tratamento mecânico. No processo de branqueamento pelo método alcalino, a carga superficial das fibras normalmente diminui devido à dissolução e remoção de polissacarídeos ácidos, particularmente xilanas (da hemicelulose) e lignina degradada. O agente alcalino reage com a lignina residual de diferentes formas, influenciando no número de grupos ácidos carregados negativamente (BHARDWAJ et al., 2004).

O tratamento mecânico, última etapa do processo, pode influenciar na estabilidade da suspensão coloidal. De acordo com Andrade-Mahecha (2012), o tratamento mecânico (homogeneização a alta pressão) maximiza as forças repulsivas entre as nanofibras e, em consequência, a suspensão aquosa de nanofibras torna-se um sistema mais estável.

3.4 CONCLUSÃO

As metodologias realizadas no presente capítulo foram avaliadas quanto sua eficiência na produção de nanofibras de celulose a partir de farelo da casca de banana. O pré-tratamento do substrato é uma das etapas mais importantes para iniciar o processo, visto que consiste na remoção das frações lignocelulósicas da estrutura fibrilar. Desta forma, a escolha do agente químico para realizar o branqueamento (deslignificação) torna-se essencial, pois a eficiência da hidrólise vai depender de quão isolada estão às cadeias de celulose.

As imagens de MET confirmaram a presença de partículas nanométricas na suspensão coloidal obtida após tratamento alcalino (KOH 5%), hidrólise enzimática com xilanase e celulase e tratamento mecânico, sendo que este último promoveu a desintegração das fibras. Para as amostras sem tratamento químico do farelo e com tratamento com clorito de sódio (NaClO_2) foi possível observar a presença de micropartículas de celulose, ou seja, as enzimas encontraram dificuldade no acesso às fibras de celulose.

Dentre as metodologias testadas, o método 4 mostrou-se mais eficiente na produção de nanofibras de celulose, quais foram isoladas com sucesso a partir da casca de banana. Isto estimula o uso da casca de banana verde, resíduo agroindustrial e renovável, que pode ser considerado uma fonte de celulose promissora para produção de nanopartículas.

Capítulo 4 Estudo das condições de hidrólise enzimática com xilanase

O farelo previamente tratado com agente alcalino (FTA) foi submetido à hidrólise com enzima xilanase. Diante da necessidade de se obter as melhores condições de processo, os experimentos foram realizados empregando-se um planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} com três pontos centrais. Os fatores de estudo foram: temperatura, pH, concentração de enzima e concentração de substrato. As nanofibras de celulose foram caracterizadas quanto ao diâmetro, distribuição do comprimento, potencial zeta, análise de grupos funcionais por FTIR, cristalinidade por difração de raios-X (DRX) e característica morfológica por microscopia eletrônica de transmissão (MET). As imagens MET confirmaram que o tratamento com a enzima xilanase foi eficaz no isolamento de fibras de celulose em escala nanométrica. As NFCs apresentaram diâmetro médio de 8,8 nm e comprimento variando entre 615,0 e 3633,3 nm. Em água neutra, as suspensões de nanofibras apresentaram potencial zeta alto e negativo, na faixa de -22,8 e -29,5, o que minimiza as interações que levam à formação de agregados de nanofibras, colaborando para a formação de uma suspensão coloidal mais estável. A análise estatística (ANOVA) mostrou que apenas temperatura foi significativa sobre o potencial zeta, enquanto que para o comprimento nenhuma condição foi significativa nos níveis de estudo, considerando um nível de significância de 5 %. O FTIR e o DRX confirmaram que houve remoção parcial da lignina na etapa de branqueamento e que a hidrólise enzimática, além de isolar as NFCs, removeu frações de hemicelulose. As nanofibras de celulose isoladas da casca de banana foram obtidas com sucesso por hidrólise enzimática com xilanase, demonstrando que é desnecessária a realização de mais uma etapa para o processo, como o uso de enzima celulase e tratamento mecânico.

4.1 INTRODUÇÃO

O isolamento das nanofibras de celulose envolve uma série de processos, podendo ser extraídas por diferentes formas, todas as quais conduzem a distintos tipos de materiais fibrilar, dependendo da matéria-prima (celulose), pré-tratamento e desintegração (CHEN, 2011). Novas técnicas de processamento estão sendo desenvolvidas e, a hidrólise

enzimática apesar de ser recentemente estudada, tem apresentado potencial aplicação. Além de ser ambientalmente amigável, suas condições brandas de processo a tornam atrativamente econômica (PÄÄKKO et al., 2007). Neste processo de hidrólise as enzimas xilanases são comumente usadas. A ação inicial destas é na hidrólise catalítica das frações hemicelulósicas presente na fibra vegetal. Após, atacam as ligações glicosídicas β -1,4 localizadas entre as unidades de glicose que formam a celulose, causando uma clivagem hidrolítica das mesmas.

A eficiência da hidrólise enzimática depende de vários fatores, tais como o tempo de hidrólise (h), concentração de substrato (%), concentração de enzima (U/g), pH e temperatura. Diante disto, é essencial o estudo das melhores condições de atuação enzimática (MEYABADI e DADASHIAN, 2012).

A fim de investigar o potencial uso do método enzimático para produção de nanofibras de celulose, para posterior uso como agente de reforço, foi realizado um estudo sobre a influência de parâmetros como pH, temperatura, concentração de enzima e concentração de substrato. Neste contexto, buscou-se produzir nanofibras de celulose (NFCs) por hidrólise enzimática com xilanase através de um planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} com três pontos centrais, a partir da casca de banana da variedade “Terra” (*Musa paradisiaca*).

4. 2 MATERIAL E MÉTODOS

4. 2. 1 Produção de nanofibras

O farelo foi submetido a um pré-tratamento, para remoção das frações amorfas (hemicelulose e lignina). Foi tratado com solução alcalina de KOH 5 % na proporção de 1:20 (farelo:solução), sob agitação vigorosa por 14 h, em temperatura ambiente. Após, o substrato foi submetido a lavagens sucessivas com água deionizada e centrifugado (10.000 rpm, 5 °C, 15 min).

A hidrólise enzimática foi realizada conforme o método adaptado por Pääkko et al. (2007). Este tratamento foi conduzido utilizando a enzima xilanase, a qual tem capacidade de remover frações hemicelulósicas presentes na fibra vegetal. Os experimentos foram

realizados empregando-se um planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} com três pontos centrais, conforme matriz de experimentos mostrada na Tabela 4.1. Os fatores avaliados foram: temperatura, pH, concentração de enzima [E] e concentração de substrato [S]. As variáveis de resposta do planejamento experimental foram escolhidas com base na literatura que evidencia estes como os parâmetros mais importantes para a eficiência da hidrólise enzimática (MEYABADI e DADASHIAN, 2012).

Os níveis de estudo para cada fator foram estabelecidos de acordo com os resultados dos ensaios preliminares (método 4, capítulo 3) e, estão apresentados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 - Matriz de experimentos do Planejamento Fatorial Fracionado 2^{4-1} resolução IV, com três pontos centrais

Experimento	(X ₁) [*]	(X ₂) ^{**}	(X ₃) ^{***}	(X ₄) ^{****}
N1	-1 (35)	-1 (4,0)	-1 (30)	-1 (15)
N2	+1 (55)	-1 (4,0)	-1 (30)	+1 (35)
N3	-1 (35)	+1 (6,0)	-1 (30)	+1 (35)
N4	+1 (55)	+1 (6,0)	-1 (30)	-1 (15)
N5	-1 (35)	-1 (4,0)	+1 (70)	+1 (35)
N6	+1 (55)	-1 (4,0)	+1 (70)	-1 (15)
N7	-1 (35)	+1 (6,0)	+1 (70)	-1 (15)
N8	+1 (55)	+1 (6,0)	+1 (70)	+1 (35)
N9	0 (45)	0 (5,0)	0 (50)	0 (25)
N10	0 (45)	0 (5,0)	0 (50)	0 (25)
N11	0 (45)	0 (5,0)	0 (50)	0 (25)

*X1: Temperatura (°C); **X2: pH; ***X3: [E] (U/g), sendo U definido como quantidade de xilose liberada por minuto por mL de enzima; **** X4: [S] (%)

A hidrólise foi conduzida em erlenmeyers de 250 mL contendo o substrato (concentração do experimento), adicionado de 50 mL de tampão acetato 0,1 M (pH do experimento). Os erlenmeyers contendo as soluções foram levados ao shaker termostatizado (temperatura do experimento) por 10 min, para a adaptação do meio. Após,

adicionou-se à mistura a enzima xilanase (concentração do experimento), permanecendo na temperatura em estudo, sob agitação (150 rpm), por 24 h. As suspensões foram colocadas em banho termostaticado na temperatura de 80 °C, para ocorrer a desnaturação da enzima, permanecendo nesta condição por 30 min e então, foram centrifugadas (10.000 rpm, 5 °C, 15 min) e lavadas sucessivamente com água deionizada. Ao final destes processos obteve-se uma suspensão coloidal de NFCs que foi mantida sob refrigeração (4°C) em água neutra.

4. 2. 2 Caracterização da suspensão obtida após pré-tratamento e das NFCs

A suspensão tratada quimicamente com álcali e as nanofibras de celulose da casca de banana (*M. Paradisiaca*) foram caracterizadas quanto ao comprimento, carga superficial (potencial zeta), índice de cristalinidade e grupos funcionais. Para as análises de DRX e FTIR, uma quantidade de suspensão para cada amostra foi seca em liofilizador (Virtid Freezemobile 25EL, USA). O material liofilizado foi armazenado em frascos de vidro hermeticamente fechados. As NFCs também foram analisadas quanto à morfologia e diâmetro por imagens obtidas da análise MET.

4. 2. 2. 1 Morfologia e Diâmetro das nanofibras

A visualização da estrutura e determinação do diâmetro das nanofibras foi realizada pela técnica MET. Cada suspensão de nanofibras foi colocada em ultrassom por 5 minutos para desaglomeração das fibras. Após, 3 µL da suspensão foi depositada em uma micrograde de carbono e parlódio (300 mesh), deixando em repouso por 60 s, então lavou-se duas vezes a grade com 3 µL de água deionizada. Por fim, 3 µL de acetato de uranila 2% foi depositado na micrograde para a amostra não degradar e para maior contraste na análise das imagens. Estas foram obtidas em um microscópio de transmissão TEM-MS (marca: JEOL 2100) com canhão de elétrons de LaB6, empregando uma tensão de aceleração de 200 kV. A morfologia e diâmetro das nanofibras foram determinados por um processo de análise das imagens obtidas por MET, usando o software ImageJ. As análises foram realizada no Laboratório de Microscopia Eletrônica (LME) do Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano).

4. 2. 2. 2 Concentração das suspensões de nanofibras

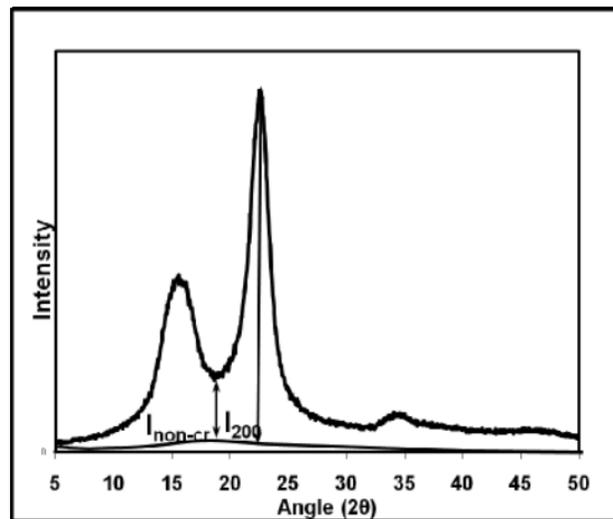
A concentração de nanofibras de celulose de cada experimento foi realizada submetendo as suspensões à secagem. Placas de petri foram previamente secas e taradas (105 °C, 1 h), nas quais se adicionou 2 mL de suspensão (homogeneizada em agitador mecânico). As placas foram levadas à estufa na temperatura de 105 °C por 24 h e pesadas. O cálculo de concentração foi realizado pela diferença entre massa inicial e massa final de amostra na placa.

4. 2. 2. 3 Análise dos grupos funcionais por FTIR

A análise de grupos funcionais presentes na suspensão pré-tratada e das NFCs foi realizada por FTIR conforme descrito no item 2. 2. 2. 4 do capítulo 2 (VICENTINI et al., 2005), utilizando um espectrofotômetro infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). As amostras foram analisadas comparando os espectros de infravermelho do farelo não tratado (FNT) e do farelo com tratamento alcalino (FTA), apresentados na Figura 4.5 e, das nanofibras de celulose (NFCs) apresentados na Figura 4.6 (N1, N2, N3, N4 e N5) e na Figura 4.7 (N6, N7, N8, N9, N10, N11). Verificaram-se os grupos funcionais presentes na composição de cada amostra.

4. 2. 2. 4 Índice de cristalinidade

A determinação da cristalinidade das amostras foi feita por difração de raios-X (DRX). A metodologia seguida foi proposta por Van Soest et al. (1996) conforme descrito no item 2. 2. 2. 5 do capítulo 2. O índice de cristalinidade (I_{cr} , %) das NFCs foi calculado empregando a equação 4.1, seguindo o método proposto por Segal et al (1959). Nesse método, o I_{cr} foi calculado a partir da razão de alturas entre a máxima intensidade do pico cristalino (I_{200}) e a intensidade de difração do material não cristalino (I_{non-cr}), como pode ser observado na Figura 4.1.



Fonte: (TERINTE et al., 2011)

Figura 4.1 - Espectro de difração de DRX de uma amostra de celulose I, ilustrando o método da altura de pico

$$I_{Cr} = \frac{I_{200} - I_{non-cr}}{I_{200}} \cdot 100 \quad (4.1)$$

Onde:

I_{200} = Máximo valor de intensidade do pico cristalino, localizado em 2θ entre 22-24°

I_{non-cr} = Valor de intensidade que separa os dois picos de difração localizada em 2θ , 18°.

Representa o material não-cristalino.

4. 2. 2. 5 Potencial zeta e determinação do comprimento dos filamentos celulósicos

A carga superficial (PZ) e o comprimento das nanofibras, em suspensão aquosa neutra, foram analisados por um Zetasizer (Malvern Instruments, Ltda., U.K). Para cada tipo de nanofibra foram obtidas seis medidas do comprimento e seis medidas do potencial zeta, as quais foram realizadas à temperatura ambiente (25 °C).

4. 2. 2. 6 Determinação de açúcares redutores totais (DNS)

Ao final da hidrólise enzimática, uma alíquota do sobrenadante separado do material hidrolisado, foi coletada para análise de produção de açúcares redutores totais, durante a

reação hidrolítica. Os ensaios foram realizados em triplicata e, o procedimento foi adaptado do método proposto por Ghose (1987), através do método ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). A leitura da absorbância das amostras foi realizada em espectrofotômetro a 546 nm (MILLER, 1959).

4. 2. 2. 7 Análise estatística

Os resultados de diâmetro, comprimento, relação de aspecto, potencial zeta e índice de cristalinidade das NFCs obtidas no planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} foram analisados através de Análise de Variância (ANOVA), bem como a concentração de açúcar redutor formado. Por se tratar de um sistema biológico, processo utilizando enzima, e também por ter sido realizado um planejamento fracionado, há a possibilidade de existir um erro maior embutido nos resultados. Assim, a análise estatística dos resultados foi realizada com um intervalo de confiança de 90%, ou seja, foi considerado um nível de significância de 10%.

4. 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. 3. 1 Caracterização da suspensão obtida após pré-tratamento e das NFCs

Após a realização do pré-tratamento do farelo, foi obtido um rendimento de 13% de amostra tratada em relação à quantidade inicial de amostra.

4. 3. 1. 1 *Morfologia, tamanho, potencial zeta*

A distribuição de tamanho (comprimento) dos filamentos celulósicos obtidos após o pré-tratamento do farelo da casca de banana, está apresentada na Figura 4.2. Observa-se que a distribuição está mais concentrada na faixa entre 5000 e 7000 nm, apresentando um comprimento médio de 6588 nm.

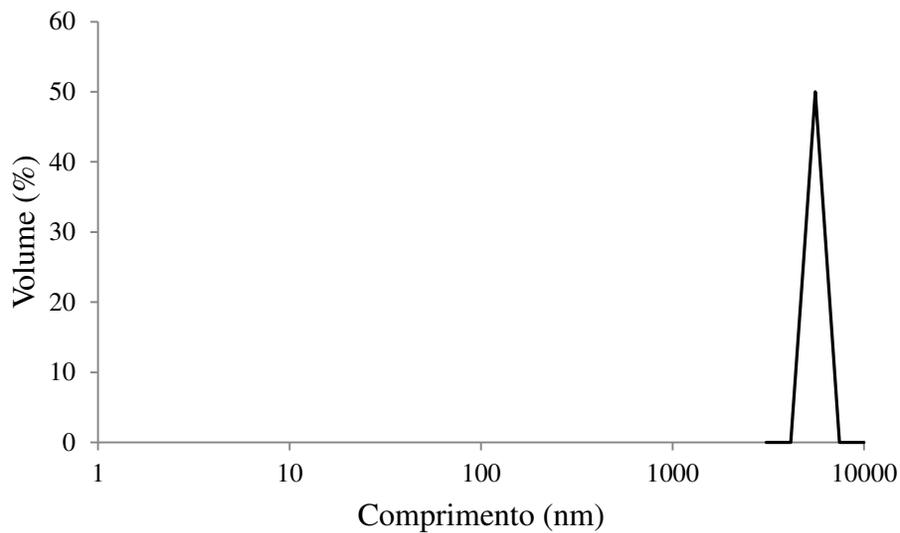


Figura 4.2 - Distribuição do tamanho dos filamentos celulósicos após tratamento alcalino

A Análise MET confirmou a presença de nanofibras de celulose nas 11 suspensões obtidas. As Figuras 4.3 e 4.4 apresentam as estruturas das amostras de NFCs obtidas a partir do planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} . As imagens mostram que as estruturas das nanofibras de celulose (N6, N8 e pontos centrais) são muito semelhantes, exibindo filamentos celulósicos longos e emaranhados, de maneira a formar uma rede. Para as demais amostras (N1, N2, N3, N4, N5), nota-se que há presenças de NFCs, porém em menor quantidade e mais dispersas entre si, não sendo possível a formação de uma rede. As imagens de todas as amostras sugerem que as frações amorfas foram removidas após o tratamento químico (lignina) e hidrólise enzimática com xilanase (hemicelulose).

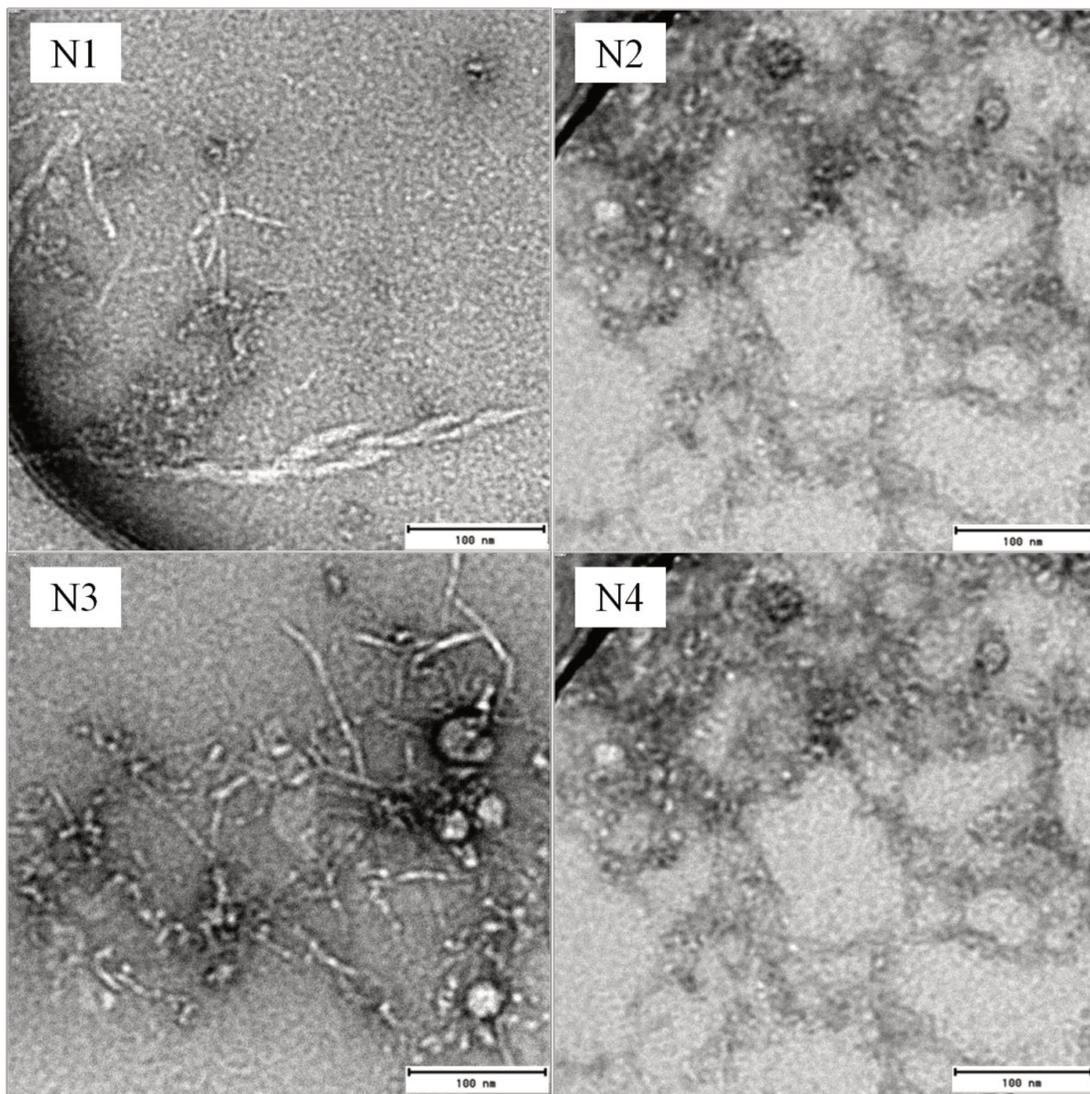


Figura 4.3 - Imagens TEM obtidas para as amostras de NFCs: N1 (T= 35 °C, pH 4,0, [E] 30 U/g e [S] 15 %), N2 (T= 55 °C, pH 4,0, [E] 30 U/g e [S] 35 %), N3 (T= 35 °C, pH 6,0, [E] 30 U/g e [S] 35 %), N4 (T= 55 °C, pH 6,0, [E] 30 U/g e [S] 15 %), sendo U definido como 1 μ mol de xilose liberada por minuto por mL de enzima (1000x, escala = 100 nm).

