

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS**

**BRUNO ROBERTO ROSSI**

**Produção e caracterização de nanocelulose utilizando enzimas ativas em  
carboidratos complexos**

**São Carlos  
2019**



**BRUNO ROBERTO ROSSI**

**Produção e caracterização de nanocelulose utilizando enzimas ativas em  
carboidratos complexos**

Versão Corrigida  
Original na Unidade

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Desenvolvimento, Caracterização e Aplicação de Materiais.

Orientador: Valmor Roberto Mastelaro

**São Carlos  
2019**

**AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Dr. Sérgio Rodrigues Fontes da EESC/USP com os dados inseridos pelo(a) autor(a).

Rossi, Bruno Roberto
R823p Produção e caracterização de nanocelulose utilizando enzimas ativas em carboidratos complexos / Bruno Roberto Rossi; orientador Valmor Roberto Mastelaro. São Carlos, 2019.
Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais e Área de Concentração em Desenvolvimento, Caracterização e Aplicação de Materiais -- Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2019
1. Nanofibras Oxidadas. 2. Nanocelulose. 3. Enzimas. I. Título.

Eduardo Graziosi Silva - CRB - 8/8907

## FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato: Bacharel **BRUNO ROBERTO ROSSI**.

Título da dissertação: "Síntese e caracterização de nanocelulose aplicada como suporte para nanopartículas de óxidos metálicos".

Data da defesa: 01/11/2019.

### Comissão Julgadora:

### Resultado:

Prof. Associado **Valmor Roberto Mastelaro**  
**(Orientador)**  
(Instituto de Física de São Carlos/IFSC-USP)

APROVADO

Prof. Dr. **Valdeir Arantes**  
(Escola de Engenharia de Lorena/EEL-USP)

APROVADO

Dra. **Cristiane Sanchez Farinas**  
(Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária/EMBRAPA)

APROVADO

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais:

Prof. Associado **Marcelo Falcão de Oliveira**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:  
Prof. Titular **Murilo Araujo Romero**



## **AGRADECIMENTOS**

Ao professor Dr. Antônio Felix de Carvalho e a Mestranda Emanoele pela colaboração ao longo do trabalho.

Ao Prof. Dr. Igor Polikarpov e à Dr.<sup>a</sup> Vanessa pela por todo e empenho no desenvolvimento desse trabalho, estendendo aos colegas do Grupo de Biotecnologia Molecular.

Ao Prof. Dr. Valmor Roberto Mastelaro pela orientação e pela oportunidade de aprendizado durante o desenvolvimento desse trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Escola de Engenharia de São Carlos pelo conhecimento transmitido.

Ao Instituto de Física de São Carlos e ao Grupo de Nanomateriais e Cerâmicas Avançadas (NACA), pela infraestrutura e apoio dado pelos professores e técnicos.

À minha família, por todo o apoio ao longo desses anos.

À minha namorada, pelo amor e companheirismo.

Aos amigos com quem dividi tantos momentos ao longo da minha caminhada.

Aos colegas do Grupo de Nanomateriais e Cerâmicas Avançadas, por todos os momentos e risadas compartilhados.

A agência financiadora CNPQ pela concessão da bolsa de Mestrado.

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

Muito obrigado a todos.





## RESUMO

ROSSI, B. R. **Produção e caracterização de nanocelulose utilizando enzimas ativas em carboidratos complexos**. 88p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2019.

A celulose é um polímero de origem natural e um dos mais abundantes encontrado na natureza. Obtidas a partir da desconstrução das fibras de celulose, a nanocelulose apresenta propriedades com grande interesse científico e tecnológico como hidrofiliabilidade, capacidade de modificação química, elevada rigidez, elevada resistência a tração, translucidez, entre outras. Uma das principais fontes para a obtenção da celulose é através da biomassa lignocelulósica, que é matéria orgânica proveniente de fontes vegetais ou resultante do seu processo. O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, o que torna esta fonte atrativa para a produção de materiais de alto valor agregado, como a nanocelulose. Neste trabalho, o bagaço de cana-de-açúcar foi utilizado para a produção de nanofibras de celulose. Para isso, o bagaço foi submetido a um pré-tratamento ácido e básico para a solubilização dos componentes não celulósicos da biomassa, como lignina e hemicelulose. Em seguida, nanofibras de celulose foram obtidas através do uso de três diferentes enzimas; a endoglucanase *ThCel7B*, a xilanase *TcXyn10A* e uma enzima de atividade auxiliar da família AA9 seguida de um tratamento em um ultrassom de sonda. As enzimas utilizadas de forma simultânea levaram a uma melhora na eficiência do processo resultando em um aumento da concentração dos produtos solúveis e de grupos oxidados. Entretanto, não foi possível observar uma diferença significativa entre as amostras de nanocelulose produzidas, seja por via enzimática ou por via química, em seu índice de cristalinidade, apesar da ação da endoglucanase. A estabilidade térmica do material obtido é maior que aquele produzido por outras rotas para obtenção de nanofibras oxidadas, como a TEMPO oxidação. Entretanto, o diâmetro das fibras produzidas com enzimas é maior que as produzidas pela rota química. Os resultados obtidos mostraram que é possível a obtenção de nanofibras de celulose através da ação de enzimas, sem a utilização de reagentes mais agressivos, como o TEMPO, ou de processos mecânicos com maior gasto energético, como os homogeneizadores.

**Palavras-chave:** Nanofibras oxidadas, Nanocelulose, Enzimas.



## ABSTRACT

ROSSI, B. R. **Nanocellulose production and characterization using carbohydrate-active enzymes.** 88p. Dissertação (Mestrado) –Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2019.

Cellulose is a natural polymer and one of the most abundant in nature. Nanocellulose, produced from the deconstruction of cellulose fibers, presents properties with great scientific and technological appeal, such as hydrophilicity, capacity of chemical modification, high stiffness, high tensile strength, translucency, and others. One way to obtain cellulose is through lignocellulosic biomass, which is organic raw material from plant sources or its process. Brazil is the world's largest producer of sugarcane, which makes it attractive for the production of high value-added materials such as nanocellulose. In this work, sugarcane bagasse was used for the production of cellulose nanofibers. For this, acid and basic pretreatment was used for solubilization of non-cellulosic components of biomass, as lignin and hemicellulose. Then, the production of cellulose nanofibers using three different enzymes: one ThCel7B endoglucanase, one TcXyn10A xylanase and an auxiliary activity enzyme of the AA9 family, followed by ultrasonification. As the enzymes used simultaneously lead to process improvement, this results in increased concentration of soluble products and oxidized groups. However, it was not possible to estimate significant difference in the crystallinity of the nanocellulose produced with enzymatic and chemical approaches, despite the endoglucanase action. The thermal stability of the material produced by the enzymatic approach is higher than that produced by other approaches for oxidized nanofibers, as TEMPO oxidation. However, the enzymatic nanofiber presents a larger diameter than produced by a chemical approach. The results show that it is possible to produce oxidized cellulose nanofibers with action of carbohydrate-activated enzymes without using more aggressive reagents such as TEMPO or mechanical processes with higher energy consumption such as homogenizers.

**Keywords:** Oxidated Nanofibers, Nanocellulose, Enzymes.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1: Exemplos de materiais nanométricos, a) nanopartícula de ouro [15], b) nanobastões de ZnS [16] e c) nanoplacas de hidróxidos de magnésio [17].....	24
Figura 2.2: Estrutura Química da Celulose. Adaptado de [18]. .....	25
Figura 2.3: Esquema da matriz lignocelulósica. Adaptado de [23].....	26
Figura 2.4: Estrutura Química da Xilana. Adaptado de [25] .....	26
Figura 2.5: Unidades monoméricas que formam a Lignina, Ácido Cumarílico, Alcool Cuniferílico e Álcool Sinapílico. Adaptado de [25].....	27
Figura 2.6: Microscopia eletrônica de transmissão de a) Nanofibras de celulose b) Nanocristais de celulose e (c) Microscopia eletrônica de Varredura da nanocelulose bacteriana. Adaptado de [3] .....	28
Figura 2.7: Hidrogéis de celulose bacteriana e imagens do arranjo de suas fibras. Adaptado de [3]. .....	30
Figura 2.8: Fotografia de uma amostra de CNF TEMPO Oxidada. Elaborada pelo Autor.....	31
Figura 2.9: Compósito a partir de PEDOT:PSS, nanofibras de celulose, glicerol e dimetilsulfóxido para armazenagem de energia. Acessado em [42] .....	33
Figura 2.10: Métodos químicos de obtenção de nanocelulose, a) carboxilação via oxidação com periodato-clorito, b) sulfonação via tratamento com periodato-bissulfito, c) caboximetilação usando ácido cloroacético e d) quaternização utilizando cloreto de (2-3-epoxipropil)trimetilamônia). Adaptado de [7].....	36
Figura 2.11: Ciclo catalítico da oxidação com reagente TEMPO. Adaptado de [59] .....	37
Figura 2.12: Esquema da oxidação da ligação glicosídica da celulose através da ação da enzima LPMO. Adaptado de [11]......	38
Figura 2.13: Esquema da reação enzimática de hidrólise da ligação glicosídica a) com inversão e b) com retenção de configuração. Adaptado de [64]......	40
Figura 4.1: Esquema etapa a etapa para a produção dos materiais. ....	45
Figura 5.1: Cromatograma dos padrões e dos produtos solúveis de oxidação. onde a) padrão para xilo-oligosacarídeos (de 1 a 6) b) padrão de oligossacarídeos (de 1 a 6); c) é a reação realizada por 3 horas; d) é a reação por 24 horas e e) é um padrão de ácido ascórbico .....	56
Figura 5.2: Reação enzimática realizada por 24 horas e seus controles. Onde a) reação com as três enzimas; b) reação com endoglucanase e LPMO; c) reação com	

endoglucanase e xilanase; d) reação com xilanse e LPMO; e) reação com endoglucanase somente; f) reação com xilanase somente; g) reação com LPMO somente e h) nenhuma enzima utilizada. ....	57
Figura 5.3: Destaque da região dos oxidados da figura 5.2. Onde a) reação com as três enzimas; b) reação com endoglucanase e LPMO; c) reação com endoglucanase e xilanase; d) reação com xilanse e LPMO; e) reação com endoglucanase somente; f) reação com xilanase somente; g) reação com LPMO somente e h) nenhuma enzima utilizada. ....	59
Figura 5.4: DRX do material obtido para a amostra relativa a 3 horas e seus picos deconvoluídos e indexados, onde a) difratograma da amostra, b) plano (110), c) plano (-110), d) plano (200), e) plano (021), f) componente amorfa e g) plano (040). ....	60
Figura 5.5: a) espectro de Infravermelho para as reações com 3 horas e 24 horas e para o controle, b) destaque da região relativa a carboxila e c) adaptado de [11] para comparação. ....	62
Figura 5.6: Variação da condutividade em relação ao volume de ácido adicionado para a reação de 24 horas. ....	63
Figura 5.7: Microscopia Eletrônica obtida da amostra controle com a distribuição de tamanhos referente as fibras analisadas. ....	65
Figura 5.8: Microscopia Eletrônica para a amostra referente a reação por 3 horas com a distribuição de tamanhos referente as fibras analisadas. ....	66
Figura 5.9: Microscopia Eletrônica para a amostra referente a reação por 24 horas com a distribuição de tamanhos referente as fibras analisadas. ....	66
Figura 5.10: Microscopia Eletrônica para a amostra referente a reação de oxidação via reagente TEMPO com a distribuição de tamanhos referente as fibras analisadas. ....	67
Figura 5.11: Análise Termogravimétrica realizada nos materiais obtidos. ....	68
Figura 5.12: Primeira derivada da análise termogravimétrica apresentada anteriormente. Onde a) amostra TEMPO oxidada, b) amostra controle, c) amostra da reação por 3 horas e d) amostra pra reação durante 24 horas. ....	69
Figura 5.13: Espectros survey das amostras referentes as reações de 3 horas, 24 horas, além do material produzido pela oxidação via TEMPO e de uma amostra controle onde não foram utilizadas as enzimas. Nitrogênio (N), sódio (Na), carbono (C) e oxigênio (O). ....	71

Figura 5.14: Espectros de alta resolução deconvoluídos do carbono nas amostras referente a a) reações de 3 horas, b) 24 horas, c) oxidação via TEMPO e d) uma amostra controle onde não foram utilizadas as enzimas..... 72

Figura 5.15: Espectros de alta resolução deconvoluídos do oxigênio nas amostras referente a a) reações de 3 horas, b) 24 horas, c) oxidação via TEMPO e d) uma amostra controle onde não foram utilizadas as enzimas..... 73





## LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1: Composição química e rendimento dos materiais lignocelulósicos (em %). Onde Etapa 1 e 3 são as utilizações de Clorito de Sódio e as Etapas 2 e 4 são as utilizações de Hidróxido de Potássio .....	55
Tabela 5.2: Índice de cristalinidade obtido para as amostras através da análise da deconvolução dos difratogramas de raios-X. ....	61
Tabela 5.3: Concentração de grupos oxidados para os materiais obtidos. ....	63
Tabela 5.4: Valores da temperatura de início ( $T_{onset}$ ) e máximo ( $T_{max}$ ) de degradação para os materiais obtidos. ....	70
Tabela 5.5: Concentração dos elementos presentes nas amostras, obtida do espectro survey. ....	73
Tabela 5.6: Posição assinalada referente a ligação para os elementos Oxigênio (O) e Carbono (C).....	74



## **LISTA DE SIGLAS**

AA	Atividades Auxiliares
BNC	Nanocelulose Bacteriana
CAZy	Carbohydrate-Active Enzymes Database
CNC	Nanocristais de Celulose
CNF	Nanofibras de Celulose
DP	Grau de Polimerização
GHs	Hidrolases de Glicosídeos
IC	Índice de Cristalinidade
LPMO	Monooxigenase Lítica de Polissacarídeos
TEMPO	1-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina
XPS	Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X



## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	21
2 REVISÃO DA LITERATURA .....	23
2.1 NANOTECNOLOGIA.....	23
2.2 CELULOSE .....	24
2.2.1 Bagaço de Cana-de-Açúcar .....	25
2.2.2 Pré-tratamento para separação dos componentes da biomassa de cana-de-açúcar.....	27
2.3 NANOCELULOSE .....	28
2.3.1 Nanocelulose Bacteriana (BNC).....	29
2.3.2 Nanocristais de celulose (CNC).....	30
2.3.3 Nanofibras de Celulose (CNF) .....	31
2.3.4 Aplicações da Nanocelulose .....	32
2.4 PRODUÇÃO DE NANOCELULOSE .....	33
2.4.1 Métodos Físicos .....	34
2.4.2 Métodos Químicos.....	34
2.4.3 Métodos Enzimáticos .....	37
2.5 ENZIMAS ATIVAS EM CARBOIDRATOS .....	38
2.5.1 Hidrolases de glicosídeos (GHs) .....	39
2.5.2 Endoglucanase.....	40
2.5.3 Monooxigenases Líticas de Polissacarídeos .....	40
2.5.4 Xilanase.....	41
3 OBJETIVOS DO PROJETO DE PESQUISA.....	43
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
4.1 ENZIMAS UTILIZADAS.....	45
4.2 PROCESSO DE PRÉ-TRATAMENTO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR ..	45
4.3 OBTENÇÃO DE NANOFIBRAS DE CELULOSE VIA ENZIMÁTICA.....	46
4.4 OBTENÇÃO DAS NANOFIBRAS DE CELULOSE VIA REAGENTE 1-OXIL-2,2,6,6-TETRAMETILPIPERIDINA (TEMPO).....	47
4.5 CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS OBTIDOS .....	48
4.5.1 Composição Química .....	48
4.5.1.1 Determinação da concentração de Lignina .....	49
4.5.1.2 Cinzas Totais.....	50

4.5.1.3 Furfural .....	50
4.5.1.4 Carboidratos, hidroximetilfurfural e ácidos orgânicos .....	50
4.5.2 Produtos de Oxidação .....	51
4.5.3 Difração de Raios-X.....	51
4.5.4 Espectroscopia no Infravermelho.....	52
4.5.5 Condutimetria.....	52
4.5.6 Microscopia Eletrônica de Varredura .....	53
4.5.7 Termogravimetria.....	53
4.5.8 Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS) .....	53
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	55
5.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA.....	55
5.2 PRODUTOS DE OXIDAÇÃO.....	56
5.3 DIFRAÇÃO DE RAIOS-X.....	59
5.4 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO .....	61
5.5 CONDUTIMETRIA.....	62
5.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA .....	64
5.7 TERMOGRAVIMETRIA .....	67
5.8 ESPECTROSCOPIA DE FOTOELÉTRONS EXCITADOS POR RAIOS X (XPS) .....	70
6 CONCLUSÕES.....	75
7 SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS.....	77
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79

## 1 INTRODUÇÃO

O avanço em áreas como biotecnologia, química, física e ciências dos materiais, levou ao desenvolvimento de novas tecnologias [1]. O conceito de manipular estruturas em escalas nanométrica, como átomos ou moléculas para a síntese de materiais com propriedades funcionais, levou ao estabelecimento de uma ciência moderna intitulada de nanotecnologia [2].

A celulose, é um dos biopolímeros mais abundantes encontrados na natureza. A unidade estrutural da celulose é formada por um dímero de glicose denominado celobiose. A biossíntese da celulose leva a formação de cadeias que unem-se através de uma ligação de hidrogênio, formando fibras que se agregam, levando a obtenção da estrutura observada na parede celular vegetal [3]. Sua separação em fibras menores leva a formação de um material com propriedades de grande interesse, como: hidrofiliabilidade, capacidade de modificação química, alta rigidez, alta resistência a tração, translucidez, entre outras [4].

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar no mundo, gerando como resíduo o bagaço que possui uma composição química majoritariamente formada por celulose, além de hemicelulose e lignina [5]. A biomassa obtida após seu processamento pode ser utilizada como fonte alternativa na produção de materiais nanocelulósicos. Para isso, é necessário que o material lignocelulósico passe por um processo de pré-tratamento, que visam a diminuição do gasto energético e aumentar a eficiência do processo de obtenção da celulose [6].

Entre os processos de pré-tratamento encontrados na literatura, os processos mecânicos e os químicos são os mais amplamente utilizados [6]. Através da ação de energia mecânica, pode-se diminuir as dimensões do material lignocelulósico levando ao aumento da área superficial, enquanto que os processos químicos promovem a solubilização das componentes da biomassa, ou o inchaço das fibras de celulose [6].

Assim como existem diversas metodologias para o preparo da biomassa, há diferentes metodologias para a produção da nanocelulose, que podem levar a formação de um material fibroso cujo diâmetro varia entre 5 e 100 nanômetros de diâmetro e alguns micrômetros de comprimento chamado de nanofibras de celulose [7]. Entre estes métodos, pode-se citar a utilização de homogeneizadores ou microfluidizadores, que promovem a quebra das ligações de hidrogênio entre as

cadeias utilizando energia mecânica. Outra forma de obtenção de nanofibras de celulose é utilizando reagentes químicos, como a 1-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina (TEMPO), um reagente com alta seletividade de oxidação [8].

Métodos mecânicos levam a um alto gasto energético, enquanto que a utilização de reagentes químicos muitas vezes é agressiva ao meio ambiente. Uma alternativa ecológica em comparação aos procedimentos mencionados, é a utilização de enzimas capazes de hidrolisar carboidratos [9]. A utilização de enzimas como a endoglucanase, causam a clivagem de ligações glicosídicas da região de menor ordenamento na estrutura da celulose e são estudadas para a produção de nanofibras de celulose desde 2007 [10]. Entretanto, recentemente, para a produção de nanofibras, foi proposto a utilização de enzimas de atividade auxiliar, como as monooxigenases líticas de polissacarídeos (LPMOs), além de enzimas que hidrolisam hemicelulose, como a xilanase[11].

Neste trabalho, para a obtenção de celulose, foi utilizada a biomassa de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com o uso combinado de ácido e base. Para a produção de nanofibras de celulose, foi utilizado um conjunto de três diferentes enzimas: *ThCel7B*, uma endoglucanase fúngica, uma xilanase (*TcXin10A*) e uma enzima de atividade auxiliar LPMO AA9. A desfibrilação do material obtido foi realizada com a utilização de um sonificador. O material obtido ao final do processo foi analisado por diferentes técnicas físico-químicas para maior entendimento de suas características em função da metodologia de síntese utilizada.



## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 NANOTECNOLOGIA

Capacidade de manipular estruturas ou moléculas com, ao menos, uma dimensão em escala nanométrica [2]. Assim foi definida a nanotecnologia, uma ciência moderna idealizada no fim da década de 50, que atraiu muito interesse em diversas áreas, como ciência dos materiais, mecânica, eletrônica, ótica, medicina, energia, entre outros [1]. Atualmente, o principal foco das pesquisas realizadas em nanotecnologia encontra-se sobre: as propriedades em escala nanométrica, a síntese de novos materiais e sua caracterização e a aplicação e desenvolvimento de dispositivos [12].

O termo nanotecnologia apareceu pela primeira vez em um artigo publicado por Norio Taniguchi em 1974. Entretanto, a primeira aparição com a mesma definição que é utilizada nos dias de hoje ocorreu no livro “Engines of Creation” de Eric Drexler [13]. Baseado nas ideias proferidas por Richard Feynman em uma palestra realizada em um encontro da American Physical Society no fim de 1959, intitulada *There's Plenty of Room at the Bottom*, Drexler discorre sobre suas visões acerca da manipulação de moléculas à escala nanométrica [13]. Esses conceitos evoluíram e, atualmente, a nanotecnologia é utilizada em diferentes áreas no nosso dia a dia, como embalagens, alimentos, eletrônicos, entre outros.

