

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE FIBRA DE CAROÁ (*NEOGLAZIOVIA
VARIEGATA*) VISANDO À PRODUÇÃO DE NANOCELULOSE E
ETANOL**

DANIELE FERNANDA CHIARELLI GONÇALVES

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da UNESP – Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de
Doutor em Agronomia (Energia na
Agricultura).

BOTUCATU – SP

Fevereiro – 2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE FIBRA DE CAROÁ (*NEOGLAZIOVIA
VARIEGATA*) VISANDO À PRODUÇÃO DE NANOCELULOSE E
ETANOL**

DANIELE FERNANDA CHIARELLI GONÇALVES

Orientador: Prof. Dr. Alcides Lopes Leão

Coorientador: Prof. Dr. Mario de Oliveira Neto

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da UNESP – Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de
Doutor em Agronomia (Energia na
Agricultura).

BOTUCATU – SP

Fevereiro – 2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - DIRETORIA TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

G635h Gonçalves, Daniele Fernanda Chiarelli, 1981-
Hidrólise enzimática de fibra de caroá (*Neoglaziovia variegata*) visando à produção de nanocelulose e etanol / Daniele Fernanda Chiarelli Gonçalves. - Botucatu : [s.n.], 2016
xi, 68 f. : fots. color.; grafs. color., ils. color., tabs.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2016
Orientador: Alcides Lopes Leão
Coorientador: Mario de Oliveira Neto
Inclui bibliografia

1. Bioetanol. 2. Bromeliaceae. 3. Celulase. 4. Hidrólise. 5. Nanoestrutura. I. Leão, Alcides Lopes. II. Oliveira Neto, Mario de. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Câmpus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônômicas. IV. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

**TÍTULO: "HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE FIBRA DE CAROÁ (Neoglaziovia variegata)
VISANDO À PRODUÇÃO DE NANOCELULOSE E ETANOL"**

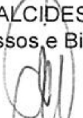
AUTORA: DANIELE FERNANDA CHIARELLI GONÇALVES

ORIENTADOR: ALCIDES LOPES LEÃO

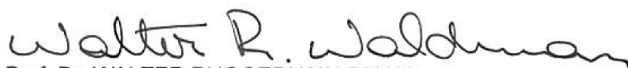
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em AGRONOMIA
(ENERGIA NA AGRICULTURA), pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. ALCIDES LOPES LEÃO
Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Agrônomicas - UNESP



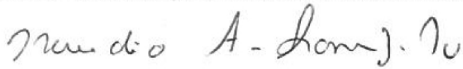
Prof. Dr. FÁBIO DE LIMA LEITE
Física, Química e Matemática / Universidade Federal de São Carlos / Campus de Sorocaba



Prof. Dr. WALTER RUGGERI WALDMAN
Campus de Sorocaba / UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS



Prof. Dr. GERMANO ANDRADE SIQUEIRA
Depto de Biotecnologia / ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA



Prof. Dr. CLAUDIO ANGELI SANSIGOLO
Dep de Ciencia Florestal / Faculdade de Ciências Agrônomicas - UNESP

Botucatu, 03 de fevereiro de 2016.

"Reescreva-se, republique-se, reinvente-se e transforme-se na melhor edição feita de você".

(Fernanda Mello)

*Ao meu amado pai (in memoriam), deixo registrado meu
amor e gratidão por não ter medido esforços para
que meus sonhos pudessem se tornar realidade.*

OFEREÇO

*À minha amada mãe, aos meus irmãos e a todos os meus
familiares, agradeço por todo apoio,
incentivo e amor.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me guiar e conduzir os meus caminhos.

Ao curso de Pós-graduação em Agronomia "Energia na Agricultura" da Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP, Câmpus de Botucatu-SP, pela oportunidade da realização do curso de doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Prof. Dr. Alcides Lopes Leão, pela confiança, incentivo e orientação no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Mario de Oliveira Neto, pela coorientação, parceria, dedicação, confiança e, em especial, pela nossa amizade.

A todos os meus familiares, pelo carinho, amor e participação na minha vida.

Ao Thiago, por ser um presente em minha vida, pelo amor, incentivo, compreensão e exemplo profissional.

Aos amigos Lessa e Roberto, por tornarem essa caminhada mais prazerosa e divertida.

A minha querida amiga Djanira, pela amizade, convívio e pelo suporte ao longo do doutorado.

Ao Alex Basseto, pelo apoio nas atividades laboratoriais e por sua amizade e paciência.

Aos amigos, colegas e técnicos do grupo Residual e do departamento de Física e Biofísica do IBB, pelo auxílio, cooperação e por proporcionarem um bom convívio.

Aos técnicos José Augusto da Rocha (IFSC) e Ricardo Figueira (FCA) pela ajuda na realização de determinadas análises.

Ao Prof. Dr. George Jackson M. Rocha pela cooperação e atenção à nossa pesquisa.

Ao Prof. Dr. Cláudio A. Sansígolo pelo apoio em algumas etapas deste trabalho e confiança.

Ao pesquisador Dr. Germano Andrade Siqueira, pela atenção e apoio em nossa pesquisa.

Ao Prof. Dr. Walter Ruggeri Waldman, pelo valioso apoio ao longo do doutorado.

Ao Prof. Dr. Fábio de Lima Leite e a doutoranda Arianne de S. Moraes, pela colaboração e apoio na realização de algumas etapas deste estudo.

Em especial, aos meus pais (Soeli Aparecida Chiarelli Gonçalves e Sergio Gonçalves), por todo amor, dedicação e incentivo para o meu crescimento profissional e pessoal.

A todos aqueles que contribuíram para a realização desta pesquisa.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	VIII
LISTA DE FIGURAS.....	IX
RESUMO.....	1
SUMMARY	2
1. INTRODUÇÃO	3
1.1. OBJETIVO	4
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
2.1. Biomassa vegetal (Caroá).....	5
2.2. Estrutura da parede celular vegetal	6
2.3. Componentes da parede vegetal.....	8
2.3.1. Celulose	8
2.3.2. Hemicelulose	10
2.3.3. Lignina	11
2.4. Desconstrução da biomassa vegetal	12
2.4.1. Tratamento hidrotérmico	14
2.4.2. Hidrólise ácida	15
2.4.3. Tratamento alcalino	15
2.4.4. Organossolve	16
2.4.5. Hidrólise enzimática da polpa de celulose.....	16
2.4.6. Glicosilhidrolase	18
2.5. Nanocelulose.....	19
2.6. Etanol de celulose	23
3. MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1. Obtenção da polpa de celulose.....	26
3.2. Caracterização química	27
3.3. Difração de raios-X (DRX)	27
3.4. Termogravimetria (TGA/DTG)	28
3.5. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	28
3.6. Preparação da nanocelulose	28
3.6.1. Hidrólise enzimática	28
3.6.2. Inativação das enzimas	29

3.6.3. Sonicação (tratamento ultrasônico).....	29
3.7. Microscopia de força atômica (AFM).....	30
3.8. Aproveitamento do resíduo da hidrólise	30
3.8.1. Fermentação alcoólica	30
3.9. Rendimento de etanol.....	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1. Caracterização química	32
4.1.1 Material in natura.....	32
4.1.2 Materiais pré-tratados	32
4.2. Difração de raios-X (DRX)	35
4.3. Termogravimetria (TGA)	39
4.4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	43
4.5. Hidrólise enzimática com endoglucanase	45
4.5.1 Efeitos da inativação enzimática.....	45
4.6. Microscopia de força atômica (AFM).....	45
4.7. Hidrólise enzimática com complexo enzimático	50
4.7.1 Medida de açúcares redutores totais (ART).....	50
4.8. Obtenção de etanol	51
4.8.1. Cálculo do rendimento teórico de etanol	51
4.8.2. Cálculo do rendimento real de etanol	52
5. CONCLUSÕES.....	53
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Aspectos dos principais métodos de pré-tratamento de biomassa lignocelulósica ..	14
Tabela 2. Características dos modelos de nanocelulose.	21
Tabela 3. Metodologias de obtenção de nanocelulose via hidrólise enzimática.	22
Tabela 4. Condições de hidrólise enzimática.	29
Tabela 5. Comparação da composição química das fibras de caroá com curauá e bagaço.....	34
Tabela 6. Caracterização química das amostras lignocelulósicas de caroá.	34
Tabela 7. Avaliação da difração de raios-X nas amostras de fibras de caroá in natura e pré-tratadas.	37
Tabela 8. Temperaturas (°C) dos picos do gráfico da termogravimetria derivada (DTG).	42
Tabela 9. Percentual da perda de massa cumulativa das fibras lignocelulósicas analisadas.	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Aspectos visuais das plantas e floração de caroá. Fonte: onordeste.com.	5
Figura 2. Estrutura da parede celular das plantas. Fonte: Adaptado de Gibson et al. (2012)....	7
Figura 3. Parede celular. A) Modelo da parede celular primária. Presença de microfibrilas curtas e finas; hemicelulose composta de xiloglucano e pectina em abundância. B) Modelo da parede celular secundária, depositada entre a parede celular primária e a membrana plasmática. Contém microfibrilas de celulose longas e espessas, xilano e lignina. Fonte: Adaptado de Nakano et al. (2015).	7
Figura 4. Representação esquemática da estrutura química da celulose, formação de ligações de hidrogênio intra e intermoleculares. Fonte: Lin e Dufresne (2014).	9
Figura 5. Estrutura da celulose. a) Moléculas de glicose: ligações covalentes (linha contínua) e ligações de hidrogênio (linha tracejada); (b) Fibrilas de celulose, com as regiões cristalina e amorfa, formando agregados em microfibrila. Fonte: Adaptado de Gibson et al. (2012)....	10
Figura 6. Esquema das moléculas de celulose e hemicelulose da parede vegetal. Fonte: U.S. Department of Energy (2008).	11
Figura 7. Monolignóis e as subunidades de lignina. Fonte: Adaptado de Brandt et al. (2013) e Rahimi et al. (2014).	12
Figura 8. Efeito do pré-tratamento em materiais lignocelulósicos. Fonte: Adaptado de Mosier et al. (2005).	13
Figura 9. Modo de ação das enzimas do complexo celulolítico (EG - endoglucanase; CBH - celobiohidrolase; BG - β -glicosidase). Fonte: Adaptado de Lynd et al. (2002)..	17
Figura 10. Estrutura da endoglucanase <i>Tm_Cel5A</i> (<i>Tm</i> – <i>Thermotoga marítima</i> ; Cel5A- celulase da família GH5). Presença de um único domínio catalítico em forma de barril (β/α) 8. O núcleo da enzima possui uma estrutura de β -barril formada por oito unidades de folhas β (roxo) cercadas por oito α -hélices (verde). A <i>Tm_Cel5A</i> também mostra quatro α -hélices	

curtas adicionais (azul). As esferas (laranja) representam os íons de cádmio ligados à enzima. Fonte: Adaptado de Pereira et al. (2010).	19
Figura 11. Estrutura hierárquica da celulose. Fonte: Adaptado de Lin e Dufresne (2014).	20
Figura 12. Amostras de fibras de plantas de caroá in natura e após alguns pré-tratamentos. ...	35
Figura 13. Perfil de difração de raios-X dos pré-tratamentos hidrotérmicos das fibras de caroá. – as intensidades máximas foram normalizadas a 1. PT = Pré-tratamento de banho hidrotérmico.	36
Figura 14. Perfil de difração de raios-X dos processos de deslignificação das fibras de caroá – as intensidades máximas foram normalizadas a 1. DL = Pré-tratamento de banho hidrotérmico a 160 °C e deslignificação com NaOH 1%. ORG = Organossolve.	36
Figura 15. Efeitos da temperatura e dos tratamentos no índice de cristalinidade.	38
Figura 16. Análises termogravimétricas das amostras de caroá. Termogravimetria - TG (a) e Derivada das curvas termogravimétricas - DTG (b).	40
Figura 17. Microscopia eletrônica de varredura de amostras de caroá in natura (A e B); pré-tratadas em banho hidrotérmico à 160 °C - PT (C e D) e deslignificadas DL (E e F). As imagens à esquerda possuem resolução de 250 x e à direita 500 x.	44
Figura 18. Microscopia de força atômica de nanocristais de celulose após a hidrólise com a enzima E-CELTm durante 2 h de reação.	46
Figura 19. Microscopia de força atômica de nanopartículas de celulose após a hidrólise com a enzima E-CELTm durante 10 h de reação.	47
Figura 20. Microscopia de força atômica das nanoceluloses cristalinas do caroá, com destaque para as medidas de comprimento e diâmetro.	49
Figura 21. Histogramas dos valores de comprimento (a), diâmetro (b) e razão de aspecto (c) das nanofibrilas obtidas após a hidrólise com E-CELTm por 2 h.	49

Figura 22. Curva de liberação de glicose na presença do complexo celulolítico Accellerase 1.500, do resíduo de fibras de caroá após a hidrólise com a endoglucanase E-CELTM por 2 h (R-TM) e fibra de caroá deslignificada (DL). 51

HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE FIBRA DE CAROÁ (*NEOGLAZIOVIA VARIEGATA*) VISANDO À PRODUÇÃO DE NANOCELULOSE E ETANOL.

Botucatu, 2016. 68 p. Tese (Doutorado em Agronomia/ Energia na Agricultura) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

Doutoranda: Daniele Fernanda Chiarelli Gonçalves

Orientador: Prof. Dr. Alcides Lopes Leão

Coorientador: Prof. Dr. Mario de Oliveira Neto

RESUMO

As fibras de caroá contêm elevado teor de celulose ($\approx 65\%$), podendo ser utilizada como fonte renovável de energia para a produção de nanocelulose e etanol de segunda geração (2G). Desse modo, objetivou-se com esta pesquisa obter nanocelulose e etanol a partir da fibra de caroá, por meio de uma metodologia capaz de gerar menor impacto negativo ao ambiente. Ensaio de pré-tratamento hidrotérmico (160, 170 e 180 °C) foram realizados visando à remoção da hemicelulose da fibra de caroá. Com base nos resultados, o material pré-tratado em banho hidrotérmico a 160 °C foi deslignificado com NaOH 1%, para obtenção da polpa de celulose. O método organossolve com o uso da relação de água/etanol (50/50) a 180 °C também foi testado. A eficiência desses processos foi avaliada por meio da caracterização química (teor de celulose, hemicelulose e lignina) e da difração de raios-X (DRX). Por ter fornecido o melhor rendimento de polpa de celulose, o pré-tratamento com banho a 160 °C e deslignificado com NaOH 1% foi o método selecionado. Esse material foi submetido a análises de termogravimetria (TG) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Por meio dessas técnicas, notou-se que houve a remoção da hemicelulose e da lignina da fibra de caroá. Em uma segunda etapa, a endoglucanase comercial E-CELTTM foi utilizada para hidrolisar a polpa celulósica e gerar nanoestruturas de celuloses. A nanocelulose obtida foi caracterizada por microscopia de força atômica (AFM). Os dados de AFM evidenciaram a presença de nanocelulose cristalina com razão de aspecto de 16 ± 5 . O material residual desse processo foi usado em uma nova hidrólise com o coquetel enzimático “Accellerase 1500” para liberação dos açúcares fermentescíveis, que podem ser convertidos em etanol. A concentração de glicose obtida após 72 h de reação foi de 19,6 g L⁻¹ e de etanol após a fermentação foi de 7,5 g L⁻¹. Dessa forma, as fibras de caroá são potenciais fontes de nanocelulose e etanol 2G.