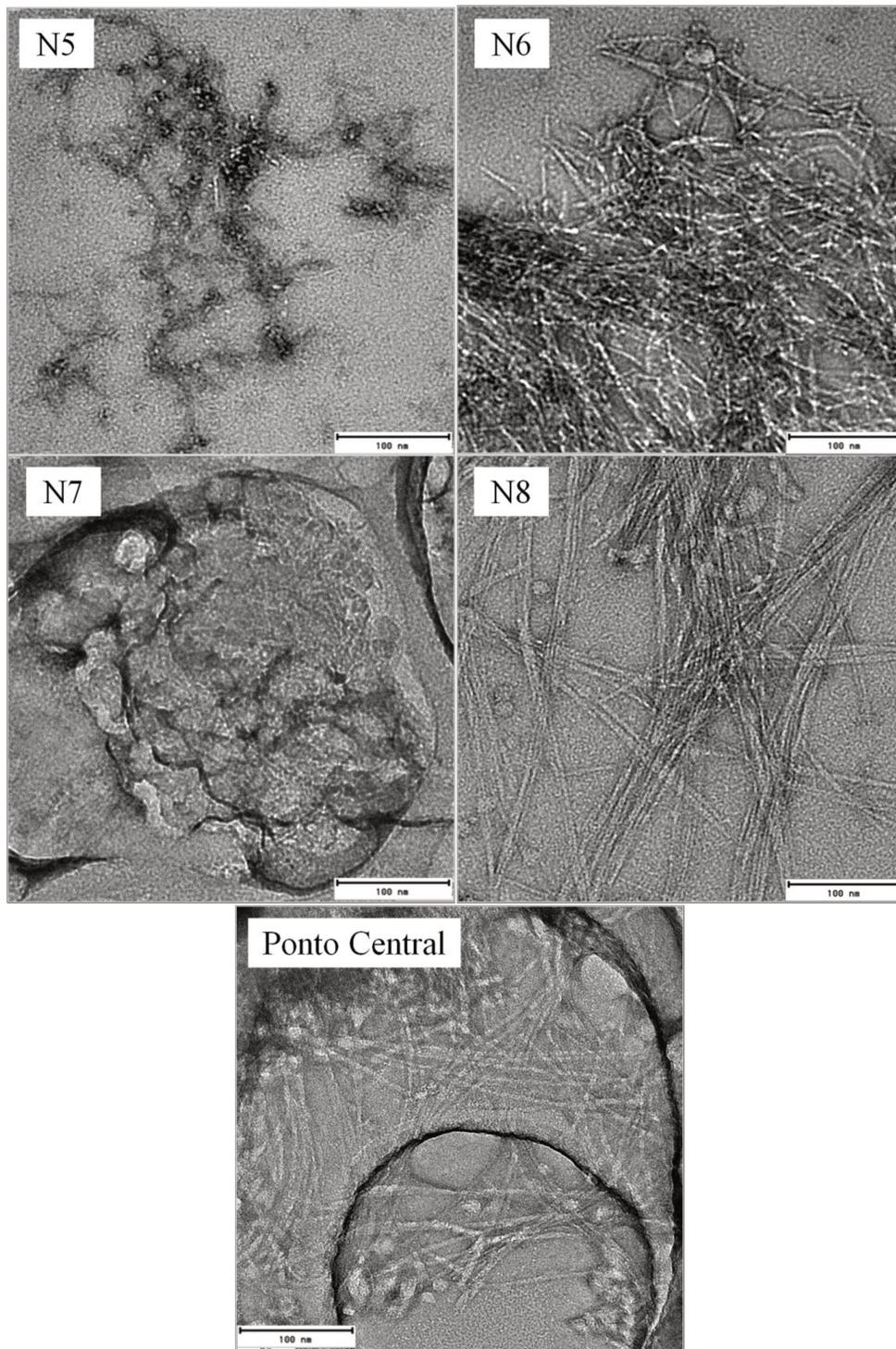


Figura 4.4 - Imagens TEM obtidas para as amostras de NFCs: N5 (T= 35 °C, pH 4,0, [E] 70 U/g e [S] 35 %), N6 (T= 55 °C, pH 4,0, [E] 70 U/g e [S] 15 %), N7 (T= 35 °C, pH 6,0, [E] 70 U/g e [S] 15 %), N8 (T= 55 °C, pH 6,0, [E] 70 U/g e [S] 35 %), PC (T= 45 °C, pH 5,0, [E] 50 U/g e [S] 25 %), sendo U definido como 1 μmol de xilose liberada por minuto por mL de enzima (1000x, escala = 100 nm).

A dimensão das NFCs foi caracterizada quanto ao diâmetro (D), comprimento (L) e relação de aspecto (L/D). A Tabela 4.2 apresenta os tamanhos, potencial zeta e concentração das nanofibras obtidas de cada experimento do planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} .

Em geral as NFCs obtidas por hidrólise enzimática apresentaram diâmetro médio de 8,8 nm, comprimento entre 615, 0 e 3633,3 nm, relação de aspecto entre 80,9 e 294,3 e potencial zeta entre -21,2 e -29,5 mV. Os resultados obtidos estão em um intervalo considerado ideal para utilização como agente de reforço em compósitos. Os dados são similares aos encontrados para outras nanofibras de celulose obtidas por hidrólise enzimática, de fontes como madeira macia, bagaço e algodão (PÄÄKKO et al., 2007; HASSAN et al., 2011; SATYAMURTHY et al., 2011). Os cálculos de concentrações foram realizados baseados a partir do farelo tratado com solução alcalina (g/gfarelotratado).

Tabela 4.2 - Tamanhos, potencial zeta e concentração das NFCs produzidas através do planejamento fatorial fracionado 2^{4-1}

Experimento	(X ₁) [*]	(X ₂) ^{**}	(X ₃) ^{***}	(X ₄) ^{****}	Diâmetro (nm) (d)	Comprimento (nm)	Relação de aspecto (C/d)	Potencial zeta (mV)	Concentração (g/g farelosecotratado)
N1	-1 (35)	-1 (4,0)	-1 (30)	-1 (15)	11,2	3091,3	276,6	-29,5	0,60
N2	+1 (55)	-1 (4,0)	-1 (30)	+1 (35)	15,8	1620,0	102,8	-21,2	0,94
N3	-1 (35)	+1 (6,0)	-1 (30)	+1 (35)	9,4	904,6	96,6	-27,2	0,93
N4	+1 (55)	+1 (6,0)	-1 (30)	-1 (15)	7,4	615,0	82,7	-25,5	0,92
N5	-1 (35)	-1 (4,0)	+1 (70)	+1 (35)	13,9	1124,7	80,9	-26,8	0,67
N6	+1 (55)	-1 (4,0)	+1 (70)	-1 (15)	6,5	1838,3	282,5	-26,5	0,83
N7	-1 (35)	+1 (6,0)	+1 (70)	-1 (15)	5,2	1820,3	350,1	-27,0	0,83
N8	+1 (55)	+1 (6,0)	+1 (70)	+1 (35)	5,2	3633,3	698,7	-22,8	0,91
N9	0 (45)	0 (5,0)	0 (50)	0 (25)	7,6	2192,0	288,4	-28,4	0,85
N10	0 (45)	0 (5,0)	0 (50)	0 (25)	7,6	2243,6	295,2	-26,7	0,97
N11	0 (45)	0 (5,0)	0 (50)	0 (25)	7,6	2689,7	353,9	-25,7	0,90

*X₁: Temperatura (°C); **X₂: pH; ***X₃: [E] (U/g), sendo U definido como quantidade de xilose liberada por minuto por mL de enzima; **** X₄: [S] (%)

A partir dos resultados obtidos, é evidente que após a hidrólise enzimática os filamentos celulósicos foram atacados e quebrados, de modo que o comprimento das fibras foi reduzido, no mínimo, pela metade. O maior valor de comprimento foi obtido na nanofibra N8 (3633,3 nm), para a qual foram avaliadas todas as condições de processo nos níveis superiores de estudo. Desta forma, observou-se que a enzima teve sua ação minimizada nestes níveis extremos, sendo um resultado satisfatório em virtude de que se procura obter nanofibras com maior comprimento e menor diâmetro para alcançar uma faixa de relação de aspecto ideal. Entretanto, os menores valores de comprimento foram apresentados pelas nanofibras N3 (904,6 nm) e N4 (615,0 nm), para as quais o fator concentração de enzima está no nível inferior de estudo, ou seja, além de individualizar as nanofibras, na menor concentração a enzima tem maior atuação e levou à maior quebra das mesmas.

A análise estatística apresentada na Tabela 4.3 mostra que os fatores nos níveis de estudo do planejamento fracionado, não exercem influência significativa sobre a variável resposta comprimento das NFCs, considerando um nível de significância de 10% ($p < 0,1$).

Tabela 4.3 - Análise de variância e efeitos estimados das variáveis pH, temperatura, concentração de enzima e substrato sobre o comprimento dos filamentos celulósicos nos experimentos do Planejamento Fracionado 2^{4-1} , com três pontos centrais

Fonte de variação	Efeito	Nível de significância (p)
Interação	1944,7	0,001
T	191,4	0,825
pH	-175,3	0,839
[E]	546,5	0,534
[S]	-20,6	0,981

As distribuições de comprimento em volume das NFCs estão apresentadas no Apêndice 1. Observa-se que as amostras N1, N2 e pontos centrais (N9, N10 e N11) apresentam uma distribuição bimodal, com dois tamanhos distintos de partículas. Enquanto

que as amostras N3, N4, N5, N6 e N7 apresentaram distribuição monomodal. A amostra N8 apresentou 4 picos distintos, sendo que o pico no qual se situou o maior volume de partículas (12,5%) corresponde ao comprimento de 955,4 nm. A Tabela 4.4 apresenta os valores dos picos nos quais se situaram os maiores volumes de partículas, bem como os tamanhos correspondentes do comprimento das NFCs.

Tabela 4.4 - Valores da distribuição de comprimento em volume das nanofibras de celulose

Experimento	(X ₁) [*]	(X ₂) ^{**}	(X ₃) ^{***}	(X ₄) ^{****}	Volume (%)				Comprimento (nm)			
					Pico 1	Pico 2	Pico 3	Pico 4	Pico 1	Pico 2	Pico 3	Pico 4
N1	-1 (35)	-1 (4,0)	-1 (30)	-1 (15)	22,3	11,0	-	-	1990	4801,0	-	-
N2	+1 (55)	-1 (4,0)	-1 (30)	+1 (35)	22,6	9,8	-	-	712,4	1484,0	-	-
N3	-1 (35)	+1 (6,0)	-1 (30)	+1 (35)	23,2	-	-	-	825,0	-	-	-
N4	+1 (55)	+1 (6,0)	-1 (30)	-1 (15)	21,5	-	-	-	712,4	-	-	-
N5	-1 (35)	-1 (4,0)	+1 (70)	+1 (35)	21,1	-	-	-	955,4	-	-	-
N6	+1 (55)	-1 (4,0)	+1 (70)	-1 (15)	35,4	-	-	-	1484,0	-	-	-
N7	-1 (35)	+1 (6,0)	+1 (70)	-1 (15)	34,8	-	-	-	1484,0	-	-	-
N8	+1 (55)	+1 (6,0)	+1 (70)	+1 (35)	0,8	12,5	11,5	9,8	295,3	955,4	1484	5560
N9	0 (45)	0 (5,0)	0 (50)	0 (25)	11,5	19,3	-	-	955,4	1990	-	-
N10	0 (45)	0 (5,0)	0 (50)	0 (25)	23,5	9,5	-	-	1484,0	2669,0	-	-
N11	0 (45)	0 (5,0)	0 (50)	0 (25)	12,9	18,7	-	-	955,4	1990	-	-

Conforme citado por vários autores, a relação de aspecto das nanofibras de celulose tem um papel importante no seu desempenho como agente de reforço em matrizes poliméricas. Quando calculada a relação de aspecto (C/d), evidenciou-se que o maior valor foi no experimento N8 (698,7), como consequência do maior comprimento apresentado por estas. A alta relação de aspecto favorece a transferência de tensão na interface nanofibra-matriz (CHEN, 2011; GEORGE et al., 2011). A Tabela 4.5 apresenta a análise estatística mostrando que os fatores nos níveis de estudo do planejamento fracionado, não exercem influência significativa sobre a variável resposta relação de aspecto das NFCs, considerando um nível de significância de 10% ($p < 0,1$).

Tabela 4.5 - Análise de variância e efeitos estimados das variáveis pH, temperatura, concentração de enzima e substrato sobre a relação de aspecto nos experimentos do Planejamento Fracionado 2^{4-1} , com três pontos centrais

Fonte de variação	Efeito	Nível de significância (p)
Interação	259,72	0,003
T	88,72	0,513
pH	121,00	0,379
[E]	213,05	0,146
[S]	-5,1	0,969

O desempenho da nanofibra como reforço também está associado a outras características como sua carga superficial (potencial zeta). A suspensão após tratamento alcalino do farelo exibiu valor de carga superficial alta e negativa (-37,7), em água neutra. Este é um resultado satisfatório, visto que quanto maior o potencial zeta, mais estável é a suspensão coloidal e, conseqüentemente, não formará agregados de fibrilas (RÉFEGA, 2010). Assim, uma suspensão inicialmente estável facilitará na produção de partículas de celulose nanométricas estáveis, com potencial aplicação como material de reforço em compósitos.

A Tabela 4.6 apresenta os resultados da análise de variância para a variável resposta potencial zeta das NFCs do planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} .

Tabela 4.6 - Análise de variância dos resultados do potencial zeta das NFCs obtidos nos experimentos do Planejamento Fracionado 2^{4-1} , com três pontos centrais

Fatores	Somas do quadrados (SQ)	Graus de liberdade (Gl)	Quadrado médio (QM)	Valor F	Nível de significância (p)
T	0,040	1	0,040	5,385	0,017
pH	0,037	1	0,037	5,013	0,744
[E]	0,002	1	0,002	0,372	0,943
[S]	0,009	1	0,009	1,208	0,057

Em água neutra, todas as suspensões de NFCs exibiram potencial zeta alto e negativo, o qual variou entre -21,2 e -29,5 mV. A temperatura e a concentração de substrato foram os fatores estatisticamente significativos sobre a variável resposta nos níveis estudados ($p = 0,017$) e ($p = 0,057$), respectivamente, considerando um nível de significância de 10 % e o SS residual.

A Tabela 4.7 apresenta os efeitos estimados das variáveis sobre o potencial zeta das NFCs nos experimentos do planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} .

Tabela 4.7 - Efeitos estimados das variáveis pH, temperatura, concentração de enzima e substrato sobre o potencial zeta das NFCs nos experimentos do Planejamento Fracionado 2^{4-1} , com três pontos centrais

Fatores	Efeito	Nível de significância (p)
Interação	-26,13	0,000
T	3,63	0,017
pH	0,38	0,744
[E]	0,08	0,943
[S]	2,63	0,057

A temperatura é o fator que exerce maior influencia sobre o potencial zeta (3,63). Neste caso em que o valor da variável resposta é negativo, passando a temperatura do nível inferior (35 °C) ao nível superior (50 C°), a carga superficial das nanofibras diminui. Desta forma, para obter uma suspensão mais estável o processo deve ser mantido em baixas temperaturas. O fator concentração de substrato apresentou efeito linear positivo (2,63), assim passando o valor deste fator do nível inferior (15%) ao nível superior (35%) a carga superficial das nanofibras irá diminuir, portanto, a melhor condição para esta resposta é manter a [S] no nível inferior de estudo. De acordo com Tholstrup Sejersen et al. (2007), para partículas pequenas (nm) é necessário que o valor de PZ seja alto, pois este irá conferir estabilidade, ou seja, a suspensão coloidal resistirá à agregação e aumentará o grau de dispersão em compósitos.

A Tabela 4.8 apresenta os resultados da análise de variância para a variável resposta concentração de NFCs do planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} . Observa-se que os fatores temperatura e pH foram estatisticamente significativos na concentração de NFCs, nos níveis estudados, ($p = 0,059$) e ($p = 0,066$), respectivamente, considerando um nível de significância de 10% e o SS residual.

Tabela 4.8 - Análise de variância dos resultados da concentração das NFCs obtidos nos experimentos do Planejamento Fracionado 2^{4-1} , com três pontos centrais

Fatores	Somas do quadrados (SQ)	Graus de liberdade (Gl)	Quadrado médio (QM)	Valor F	Nível de significância (p)
T	0,040	1	0,040	5,385	0,059
pH	0,037	1	0,037	5,013	0,066
[E]	0,002	1	0,002	0,372	0,563
[S]	0,009	1	0,009	1,208	0,313

A Tabela 4.9 apresenta os efeitos estimados das variáveis sobre a concentração das NFCs nos experimentos do planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} .

Tabela 4.9 - Análise de variância e efeitos estimados das variáveis pH, temperatura, concentração de enzima e substrato sobre a concentração das NFCs nos experimentos do Planejamento Fracionado 2^{4-1} , com três pontos centrais

Fatores	Efeito	Nível de significância (p)
Interação	0,850	0,000
T	0,142	0,059
pH	0,137	0,066
[E]	-0,03	0,563
[S]	0,067	0,313

A temperatura apresentou o maior efeito linear positivo (0,142), ou seja, é o fator que exerce maior influência sobre a concentração das NFCs. Assim, passando a temperatura do nível inferior (35 °C) ao nível superior (55 °C) a concentração de NFCs irá aumentar. O pH apresentou um efeito linear positivo (0,137), ou seja, variando este fator do nível inferior (4,0) ao nível superior (6,0) o valor da variável resposta irá aumentar. As condições de maior temperatura e pH foram favoráveis para a atuação da enzima na produção de NFCs (concentração).

4. 3. 1. 2 Análise dos grupos funcionais

As Figuras 4.5, 4.6 e 4.7 apresentam os espectros de FTIR do farelo, farelo tratado com KOH e das NFCs. A ampla banda na região de 3311 cm^{-1} e 3364 cm^{-1} , que corresponde ao alongamento -OH , foi observada nos espectros de todas as amostras. De acordo com diferentes autores, esta banda é característica e específica da celulose (YANG et al., 2007; SIQUEIRA et al., 2010b). O FNT apresenta uma pequena banda na região de 2925 cm^{-1} e, este pico aparece com maior intensidade nas amostras de FTA e nas NFCs, o qual é originário das vibrações do estiramento das ligações C-H, características da hemicelulose e celulose (CHERIAN et al., 2008a). Nota-se que a celulose começa a aparecer com mais intensidade após os tratamentos realizados no farelo, ou seja, houve uma remoção de frações de lignina e, conseqüente aumento da área cristalina da celulose. Isto

pode ser também confirmado pelo fato de aparecer picos intensos nos espectros de FTA e NFCs na região de 1350 cm^{-1} , atribuída à deformação C-H presente em celulose, ao contrário do que se observa nas amostras FNT, onde há um pico muito enfraquecido nesta região.

A etapa de deslignificação foi eficiente e removeu parte da lignina e da hemicelulose do farelo, visto que o FNT apresentou vibrações na banda de 1253 cm^{-1} (alongamento C=O do anel guaiacil), a qual encontra-se muito enfraquecida para a amostra de FTA e não aparece nos espectros das NFCs. Esta banda também é comumente observada quando tem grupos =C-O-, que representa ésteres, éter e fenóis (SIQUEIRA et al., 2010b). De acordo com Cherian et al. (2008b), as bandas nesta região (1253 cm^{-1}) são referentes a frações de hemicelulose e isto confirma o fato de que a hidrólise enzimática com xilanase, além de isolar NFCs também foi eficiente na remoção das frações de hemicelulose. Neste contexto, ainda aparece o pico em 1609 cm^{-1} para a amostra de FNT, que representa anéis aromáticos e grupos carbonilo conjugados que estão presentes na estrutura de polifenólicos da lignina. Esse mesmo pico não é observado nas amostras de NFCs, confirmando a deslignificação do substrato. Contudo, esta banda também aparece para a amostra de FTA o que indica que ainda existem resíduos de lignina após o tratamento alcalino (HASSAN et al., 2010). Além disso, segundo Cherian et al. (2008b), os picos que aparecem para as amostras de FTA e NFCs, na região de 1731 cm^{-1} são originários da dissolução do componente hemicelulose das fibras de banana durante o processo de branqueamento.

A banda em 1102 cm^{-1} observada nas amostras de NFCs podem estar associadas à mudanças nas ligações de hidrogênio e, possivelmente indica a transição da celulose I para celulose II (ZULUAGA et al., 2009). A região de 1034 cm^{-1} que aparece em todos os espectros é devido as frações de xiloglicanos associados à hemicelulose que estão fortemente ligados no interior das microfibrilas de celulose e não foram hidrolisadas (VIIKARI et al., 1994; ZULUAGA et al., 2009)

Em todos os espectros de NFCs e de FTA observam-se picos na região de 896 cm^{-1} , que conforme descrito por Alemdar & Sain (2008), indicam estruturas típicas de celulose. Esta banda não aparece para a amostra de FNT, porém, observa-se um pico na região próxima a 840 cm^{-1} que é característico dos grupos C-H de anéis aromáticos presentes na lignina (MARCOVICH et al., 1996).