Com o avanço da ciência, surgiu a necessidade da padronização das definições utilizadas. Para isso, a norma ISO/TS 27687:2008(E) surgiu para unificar conceitos, estabelecendo que um nano-objeto é um material onde, pelo menos, uma das três dimensões se encontra em escala entre 1 e 100 nm. Esse objeto poderá ser chamado de nanoplaca, nanofibra ou nanopartícula e isso irá depender de quantas dimensões do material está na escala nanométrica uma, duas ou três, respectivamente. As nanofibras podem ser divididas em três outras categorias, os nanobastões que são definidos como fibras rígidas, os nanotubos que são definidos como fibras ocas e os nanofios, que são definidos como fibras condutoras [14].

Na Figura 2.1 são apresentados exemplos encontrados na literatura de nanomateriais que possuem as características mencionadas.

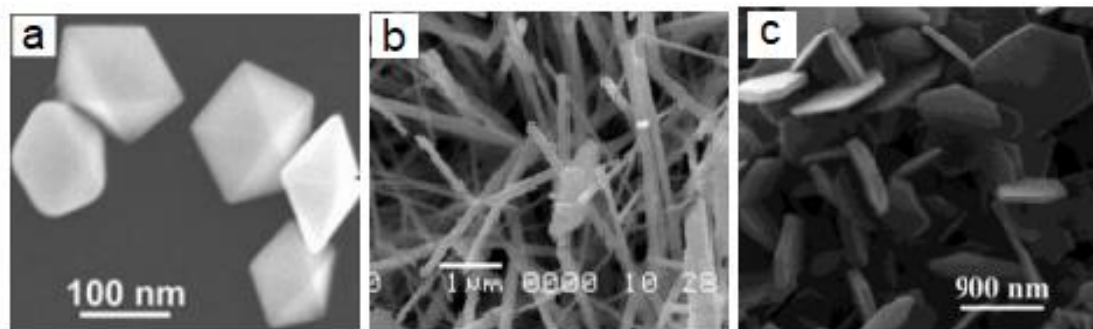


Figura 2.1: Exemplos de materiais nanométricos, a) nanopartícula de ouro [15], b) nanobastões de ZnS [16] e c) nanoplacas de hidróxido de magnésio [17].

A base da nanotecnologia reside no fato de que as propriedades dos materiais diferem drasticamente quando seu tamanho é reduzido a escala nanométrica, onde a mecânica clássica não está apta a descrever seu comportamento. Essa área interdisciplinar tem o potencial de trazer inúmeros benefícios para a sociedade, muitos produtos e serviços hoje produzidos pelas indústrias já estão sendo adaptados para esta nova tecnologia [1-2].

## 2.2 CELULOSE

Principal componente da parede celular vegetal, a celulose é um dos polímeros mais abundantes no planeta. Apesar de empregada há milhares de anos em diferentes áreas como na construção civil ou para geração de energia, na forma de madeira, só foi descrita como uma molécula durante a segunda metade do século XIX [3-18]. Entretanto, foi a partir do último século que a indústria química passou a utilizá-la como matéria prima para a produção de diferentes tipos de insumos químicos e materiais [3]. A estrutura química de sua cadeia polimérica é formada através da união de dímeros chamados celobiose, que são formados através de ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 entre moléculas de glicose, como apresentadas na Figura 2.2. Os grupos hidroxilas de cadeias adjacentes de celulose sofrem interações condensando-as em filamentos que são chamados de fibras elementares. O mesmo ocorre entre as fibras elementares, formando sua macroestrutura fibrosa com dimensões da ordem de 1-4 mm de comprimento e 3-100 micrômetros de diâmetro. Ao se condensar, as cadeias formam regiões de maior e de menor ordenamento, o que concede as características semicristalinas do polímero [18].

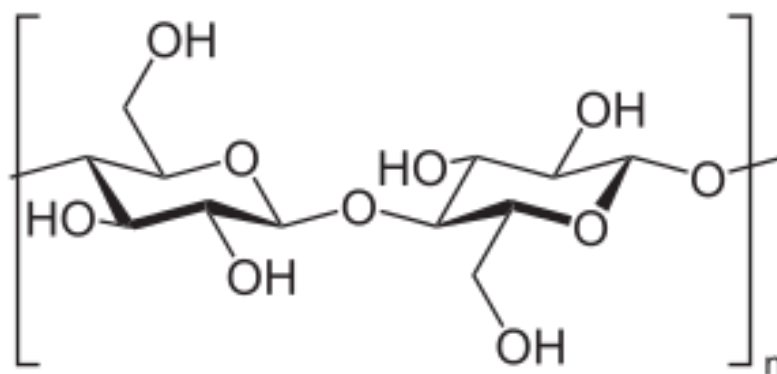


Figura 2.2: Estrutura Química da Celulose. Adaptado de [18].

A obtenção da celulose, em geral, é realizada a partir da biomassa lignocelulósica, que compreende os resíduos agroindustriais e a matéria orgânica proveniente diretamente de fontes vegetais ou resultantes de seu processo [19]. O Brasil é o maior produtor mundial de Cana-de-Açúcar, o que torna atrativa a utilização da sua biomassa como fonte de celulose para a produção de materiais de alto valor agregado como a nanocelulose.

### 2.2.1 Bagaço de Cana-de-Açúcar

O bagaço de cana-de-açúcar é o resíduo obtido após o processamento do caldo nas indústrias sucroalcooleiras. No Brasil, a produção de cana-de-açúcar para o ano de 2017 alcançou 635,6 milhões de toneladas [20], gerando cerca de 166 milhões de toneladas de bagaço, cuja maior parte é queimada em caldeiras para a geração de energia. Entretanto, estima-se que 17% de todo bagaço gerado não é utilizado como fonte de energia, podendo ser aproveitado para a geração de materiais e biocombustíveis [21].

Diversos componentes constituem o bagaço de cana-de-açúcar, entre eles a celulose é mais abundante e corresponde cerca de 40-50% da massa do bagaço. Entre os outros componentes que formam o bagaço, temos a hemicelulose, representando entre 25-30% em massa, a lignina que corresponde a 20-25% em massa, e o restante, referente às componentes de baixo peso molecular, também chamados de extrativos e compostos inorgânicos [22]. A composição do bagaço varia conforme seu local de colheita, safra, entre outros fatores. Os componentes do bagaço, formam uma complexa rede de ligações na forma de uma estrutura tridimensional como mostra o esquema da Figura 2.3. Para a utilização da celulose,

é necessário promover a separação desses componentes, podendo ser empregadas diferentes técnicas para atingir este objetivo [22].

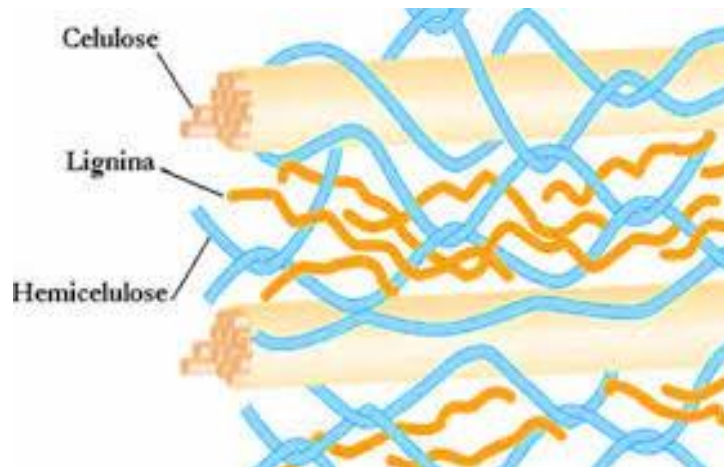


Figura 2.3: Esquema da matriz lignocelulósica. Adaptado de [23]

Enquanto a celulose é composta exclusivamente por unidades de celobiose, as hemiceluloses são polissacarídeos não celulósicos compostos de vários açúcares, como as pentoses e hexoses. Em sua cadeia principal, pode-se reunir unidades de um único açúcar (homopolímero) ou de dois ou mais açúcares (heteropolímero) e, normalmente, as hemiceluloses diferem das celulosas por apresentarem cadeias curtas que podem ser ramificadas. Um das principais hemiceluloses é a xilana, formada por unidades de D-xilose contribuindo com cerca de 35% dos carboidratos da parede celular e representado na Figura 2.4 [24].

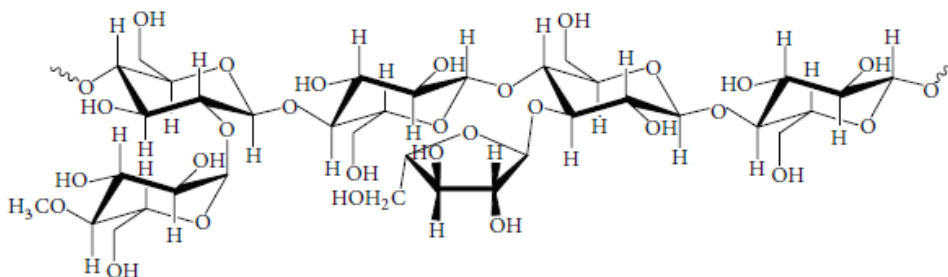


Figura 2.4: Estrutura Química da Xilana. Adaptado de [25]

De forma distinta ao que ocorre na celulose e nas hemiceluloses, a molécula de lignina não pode ser descrita por uma simples combinação de unidades monoméricas, como o álcool cumarílico, o álcool coniferílico e o álcool sinapílicos

apresentados na Figura 2.5. A lignina é definida como uma macromolécula heterogênea, de natureza aromática e complexa, relacionada à resistência mecânica dos vegetais [25].

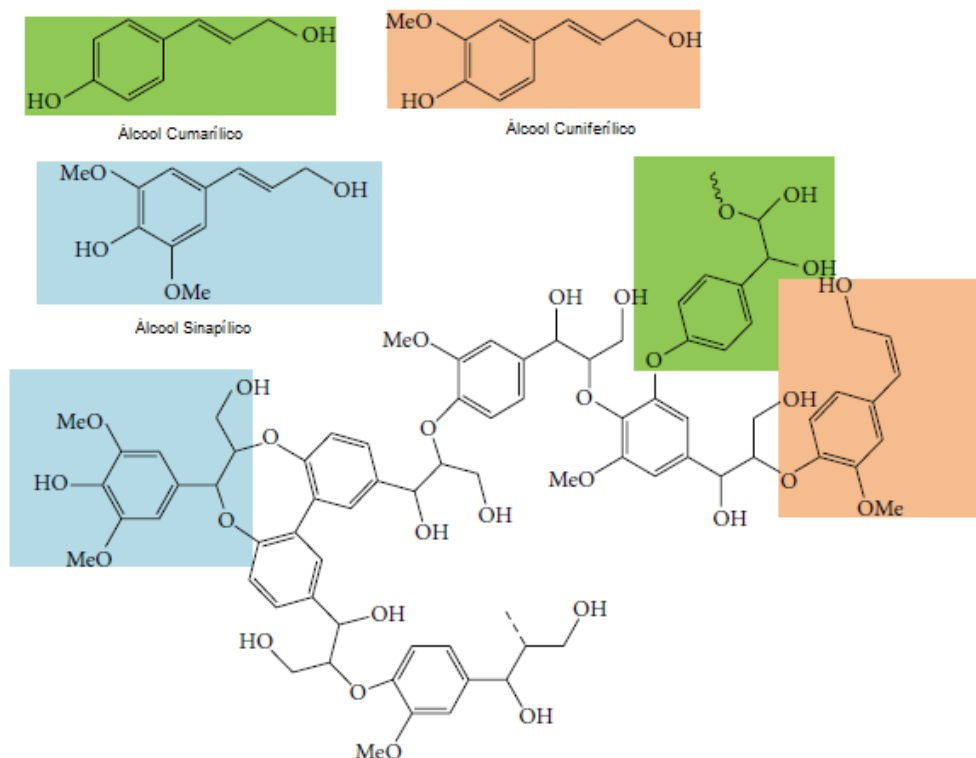


Figura 2.5: Unidades monoméricas que formam a Lignina, Ácido Cumarílico, Alcool Cuniferílico e Álcool Sinapílico. Adaptado de [25]

### 2.2.2 Pré-tratamento para separação dos componentes da biomassa de cana-de-açúcar.

Em termos gerais, os processos de pré-tratamento são empregados para desorganizar a estrutura lignocelulósica da biomassa. Diversas metodologias vêm sendo empregadas e discutidas e, entre elas, existem as que são empregadas exclusivamente para a separação de um componente, como a lignina ou carboidratos e até mesmo a própria celulose [19]. A escolha do pré-tratamento deve se adequar ao produto alvo, pois, a partir da biomassa lignocelulósica, pode-se gerar diferentes produtos de interesse, como glicose para geração de energia, ou mesmo os componentes majoritários separados, como a celulose, para sua utilização na indústria [26].

Entre os tipos de pré-tratamentos possíveis, os denominados químicos são aqueles que se utilizam de pH ácidos ou básicos e que promovem a quebra da matriz lignocelulósica, favorecendo a solubilização dos componentes não celulósicos e/ou o inchaço da fibra [27]. As metodologias realizadas em pH ácido promovem a solubilização da hemicelulose e da celulose menos ordenadas presentes na biomassa, o que leva a um aumento do índice de cristalinidade (IC) do material e a liberação de pentoses e açúcares na solução [19]. Já as metodologias que utilizam reagentes básicos, levam a deslignificação da biomassa além de promover a solubilização de uma quantidade significativa de hemicelulose, levando ao inchaço da fibra de celulose e, conseqüentemente, o aumento da área interna e a diminuição do IC e do grau de polimerização.

### 2.3 NANOCELULOSE

Pode-se definir nanocelulose como um material composto de cadeias de celulose onde pelo menos uma das dimensões se encontra na escala nanométrica. Existem diferentes tipos de nanocelulose, sendo possível classifica-las em três diferentes categorias: nanofibras de celulose (CNF), nanocristais de celulose (CNC) e nanocelulose bacteriana (BNC) [3]. Na Figura 2.6, são apresentadas micrografias destes 3 tipos de nanocelulose que podem apresentar diferenças em suas dimensões, da fonte da qual é obtida e, até mesmo, em suas propriedades.

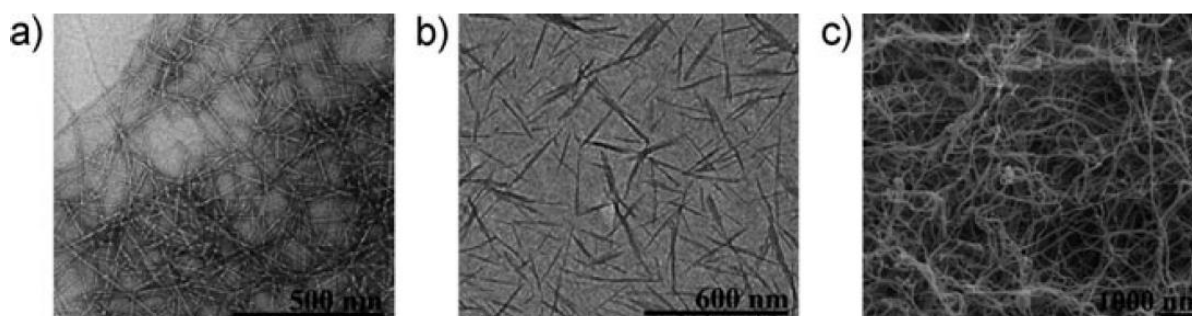


Figura 2.6: Microscopia eletrônica de transmissão de a) Nanofibras de celulose b) Nanocristais de celulose e (c) Microscopia eletrônica de Varredura da nanocelulose bacteriana. Adaptado de [3]

A fibra de celulose que compõem a parede vegetal possui uma estrutura complexa e em multinível, onde fibras de menor espessura interagem formando estruturas mais espessas. Essas fibras de menor espessura, por sua vez, são

formadas por fibras menores, já anteriormente mencionadas, denominadas fibras elementares. O processo de produção de nanocelulose pode ocorrer de dois modos diferentes, denominados bottom-up ou top-down, onde bottom-up são meios em que se inicia o processo com uma base elementar para a formação de estruturas maiores, como em organismos vivo, enquanto que os métodos top-down partem de materiais maiores com o intuito da formação de estruturas nanométricas, por exemplo a hidrólise ácida. Esses materiais produzidos possuem propriedades interessantes como, por exemplo, hidrofiliçidade, capacidade de modificação química, alta rigidez, alta resistência a tração, translucidez, entre outras [18].

### 2.3.1 Nanocelulose Bacteriana (BNC)

Denominada também como celulose bacteriana, celulose microbiana ou biocelulose, a BNC é sintetizada a partir de açúcares de baixo peso molecular ou outras fontes de carbono por bactérias do gênero *Gluconacetobacter*, formando biofilmes compostos de celulose pura na interface entre líquido e ar das soluções onde estão inseridas. Diferentes variáveis são importantes e podem influenciar na produção da BNC como o tipo de cepa da bactéria utilizada, os componentes do meio de cultura e a temperatura. As cadeias de celulose sintetizadas são excretadas como fibras com diâmetro na escala nanométrica, essas cadeias se combinam em forma de fios e, finalmente, em uma estrutura tridimensional de nanofibras [3].

Possuindo fibras com diâmetro entre 20-100 nm, a BNC destaca-se também por possuir alto grau de polimerização (DP) entre 4000-100000 unidades de anidroglicose, alto IC, entre 80 e 90%, além da grande área superficial, tendo grande interação com água, outros polímeros de baixo peso molecular ou com nanopartículas. Por este motivo, durante sua formação grandes quantidades de água são incorporadas em sua rede de nanofibras, produzindo hidrogéis estáveis, como os apresentados na Figura 2.7 [4].

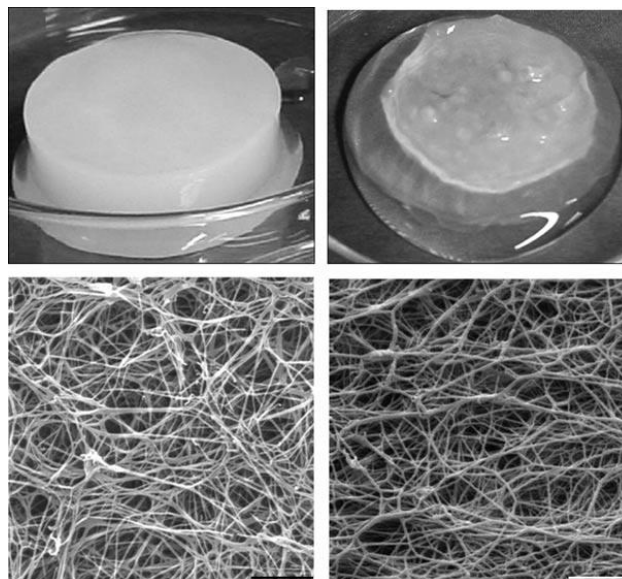


Figura 2.7: Hidrogéis de celulose bacteriana e imagens do arranjo de suas fibras. Adaptado de [3].

### 2.3.2 Nanocristais de celulose (CNC)

A completa solubilização das regiões de menor ordenação das fibras de celulose levam a obtenção de um material com alta cristalinidade denominado nanocristais de celulose, celulose nanocristalina ou whyskers que destacam-se por apresentar estrutura rígida, resistência mecânica e propriedades ópticas [28]. A sua produção ocorre pela utilização de ácidos minerais ou enzimas, levando a formação de um material que possui estrutura tridimensional que se assemelha a bastões, cujas dimensões são da ordem de 5-70 nm de diâmetro e 100-250 nm de comprimento, para CNC produzidas por reagentes ácidos [28]. A funcionalidade da superfície das CNC deriva do tipo de ácido empregado para a reação de hidrólise sendo que ao empregar ácido sulfúrico, os cristais obtidos estão mais negativamente carregados, enquanto que ao se utilizar ácido clorídrico, resulta em materiais menos negativamente carregados [29].

Devido às interações intramoleculares entre as cadeias poliméricas por meio de ligações de hidrogênio e também pela alta cristalinidade, que pode chegar a 90% para CNC produzidas a partir de algodão, os nanocristais possuem módulo de Young específico similar ao Klevar® e ao aço [30]. Além disso, a propriedade óptica de birrefringência e sua capacidade de formar cristais líquidos fazem com que esse material apresente potencial para utilização como pigmento e em biosensores [31].



### 2.3.3 Nanofibras de Celulose (CNF)

As nanofibras de celulose, também denominadas de celulose microfibrilada, nanofibrilas de celulose ou microfibrilas de celulose, são fibras de celulose onde seu diâmetro se encontra em escala nanométrica entre 5-100 nm, podendo alcançar até alguns micrômetros de comprimento [32]. A CNF pode ser produzida de diversas formas, pela utilização de reagentes químicos, ou enzimas, ou também pelo uso de equipamentos que promovem o desfibrilamento da celulose através da ação mecânica e ainda por técnicas enzimático-mecânicas [7]. O processamento de madeira em nanofibras teve origem no fim da década de 70 nos Estados Unidos, mas os pesquisadores da época descobriram que o consumo de energia para sua produção era muito alto e que os equipamentos utilizados entupiam, tornando inviável a comercialização do material [33]. Entretanto, a obtenção ocorre de forma facilitada ao utilizar-se algum tipo de pré-tratamento [19].

A CNF apresenta propriedades como a formação de uma estrutura do tipo gel em determinada concentração, além da possibilidade de modificação química devido aos grupos hidroxilas em sua estrutura, bem como alta razão comprimento diâmetro, o que infere uma grande área superficial. Além disso, as nanofibras podem ser utilizadas na confecção de filmes que possuem uma combinação interessante entre módulo de Young, resistência a tração, bem como boa transparência e baixa permeabilidade ao oxigênio [4]. Na Figura 2.8 é apresentado um material composto por CNF TEMPO oxidada.