Palavras-chave: bioetanol; bromeliaceae; celulase; hidrólise enzimática; nanoestrutura.

ENZYMATIC HYDROLYSIS OF CAROÁ (*NEOGLAZIOVIA VARIEGATA*) FIBER FOR NANOCELLULOSE AND ETHANOL PRODUCTION. Botucatu, 2016. 68 p. Thesis (Doctorate in Agronomy / Energy in Agriculture) – College of Agricultural Sciences, Sao Paulo State University.

Author: Daniele Fernanda Chiarelli Gonçalves

Advisor: Prof. Dr. Alcides Lopes Leão

Co-advisor: Prof. Dr. Mario de Oliveira Neto

SUMMARY

The fiber of caroa plants has a high quantity of cellulose ($\approx 65\%$) that can be used as a renewable energy source to produce nanocellulose and second-generation ethanol (2G). The aim of this research was to obtain nanocellulose and ethanol from caroa fiber using methods with minimal detrimental effects on the environment. Hydrothermal pretreatment trials (160, 170 and 180 °C) were carried out to remove the hemicellulose from caroa fiber. Based on the results, the pre-treated material at 160 °C in liquid hot water was delignified with 1% NaOH to obtain cellulose pulp. The organosolv method using water/ethanol ratio (50/50) at 180 °C was also studied. The efficiency of these processes was assessed by chemical characterization (content of cellulose, hemicellulose, and lignin) and by X-ray diffraction (XRD). The best yield of cellulose pulp was obtained from the pre-treated material using liquid hot water at 160 °C and delignified with 1% NaOH and was selected for further analysis. This material was submitted to thermogravimetric analysis (TGA) and scanning electron microscopy (SEM). After the material was pre-treated a second process, commercial endoglucanase E-CELTM, was used to hydrolyze the cellulosic pulp and to produce cellulose nanostructures. The nanocellulose obtained was characterized by atomic force microscopy (AFM). The AFM data shows the presence of nanocellulose crystal with aspect ratio of 16 ± 5 . The residual of these materials was used for a new hydrolysis with the enzyme cocktail "Accellerase 1500" for release of fermentable sugars, which can be converted into ethanol. The concentration of glucose obtained after 72 h of reaction was $19,6 \text{ g L}^{-1}$ and the concentration of ethanol after fermentation was $7,5 \text{ g L}^{-1}$. Therefore, caroa fibers are potential sources of nanocellulose and ethanol 2G.

Keywords: bioethanol; bromeliaceae; cellulase; enzymatic hydrolysis; nanostructure.

1. INTRODUÇÃO

O caroá [*Neoglaziovia variegata* (Arruda) Mez] é uma planta da família Bromeliaceae muito importante para o ecossistema do semi-árido brasileiro. É uma espécie nativa do estrato baixo da caatinga e por ser considerada uma excelente fonte de fibra dura, vem sendo utilizada, principalmente, na indústria têxtil (RIBEIRO, 2007). As fibras de caroá contêm elevado teor de celulose, tornando-se uma biomassa de interesse para a produção de nanocelulose e de etanol celulósico.

O termo “nanocelulose” se refere a materiais celulósicos que possuem pelo menos uma de suas dimensões na escala nanométrica, são biodegradáveis e podem ser produzidas de qualquer fonte de biomassa lignocelulósica (KHALIL et al., 2014). As nanoceluloses têm sido estudadas como biopolímeros de alta tecnologia para aplicação em diversos materiais. Tal fato se deve a sua biocompatibilidade, estabilidade térmica, menor densidade, elevada relação de aspecto - definida como a razão entre o comprimento e o diâmetro, a sua contribuição como reforço mecânico e as suas propriedades ópticas (LEÃO et al., 2007; FUKUZUMI et al., 2009; NOGI et al., 2009; MOON et al., 2011; HONORATO et al., 2015).

Além dos materiais nanocompósitos, como baterias, biofilmes de embalagens de alimentos e sensores eletrônicos (ISOGAI et al., 2011; MOON et al., 2011; ZHENG et al., 2015), as nanoceluloses podem ser utilizadas como hidrogéis em formulações cosméticas (SPOLJARIC et al., 2014), aditivos para revestimentos e na forma de barreiras de gás como preenchimento da micro e nanoporosidade de filmes (BELBEKHOUCHE et al., 2011). Esse nanomaterial também pode ser utilizado para encapsulamento e controle da liberação de fármacos (MOON et al., 2011). Estudos têm sido intensificados na área biomédica com o emprego da nanocelulose na engenharia de tecidos como substituto dos vasos sanguíneos e tecidos moles, reparação de ossos e pele (LIN; DUFRESNE, 2014), além da confecção de membranas semelhantes aos filtros sintéticos antimicrobianos (METREVELI et al., 2014).

O etanol de celulose, também conhecido como etanol de 2ª geração, é produzido pela hidrólise da biomassa celulósica a partir da liberação de açúcares fermentescíveis (WYK, 2001; OGEDA; PETRI, 2010). Atualmente, tem sido bastante estudado por se tratar de uma alternativa para aumentar significativamente a produção mundial de etanol, além de ser considerado uma tecnologia mais limpa. Assim, materiais lignocelulósicos

ganham cada vez mais destaque como matéria-prima promissora para produção desses biocombustíveis (TILMAN et al., 2009; KARLRSSON et al., 2014).

Durante o processo de produção de nanocelulose e etanol celulósico é importante conhecer bem as matérias-primas e os métodos de pré-tratamento utilizados para o processamento da biomassa lignocelulósica. Nesse sentido, a hidrólise enzimática catalisada por enzimas denominadas celulasas torna-se uma opção, principalmente por reduzir os danos ambientais devido ao uso de reagentes tóxicos.

1.1. OBJETIVO

Diante do exposto, objetivou-se com o presente estudo, avaliar as fibras de plantas de caroá para a produção de nanocelulose e obtenção de açúcares fermentescíveis para a geração de etanol. Assim, os objetivos específicos foram:

- Realizar os processos de pré-tratamento das fibras de plantas de caroá para extração da polpa de celulose;
- Promover a hidrólise enzimática da polpa de celulose para obtenção de nanocelulose com o emprego de endoglucanase comercial da família glicosilhidrolase 5 (GH 5);
- Caracterizar morfológicamente a nanocelulose de plantas de caroá;
- Realizar a hidrólise da polpa celulósica na presença do complexo celulolítico visando à obtenção de açúcares fermentescíveis;
- Promover a fermentação alcoólica do material hidrolisado e determinar a quantidade de etanol produzida.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Biomassa vegetal (Caroá)

O caroá [*Neoglaziovia variegata* (Arruda) Mez] (Figura 1) é uma planta da família Bromeliaceae, com folhas verdes listradas e espinhosas, flores vermelhas protegidas por brácteas e frutos em bagas suculentas, que mede em torno de 90 a 180 cm de altura (SMITH; DOWNS, 1979; XAVIER, 1982).



Figura 1. Aspectos visuais das plantas e floração de caroá. Fonte: onordeste.com.

A fenologia das plantas estuda as mudanças morfológicas relacionadas às fases do ciclo de vida, como germinação, floração e frutificação (FENNER, 1998). As sementes de *N. variegata* requerem altas temperaturas, entre 30 e 37 °C, para germinação. A restrição hídrica do meio pode ocasionar um atraso no tempo de germinação (SILVEIRA et al., 2011). Sendo assim, a fase de brotamento concentra-se na estação chuvosa. A floração do caroá ocorre em um único período do ano, sempre após a estação seca e a polinização é realizada pelo beija-flor da espécie *Chlorostilbon aureoventris* (LEAL et al., 2006; SILVEIRA et al., 2009). A fenofase de frutificação ocorre logo após a floração, no período chuvoso (PEREIRA; QUIRINO, 2008).

Essa espécie é muito importante para o ecossistema do semi-árido brasileiro, nativa do estrato baixo da caatinga, é uma excelente fonte de fibra dura, especialmente para a indústria têxtil, mas que foi negligenciada, a partir da década de 50, com a entrada no mercado das fibras artificiais (RIBEIRO, 2007). A confecção de produtos artesanais a partir das fibras de caroá é uma fonte de trabalho e renda para muitas famílias da região nordeste (SILVEIRA et al., 2011).

As fibras de caroá contêm em torno de 80% de holocelulose, 15% de lignina e 8% de extrativos (VASCONCELOS et al., 2009). O alto valor do teor de holocelulose torna o caroá uma biomassa de interesse para geração de produtos a base de polpa de celulose, como por exemplo, a nanocelulose e o etanol de segunda geração. Possibilitando, dessa forma, adensar a cadeia produtiva do caroá permitindo que o produtor tenha acesso a novos mercados que remunerem melhor, quando comparado com a receita obtida atualmente nos produtos tradicionais destinados ao artesanato.

2.2. Estrutura da parede celular vegetal

A parede celular (PC) das plantas representa a maior fonte de carbono orgânico do planeta (GILBERT, 2010). A PC vegetal é composta por quatro componentes principais: celulose, hemicelulose, pectina e lignina, que conferem resistência mecânica e rigidez às plantas (GIBSON, 2012; NAKANO et al., 2015). A estrutura da parede das células vegetais é formada por quatro camadas: parede primária (PP), parede secundária externa (S1), parede secundária média (S2) e parede secundária interna (S3) (Figura 2) (FENGEL; WEGENER, 1989; KEEGSTRA et al., 2010; GIBSON, 2012). Essas camadas são secretadas pelo protoplasto, onde a camada mais antiga localiza-se mais distante da membrana plasmática (GIBSON, 2012).

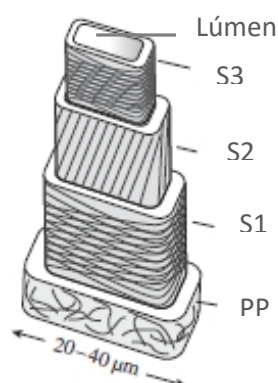


Figura 2. Estrutura da parede celular das plantas. Fonte: Adaptado de Gibson et al. (2012).

As camadas da parede celular diferenciam-se na composição química, orientação das microfibrilas de celulose e localização celular (Figura 3) (CARVALHO et al., 2009; GIBSON, 2012; NAKANO et al., 2015). Cada espécie vegetal apresenta uma quantidade de celulose, hemicelulose e lignina em cada camada (CARVALHO et al., 2009).

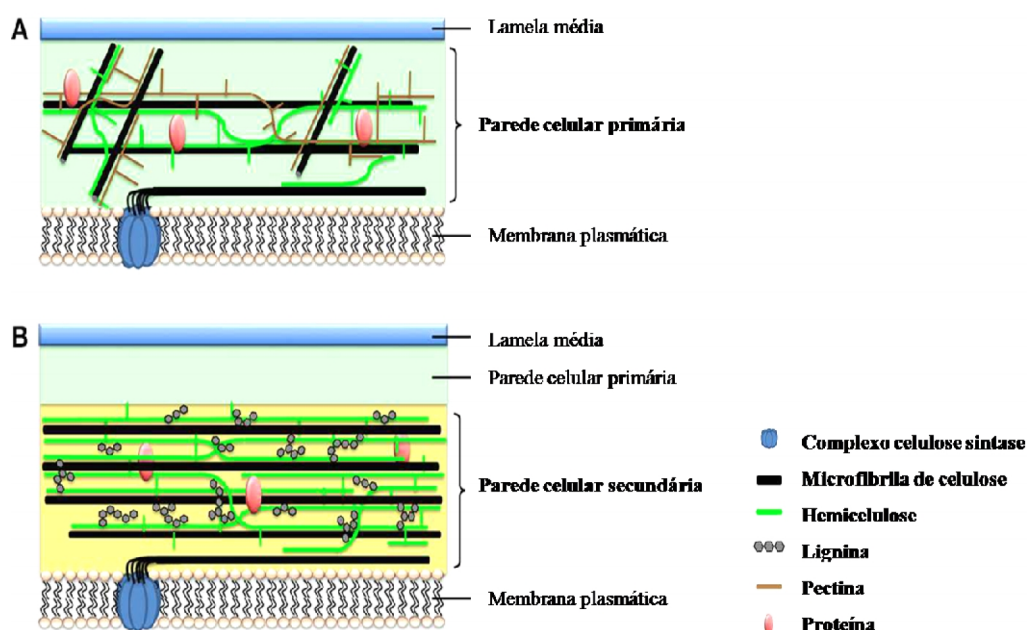


Figura 3. Parede celular. A) Modelo da parede celular primária. Presença de microfibrilas curtas e finas; hemicelulose composta de xiloglucana e pectina em abundância. B) Modelo da parede celular secundária, depositada entre a parede celular primária e a membrana plasmática. Contém microfibrilas de celulose longas e espessas, xilana e lignina. Fonte: Adaptado de Nakano et al. (2015).

A celulose é o componente principal das camadas. No entanto, este polímero está presente na PP com menor grau de polimerização. Os outros componentes da parede celular também diferem entre as camadas primária e secundárias, como a abundância de pectina na PP e lignina na parede secundária. Estas características são responsáveis pela flexibilidade da PP e maior rigidez da parede secundária (COSGROVE, JARVIS, 2012; NAKANO et al., 2015).