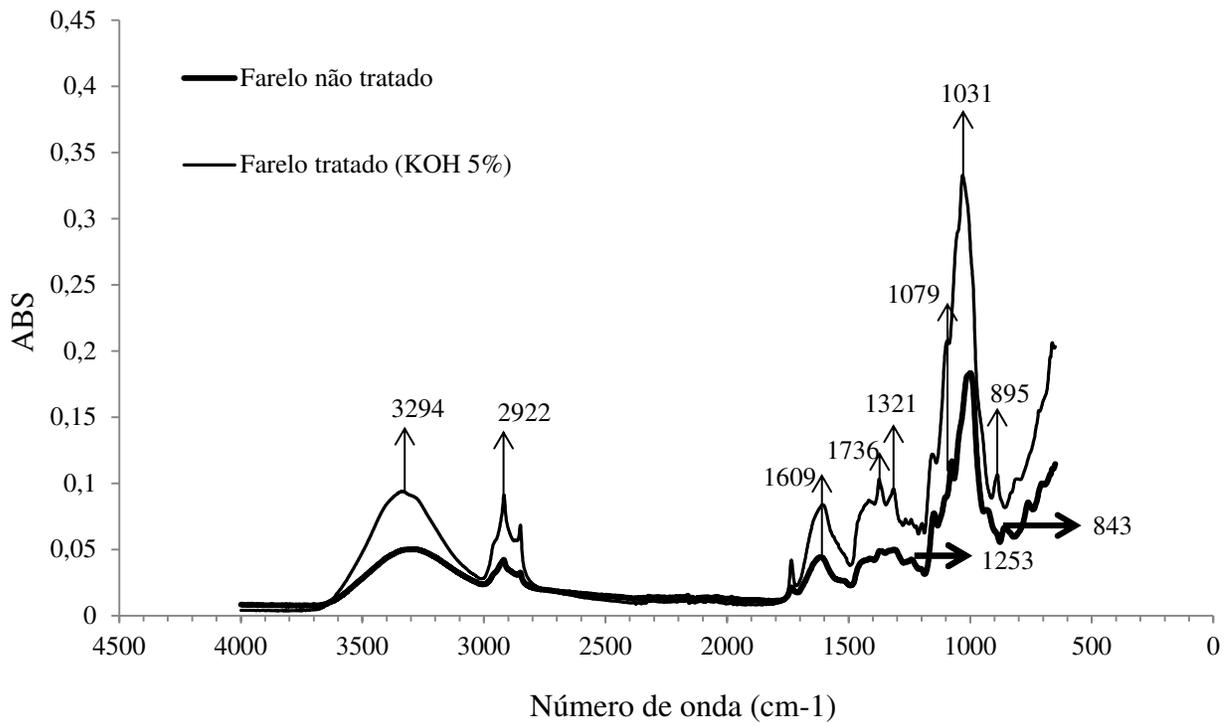


Figura 4.5 - Espectro de FTIR obtido para as amostras de farelo não tratado (FNT) e farelo tratado com KOH 5% (FTA)

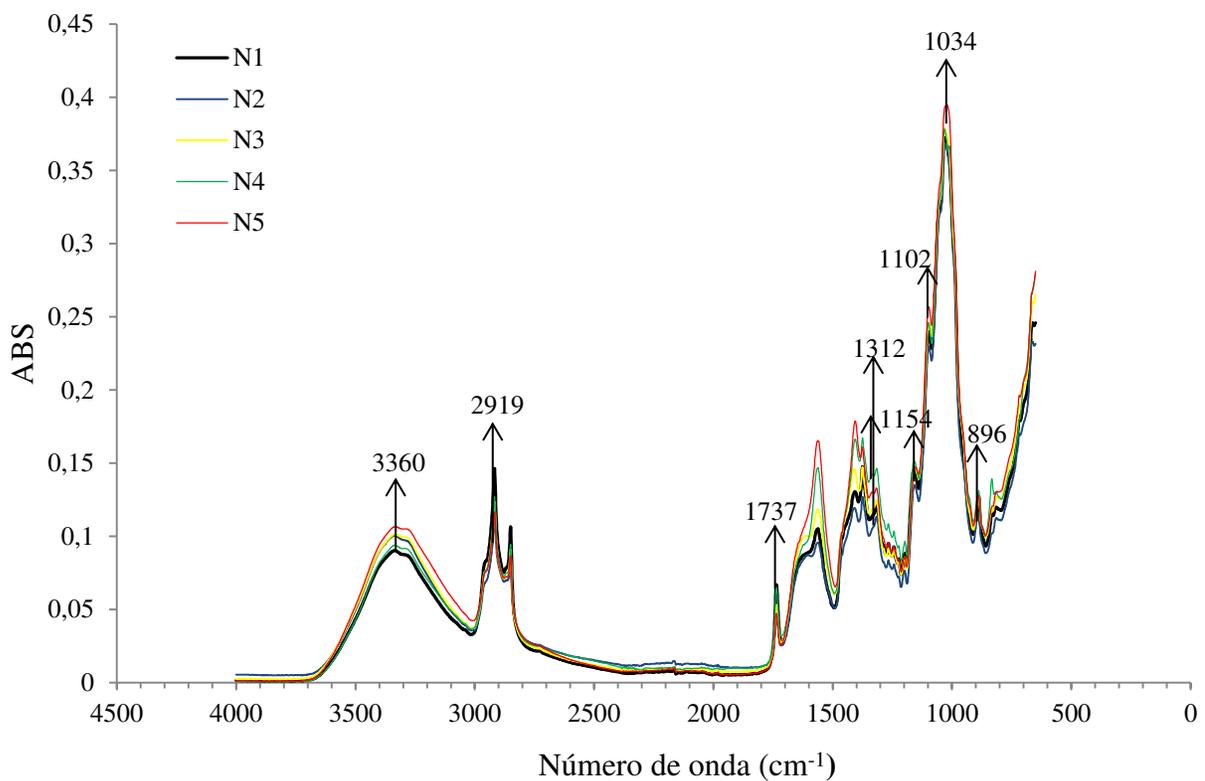


Figura 4.6 - Espectro de FTIR obtido para as amostras de NFCs (N1, N2, N3, N4 e N5)

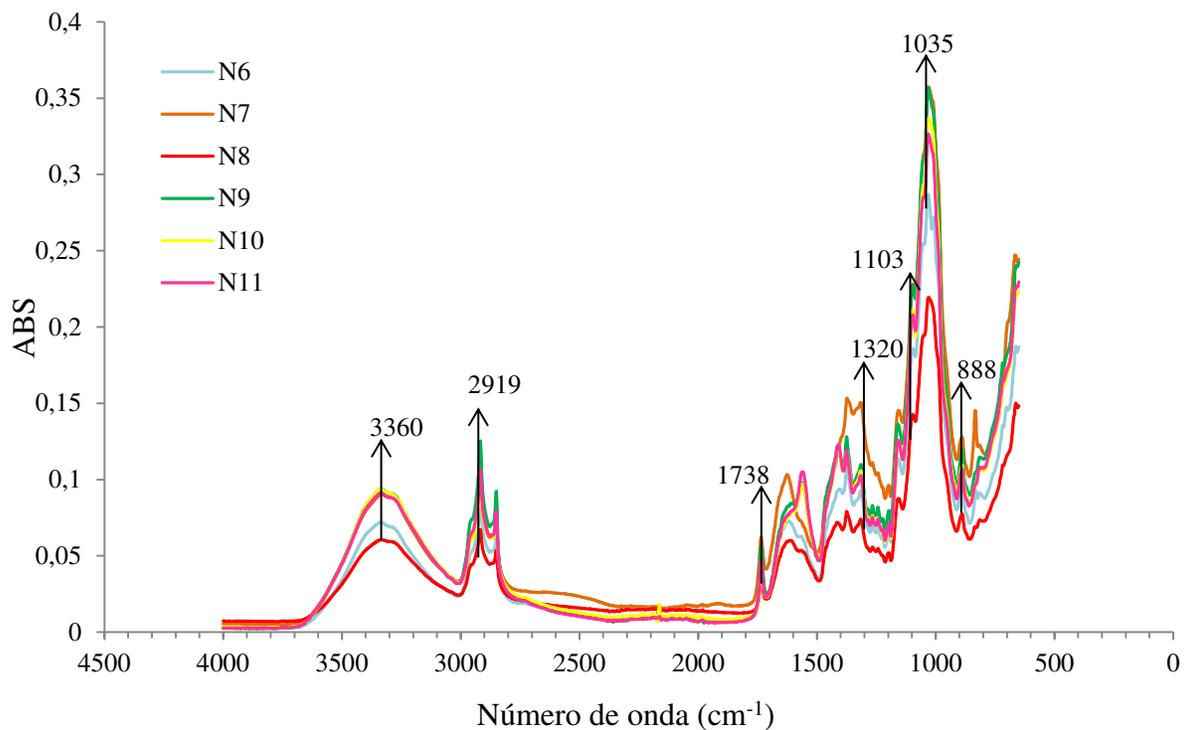


Figura 4.7 - Espectro de FTIR obtido para as amostras de NFCs (N6, N7, N8, N9, N10 e N11)

4.3.1.3 Índice de cristalinidade

A cristalinidade das amostras foi analisada para verificar a eficiência dos métodos aplicados. A Tabela 4.10 apresenta o índice de cristalinidade (I_{cr}) do FNT, do FTA e das NFCs obtidas através do planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} com três pontos centrais. Nas Figuras 4.8, 4.9, 4.10 e 4.11 são apresentados os difratogramas de raios-x para cada amostra.

Tabela 4.10 - Índice de cristalinidade (I_{cr}) do FNT, FTA e das NFCs produzidas através do planejamento fatorial fracionado 2^{4-1}

Experimento	(X ₁) [*]	(X ₂) ^{**}	(X ₃) ^{***}	(X ₄) ^{****}	I _{cr} (%)
FNT	-	-	-	-	15,0
FTA	-	-	-	-	46,8
N1	-1 (35)	-1 (4,0)	-1 (30)	-1 (15)	48,5
N2	+1 (55)	-1 (4,0)	-1 (30)	+1 (35)	58,3
N3	-1 (35)	+1 (6,0)	-1 (30)	+1 (35)	55,4
N4	+1 (55)	+1 (6,0)	-1 (30)	-1 (15)	60,0
N5	-1 (35)	-1 (4,0)	+1 (70)	+1 (35)	59,7
N6	+1 (55)	-1 (4,0)	+1 (70)	-1 (15)	61,0
N7	-1 (35)	+1 (6,0)	+1 (70)	-1 (15)	58,5
N8	+1 (55)	+1 (6,0)	+1 (70)	+1 (35)	54,3
N9	0 (45)	0 (5,0)	0 (50)	0 (25)	50,7
N10	0 (45)	0 (5,0)	0 (50)	0 (25)	53,2
N11	0 (45)	0 (5,0)	0 (50)	0 (25)	49,2

FNT: farelo não tratado; FTA: farelo tratado alcalinamente; *X₁: Temperatura (°C); **X₂: pH; ***X₃: [E] (U/g), sendo U definido como quantidade de xilose liberada por minuto por mL de enzima; **** X₄: [S] (%)

A Tabela 4.11 apresenta a análise de variância e efeitos estimados para os resultados de cristalinidade obtidos através do planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} . Os fatores não apresentaram efeito estatisticamente significativo ($p > 0,01$) sobre a cristalinidade das NFCs, nos níveis de estudo.

Tabela 4.11 - Análise de variância e efeitos estimados das variáveis pH, temperatura, concentração de enzima e substrato sobre a cristalinidade das NFCs nos experimentos do Planejamento Fracionado 2^{4-1} , com três pontos centrais

Fatores	Efeito	Nível de significância (p)
Interação	55,34	0,000
T	2,87	0,474
pH	0,17	0,964
[E]	2,82	0,482
[S]	-0,07	0,984

Conforme verificado no item 2. 3. 1. 5 do capítulo 2, o FNT apresenta um baixo valor de índice de cristalinidade (15%), o qual pode ser explicado devido presença de frações amorfas em resíduos lignocelulósicos (casca de banana). Segundo Pirani & Hashaikeh (2013) regiões largas representam porções amorfas e picos finos e pontiagudos representam a região cristalina. Tal fato fica evidente observando a Figura 8, na qual é possível notar que o FNT tem uma larga porção de região amorfa, variando o pico padrão de $2\theta = 13^\circ$ a 23° . Além disso, apresenta um pico padrão $2\theta = 17^\circ$, demonstrando a presença de amido.

Após o pré-tratamento, a cristalinidade da amostra de farelo teve um aumento de 200 %. A técnica de branqueamento utilizada mostrou-se eficiente, confirmando que o agente alcalino (KOH 5%) utilizado nesta etapa promove a remoção da lignina e, também a ruptura da ligação de hidrogênio na estrutura da celulose. Desta forma, ocorreu um aumento da área superficial cristalina, além da redução de certas quantidades de ceras e óleos que recobrem a superfície externa da parede celular da fibra (ALEMDAR e SAIN, 2008). Nota-se no difratograma do FTA que os picos que representam a região amorfa foram reduzidos e, conseqüentemente o pico padrão em $2\theta = 22^\circ$ foi ficando mais intenso e agudo. Este pico é típico da celulose I e indica um aumento da cristalinidade, o que era esperado, visto que a finalidade do branqueamento era remover a lignina.

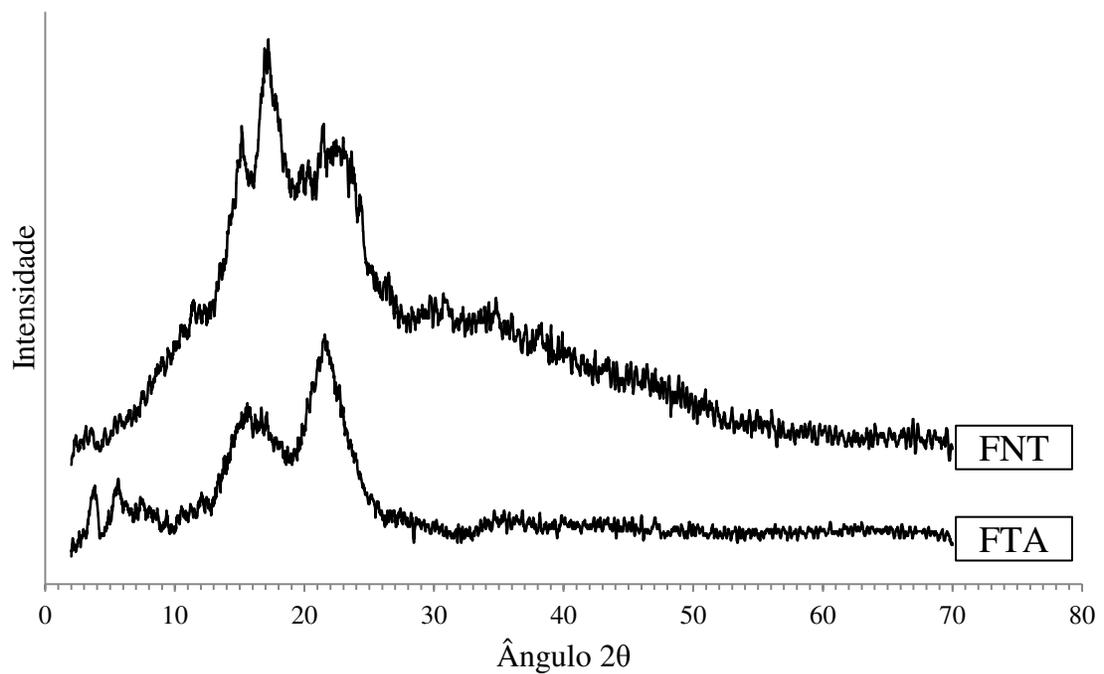


Figura 4.8 - Padrão da difração de raios-X do farelo da casca de banana não tratado e com tratamento alcalino

Todas as NFCs produzidas por hidrólise enzimática apresentaram maior índice de cristalinidade em relação ao FNT e ao FTA, variando entre 48,5% a 61,0%. Uma vez que o índice de cristalinidade é representado pela altura do pico ($2\theta = 16^\circ$ e $2\theta = 22^\circ$) fica evidente observando as Figuras 9, 10 e 11 que as NFCs obtidas tem maior cristalinidade comparado com o material de partida (FNT) e com o FTA. Segundo Mussatto et al (2008), a remoção da hemicelulose e da lignina causa extensiva mudança na estrutura do farelo, aumentando a área superficial cristalina e, conseqüentemente, a acessibilidade da enzima à fibra de celulose.

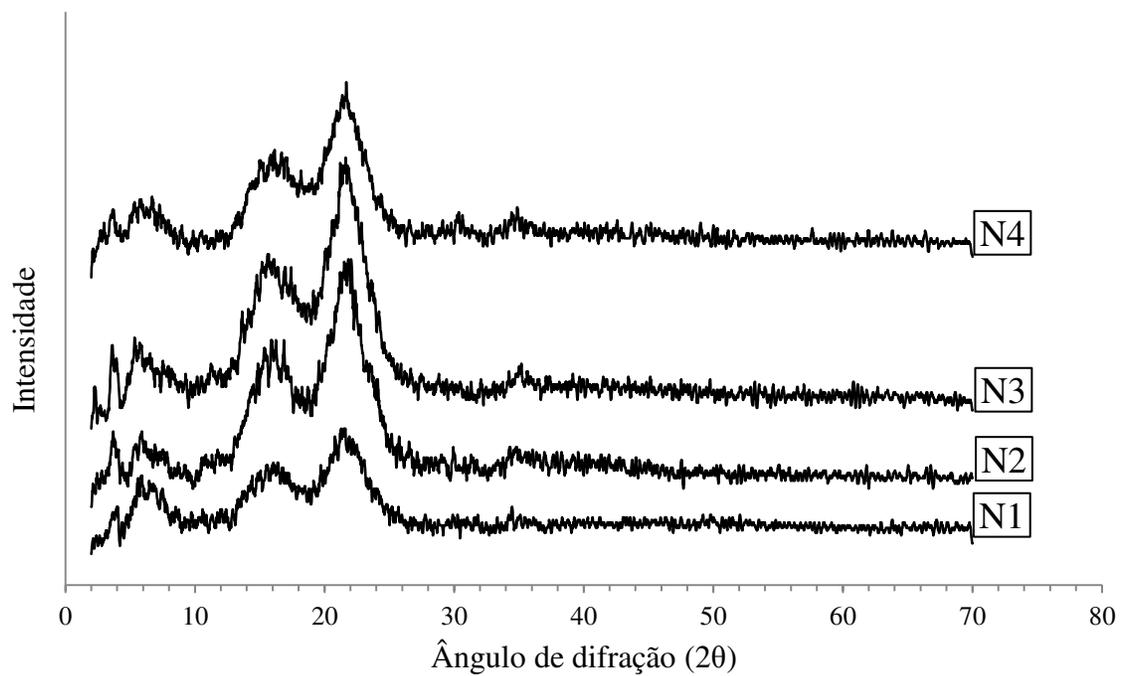


Figura 4.9 - Padrão da difração de raios-X das amostras de NFCs (N1, N2, N3 e N4) obtidas através do planejamento fatorial fracionado 2^{4-1}

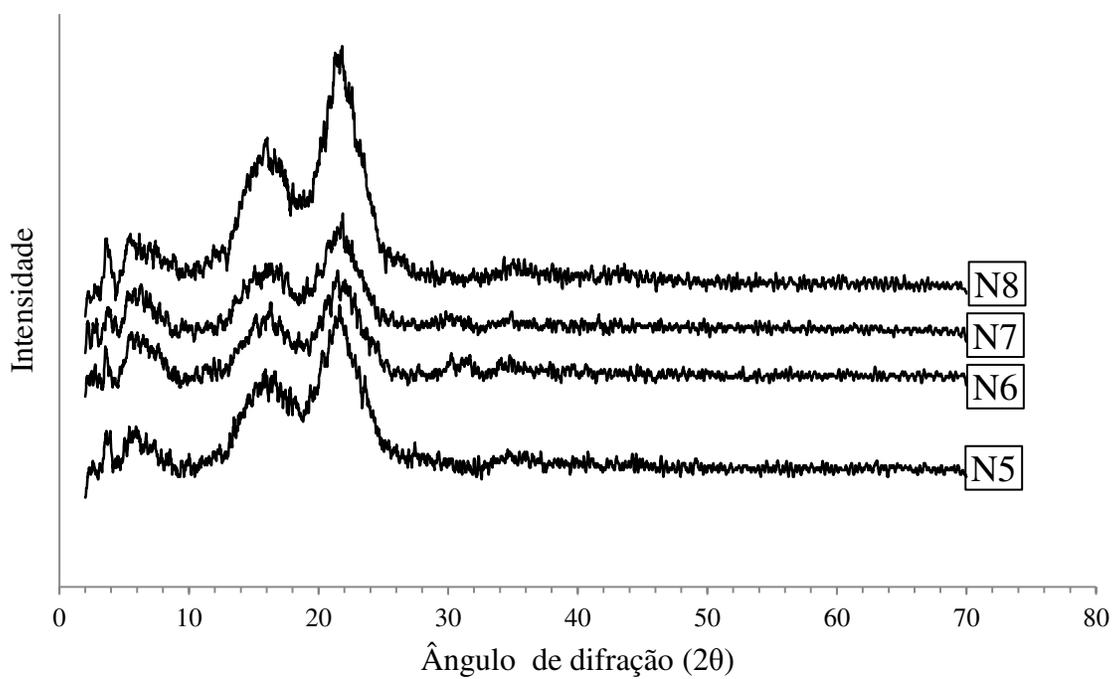


Figura 4.10 - Padrão da difração de raios-X das amostras de NFCs (N5, N6, N7 e N8) obtidas através do fatorial fracionado 2^{4-1}

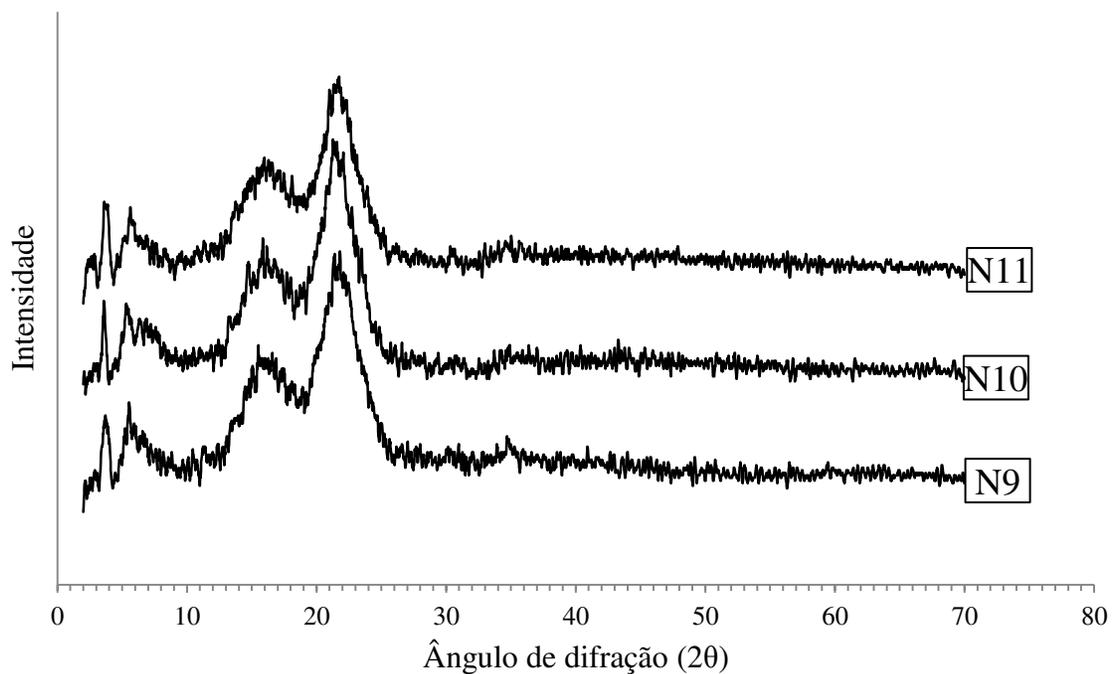


Figura 4.11 - Padrão da difração de raios-X das amostras de NFCs dos pontos centrais (N9, N10 e N11) obtidas através do fatorial fracionado 2^{4-1}

4. 3. 1. 4 Teor de açúcares redutores totais (ART)

A análise de concentração de açúcares redutores formados durante a hidrólise enzimática com complexo celulolítico foi realizada para observar o teor de degradação das regiões amorfas. Esta análise permite verificar quais as melhores condições de atuação da enzima xilanase na remoção da hemicelulose, que tem como principal componente um açúcar (xilose), cadeia específica de ação desta enzima.

A Tabela 4.12 apresenta os valores de concentração de açúcar redutor obtidos para cada amostra do planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} .