Figura 2.8: Fotografia de uma amostra de CNF TEMPO Oxidada. Elaborada pelo Autor.

#### 2.3.4 Aplicações da Nanocelulose

Devido suas propriedades, a nanocelulose encontra possibilidade para aplicação em diferentes setores, desde a produção de embalagens até na área de eletrônicos ou medicinal [34]. Devido a sua rigidez e resistência, tanto os nanocristais (CNC) quanto as nanofibras (CNF) são atrativas para a sua utilização como material de reforço. Por exemplo, as CNF podem ser adicionadas ao cimento para diminuir sua retração durante a secagem e para aumentar a absorção de som, por isso vem sendo utilizada em substituição as fibras sintéticas para se adequar a questões ambientais [35].

A baixa permeabilidade e a habilidade de formar um filme denso com características percolantes devido às ligações de hidrogênio, tornaram os materiais nanocelulósicos interessantes para sua utilização em filtros e embalagens, principalmente embalagens para alimentos [36;37]. Filmes feitos a partir de nanofibras de celulose, com ou sem adição de cargas inorgânicas como argila ou carbonato de cálcio, podem substituir os plásticos não-degradáveis utilizados em embalagens [38].

Uma outra possibilidade do aplicação da nanocelulose está na produção de materiais eletrônicos flexíveis e de baixo peso, onde pode-se adicionar um material condutivo como um polímero para se obter uma alta capacitância volumétrica [39]. Existem diversos exemplos da sua utilização nesse sentido, seja para a produção de capacitores, transistores, ou papeis eletroativos [39–41]. Na Figura 2.9 é apresentada a imagem de material compósito, com propriedades condutoras, formado a partir de nanofibras de celulose, glicerol, dimetilsulfóxido e poli(3,4-etilenodioxitiofeno):poli(estirenosulfonato), ou PEDOT:PSS [42].



Figura 2.9: Compósito a partir de PEDOT:PSS, nanofibras de celulose, glicerol e dimetilsulfóxido para armazenagem de energia. Acessado em [42]

Existem muitos outros exemplos de aplicação de nanocelulose como a utilização de BNC para produção de alimentos ou na aplicação para aceleração da cicatrização, sensores piezoelétricos ou como suporte para um material microeletrônico, formando um dispositivo que possa ser integrado ao corpo humano [43-45].

#### 2.4 PRODUÇÃO DE NANOCELULOSE

Como comentado anteriormente, a produção da nanocelulose em processos top-down, ocorre após o preparo da biomassa lignocelulósica a fim de separar a celulose de sua estrutura. As diferentes técnicas utilizadas na produção de nanocelulose, sejam CNF ou CNC, normalmente são empregadas em conjunto para uma maior eficiência do processo. Para isso, pode-se utilizar diferentes metodologias, como a utilização de ácidos minerais ou do reagente 1-oxil-2,2,6,6-Tetrametilpiperidina (TEMPO) [8]. Outros métodos utilizam somente da energia mecânica, como os homogeneizadores e os microfluidizadores, ou enzimas que promovam a degradação das moléculas que compõe o material utilizado para a obtenção da nanocelulose [46].

Henriksson e colaboradores [10], mostraram em seu trabalho a possibilidade da produção de nanofibras de celulose com a utilização da enzima Novozym 476 e, posteriormente, a utilização de um homogenizador. Isogai e colaboradores utilizaram, para a produção de nanofibras de celulose oxidadas, primeiramente uma rota química através do reagente TEMPO e, em sequência, empregaram energia

mecânica pelo uso de um ultrassom de sonda [8]. Os métodos de obtenção da nanocelulose por método bottom-up não serão abordados neste trabalho.

#### 2.4.1 Métodos Físicos

Entre os diferentes procedimentos desenvolvidos para a obtenção de nanomateriais a base de celulose, pode-se citar o uso de microfluidizadores, homogeneizadores, moinhos criogênicos, moinhos de bolas, ultrassonificação, entre outros, que utilizam de energia mecânica para a obtenção da nanocelulose [46]. Um dos métodos mecânicos mais utilizados para a produção de nanofibras de celulose na indústria é a ultra moagem, que opera com dois discos, onde um deles se encontra estático enquanto o outro rotaciona, promovendo a quebra das ligações de hidrogênio entre as fibras pela ação da força de cisalhamento [32]

Outro método mecânico bastante utilizado faz uso de homogeneizadores de alta pressão, onde a suspensão contendo a celulose entra em uma válvula e, pela pressão aplicada, sai com uma velocidade elevada, colidindo contra um anel de impacto, o que leva ao fracionamento do material [47]. Este método é considerado eficiente para o refino devido a sua eficiência e simplicidade [48].

A ultrassonificação pode ser utilizada para a produção de nanomateriais de celulose. Esta técnica consiste em submeter uma suspensão contendo celulose a ondas ultrassônicas (>20 kHz) para que aconteça a desfibrilação [49]. Isso ocorre, pois ciclos de alta e baixa pressão levam a formação de bolhas na suspensão, onde o colapso das bolhas leva a formação de forças hidrodinâmicas de cisalhamento, promovendo a desfibrilação da fibra de celulose [50]. Diferentes pesquisadores têm utilizado a ultrassonificação com intuito de isolar nanofibras de celulose, avaliando o efeito da temperatura, concentração, tempo ou distância do material à ponta da sonda [51].

#### 2.4.2 Métodos Químicos

A produção de nanocelulose utilizando somente métodos mecânicos requer um alto gasto energético, uma vez que a utilização de homogeneizadores, por exemplo, requer um consumo de energia que pode chegar a 70 MWh/t [52]. Assim, muitos trabalhos foram realizados com o intuito de desenvolver uma rota alternativa para a produção de CNF ou CNC. Algumas dessas rotas recebem a denominação

de métodos químicos, onde são empregados reagentes químicos para a produção dos materiais. Entre estes métodos, o mais utilizado são a hidrólise ácida e a oxidação via reagente TEMPO [53]. Entretanto, existem outros reagentes que podem ser utilizados para esse propósito, como a carboxilação utilizando periodato-clorito que, além de oxidar os grupos hidroxilas a grupos carboxila, promove a abertura do anel de glicose [54]. Sulfonação, carboximetilação e quarternização, são outros modos de modificação da estrutura química da celulose, cujas reações são mostradas na Figura 2.10 [55–57].

A hidrólise ácida é um método bastante comum para a produção de nanocelulose onde, através da hidrólise das regiões de menor ordenação da celulose, leva-se a formação da CNC. Ao utilizar ácido sulfúrico para a reação de hidrólise ácida, além de propiciar a produção das CNC, leva a formação de uma dispersão coloidal estável devido à esterificação dos grupos hidroxila [53].

A oxidação seletiva das hidroxilas da estrutura da celulose vem sendo estudada desde 1993, quando Davis e Flitsch reportaram a utilização do reagente TEMPO para a oxidação de monossacarídeos [58]. Isogai e colaboradores mostram em seu artigo de revisão as principais características e métodos de produção de CNF oxidada pela TEMPO, onde afirmam que a repulsão eletrostática e o efeito osmótico entre as fibras carregadas negativamente levam a formação de fibras individualizadas de nanocelulose TEMPO oxidada (TOCN) após o uso de forma moderada de desfibrilação mecânica [8].

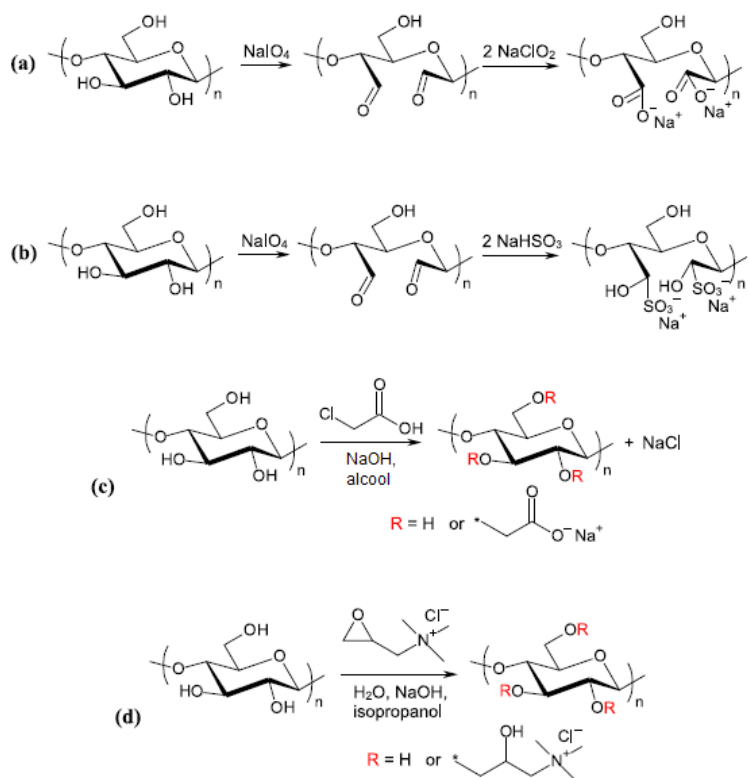


Figura 2.10: Métodos químicos de obtenção de nanocelulose, a) carboxilação via oxidação com periodato-clorito, b) sulfonação via tratamento com periodato-bissulfito, c) caboximetilação usando ácido cloroacético e d) quaternização utilizando cloreto de (2-3-epoxipropil)trimetilamônia). Adaptado de [7]

A reação com o reagente TEMPO ocorre em um ciclo catalítico, apresentado na Figura 2.11, com a oxidação do carbono C6 da estrutura química da celulose, formando um grupo carboxila. Nessa reação, quantidades catalíticas de TEMPO e brometo de sódio (NaBr) são dissolvidos na dispersão contendo as fibras de celulose, com o pH entre 10 e 11. A oxidação começa após a adição de hipoclorito de sódio (NaClO), essa reação ocorre como mostrado na Figura 2.11, com a formação de um grupo aldeído. Esse grupo, na sequência, sofre uma oxidação, levando a formação do grupo carboxila. Após a reação, o material passa por uma desfibrilação moderada onde a CNF resultante apresenta uma boa homogeneidade, com espessura da ordem de 3 a 5 nm e comprimento entre 2-3  $\mu\text{m}$  [7;8;53].

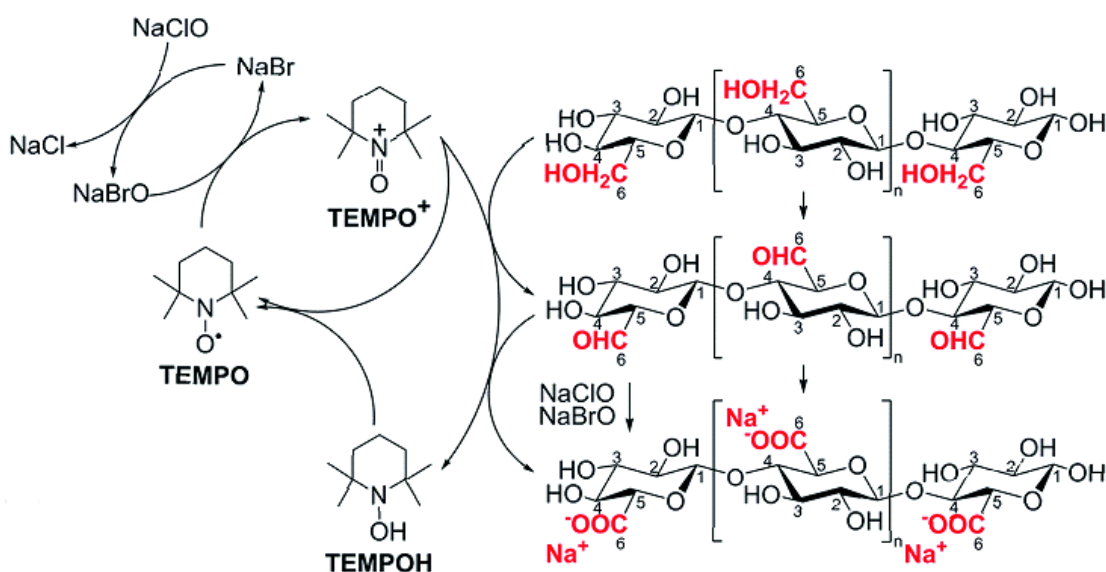


Figura 2.11: Ciclo catalítico da oxidação com reagente TEMPO. Adaptado de [59]

### 2.4.3 Métodos Enzimáticos

Enquanto a produção de nanocelulose por métodos físicos requer um alto gasto energético e a os métodos químicos podem levar a degradação dos equipamentos e são mais agressivos ao meio ambiente [9], uma alternativa a essas metodologias na produção da nanocelulose é a utilização de enzimas que despolimerizam as cadeias de celulose para a formação de açúcares. As reações de hidrólise enzimática são amplamente estudadas para a produção de etanol de segunda geração [60] e, mais recentemente, alguns pesquisadores sugeriram a utilização da hidrólise de forma moderada para a produção de CNF [61].

Em 2007, Pääkkö e colaboradores realizaram a síntese de NFC e géis por um procedimento realizado em quatro etapas, onde a primeira etapa consistia de um refinamento mecânico para maior acessibilidade das enzimas, seguido da hidrólise enzimática pela ação de uma enzima endoglucanase, que no geral hidrolisa as regiões de menor ordenação na fibra de celulose, uma segunda etapa de refinamento, seguida da homogeneização da suspensão através de um microfluidizador, produzindo NFC com espessura entre 10 e 20 nm [61]. Posteriormente, no mesmo ano, Henriksson e colaboradores apresentaram uma estratégia similar para a produção das nanofibras, porém, utilizaram diferentes concentrações da enzima e um homogeneizador de alta pressão, observando que

durante a hidrólise enzimática, ocorre a diminuição do grau de polimerização e o aumento do IC [10].

Mais recentemente, em 2018, Hu e colaboradores mostraram a possibilidade da produção de fibras oxidadas através da utilização de enzimas [11]. Além da endoglucanase, utilizaram outras enzimas denominadas auxiliares, como a monooxigenase lítica de polissacarídeos (LPMO), que possui sinergia com a endoglucanase melhorando a acessibilidade à estrutura da celulose [62]. Porém, apesar de agir de forma positiva para a despolimerização da celulose, a ação da LPMO não consistiu na hidrólise direta da celulose, mas da oxidação da ligação glicosídica, levando a formação de grupos carboxílicos na superfície das fibras [63]. Essa oxidação pode se dar tanto ao carbono C1 de um dos anéis da celobiose, quanto ao carbono C4 do outro anel. Um esquema da ação da monooxigenase é apresentado na Figura 2.12.

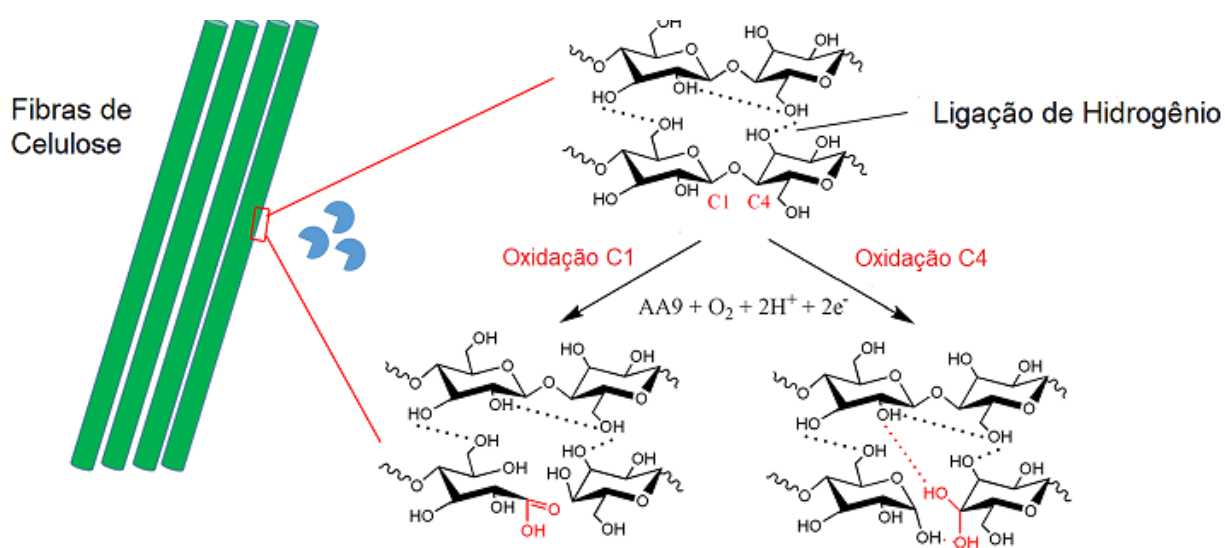


Figura 2.12: Esquema da oxidação da ligação glicosídica da celulose através da ação da enzima LPMO. Adaptado de [11].

## 2.5 ENZIMAS ATIVAS EM CARBOIDRATOS

Muitos microrganismos encontrados na natureza são aptos para a conversão de material lignocelulósico em alimento e energia, fazendo uso de diferentes tipos de enzimas, que atuam de forma sinérgica para a quebra da estrutura dos polissacarídeos. Assim, no início da década de 50 iniciou-se o estudo da utilização



das enzimas do tipo celulase, que são hidrolases que clivam as ligações glicosídicas para a conversão de celulose em glicose [64].

A variedade de enzimas que podem ser utilizadas para sintetizar, modificar e desconstruir carboidratos é vasta, dada a complexidade desse substrato. Entretanto, foi desenvolvido um banco de dados chamado Carbohydrate-Active Enzymes (CAZy) [65], dedicado a pesquisa e análise das informações bioquímicas, estrutural e genômica de enzimas ativas em carboidratos. Dentre as diferentes classes de enzimas ativas, pode-se citar: glicosiltransferases, carboidrato esterases, polissacarídeo-liases, proteínas com atividades auxiliares (AA), modulo de ligação a carboidratos e hidrolases de glicosídeos (GHs) [64].

### 3.5.1 Hidrolases de glicosídeos (GHs)

Entre as classes de enzimas mencionadas anteriormente, as GHs que são as principais responsáveis pela degradação enzimática de polissacarídeos, são compostas por 165 famílias identificadas e promovem a clivagem das ligações  $\beta$ -1,4 que unem os anéis de glicose na estrutura química da celulose [66]. A maioria das celulasas são GHs e, o mecanismo dessa reação, pode ocorrer de dois modos diferentes, com inversão ou retenção da configuração do carbono anomérico. O mecanismo com inversão, ocorre através de reação catalítica de uma única etapa, onde uma molécula de água realiza um ataque nucleofílico em um oligo ou polissacarídeo, um próton da água é transferido à base catalítica e um próton é transferido do ácido catalítico para a clivagem da ligação glicosídica, esse mecanismo está explicitado na Figura 2.13 [64].

Quando a hidrólise ocorre por um mecanismo de retenção de estrutura, ocorre uma reação em duas etapas onde, durante a primeira etapa, um próton é transferido para o ácido catalítico enquanto um ataque ao carbono anomérico é realizado pelo resíduo nucleofílico, formando um intermediário glicosil-enzima. Na segunda etapa, uma molécula de água entra no sítio ativo da enzima e realiza um ataque nucleofílico no carbono anomérico, quebrando a ligação do intermediário e um próton é transferido para a base [64].

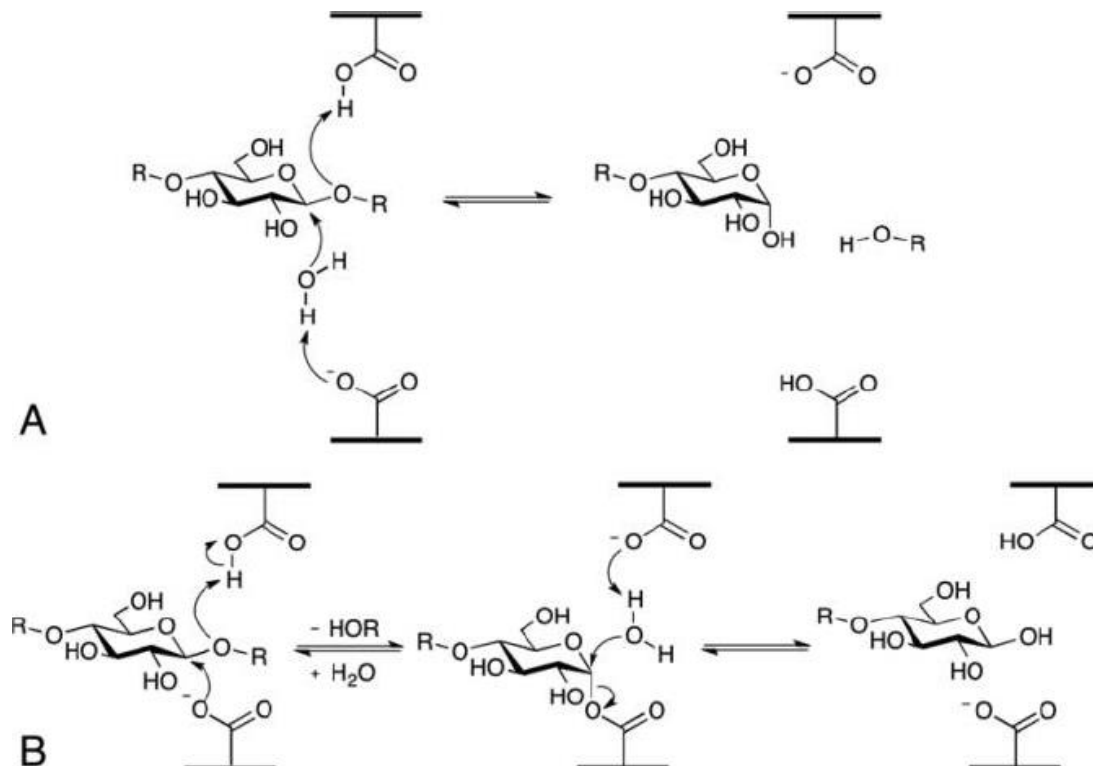


Figura 2.13: Esquema da reação enzimática de hidrólise da ligação glicosídica a) com inversão e b) com retenção de configuração. Adaptado de [64]

### 2.5.2 Endoglucanase

Entre as diferentes famílias que pertencem a classe das GHs, encontram-se as  $\beta$ -1,4-Endoglucanases (EG). As EG são enzimas responsáveis por iniciar a hidrólise, agindo na clivagem de ligações  $\beta$ -1,4 internas da estrutura da celulose [67]. A estrutura do seu domínio catalítico possui sítio ativo em forma de fenda, o que possibilita o ataque ao longo da cadeia de celulose nas regiões de menor ordenação, possuindo alta especificidade a essas regiões. Apesar de todas as EG catalisarem as mesmas reações bioquímicas, elas podem diferir no mecanismo pelo qual essa reação se dá, inversão ou retenção, e são distribuídas entre 17 famílias das GHs, possuindo estruturas terciárias únicas, porém similares [68].