2.3. Componentes da parede vegetal

2.3.1. Celulose

A celulose é o biopolímero renovável mais abundante e é encontrado em plantas, bactérias e alguns animais (TINGAUT et al., 2012; CHEN, 2014). A estrutura da celulose é um homopolissacarídeo semicristalino linear de cadeia longa constituída de 7.000 a 15.000 resíduos de D-glicose unidas por ligações β -1,4 glicosídicas (GIBSON, 2012). Na natureza, a celulose está na forma de fibra com diâmetro de 5 a 20 μm e comprimento de 0,5 a vários milímetros (KALIA et al., 2014). Nos vegetais, as moléculas de celulose estão organizadas em fibrilas elementares, que são integradas em unidades maiores denominadas microfibrilas, que por sua vez compõem as fibras (PAAKKO et al., 2007; HABIBI et al., 2010). As microfibrilas de celulose estão embebidas em uma matriz envolta por hemicelulose e lignina ou pectina, conferindo suporte estrutural às plantas (MORTIMER et al., 2010; GIBSON, 2012; SILVEIRA et al., 2013). As cadeias de celulose, em paralelo, são unidas por interações de van der Waals e por ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxila laterais (Figura 4), que determinam a estabilidade tridimensional da molécula com a formação de uma estrutura cristalina altamente ordenada (FENGEL; WEGENER, 1989; UTO et al., 2014; LIN; DUFRESNE, 2014).

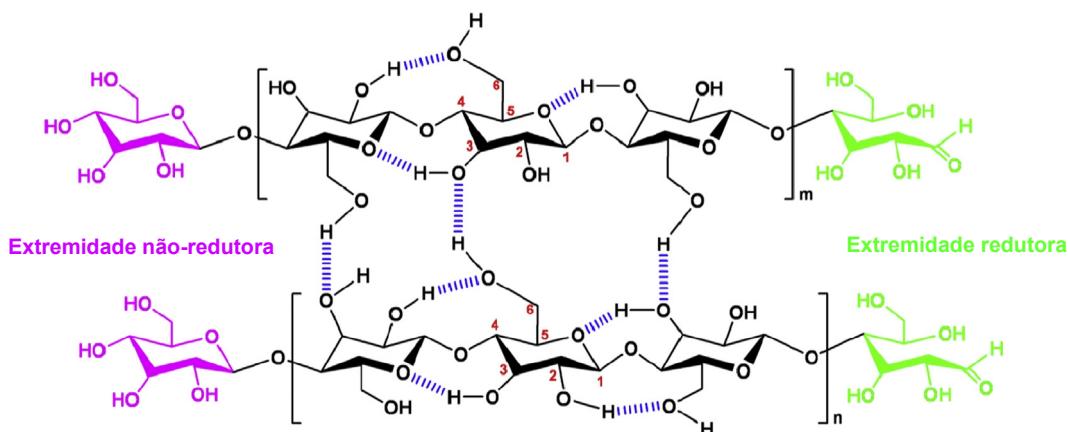


Figura 4. Representação esquemática da estrutura química da celulose, formação de ligações de hidrogênio intra e intermoleculares. Fonte: Lin e Dufresne (2014).

Cada fibrila de celulose mede aproximadamente de 3 a 4 nm de espessura e vários micrometros de comprimento, contendo regiões ordenadas e desordenadas, denominadas cristalinas e amorfas, respectivamente (Figura 5) (KOSARIC et al., 1983; PAAKKO et al., 2007; ZIMMERMANN et al., 2010; MOON et al., 2011). A estrutura cristalina da celulose confere propriedades mecânicas atrativas para um polímero, como o elevado módulo de elasticidade (estimado em 134 GPa) e resistencia à tração (GIBSON, 2012; TINGAUT et al., 2012).

A celulose é um composto polimorfo, sendo identificadas sete estruturas cristalinas de celulose: I α , I β , II, III₁, III₂, IV₁ e IV₂ (OGEDA; PETRI, 2010). Essas estruturas alomorfos derivam da celulose I (α e β), que é a forma encontrada in natura (UTO et al., 2014). A celulose I α apresenta uma estrutura triclinica que pode ser convertida na forma mais estável monoclinica I β após tratamento hidrotérmico ou com solvente orgânico a alta temperatura (YAMANO et al., 1989; UTO et al., 2014). Ambas as estruturas de celulose I estão presentes em todas as fontes de celulose, mas em proporções diferentes. A celulose I α é encontrada em maiores proporções nas bactérias, fungos e algas, e a estrutura I β nas plantas (FLEMMING et al., 2001). A celulose tipo II pode ser obtida pelo processo de mercerização ou regeneração da celulose I. No entanto, esse é um processo irreversível, devido à mudança da polaridade da cadeia celulósica de paralela para antiparalela, resultando em uma estrutura mais estável com a formação de um maior número de ligações de hidrogênio (KROON-BATENBURG; KROON, 1997; LANGAN et al., 2005; UTO et al., 2014). A celulose II tem uma estrutura monoclinica e é utilizada para produção de filmes transparentes (celofane) (KLEMM et al., 2005). As celulosas III₁ e III₂ são formadas

após o tratamento da celulose I e II com amônia ou aminas (OGEDA; PETRI, 2010). As celulose IV₁ e IV₂ são produzidas após o aquecimento com glicerol a 206 °C das celulose III₁ e III₂, respectivamente (O'SULLIVAN, 1997; OGEDA; PETRI, 2010). Cada tipo de celulose apresenta características específicas, como densidade, ponto de fusão e estrutura cristalina (KADLA; GILBERT, 2000).

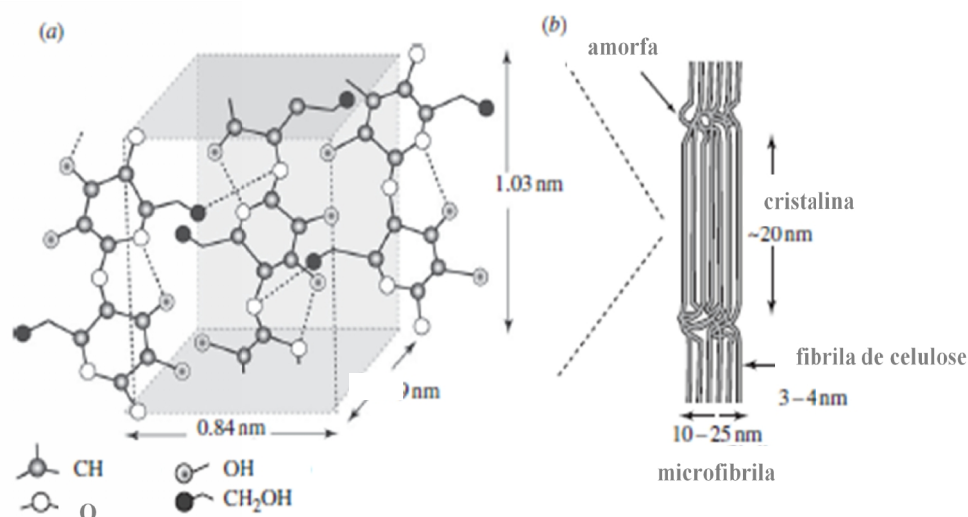


Figura 5. Estrutura da celulose. a) Moléculas de glicose: ligações covalentes (linha contínua) e ligações de hidrogênio (linha tracejada); (b) Fibrilas de celulose, com as regiões cristalina e amorfa, formando agregados em microfibrila. Fonte: Adaptado de Gibson et al. (2012).

2.3.2. Hemicelulose

Hemiceluloses são polissacarídeos de cadeia ramificada compostos de 500 a 3.000 unidades de monossacarídeos contendo cinco ou seis carbonos (NIKLAS, 1992; KUMMAR et al., 2008). Os principais monômeros constituintes das hemiceluloses são as pentoses D-xilose e L-arabinose e em menor quantidade as hexoses D-glicose, D-galactose, D-manose, D-ácido glicurônico e 4-O-metil-D-ácido glicurônico (Figura 6) (KULKARNI et al., 2012).

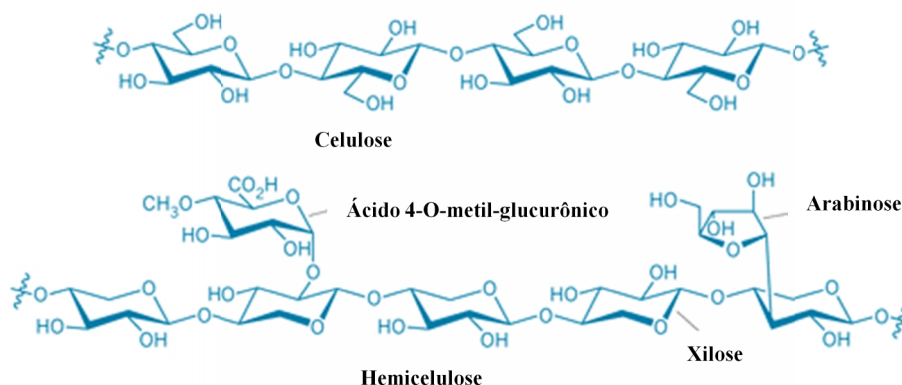


Figura 6. Esquema das moléculas de celulose e hemicelulose da parede vegetal. Fonte: U.S. Department of Energy (2008).

O teor e a estrutura da hemicelulose diferem entre as espécies de plantas, sendo que a cadeia principal deste polissacarídeo é constituída por um ou mais tipos de grupos glicosil unidos por ligações β -1,3, β -1,4, β -1,6 ou β -1,3- β -1,4 (CHEN, 2014). As moléculas de hemiceluloses associam-se às moléculas de celulose e fazem ligação cruzada com moléculas de lignina, resultando em uma complexa e resistente rede (SCHELLER; ULVSKOV, 2010).

2.3.3. Lignina

Ligninas são polímeros hidrofóbicos e amorfos compostos por unidades de fenilpropano ligadas pelo acoplamento radicalar de C-C e C-O (CHEN, 2014). Estes polímeros preenchem os espaços na parede celular entre as moléculas de celulose e hemicelulose, atuando como uma “cola” que mantém a matriz lignocelulósica coesa e confere uma alta resistência da parede celular à degradação (RUBIN, 2008; ZHONG; YE, 2015). A lignina é um complexo polifenólico tridimensional gerado pela polimerização oxidativa de três precursores monolignóis (Figura 7): o álcool cumarílico, o álcool coniferílico e o álcool sinapílico, que geram três tipos de lignina respectivamente: *p*-hidroxifenil lignina (H), guaiacil lignina (G) e siringil lignina (S). A degradação da estrutura da rede de polifenóis demonstra o alto grau de polidispersividade dos fragmentos de lignina liberados, desde frações de menores pesos moleculares, 2.100, 7.100, e 11.000, até tamanhos maiores entre 18.000 e 40.000 (JIANG, 2001; CHEN, 2014).

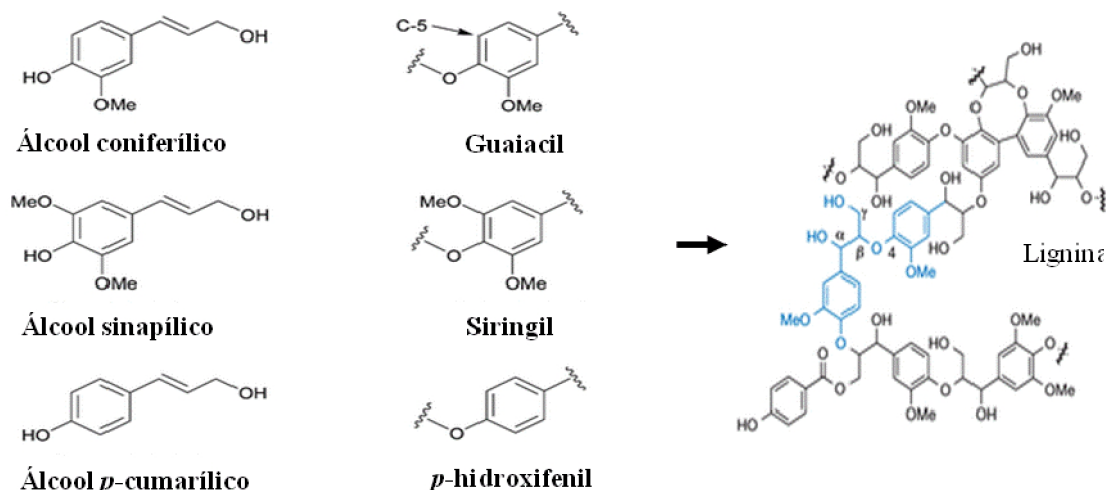


Figura 7. Monolignóis e as subunidades de lignina. Fonte: Adaptado de Brandt et al. (2013) e Rahimi et al. (2014).

As espécies vegetais possuem tipos e proporções diferentes dos polímeros de lignina (ZHONG; YE, 2015). Geralmente, as dicotiledôneas contêm unidades de guaiacil-siringil (GS) em maiores quantidades, já as monocotiledôneas contêm, principalmente, guaiacil-siringil-hidroxifenil (GSH) (WEI, SONG, 2001). A lignina de madeira mole (“softwood”) é composta, principalmente, de unidades de guaiacil (BRANDT et al., 2013). Já a lignina de madeira dura (“hardwood”) contém tanto unidades de G e S em proporções similares. Quantidades significativas de grupos *p*-hidroxifenil são encontradas em ligninas de herbáceas (YINGHUI et al., 2013).

2.4. Desconstrução da biomassa vegetal

A biomassa lignocelulósica é um recurso renovável composto, principalmente, de celulose, hemicelulose e lignina. Os componentes obtidos do processamento da biomassa vegetal podem ser convertidos em combustíveis, produtos químicos e biomateriais (KAMM et al., 2006; LEE et al., 2014). O principal obstáculo para a desconstrução da biomassa lignocelulósica é a sua recalcitrância, que dificulta a separação da celulose, hemicelulose e lignina presentes na parede celular (SILVEIRA et al., 2013; LEE et al., 2014). Alguns fatores contribuem para a recalcitrância da biomassa: proteção da celulose pela lignina, revestimento pela hemicelulose, a cristalinidade e o grau de polimerização da celulose (LEE et al., 2014).

Desse modo, o fator limitante da desconstrução da biomassa é o método de pré-tratamento empregado. O objetivo do pré-tratamento é romper a estrutura da lignina e da hemicelulose (Figura 8), expondo a molécula de celulose para facilitar o acesso das enzimas celulolíticas e aumentar a eficiência da hidrólise enzimática (OOSHIMA et al., 1991; MOSIER et al., 2005; ALVIRA et al., 2010; OGEDA, PETRI, 2010; CHANDRA et al., 2015). Assim, o pré-tratamento visa aumentar a área de superfície específica da celulose e a porosidade do substrato disponível, além de reduzir sua cristalinidade para o ataque enzimático (ALVIRA et al., 2010; LEE et al., 2014). A remoção da lignina é importante, uma vez que esta pode também adsorver as enzimas hidrolíticas competindo com as fibras de celulose pelos sítios de ligação catalíticos (BERLIN et al., 2005; ZHENG et al., 2013; KO et al., 2015).