Tabela 4.12 - Concentração de açúcar redutor formado durante a hidrólise enzimática com xilanase na produção de NFCs através do planejamento fatorial fracionado 2^{4+1}

Experimento	(X ₁) [*]	(X ₂) ^{**}	(X ₃) ^{***}	(X ₄) ^{****}	[ART] (mg/g _{farelo} tratado)]
N1	-1 (35)	-1 (4,0)	-1 (30)	-1 (15)	0,07
N2	+1 (55)	-1 (4,0)	-1 (30)	+1 (35)	2,1
N3	-1 (35)	+1 (6,0)	-1 (30)	+1 (35)	10,3
N4	+1 (55)	+1 (6,0)	-1 (30)	-1 (15)	13,7
N5	-1 (35)	-1 (4,0)	+1 (70)	+1 (35)	7,4
N6	+1 (55)	-1 (4,0)	+1 (70)	-1 (15)	2,4
N7	-1 (35)	+1 (6,0)	+1 (70)	-1 (15)	7,0
N8	+1 (55)	+1 (6,0)	+1 (70)	+1 (35)	15,0
N9	0 (45)	0 (5,0)	0 (50)	0 (25)	11,6
N10	0 (45)	0 (5,0)	0 (50)	0 (25)	12,0
N11	0 (45)	0 (5,0)	0 (50)	0 (25)	12,6

*X₁: Temperatura (°C); **X₂: pH; ***X₃: [E] (U/g), sendo U definido como quantidade de xilose liberada por minuto por mL de enzima; **** X₄: [S] (%)

A maior concentração de açúcar redutor produzido foi no experimento 8 (15,0 mg/g_{farelo}), nos níveis máximos de estudo da matriz experimental, ou seja, nestas condições a enzima tem atuação mais eficiente para degradação da hemicelulose.

A Tabela 4.13 apresenta os resultados da análise de variância para a variável resposta concentração de açúcar redutor durante a hidrólise do planejamento fatorial fracionado 2^{4+1} . Observa-se que somente o fator pH é significativo ($p=0,021$) sobre a

variável resposta (ART), nos níveis de estudo, considerando um nível de significância de 10 % e o SS residual.

Tabela 4.13 - Análise de variância dos resultados da concentração de açúcar redutor formado nos experimentos do Planejamento Fracionado 2^{4-1} , com três pontos centrais

Fatores	Somas do quadrados (SQ)	Graus de liberdade (Gl)	Quadrado médio (QM)	Valor F	Nível de significância (p)
T	8,883	1	8,883	0,596	0,469
pH	144,755	1	144,755	9,721	0,021
[E]	3,962	1	3,962	0,266	0,624
[S]	16,907	1	16,907	1,135	0,327

A Tabela 4.14 apresenta os efeitos estimados das variáveis sobre a concentração de açúcar redutor formado durante a hidrólise nos experimentos do planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} . O pH apresenta efeito positivo (8,375), ou seja, passando o valor de pH do nível inferior ao nível superior, ocorre um aumento de 8,375 mg/g_{farelo} de açúcar redutor durante a reação. Neste caso, não é ideal que a concentração de açúcar redutor aumente durante o processo, pois pode significar que a enzima está degradando a celulose à glicose, sendo prejudicial para formação de NFCs.

Tabela 4.14 - Análise de variância e efeitos estimados das variáveis pH, temperatura, concentração de enzima e substrato sobre a concentração de açúcar redutor formado nos experimentos do Planejamento Fracionado 2^{4-1} , com três pontos centrais

Fatores	Efeito	Nível de significância (p)
Interação	8,561	0,000
T	2,107	0,469
pH	8,507	0,021
[E]	2,907	0,624
[S]	2,975	0,327

A Figura 4.12 apresenta o gráfico da concentração de açúcar redutor formado em cada experimento durante o tempo de 30 h de hidrólise enzimática com xilanase. Observa-se que para as amostras N2, N6 e N7 a concentração de açúcar redutor formado aumenta até o tempo de 12 h de hidrólise e para as demais amostras do planejamento experimental até 24 h de hidrólise, e após este período, a formação de açúcar redutor decresce ou se mantém constante. O resultado indica que o tempo de 24 h de hidrólise é suficiente para hidrolisar e remover frações hemicelulósicas presentes na fibra vegetal.

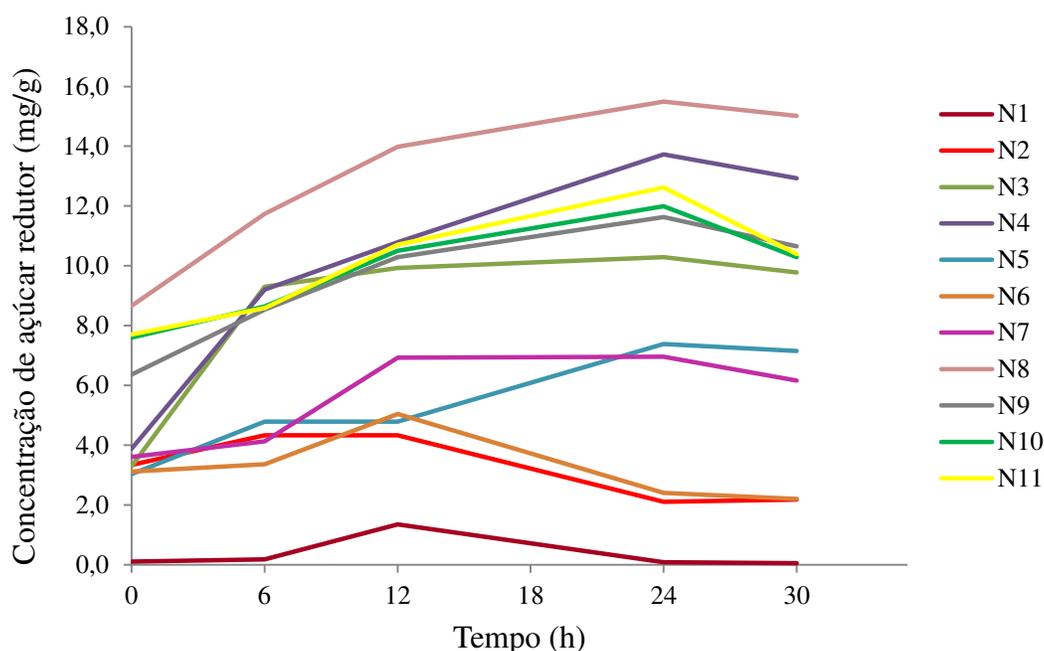


Figura 4.12 - Concentração de açúcar redutor em função do tempo de hidrólise

4.4 CONCLUSÃO

Diante da necessidade de desenvolver métodos de obtenção de celulose amigáveis com o meio ambiente, o emprego da hidrólise enzimática proporciona um processo mais suave em comparação com a hidrólise ácida, visto que não utiliza reagentes químicos. Apesar do uso de um tratamento alcalino na etapa de deslignificação, a concentração de KOH (5%) pode ser considerada baixa, não oferecendo riscos ambientais abusivos. Além disso, o uso de KOH 5% foi eficaz na remoção de grande parte das frações amorfas presente na fibra, obtendo-se um substrato com maior cristalinidade, passando de 15% (FNT) para 61,0% (N6). As nanofibras obtidas neste estudo apresentaram resultados, quanto à sua caracterização, que demonstram que condições de temperatura de 35 °C a 55 °C, pH de 4,0 a 6,0, concentração de enzima de 30 U a 70 U e concentração de substrato de 15% a 35% podem ser utilizadas para obtenção de fibras em tamanho nanométrico a partir de um subproduto agrícola (casca de banana). A temperatura foi o fator que apresentou maior influência sobre as variáveis respostas, obtendo os melhores resultados no nível superior de estudo (55 °C). O planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} foi útil para avaliar o

impacto dos fatores sobre as respostas e para definir um próximo fatorial completo a ser adotado. A hidrólise enzimática com xilanase é um tratamento promissor no isolamento de NFCs da casca de banana, demonstrando que o uso de enzimas celulasas é desnecessário, bem como a adição de mais uma etapa de processo como tratamento mecânico.

Capítulo 5 Efeito da enzima celulase sobre as propriedades das nanofibras de celulose

Uma etapa de hidrólise enzimática, usando enzima celulase, foi adicionada ao processo de obtenção de nanofibras de celulose (NFCs). O complexo celulolítico é formado por três enzimas que atuam em sinergismo (endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidades), liberando produtos uma para outra. As suspensões foram quimicamente tratadas com agente alcalino para remoção da lignina e submetidas a hidrólise enzimática com xilanase, a fim de remover frações de hemicelulose, sob condições previamente estudadas no capítulo 4, fixando os níveis que apresentaram melhores resultados. A hidrólise com o complexo celulolítico foi realizada testando-se três diferentes condições de processos, variando temperatura, pH e concentração de enzima). A partir das imagens MET, pode-se observar que não houve presença de NFCs nas amostras. A análise de grupos funcionais evidenciou mudanças na estrutura da celulose. O intenso decréscimo no índice de cristalinidade confirmou a degradação da celulose pelas enzimas celulases. Em água neutra, as suspensões foram analisadas quanto à carga superficial e, os baixos valores obtidos demonstram instabilidade das mesmas. Desta forma, realizou-se análise de concentração de açúcares redutores formados após a hidrólise. Confirmou-se o fato de que as cadeias de celulose foram degradadas à açúcares redutores, principalmente à glicose. A etapa de hidrólise com o complexo celulolítico não é eficiente para o isolamento de NFCs, visto que estas enzimas atuam intensivamente sobre a celulose.

5.1 INTRODUÇÃO

A hidrólise enzimática, normalmente, é conduzida a partir do tratamento de uma biomassa com enzimas xilanase e celulase. O tratamento com xilanase resulta na remoção parcial da hemicelulose, pois esta enzima age especificamente sobre a xilana, componente principal da hemicelulose (HASSAN et al., 2010). As celulases constituem um complexo capaz de atuar sobre materiais celulósicos, promovendo sua hidrólise. A utilização desta enzima deve ser muito bem controlada, visto que são biocatalisadores altamente específicos que atuam em sinergia para a liberação de açúcares. O complexo celulolítico divide-se em

três grandes grupos que podem ser classificadas de acordo com seu local de atuação no substrato celulósico. As endoglucanases clivam as ligações internas da fibra celulósica, as exoglucanases atuam na região externa da celulose e por fim, as β -glicosidases hidrolisam oligossacarídeos solúveis em glicose. Neste contexto, fica evidente que não seria possível obter partículas de celulose em tamanho nanométrico utilizando apenas o complexo celulolítico no tratamento enzimático. Para evitar a hidrólise total da celulose, o processo deve ser interrompido após a atuação da enzima endoglucanase, que é responsável por iniciar a hidrólise. Tal enzima hidrolisa randomicamente as regiões internas da estrutura amorfa da fibra celulósica e, conseqüentemente, no isolamento da celulose em tamanho nanométrico (CASTRO e PEREIRA JR, 2010).

Na tentativa de aumentar o índice de cristalinidade, diminuir o diâmetro das fibras de celulose produzidas, bem como isolar maior concentração de NFCs, este estudo investigou o uso do complexo celulolítico na hidrólise enzimática do farelo da casca de banana, previamente tratado alcalinamente e com enzima xilanase. A adição desta etapa de hidrólise teve como objetivo obter maior eficiência de processo. As suspensões coloidais obtidas foram caracterizadas quanto a microscopia eletrônica de transmissão, análise de grupos funcionais (FTIR), índice de cristalinidade (DRX), carga superficial (PZ). Para investigar quão isolada ou quão degradada foi a celulose, realizou-se análises de formação de açúcares redutores durante a hidrólise com o complexo celulolítico.

5. 2 MATERIAL E MÉTODOS

5. 2. 1 Produção de nanofibras

O potencial das nanofibras de celulose produzidas por hidrólise enzimática com xilanase pode ser melhorado quanto à coloração da suspensão coloidal, a cristalinidade e maior remoção dos componentes amorfos. Neste contexto, o branqueamento do farelo seguiu a mesma metodologia usada no capítulo 4 (KOH 5%, 14 h, T_{ambiente}) e, as condições de hidrólise com enzima xilanase foram fixadas com base nas utilizadas para a amostra N6 da matriz de experimentos apresentada na Tabela 1 do capítulo 4 ($T = 55\text{ }^{\circ}\text{C}$, pH 4,0, $[E] = 70\text{ U/g}$ e $[S] = 15\%$), visto que este experimento obteve os melhores resultados. A

suspensão coloidal obtida após estas duas etapas foi submetida a outra hidrólise enzimática, utilizando enzima celulase. A hidrólise foi conduzida a partir dos quatro fatores anteriormente estudados, os quais tiveram três níveis de estudo, conforme o esquema de processo apresentado na Figura 5.1.

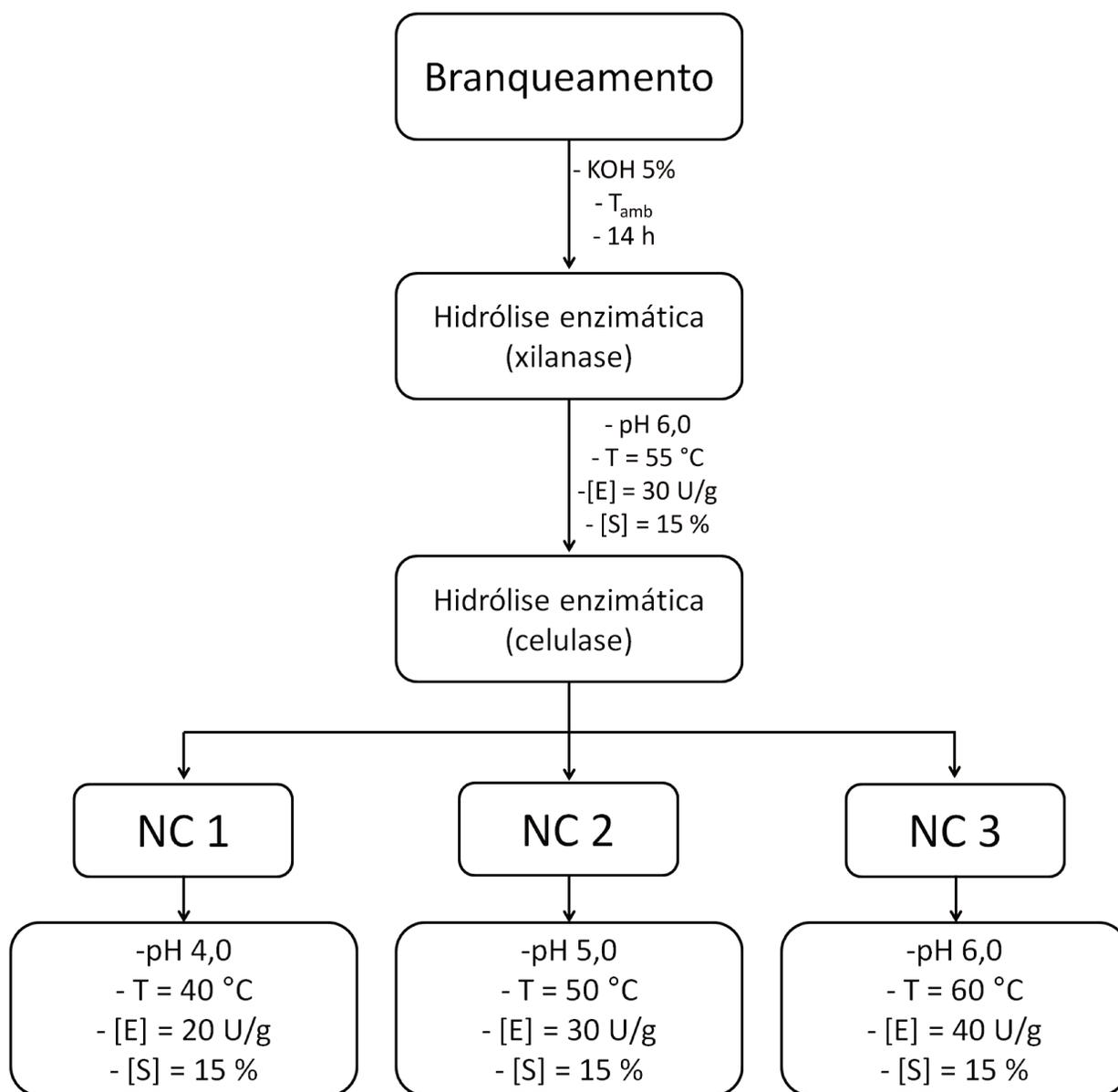


Figura 5.1 - Esquema da produção de nanofibras de celulose por hidrólise enzimática com xilanase e celulase

Em erlenmeyers de 250 mL contendo a suspensão coloidal (15 %) foi adicionado 50 mL de tampão acetato 0,1 M (pH do estudo). Em shaker termostatizado (temperatura do estudo) a mistura permaneceu por 10 min para adaptação do meio e, então, a enzima celulase foi adicionada (concentração do estudo U/g), sendo que U é definido como 1 μ L de glicose liberada por mL de enzima. Os experimentos permaneceram nas condições de estudo por 2 h e, após este período, a temperatura foi elevada a 80 °C para desnaturação da enzima. As suspensões foram centrifugadas (10.000 rpm, 5 °C, 15 min) e lavadas sucessivamente com água deionizada. Ao final destes processos obteve-se uma suspensão coloidal que foi mantida sob refrigeração (4°C) em água neutra.

5. 2. 2 Caracterização das suspensões

As suspensões obtidas dos diferentes tratamentos com enzima celulase foram caracterizadas quanto à morfologia, carga superficial (potencial zeta), índice de cristalinidade (DRX), grupos funcionais (FTIR) e teor de glicose gerado.

5. 2. 2. 1 Morfologia das nanofibras

A confirmação da presença de nanofibras, bem como a visualização da morfologia da suspensão foi realizada pela técnica MET. A análise foi realizada conforme descrito no item 4. 2. 2. 1, do capítulo 4. A imagens foram obtidas em um microscópio de transmissão (TEM-MS) empregando uma tensão de aceleração de 120 kV.

5. 2. 2. 2 Concentração das suspensões de nanofibras

A concentração de material em cada experimento foi realizada submetendo as suspensões à metodologia de secagem, conforme descrito no item 4. 2. 2. 2, do capítulo 4.

5. 2. 2. 3 *Análise dos grupos funcionais por FTIR*

A análise de grupos funcionais presentes na suspensão coloidal foi realizada utilizando um espectrofotômetro infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), conforme descrito no item 2. 2. 2. 3 do capítulo 2 (VICENTINI et al., 2005).

5. 2. 2. 4 *Índice de cristalinidade*

A determinação da cristalinidade das amostras foi feita por difração de raios-X (DRX). A metodologia seguida foi proposta por Van Soest et al. (1996) e está descrita no item 2. 2. 2. 4 do capítulo 2, bem como cálculo do I_{cr} , %.

5. 2. 2. 5 *Potencial zeta e determinação*

Em suspensão aquosa neutra, a carga superficial (PZ) foi analisada por um Zetasizer (Malvern Instruments, Ltda., U.K). Para cada amostra foram obtidas seis medidas à temperatura ambiente (25 °C).

5. 2. 2. 6 *Determinação de açúcares redutores totais (DNS)*

Ao final da hidrólise enzimática, uma alíquota do sobrenadante separado do material hidrolisado, foi coletada para análise de produção de açúcares redutores totais, durante a reação hidrolítica. Os ensaios foram realizados em triplicata e, o procedimento foi adaptado do método proposto por Ghose (1987), através do método ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). A leitura da absorbância das amostras foi realizada em espectrofotômetro a 546 nm (MILLER, 1959).

5. 2. 2. 7 *Determinação do teor de glicose nas suspensões coloidais por UPLC*

Para determinar o teor de glicose gerada após a hidrólise enzimática, foi utilizado um cromatógrafo Waters (Estados Unidos) e uma coluna Acquity UPLC BEH Amide (1,7 µm, 2,1 x 100 mm). As fases móveis foram compostas por acetonitrila com hidróxido de

amônio 0,1% (solvente A) e água mili-Q com hidróxido de amônio 0,1% (solvente B) a uma vazão de 0,4 mL/min. A eluição começou com 80% do solvente A até 4 min, após isso, a eluição passou para 60% do solvente B, seguindo, deste modo, até 5 min. Neste momento, a coluna começou a ser re-equilibrada com 80% do solvente A (7,5 min), para retornar a condição inicial.

5. 2. 3 Análise estatística

A análise estatística para comparação das diferenças entre as amostras quanto à concentração e potencial zeta, foi realizada por teste de Tukey, considerando um nível de significância de 95%. Foi utilizado o software Statistica 7.0 (StatSoft Inc, Tulsa, Oklahoma, USA).

5. 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. 3. 1 Aparência e concentração das suspensões coloidais

A aparência dos precipitados obtidos pela hidrólise enzimática (xilanase e celulase) do farelo da casca da banana está apresentada na Figura 5.2. Em comparação com as amostras obtidas no capítulo 4 através do planejamento fracionado 2^{4-1} somente usando a enzima xilanase, nota-se que a coloração das amostras tratadas também, com celulase ficaram mais clara. Desta forma, é evidente que a enzima celulase atua na degradação dos resíduos dos componentes amorfos que não foram totalmente hidrolisados na etapa anterior, em especial, a lignina (responsável pela coloração escura), ou seja, esta degradação foi muito maior acrescentando esta etapa no processo. A amostra NC1 apresentou coloração totalmente branca, indicando que nestas condições (pH 4,0, T = 40°C e [E] = 20 U/g) há maior atuação da enzima celulase sobre os compostos lignocelulósicos.



Figura 5.2 - Suspensões coloidais obtidas pelos diferentes métodos de hidrólise enzimática com xilanase (T= 55 °C, pH 6,0, [E] 30 U/g e [S] 15%) e celulase: NC1 (T= 40 °C, pH 4,0, [E] 20 U/g e [S] 15%); NC2 (T= 50 °C, pH 5,0, [E] 30 U/g e [S] 15%) e NC3 (T= 60 °C, pH 6,0, [E] 40 U/g e [S] 15%). Sendo que U é definido como 1 μ L de xilose/glicose liberada por mL de enzima

A concentração de sólidos totais no final do processo de hidrólise (Tabela 5.1) foi semelhante as concentrações obtidas de nanofibras de celulose pelo planejamento com xilanase (capítulo 4). Porém, não se pode afirmar que, após o processo com o complexo celulolítico, essa quantidade seja de NFCs, visto que o material produzido ainda não é conhecido e, também, segundo a literatura, o complexo celulolítico atua em sinergismo atacando as fibras de celulose degradando-as à glicose e outros açúcares (CASTRO, 2010).

A partir da análise estatística observa-se que as amostras apresentam diferença significativa entre si ($p < 0,05$), ou seja, as diferentes condições utilizadas na hidrólise com celulase são significativas no processo. A amostra NC1 obteve menor concentração de sólidos, confirmando o fato de que houve maior atuação da enzima e degradação da celulose nestas condições de processo, o que pôde ser comprovado pela sua coloração branca.

Tabela 5.1 - Concentração de sólidos totais nas suspensões (g de sólidos/100 g de suspensão)

Amostra	Concentração (g/100g _{suspensão})
NC1	0,26 \pm 0,01 ^a
NC2	0,78 \pm 0,02 ^b
NC3	0,56 \pm 0,01 ^c

5.3.2 Caracterização das suspensões

5.3.2.1 Morfologia das nanofibras

As imagens obtidas através da técnica MET (Figura 5.3) permitiram visualizar que não há presença de nanofibras de celulose nas suspensões obtidas por hidrólise enzimática, neste estudo (xilanase + celulase). Para todas as amostras observa-se que houve a formação de aglomerados, podendo ser considerados produtos resultantes da reação hidrolítica.