### 2.5.3 Monooxigenases Líticas de Polissacarídeos

A classificação original na base de dados CAZy descrevia apenas enzimas que clivavam ou formavam estruturas de carboidratos complexos, como as citadas anteriormente. Entretanto, após a descoberta de enzimas correspondentes às famílias GH61 e CBM 33 como enzimas com mecanismo de ação diferentes, houve

a reclassificação para uma nova família, das enzimas com atividades auxiliares (AA), e foram denominadas como AA9 e AA10, respectivamente [69;70].

A estrutura das LPMOs é composta de uma face plana onde se encontra um átomo de cobre ( $\text{Cu}^{+2}$ ) e utilizam do oxigênio molecular e um doador de elétrons para oxidar diretamente a celulose no C1, C4 ou em ambos [71]. O mecanismo de reação das LPMOs é chamado de combustão enzimática e envolve a geração de radicais reativos que clivam a ligação C-C, deixando o carbono oxidado. As LPMOs são biocatalisadores dependentes de cobre que tornam a biomassa mais suscetível à quebra, favorecendo a hidrólise realizada pelas enzimas clássicas [72].

#### 2.5.4 Xilanase

As xilanases são enzimas ativas para a hidrólise da xilana e, assim como as celulases e outras enzimas que participam da hidrólise de polissacarídeos, as xilanases também são produzidas por microrganismos e participam das reações de despolimerização da parede celular vegetal. Devido a sua estrutura complexa, a degradação de xilana requer um complexo de enzimas, onde os componentes mais estudados foram as endoxilanases e as  $\beta$ -xilosidases, sendo o alvo deste estudo somente a primeira. Endo- $\beta$ -1,4-xilanases clivam as ligações glicosídicas na estrutura química do xilana, provocando sua despolimerização [73].

Durante a atuação da xilanase, a xilana não é atacada aleatoriamente, as ligações que são selecionadas para a hidrólise dependem da natureza molecular do substrato, ou seja, do tamanho da cadeia polimérica, do grau de ramificações e da presença de substituintes. A ação das xilanases em biomassa lignocelulósica leva a exposição de regiões antes não acessíveis anteriormente, melhorando a eficiência de outras enzimas, caso seja utilizada em um coquetel enzimático [74].



### 3 OBJETIVOS DO PROJETO DE PESQUISA

Em vista da revisão bibliográfica apresentada, este estudo teve como objetivo a síntese e caracterização de nanofibras de celulose oxidadas a partir de bagaço de cana-de-açúcar. Para isso, a biomassa utilizada foi pré-tratada pela ação de uma solução contendo clorito de sódio e outra contendo hidróxido de potássio, sucessivamente. Em seguida foi utilizada a ação conjunta de três diferentes enzimas: endoglucanase *ThCel7B*, xilanase *TcXyn10A* e monooxigenase lítica de polissacarídeos da família AA9. Essas enzimas atuam hidrolisando, ou oxidando no caso da LPMO, as ligações na molécula de celulose, facilitando o processo de desfibrilação. Finalmente, a desfibrilação se deu pela ação de um ultrassom de ponteira, diminuindo as dimensões das fibras de celulose. O material obtido foi comparado com uma amostra de nanocelulose fibrilada produzida pela rota tradicional (TEMPO).

#### Objetivos específicos:

- Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar e caracterização de sua composição
- Obtenção de nanofibras de celulose oxidadas através da ação conjuntas das enzimas citadas, com posterior uso de ultrassom de ponta.
- Caracterização das amostras obtidas por técnicas diferentes (DRX, FTIR, TG, MEV, XPS e Condutimetria).
- Comparação das análises realizadas com o material obtido pela rota tradicional (TEMPO).



## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia de produção da NFC oxidada pela ação de três diferentes enzimas é descrita a seguir. Os resultados obtidos com a NFC obtida através desta metodologia serão comparados com os resultados da NFC oxidada pela ação do reagente TEMPO. O esquema apresentado na Figura 4.1 mostra, etapa a etapa, como foram realizadas as reações para a produção das amostras de NFC.

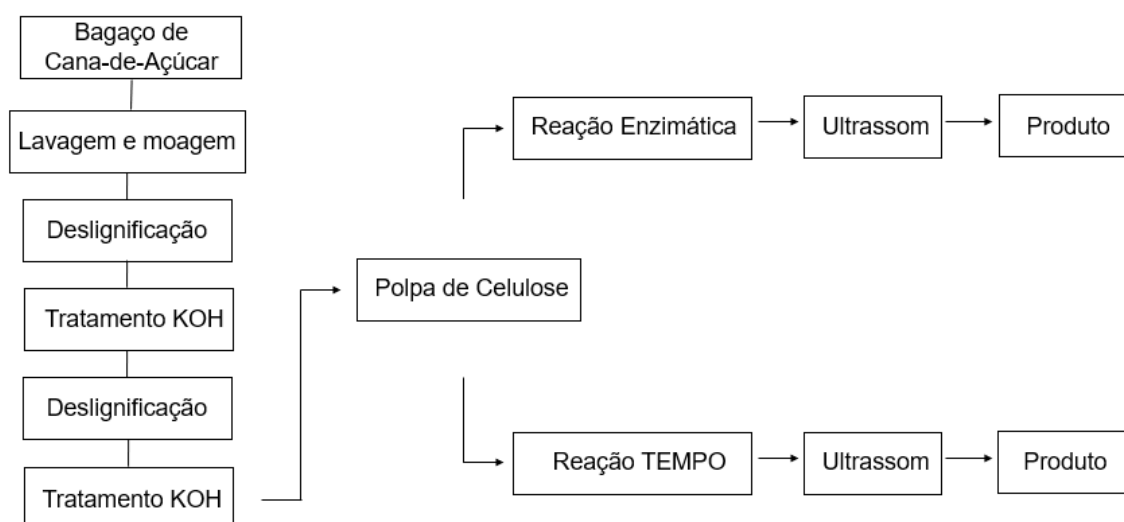


Figura 4.1: Esquema etapa a etapa para a produção dos materiais.

### 4.1 ENZIMAS UTILIZADAS

As enzimas utilizadas neste trabalho, endoglucanase ThCel7B, xilanase TcXyn10A e a LPMO da família AA9, foram produzidas pelo Grupo de Biotecnologia Molecular do Instituto de Física de São Carlos, em colaboração com o Professor Igor Polikarpov.

### 4.2 PROCESSO DE PRÉ-TRATAMENTO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

Como comentado anteriormente, o bagaço de cana-de-açúcar é composto majoritariamente por lignina, hemicelulose e celulose. Para obter um material com maior porcentagem de celulose em sua composição, ou seja, para promover a remoção dos outros componentes, o material foi submetido a um pré-tratamento com clorito de sódio e hidróxido de potássio, que causam a solubilização dos

componentes não celulósico ou o inchaço da fibra. Esta etapa de pré-tratamento foi realizada em colaboração com o Professor Antônio José Felix de Carvalho, da Escola de Engenharia de São Carlos, seguindo o procedimento da referência [75]. Esta etapa de pré-tratamento foi conduzida seguindo as especificações descritas a seguir, onde foram realizadas por duas vezes a etapa com utilização de clorito de sódio, etapa chamada de deslignificação, e duas vezes a etapa com utilização de hidróxido de potássio, alternando-se entre estes. O bagaço utilizado neste trabalho foi previamente lavado, seco e moído em moinho de facas com peneira de 20 mesh.

Em um béquer, foram adicionados água destilada (0,4 L) e clorito de sódio (5,2 g), o pH foi ajustado para 4,0 com a adição de ácido acético glacial, em seguida foi adicionado o bagaço já seco (5,0 g). Em banho-maria, a solução foi colocada sob agitação magnética e aquecida a temperatura de 65 °C por uma hora. Em seguida, o material foi filtrado em um sistema à vácuo.

O material obtido após a filtração foi colocado em um béquer onde adicionou-se água destilada (0,6 L) e hidróxido de potássio (12,0 g). A solução foi mantida sob agitação magnética em banho-maria com temperatura de 85 °C por duas horas. Em seguida, o material foi filtrado em sistema à vácuo.

O material obtido após a filtração passou novamente pela reação de branqueamento descrita anteriormente, utilizando água destilada (0,4L), clorito de sódio (5,2 g), o pH ajustado a 4,0 com ácido acético glacial, temperatura de 65 °C e tempo de reação de 1 hora. O material obtido foi filtrado em um sistema à vácuo. Em seguida, o material foi colocado em um béquer com água destilada (0,6 L) e hidróxido de potássio (30,0 g). A solução foi mantida sob agitação magnética em banho maria com temperatura de 85 °C por duas horas. Em seguida o material foi filtrado em sistema à vácuo até pH neutro.

#### 4.3 OBTENÇÃO DE NANOFIBRAS DE CELULOSE VIA ENZIMÁTICA

Para a produção de nanofibrilas de celulose que sejam consideradas mais ecológicas e que possuam uma razão alta comprimento/diâmetro e grupos oxidados, foi utilizada uma estratégia da utilização de três diferentes tipos de enzima; a Endoglucanase, a Xilanase e a Monoxidase Lítica de Polisacarídeos (LPMO). Estas enzimas atuam de forma sinérgica, onde a endoglucanase tem como função quebrar as ligações entre as fibras de celulose nas regiões de menor ordenação, a xilanase



atua principalmente na quebra das moléculas de hemicelulose na cadeia e, a LPMO, atua na hidrólise da ligação glicosídica onde ocorre a formação de um grupo carboxilato. Após a reação, as fibras são finalmente separadas com a utilização de um ultrassom de sonda. O processo completo é descrito com detalhes a seguir.

Para a reação com as enzimas do material obtido da etapa de pré-tratamento, foi utilizada uma proporção de 1 mg de cada enzima para 1 g de substrato. Assim, em um frasco Erlenmeyer de 50 mL, adicionou-se Endoglucanase (10,0  $\mu$ L; 2,0 mg/mL), Xilanase (4,0  $\mu$ L; 5,0 mg/mL), LPMO (10,6  $\mu$ L; 1,9 mg/mL), além de 1 g do substrato, neste caso o bagaço de cana-de-açúcar submetida a etapa de pré-tratamento. Para que ocorresse a doação de elétrons para a oxidação realizada pela enzima LPMO, foi adicionado ácido ascórbico na concentração de 1 mM. A reação foi realizada em tampão fosfato 50 Mm a pH 5,0, sendo a massa do substrato igual a 1% do volume de tampão utilizado, com temperatura de 50 °C e agitação. Dois conjuntos de experimentos foram realizados com períodos diferentes de tempo, 3 horas e 24 horas. Além disso, as reações realizadas foram feitas em paralelo com reações controle, em um total de sete amostras controle. Três destes com somente duas enzimas, três com somente uma enzima e o último com nenhuma enzima.

Após o procedimento descrito anteriormente, o frasco foi aquecido a 95 °C por 15 minutos para a desnaturação das proteínas do meio e, conseqüentemente, a reação seja cessada. Em seguida, foi separado o material sólido do seu sobrenadante, o qual foi guardado em câmara fria, a temperatura de 4 °C, enquanto que o material sólido é redisperso em uma solução de HCl 0,1 M. A seguir, a fração sólida passou por etapas de centrifugação e descarte do líquido separado, com posterior lavagem com água destilada, até que o pH se encontra próximo a 6,0. Enfim, o material foi levado a um ultrassom de sonda, por 20 minutos com pulso de dois segundos e intervalo de 0,5 segundos, a 30% de amplitude para que ocorresse a desfibrilação.

#### 4.4 OBTENÇÃO DAS NANOFIBRAS DE CELULOSE VIA REAGENTE 1-OXIL-2,2,6,6-TETRAMETILPIPERIDINA (TEMPO)

As nanofibras de celulose produzidas a partir desta metodologia são de interesse para a comparação com as nanofibrilas produzidas pela via enzimática, pois ambas as técnicas produzem fibras que possuem um grupo oxidado ligado à

sua estrutura. Na reação com a 1-oxil-2,2,6,6 tetrametilpiperidina (TEMPO), brometo de sódio e hipoclorito, o carbono que se encontra fora do anel glicosídico na estrutura da celulose é oxidado de uma hidroxila para um ácido carboxílico. A seguir, é detalhado o processo completo desta etapa.

Adicionou-se o reagente TEMPO (0,025 g) e brometo de sódio (0,25 g) ao material obtido da etapa de pré tratamento (2,0 g) suspenso em água destilada (0,15 L). A solução foi colocada sob agitação magnética a temperatura ambiente e, em seguida, uma solução de hipoclorito de sódio (0,13 L, 2% v/v; pH: 10) foi adicionada lentamente à suspensão. Enquanto a reação ocorria, o pH foi monitorado e mantido em torno de 10,5 com a adição de hidróxido de sódio (0,5 M). Após duas horas de reação, a solução obtida foi filtrada, o material lavado, suspenso em água e colocado em um ultrassom de sonda, a 30% de amplitude durante 5 minutos, para a formação de uma dispersão do material.

## 4.5 CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS OBTIDOS

### 4.5.1 Composição Química

As amostras de materiais lignocelulósicos, antes e após as etapas de pré-tratamento, foram caracterizadas quanto à sua composição química de acordo com os protocolos estabelecidos por Rocha e colaboradores [76] e validada por Gouvea e colaboradores [77] com algumas adaptações realizadas pelo Prof. Dr. George Jackson do Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol. Este procedimento requer a hidrólise química total com o ácido sulfúrico concentrado e padronizado, garantindo a eficiência do processo.

Inicialmente, o material a ser analisado, seja ele o bagaço *in natura* ou o material obtido após alguma etapa de pré-tratamento, foi adicionado em um Erlenmeyer (1,0 g) de 100 mL em um banho termostático a 45 °C, adicionou-se ácido sulfúrico (10 mL; 72%) já na temperatura adequada e amostra foi agitada por 7 minutos. A seguir, adicionou-se água destilada (50 mL) e a amostrado foi agitada e transferida a outro Erlenmeyer de 500 mL, enquanto que, com a utilização de uma pisseta, o Erlenmeyer inicial foi lavado com água destilada (225 mL) e a água dessa lavagem foi transferida ao último recipiente. Em seguida, este foi autoclavado a 121°C por 30 min.

Após a descompressão da autoclave, os frascos foram resfriados a temperatura ambiente, filtrados em papel filtro quantitativo que possui quantidade de cinza pré-determinada (0,00021 g) e foram secos a 105 °C em estufa por 2 h. O Erlenmeyer foi lavado até o preenchimento do balão volumétrico de 500 mL, o qual foi reservado para posteriores análises de açúcares, lignina solúvel e produtos de degradação.

#### 4.5.1.1 Determinação da concentração de Lignina

A determinação da concentração de lignina em um material lignocelulósico é feita tanto através da fração sólida quanto da fração líquida obtidas da reação de hidrólise com ácido sulfúrico. O papel de filtro contendo a fração sólida, após secagem em estufa a 105 °C, teve sua massa medida e esse valor será denominado  $M_l$ . O material, então, é transferido para cadinhos de porcelana e calcinado em mufla a 800 °C por 2 h. Após a queima, foi obtida a massa das cinzas, denominada  $M_c$ , que é comparada com a massa do bagaço seco, denominado  $M_b$ , juntamente com a  $M_l$  através da equação 1.

$$\% \text{ de Lignina Insolúvel} = \frac{M_l - M_c}{M_b} \times 100\% \quad (1)$$

Por outro lado, a fração solúvel em ácido é determinada a partir de uma análise da absorvância a 280 nm em um espectrofotômetro UV-visível (Perkin Elmer – Lambda 25). Para isto, foi colocada a amostra (5,0 mL) após hidrólise ácida em um balão volumétrico de 100 mL, juntamente com água destilada (50 mL) e hidróxido de sódio (2 mL; 6,5 mol/L). Esta medida considerou a influência da absorção devido a possível presença de furfural e 5-hidroximetilfurfural e a concentração de lignina solúvel é dada pela equação 2.

$$C_{lig} = 0,04187x\{A_{280nm} - [(C_{furf}x \varepsilon_{Furf}) - (C_{HMF} x \varepsilon_{HMF})]\} - 0,0003279 \quad (2)$$

onde,  $C_{lig}$  : Concentração de lignina solúvel no hidrolisado ( $\text{g.L}^{-1}$ ); Absortividade da lignina : 0,04187; Coeficiente linear da absortividade da lignina : 0,0003279;  $A_{280nm}$  : Absorbância do hidrolisado em 280 nm;  $\varepsilon_{HMF}$  : Absortividade do hidroximetilfurfural ( $114 \text{ L.g}^{-1}\text{cm}^{-1}$ );  $\varepsilon_{Furf}$  : Absortividade do furfural ( $146,85 \text{ L.g}^{-1}\text{cm}^{-1}$ );  $C_{HMF}$  :

Concentração de hidroximetil furfural no hidrolisado ( $\text{g.L}^{-1}$ ) e  $C_{\text{Furf}}$ : Concentração de furfural no hidrolisado ( $\text{g.L}^{-1}$ )

Finalmente, a concentração final de lignina encontrada no material é dada pela equação 3.

$$\%Lignina\ Total = \%Lignina\ Solúvel + \%Lignina\ Insolúvel \quad (3)$$

#### 4.5.1.2 Cinzas Totais

Para a determinação da concentração de cinzas do bagaço *in natura* e do material obtido em cada etapa, a amostra (1,0 g) é colocada em cadinhos de porcelana e foram calcinadas a temperatura de 800 °C por 3 h em uma mufla, com rampa de aquecimento programada para 1 h a 200 °C, 1 h a 400 °C e 2 h a 800 °C. Posteriormente, após o resfriamento, a massa foi aferida e a % de cinzas foi determinada pela equação abaixo 4.

$$\%cinzas = \frac{\text{massa de cinzas obtidas}}{\text{massa seca inicial}} \times 100\% \quad (4)$$

#### 4.5.1.3 Furfural

A determinação da presença de furfural nas amostras foi realizada por cromatografia líquida de ultra altaeficiência (Termofisher, modelo Ultimate 3000), em uma coluna C18, utilizando como solventes o tampão fosfato de sódio (10mM; ph 2,6) e acetonitrila na proporção de 19/1 (tampão/acetonitrila) a uma vazão de 1 mL/min a temperatura de 25 °C. Os compostos foram detectados na presença de um detector UV-visível em 276 nm.

#### 4.5.1.4 Carboidratos, hidroximetilfurfural e ácidos orgânicos

O material hidrolisado obtido da metodologia de caracterização, descrita anteriormente, do bagaço *in natura* e das amostras tratadas, ou seja, os açúcares, ácidos orgânicos e hidroximetilfurfural, foram analisados pelo método cromatográfico com o uso de um cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC - Waters Alliance e2695), equipado com detector de índice de refração para glicose, xilose, arabinose,

mnosacarídeos e ácido acético, e detector ultravioleta para lignina solúvel. A coluna utilizada foi Aminex HPX 67 H (exclusão de íons).

#### 4.5.2 Produtos de Oxidação

Foi realizada uma análise dos produtos obtidos através da reação da biomassa frente às enzimas utilizadas para verificar quais moléculas, oxidadas ou não, estão presentes no sobrenadante da amostra após o aquecimento da solução onde ocorreu a reação enzimática. Para isso, o sobrenadante da reação é separado, centrifugado para remoção de possíveis fibras maiores e, posteriormente, analisado por método cromatográfico utilizando um cromatógrafo de troca aniônica de alta eficiência acoplada com detecção eletroquímica por amperometria pulsada (HPAE-PAD) equipado com uma pré-coluna e uma coluna de troca aniônica CarboPac PA10 (Dionex ICS 5000, ThermoFisher). Como fase móvel foi utilizada uma solução de hidróxido de sódio 400 mM com fluxo de 1,0 mL. min<sup>-1</sup> com gradiente de concentração (16 – 400 mmol/L) por 30 min. Os cromatogramas das amostras foram comparados com os padrões de produtos oxidados e não oxidados provenientes da hidrólise da celulose e hemicelulose com grau de polimerização baixo, como glicose, celobiose, triose, etc.

#### 4.5.3 Difração de Raios-X

A celulose é um material semicristalino, constituído de regiões de menor ordenação estrutural e regiões de maior ordenação estrutural. Através da técnica de Difração de Raios-X (DRX) podemos avaliar a cristalinidade de uma amostra seguindo procedimentos de deconvolução dos difratogramas utilizando softwares específicos para este fim [78]. As amostras, previamente suspensas em água, foram colocadas em um estufa a 35 °C por dois dias para que a água evaporasse e um filme do material fosse formado, esse filme foi utilizada como amostra para a aquisição de dados de difração. As análises foram realizadas utilizando um equipamento Rigaku Miniflex 600, com radiação Cu K $\alpha$  ( $\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$ ) a temperatura ambiente, operando a 40 kV e 15 mA. A varredura  $2\theta$  foi realizada entre os ângulos de 5° e 60°, com passo 0.05° e exposição de 15 s. Os dados obtidos foram analisados através do software PeakFit®, onde foi realizada a deconvolução dos picos seguindo o mesmo procedimento realizado por Park e colaboradores [78].