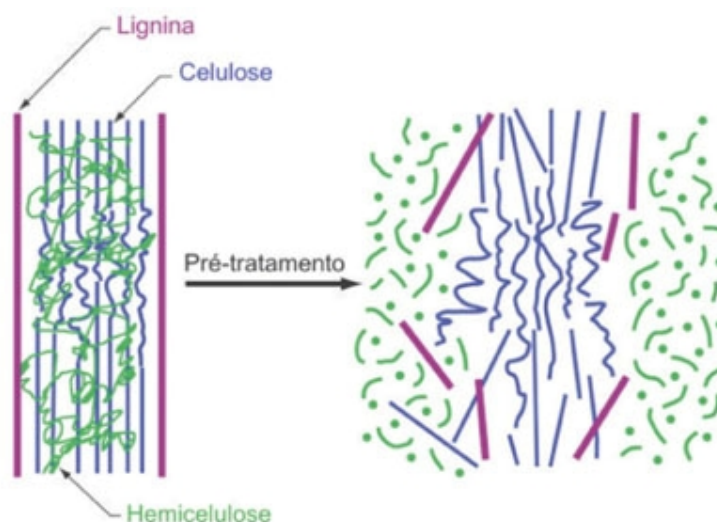


Figura 8. Efeito do pré-tratamento em materiais lignocelulósicos. Fonte: Adaptado de Mosier et al. (2005).

Cada material lignocelulósico tem diferentes características físico-químicas e, portanto, é importante adequar a metodologia de pré-tratamento com base nas propriedades da biomassa escolhida (ALVIRA et al., 2010). Além disso, o pré-tratamento influencia, potencialmente, a hidrólise enzimática da celulose, a produção de compostos tóxicos como os inibidores do crescimento da levedura e, também, a demanda de energia (GALBE, ZACCHI, 2007).

Diversos métodos de pré-tratamento (Tabela 1) podem ser aplicados, como por exemplo: moagem, tratamento hidrotérmico, hidrólise ácida, tratamento alcalino,

organossolve, biodegradação fúngica e as combinações de tratamentos físicos, químicos e biológicos (TALEBNIA et al., 2010; LEE et al., 2014).

Tabela 1. Aspectos dos principais métodos de pré-tratamento de biomassa lignocelulósica.

Método de pré-tratamento		Vantagens	Desvantagens
Moagem	Físico	Redução da cristalinidade da celulose	Alto consumo de energia
Explosão a vapor	Físico-químico	Custo efetivo; solubilização da hemicelulose e transformação da lignina	Formação de compostos tóxicos; degradação parcial da hemicelulose
Hidrotérmico com água quente	Químico	Ausência do uso de reagentes químicos	Degradação parcial da hemicelulose
Ozonólise	Químico	Reduz o teor de lignina; ausência de compostos tóxicos	Alto custo
Organossolve	Químico	Hidrólise da lignina e hemicelulose	Alto custo; necessidade de reciclagem do solvente
Tratamento ácido concentrado	Químico	Alto rendimento de glicose; processo em temperatura ambiente	Elevado custo do ácido; corrosão dos reatores; formação de inibidores
Tratamento ácido diluído	Químico	Diminuição dos problemas de corrosão e menor quantidade de inibidores do que o tratamento com ácido concentrado	Menor concentração de açúcares
Tratamento alcalino	Químico	Solubilização da lignina; menor degradação de açúcar do que o tratamento ácido ⁽¹⁾	Produção de compostos inibidores
Fúngico (ação de enzimas que degradam lignina - peroxidases e lacases) ⁽¹⁾	Biológico	Degradação da lignina e hemicelulose; baixo consumo de energia	Baixa taxa de hidrólise

Fonte: Adaptado de Alvira et al. (2010). ⁽¹⁾ Kumar et al. (2009).

2.4.1. Tratamento hidrotérmico

O pré-tratamento hidrotérmico é realizado a alta temperatura (160 a 240 °C), mantida pela pressão aplicada nos reatores, sem a adição de catalisador ou reagente químico (ALVIRA et al., 2010; TALEBNIA et al., 2010). A água quente solubiliza uma fração elevada de açúcares hemicelulósicos e abre os poros entre os feixes de microfibrilas

(HENDRIKS; ZEEMAN, 2009; PENTTILÄ et al., 2013). O pH do líquido deve ser mantido entre 4 e 7, que mantém a hemicelulose na forma oligomérica, minimizando a formação de monômeros que atuam como inibidores da fermentação (ALVIRA et al., 2010).

O tratamento hidrotérmico também pode ser realizado por explosão a vapor. Neste processo, após alguns minutos de reação do material lignocelulósico em banho hidrotérmico sob alta pressão e temperatura, o reator é despressurizado subitamente, o que proporciona a abertura das fibras e solubilização da hemicelulose (MABEE et al., 2006; TALEBNIA et al., 2010). Como consequência, as hemiceluloses são hidrolisadas liberando o ácido acético que catalisa a desidratação da glicose e xilose, produzindo o furfural e o hidroximetilfurfural, respectivamente. Esses dois compostos são considerados inibidores da fermentação (MABEE et al., 2006). Além disso, no processo de explosão a vapor ocorre deslignificação liberando compostos aromáticos (BERLIN et al., 2005; ZHENG et al. 2013). A lignina é despolimerizada por clivagem de ligações éter e pode sofrer condensação com a formação de ligação C-C que é mais forte (LI et al., 2007; KO et al., 2015). Sendo assim, o posterior processo de lavagem do material é extremamente necessário. O tratamento hidrotérmico é considerado viável tanto ambientalmente como economicamente, uma vez que consome menos energia (BALLESTEROS et al., 2006).

2.4.2. Hidrólise ácida

A hidrólise ácida das fibras vegetais em alta temperatura é um processo em que os íons H_3O^+ atacam ligações inter e intramoleculares entre a celulose, hemicelulose e lignina (LEE et al., 2014). Este processo é eficaz na solubilização da hemicelulose (DONOHOE et al., 2008). No entanto, a utilização de ácidos fortes, como o H_2SO_4 , HCl , H_3PO_4 ou HNO_3 , pode ocasionar a corrosão dos reatores, tem um alto custo, além de gerar compostos inibidores do processo e resíduos tóxicos ao ambiente (MOSIER et al., 2005; ALVIRA et al., 2010).

2.4.3. Tratamento alcalino

O tratamento alcalino é capaz de romper a estrutura da lignina por meio da saponificação da ligação éster intermolecular, que reticula xilano (hemicelulose) e lignina,

liberando acetatos, ácido ferúlico e *p*-cumárico (MORRISON; STEWART, 1995; SUN; CHENG 2002). A clivagem das ligações ésteres leva à substituição nucleofílica no grupo acila para formar sal carboxílico e álcool, na presença de sal alcalino (PERDESEN; MEYER, 2010). Os principais agentes alcalinos utilizados no processo de deslignificação da biomassa são: NaOH, KOH, Ca(OH)₂ e NH₄OH (TAHERDANAK; ZILOUEI, 2014). Estes agentes também são responsáveis pelo inchamento da celulose, diminuindo o grau de polimerização e cristalinidade desta molécula (LEE et al., 2014).

O tratamento alcalino, quando comparado à hidrólise ácida, é realizado em condições mais brandas, com menor temperatura (120 °C) e baixas concentrações de reagentes.

2.4.4. Organossolve

O processo organossolve envolve pré-hidrólise para solubilização da hemicelulose e deslignificação simultâneas da biomassa vegetal, com a utilização de solventes orgânicos em solução aquosa (ZHAO et al., 2009; LEE et al., 2014). Os solventes orgânicos, como os alcoóis (etanol, metanol, glicerol), éteres, cetonas, e fenóis, promovem a solubilização da hemicelulose e lignina sob aquecimento (THRING et al., 1990; LEE et al., 2014).

O álcool é o principal solvente utilizado no processo organossolve devido à facilidade de recuperação por destilação simples, baixo custo e solubilidade em água. O OH⁻ do álcool ataca as ligações ácido-éster dos compostos lignina-hemicelulose, além de aumentar os poros da celulose e reduzir sua cristalinidade (ZHAO et al., 2009; LEE et al., 2014). No entanto, o pré-tratamento organossolve tem um custo muito elevado, uma vez que exige uma lavagem extensiva dos materiais pré-tratados com solvente orgânico para evitar a precipitação da lignina (ZHAO et al., 2009; LEE et al., 2014).

2.4.5. Hidrólise enzimática da polpa de celulose

A hidrólise enzimática da celulose é catalisada por enzimas altamente específicas denominadas celulasas, que são divididas em três grupos: as endoglucanases (EC 3.2.1.4), que clivam aleatoriamente ligações internas β -1-4 da região amorfa; as exoglucanases/ celobiohidrolases (EC 3.2.1.91), que atuam nas extremidades das cadeias de celulose para liberar celobiose, e β -glicosidases (EC 3.2.1.21), que catalisam a hidrólise de celobiose em

glicose (KUMAR et al., 2008; SERPA; POLIKARPOV, 2011). As enzimas do complexo celulolítico são classificadas pela *Enzyme Commission* (EC) com a codificação 3.2.1.x, no qual o valor de x varia com a celulase avaliada (HENRISSAT, 1991).

Essas enzimas individualmente não hidrolisam a celulose com eficiência, sendo necessária uma ação complementar das outras enzimas do complexo. O sinergismo entre endoglucanase, exoglucanases e β -glicosidase potencializa a hidrólise da fibra celulósica (Figura 9).

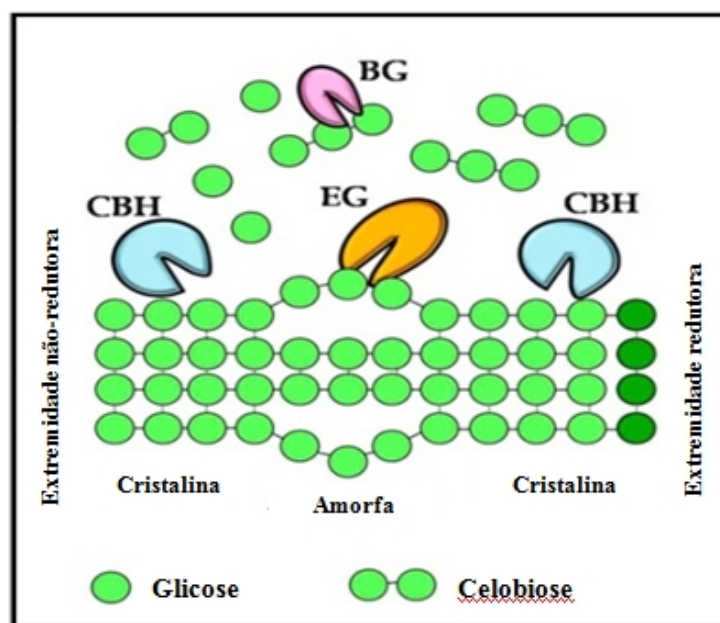


Figura 9. Modo de ação das enzimas do complexo celulolítico (EG - endoglucanase; CBH - celobiohidrolase; BG - β -glicosidase). Fonte: Adaptado de Lynd et al. (2002).

Alguns microrganismos, como fungos e bactérias, foram descritos como capazes de utilizar celulose e hemicelulose como fonte de carbono e energia, degradando-as, por meio da ação de enzimas (CLOETE; MALHERBE, 2002; SÁNCHEZ, 2009; ORLOWSKI et al., 2015). Os fungos apresentam dois tipos de sistemas enzimáticos extracelulares, o sistema hidrolítico, que produz hidrolases responsáveis pela degradação de polissacarídeos e um sistema ligninolítico extracelular e oxidativo único, que degrada a lignina (SÁNCHEZ, 2009). Fungos filamentosos como *Aspergillus niger* e *Trichoderma reesei* são expressivos produtores de enzimas celulolíticas (DEMAIN et al., 2005; VAN DEN BRINK et al., 2014). Do total das proteínas celulolíticas de *T. reesei*, por volta de 80% corresponde à celobiohidrolase (TANGNU et al., 1981; ILMÉN et al., 2011).

Algumas bactérias possuem enzimas multidomínios que quebram a celulose e hemicelulose sem a cooperação de outras enzimas. A celulase bacteriana é eficiente na hidrólise da biomassa lignocelulósica e tem superado os coquetéis enzimáticos comerciais produzidos por fungos (DUTTA; WU, 2014).

2.4.6. Glicosilhidrolase

As celulasas pertencem ao grupo das enzimas Glicosilhidrolase (GH), que realizam a hidrólise glicosídica entre dois ou mais carboidratos, ou entre um grupamento carboidrato e um não-carboidrato (GILBERT et al., 2010; TIWARI et al., 2013; SCHRÖDER et al., 2015). A classificação dessas enzimas é baseada na similaridade da sequência de aminoácidos, ao invés de especificidade ao substrato (HENRISSAT; BAIROCH, 1993; 1996). As GHs são classificadas em grupos com base em domínios catalíticos conservados (CANTAREL et al., 2009; LOMBARD et al., 2014). As enzimas da família GH possuem uma estrutura de multi-domínio composto de um ou dois domínios catalíticos que podem estar associados a domínios acessórios, como os “módulos de ligação a carboidratos” (CBM), que facilitam a associação dos domínios catalíticos com os carboidratos insolúveis (SCHUBOT et al., 2004; PEREIRA et al., 2009). Atualmente, as famílias são numeradas de 1-135, listadas no banco de dados Carbohydrate-Active Enzyme (LOMBARD et al., 2014).

As β -glicosidases (BGs) são encontrados em seis famílias GHs (1, 3, 5, 9, 30 e 116), a maioria pertencente a GH1 (KETUDAT CAIRNS; ESEN, 2010). Estas enzimas hidrolisam celodextrinas e celobiose a glicose (CHAUVE et al., 2010). Todos os organismos que hidrolizam celulose possuem sistemas relativamente complexos compostos por enzimas de uma, duas ou três das classes mencionadas (TIWARI et al., 2013).