De acordo com SALES et al. (2010), o complexo celulolítico tem capacidade de hidrolisar as cadeias de celulose, principalmente, à glicose e outros açúcares redutores totais, como sacarose e frutose. Neste contexto, devido a ação sinérgica e conjunta das três enzimas do complexo celulolítico, ocorreu a hidrólise da celulose a monômeros de carboidrato.

Diferentes autores têm utilizado somente as enzimas endoglucanases para produção de nanofibras de celulose (PÄÄKKO et al., 2007; WOEHL et al., 2010), visto que estas são mais ativas nas regiões amorfas da fibra vegetal. Desta forma, esta enzima isolada do complexo celulolítico deve atuar somente nas regiões específicas e, conseqüentemente isolando as NFCs sem haver degradação da celulose.

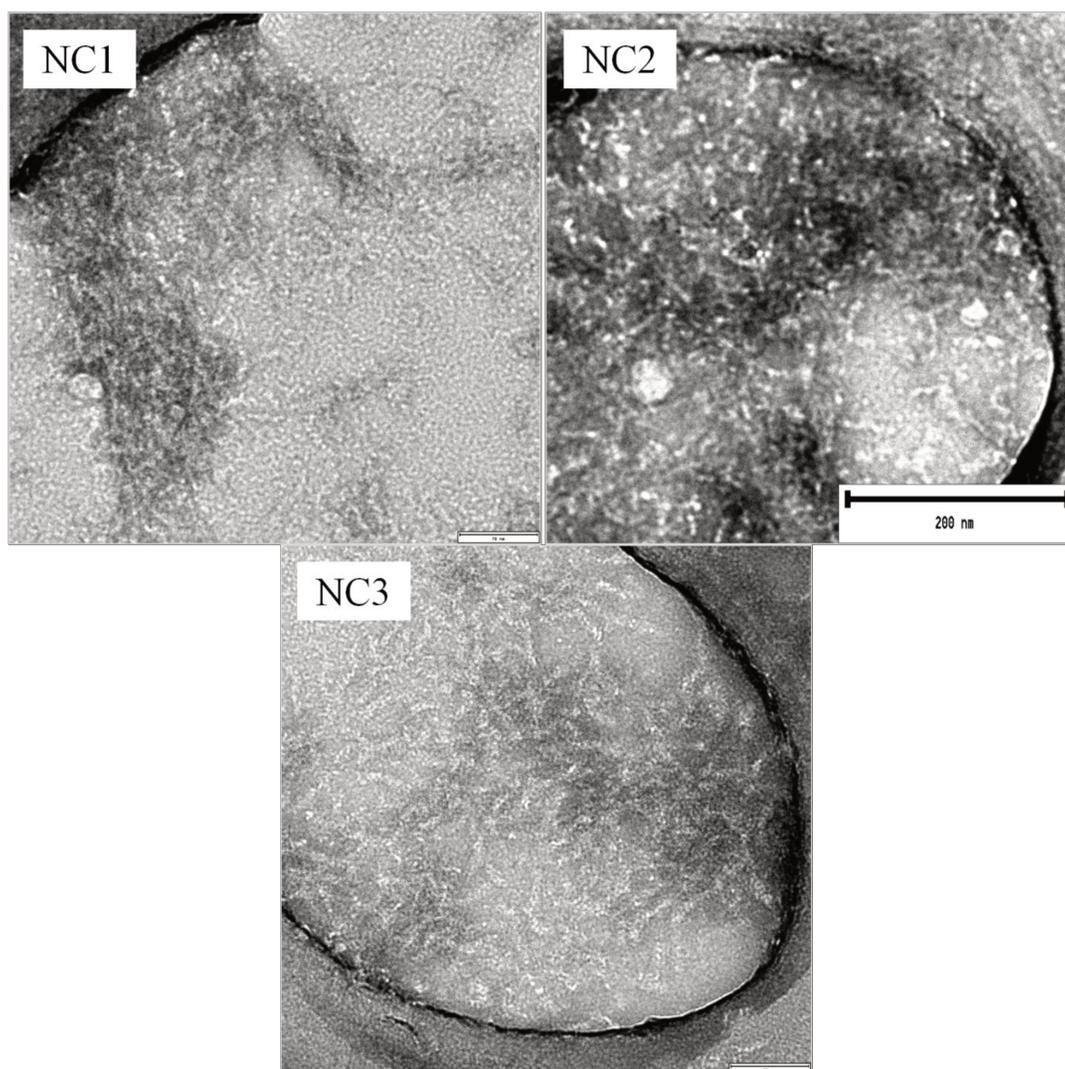


Figura 5.3 - Imagens MET das suspensões coloidais obtidas pela hidrólise com enzimas xilanase ($T=55\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH } 6,0$, $[\text{E}] 30\text{ U/g}$ e $[\text{S}] 15\%$) e celulase: NC1 ($T=40\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH } 4,0$, $[\text{E}] 20\text{ U/g}$ e $[\text{S}] 15\%$); NC2 ($T=50\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH } 5,0$, $[\text{E}] 30\text{ U/g}$ e $[\text{S}] 15\%$) e NC3 ($T=60\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH } 6,0$, $[\text{E}] 40\text{ U/g}$ e $[\text{S}] 15\%$). Sendo que U é definido como $1\text{ }\mu\text{L}$ de xilose/glicose liberada por mL de enzima

5. 3. 2. 2 Análise dos grupos funcionais por FTIR

Os espectros de FTIR para as amostras das suspensões obtidas após hidrólise com enzima celulase (Figura 5.4), indicam que este tratamento enzimático teve algum efeito sobre a estrutura da celulose. Os picos situados nas regiões entre 3400 e 3300 cm^{-1} são referentes a grupos OH e C-O, característicos da celulose (YANG et al., 2007). Nota-se que há picos nesta região, porém com intensidade muito menor que os picos encontrados para

as amostras tratadas somente com agente alcalino e enzima xilanase. A confirmação de que houve degradação da celulose, ou que pelo menos, ocorreram modificações severas na sua estrutura, pode ser observada pela inexistência de picos em 2925 cm^{-1} , originário das vibrações do estiramento das ligações C-H, que são características da hemicelulose e celulose. Além disso, não ocorrem picos na região de 1350 cm^{-1} , que também são característicos das vibrações dos grupos presentes na celulose (CHERIAN et al., 2008a).

De acordo com Cao & Tan (2002), que realizaram estudos sobre o efeito da celulase sobre a estrutura da celulose, bandas entre 1100 e 1200 cm^{-1} indicam presença de celulose e, diferente do observado para as amostras anteriores (xilanase), não existem picos nesta faixa para as amostras tratadas com celulase. Outros picos referentes à celulose (1034 cm^{-1} , 888 cm^{-1}) não são observados nas amostras hidrolisadas com a enzima celulase, demonstrando que houve degradação da mesma (ZULUAGA et al., 2009; SIQUEIRA et al., 2010b).

Para todas as amostras analisadas no presente trabalho, não há presença da banda na região de 1400 cm^{-1} , porém para as amostras da hidrólise enzimática com xilanase, esta fica visível. Segundo Siqueira et al. (2010b) este pico é originário de grupos metoxil presentes na lignina, ou seja, a celulose foi degradada, mas ainda aparecem resíduos de lignina, colaborando com a aparência das suspensões, as quais não ficaram totalmente brancas. Este pico também indica a existência de anéis aromáticos e ligações C-H (lignina) (LIU et al., 2008).

Os espectros das amostras tratadas com o complexo celulase, mostraram que a adição desta etapa no processo de hidrólise não foi eficiente para isolar NFCs, pois a ação das enzimas em conjunto é muito intensa e degrada a celulose à açúcares.

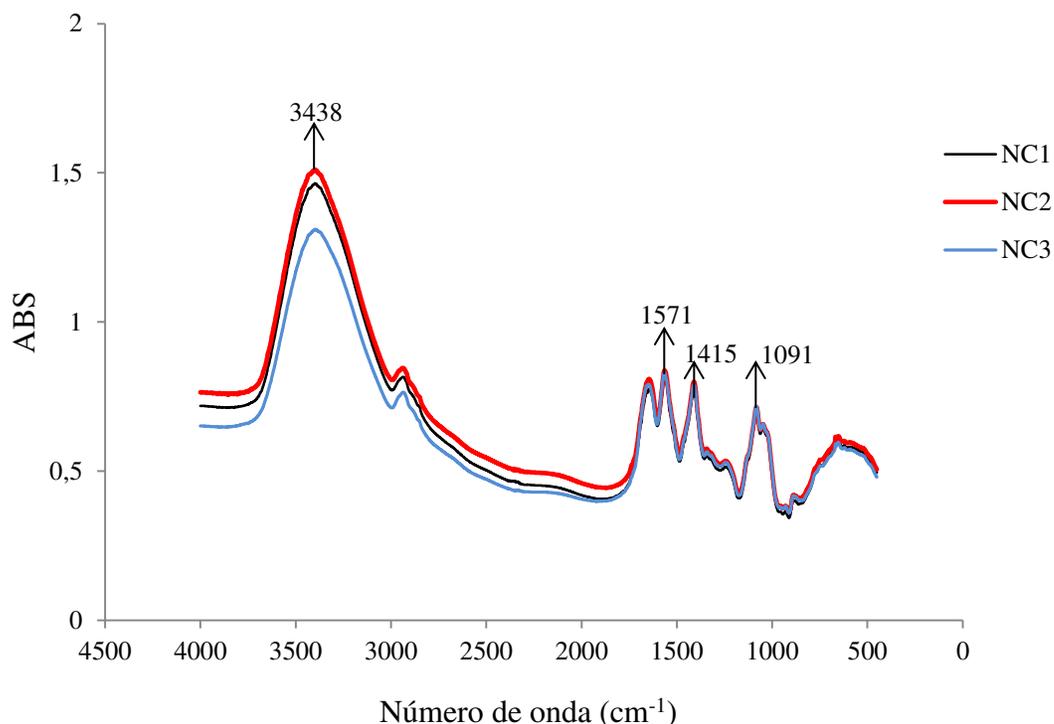


Figura 5.4 - Espectros de FTIR obtidos para as amostras obtidas da hidrólise com enzimas xilanase ($T= 55\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH } 6,0$, $[\text{E}] 30\text{ U/g}$ e $[\text{S}] 15\%$) e celulase: NC1 ($T= 40\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH } 4,0$, $[\text{E}] 20\text{ U/g}$ e $[\text{S}] 15\%$); NC2 ($T= 50\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH } 5,0$, $[\text{E}] 30\text{ U/g}$ e $[\text{S}] 15\%$) e NC3 ($T= 60\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH } 6,0$, $[\text{E}] 40\text{ U/g}$ e $[\text{S}] 15\%$). Sendo que U é definido como $1\text{ }\mu\text{L}$ de xilose/glicose liberada por mL de enzima

5. 3. 2. 3 Índice de cristalinidade (Icr%)

A análise da cristalinidade confirmou a hipótese de que a celulose foi degradada pelo complexo celulolítico celulase. As amostras tratadas com xilanase mais celulase (NC1, NC2 e NC3) apresentaram índice de cristalinidade de 12,7%, 20,7% e 14,8%, respectivamente, valores semelhantes ao encontrado para o farelo não tratado (15%).

Nota-se que houve um decréscimo muito grande do Icr % em comparação com as amostras tratadas somente com xilanase, que apresentaram Icr% entre 48,1% e 61,0%. O decréscimo do índice de cristalinidade em comparação com as demais amostras ocorreu devido à degradação da celulose cristalina pela ação sinérgica das enzimas endoglucanase e exoglucanase. Segundo Siqueira et al. (2010b), a celulose cristalina é altamente resistente ao ataque enzimático, pois a maioria das ligações glicosídicas na microfibrila são

inacessíveis às enzimas. Assim, todas as ligações clivadas pela ação das endoglucanases foram modificadas devido à orientação estável das ligações glicosídicas.

O fato do intenso decréscimo do $I_{cr}\%$ das amostras submetidas a etapa de hidrólise com celulase, pode ser explicado pela observação do difratograma das amostras obtidas por hidrólise enzimática com xilanase e celulase em comparação com o difratograma obtido para a amostra N6 do tratamento com enzima xilanase do capítulo 4 (Figura 5.5 e 5.6). Este exhibe claramente regiões largas, que são características de estrutura amorfa. A reação com o complexo celulolítico promoveu a redução de ligações de hidrogênio intra e intermolecular, que ocorreram durante a contínua transformação de celulose I em celulose amorfa (CIOLACU et al., 2011). Além disso, o $I_{cr}\%$ é representado pela inclinação do pico ($2\theta = 16^\circ$ e $2\theta = 22^\circ$), e fica evidente que a intensidade destes picos foi reduzida.

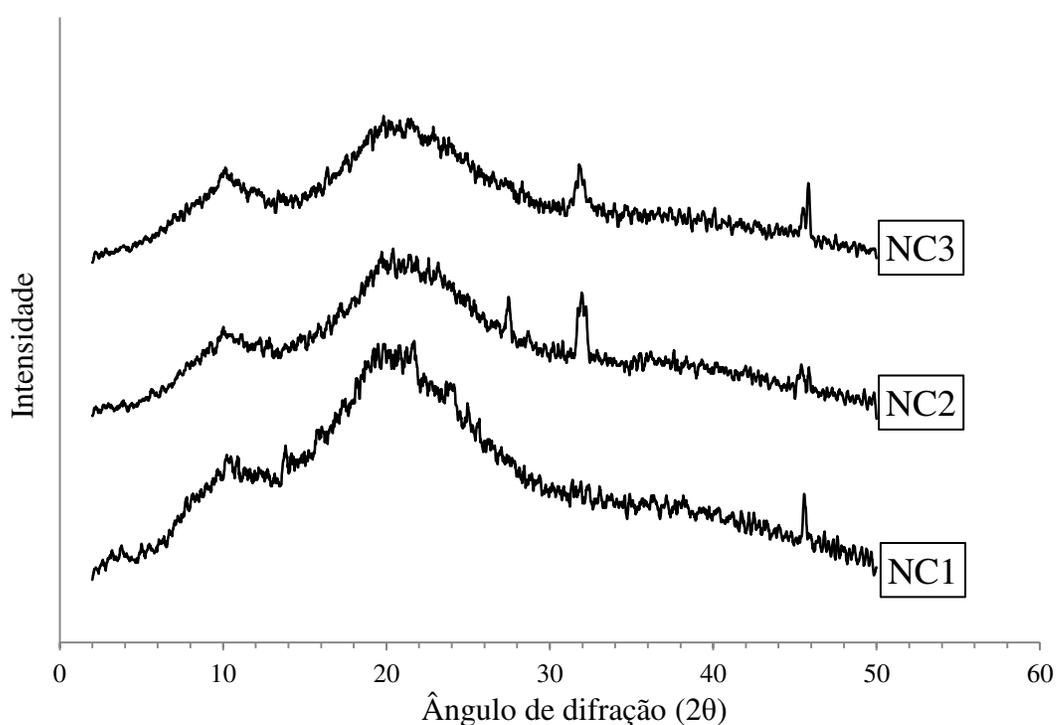


Figura 5.5 - Padrão da difração de raio-X das amostras obtidas por hidrólise enzimática com xilanase ($T= 55^\circ\text{C}$, $\text{pH } 6,0$, $[\text{E}] 30 \text{ U/g}$ e $[\text{S}] 15\%$) e celulase: NC1 ($T= 40^\circ\text{C}$, $\text{pH } 4,0$, $[\text{E}] 20 \text{ U/g}$ e $[\text{S}] 15\%$); NC2 ($T= 50^\circ\text{C}$, $\text{pH } 5,0$, $[\text{E}] 30 \text{ U/g}$ e $[\text{S}] 15\%$) e NC3 ($T= 60^\circ\text{C}$, $\text{pH } 6,0$, $[\text{E}] 40 \text{ U/g}$ e $[\text{S}] 15\%$). Sendo que U é definido como $1 \mu\text{L}$ de xilose/glicose liberada por mL de enzima

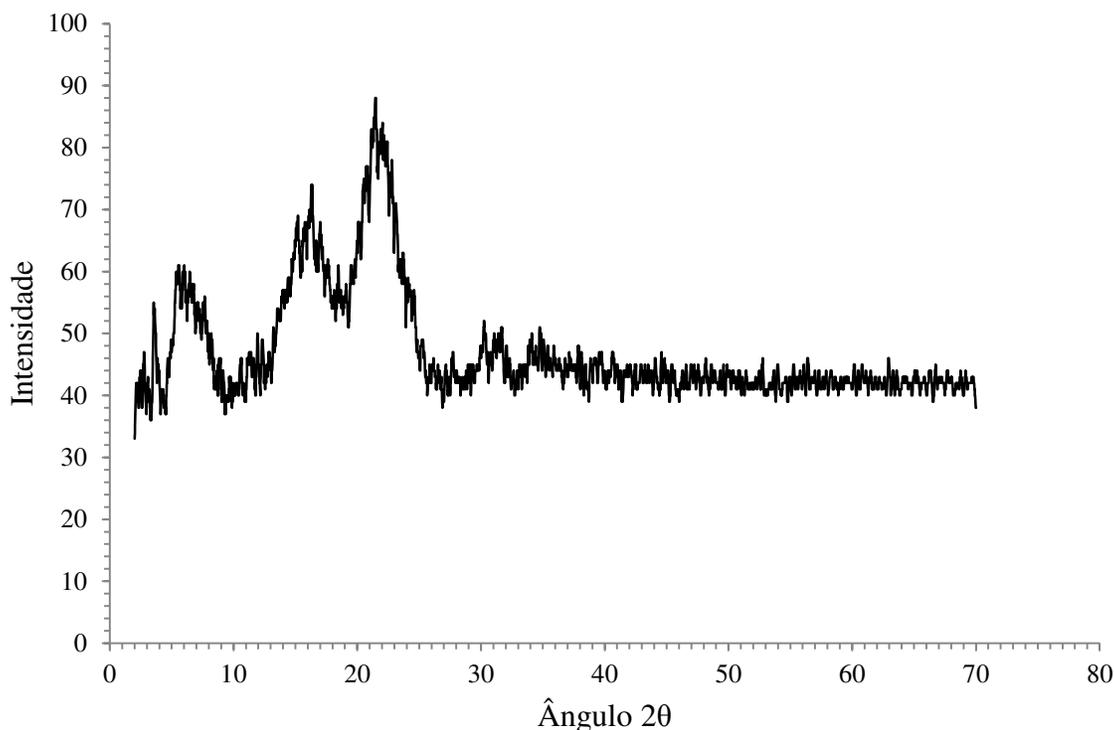


Figura 5.6 - Padrão da difração de raio-X da amostra obtida por hidrólise enzimática com xilanase: N6 (T = 55 °C, pH 4,0, [E] 70 U/g e [S] 15%), sendo U definido como quantidade de xilose liberada por minuto por mL de enzima

A análise de carga superficial fornece informações sobre a estabilidade das suspensões coloidais. A Tabela 5.2 apresenta os valores de PZ para as amostras obtidas por hidrólise enzimática com xilanase e celulase.

A partir destes resultados observa-se que as suspensões obtidas não tem potencial para ser utilizadas como material de reforço em compósitos. Em relação a carga superficial as amostras apresentaram diferença significativa entre si ($p < 0,005$). Entretanto, as suspensões obtidas não são consideradas estáveis. Isto pode ser explicado pelo fato de que, o produto gerado da hidrólise com o complexo celulolítico, é formado por carboidratos. Desta forma, a etapa de hidrólise com celulase é dispensável, visto que quando o potencial zeta é baixo, a atração de repulsão excede e a suspensão irá flocular e formar agregados (THOLSTRUP SEJERSEN et al., 2007). Observou-se que a amostra NC1 apresenta valor positivo, diferente de todos os resultados já obtidos para nanofibras de celulose. Tal fato pode ser explicado pela presença de resíduos de amido (carga superficial positiva) em

contato com a superfície da fibra de celulose (carga superficial negativa) altera a carga da fibra para positiva (PANDOCHI, 2009).

Tabela 5.2 - Potencial zeta das suspensões obtidas por hidrólise enzimática com xilanase e celulase

Amostra	PZ (mV)
NC1	3,4 ± 0,0 ^a
NC2	-11,1 ± 0,4 ^b
NC3	-8,6 ± 0,7 ^c

5. 3. 2. 4 Determinação de açúcares redutores totais (ART)

A partir de amostras do sobrenadante obtido após 2 horas de hidrólise com celulase (Figura 5.7), analisou-se a concentração de açúcares redutores formados ao final de todo processo. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 5.3. A quantificação dos açúcares redutores totais (ART), resultantes da hidrólise enzimática com xilanase e celulase, confirma o fato de que a estrutura da celulose foi modificada e reduzida à açúcares (glicose, xilose, frutose, entre outros). A hidrólise das cadeias de hemicelulose resulta em moléculas de arabinose e xilose, também, esta porção amorfa pode liberar oligômeros compostos de muitas moléculas de açúcares, as quais podem ser quebradas em moléculas ainda menores (OGEDA e PETRI, 2010).

Observa-se que a amostra obtida nos níveis mais elevados de estudos (NC3), teve a maior concentração de açúcar redutor formado (130,4 mg/g farelo seco tratado com xilanase), em base inicial de farelo seco tratado com enzima xilanase. Nestas condições, as enzimas do complexo celulolítico tiveram uma atuação mais intensa na degradação da celulose. De acordo com Castro e Pereira Jr (2010), as celulasas são enzimas que constituem um complexo capaz de atuar sobre materiais celulósicos, promovendo sua hidrólise. Estas enzimas são altamente específicas e atuam em sinergia na liberação de açúcares, dos quais glicose é o que se concentra em maior quantidade e desperta maior interesse industrial.

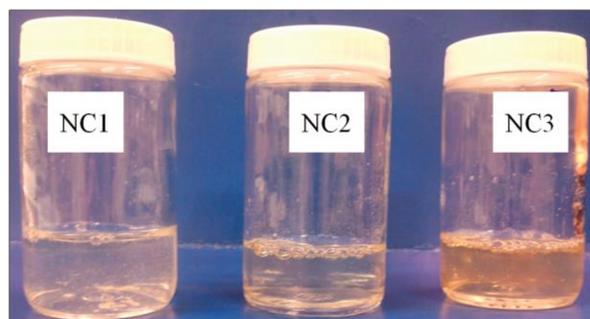


Figura 5.7 - Sobrenadante após hidrólise do farelo com xilanase (24 h) e celulase (2 h)

Tabela 5.3 - Concentração de açúcar redutor formado após hidrólise enzimática com xilanase e celulase

Amostra	ART (mg/g _{farelosecotratado} xilanase)
NC1	97,3
NC2	122,4
NC3	130,4

5. 3. 2. 4. 1 Determinação do teor de glicose nas suspensões coloidais por UPLC

A glicose é o principal açúcar produzido durante a hidrólise enzimática com celulasas, desta forma determinou-se o teor deste produzido na reação, em base no farelo seco tratado com enzima xilanase. Os valores da concentração de glicose são obtidos são apresentados na Tabela 5.4. Durante a análise, através do monitoramento de picos gerados pela glicose, foi possível identificar nos cromatogramas (Figura 5.8, 5.9 e 5.10) a presença de glicose na suspensão final de cada amostra NC1, NC2 e NC3, respectivamente.