Essa análise leva a deconvolução do difratograma de celulose em 6 picos, sendo cinco desses picos referentes a região de maior ordenamento e um, na posição 20,5 °, referente a região de menor ordenamento. A partir desses dados, pode-se calcular a área da região de cada pico e, conseqüentemente, pode-se determinar o IC do material através da equação 5, onde %Cristalinidade é a cristalinidade do material,  $área_{min}$  é a área do pico referente a região de menor ordenação e  $área_{total}$  é a somatória das áreas de todos os picos observados.

$$\%Cristalinidade = \frac{área_{rmin}}{área_{total}} \quad (5)$$

#### 4.5.4 Espectroscopia no Infravermelho

Como ocorre uma reação de oxidação devido a presença de uma enzima oxidante durante a reação, espera-se que existam diferenças na estrutura química das fibras pós-modificação. Da literatura, sabe-se que ácidos carboxílicos apresentam uma banda intensa e larga na região entre 3300-2500  $cm^{-1}$ , devido ao estiramento da ligação O-H. Nessa região, também é possível observar uma banda referente a um estiramento da ligação C-H. Também dos ácidos carboxílicos, é possível observar uma banda intensa na região entre 1760-1690  $cm^{-1}$  referente ao estiramento C=O do ácido carboxílico.

Assim, as amostras previamente suspensas em água, foram deixadas em estufa a 35 °C por dois dias para que a água evaporasse e um filme do material fosse formado. Este filme foi utilizado como amostra para a aquisição de dados de Espectroscopia no Infravermelho utilizando um espectrômetro Nicolet 6700 (Thermo Fischer) entre 650 e 4000  $cm^{-1}$ .

#### 4.5.5 Condutimetria

A fim de determinar a concentração dos grupos funcionais produzidos pela modificação que ocorreu depois da oxidação, utilizou-se da análise condutimétrica. Através da mudança de condutividade pela adição de uma solução ácida à solução contendo o material obtido, calcula-se a concentração de grupos carboxilatos. Para isso, foi realizado uma titulação condutimétrica como indicado no artigo de revisão apresentado por Foster e colaboradores [79], onde uma suspensão contendo o material produzido (35 mg) foi dispersa em água destilada (49,3 mL), então adiciona-

se uma solução de hidróxido de sódio (0,2 mL; 0,1M) e uma solução de cloreto de sódio (0,5 mL; 0,01 M). A seguir essa solução é deixada em agitação por 30 minutos para estabilização, então titulasse com ácido clorídrico (5  $\mu$ L), esperando de 30 a 60 s para estabilização antes de uma nova adição. Após o ponto de equivalência, um excesso de ácido clorídrico foi adicionado.

#### 4.5.6 Microscopia Eletrônica de Varredura

Aas amostras obtidas foram analisadas por Microscopia Eletrônica de Varredura em um microscópio ZEISS modelo SIGMA equipado com canhão de elétrons por emissão de campo (MEV-FEG), com o objetivo de investigar a morfologia do material produzido. Para a realização dessa análise, uma amostra da suspensão do produto final foi diluída para uma concentração de 0,01% massa/volume. Em seguida, adicionou-se essa suspensão (10  $\mu$ L) sobre a superfície de um substrato de silício previamente preparado. Os substratos, contentando a amostra, foram deixados para secar e, antes de coloca-los no microscópio, foi feita deposição com ouro, durante 10 segundos.

#### 4.5.7 Termogravimetria

Com a finalidade de examinar a estabilidade térmica das amostras foi realizada através de análises termogravimétricas, onde monitorou-se a variação de massa do material em função da temperatura em um ambiente de atmosfera controlada. As análises foram realizadas em um equipamento de análise termogravimétrica modelo STA 409C – NETZSCH em atmosfera com fluxo de ar sintético e argônio de 10 mL/min e taxa de aquecimento de 10 °C/min a partir da temperatura ambiente até 600°C aproximadamente. As amostras analisadas eram filmes produzidos a partir da suspensão em água do produto fina, que foram deixadas em estufa a 35 °C por dois dias para que a água evaporasse e ocorresse sua formação.

#### 4.5.8 Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS)

Para caracterizar as espécies químicas presentes na superfície das amostras, foram realizadas medidas do espectro de alta resolução dos elementos constituintes das amostras por XPS. A aquisição do espectro foi realizada em um equipamento da

Scienta Omicron modelo ESCA+ equipado com um analisador hemisférico EA125 e uma fonte de raios-x monocromática Xm1000A ( $kA=1486,7$  eV). A fonte de raios-x foi utilizada com uma potência de 280W e um modo de energia de passagem constante de 50 eV. A medida do espectro survey foi realizada com passo em energia de 0,1 eV enquanto os espectros de alta resolução foram obtidos com uma resolução de 0,05 eV. A análise dos dados foi realizada pelo software CasaXPS (versão 2.3.16) [80], onde o background em espectros de alta resolução é calculado pela função Shirley. Os efeitos de carga foram corrigidos usando o pico de carbono 1s em 284,8 eV do carbono adventício presente na superfície das amostras.



## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA

O trabalho teve início com a preparação do bagaço *in natura* para a realização da reação enzimática. Para isso, realizou-se o procedimento descrito anteriormente na seção de materiais e métodos, adaptado de Grande e colaboradores [75], onde cada etapa teve como objetivo diminuir a concentração dos outros componentes da biomassa que não sejam a celulose. A Tabela 5.1 apresenta os valores finais encontrados, em porcentagem para a lignina total, cinzas, hemicelulose e celulose, bem como o rendimento em massa da celulose obtida do início do processo até a etapa em questão.

Os outros componentes da matriz celulósica, como xilana e lignina, podem blindar a celulose da ação das enzimas como a LPMO e a endoglucanase e, ao analisar as amostras após cada etapa, observa-se que a concentração final de lignina na amostra era baixa, aproximadamente 1,3%, quando comparada com a concentração dos outros componentes e com sua concentração inicial, aproximadamente 21% em massa seca do material. Além disso, apesar da concentração de hemicelulose ser relativamente alta, no coquetel de enzimas utilizadas temos uma enzima xilanase, que promove a quebra desse componente, além de poder agir de forma sinérgica com as outras enzimas. Assim, não é esperado que haja problema para a reação enzimática com a composição com as proporções apresentadas pelo material decorrente dos tratamentos realizados.

Tabela 5.1: Composição química e rendimento dos materiais lignocelulósicos (em %). Onde Etapa 1 e 3 são as utilizações de Clorito de Sódio e as Etapas 2 e 4 são as utilizações de Hidróxido de Potássio

	<i>In Natura</i>	Etapa 1	Etapa 2	Etapa 3	Etapa 4
<b>Celulose</b>	37,8 ± 0,1	46,0 ± 0,3	68,4 ± 0,5	68,0 ± 0,5	75,9 ± 3,5
<b>Hemicelulose</b>	22,2 ± 0,1	23,9 ± 0,1	21,0 ± 0,1	18,3 ± 0,1	11,7 ± 0,4
<b>Lignina</b>	21,1 ± 0,1	6,0 ± 0,7	2,9 ± 0,45	1,3 ± 0,05	1,3 ± 0,1
<b>Cinzas</b>	5,2 ± 0,6	1,0 ± 0,1	0,6 ± 0,3	0,4 ± 0,01	0,6 ± 0,03
<b>Total</b>	86,3 ± 0,2	76,9 ± 0,2	92,9 ± 0,2	88,0 ± 0,2	89,5 ± 1,4
<b>Rendimento</b>	-	80,6	55,6	54,5	43,0

Como o intuito deste trabalho foi a produção de nanofibras de celulose, não estendemos a caracterização das amostras nas etapas iniciais, somente a comparação entre o material antes e após a reação enzimática.

## 5.2 PRODUTOS DE OXIDAÇÃO

Um indício do sucesso da reação de oxidação das moléculas de celulose pela utilização da enzima LPMO é verificado através da observação das moléculas que compõem o sobrenadante das amostras do procedimento realizado. Isso pode ser feito através de um cromatógrafo de troca iônica, onde as moléculas que possuem algum estado de oxidação, sofrem maior atração com a coluna e ficam retidas por mais tempo. As moléculas menores e sem carga sofrem uma menor atração e saem, levadas pela fase móvel, primeiro durante a análise. Na Figura 5.1, é apresentada uma comparação das reações realizadas com os padrões dos produtos solúveis para esses carboidratos.

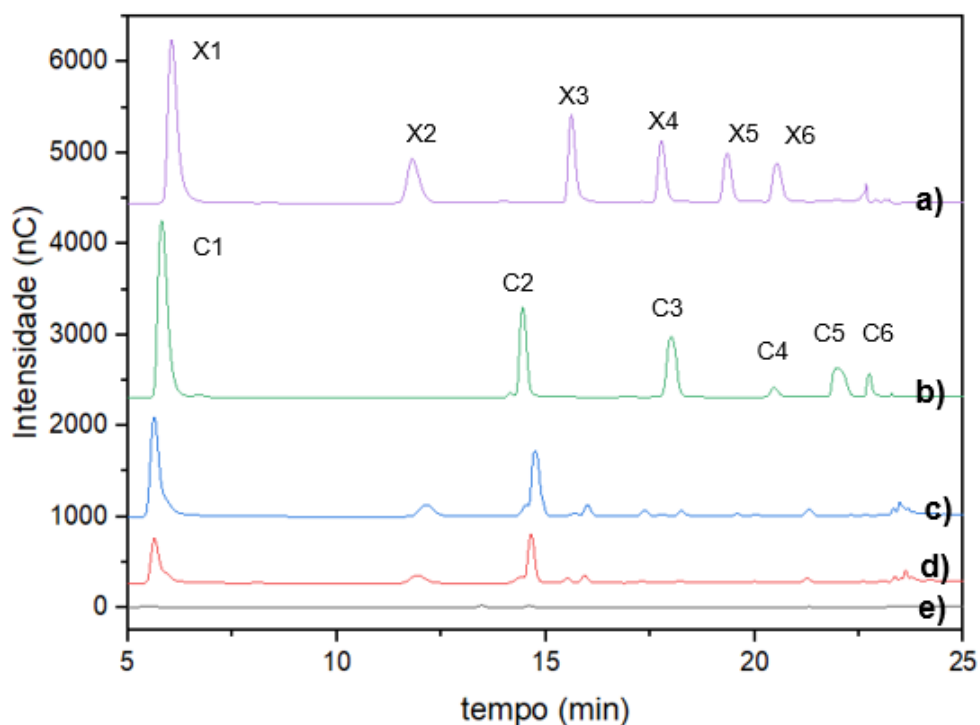


Figura 5.1: Cromatograma dos padrões e dos produtos solúveis de oxidação. onde a) padrão para xilose (X1) e xilo-oligosacarídeos (de X2 a X6) b) padrão para glicose (C1) e oligossacarídeos (de C2 a C6); c) é a reação realizada por 3 horas; d) é a reação por 24 horas e e) é um padrão de ácido ascórbico

Da Figura 5.1 observa-se que as reações de hidrólise da biomassa frente a ação das enzimas levaram a formação de diferentes produtos como xilose, xilobiose, xilotriose, glicose, celobiose, celotriose, que podem ser identificados se comparados com os padrões. Ao analisar a região próxima dos 23 minutos nos cromatogramas, observa-se sinais que não estão relacionados com os padrões apresentados na figura, esses sinais são dos produtos obtidos através da oxidação realizada pela enzima LPMO [81]. Também é possível perceber o aumento da intensidade do sinal para a reação após 24 horas em relação à reação realizada por 3 horas.

Através da Figura 5.2, podemos observar as diferentes reações que foram realizadas para controle da ação das enzimas.

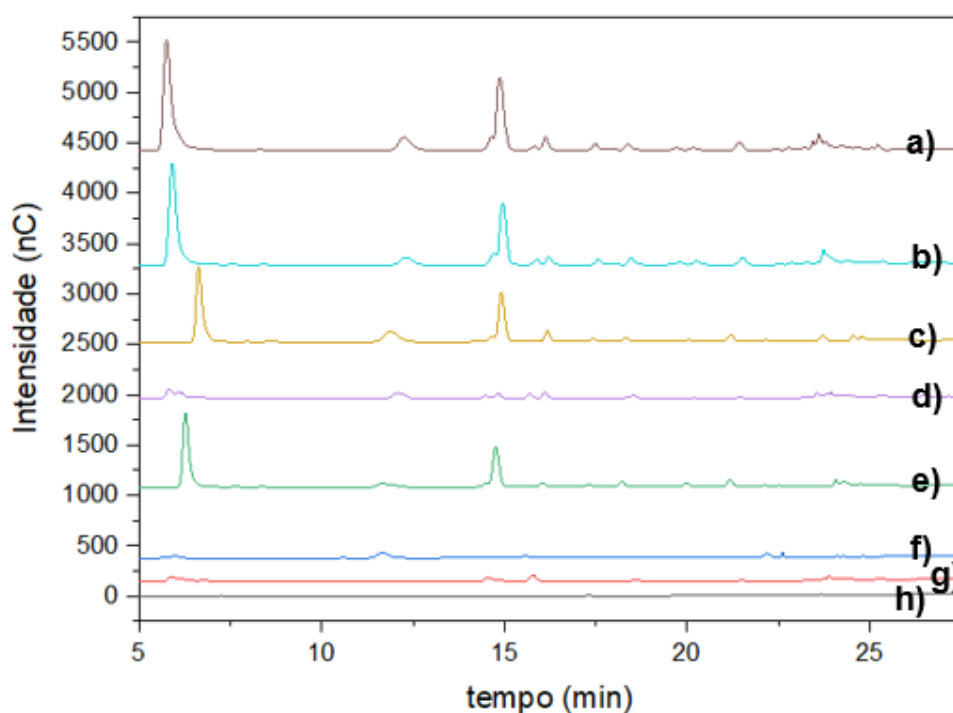


Figura 5.2: Reação enzimática realizada por 24 horas e seus controles. Onde a) reação com as três enzimas; b) reação com endoglucanase e LPMO; c) reação com endoglucanase e xilanase; d) reação com xilanase e LPMO; e) reação com endoglucanase somente; f) reação com xilanase somente; g) reação com LPMO somente e h) nenhuma enzima utilizada.

De imediato, pode-se observar que ação conjunta das três enzimas leva a um sinal de maior intensidade para o sinal referente a glicose e xilose (C1 e X1) quando comparado com as reações controle dispostas abaixo na Figura 5.2, indicando que,

ao atuarem simultaneamente, ocorre um aumento na eficiência catalítica na hidrólise da biomassa. Além disso, pode-se inferir que mesmo a ação da xilanase e a oxidação realizada pela enzima LPMO apresentam uma maior eficiência, em bom acordo com a literatura [62;82;83].

Outras peculiaridades que a remoção, ou adição, de cada enzima causa em cada reação podem ser observadas nos cromatogramas. A comparação é feita para a reação de 24 horas, onde esperava-se encontrar o máximo de produto solúvel proveniente do procedimento. Para as amostras de controle “f” e “g”, reações somente com xilanase ou LPMO respectivamente, nota-se que não há nenhum sinal distinto referente a moléculas menores, como glicose, comparado com as outras amostras. Mesmo na região característica das moléculas oxidadas, observa-se uma diferença significativa entre as reações controle, conforme mostra a Figura 5.2. Comparada com os dados apresentados na Figura 5.3, observa-se que existe uma maior concentração de produtos para a reação principal, onde estão as três enzimas que foram utilizadas. Além disso, é possível observar que a atuação da endoglucanase é fundamental para que a reação ocorra de forma efetiva, pela ação conjunta dessas enzimas, ocorrendo maior oxidação nas fibras de celulose do material inicial.

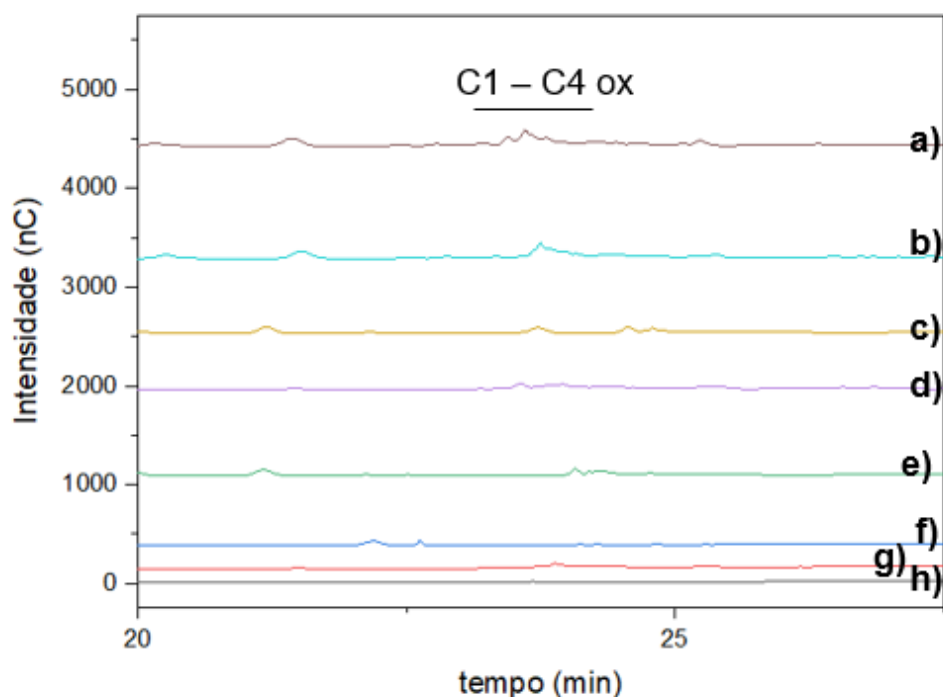


Figura 5.3: Destaque da região dos oxidados da figura 5.2. Onde a) reação com as três enzimas; b) reação com endoglucanase e LPMO; c) reação com endoglucanase e xilanase; d) reação com xilanase e LPMO; e) reação com endoglucanase somente; f) reação com xilanase somente; g) reação com LPMO somente e h) nenhuma enzima utilizada.

Da Figura 5.3, destaca-se a região dos produtos oxidados que foram obtidos da reação após 24 horas, a reação com maior intensidade. Ao comparar com os controles que estão apresentados na mesma figura, a reação “a”, que contém as três enzimas, apresenta mais picos e com maior intensidade do que aqueles que se encontram nas outras amostras. Outros trabalhos da literatura já apresentaram cromatogramas com informações acerca dos produtos solúveis [81;84;85], porém, a comparação entre esses trabalhos com os cromatogramas aqui apresentados não é feita de forma linear uma vez que o tempo da análise pelo cromatógrafo é diferente. Entretanto, da análise destes resultados pode-se perceber o mesmo perfil de retenção ao apresentado na Figura 5.3, indicando que essa região seja referente aos produtos oxidados de oligossacarídeos de C1 a C4.

Em resumo, estes dados mostraram que, com o aumento do tempo de reação, ocorre um aumento na concentração de produtos solúveis no sobrenadante. Além disso, ao utilizarmos mais de uma enzima para a reação, ocorre um aumento da concentração de produtos, ou seja, a ação das enzimas em conjunto apresenta uma melhor eficiência que a utilização de cada enzima de forma separada, ou mesmo em duplas.

### 5.3 DIFRAÇÃO DE RAIOS-X

Na Figura 5.4, é apresentado o difratograma de raios-X da amostra referente à reação por 3 horas, assim como seus picos deconvoluídos. Observa-se picos de difração característicos da estrutura cristalina para uma amostra de nanocelulose quando comparada com a literatura [79]. A primeira região, em aproximadamente  $16^\circ$ , é formada pela sobreposição da difração de dois planos (110) e (-110), a segunda região é relacionada a difração do plano (200) e do plano (021) sobrepostos, além da componente amorfa da amostra. Próximo a região de  $35^\circ$ , encontra-se o último pico da estrutura da celulose referente ao plano (040).

Os dados obtidos a partir dos difratogramas de raios-X são apresentados na Tabela 5.2, onde foram comparados o índice de cristalinidade (IC) das amostras das reações de 3 e 24 horas, além da amostra TEMPO oxidada e de uma última amostra, chamada controle, que representa o mesmo processo de produção que as amostras das reações enzimáticas porém sem a adição de enzimas, como uma reação “em branco”. Após a deconvolução dos picos obtidos dos difratogramas, foi analisado o IC através da equação 5 anteriormente apresentada.

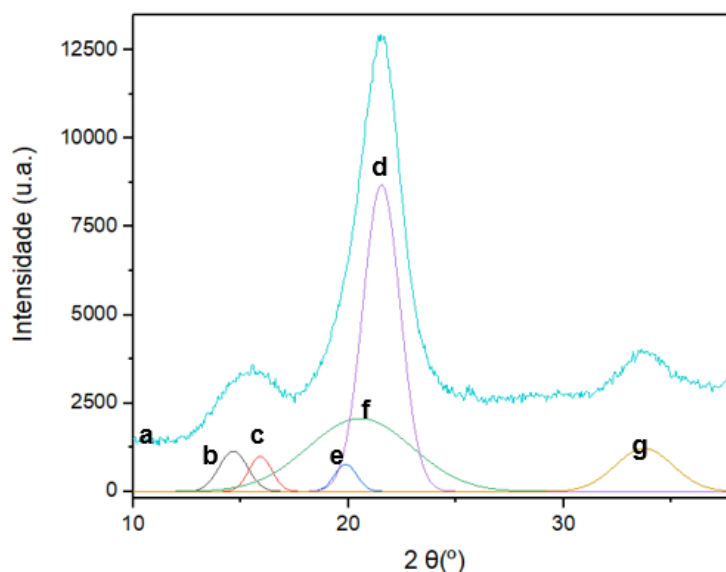


Figura 5.4: DRX do material obtido para a amostra relativa a 3 horas e seus picos deconvoluídos e indexados, onde a) difratograma da amostra, b) plano (110), c) plano (-110), d) plano (200), e) plano (021), f) componente amorfa e g) plano (040).