Existem duas classes principais de celobiohidrolase (CBH): CBHI, da família GH7, e CBHII, pertencente à família GH6. A estrutura dos domínios catalíticos dessas enzimas é diferente, porém ambas apresentam um sítio ativo “tunnel-like” (ILMÉN et al., 2011). A CBHI hidrolisa a extremidade redutora da cadeia e a CBHII atua na extremidade não-redutora (LYND et al., 2002).

As endoglucanase pertencem a um maior grupo de famílias, incluindo GH 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 26, 44, 45, 48, 51, 74 e 124 (LOMBARD et al., 2014). Uma das famílias mais numerosas é a GH5, também conhecida como GH-A, que possui uma estrutura

tridimensional na forma de barril (β/α) 8 (Figura 10). No sítio ativo (dobra do barril), dois glutamatos em cadeia β -4 e β -7 atuam como ácido/base e nucleófilo para hidrolisar as ligações glicosídicas (PEREIRA et al., 2010; WU et al., 2011). A principal atividade da família GH5 é endo- β -1,4-endoglucanase/ celulase, no entanto mais de 20 atividades enzimáticas são conhecidas (VLASENKO et al., 2010; WU et al., 2011).

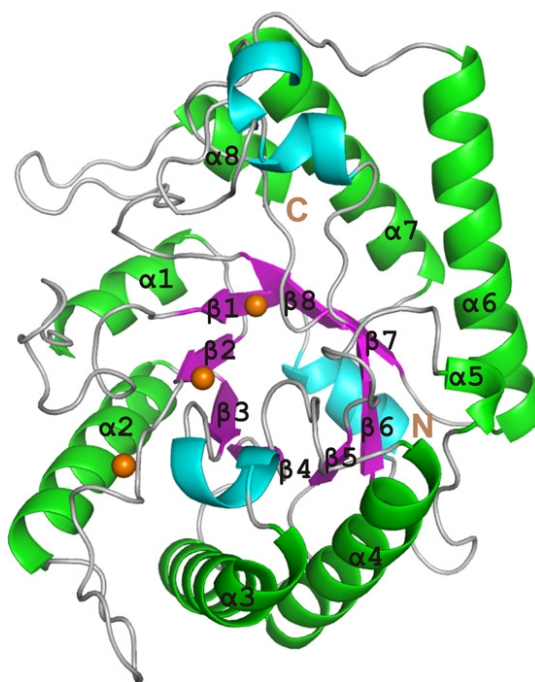


Figura 10. Estrutura da endoglucanase *Tm_Cel5A* (*Tm* – *Thermotoga marítima*; Cel5A-celulase da família GH5). Presença de um único domínio catalítico em forma de barril (β/α) 8. O núcleo da enzima possui uma estrutura de β -barril formada por oito unidades de folhas β (roxo) cercadas por oito α -hélices (verde). A *Tm_Cel5A* também mostra quatro α -hélices curtas adicionais (azul). As esferas (laranja) representam os íons de cádmio ligados à enzima. Fonte: Adaptado de Pereira et al. (2010).

2.5. Nanocelulose

Turbak, Snyder e Sandberg, pesquisadores do ITT Rayonier (EUA), fabricaram, em 1977, um gel proveniente da polpa de madeira processada utilizando um homogeneizador industrial a alta pressão. (KLEMM et al., 2011; WUESTENBERG, 2014). Este tratamento delaminava as fibras deixando expostas as denominadas celulose microfibrilada (CMF), um tipo de nanocelulose. A terminologia CMF tornou-se conhecida publicamente em 1983, com as publicações e patentes do ITT Rayonier (TURBAK et al., 1983; HERRICK

et al., 1983; WUESTENBERG, 2014). No entanto, na década de 80, o alto consumo de energia para obtenção da nanocelulose em gel foi um empecilho para sua comercialização. Posteriormente, em 1990, descobriu-se a potencial produção de membranas de CMF a partir da polpa de beterraba (WEIBEL; MYERS, 1990; DINAND et al., 1996). Ranby e Noe (1961) reportaram pela primeira vez o experimento para obtenção dos nanocristais de celulose (NCC) por hidrólise ácida. Porém, o interesse por essas estruturas cristalinas somente ganhou força com a abordagem nas publicações de Revol e seus colaboradores (1992) dos biofilmes produzidos após a secagem dos nanocristais em suspensão, preservando a ordenação nemática quiral. Estudos recentes têm focado na hidrólise enzimática seguida de ultrasonicação para produzir nanoceluloses, como alternativa ao uso de reagentes químicos corrosivos e incompatíveis ambientalmente (PAAKKO et al., 2007; FILSON et al., 2009; TANG et al., 2015).

A nanocelulose é definida como materiais celulósicos que possuem pelo menos uma de suas dimensões na escala nanométrica (KHALIL et al., 2014) (Figura 11).

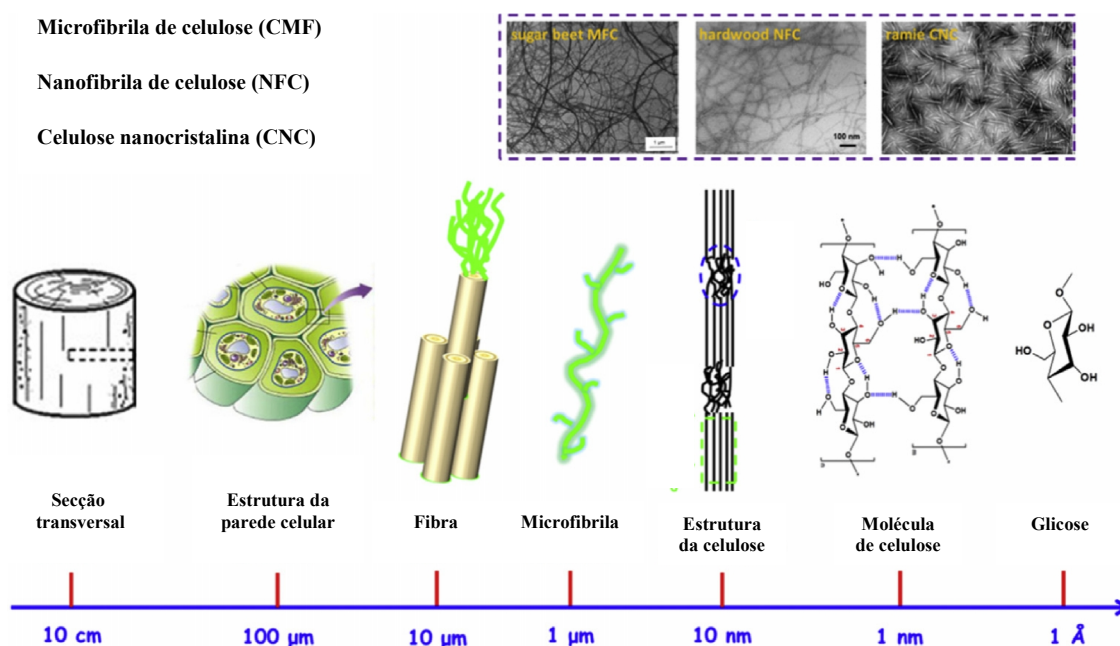


Figura 11. Estrutura hierárquica da celulose. Fonte: Adaptado de Lin e Dufresne (2014).

A celulose pode ser convertida em diferentes nanoestruturas de acordo com o método de tratamento aplicado e a fonte de origem da celulose (KLEMM et al., 2011; CAMPOS et al., 2013) (Tabela 2).

Tabela 2. Características dos modelos de nanocelulose.

Famílias	Sinônimos	Fonte	Formação	Dimensão
Microfibrila de celulose (CMF)	Nanofibrila de celulose (NFC), celulose nanofibrilar (CNF), microfibrila	Madeira, linho, cana-de-açúcar	Pressão mecânica e/ou tratamento químico; tratamento enzimático	D = 5-60 nm C = vários μm
Celulose nanocristalina (CNC)	nanocristais de celulose (NCC), <i>whiskers</i>	Madeira, algodão, linho, Avicel, tunicato, celulose de alga e bactéria	Hidrólise ácida (H_2SO_4); tratamento enzimático	D = 5-70 nm C = 100-250 nm (planta) C = 100- vários μm (tunicato, alga e bactéria)
Nanocelulose bacteriana (BNC)	Celulose bacteriana, biocelulose	Açúcares de baixo peso molecular e alcoóis	Síntese bacteriana (<i>Acetobacter sp</i>)	D = 20-100 nm Diversas redes

Fonte: Adaptado de Klemm et al. (2011). D = diâmetro. C = comprimento.

As celulosas microfibriladas consistem em nanofibras longas e flexíveis, com aproximadamente 20 a 100 nm de largura e vários micrometros de comprimento, contendo as regiões amorfas e cristalinas alternadas (TINGAU et al., 2012; BRINCHI et al., 2013). Estas nanofibras podem ser isoladas utilizando processos mecânicos, como alta pressão e moagem (HABIBI et al., 2006). Frequentemente, as CMFs são obtidas como uma suspensão aquosa de alta viscosidade, que podem exibir um comportamento do tipo gel (DUFRESNE, 2013).

A celulose nanocristalina (CNC) apresenta espessura entre 5 e 70 nm e comprimento de 100 nm até 2 μm , dependendo da origem da fonte de celulose (HABIBI et al., 2010). A principal característica dos nanocristais de celulose é o alto índice de cristalinidade (54-88%) (MOON et al., 2011), obtido após a hidrólise da biomassa com H_2SO_4 concentrado e posterior sonicação. Este tratamento remove as regiões amorfas da celulose e preserva as regiões cristalinas, resistentes ao ataque do ácido (HABIBI et al., 2010; TINGAU et al., 2012). No entanto, para diminuir os gastos de energia e toxicidade desses processos, tratamentos enzimáticos são estudados, onde os principais parâmetros utilizados neste processo são descritos na tabela 3.

Comparando-se a CMF e CNC, é evidente que a estrutura da CNC, haste alongada e cristalina, tem um limite menor de flexibilidade em comparação com a CMF, devido à ausência das regiões amorfas (BRINCHI et al., 2013). Porém, os nanocristais possuem um alto índice de cristalinidade e maior rigidez.

Tabela 3. Metodologias de obtenção de nanocelulose via hidrólise enzimática.

Ref.	m/v	Temp.	Rotação	Tampão	Celulase	Quantidade	Tempo	Biomassa	Inativação da enzima
	%	°C	rpm				h		
(1)	0.8 (2g/250 mL)	50	200	-	Celluclast 1.5 L FG (CE) (Novozyme)	84 EGU (2 mL)	24; 36	Papelão ondulado	Adição de 10% de etanol
(2)	2 (40g/ 2L)	50	-(9)	-	Novozyme 476 (endo)	0.1 mL	2	Polpa de madeira comercial	-
(3)	5 (5g/100 mL)	50	90	Citrato de sódio 0.05 N, pH 4.8	Cellic CTec 2 (CE) e Cellic HTec 2 (endoxilanase) (Novozyme)	0.2 mL CTec 2 + 0.1 mL HTec2	72	Maple	-
(4)	2 (20g/L)	50	150	Citrato de sódio 50 mM, pH 4.8	Viscozyme L (V) (Multicomponente) e FiberCareR (F) (endo) (Novozyme)	10 FBG/g (V) 33 ECU/g (F)	72	Curauá	100 °C por 10 min
(5)	10 (10g/ 100 mL)	50	-	Acetato de sódio pH 4.8	Novozyme 476 (endo); Genencor multifect B (CE)	10 FPU/ g celulose; 5 FPU/ g celulose	48	Eucalipto	-
(6)	5	50	-	-	Cclast (Novozymes) (endo); Eco (AB Enzymes) (exo)	1 wt%	2	Sisal	100 °C por 10 min
(7)	0,8 (0,2 g/ 25 ml)	50	-	Fosfato de sódio 1 M, pH 6.8	Celluclast 1.5 L FG (CE) (Novozyme)	84 EGU	1	Resíduo de polpa de madeira comercial	Adição de 10% de etanol
(8)	1	50	150	Acetato 0.1 mol/L pH 5.0	N342 (CE); N476 (endo); N613 (endo) (Novozyme)	5 FPU/ grama de celulose	24	Cana	-

Ref. = Referência. m/v = Massa/Volume. Temp. = Temperatura. (1) Tang et al. (2015). (2) Sacui et al. (2014). (3) Song et al. (2014). (4) Campos et al. (2013). (5) Zhu et al. (2011). (6) Siqueira et al. (2010). (7) Filson et al. (2009). (8) Liu et al. (2009). (9) Dados não fornecidos pelo autor.

As propriedades das nanoceluloses (CMF e CNC), como elevada relação de aspecto (comprimento/ diâmetro), elevada área de superfície específica, baixa densidade, alta rigidez e resistência mecânica (SALAS et al., 2014), estabilidade térmica, transparência, atenuação dos defeitos na escala nano (BRINCHI et al., 2013), biocompatibilidade, biodegradabilidade e não toxicidade, são atrativos para uma ampla gama de potenciais aplicações (LIN; DUFRESNE, 2014). O aumento da área superficial específica favorece as ligações entre as nanofibrilas e resulta em um material mais denso e transparente (JONOBI et al., 2009; VIANA, 2013).

As nanofibras de celulose, assim como macro e microfibras, são utilizadas como agente de reforço em materiais compósitos, podendo ser incorporadas em diferentes matrizes (SOUZA et al., 2010). O alto valor da relação de aspecto das nanofibras sustenta a transferência da tensão mecânica, uniformemente, da matriz para a fase de reforço (KLEMM et al., 2011). Floros e colaboradores (2012) utilizando apenas 0,5 % de nanocelulose em matriz de poliuretano observaram um aumento da resistência do nanocompósito. Além dos materiais nanocompósitos, como baterias, biofilmes de embalagens de alimentos e sensores eletrônicos (ISOGAI et al., 2011; MOON et al., 2011; ZHENG et al., 2015), as nanoceluloses podem ser utilizadas como hidrogéis em formulações cosméticas (SPOLJARIC et al., 2014) e liberação de agroquímicos. A nanocelulose também pode ser utilizada para encapsulamento e controle da liberação de fármacos (MOON et al., 2011). Estudos têm sido intensificados na área biomédica com o emprego da nanocelulose na engenharia de tecidos como substituto dos vasos sanguíneos e tecidos moles, reparação de ossos e pele (LIN; DUFRESNE, 2014), além da confecção de membranas semelhantes aos filtros sintéticos antimicrobianos (METREVELI et al., 2014).