Tabela 5.4 - Concentração de glicose formada após hidrólise enzimática com xilanase e celulase

Amostra	Glicose (mg/g _{farelotratado} xilanase)
NC1	11,4
NC2	19,6
NC3	18,2

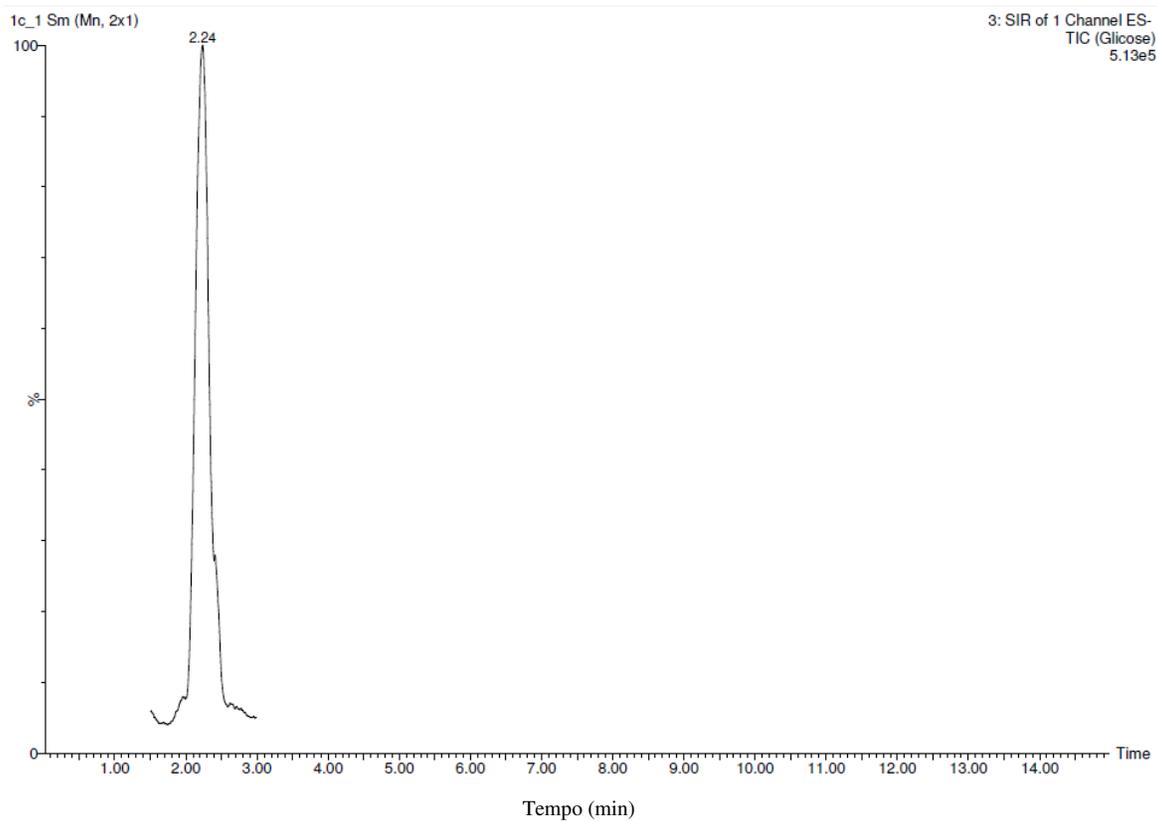


Figura 5.8 - Cromatograma da presença de glicose na amostra NC1 ($T= 40\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH } 4,0$, $[\text{E}] 20\text{ U/g}$ e $[\text{S}] 15\%$), sendo que U é definido como $1\text{ }\mu\text{L}$ de xilose/glicose liberada por mL de enzima

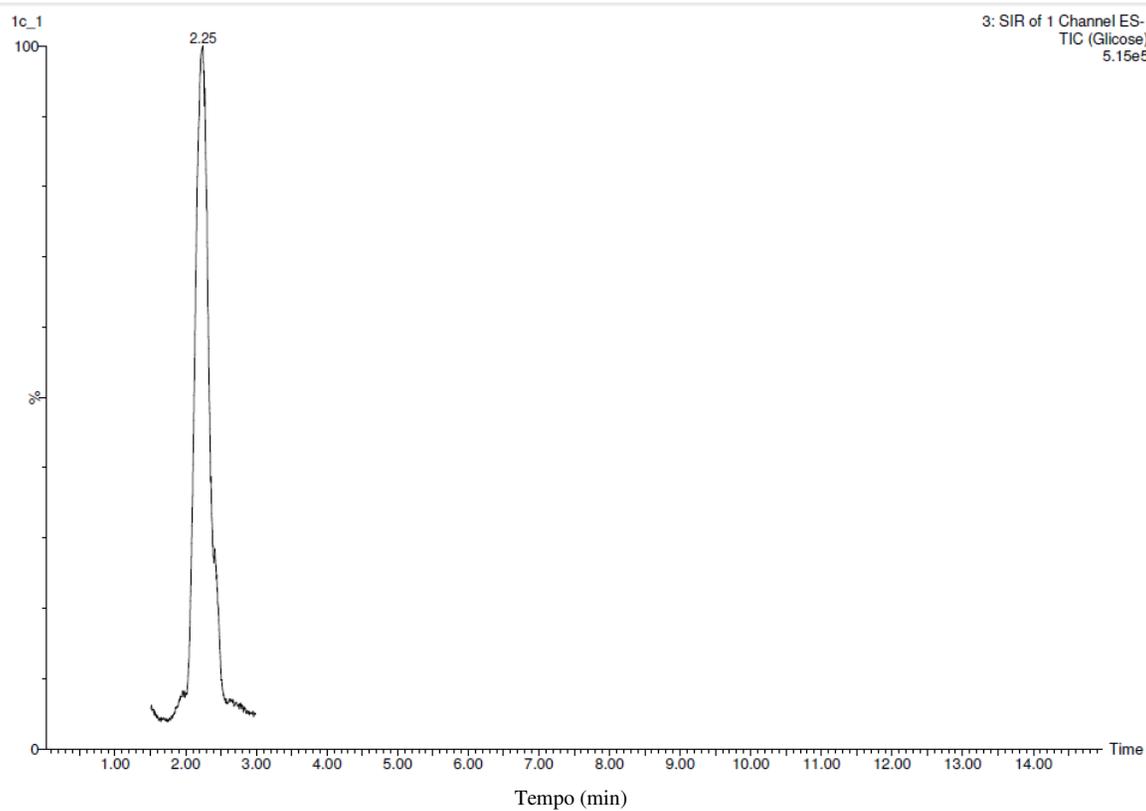


Figura 5.9 - Cromatograma da presença de glicose na amostra NC2 ($T = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH } 5,0$, $[\text{E}] 30\text{ U/g}$ e $[\text{S}] 15\%$), sendo que U é definido como $1\text{ }\mu\text{L}$ de xilose/glicose liberada por mL de enzima

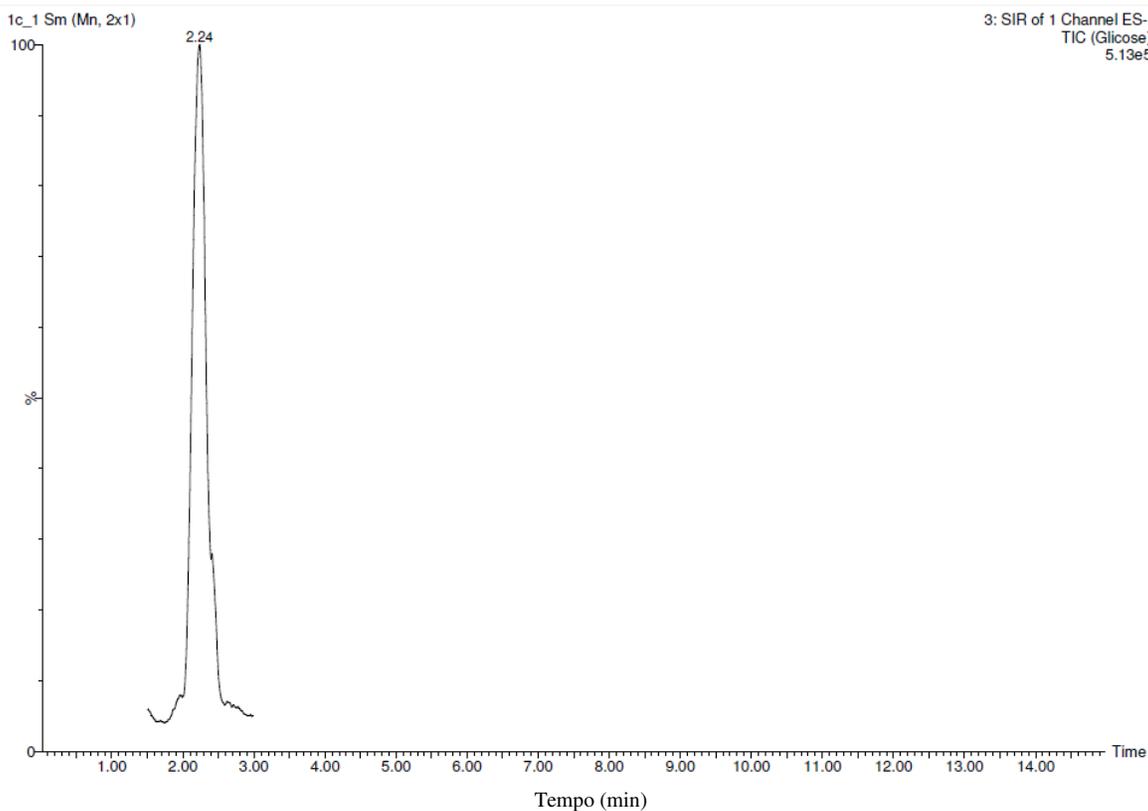


Figura 5.10 - Cromatograma da presença de glicose na amostra NC3 (T= 60 °C, pH 6,0, [E] 40 U/g e [S] 15%), sendo que U é definido como 1 μ L de xilose/glicose liberada por mL de enzima

A ação das enzimas celulolíticas no processo de hidrólise é iniciada pelas endoglucanases, que atacam as regiões de baixa cristalinidade da fibra de celulose, produzindo oligossacarídeos de menor peso molecular. Portanto, as exoglucanases iniciam a hidrólise das extremidades da cadeia, removendo unidades de celobiose. As celobiasas ou β -glicosidades completam a hidrólise catalisando a hidrólise da celobiose a glicose. Finalmente, as celobiasas hidrolisam a celobiose e as celodextrinas solúveis em água, à glicose (CASTRO e PEREIRA JR, 2010).

5.4 CONCLUSÃO

Nanofibras de celulose não foram produzidas através da metodologia adicionando mais um etapa de hidrólise enzimática (xilanase + complexo celulolítico). As três enzimas que atuam em sinergismo, promovem a degradação da celulose à glicose. O produto obtido,

glicose, é de grande interesse industrial, visto que pode ser convertido a vários outros produtos, como etanol, que agregam valor aos resíduos agroindustriais. Este método pode ser considerado promissor e ambientalmente amigável, porém foi prejudicial para produzir NFCs, não sendo necessário utilizar ambas as enzimas (xilanase e celulase) para este fim. Quando realizado o tratamento com enzima xilanase já foi possível obter NFCs e, para melhorar suas propriedades e aumentar rendimento de produto, somente a enzima endoglucanase, do complexo celulolítico, deve ser usada, pois ela atua nas regiões específicas (amorfas). A enzima endoglucanase já é comercializada purificada, ou seja, novos estudos podem ser realizados a partir da utilização desta na hidrólise enzimática, em conjunto com a enzima xilanase para produção de NFCs.

CONCLUSÕES GERAIS

Os estudos realizados demonstraram o potencial uso de um resíduo agrícola (casca da banana) para produção de subprodutos de maior valor agregado. As nanofibras de celulose produzidas a partir dessa matéria-prima, através de hidrólise enzimática, apresentaram características ideais para aplicação como agente de reforço em compósitos. O farelo da casca de banana verde (*Musa paradisiaca*) apresentou teor de celulose (7,5%), que é um material estrutural extremamente forte, pois apresenta rigidez axial, sendo esta uma propriedade desejável para uma fibra de reforço.

Neste trabalho foram obtidas nanofibras de celulose a partir da casca de banana verde pelo método de tratamento alcalino seguido de hidrólise com enzima xilanase. Os processos envolvidos se mostraram eficazes na remoção de componentes amorfos presentes no farelo e, também apresentaram potencial para aumentar a cristalinidade do material e para obter cargas superficiais eletronegativas das nanofibras. As características exibidas pelas NFCs são de extrema importância para conseguir-se uma boa dispersão e adesão do reforço em uma matriz polimérica.

A hidrólise enzimática mostrou-se ser um método promissor para isolar NFCs de fontes vegetais. Os fatores estudados pH, temperatura, concentração de enzima e concentração de substrato, mostraram ser eficientes em uma ampla faixa de estudo, ou seja, com a variação dos níveis de estudo, o processo ainda é eficaz para produção de NFCs. Apesar das rotas enzimáticas apresentarem alto custo de produção, podem ser detectados pontos importantes, tanto na economia (ponto de vista energético), por usar condições brandas no processo, como em todas as vantagens que pode trazer, como a sustentabilidade do meio ambiente.

A etapa de hidrólise enzimática com celulase foi adicionada ao processo após definir a melhor condição do tratamento com xilanase. O complexo celulolítico não apresentou resultados de interesse para o objetivo deste trabalho, visto que a ação sinérgica das três enzimas que o compõe, tem a capacidade de degradar as cadeias de celulose à glicose, produto de grande interesse industrial quando a finalidade é a sua conversão em etanol, por exemplo.

O presente trabalho apresenta um novo processo que pode ser utilizado para recuperar nanofibras de celulose (material de elevado valor) a partir de um resíduo agrícola. A hidrólise enzimática é um método relativamente novo na área de produção de nanopartículas de celulose de fibras vegetais e, apresenta potencial uso para o fim proposto. A realização deste estudo mostrou a potenciabilidade da casca de banana verde como matéria-prima para o isolamento de NFCs. Tanto a hidrólise enzimática, quanto a alternativa de propor um fim para a casca, favorecem o apelo ambiental do processo como um todo.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

O desenvolvimento de processos ambientalmente amigáveis e produtos feitos com o uso de materiais biodegradáveis é um desafio na atualidade, que conseqüentemente, atinge o futuro próximo. As nanofibras de celulose têm demonstrado grande interesse como agente de reforço em compósitos. A partir dos resultados obtidos no presente trabalho, identificam-se futuras linhas de pesquisa que podem ser exploradas nesta área:

- Estudar a potenciabilidade do aproveitamento integral da banana verde (*Musa paradisiaca*) através da utilização do amido (extraído da polpa) como matéria-prima para elaboração de embalagens biodegradáveis, propondo uma alternativa para o uso comercial desta fruta;
- Incorporar as nanofibras de celulose obtidas por hidrólise enzimática, como agente de reforço em compósitos biodegradáveis;
- Avaliar a eficiência de reforço das nanofibras de celulose em base nas propriedades mecânicas e de barreira dos nanocompósitos em função da concentração de nanofibras, abordando também o estudo de isoterms de sorção;
- Determinar a permeabilidade ao oxigênio dos nanocompósitos a fim de identificar possíveis aplicações como materiais de embalagem e/ou coberturas comestíveis;
- Realizar um estudo comparativo dos filmes incorporados com nanofibras obtidas pelo método enzimático e pelo método químico;
- Estudar a degradação em solo e de estabilidade dos nanocompósitos durante seu armazenamento e/ou utilização, submetendo-os a diferentes condições de radiação UV, luz solar, oxigênio e umidade;
- Avaliar a toxicologia das nanofibras de celulose frente à saúde humana;
- Aplicar coberturas comestíveis à base de amido de banana reforçadas com nanofibras de celulose em produtos frescos;
- Estudar o efeito das coberturas sobre algumas características de qualidade de produtos frescos, bem como estimar a vida útil desses produtos;

- Estudar a migração das nanofibras de celulose presente na cobertura para o alimento.

REFERÊNCIAS

- ALEMDAR, A., & SAIN, M. Biocomposites from wheat straw nanofibers: Morphology, thermal and mechanical properties. **Composites Science and Technology**, v. 68, n. 2, p. 557-565, 2008.
- ALONSO, D. M., WETTSTEIN, S. G., & DUMESIC, J. A. **Bimetallic catalysts for upgrading of biomass to fuels and chemicals**. *Chemical Society Reviews: RSC*. 41: 7965-8216 p. 2012.
- ANDRADE-MAHECHA, M. M. **Microcompósitos, Nanocompósitos e Coberturas a Base de Materiais Biodegradáveis Obtidos a partir do Biri (Canna Indica L.)**. 2012. Tese Doutorado em Engenharia de Alimentos. Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- BARDIYA, N., SOMAYAJI, D., & KHANNA, S. Biomethanation of banana peel and pineapple waste. **Bioresource Technology**, v. 58, n. 1, p. 73-76, 1996.
- BHARDWAJ, N. K., DUONG, T. D., HOANG, V., & NGUYEN, K. L. Determination of fiber charge components of Lo-Solids unbleached kraft pulps. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 274, n. 2, p. 543-549, 2004.
- BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 18, n. 5, p. 355-383, 2000.
- BHATNAGAR, A. Processing of Cellulose Nanofiber-reinforced Composites. **Journal of Reinforced Plastics and Composites**, v. 24, n. 12, p. 1259-1268, 2005.
- BHATTACHARYA, D., GERMINARIO, L. T., & WINTER, W. T. Isolation, preparation and characterization of cellulose microfibrils obtained from bagasse. **Carbohydrate Polymers**, v. 73, n. 3, p. 371-377, 2008.
- BONDESON, D., MATHEW, A., & OKSMAN, K. Optimization of the isolation of nanocrystals from microcrystalline cellulose by acid hydrolysis. **Cellulose**, v. 13, n. 2, p. 171-180, 2006.
- CAO, Y., & TAN, H. Effects of cellulase on the modification of cellulose. **Carbohydrate Research**, v. 337, n. 14, p. 1291-1296, 2002.
- CASTRO, A. M. D., & PEREIRA JR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, n., p. 181-188, 2010.
- CHEETHAM, N. W. H., & TAO, L. Variation in crystalline type with amylose content in maize starch granules: an X-ray powder diffraction study. **Carbohydrate Polymers**, v. 36, n. 4, p. 277-284, 1998.

CHEN, D. **Biocomposites Reinforced with Cellulose Nanocrystals Derived from Potato Peel Waste**. 2011. Dissertação Mestrado em Ciências Aplicadas. Faculdade de Pós-Graduação Ciências Aplicadas, McMaster University

CHEN, S.-L., WANG, S., & LUCIA, L. A. New insights into the fundamental nature of lignocellulosic fiber surface charge. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 275, n. 2, p. 392-397, 2004.

CHERIAN, B. M., POTHAN, L. A., NGUYEN-CHUNG, T., MENNIG, G., KOTTAISAMY, M., & THOMAS, S. A novel method for the synthesis of cellulose nanofibril whiskers from banana fibers and characterization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 14, p. 5617-5627, 2008a.

CHERIAN, B. M., POTHAN, L. A., NGUYEN-CHUNG, T., MENNIG, G. N., KOTTAISAMY, M., & THOMAS, S. A Novel Method for the Synthesis of Cellulose Nanofibril Whiskers from Banana Fibers and Characterization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 14, p. 5617-5627, 2008b.

CIOLACU, D., CIOLACU, F., & POPA, V. I. Amorphous cellulose—structure and characterization. **Cellulose chemistry and technology**, v. 45, n. 1, p. 13, 2011.

CLOWES, F. A. L., & JUNIPER, B. E. **Plant cell**. Publications, B. S. (Ed.): Oxford, 1968.

DEEPA, B., ABRAHAM, E., CHERIAN, B. M., BISMARCK, A., BLAKER, J. J., POTHAN, L. A., LEO, A. L., DE SOUZA, S. F., & KOTTAISAMY, M. Structure, morphology and thermal characteristics of banana nano fibers obtained by steam explosion. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 2, p. 1988-1997, 2011.

DUFRESNE, A., CAVAILLÉ, J. Y., & VIGNON, M. R. Mechanical behavior of sheets prepared from sugar beet cellulose microfibrils. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 64, n. 6, p. 1185-1194, 1997.

DUFRESNE, A., DUPEYRE, D., & VIGNON, M. R. Cellulose Microfibrils from Potato Tuber Cells: Processing and Characterization of Starch-Cellulose Microfibril Composites. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 76, n. 14, p. 2080-2092, 2000.

DURÁN, N., LEMES, A. P., DURÁN, M., FREER, J., & BAEZA, J. A minireview of cellulose nanocrystals and its potential integration as co-product in bioethanol production. **Journal of the Chilean Chemical Society**, v. 56, n. 2, p. 672-677, 2011.

ELANTHIKKAL, S., GOPALAKRISHNAPANICKER, U., VARGHESE, S., & GUTHRIE, J. T. Cellulose microfibrils produced from banana plant wastes: Isolation and characterization. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, n. 3, p. 852-859, 2010.

ESMERALDO, M. A. **Preparação de novos compósitos suportados em matriz de fibra vegetal/natural**. 2006. Dissertação Mestrado em Química Inorgânica. Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

- FAGURY, R. V. G. **Avaliação de fibras naturais para a fabricação de compósitos: Açai, coco e juta**. 2005. Dissertação Mestrado em Engenharia Mecânica. Universidade Federal do Pará, Belém.
- FARUK, O., BLEDZKI, A. K., FINK, H. P., & SAIN, M. Biocomposites reinforced with natural fibers: 2000-2010. **Progress in Polymer Science**, v. 37, n. 11, p. 1552-1596, 2012.
- FASSANELLA, C. C. **Ação das enzimas ligninolíticas produzidas por *Aspergillus niger* e *Penicillium* sp. em bagaço de cana-de-açúcar tratado quimicamente**. 2008. Dissertação Mestrado em Agronomia. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- FENGEL, D., & WEGENER, G. **Wood Chemistry, Ultrastructure, reactions**. Gruyter, W. d. (Ed.): Berlin, 1989.
- GARDNER, D. J., OPORTO, G. S., MILLS, R., & SAMIR, M. A. S. A. Adhesion and surface issues in cellulose and nanocellulose. **Journal of Adhesion Science and Technology**, v. 22, n. 5-6, p. 545-567, 2008.
- GEORGE, J., RAMANA, K. V., BAWA, A. S., & SIDDARAMAIAH. Bacterial cellulose nanocrystals exhibiting high thermal stability and their polymer nanocomposites. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 48, n. 1, p. 50-57, 2011.
- GEORGE, J., SREEKALA, M. S., & THOMAS, S. A. A review on interface modification and characterization of natural fiber reinforced plastic composites. **Polymer Engineering and Science**, v. 41, n., p. 1471-1485, 2001.
- GIORDANO, P. C., BECCARIA, A. J., & GOICOECHEA, H. C. Significant factors selection in the chemical and enzymatic hydrolysis of lignocellulosic residues by a genetic algorithm analysis and comparison with the standard Plackett–Burman methodology. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 22, p. 10602-10610, 2011.
- GONÇALVES, L. C. **Utilização do pseudocaule de bananeira como substrato da fermentação alcoólica: avaliação de diferentes processos de despolimerização**. 2011. Dissertação Mestrado. Engenharia de Processos, Universidade da Região de Joinville – Univille, JOINVILLE.
- GOULART, A. J., CARMONA, E. C., & MONTI, R. Partial purification and properties of cellulase-free alkaline xylanase produced by *Rhizopus stolonifer* in solid-state fermentation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n., p. 327-333, 2005.
- HABIBI, Y., LUCIA, L. A., & ROJAS, O. J. Cellulose nanocrystals: Chemistry, self-assembly, and applications. **Chemical Reviews**, v. 110, n. 6, p. 3479-3500, 2010.
- HAPPI EMAGA, T., ROBERT, C., RONKART, S. N., WATHELET, B., & PAQUOT, M. Dietary fibre components and pectin chemical features of peels during ripening in banana and plantain varieties. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 10, p. 4346-4354, 2008.