Pode-se observar através dos dados apresentados que não há uma diferença significativa no IC, entretanto, a amostra referente a reação de 24 horas apresentou uma menor IC em comparação com a amostra referente a reação de 3 horas. Este resultado não era esperado para o procedimento utilizado pois, como a endoglucanase hidrolis principalmente regiões de menor ordenação, esperava-se um aumento da cristalinidade do material com o aumento do tempo de reação, isto pode ter acontecido devido a ação da LPMO que cliva regiões de maior ordenação, transformando em um sítio preferencial para a endoglucanase. Outras análises são necessárias para melhor entender esse resultado, assim este dado será abordado novamente em momento oportuno.

O IC das amostras produzidas com a utilização de enzimas e com a utilização do reagente TEMPO não apresentou uma diferença significativa. Era esperado que o IC das amostras obtidas com a ação das enzimas fosse maior, uma vez que a oxidação TEMPO não tem ação sobre a estrutura cristalina da celulose. A ação das enzimas deveria aumentar o IC devido a solubilização das regiões de menor ordenação.

Tabela 5.2: Índice de cristalinidade obtido para as amostras através da análise da deconvolução dos difratogramas de raios-X.

Amostra	Índice de Cristalinidade (%)
Reação 3 horas	72±3
Reação 24 horas	65±1
Controle	69±2
TEMPO	68±1

#### 5.4 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO

A molécula de celulose, assim como outras moléculas, possui vibrações específicas na região do infravermelho que podem ser verificadas para confirmar sua estrutura química. Ao modificar as ligações através da oxidação do material, muda-se o *fingerprint* da molécula e, então, pode-se comparar o produto final de uma reação com o seu material inicial e identificar as diferenças que ocorreram. Para este trabalho, a mudança na estrutura química que se busca observar é a do grupo carboxilato, cuja vibração ocorre na faixa entre 1760-1690  $\text{cm}^{-1}$ . Na Figura 5.5 são apresentados os espectros de infravermelho para as amostras referentes a reação por 3 e 24 horas, além da amostra controle.

De imediato, não é possível afirmar se existe diferença estrutural entre as amostras. Porém, observa-se que existe um pequeno ombro na região que caracteriza a presença do grupo carboxilato. Da literatura, sabe-se que a vibração deste grupo, em geral, apresenta um alta intensidade, porém salienta-se que não existem tantas modificações em relação à concentração total de celulose. Além disso, o fato do grupo modificado estar posicionado no carbono C1 do anel pode levar a um menor grau de liberdade de movimento para a molécula, o que diminuiria a intensidade do sinal. Ainda nas Figuras 5.5b e 5.5c, temos em destaque a região onde ocorreu a modificação e a comparação com o trabalho de Hu e colaboradores [86], mostrando resultados similares quando a mesma metodologia foi utilizada.

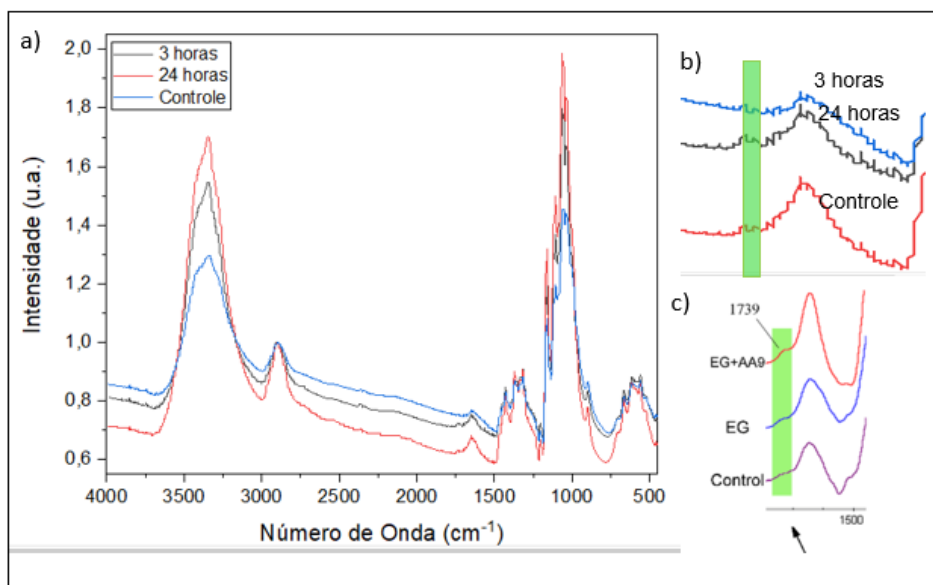


Figura 5.5: a) espectro de Infravermelho para as reações com 3 horas e 24 horas e para o controle, b) destaque da região relativa a carboxila e c) adaptado de [11] para comparação.

## 5.5 CONDUTIMETRIA

Em um meio aquoso, o grupo carboxilato resultante da reação de oxidação, se comporta como um ácido fraco, ou seja, a dissociação do hidrogênio desse grupo ocorre com maior dificuldade. Em termos de condutividade, ao adicionar uma solução de um ácido forte em uma solução contendo uma base forte, observa-se primeiramente um decréscimo na condutividade do meio conforme ocorre a reação de neutralização com formação de água e sal, até que a condutividade chega a seu valor mínimo [87].

Após a neutralização da solução, conforme adiciona-se mais da solução ácida, o excesso de prótons no meio promove um aumento da condutividade. Um ácido ou base fraca, diferentemente, não possui a mesma mobilidade protônica, ou seja, ao adicionar-se uma solução de uma base forte a uma solução contendo um ácido fraco, a condutividade no meio não terá alteração significativa. Assim é possível calcular a concentração da base ou do ácido fraco em solução através dessa região sem mudança de condutividade [79]. No gráfico da Figura 5.6, referente a amostra de 24 horas, observa-se a região onde ocorre essa constância para a condutividade.



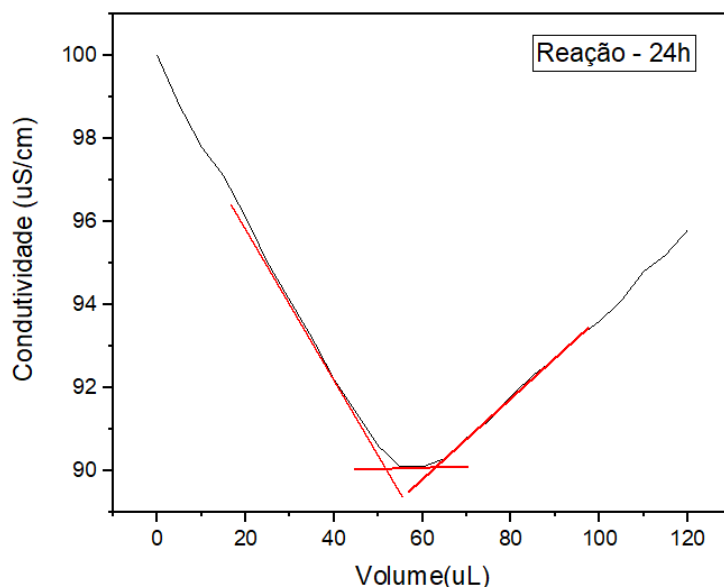


Figura 5.6: Variação da condutividade em relação ao volume de ácido adicionado para a reação de 24 horas.

Como mostrado no gráfico da Figura 5.6, para determinar a concentração de grupos oxidados, primeiro deve-se criar retas de tendência para as regiões lineares que são referentes primeiramente ao pH básico e, em seguida, ao pH ácido. Em seguida, traça-se uma reta paralela a região mínima e calcula-se, utilizando o volume relativo entre as intersecções das retas, a concentração de grupos oxidados. Na Tabela 5.3 são apresentados os valores calculados para as amostras referentes a reação por 3 horas, a reação por 24 horas, a amostra controle e a amostra oxidada pela utilização do reagente TEMPO. Além disso, foi adicionado o valor obtido para a amostra da reação durante 24 horas, utilizando somente as enzimas LPMO e xilanase.

Tabela 5.3: Concentração de grupos oxidados para os materiais obtidos.

<b>Amostra</b>	<b>Grupos Oxidados (mmol/kg)</b>
<b>3 horas</b>	48
<b>24 horas</b>	49
<b>Controle</b>	0
<b>TEMPO</b>	60
<b>24 horas (Xilanase + LPMO)</b>	16

Através dos dados da Tabela 5.3, é possível observar que, apesar da diferença de tempo entre as amostras produzidas através da ação enzimática (3 horas e 24 horas), não houve um aumento significativo no valor da concentração de grupos oxidados, em bom acordo com os resultados obtidos por Hu e colaboradores em um de seus estudos [62]. De acordo com estes autores, a ação das enzimas no material celulósico promove a remoção das camadas mais externas de celulose, liberando as camadas internas que possuem a mesma característica superficial, porém não sofreram nenhum tipo de ação ainda, então as enzimas agem sobre essas novas camadas expostas e o processo continua.

Ao compararmos os dados da Tabela 5.3 com os resultados obtidos para os produtos solubilizados da Figura 5.1, observa-se que apesar de possuir uma maior intensidade, conseqüentemente maior concentração de produto solúvel, não se observa uma maior concentração de grupos carboxila nas fibras não solúveis. Isso pode ser um indicativo de que o mecanismo ocorre como o proposto por Hu [62], onde as fibras das camadas externas já oxidadas são liberadas e as fibras do interior passam a sofrer uma oxidação. Também é possível avaliar que a oxidação pela ação do TEMPO ocorre com maior eficiência que a reação enzimática, pois promove uma maior carga superficial.

Finalmente, é possível observar que, apesar da ausência da enzima endoglucanase, a ação da xilanase em conjunto com a LPMO levaram a introdução de cargas na superfície do material, apesar de ocorrer em uma concentração visivelmente menor que para a reação com a utilização das três enzimas. Entretanto, esses resultados mostram a possibilidade da utilização das duas enzimas para um processo de oxidação de fibras de celulose que sejam mais acessíveis para a ação enzimática.

## 5.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Para que seja possível definir o material produzido como sendo nanofibras de celulose e fazer uma avaliação mais criteriosa da morfologia do material, foram efetuadas imagens do produto final por Microscopia Eletrônica de Varredura. Como comentado anteriormente, um material é considerado uma nanofibra quando possui um diâmetro menor que 100 nm. Na Figura 5.7 é possível observar o material obtido

após o mesmo processo de produção das nanofibras, entretanto sem adição de enzimas, com posterior desfibrilação pelo ultrassom de sonda. Avaliando-se a partir do valor de diâmetro médio de 43 nm do material, pode-se intuir que só a utilização de ultrassom já forneceu a energia suficiente para que as fibras de celulose fossem desfibriladas até alcançar um diâmetro na escala nanométrica. Isso já havia sido observado em outros trabalhos que empregam somente a utilização do ultrassom de sonda para essa finalidade.

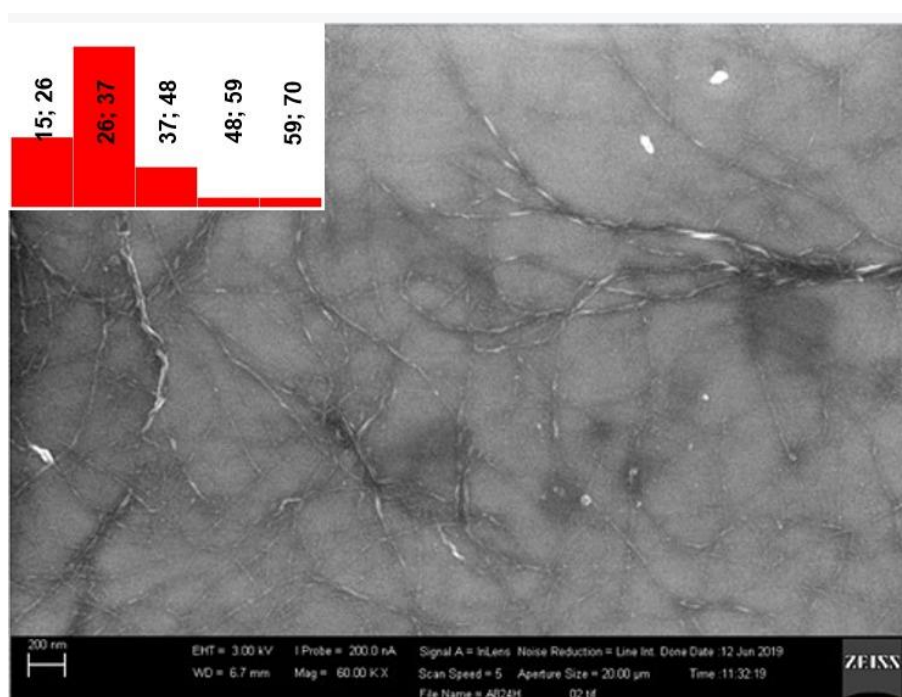


Figura 5.7: Microscopia Eletrônica obtida da amostra controle com a distribuição de tamanhos referente as fibras analisadas.

Nas Figuras 5.8 e 5.9, são apresentadas respectivamente as microscopias das amostras referentes a reação durante 3 horas e 24 horas utilizando todas as enzimas. Ao analisar o diâmetro médio para ambas as amostras, observou-se um diâmetro médio de 28 e 31 nm, pode-se inferir que o aumento do tempo da reação enzimática não está causando uma diminuição significativa na espessura final da fibra. Seria de esperar que ocorreria uma diminuição no comprimento das fibras devido a ação da enzima endoglucanase, entretanto é difícil avaliar pela análise das imagens se de fato realmente isso ocorreu visto que as fibras possuem comprimento bastante elevado e se sobrepõe, dificultando a definição do início e do fim das fibras. Como dos resultados de titulação condutimétrica obtivemos resultados próximos

para a concentração de grupos oxidados, podendo traçar um paralelo entre o grau de oxidação e a o diâmetro da fibra, pois ambas amostras apresentaram fibras de diâmetro similares.

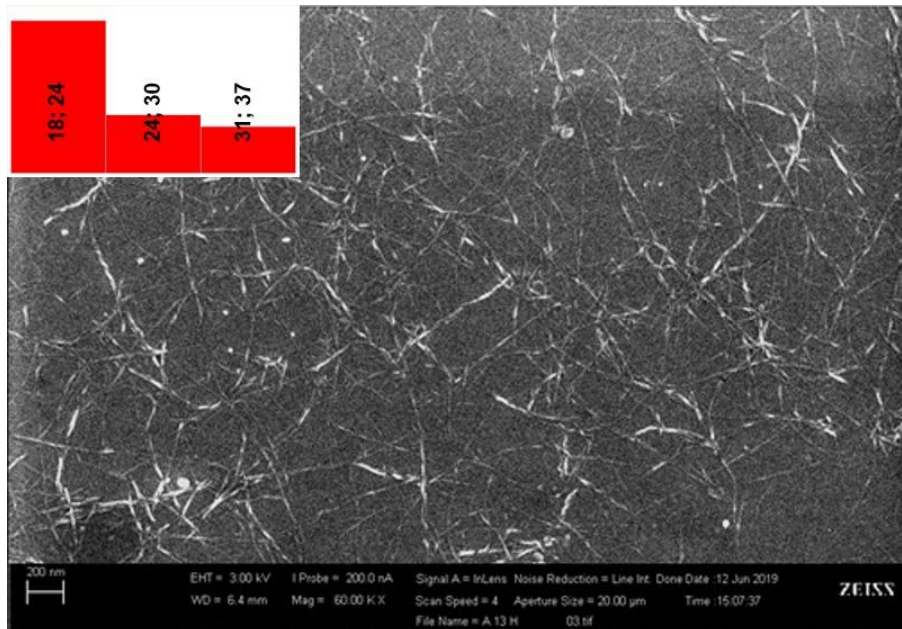


Figura 5.8: Microscopia Eletrônica para a amostra referente a reação por 3 horas com a distribuição de tamanhos referente as fibras analisadas.

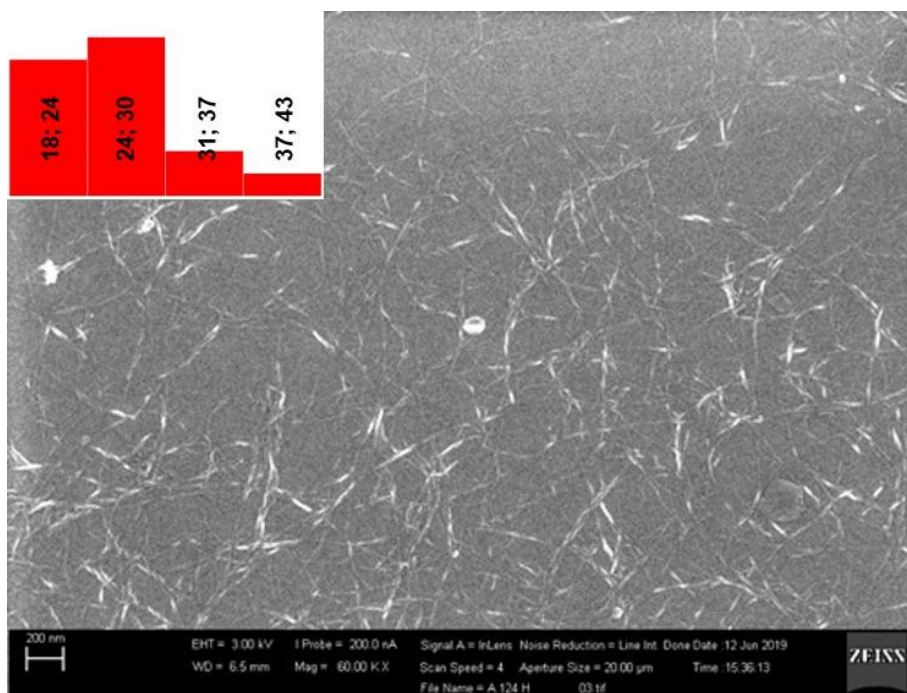


Figura 5.9: Microscopia Eletrônica para a amostra referente a reação por 24 horas com a distribuição de tamanhos referente as fibras analisadas.

Finalmente, na Figura 5.10 é apresentada a microscopia eletrônica para a amostra NFC TEMPO oxidada, cujo diâmetro médio corresponde a 11 nm. Como a concentração de grupos oxidados na superfície das fibras da celulose tempo oxidada é maior, era esperado que as fibras produzidas possuíssem uma menor espessura menor pois, devido a carga superficial, as fibras se repelem, o que facilita o processo de desfibrilação.

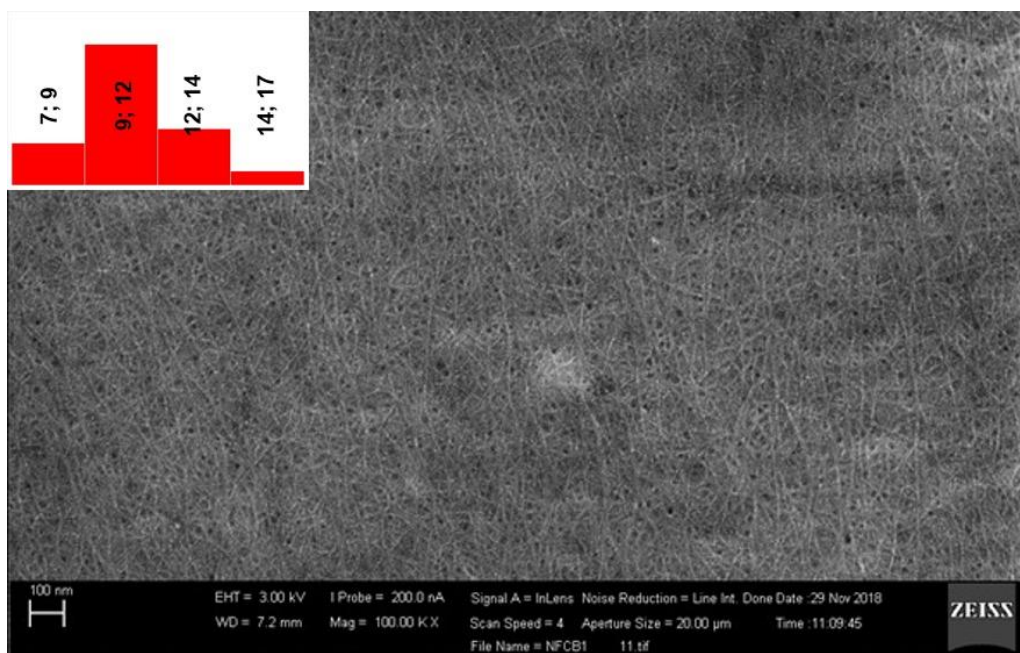


Figura 5.10: Microscopia Eletrônica para a amostra referente a reação de oxidação via reagente TEMPO com a distribuição de tamanhos referente as fibras analisadas.

## 5.7 TERMOGRAVIMETRIA

Ao submeter-se um determinado material ao aumento de temperatura, espera-se que o mesmo seja estável até alcançar um patamar onde a energia recebida pelo material em forma de calor será superior a energia das interações ou ligações químicas. A capacidade de tolerar altas temperaturas é vista com interesse para determinadas aplicações em engenharia, como por exemplo para aplicações em componentes eletrônicos, pois os materiais precisam manter sua estabilidade para que não ocorra nenhum problema frente ao aumento da temperatura.