2.6. Etanol de celulose

No Brasil, o álcool etílico (C_2H_5OH) é obtido, principalmente, via fermentação, tanto o etanol de primeira geração, a partir da sacarose de cana-de-açúcar, quanto o de segunda geração (PEREIRA Jr. et al., 2008). O microorganismo mais utilizado na fermentação alcoólica é a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (SÁNCHEZ; CARDONA, 2008). A fermentação alcoólica tem início com a glicólise, pela qual a molécula de glicose é oxidada a duas moléculas de piruvato, em duas etapas. Na primeira etapa, são consumidas duas

moléculas de ATP durante a fosforilação da glicose em dois compostos: gliceraldeído 3-fosfato (GP) e diidroxiacetona fosfato (DHAP), que é imediatamente convertida em GP. Na segunda etapa, as duas moléculas de GP são oxidadas em duas moléculas de piruvato. Nessas reações, duas moléculas de NAD^+ (nicotinamida adenina dinucleotídio) são reduzidas a NADH e quatro moléculas de ATP são formadas. Após a glicólise, as duas moléculas de piruvato são convertidas em duas moléculas de acetaldeído e duas moléculas de CO_2 . As moléculas de acetaldeído são reduzidas por duas moléculas de NADH para formar duas moléculas de etanol, o produto final da fermentação (TORTORA et al., 2005; NELSON; COX, 2011).

O rendimento da fermentação é estimado em 95% de etanol (OSUNKOYA; OKWUDINKA, 2011). No entanto, em condições industriais, onde fatores como pH, temperatura e contaminação microbiológica podem afetar a levedura, o rendimento, normalmente, é de 90% (GUTIERREZ et al., 1991; ALVEZ, 1994).

Os biocombustíveis podem ser classificados de acordo com suas tecnologias de produção em primeira geração, segunda, terceira e quarta geração. Biocombustíveis de primeira geração utilizam a matéria vegetal produzida pelas culturas agrícolas, como o açúcar, amido e óleos vegetais, utilizando a tecnologia convencional. A produção de etanol de primeira geração é caracterizada por mercados comerciais maduros e tecnologias bem compreendidas, como o etanol de cana produzido no Brasil e o etanol de milho produzido nos EUA, (THAMSIRIROJ; MURPHY, 2009; DEMIRBAS, 2009). Biocombustíveis de segunda geração são fabricados a partir de lignocelulósicos, incluindo a palha de cereais e de cana, resíduos florestais e o bagaço, utilizando tecnologia avançada. Os combustíveis das algas são considerados os biocombustíveis de terceira geração. A quarta geração de combustíveis baseia-se na conversão de óleos vegetais e biodiesel em biogasolina (DEMIRBAS, M. F., 2009).

A indústria do etanol busca alternativas para aumentar a produção do combustível e torná-la mais limpa. Uma delas é o etanol de celulose, também conhecido como etanol lignocelulósico ou de 2ª geração, que é produzido pela hidrólise da biomassa celulósica, com geração de açúcares fermentescíveis, que podem ser fermentados para produzir o etanol (WYK, 2001; OGEDA; PETRI, 2010). A hidrólise da biomassa pode ser realizada com ácidos

ou enzimas. Entretanto, a hidrólise enzimática vem sendo amplamente estudada, uma vez que produz melhor rendimento de açúcar sem os produtos inibidores da fermentação gerados durante a hidrólise ácida (RIVERA et al., 2010; MARTÍN et al., 2012; WANDERLEY et al., 2013).

A produção de biocombustíveis utiliza 65% do óleo vegetal produzido na União Européia (UE), 50% da cana-de-açúcar brasileira e 40% do milho americano (OECD-FAO, 2012). No entanto, existe uma preocupação da concorrência dessas culturas destinadas para produção de combustíveis com a produção de alimentos (ESCOBAR et al., 2009). Assim, os materiais lignocelulósicos ganharam destaque como matéria-prima promissora para produção de biocombustíveis (TILMAN et al., 2009; KARLRSSON et al., 2014).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Obtenção da polpa de celulose

Os pré-tratamentos químicos das fibras de caroá⁽¹⁾ realizados para avaliação do processo mais eficiente na obtenção da polpa de celulose estão descritos a seguir:

✓ **Pré-tratamento A**

O pré-tratamento A foi estabelecido conforme metodologia descrita por ROCHA et al. 2012. Dessa forma, fibras de caroá com $\pm 5\%$ de umidade, foram pré-tratadas em banho hidrotérmico (que é capaz de solubilizar a hemicelulose, facilitando o acesso das enzimas à estrutura da celulose) nas temperaturas de 160, 170 e 180 °C. Para tal, a biomassa foi cortada ($\sim 0,8$ mm) para aumentar a área de superfície do material que foi colocado no reator (ampola) com capacidade para 100 mL, na proporção 1:10 m/v em banho hidrotérmico nas temperaturas selecionadas, por 10 minutos. Os materiais foram lavados exaustivamente até a total remoção dos açúcares hidrolisados. Após a análise de caracterização química, o material proveniente do pré-tratamento 160 °C (PT 160 °C) foi selecionado para a deslignificação por hidrólise alcalina. Este material foi solubilizado em hidróxido de sódio (NaOH) a 1%, utilizando autoclave a pressão de 0,152 MPa (1,5 atm) por 1 h a 120 °C. O material deslignificado (DL) obtido foi lavado com água fervente até retornar ao pH neutro. Amostras para análise de composição química foram coletadas.

✓ **Pré-tratamento B**

No pré-tratamento B a fibra de caroá cortada ($\sim 0,8$ mm) foi dispersa em meio aquoso com 50% de etanol, em um processo conhecido como organossolve (ORG) (VASCONCELOS et al., 2009; ZHAO et al., 2009). O material foi colocado em reator (ampola) na proporção

⁽¹⁾ As fibras das folhas de Caroá utilizadas como matéria-prima foram gentilmente cedidas pela Associação de Desenvolvimento Sustentável e Solidário da Região Sisaleira (APAEB), localizada em Valente, Bahia.

1:100 m/v, sob a temperatura de 180 °C por 1 h e lavado com água quente. Posteriormente, amostras foram coletadas para análise da composição química.

3.2. Caracterização química

A análise da composição química do caroá in natura e dos materiais pré-tratados foi realizada para quantificar o teor de celulose, hemicelulose e lignina. A remoção de extrativos é uma etapa fundamental para caracterização química de materiais lignocelulósicos in natura, para evitar que componentes presentes nos extrativos interfiram nas análises subsequentes, gerando resultados superestimados (GOUVEIA et al., 2009). Assim, amostras de caroá in natura foram tratadas com etanol e água para determinação do teor de extrativos. O teor de lignina foi determinado após a hidrólise do material lignocelulósico com ácido sulfúrico 72% v/v (TAPPI T 222 om-06). O teor de cinzas foi calculado segundo a norma TAPPI T 211 om-85. A lignina insolúvel foi determinada por diferença de massa das cinzas após a incineração em mufla. A celulose foi obtida pela degradação da biomassa em ácido peracético de acordo com a metodologia de Garbutt (WRIGHT; WALLIS, 1998). No caso da fração de hemicelulose, esta foi calculada por diferença de 100% da soma dos teores de extrativos, cinzas, lignina e celulose. As amostras foram analisadas em duplicata.

3.3. Difração de raios-X (DRX)

A determinação do grau de cristalinidade possibilita uma compreensão melhor das alterações que ocorrem na estrutura do material celulósico, tanto na região cristalina quanto na região amorfa. Os índices de cristalinidade das fibras foram calculados de acordo com o método empírico de Segal et al. (1962), utilizando a equação (1) descrita abaixo:

$$I_c = \frac{I_{(0\ 0\ 2)} - I_{(a\ 0\ 0)}}{I_{(0\ 0\ 2)}} \times 100 \text{ (equação 1)}$$

I_c = índice de cristalinidade (%);

$I_{(002)}$ = pico de intensidade da difração que representa o material cristalino ($2\theta \sim 22^\circ$); e,

$I_{(am)}$ = pico de intensidade da difração que representa o material amorfo ($2\theta \sim 18^\circ$).

A cristalinidade das amostras lignocelulósicas foi determinada utilizando um difratômetro de raios-X (modelo Apex II - Bruker), com fonte de radiação $\text{CuK}\alpha$, no Instituto de Física de São Carlos da USP. Os difratogramas foram obtidos no intervalo 2θ de 5 a 80° com passo de $0,02^\circ$.

3.4. Termogravimetria (TGA/DTG)

As análises termogravimétricas foram realizadas utilizando um Simultaneous Thermal Analysis - STA 409 NETZSCH. As amostras de caroá in natura, PT 160°C e DL foram aquecidas de 30 até 700°C a uma taxa de aquecimento de $20^\circ\text{C min}^{-1}$ sob uma atmosfera de ar sintético, a uma taxa de fluxo de 10 mL min^{-1} . Aproximadamente, 10 mg de cada amostra foram utilizadas para cada análise termogravimétrica.

3.5. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As superfícies da fibra de caroá in natura, PT 160°C e DL foram examinadas por MEV (Quanta 200 - FEI). As amostras foram, previamente, revestidas com uma camada fina de ouro por pulverização catódica para evitar a formação de carga eletrostática durante as análises de microscopia.

3.6. Preparação da nanocelulose

A polpa de celulose obtida do pré-tratamento de banho hidrotérmico a 160°C e deslignificação com NaOH 1% das fibras de caroá foi utilizada para hidrólise enzimática. A celulase utilizada, com atividade endo-1,4- β -D-glucanase, foi obtida da Megazyme: E-CELTm (*Thermotoga marítima*).

3.6.1. Hidrólise enzimática

As reações de hidrólise foram realizadas a 2% m/v de polpa (250 mg) dispersa em 12,5 mL de tampão citrato ($0,05\text{ mol L}^{-1}$; pH 4,8) em tubos Falcon de 50 mL. Os frascos, tampão e

a polpa celulósica foram previamente esterilizados em autoclave a 120 °C por 20 min. Após resfriamento, a enzima endoglucanase, na carga de 105 U/ 250 mg de polpa (equivalente a 84 EGU/ 200 mg de substrato de acordo com FILSON et al. 2009), foi adicionada ao sistema, sendo mantida em uma câmara incubadora a 40 °C e 200 rpm por dois períodos (2 e 10 h). O rendimento, de aproximadamente 10%, foi calculado como a porcentagem da proporção entre a massa seca de polpa de celulose à massa seca de polpa hidrolisada. As informações da enzima fornecida pelo fabricante (Megazyme) e as principais condições selecionadas para hidrólise da polpa de caroá estão apresentadas na tabela 4.

Tabela 4. Condições de hidrólise enzimática.

Endoglucanase	Quantidade de enzima ⁽¹⁾	Temperatura	pH	Tempo
	μL	°C		h
E-CELT TM	210	40	4,8	2 e 10

⁽¹⁾ Quantidade de enzima equivalente a 105 U.

3.6.2. Inativação das enzimas

As reações de hidrólise enzimática foram interrompidas no tempo pretendido por meio da inativação das enzimas. Dois processos de inativação foram testados: adição de etanol (20% do volume da amostra) (FILSON et al., 2009; TANG et al., 2015) e aquecimento da amostra a 100 °C por 5 min (SIQUEIRA et al., 2010; CAMPOS et al., 2013). Após a inativação, as amostras foram centrifugadas a 9.200 rpm por 10 min para lavagem e o sobrenadante foi descartado. Este procedimento foi realizado duas vezes.

3.6.3. Sonicação (tratamento ultrasônico)

Após lavagem, as amostras foram dispersas em 5 mL de água destilada utilizando um sonicador (Unitec), com microponteira de 3 mm. O sonicador (500 W) foi operado a 20% de amplitude por 5 min (10s de pulso, 30s de repouso). As amostras foram filtradas em membranas de PVDF de 0,45 μm (modelo Millex-HV/ Millipore) e novamente sonicadas (CAMPOS et al., 2013).

3.7. Microscopia de força atômica (AFM)

As imagens de microscopia de força atômica (AFM, do inglês *atomic force microscopy*) foram obtidas em microscópio modelo SOLVER Nano da NT-MDT. Foram depositados sobre um substrato de mica 200 μL de suspensão aquosa de CNC 0,01%. A secagem da amostra foi à temperatura ambiente. As análises de AFM foram realizadas no modo contato intermitente (“tapping”) com ponta de nitreto de silício com raio nominal de 10 nm e constante elástica de aproximadamente $0,03 \text{ N m}^{-1}$. As análises foram realizadas em umidade relativa do ar de 40%, como proposto por Thundat et al. (1993) para minimizar a interferência da força de capilaridade. As dimensões dos nanocristais foram estimadas com a utilização do software Nova PX-3.2.5-NT-MDT.

3.8. Aproveitamento do resíduo da hidrólise

O complexo enzimático Accellerase 1.500 (Genencor), composto de exoglucanases, endoglucanases, hemicelulases e β -glicosidases, foi utilizado para a hidrólise do material residual filtrado do processo de obtenção da nanocelulose. As reações foram realizadas em tubos falcon de 50 mL com tampão citrato ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$; pH 4,8). Os frascos, tampão e a polpa celulósica foram previamente esterilizados em autoclave a 120°C por 20 min. Após resfriamento, foi adicionado o complexo enzimático ($0,25 \text{ mL g}^{-1}$ de substrato) ao sistema, sendo mantido em uma câmara incubadora a 50°C com agitação orbital durante 24, 48 e 72 h. Alíquotas foram retiradas para determinação dos açúcares redutores totais (ART) pelo método de Miller (1959).

3.8.1. Fermentação alcoólica

O teste de fermentação alcoólica do hidrolisado enzimático utilizou a levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae*. O inóculo foi preparado com a transferência de 7 g L^{-1} de levedura em frasco schott de 250 mL contendo 50 mL de meio líquido com 20 g L^{-1} de glicose e 4 g L^{-1} de extrato de levedura, em pH 7, acondicionado por 17 horas a 30°C e 110 rpm (WANDERLEY et al., 2013; IDREES et al., 2014).

Os meios de fermentação à base de hidrolisado enzimático, foram suplementados com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (2 g L⁻¹), K_2HPO_4 (2 g L⁻¹), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,75 g L⁻¹) e extrato de levedura (4 g L⁻¹), ajustando-se o pH para 5,0. Um volume de 1,25 mL do inóculo (proporção de 1:10) foi transferido para os tubos Falcon contendo 12,5 mL do meio de fermentação à base do hidrolisado enzimático. Os frascos foram mantidos a 30 °C e 150 rpm por 48 horas.