- HASSAN, M., HASSAN, E., & OKSMAN, K. Effect of pretreatment of bagasse fibers on the properties of chitosan/microfibrillated cellulose nanocomposites. **Journal of Materials Science**, v. 46, n. 6, p. 1732-1740, 2011.
- HASSAN, M., MATHEW, A., HASSAN, E., & OKSMAN, K. Effect of Pretreatment of Bagasse Pulp on Properties of Isolated Nanofibers and Nanopaper Sheets. **Wood and Fiber Science**, v. 42, n. 3, p. 362-376, 2010.
- HENRIKSSON, M., HENRIKSSON, G., BERGLUND, L. A., & LINDSTRÖM, T. An environmentally friendly method for enzyme-assisted preparation of microfibrillated cellulose (MFC) nanofibers. **European Polymer Journal**, v. 43, n. 8, p. 3434-3441, 2007.
- HONGMING, M., ZENG, J., REALFF, M. L., KUMAR, S., & SCHIRALDI, D. A. Processing, structure, and properties of fibers from polyester/carbon nanofiber composites. **Composites Science and Technology**, v. 63, n. 11, p. 1617-1628, 2003.
- HUBBE, M. A., ROJAS, O. J., LUCIA, L. A., & SAIN, M. Cellulosic nanocomposites: A review. **BioResources**, v. 3, n. 3, p. 929-980, 2008.
- IOELOVICH, M. Cellulose as a nanostructured polymer: A short review. **BioResources**, v. 3, n. 4, p. 1403-1418, 2008.
- ISIL, S., & NILUFER, A. Investigation of factors affecting xylanase activity from *Trichoderma harzianum* 1073 D3. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n., p. 187-193, 2005.
- JOHN, M., & THOMAS, S. Biofibres and biocomposites. **Carbohydrate Polymers**, v. 71, n. 3, p. 343-364, 2008.
- KANG, H. J., & MIN, S. C. Potato peel-based biopolymer film development using high-pressure homogenization, irradiation, and ultrasound. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, n. 6, p. 903-909, 2010.
- KAUSHIK, A., & SINGH, M. Isolation and characterization of cellulose nanofibrils from wheat straw using steam explosion coupled with high shear homogenization. **Carbohydrate Research**, v. 346, n. 1, p. 76-85, 2011.
- KAUSHIK, A., SINGH, M., & VERMA, G. Green nanocomposites based on thermoplastic starch and steam exploded cellulose nanofibrils from wheat straw. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, n. 2, p. 337-345, 2010.
- LEHNINGER, A. L., NELSON, D. L., & COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. Sarvier (Ed.): São Paulo, 2002.

- LIU, Q., WANG, S., ZHENG, Y., LUO, Z., & CEN, K. Mechanism study of wood lignin pyrolysis by using TG-FTIR analysis. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 82, n. 1, p. 170-177, 2008.
- LODISH, H., BERK, A., S, L. Z., MATSUDAIRA, P., BALTIMORE, D., & DARNELL., J. The Dynamic Plant Cell Wall. In: Freeman, W. H. (Ed.). **Molecular Cell Biology**. 14th. New York, 2000.
- MALI, S., GROSSMANN, M. V. E., & YAMASHITA, F. Filmes de amido: produção, propriedades e potencial de utilização. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n., p. 137-156, 2010.
- MARCOVICH, N. E., REBOREDO, M. M., & ARANGUREN, M. I. FTIR spectroscopy applied to woodflour. **Composite Interfaces**, v. 4, n., p. 119-132, 1996.
- MEYABADI, T. F., & DADASHIAN, F. Optimization of Enzymatic Hydrolysis of Waste Cotton Fibers for Nanoparticles Production Using Response Surface Methodology. **Fibers and Polymers**, v. 13, n. 3, p. 313-321, 2012.
- MILLER, G. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal Chem**, v. 31, n., p. 426-428, 1959.
- MOHANA, S., SHAH, A., DIVECHA, J., & MADAMWAR, D. Xylanase production by Burkholderia sp. DMAX strain under solid state fermentation using distillery spent wash. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 16, p. 7553-7564, 2008.
- MOHAPATRA, D., MISHRA, S., & SUTAR, N. Banana and its by-product utilization: an overview. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 69, n., p. 323-329, 2010.
- MUSSATTO, S. I., FERNANDES, M., MILAGRES, A. M. F., & ROBERTO, I. C. Effect of hemicellulose and lignin on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, n. 2, p. 124-129, 2008.
- NUWAMANYA, E., BAGUMA, Y., N N EMMAMBUX, & RUBAIHAYO, P. Crystalline and Pasting Properties of Cassava Starch are Influenced by its Molecular Properties. **African Journal of Food Science**, v. 4, n., p. 8-15, 2010.
- OGEDA, T. L., & PETRI, D. F. S. Biomass enzymatic hydrolysis. **Hidrólise enzimática de biomassa**, v. 33, n. 7, p. 1549-1558, 2010.
- OLIVEIRA, L., CORDEIRO, N., EVTUGUIN, D. V., TORRES, I. C., & SILVESTRE, A. J. D. Chemical composition of different morphological parts from 'Dwarf Cavendish' banana plant and their potential as a non-wood renewable source of natural products. **Industrial Crops and Products**, v. 26, n. 2, p. 163-172, 2007.
- OLIVEIRA, L., EVTUGUIN, D., CORDEIRO, N., & SILVESTRE, A. J. D. Structural characterization of stalk lignin from banana plant. **Industrial Crops and Products**, v. 29, n. 1, p. 86-95, 2009.

PÄÄKKO, M., ANKERFORS, M., KOSONEN, H., NYKÄNEN, A., AHOLA, S., ÖSTERBERG, M., RUOKOLAINEN, J., LAINE, J., LARSSON, P. T., IKKALA, O., & LINDSTRÖM, T. Enzymatic hydrolysis combined with mechanical shearing and high-pressure homogenization for nanoscale cellulose fibrils and strong gels. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 6, p. 1934-1941, 2007.

PANDOCHI, L. **Estudo do comportamento coloidal de suspensão de fibra de celulose, carbonato de cálcio, amido catiônico : variação da força iônica e do pH**. 2009. Dissertação Mestrado. Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" Araraquara.

PELLISSARI, F., SOBRAL, P. A., & MENEGALLI, F. Isolation and characterization of cellulose nanofibers from banana peels. **Cellulose**, v. 21, n. 1, p. 417-432, 2014.

PELLISSARI, F. M., ANDRADE-MAHECHA, M. M., SOBRAL, P. J. D. A., & MENEGALLI, F. C. Isolation and characterization of the flour and starch of plantain bananas (*Musa paradisiaca*). **Starch - Stärke**, v. 64, n. 5, p. 382-391, 2012.

PÉREZ, J., MUÑOZ-DORADO, J., RUBIA, T., & MARTÍNEZ, J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. **International Microbiology**, v. 5, n. 2, p. 53-63, 2002.

PIRANI, S., & HASHAIKEH, R. Nanocrystalline cellulose extraction process and utilization of the byproduct for biofuels production. **Carbohydrate Polymers**, v. 93, n. 1, p. 357-363, 2013.

RAMALHO, J. B. V. S., & OLIVEIRA, M. C. K. Metodologia para determinação da distribuição do diâmetro de gotas em emulsões de petróleo do tipo água-óleo por difração a laser. **Boletim Técnico Petrobrás**, v. 42, n., p. 72-76, 1999.

RAMOS, L. P., NAZHAD, M. M., & SADDLER, J. N. Effect of enzymatic hydrolysis on the morphology and fine structure of pretreated cellulosic residues. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 15, n. 10, p. 821-831, 1993.

RÉFEGA, R. J. M. **Nanopartículas para Aplicação Biomédica**. 2010. Dissertação Mestrado em Engenharia de Materiais. Instituto Superior Técnico, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.

REGULY, J. C. **Biotechnologia dos Processos Fermentativos**. UFPEL, E. U. (Ed.): Pelotas, 1996.

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**, v. 81, n. 1, p. 83-92, 2010.

- SALES, M. R., DE MOURA, R. B., PORTO, T. S., DE MACEDO, G. R., & PORTO, A. L. F. Variáveis que influenciam a produção de celulasas e xilanase por espécies de *Aspergillus*. **Pesq. agropec. bras., Brasília**, v. 45, n. 11, p. 1290-1296, 2010.
- SANNINO, A., DEMITRI, C., & MADAGHIELE, M. Biodegradable Cellulose-based Hydrogels: Design and Applications. **Materials**, v. 2, n. 2, p. 353-373, 2009.
- SANTANA, R. C., PERRECHIL, F. A., SATO, A. C. K., & CUNHA, R. L. Emulsifying properties of collagen fibers: Effect of pH, protein concentration and homogenization pressure. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 4, p. 604-612, 2011.
- SANTOS, E. D. **Utilização de Enzimas Produzidas por *Trichoderma Reesei* e *Aspergillus Niger* na Extração de Óleos Essenciais**. 2008. Dissertação Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio De Mesquita Filho” Araraquara.
- SAO, K., SAMANTARAY, B., & BHATTACHERJEE, S. X-ray study of crystallinity and disorder in ramie fiber. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 52, n. 12, p. 1687-1694, 1994.
- SATYAMURTHY, P., JAIN, P., BALASUBRAMANYA, R. H., & VIGNESHWARAN, N. Preparation and characterization of cellulose nanowhiskers from cotton fibres by controlled microbial hydrolysis. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 1, p. 122-129, 2011.
- SEDAN, D., PAGNOUX, C., CHOTARD, T., SMITH, A., LEJOLLY, D., GLOAGUEN, V., & KRAUSZ, P. Effect of calcium rich and alkaline solutions on the chemical behaviour of hemp fibres. **Journal of Materials Science**, v. 42, n., p. 9336-9342, 2007.
- SEGAL, L., CREELY, J. J., MARTIN, A. E., & CONRAD, C. M. An Empirical Method for Estimating the Degree of Crystallinity of Native Cellulose Using the X-ray Diffractometer. **Textile Research Journal**, v. 29, n., p. 786-794, 1959.
- SILVA, A. C. E. **Estudo da Durabilidade de Compósitos Reforçados com Fibras de Celulose**. 2002. Dissertação Mestrado em Engenharia Civil. Departamento de Engenharia de Construção Civil, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- SILVA, D. D. J., & D'ALMEIDA, M. L. O. **Nanocristais de celulose - Cellulose whiskers**. *O Papel*. 70: 34-52 p. 2009.
- SILVA NETO, S. P. D., & GUIMARÃES, T. G. **Evolução da cultura da banana no Brasil e no mundo**. Planaltina, DF. *Embrapa Cerrados* 2011.
- SILVA, R., HARAGUCHI, S. K., MUNIZ, E. C., & RUBIRA, A. F. Applications of Lignocellulosic Fibers in Polymer Chemistry and in Composites. **Aplicações de fibras lignocelulosicas na química de polímeros e em compósitos**, v. 32, n. 3, p. 661-671, 2009.

SILVA, V. F. N. **Estudos de Pré-Tratamento e Sacarificação Enzimática de Resíduos Agroindustriais como Etapas no Processo de Obtenção de Etanol Celulósico**. 2009. Dissertação Mestrado em Ciências. Escola De Engenharia De Lorena – EEL, Universidade de São Paulo, Lorena.

SIQUEIRA, G., BRAS, J., & DUFRESNE, A. Cellulose whiskers versus microfibrils: Influence of the nature of the nanoparticle and its surface functionalization on the thermal and mechanical properties of nanocomposites. **Biomacromolecules**, v. 10, n. 2, p. 425-432, 2009.

SIQUEIRA, G., BRAS, J., & DUFRESNE, A. Cellulosic Bionanocomposites: A Review of Preparation, Properties and Applications. **Polymers**, v. 2, n. 4, p. 728-765, 2010a.

SIQUEIRA, G., BRAS, J., & DUFRESNE, A. Luffa cylindrica as a lignocellulosic source of fiber, microfibrillated cellulose, and cellulose nanocrystals. **BioResources**, v. 5, n. 2, p. 727-740, 2010b.

SIRO, I., & PLACKETT, D. Microfibrillated cellulose and new nanocomposite materials: a review. **Cellulose**, v. 17, n., p. 459-494, 2010.

SLUITER, A., HAMES, B., RUIZ, R., SACARLATA, C., SLUITER, J., & TEMPLETON, D. Determination os Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. **NREL. National renewable Energy Laboratory of Analytical procedure (LAP)**, n., 2008.

SLUITER, A., RUIZ, R., SACARLATA, C., SLUITER, J., & TEMPLETON, D. Determination of extractives in biomass. **NREL. National renewable Energy Laboratory of Analytical procedure (LAP)**, n., 2008.

SONESSO, M. F. C. **Obtenção e Caracterização de Nanocristais de Celulose a partir de Algodão Cru e Polpa Kraft**. 2011. Dissertação Mestrado em Engenharia Química. CENTRO TECNOLÓGICO, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

SUKUMARAN, R. K., SINGHANIA, R. R., MATHEW, G. M., & PANDEY, A. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production. **Renewable Energy**, v. 34, n. 2, p. 421-424, 2009.

SUN, J. Isolation and characterization of cellulose from sugarcane bagasse. **Polymer Degradation and Stability**, v. 84, n. 2, p. 331-339, 2004a.

SUN, J. X., XU, F., SUN, X. F., XIAO, B., & SUN, R. C. Physico-chemical and thermal characterization of cellulose from barley straw. **Polymer Degradation and Stability**, v. 88, n. 3, p. 521-531, 2005.

SUN, X.-F., JING, Z., FOWLER, P., WU, Y., & RAJARATNAM, M. Structural characterization and isolation of lignin and hemicelluloses from barley straw. **Industrial Crops and Products**, v. 33, n. 3, p. 588-598, 2011.

- SUN, X. Isolation and characterisation of cellulose obtained by a two-stage treatment with organosolv and cyanamide activated hydrogen peroxide from wheat straw. **Carbohydrate Polymers**, v. 55, n. 4, p. 379-391, 2004b.
- TERINTE, N., IBBETT, R., & SCHUSTER, K. C. Overview on Native Cellulose and Microcrystalline Cellulose I Structure Studied by X-Ray Diffraction (WAXD): Comparison between Measurement Techniques. **Lenzinger Berichte**, v. 89, n., p. 118-131, 2011.
- THOLSTRUP SEJERSEN, M., SALOMONSEN, T., IPSEN, R., CLARK, R., ROLIN, C., & BALLING ENGELSEN, S. Zeta potential of pectin-stabilised casein aggregates in acidified milk drinks. **International Dairy Journal**, v. 17, n. 4, p. 302-307, 2007.
- TOLAN, J., & FOODY, B. Cellulase from Submerged Fermentation. In: (Ed.). **Recent Progress in Bioconversion of Lignocellulosics**: Springer Berlin Heidelberg, v.65, 1999. cap. 3, p.41-67. (Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology).
- TONOLI, G. H. D., TEIXEIRA, E. M., CORRÊA, A. C., MARCONCINI, J. M., CAIXETA, L. A., PEREIRA-DA-SILVA, M. A., & MATTOSO, L. H. C. Cellulose micro/nanofibres from Eucalyptus kraft pulp: Preparation and properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, n. 1, p. 80-88, 2012.
- VAN SOEST, J. J. G., HULLEMAN, S. H. D., DE WIT, D., & Vliegenthart, J. F. G. Changes in the mechanical properties of thermoplastic potato starch in relation with changes in B-type crystallinity. **Carbohydrate Polymers**, v. 29, n. 3, p. 225-232, 1996.
- VÁRNAI, A., SIIKA-AHO, M., & VIKARI, L. Restriction of the enzymatic hydrolysis of steam-pretreated spruce by lignin and hemicellulose. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, n. 3-4, p. 185-193, 2010.
- VICENTINI, N. M., DUPUY, N., LEITZELMAN, M., CEREDA, M. P., & SOBRAL, P. J. A. Prediction of cassava starch edible film properties by chemometric analysis of infrared spectra. **Spectroscopy Letters**, v. 38, n. 6, p. 749-767, 2005.
- VIIKARI, L., KANTELINEN, A., SUNDQUIST, J., & LINKO, M. Xylanases in bleaching: From an idea to the industry. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 13, n. 2-3, p. 335-350, 1994.
- VOET, D., VOET, J. G., & PRATT, C. W. **Fundamentos de bioquímica**. Artmed (Ed.): Porto Alegre, 2000.
- VOET, D., VOET, J. G., & PRATT, C. W. **Fundamentos de Bioquímica**. Artmed (Ed.): Porto Alegre, 2002.
- WANG, B., SAIN, M., & OKSMAN, K. Study of Structural Morphology of Hemp Fiber from the Micro to the Nanoscale. **Applied Composite Materials**, v. 14, n. 2, p. 89-103, 2007.

- WHITNEY, S. E., GOTHARD, M. G., MITCHELL, J. T., & GIDLEY, M. J. Roles of cellulose and xyloglucan in determining the mechanical properties of primary plant cell walls. **Plant Physiol**, v. 121, n. 2, p. 675, 1999.
- WOEHL, M. A., CANESTRARO, C. D., MIKOWSKI, A., SIERAKOWSKI, M. R., RAMOS, L. P., & WYPYCH, F. Bionanocomposites of thermoplastic starch reinforced with bacterial cellulose nanofibres: Effect of enzymatic treatment on mechanical properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, n. 3, p. 866-873, 2010.
- WYMAN, C. E., DECKER, S. R., HIMMEL, M. E., BRADY, J. W., SKOPEC, C. E., & VIIKARI, L. **Hydrolysis of Cellulose and Hemicellulose**. Dekker, M. (Ed.), 2005.
- XU, F., SUN, J.-X., SUN, R., FOWLER, P., & BAIRD, M. S. Comparative study of organosolv lignins from wheat straw. **Industrial Crops and Products**, v. 23, n. 2, p. 180-193, 2006.
- YANG, H., YAN, R., CHEN, H., LEE, D. H., & ZHENG, C. Characteristics of hemicellulose, cellulose and lignin pyrolysis. **Fuel**, v. 86, n. 12-13, p. 1781-1788, 2007.
- YEOMAN, C. J., HAN, Y., DODD, D., SCHROEDER, C. M., MACKIE, R. I., & CANN, I. K. O. Chapter 1 - Thermostable Enzymes as Biocatalysts in the Biofuel Industry. In: (Ed.). **Advances in Applied Microbiology**: Academic Press, v. Volume 70, 2010. p.1-55.
- YU, Y., LOU, X., & WU, H. Some recent advances in hydrolysis of biomass in hot-compressed water and its comparisons with other hydrolysis methods. **Energy and Fuels**, v. 22, n. 1, p. 46-60, 2008.
- ZHANG, P., WHISTLER, R. L., BEMILLER, J. N., & HAMAKER, B. R. Banana starch: production, physicochemical properties, and digestibility—a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 59, n. 4, p. 443-458, 2005.
- ZHANG, Y. H. P., HIMMEL, M. E., & MIELENZ, J. R. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, v. 24, n. 5, p. 452-481, 2006.
- ZHAO, X., & LIU, D. Chemical and thermal characteristics of lignins isolated from Siam weed stem by acetic acid and formic acid delignification. **Industrial Crops and Products**, v. 32, n. 3, p. 284-291, 2010.
- ZHU, J. Y., SABO, R., & LUO, X. Integrated production of nano-fibrillated cellulose and cellulosic biofuel (ethanol) by enzymatic fractionation of wood fibers. **Green Chemistry**, v. 13, n. 5, p. 1339-1344, 2011.
- ZULUAGA, R., PUTAUX, J. L., CRUZ, J., VÉLEZ, J., MONDRAGON, I., & GAÑÁN, P. Cellulose microfibrils from banana rachis: Effect of alkaline treatments on structural and morphological features. **Carbohydrate Polymers**, v. 76, n. 1, p. 51-59, 2009.

APÊNDICES

Apêndice 1: Distribuição de tamanho (comprimento) das nanofibras de celulose obtidas através do planejamento fatorial fracionado 2^{4+1} com três pontos centrais.

As distribuições do comprimento (nm) das NFcs produzidas, estão apresentadas nas Figuras 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11.