Conforme podemos observar na Figura 5.11, o perfil do comportamento da amostra realizada por 3 horas de reação (3 horas), por 24 horas de reação (24 horas), da amostra em que não houve adição de enzimas (controle) e uma amostra referente ao material obtido através da oxidação via reagente TEMPO (TEMPO).

Pode-se inferir pela análise desse gráfico que os materiais possuem comportamentos bem parecidos, o único que apresenta uma maior diferença é referente a amostra TEMPO. O fim da análise ainda apresenta quantidades significativas de massa das amostras, isso ocorre devido a grafitização da celulose durante o aquecimento.

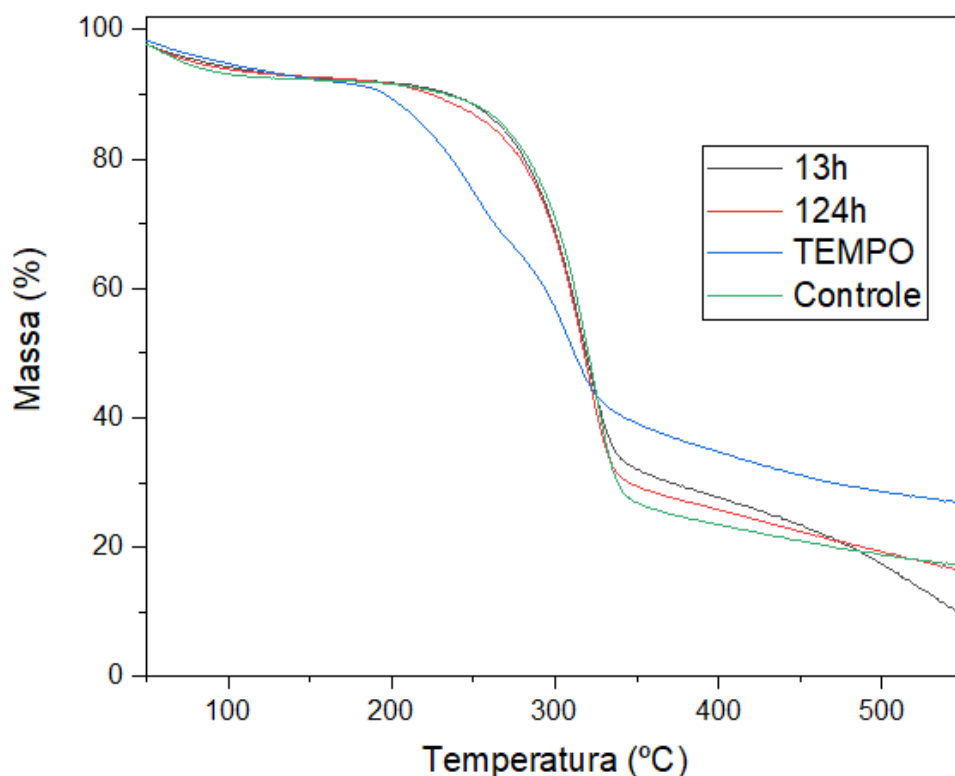


Figura 5.11: Análise Termogravimétrica realizada nos materiais obtidos.

Ao derivar as curvas em relação à perda de massa apresentada na Figura 5.11, observa-se mudanças de tendências mais difíceis de analisar a partir desse gráfico. Com os dados dessa derivada (DTG), observa-se que a amostra TEMPO, que possuía um perfil diferente das demais, apresenta um evento não observado nas outras amostras. Esse evento é explicado pela autocatálise da abertura do anel da estrutura da molécula de celulose promovido pelo grupo carboxilato. Esse evento não é observado nas amostras que foram oxidadas com a utilização de enzima e, de acordo com a literatura, a oxidação promovida pelas enzimas é diferente daquela promovida pelo reagente TEMPO, uma vez que ocorre no carbono C1 e não no C6 que é o carbono priorizado na reação via reagente TEMPO. Assim, a autocatálise de abertura do anel não ocorre, por isso, existe essa diferença em relação as amostras obtidas pela rota enzimática [8;86].



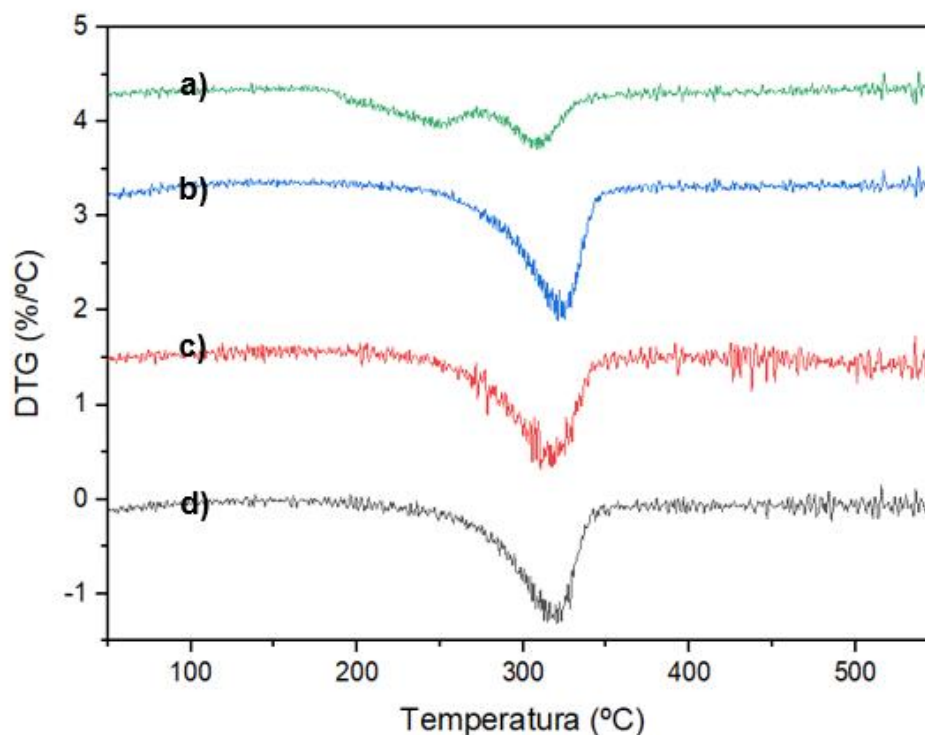


Figura 5.12: Primeira derivada da análise termogravimétrica apresentada anteriormente. Onde a) amostra TEMPO oxidada, b) amostra controle, c) amostra da reação por 3 horas e d) amostra pra reação durante 24 horas

A partir dos gráficos das Figuras 5.11 e 5.12, pode-se obter informações mais precisas como a temperatura inicial dos eventos e a temperatura de maior perda de massa, respectivamente. Dos dados que são apresentados na Tabela 5.4 é perceptível a menor estabilidade do material TEMPO oxidado frente às outras amostras. Além disso, podemos perceber que entre as outras amostras, a estabilidade é maior para a amostra controle e menor para a referente a reação por 24 horas. A diferença deve-se ao fato de que, quanto menor as dimensões de um material, maior sua área superficial, o mesmo recebe mais energia devido a superfície de contato e, conseqüentemente, alcança a energia necessária para o início da sua degradação em uma menor temperatura.

Tabela 5.4: Valores da temperatura de início ( $T_{\text{onset}}$ ) e máximo ( $T_{\text{max}}$ ) de degradação para os materiais obtidos.

<b>Amostra</b>	<b><math>T_{\text{onset}}</math> (° C)</b>	<b><math>T_{\text{max}}</math> (° C)</b>
3 horas	273	316
24 horas	261	315
Controle	281	321
TEMPO	193	306

Em resumo, o material produzido pela reação enzimática possui maior estabilidade térmica quando comparado com nanofibras produzidas através de uma rota química tradicional, a TEMPO oxidação. Isso é explicado pela posição onde ocorre a oxidação na estrutura química, pois a reação enzimática oxida a ligação  $\beta$ -1,4, enquanto que a molécula TEMPO possui seletividade sobre o carbono C6

## 5.8 ESPECTROSCOPIA DE FOTOELÉTRONS EXCITADOS POR RAIOS X (XPS)

A Figura 5.13 apresenta o espectro de XPS de ampla varredura das amostras referentes às reações de 3 horas, 24 horas, além do material produzido pela oxidação via TEMPO e de uma amostra controle onde não foram utilizadas as enzimas. Através da análise destes espectros é possível concluir que as composições químicas das amostras são bem parecidas, diferenciando-se em alguns elementos em baixa concentração como nitrogênio (N), sódio (Na) e silício (Si). A presença de Na no material é explicado pela reação enzimática, que ocorre em tampão com acetato, cujo contra-íon é justamente o Na, sendo que um resquício desse tampão pode estar presente na amostra. Já o N, pode ser explicado pela presença da enzima desnaturada junto do material, ou de alguma contaminação do ar. O Si foi observado em uma concentração muito baixa em 100 eV, provavelmente proveniente do bagaço de cana que contém materiais inorgânicos em sua composição.



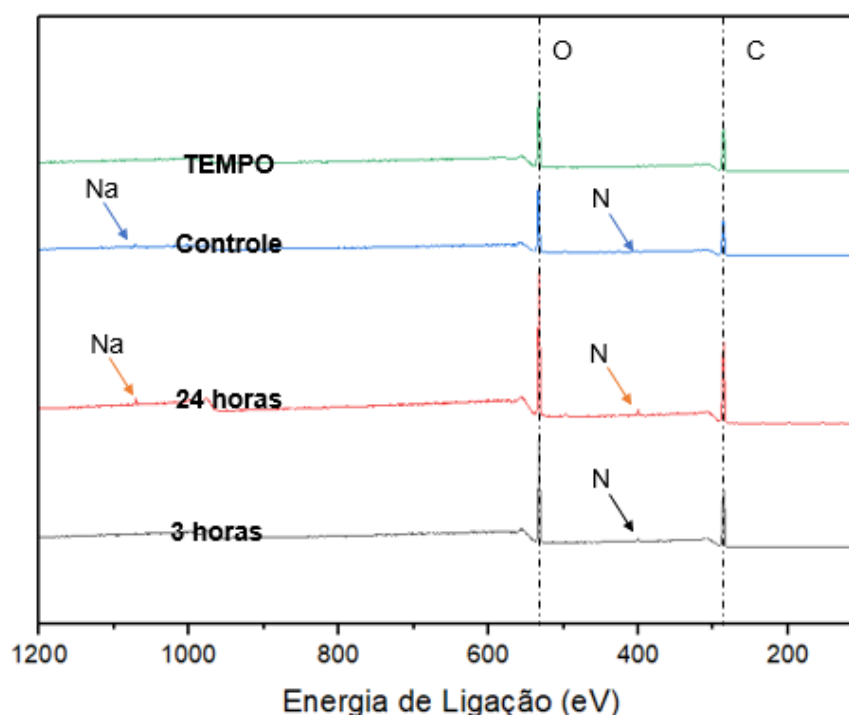


Figura 5.13: Espectros de ampla varredura das amostras referentes as reações de 3 horas, 24 horas, além do material produzido pela oxidação via TEMPO e de uma amostra controle onde não foram utilizadas as enzimas. Nitrogênio (N), sódio (Na), carbono (C) e oxigênio (O).

Para obter uma informação mais precisa sobre os principais elementos de interesse, ou seja, o carbono e o oxigênio, medidas de alta-resolução destes dois elementos foram realizadas. A Figura 5.14 e a Figura 5.15 apresentam respectivamente os espectros de alta resolução do carbono e do oxigênio. As concentrações relativas e as energias de cada ligação do carbono e do oxigênio obtidas a partir da deconvolução dos espectros de alta-resolução são apresentadas na Tabela 5.5. Da Figura 5.13 e da Tabela 5.5, pode-se perceber que outros elementos que não sejam carbono e oxigênio aparecem em concentração muito baixa, sendo responsável por aproximadamente 1% da concentração da amostra analisada. Da deconvolução dos espectros de alta resolução, é possível discriminar as ligações que um determinado elemento faz em relação à energia de ligação em comparação com a literatura [88]. A deconvolução realizada nos espectros de alta resolução do carbono é apresentada na Figura 5.14. A energia de ligação e a identificação das respectivas ligações dos elementos oxigênio e carbono de cada amostra são apresentadas na Tabela 5.6.

A principal diferença que pode ser observada entre as amostras está na posição 284 eV que é referente a ligação carbono-carbono (C-C). Isso ocorre, provavelmente devido a deposição do carbono presente na atmosfera sobre a amostra. Para as amostras oxidadas a presença das ligações O-C=O era esperada, entretanto, este tipo de ligação foi observada também na amostra controle, provavelmente devido a inserção de grupos carboxil durante a etapa de tratamento com clorito de sódio. A deconvolução realizada nos espectros de oxigênio são apresentadas na Figura 5.15. No caso só oxigênio, para todas as amostras, foram observadas as ligações em 532,7 eV referentes as ligações C-O, C=O e em 543,3 eV, referente as ligações C-OH.

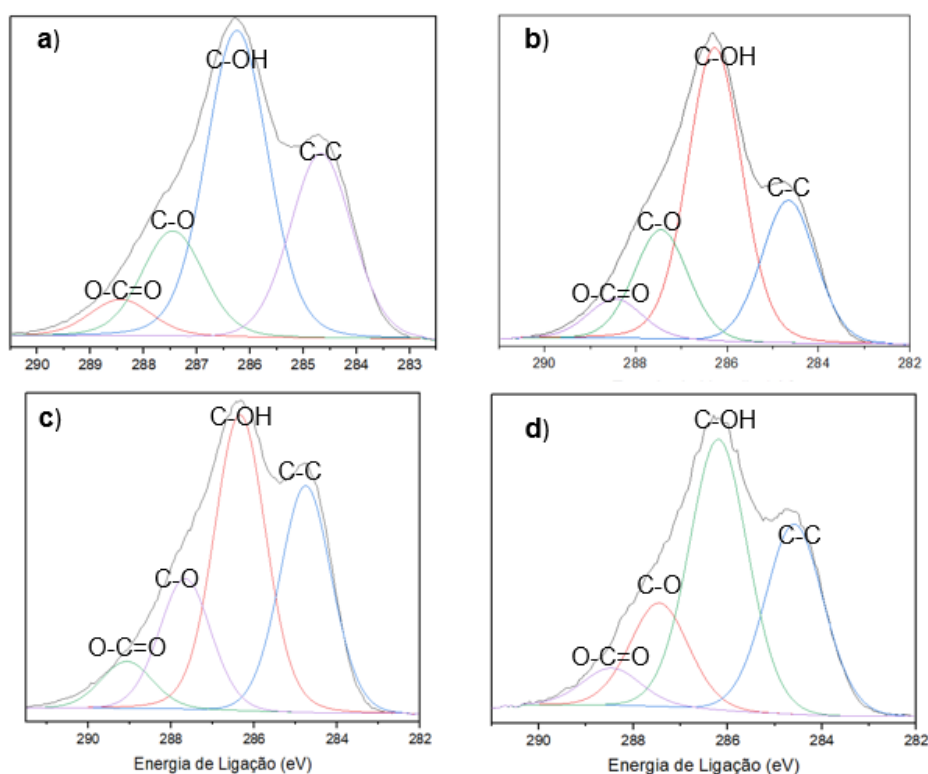


Figura 5.14: Espectros de alta resolução deconvoluídos do carbono nas amostras referente a a) reações de 3 horas, b) 24 horas, c) oxidação via TEMPO e d) uma amostra controle onde não foram utilizadas as enzimas.

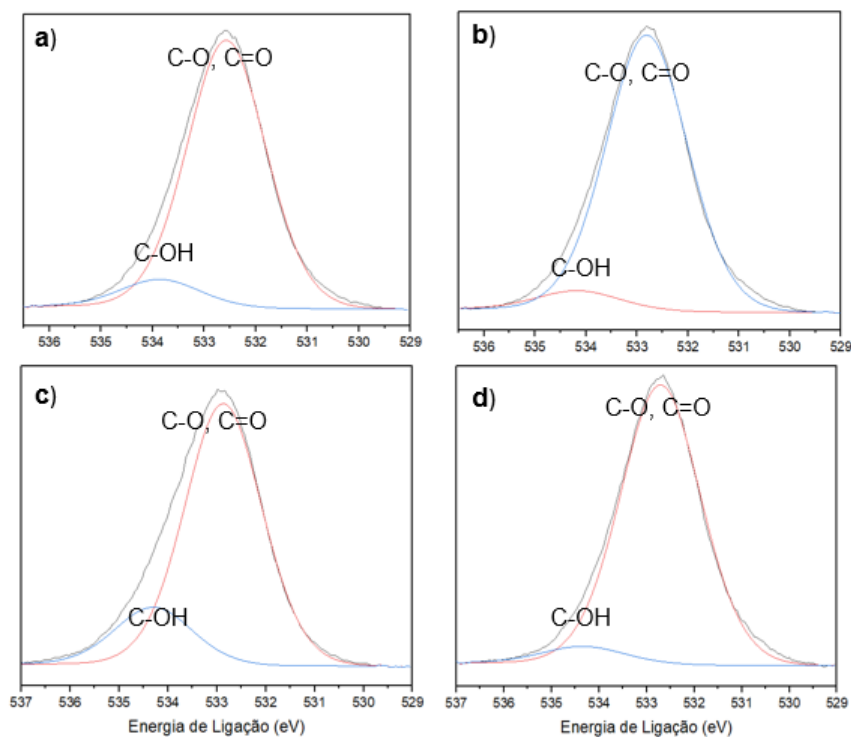


Figura 5.15: Espectros de alta resolução deconvoluídos do oxigênio nas amostras referente a a) reações de 3 horas, b) 24 horas, c) oxidação via TEMPO e d) uma amostra controle onde não foram utilizadas as enzimas.

Tabela 5.5: Concentração dos elementos presentes nas amostras, obtida do espectro survey.

Amostra	Concentração (%)				
	C	O	N	Na	Si
3 horas	70,34	28,45	0,87	0,33	-
24 horas	68,76	30,15	0,81	0,25	0,03
TEMPO	72,98	27,02	-	-	-
Controle	71,99	26,89	0,74	0,38	-

Tabela 5.6: Posição assinalada referente a ligação para os elementos Oxigênio (O) e Carbono (C).

Amostra	C	O
3 horas	284,7 eV (C-C, C-H) 286,3 eV (C-O, C-N) 287,4 eV (C=O) 288,4 eV (O-C=O)	532,7 eV (C-O, C=O) 533,3 eV (C-OH)
24 horas	284,6 eV (C-C, C-H) 286,3 eV (C-O, C-N) 287,4 eV (C=O) 288,5 eV (O-C=O)	532,6 eV (C-O, C=O) 533,8 eV (C-OH)
TEMPO	284,7 eV (C-C, C-H) 286,3 eV (C-O, C-N) 287,7 eV (C=O) 289,1 eV (O-C=O)	532,8 eV (C-O, C=O) 534,2 eV (C-OH)
Controle	284,6 eV (C-C, C-H) 286,2 eV (C-O, C-N) 287,8 eV (C=O) 288,5 eV (O-C=O)	532,9 eV (C-O, C=O) 534,3 eV (C-OH)

## 6 CONCLUSÕES

O procedimento de pré-tratamento da biomassa obtida de resíduo de cana de açúcar levou a produção de uma polpa com alto teor de celulose e baixo teor de lignina. Com base nos resultados obtidos, pode-se afirmar que através da metodologia utilizada seguindo a rota enzimática, foi possível obter nanofibras de celulose oxidada possuindo um diâmetro médio de aproximadamente 30 nm, cuja concentração de oxidação é, de aproximadamente, 48 mmol/kg. Há evidências de que a ação conjunta das enzimas endoglucanase, xilanase e LPMO levaram a oxidação do material, o que pode ter sido o motivo da melhor desfibrilação para as fibras com cargas pois, uma vez que as fibras possuam cargas superficiais, elas se repelem, facilitando a desfibrilação.

Não foram observadas mudanças significativas no IC do material uma vez que o IC das amostras, um resultado não esperado pois a endoglucanase hidrolisa as regiões de menor ordenação. Isso deve ter ocorrido devido a remoção das camadas de celulose promovidas pela ação da enzima LPMO após a oxidação, além da quebra das regiões cristalinas promovidas pela enzima que leva a um sítio de ação da endoglucanase, esses resultados estão em bom acordo com a similaridade entre as concentrações de grupos oxidados apresentados na tabela 5.3.

A análise dos dados de infravermelho mostrou a existência de um ombro de baixa intensidade que, segundo a literatura, é devido a vibração do grupo carboxila. A estabilidade térmica entre as amostras produzidas por reações enzimáticas foi superior a da amostra TEMPO oxidada. Para aplicações em que a temperatura é uma questão chave, como a eletrônica, por exemplo, é interessante a utilização de um material com estabilidade térmica relativamente maior. Não foi possível identificar com precisão as ligações relacionadas ao processo de oxidação, tanto via enzimática como TEMPO, na estrutura eletrônica da nanocelulose utilizando a técnica de XPS, possivelmente devido a inserção de grupos carboxil durante a etapa de pré-tratamento.



## **7 SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS**

Existe um apelo para a utilização de nanomateriais de celulose em diversas áreas da ciência e da tecnologia. Porém, inicialmente, é necessário um estudo mais aprofundado da metodologia para que seja possível a produção em maior escala do material. Uma maior concentração da celulose implica também na necessidade de avaliação das propriedades do material quando obtida em uma alta escala.

Além disso, seria interessante o estudo de algumas características do material, como seu comprimento, através da avaliação da viscosidade, ou das propriedades mecânicas dos filmes obtidos após secar as soluções contendo o material. Como as fibras obtidas apresentam modificações químicas, os grupos carboxila, é possível sua aplicação como suporte de nanopartículas, ou na formação de compósitos com outros materiais de interesse científico e tecnológico.





## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] M. E. Doyle, “Nanotechnology: A Brief Literature Review”, p. 10, 2006.
- [2] D. Bhattacharyya, S. Singh, N. Satnalika, A. Khandelwal, e S.-H. Jeon, “Nanotechnology, Big things from a Tiny World: a Review”, *Sci. Technol.*, vol. 2, nº 3, p. 10, 2009.
- [3] D. Klemm *et al.*, “Nanocelluloses: A New Family of Nature-Based Materials”, *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 50, nº 24, p. 5438–5466, jun. 2011.
- [4] D. Klemm *et al.*, “Nanocellulose as a natural source for groundbreaking applications in materials science: Today’s state”, *Mater. Today*, vol. 21, nº 7, p. 720–748, set. 2018.
- [5] B. S. Santucci, “ESTUDO DOS EFEITOS DOS TRATAMENTOS FÍSICO-MECÂNICOS NA HIDRÓLISE DA CELULOSE DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR”, p. 342.
- [6] H. B. Aditiya, T. M. I. Mahlia, W. T. Chong, H. Nur, e A. H. Sebayang, “Second generation bioethanol production: A critical review”, *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 66, p. 631–653, dez. 2016.
- [7] O. Nechyporchuk, M. N. Belgacem, e J. Bras, “Production of cellulose nanofibrils: A review of recent advances”, *Ind. Crops Prod.*, vol. 93, p. 2–25, dez. 2016.
- [8] A. Isogai, T. Saito, e H. Fukuzumi, “TEMPO-oxidized cellulose nanofibers”, *Nanoscale*, vol. 3, nº 1, p. 71–85, jan. 2011.
- [9] S. Afrin e Z. Karim, “Isolation and Surface Modification of Nanocellulose: Necessity of Enzymes over Chemicals”, *ChemBioEng Rev.*, vol. 4, nº 5, p. 289–303, out. 2017.
- [10] M. Henriksson, G. Henriksson, L. A. Berglund, e T. Lindström, “An environmentally friendly method for enzyme-assisted preparation of microfibrillated cellulose (MFC) nanofibers”, *Eur. Polym. J.*, vol. 43, nº 8, p. 3434–3441, ago. 2007.
- [11] J. Hu, D. Tian, S. Renneckar, e J. N. Saddler, “Enzyme mediated nanofibrillation of cellulose by the synergistic actions of an endoglucanase, lytic polysaccharide monooxygenase (LPMO) and xylanase”, *Sci. Rep.*, vol. 8, nº 1, dez. 2018.
- [12] Š. Luby, M. Lubyová, P. Šiffalovič, M. Jergel, e E. Majková, “A Brief History of Nanoscience and Foresight in Nanotechnology”, in *Nanomaterials and*

*Nanoarchitectures*, M. Bardosova e T. Wagner, Orgs. Dordrecht: Springer Netherlands, 2015, p. 63–86.

[13] A. Keiper, “The Nanotechnology Revolution”, p. 19.

[14] International Organization for Standardization - ISO/TS 2768: 2008(E) “Nanotechnologies - Terminology and definitions for nano-objects - Nanoparticle, nanofibre and nanoplate”, First Edition.

[15] M. Grzelczak, J. Pérez-Juste, P. Mulvaney, e L. M. Liz-Marzán, “Shape control in gold nanoparticle synthesis”, *Chem. Soc. Rev.*, vol. 37, nº 9, p. 1783, 2008.

[16] M. V. Limaye, S. Gokhale, S. A. Acharya, e S. K. Kulkarni, “Template-free ZnS nanorod synthesis by microwave irradiation”, *Nanotechnology*, vol. 19, nº 41, p. 415602, out. 2008.

[17] J. C. Yu, A. Xu, L. Zhang, R. Song, e L. Wu, “Synthesis and Characterization of Porous Magnesium Hydroxide and Oxide Nanoplates”, *J. Phys. Chem. B*, vol. 108, nº 1, p. 64–70, jan. 2004.

[18] D. Klemm, B. Heublein, H.-P. Fink, e A. Bohn, “Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material”, *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 44, nº 22, p. 3358–3393, maio 2005.

[19] P. Alvira, E. Tomás-Pejó, M. Ballesteros, e M. J. Negro, “Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review”, *Bioresour. Technol.*, vol. 101, nº 13, p. 4851–4861, jul. 2010.

[20] COMPANHIA NACIONAL DO ABASTECIMENTO (CONAB). **Acompanhamento da Safra Brasileira: cana-de-açúcar**. Brasília, 2018. Disponível em: <<https://portaldeinformacoes.conab.gov.br/index.php/safra/cana-serie-istorica>>.

Acesso 05 setembro 2019

[21] MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA (MME). **Balanço Energético Nacional 2018**, Brasília, 2018. Disponível em < <http://www.epe.gov.br/sites-pt/publicacoes-dados-abertos/publicacoes/>

[PublicacoesArquivos/publicacao-160/topico-168/Anuario2018vf.pdf](http://www.epe.gov.br/sites-pt/publicacoes-dados-abertos/publicacoes/PublicacoesArquivos/publicacao-160/topico-168/Anuario2018vf.pdf)>. Acesso em 05 setembro 2019

[22] Fengel, D., Wegener, G. "Wood: Chemistry, ultrastructure, reactions". New York. Walter de Gruyter, 1989, 613p

[23] A. M. Boudet, S. Kajita, J. Grima-Pettenati, e D. Goffner, “Lignins and lignocellulosics: a better control of synthesis for new and improved uses”, *Trends Plant Sci.*, vol. 8, nº 12, p. 576–581, dez. 2003.

- [24] A. P. de Souza, D. C. C. Leite, S. Pattathil, M. G. Hahn, e M. S. Buckeridge, "Composition and Structure of Sugarcane Cell Wall Polysaccharides: Implications for Second-Generation Bioethanol Production", *BioEnergy Res.*, vol. 6, n° 2, p. 564–579, jun. 2013.
- [25] H. V. Lee, S. B. A. Hamid, e S. K. Zain, "Conversion of Lignocellulosic Biomass to Nanocellulose: Structure and Chemical Process", *Sci. World J.*, vol. 2014, p. 1–20, 2014.
- [26] M. Espirito Santo *et al.*, "Structural and compositional changes in sugarcane bagasse subjected to hydrothermal and organosolv pretreatments and their impacts on enzymatic hydrolysis", *Ind. Crops Prod.*, vol. 113, p. 64–74, mar. 2018.
- [27] R. Remadevi, S. Gordon, X. Wang, e R. Rajkhowa, "Investigation of the swelling of cotton fibers using aqueous glycine solutions", *Text. Res. J.*, vol. 87, n° 18, p. 2204–2213, nov. 2017.
- [28] Y. Habibi, L. A. Lucia, e O. J. Rojas, "Cellulose Nanocrystals: Chemistry, Self-Assembly, and Applications", *Chem. Rev.*, vol. 110, n° 6, p. 3479–3500, jun. 2010.
- [29] F. Cherhal, F. Cousin, e I. Capron, "Influence of Charge Density and Ionic Strength on the Aggregation Process of Cellulose Nanocrystals in Aqueous Suspension, as Revealed by Small-Angle Neutron Scattering", *Langmuir*, vol. 31, n° 20, p. 5596–5602, maio 2015.
- [30] S. J. Eichhorn *et al.*, "Review: current international research into cellulose nanofibres and nanocomposites", *J. Mater. Sci.*, vol. 45, n° 1, p. 1–33, jan. 2010.
- [31] J. P. F. Lagerwall *et al.*, "Cellulose nanocrystal-based materials: from liquid crystal self-assembly and glass formation to multifunctional thin films", *NPG Asia Mater.*, vol. 6, n° 1, p. e80–e80, jan. 2014.
- [32] I. Siró e D. Plackett, "Microfibrillated cellulose and new nanocomposite materials: a review", *Cellulose*, vol. 17, n° 3, p. 459–494, jun. 2010.
- [33] Turbak, A.F., Snyder, F.W., and Sandberg, K.R. "Microfibrillated cellulose, a new cellulose product: properties, uses, and commercial potential. United States", N. p., 1983. Web.
- [34] B. Thomas *et al.*, "Nanocellulose, a Versatile Green Platform: From Biosources to Materials and Their Applications", *Chem. Rev.*, vol. 118, n° 24, p. 11575–11625, dez. 2018.
- [35] L. Gan, J. Liao, N. Lin, C. Hu, H. Wang, e J. Huang, "Focus on Gradientwise Control of the Surface Acetylation of Cellulose Nanocrystals to Optimize Mechanical

Reinforcement for Hydrophobic Polyester-Based Nanocomposites”, *ACS Omega*, vol. 2, nº 8, p. 4725–4736, ago. 2017.

[36] S. S. Nair, J. Zhu, Y. Deng, e A. J. Ragauskas, “High performance green barriers based on nanocellulose”, *Sustain. Chem. Process.*, vol. 2, nº 1, p. 23, dez. 2014.

[37] H. M. C. Azeredo, M. F. Rosa, e L. H. C. Mattoso, “Nanocellulose in bio-based food packaging applications”, *Ind. Crops Prod.*, vol. 97, p. 664–671, mar. 2017.

[38] F. Li, P. Biagioni, M. Bollani, A. Maccagnan, e L. Piergiovanni, “Multi-functional coating of cellulose nanocrystals for flexible packaging applications”, *Cellulose*, vol. 20, nº 5, p. 2491–2504, out. 2013.

[39] Z. Wang *et al.*, “Surface Modified Nanocellulose Fibers Yield Conducting Polymer-Based Flexible Supercapacitors with Enhanced Capacitances”, *ACS Nano*, vol. 9, nº 7, p. 7563–7571, jul. 2015.

[40] C. Legnani *et al.*, “Bacterial cellulose membrane as flexible substrate for organic light emitting devices”, *Thin Solid Films*, vol. 517, nº 3, p. 1016–1020, dez. 2008.

[41] F. Hoeng, J. Bras, E. Gicquel, G. Krosnicki, e A. Denneulin, “Inkjet printing of nanocellulose–silver ink onto nanocellulose coated cardboard”, *RSC Adv.*, vol. 7, nº 25, p. 15372–15381, 2017.

[42] Linköping University (LiU). Storing electricity in paper, Linköping, 2015. Disponível em < <https://liu.se/en/article/storing-electricity-in-paper>>. Acesso em 05 setembro 2019

[43] H. Mertaniemi *et al.*, “Human stem cell decorated nanocellulose threads for biomedical applications”, *Biomaterials*, vol. 82, p. 208–220, mar. 2016.

[44] R. Mangayil *et al.*, “Engineering and Characterization of Bacterial Nanocellulose Films as Low Cost and Flexible Sensor Material”, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 9, nº 22, p. 19048–19056, jun. 2017.

[45] J. D. Yuen, S. A. Walper, B. J. Melde, M. A. Daniele, e D. A. Stenger, “Electrolyte-Sensing Transistor Decals Enabled by Ultrathin Microbial Nanocellulose”, *Sci. Rep.*, vol. 7, nº 1, p. 40867, fev. 2017.

[46] H. P. S. Abdul Khalil *et al.*, “Production and modification of nanofibrillated cellulose using various mechanical processes: A review”, *Carbohydr. Polym.*, vol. 99, p. 649–665, jan. 2014.

- [47] A. N. Frone, D. M. Panaitescu, e D. Donescu, "SOME ASPECTS CONCERNING THE ISOLATION OF CELLULOSE MICRO- AND NANO- FIBERS", p. 20.
- [48] M. Keerati-u-rai e M. Corredig, "Effect of Dynamic High Pressure Homogenization on the Aggregation State of Soy Protein", *J. Agric. Food Chem.*, vol. 57, n° 9, p. 3556–3562, maio 2009.
- [49] Q. Cheng, S. Wang, e T. G. Rials, "Poly(vinyl alcohol) nanocomposites reinforced with cellulose fibrils isolated by high intensity ultrasonication", *Compos. Part Appl. Sci. Manuf.*, vol. 40, n° 2, p. 218–224, fev. 2009.
- [50] P. Chen, H. Yu, Y. Liu, W. Chen, X. Wang, e M. Ouyang, "Concentration effects on the isolation and dynamic rheological behavior of cellulose nanofibers via ultrasonic processing", *Cellulose*, vol. 20, n° 1, p. 149–157, fev. 2013.
- [51] S. Wang e Q. Cheng, "A novel process to isolate fibrils from cellulose fibers by high-intensity ultrasonication, Part 1: Process optimization", *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 113, n° 2, p. 1270–1275, jul. 2009.
- [52] Ø. Eriksen, K. Syverud, e Ø. Gregersen, "The use of microfibrillated cellulose produced from kraft pulp as strength enhancer in TMP paper", *Nord. Pulp Pap. Res. J.*, vol. 23, n° 3, p. 299–304, ago. 2008.
- [53] N. Lin, C. Bruzzese, e A. Dufresne, "TEMPO-Oxidized Nanocellulose Participating as Crosslinking Aid for Alginate-Based Sponges", *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 4, n° 9, p. 4948–4959, set. 2012.
- [54] A. Tejado, Md. N. Alam, M. Antal, H. Yang, e T. G. M. van de Ven, "Energy requirements for the disintegration of cellulose fibers into cellulose nanofibers", *Cellulose*, vol. 19, n° 3, p. 831–842, jun. 2012.
- [55] H. Liimatainen, M. Visanko, J. Sirviö, O. Hormi, e J. Niinimäki, "Sulfonated cellulose nanofibrils obtained from wood pulp through regioselective oxidative bisulfite pre-treatment", *Cellulose*, vol. 20, n° 2, p. 741–749, abr. 2013.
- [56] L. Wågberg, G. Decher, M. Norgren, T. Lindström, M. Ankerfors, e K. Axnäs, "The Build-Up of Polyelectrolyte Multilayers of Microfibrillated Cellulose and Cationic Polyelectrolytes", *Langmuir*, vol. 24, n° 3, p. 784–795, fev. 2008.
- [57] C. Aulin, E. Johansson, L. Wågberg, e T. Lindström, "Self-Organized Films from Cellulose I Nanofibrils Using the Layer-by-Layer Technique", *Biomacromolecules*, vol. 11, n° 4, p. 872–882, abr. 2010.

- [58] N. J. Davis e S. L. Flitscb, “Selective Oxidation of Monosaccharide Derivatives to Uranic Acids”, p. 4.
- [59] D. O. Carlsson, J. Lindh, L. Nyholm, M. Strømme, e A. Mihranyan, “Cooxidant-free TEMPO-mediated Oxidation of Highly Crystalline Nanocellulose in Water”, *RSC Adv.*, p. 12, 2012.
- [60] V. de O. A. Pellegrini, “Clonagem molecular, expressão, purificação e caracterização estrutural da endoglucanase de *Trichoderma harzianum* visando o desenvolvimento de coquetéis enzimáticos para a produção de etanol lignocelulósico”, Doutorado Direto em Física Aplicada, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.
- [61] M. Pääkkö *et al.*, “Enzymatic Hydrolysis Combined with Mechanical Shearing and High-Pressure Homogenization for Nanoscale Cellulose Fibrils and Strong Gels”, *Biomacromolecules*, vol. 8, nº 6, p. 1934–1941, jun. 2007.
- [62] J. Hu, V. Arantes, A. Pribowo, e J. N. Saddler, “The synergistic action of accessory enzymes enhances the hydrolytic potential of a ‘cellulase mixture’ but is highly substrate specific”, *Biotechnol. Biofuels*, vol. 6, nº 1, p. 112, ago. 2013.
- [63] T. J. Simmons *et al.*, “Structural and electronic determinants of lytic polysaccharide monooxygenase reactivity on polysaccharide substrates”, *Nat. Commun.*, vol. 8, nº 1, p. 1064, dez. 2017.
- [64] C. M. Payne *et al.*, “Fungal Cellulases”, *Chem. Rev.*, vol. 115, nº 3, p. 1308–1448, fev. 2015.
- [65] E. Moon, I. Lee, D. Blaauw, e J. D. Phillips, “High-efficiency photovoltaic modules on a chip for millimeter-scale energy harvesting”, *Prog. Photovolt. Res. Appl.*, vol. 27, nº 6, p. 540–546, jun. 2019.
- [66] L. L. Lairson, B. Henrissat, G. J. Davies, e S. G. Withers, “Glycosyltransferases: Structures, Functions, and Mechanisms”, *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 77, nº 1, p. 521–555, jun. 2008.
- [67] N. R. Gilkes, B. Henrissat, D. G. Kilburn, e R. A. J. Warren’, “Domains in Microbial 3-1,4-Glycanases: Sequence Conservation, Function, and Enzyme Families”, *MICROBIOL REV*, vol. 55, p. 13, 1991.
- [68] L. R. Lynd, P. J. Weimer, W. H. van Zyl, e I. S. Pretorius, “Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology”, *MICROBIOL MOL BIOL REV*, vol. 66, p. 73, 2002.

- [69] R. J. Quinlan *et al.*, "Insights into the oxidative degradation of cellulose by a copper metalloenzyme that exploits biomass components", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 108, n° 37, p. 15079–15084, set. 2011.
- [70] S. Horn, G. Vaaje-Kolstad, B. Westereng, e V. G. Eijsink, "Novel enzymes for the degradation of cellulose", *Biotechnol. Biofuels*, vol. 5, n° 1, p. 45, 2012.
- [71] G. Vaaje-Kolstad *et al.*, "An Oxidative Enzyme Boosting the Enzymatic Conversion of Recalcitrant Polysaccharides", *Science*, vol. 330, n° 6001, p. 219–222, out. 2010.
- [72] J. W. Agger *et al.*, "Discovery of LPMO activity on hemicelluloses shows the importance of oxidative processes in plant cell wall degradation", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 111, n° 17, p. 6287–6292, abr. 2014.
- [73] M. L. T. M. Polizeli, A. C. S. Rizzatti, R. Monti, H. F. Terenzi, J. A. Jorge, e D. S. Amorim, "Xylanases from fungi: properties and industrial applications", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 67, n° 5, p. 577–591, jun. 2005.
- [74] S. T. Merino e J. Cherry, "Progress and Challenges in Enzyme Development for Biomass Utilization", in *Biofuels*, vol. 108, L. Olsson, Org. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2007, p. 95–120.
- [75] R. Grande, E. Trovatti, M. T. B. Pimenta, e A. J. F. Carvalho, "Microfibrillated Cellulose from Sugarcane Bagasse as a Biorefinery Product for Ethanol Production", *J. Renew. Mater.*, vol. 6, n° 2, p. 195–202, mar. 2018.
- [76] ROCHA, G. J. M.; SILVA, F. T.; ARAÚJO, G. T.; CURVELO, A. A. S. "A fast and accurate method for determination of cellulose and polyoses by HPLC. In: BRAZILIAN SYMPOSIUM ON THE CHEMISTRY OF LIGNIN AND OTHER WOOD COMPONENTS", 1997, Curitiba. Anais, Curitiba: UFPR, 1997. v.5
- [77] GOUVEIA, E. R.; NASCIMENTO, R. T.; SOUTO-MAIOR, A. M.; ROCHA, G. J. M. "Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar". *Química Nova*, v. 32, n.6, p.1-4, 2009.
- [78] S. Park, J. O. Baker, M. E. Himmel, P. A. Parilla, e D. K. Johnson, "Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance", p. 10, 2010.
- [79] E. J. Foster *et al.*, "Current characterization methods for cellulose nanomaterials", *Chem. Soc. Rev.*, vol. 47, n° 8, p. 2609–2679, 2018.
- [80] CasaXPS software Ltd.

- [81] V. G. H. Eijsink *et al.*, “On the functional characterization of lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs)”, *Biotechnol. Biofuels*, vol. 12, n° 1, p. 58, dez. 2019.
- [82] I. J. Kim, H. J. Youn, e K. H. Kim, “Synergism of an auxiliary activity 9 (AA9) from *Chaetomium globosum* with xylanase on the hydrolysis of xylan and lignocellulose”, *Process Biochem.*, vol. 51, n° 10, p. 1445–1451, out. 2016.
- [83] J. Hu, J. Davies, Y. Mok, C. Arato, e J. Saddler, “The Potential of Using Immobilized Xylanases to Enhance the Hydrolysis of Soluble, Biomass Derived Xylooligomers”, *Materials*, vol. 11, n° 10, p. 2005, out. 2018.
- [84] C. Valls *et al.*, “Assessing the enzymatic effects of cellulases and LPMO in improving mechanical fibrillation of cotton linters”, *Biotechnol. Biofuels*, vol. 12, n° 1, p. 161, dez. 2019.
- [85] A. Villares *et al.*, “Lytic polysaccharide monooxygenases disrupt the cellulose fibers structure”, *Sci. Rep.*, vol. 7, n° 1, p. 40262, fev. 2017.
- [86] J. Hu, D. Tian, S. Renneckar, e J. N. Saddler, “Enzyme mediated nanofibrillation of cellulose by the synergistic actions of an endoglucanase, lytic polysaccharide monooxygenase (LPMO) and xylanase”, *Sci. Rep.*, vol. 8, n° 1, dez. 2018.
- [87] T. Saito, Y. Nishiyama, J.-L. Putaux, M. Vignon, e A. Isogai, “Homogeneous Suspensions of Individualized Microfibrils from TEMPO-Catalyzed Oxidation of Native Cellulose”, *Biomacromolecules*, vol. 7, n° 6, p. 1687–1691, jun. 2006.
- [88] B. Ly, W. Thielemans, A. Dufresne, D. Chaussy, e M. N. Belgacem, “Surface functionalization of cellulose fibres and their incorporation in renewable polymeric matrices”, *Compos. Sci. Technol.*, vol. 68, no 15–16, p. 3193–3201, dez. 2008