3.9. Rendimento de etanol

O método teórico para calcular o rendimento teórico de etanol consiste em determinar os rendimentos para a conversão de açúcares C6 a etanol com base na equação de Gay-Lussac (2) para fermentação (LAVASACK, 2003).

Reação:	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \rightarrow 2 \text{C}_2\text{H}_5\text{OH} + 2 \text{CO}_2$		
Massa molar	180	92	88
Balanco de massa (%)	100	51,14	48,86

(equação 2)

Assim, o rendimento de etanol do material fermentado foi comparado com o teórico (0,51 g de etanol/ g de glicose).

O método analítico para calcular o rendimento de etanol da amostra foi obtido pelo método da destilação com uso de densímetro digital (modelo KEM DA-310 da Mettler) e tabela de conversão densidade/teor alcoólico. A amostra fermentada foi previamente filtrada em membrana de PVDF de 0,45 µm (modelo Millex-HV/ Millipore).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização química

4.1.1 Material in natura

A fibra de caroá in natura foi caracterizada quimicamente para obtenção dos valores percentuais de celulose, hemicelulose, lignina, cinzas e extrativos totais.

O teor percentual de celulose e extrativos (resinas, óleos, ceras, gorduras e substâncias fenólicas) das fibras de folhas de caroá in natura é semelhante ao observado nas fibras de curauá (*Ananas erectifolius*), espécie pertencente também à família Bromeliaceae (tabela 5). O teor de lignina do caroá mostrou-se superior ao da espécie de curauá, ao passo que o teor de hemicelulose é menor. A composição química do caroá comparada ao bagaço de cana-de-açúcar, que vem sendo utilizado industrialmente para produção de etanol celulósico, mostrou um aumento de 20,4 % de celulose e redução da metade do teor de lignina.

Tabela 5. Comparação da composição química das fibras de caroá com curauá e bagaço.

Fibra in natura	Celulose	Hemicelulose	Lignina	Extrativos
Caroá	63,5	19,8	10,3	5,3
Curauá (*)	66,4	26,1	6,5	5,3
Bagaço de cana-de-açúcar (**)	43,1	25,2	22,9	4,3

(*) Marques et al. (2007). (**) Rocha et al. (2012).

Com base no teor de celulose, essas comparações mostram que o caroá é uma fibra que pode ser estudada para obtenção de nanocelulose assim como as fibras de curauá e bagaço de cana-de-açúcar (CAMPOS et al., 2013), além de serem usados para produzir o etanol de segunda geração como o bagaço de cana (SILVA et al., 2011).

4.1.2 Materiais pré-tratados

O pré-tratamento hidrotérmico seguido de deslignificação com hidróxido de sódio e o processamento organossolve foram realizados. As condições de pré-tratamento foram

otimizadas baseadas no rendimento de celulose das fibras de caroá e na eficiência da remoção de lignina e hemicelulose, com o intuito da realização de uma hidrólise enzimática eficaz (HU et al., 2015).

Com base na caracterização química das amostras lignocelulósicas de caroá in natura e pré-tratadas, pôde-se notar aumento do teor de celulose e redução dos teores de hemicelulose, lignina e cinzas após pré-tratamento hidrotérmico seguido de deslignificação com hidróxido de sódio e também do processo organossolve (Tabela 6).

Após pré-tratamento hidrotérmico (PT) da biomassa de caroá a 160, 170 e 180 °C, o teor de hemicelulose diminuiu de 21% para 19, 18,1 e 17,5%, respectivamente (Tabela 6), o que corresponde a uma perda de aproximadamente 10, 14 e 17% em relação ao teor de hemicelulose do caroá in natura. As concentrações de celulose aumentaram de 63,5 % para 69,4, 70,7 e 72,4%. Praticamente a quantidade de lignina não foi alterada. O bagaço de cana-de-açúcar tratado em banho hidrotérmico a 185°C durante 10 minutos por Silva et al. (2012) teve uma diminuição do teor de hemicelulose de aproximadamente 40% em relação ao bagaço in natura, ao passo que o teor de celulose foi elevado de 43% para 59% e a lignina aumentou em torno de 3%. A lignina pode adsorver as enzimas hidrolíticas competindo com as fibras de celulose pelos sítios de ligação catalíticos (BERLIN et al., 2005; ZHENG et al., 2013; KO et al., 2015). Sendo assim, uma deslignificação alcalina (NaOH) foi realizada como o segundo passo do pré-tratamento das fibras de caroá.

O processo de pré-tratamento determina o rendimento da biomassa (VIDAL; HORA, 2014), ao longo dos tratamentos hidrotérmicos ocorreu perda de massa do material bruto devido à extração de hemicelulose. Para a amostra de PT 160 °C o rendimento foi de aproximadamente 85 %, já as amostra de PT 170 °C e PT 180 °C apresentaram 80 e 70 % de rendimento em massa seca.

Os valores percentuais de lignina e hemicelulose nos materiais pré tratados a diferentes temperaturas se mostraram similares dentro da análise de erros, sendo assim a melhor condição de pré tratamento hidrotérmico foi selecionada baseada no rendimento de massa seca. Desta forma o material selecionado para deslignificação foi o PT 160 °C.

Após a deslignificação do material pré-tratado a 160 °C, o rendimento de polpa celulósica obtida foi de 68% com um teor de celulose de 77,5%. Para o material deslignificado (DL), observou-se que o teor de lignina reduziu de 10,3 para 7,0% e o teor de hemicelulose

diminuiu de 21 para 14,8%. Outros autores também verificaram que o pré-tratamento alcalino diminui o teor de lignina de 39,5 para 20% em madeira (KUMAR et al., 2009) e o teor de hemicelulose de 8 para 6,4% em bagaço de cana-de-açúcar (MARTÍN et al., 2012). O tratamento alcalino é capaz de romper a estrutura da lignina por meio da saponificação da ligação éster intermolecular, que reticula hemicelulose e lignina (MORRISON; STEWART, 1995; SUN; CHENG 2002).

Como resultado do processo organossolve, o teor de lignina reduziu de 10,3 para 7,6% (aproximadamente 26%) e o teor de celulose passou de 63,5 para 77,6 %. No pré-tratamento organossolve de água/etanol a partir do linho (*Cannabis sativa*), a remoção de lignina atingiu 47% após 150 minutos de reação (GÜMÜSKAYA et al., 2007). No entanto, o material do processo organossolve das fibras de caroá apresentou um rendimento de aproximadamente 60% em massa em somente 10 minutos de reação, o que está relacionado com a perda significativa de material celulósico, sendo assim um aumento no tempo de reação com o intuito de aumentar a remoção de lignina, aumentaria ainda mais a perda de celulose.

O teor de cinzas observado para a amostra de caroá in natura foi 1,1%, sendo que após os tratamentos das fibras de caroá esse valor foi reduzido para menos de 1%. Normalmente, a madeira tem um baixo teor de cinzas (minerais/ óxido), menor ou equivalente a 1% (CHEN, 2014). O mesmo padrão do teor de cinzas pode ser observado para as amostras de caroá.

Tabela 6. Caracterização química das amostras lignocelulósicas de caroá.

Amostra	Celulose	Hemicelulose	Lignina	Cinzas	Extrativos
	%				
In natura	63,5 ± 2,3	19,8	10,3 ± 0,6	1,1 ± 0,1	5,3 ± 0,1
PT 160°C	69,4 ± 1,4	19,0	11,2 ± 1,1	0,4 ± 0,1	-(¹)
PT 170 °C	70,7 ± 2,1	18,1	10,9 ± 1,1	0,3 ± 0,1	-
PT 180 °C	72,4 ± 0,1	17,5	9,8 ± 1,9	0,3 ± 0,1	-
DL	77,5 ± 0,7	14,8	7,0 ± 0,1	0,7 ± 0,1	-
ORG	77,6 ± 0,9	14,6	7,6 ± 1,1	0,2 ± 0,1	-

PT = Pré-tratamento de banho hidrotérmico. DL = Pré-tratamento de banho hidrotérmico a 160 °C e deslignificação com NaOH 1%. ORG = Organossolve. (¹) Remoção de extrativos não realizada para amostras processadas.

Além das informações mostradas acima acerca da composição química dos materiais in natura e pré-tratados, bem como os seus valores de rendimento, foram observadas mudanças

na coloração dos materiais. O pré-tratamento hidrotérmico a 160 °C manteve a coloração da fibra in natura, sendo observado um branqueamento após a deslignificação (Figura 12). Já para o pré-tratamento hidrotérmico a 180 °C e para o pré-tratamento por organossolve, notou-se uma coloração mais escura das fibras, o que pode estar relacionado com a caramelização dos açúcares em temperaturas elevadas.

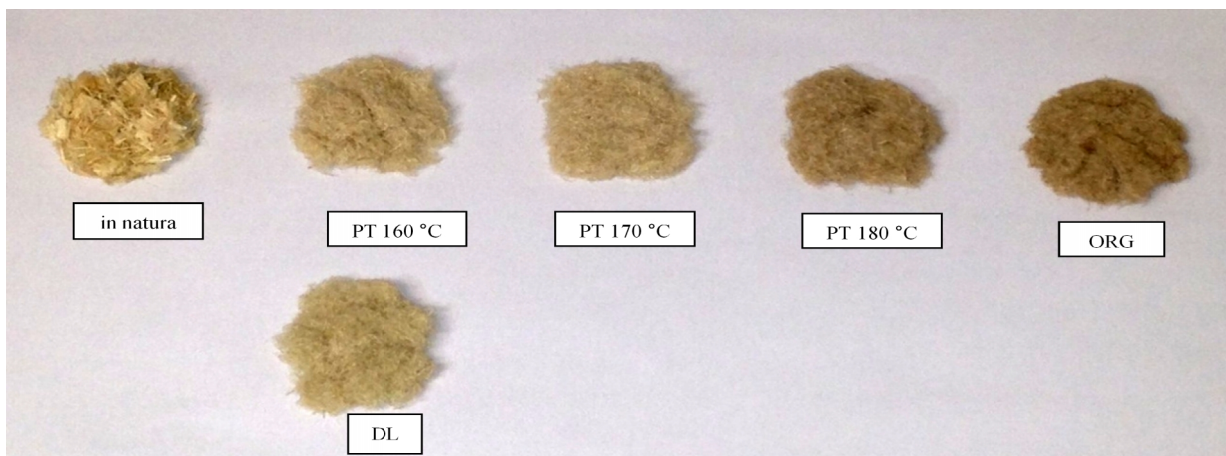


Figura 12. Amostras de fibras de plantas de caroá in natura e após alguns pré-tratamentos.

4.2. Difração de raios-X (DRX)

O índice de cristalinidade (I_C) da celulose das amostras de caroá in natura e pré-tratadas foi medido por DRX. A cristalinidade afeta a hidrólise enzimática de lignocelulósicos, uma vez que a parte amorfa da celulose é digerida com mais facilidade pelas celulasas do que a parte cristalina (ZHAO et al., 2008).

Os difratogramas da biomassa de caroá in natura, após os pré-tratamentos (PT) a 160, 170 e 180 °C, organossolve (ORG) e material deslignificado com NaOH 1% (DL), podem ser observados nas Figuras 13 e 14.

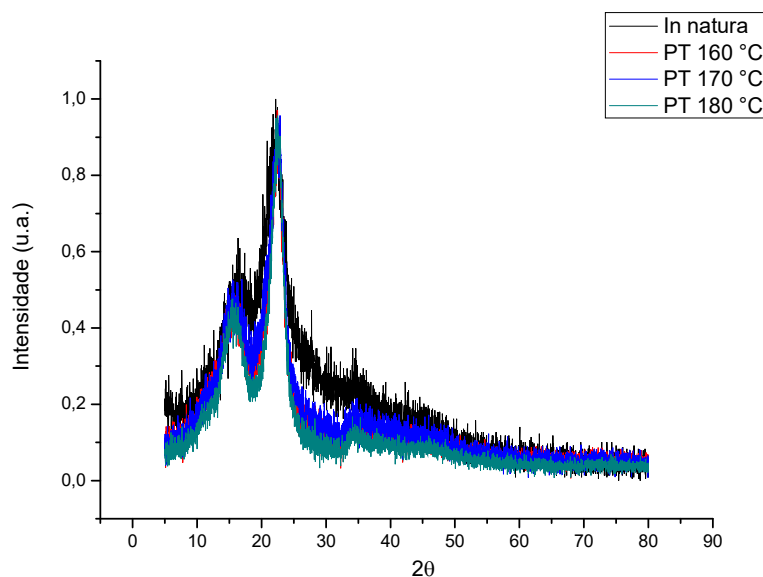


Figura 13. Perfil de difração de raios-X dos pré-tratamentos hidrotérmicos das fibras de caroá. – as intensidades máximas foram normalizadas a 1. PT = Pré-tratamento de banho hidrotérmico.

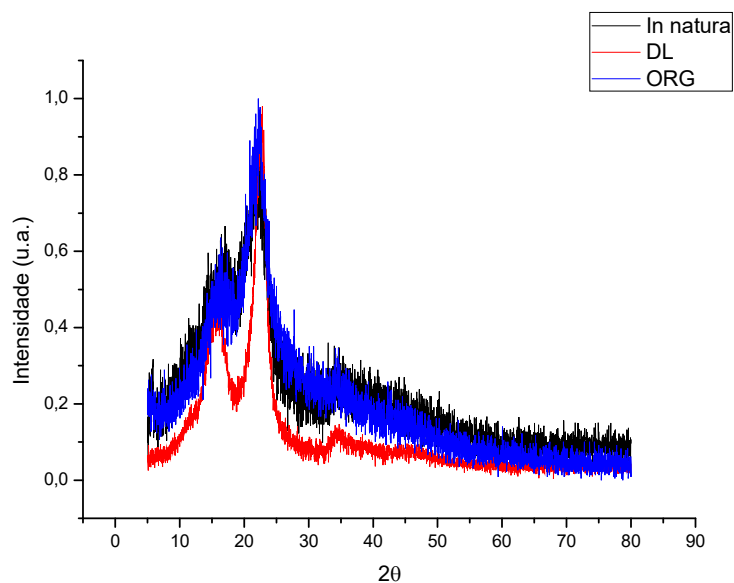


Figura 14. Perfil de difração de raios-X dos processos de deslignificação das fibras de caroá – as intensidades máximas foram normalizadas a 1. DL = Pré-tratamento de banho hidrotérmico a 160 °C e deslignificação com NaOH 1%. ORG = Organossolve.