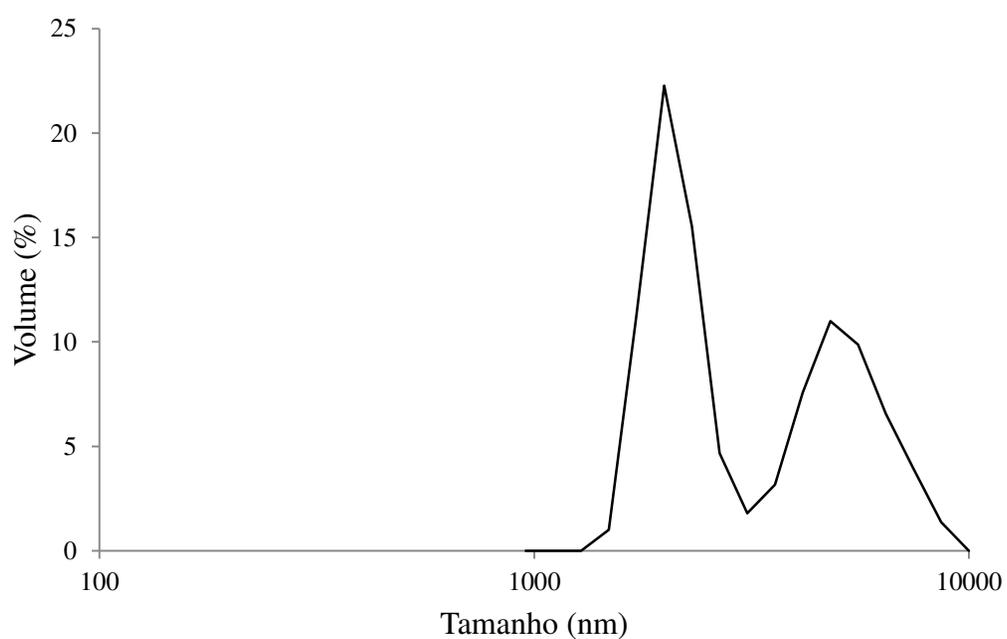


Figura 5.1 - Distribuição do comprimento das partículas de nanofibras de celulose (N1)

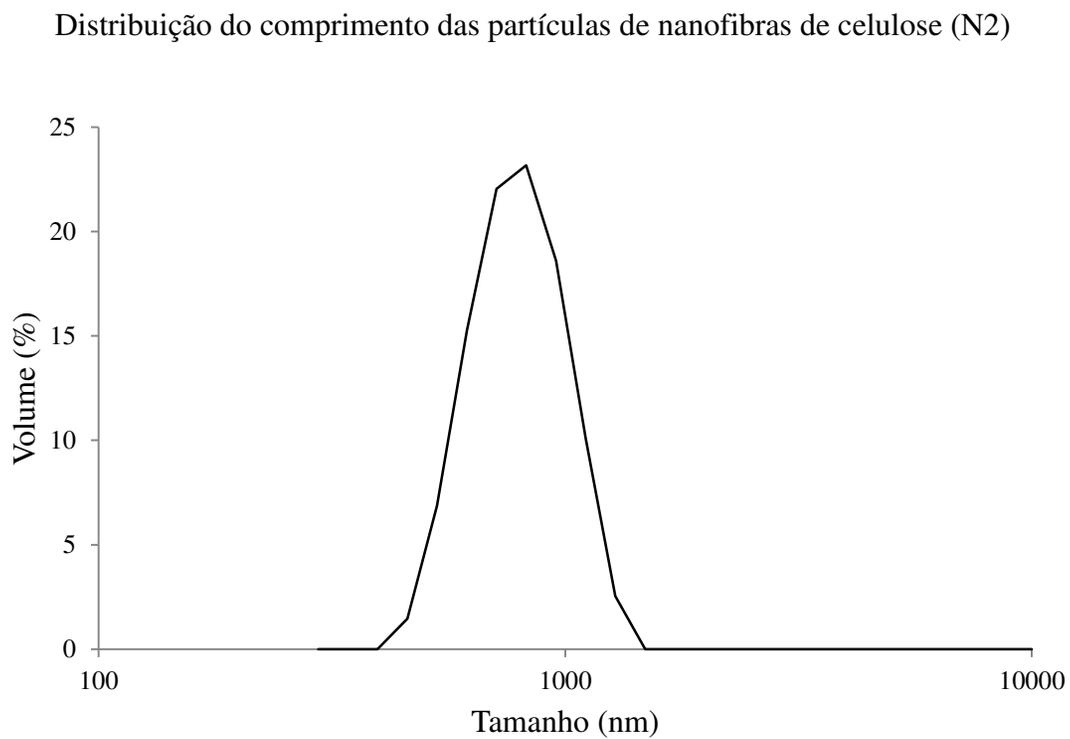
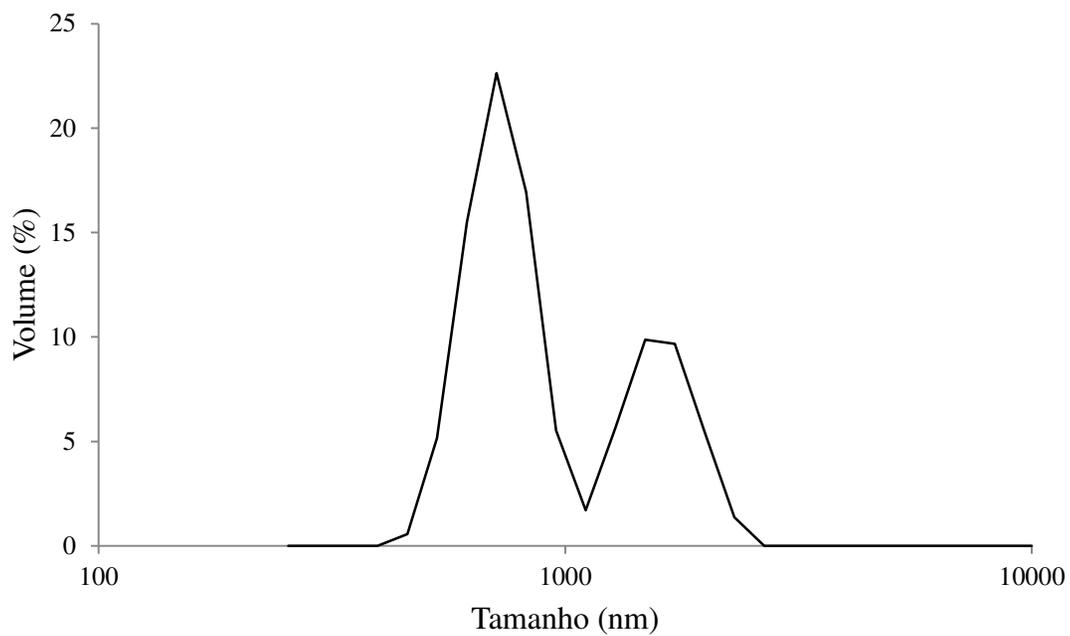


Figura 5.1 - v Distribuição do comprimento das partículas de nanofibras de celulose (N3)

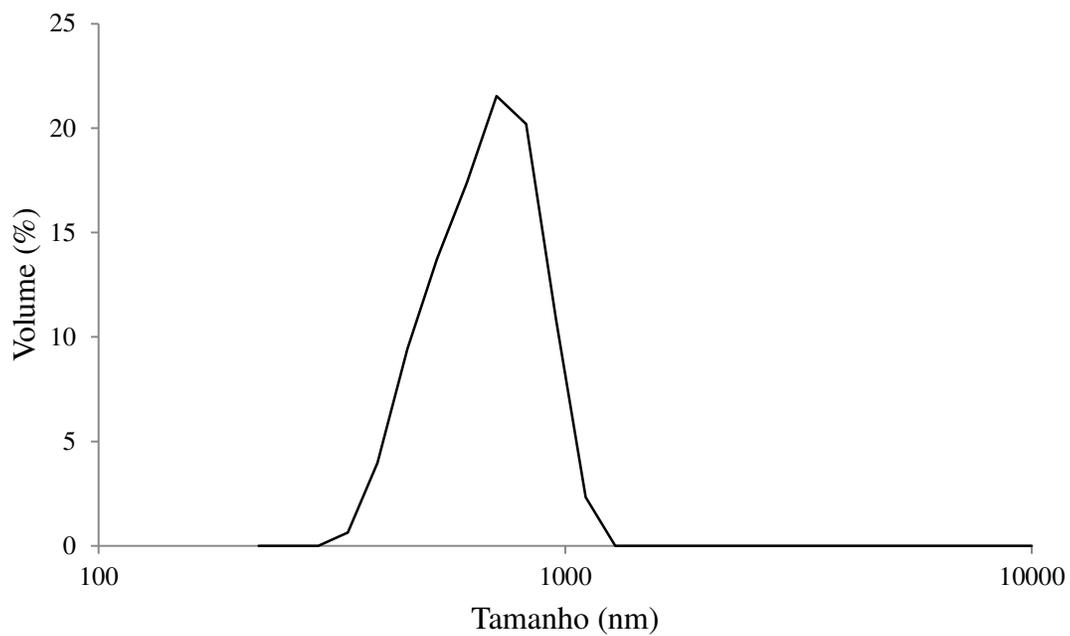


Figura 5.2 - Distribuição do comprimento das partículas de nanofibras de celulose (N4)

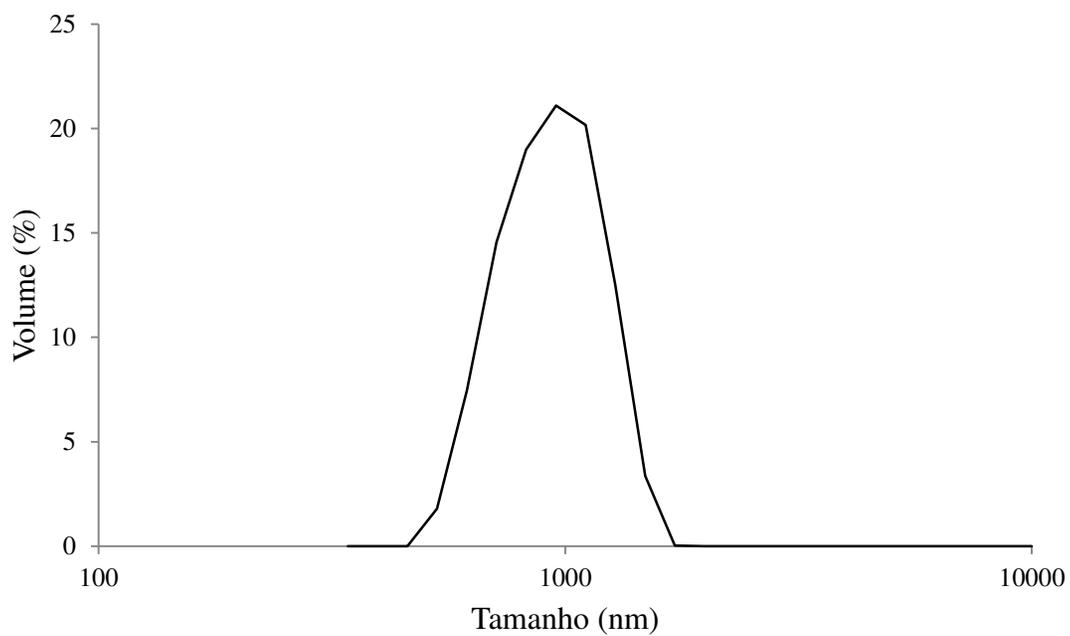


Figura 5.3 - Distribuição do comprimento das partículas de nanofibras de celulose (N5)

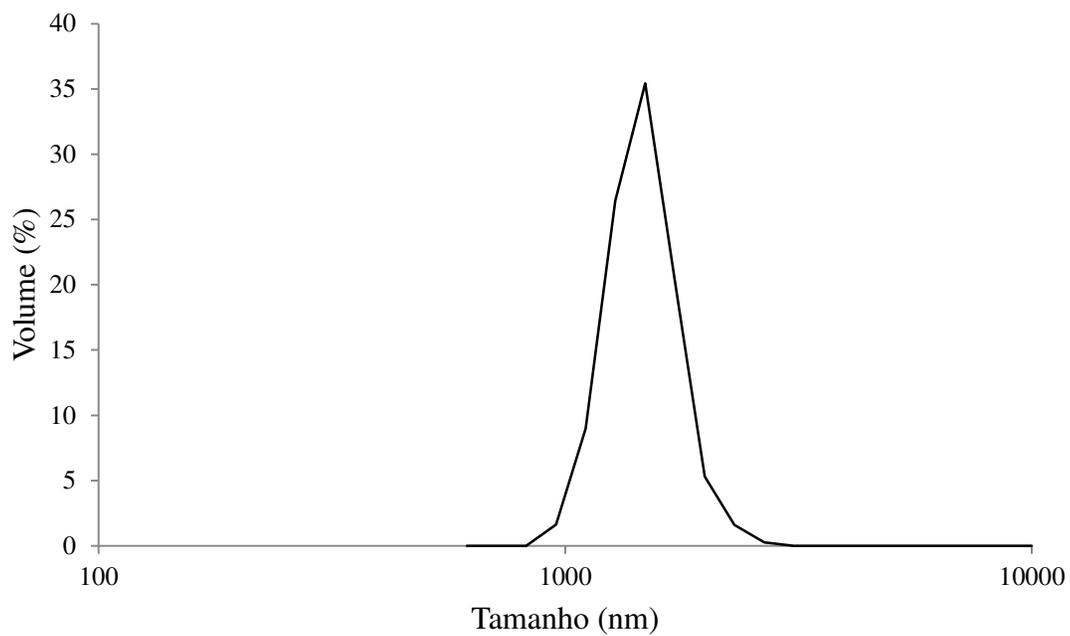


Figura 5.4 - Distribuição do comprimento das partículas de nanofibras de celulose (N6)

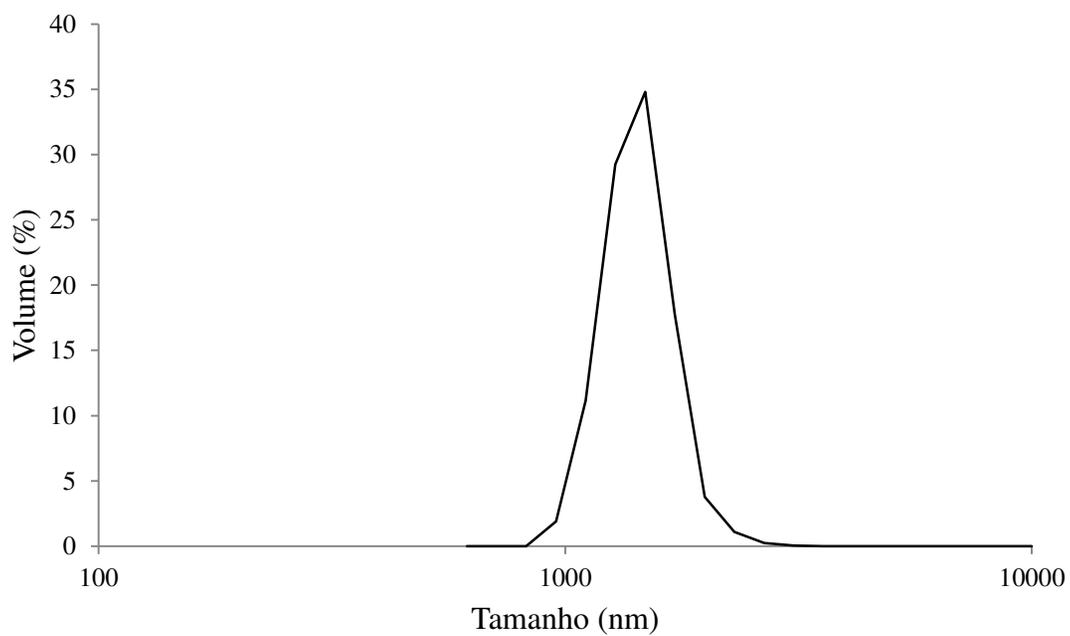


Figura 5.5 - Distribuição do comprimento das partículas de nanofibras de celulose (N7)

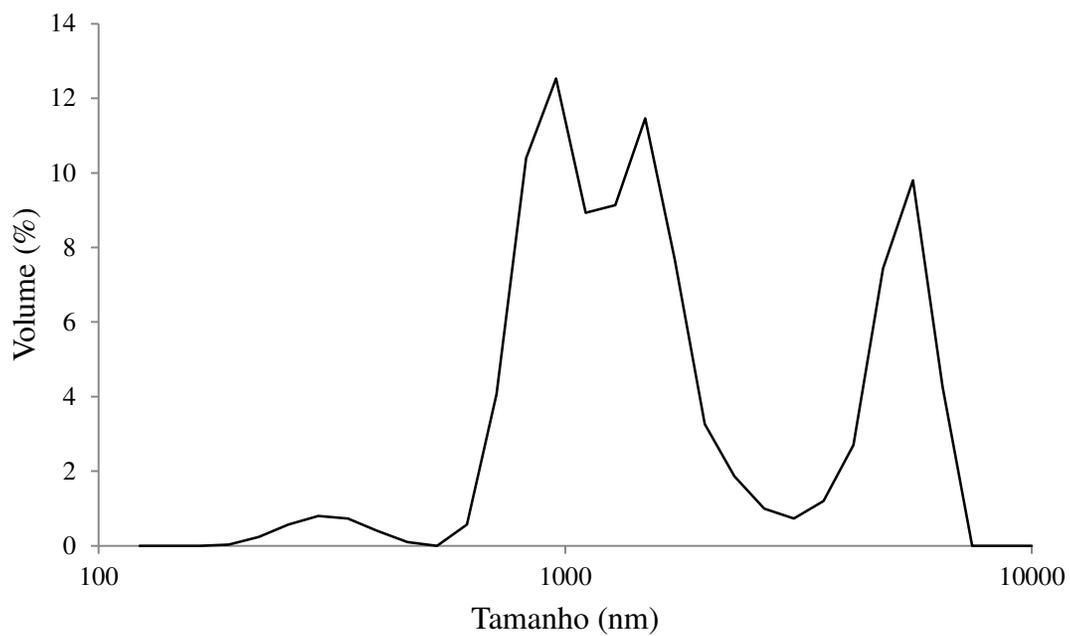


Figura 5.6 - Distribuição do comprimento das partículas de nanofibras de celulose (N8)

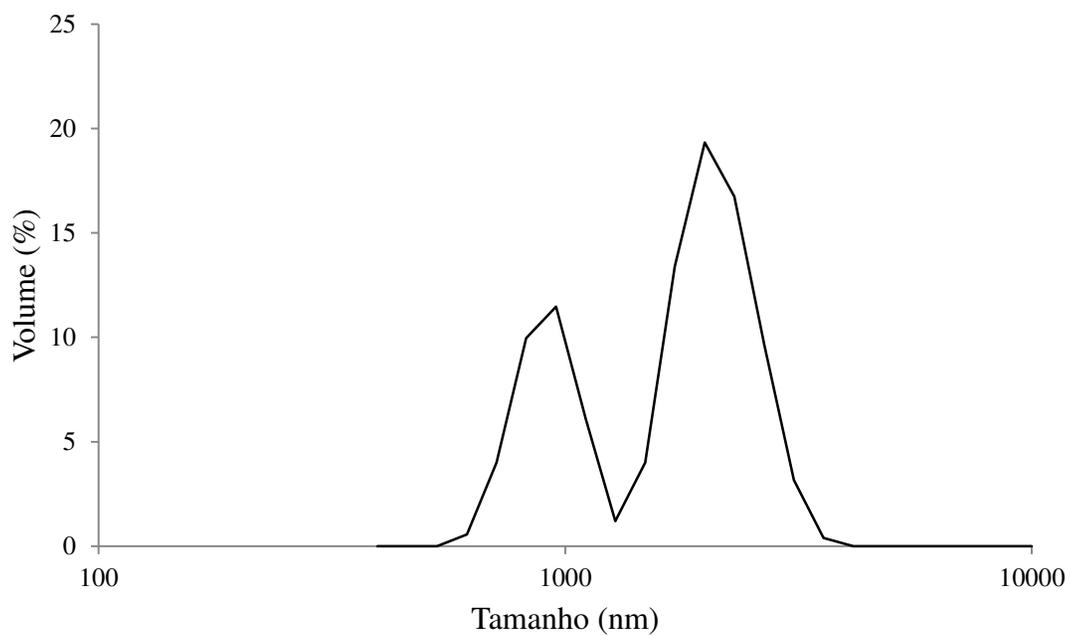


Figura 5.7 - Distribuição do comprimento das partículas de nanofibras de celulose (N9)

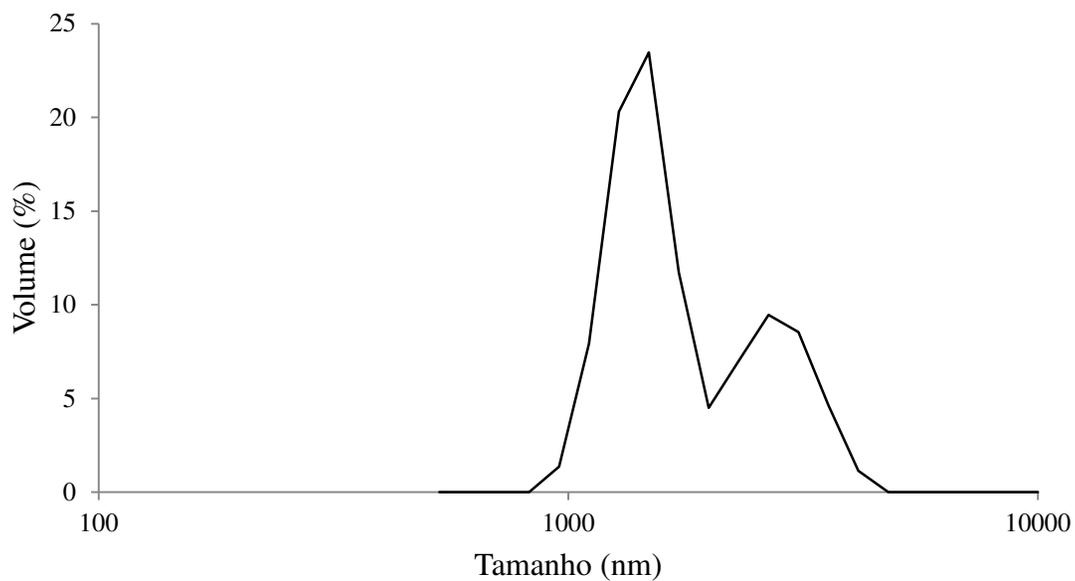


Figura 5.8 - Distribuição do comprimento das partículas de nanofibras de celulose (N10)

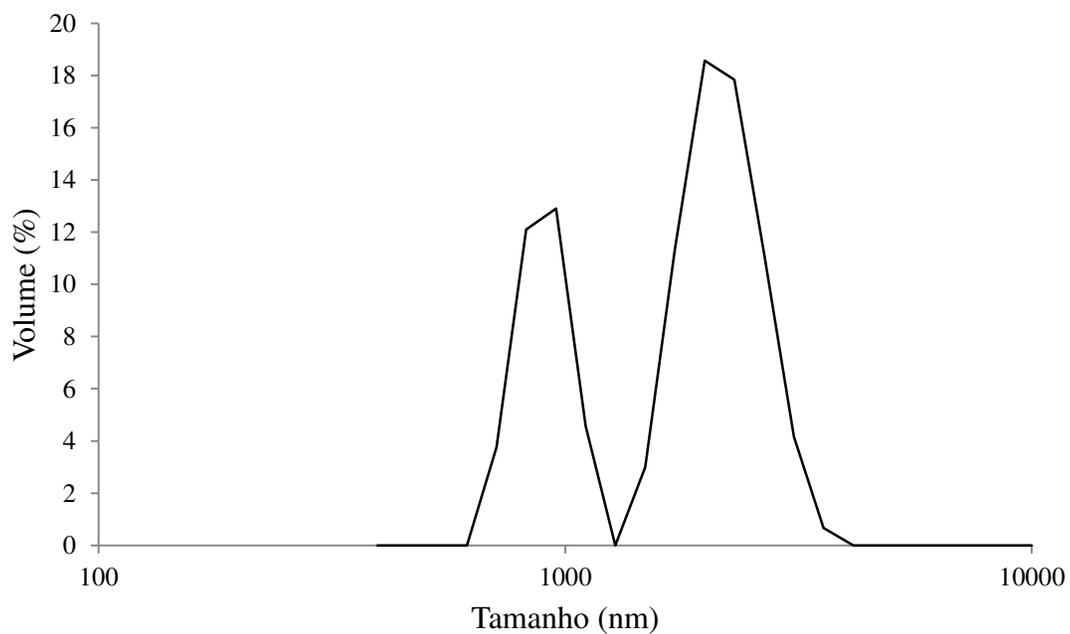


Figura 5.9 - Distribuição do comprimento das partículas de nanofibras de celulose (N11)