Em um difratograma de raios-X de celulose, a intensidade do vale amorfo, encontra-se entre $18^\circ \leq 2\theta \leq 19^\circ$ para celulose tipo I e entre $13^\circ \leq 2\theta \leq 15^\circ$ para celulose tipo II. A intensidade do pico máximo (I_{002}), o qual corresponde a fração cristalina, encontra-se entre $22^\circ \leq 2\theta \leq 23^\circ$ para celulose tipo I e entre $18^\circ \leq 2\theta \leq 22^\circ$ para celulose tipo II (TAGLIAFERRO et al., 2005; PARK et al., 2010). Nesse sentido, notou-se que o caroá in natura e os materiais pré-tratados, apresentaram um difratograma típico de celulose tipo I. Em Corrêa et al. (2010), as fibras de curaua deslignificadas com 5% de NaOH também mantiveram o polimorfismo original da celulose.

As alterações na estrutura da celulose após tratamentos físico-químico e biológico podem ser descritas pelo índice de cristalinidade (NISIZAWA, 1973; PARK et al., 2010). Dessa forma, o I_C depende da composição química do material. Com base nos resultados obtidos pelos difratogramas (Figuras 13 e 14), o I_C das amostras foi calculado - levando-se em consideração a relação entre a intensidade do pico cristalino ($I_{002} - I_{am}$) e intensidade total (I_{002}), após descontar o sinal de espalhamento “parasita” do equipamento (SEGAL et al., 1962; WANG et al., 2008) - e pode ser verificado na Tabela 7. As medidas obtidas pelo método de Segal e colaboradores (1962) são relativas e permitem comparar as amostras de celulose, mesmo o I_C das amostras não sendo considerado um valor absoluto (PARK et al., 2010).

Tabela 7. Avaliação da difração de raios-X nas amostras de fibras de caroá in natura e pré-tratadas.

Amostra	$I_{(002)}$	$I_{(am)}$	I_C (%)
In natura	0,78	0,50	36,99
PT 160 °C	0,82	0,31	60,98
PT 170 °C	0,84	0,32	61,90
PT 180 °C	0,84	0,23	72,62
DL	0,91	0,19	79,55
ORG	0,88	0,21	75,97

PT = Pré-tratamento de banho hidrotérmico. DL = Pré-tratamento de banho hidrotérmico a 160 °C e deslignificação com NaOH 1%. ORG = Organossolve. $I_{(002)}$ = pico de intensidade da difração que representa o material cristalino ($2\theta \sim 22^\circ$). $I_{(am)}$ = pico de intensidade da difração que representa o material amorfo ($2\theta \sim 18^\circ$). I_C = índice de cristalinidade (%);

A amostra de PT 160 °C apresentou I_C de 60,98% e as amostras de PT 170 e 180 °C apresentaram 61,27 e 72,62%, quase o dobro do valor da cristalinidade das fibras de caroá in natura. Verificou-se que os I_C de todos os pré-tratamentos aumentaram quando comparado

com o material in natura (Figura 15). Este fato está relacionado com a elevação da temperatura utilizada nos pré-tratamentos testados (INOUE et al., 2008). Em seu trabalho, Xiao e colaboradores (2011) demonstraram o aumento da cristalinidade da madeira com a elevação da temperatura em pré-tratamento hidrotérmico. Foram testadas temperaturas entre 100 e 200 °C com intervalo de 20 °C e observou-se um aumento gradativo do I_C , sendo de 41% para a madeira in natura e de 41,7% e 55,5% para os materiais pré-tratados a 100°C e 200 °C, respectivamente.

A amostra de fibras de caroá deslignificadas com NaOH 1% (DL) apresentou o dobro do índice de cristalinidade comparado à amostra in natura, passando de 36,99 para 79,55% (Tabela 7). As fibras de curauá também tratadas com soda apresentaram um aumento no I_C de 64 para 69% (CORRÊA et al., 2010) e o bagaço de cana-de-açúcar tratado com ácido peracético teve o I_C elevado em relação ao bagaço não tratado de 42,62% para 62,98% (ZHAO et al., 2008). Essas informações confirmam que tanto o aumento da temperatura quanto os tratamentos químicos elevam o I_C das amostras lignocelulósicas.

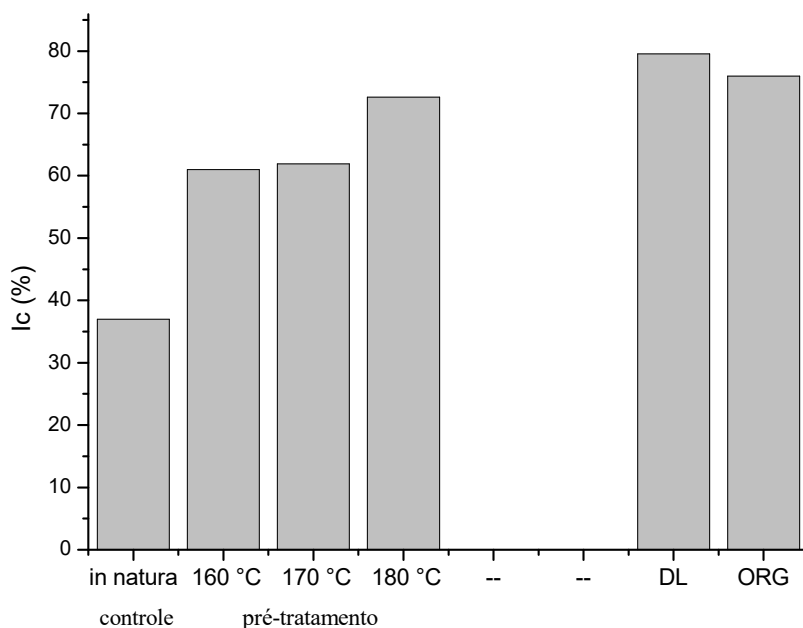


Figura 15. Efeito da temperatura e dos tratamentos no índice de cristalinidade. DL = Pré-tratamento de banho hidrotérmico a 160 °C e deslignificação com NaOH 1%. ORG = Organossolve.

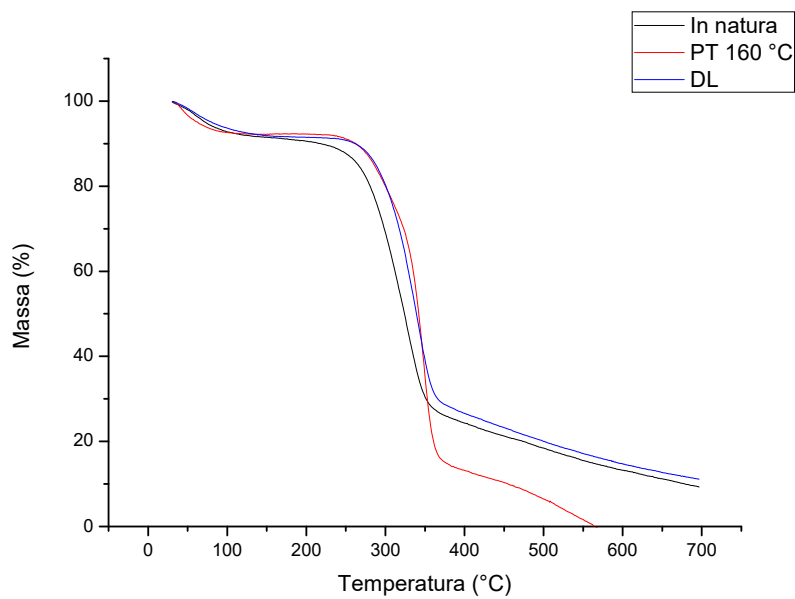
O aumento no grau de cristalinidade das amostras pré-tratadas sugere a remoção da hemicelulose, lignina e da fração amorfa da celulose (ZHAO et al., 2008; LEE et al., 2010; XIAO et al., 2011). Por outro lado, a maior cristalinidade encontrada nesses materiais pode dificultar a hidrólise enzimática, devido à diminuição da absorção de água da celulose (VLASENKO et al., 1997; XIAO et al., 2011; GHAREHKHANI et al., 2015). A remoção de componentes amorfos permite a formação de ligações de hidrogênio entre os grupos OH expostos na superfície da celulose, aumentando a cristalinidade (CORRÊA et al., 2010).

4.3. Termogravimetria (TGA)

Com base nos resultados de rendimento, a amostra pré-tratada 160 °C com posterior deslignificação com NaOH 1% foi selecionada para os experimentos de hidrólise enzimática, sendo assim as mesmas foram caracterizadas por análises termogravimétricas e microscopia eletrônica.

O desempenho termogravimétrico das fibras de caroá in natura, PT 160 °C e DL foram avaliados por meio das análises de TG/DTG em atmosfera oxidante (Figura 16).

(a)



(b)

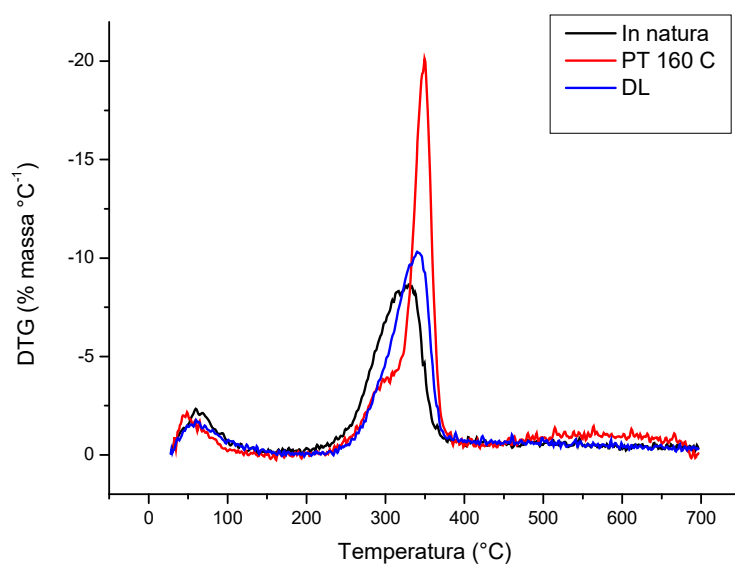


Figura 16. Análises termogravimétricas das amostras de caroá. Termogravimetria - TG (a) e Derivada das curvas termogravimétricas - DTG (b).

Verificou-se que a perda de massa inicial ocorre em temperaturas inferiores a 100 °C, devido à perda de umidade do material, comum às fibras lignocelulósicas (D'ALMEIDA et al., 2008; MONTEIRO et al., 2012).

Nota-se no gráfico da Figura 16 (b) que o primeiro pico está relacionado à perda de umidade. A temperatura de perda da água das fibras de caroá in natura foi 60 °C, já para as amostras de PT 160 °C e DL essa temperatura foi de 45 °C (Tabela 8). Esse fato está relacionado com a cristalinidade do material, que reduz a solubilidade e permeabilidade da água (ALDANA et al., 2014). As amostras de caroá pré-tratadas, que apresentam alto índice de cristalinidade em comparação com a amostra de caroá in natura (Tabela 7—seção 4.2), possuem uma barreira à umidade devido à formação de ligações de hidrogênio inter e intra-molecular dos cristais (SILVA et al., 2009). Portanto, a água dos materiais tratados é mantida na superfície sendo evaporada em temperaturas menores. Além disso, devido ao fato da hemicelulose ser um elemento altamente hidrofílico, a sua remoção faz com que a água fique mais fracamente ligada (GUPTA, 2015).

As fibras permaneceram termicamente estáveis até ≈ 200 °C, com perda de aproximadamente 10% de massa (Tabela 9). A temperatura inicial de decomposição foi 220 °C para fibra de caroá in natura e 248 °C para as amostras de PT 160 °C e DL (Tabela 8). A decomposição da hemicelulose da fibra de caroá pode ser observada entre a temperatura inicial de degradação e o pico máximo de temperatura (Figura 16). Esse resultado corrobora os encontrados por Yang et al. (2007) em que a hemicelulose comercial (Sigma-Aldrich) foi degradada de 220 a 315 °C e Monteiro et al. (2012) que determinaram valores entre 207 e 330 °C para a decomposição da hemicelulose da madeira. A hemicelulose é composta de vários sacarídeos (xilose, manose, glucose, galactose, etc.). Dessa forma, apresenta uma estrutura amorfa e ramificada, sendo facilmente degradada a temperaturas mais baixas (YANG et al., 2007).

Sabe-se que a celulose é constituída por um polímero longo de glicose e sem ramificação, o que torna a estrutura altamente ordenada conferindo uma maior estabilidade térmica à molécula (YANG et al., 2007). Neste estudo, notou-se que para as fibras de caroá in natura, a temperatura máxima de degradação da celulose foi de 316 °C (Tabela 8). Esse resultado é similar ao encontrado para as fibras de curauá, em que o máximo de degradação da celulose está em 310 °C (SANTOS et al., 2007). Já para os materiais pré-tratados, a

temperatura máxima de degradação esteve em torno de 350 °C. Esse aumento da temperatura está relacionado à remoção da hemicelulose e parte amorfa da celulose, o que confere maior estabilidade térmica ao material devido ao predomínio de celulose cristalina (DAS et al., 2010). As regiões cristalinas são impermeáveis a gases, como o oxigênio (WUESTENBERG, 2014), o que dificulta a pirólise do material e explica o aumento da temperatura de degradação para os materiais pré-tratados. A visualização de um pico máximo uniforme em DTG está relacionada com uma degradação térmica mais homogênea das fibras vegetais (D'ALMEIDA et al., 2008). No entanto, na Figura 16 (b), um “ombro” no pico da amostra de fibras de caroá pré-tratadas é observado por volta de 290°C, que pode ser atribuído à degradação térmica de pectina, lignina, hemicelulose e quebra das ligações glicosídicas da celulose (NAIR et al., 1996; TOMCZAK et al., 2007; ARAÚJO et al., 2008).

Por possuir diversos anéis aromáticos com vários ramos, a degradação térmica da lignina, pode ocorrer em uma ampla faixa de temperatura (200-700 °C) (YANG et al., 2007; MONTEIRO et al., 2012). Nesta pesquisa, estima-se que de 15 a 25% dos materiais sofreram degradação térmica após a temperatura de 400 °C (Tabela 9), sendo a maior fração correspondente a lignina de alto peso molecular, completando assim, os estágios de degradação.

Tabela 8. Temperaturas (°C) dos picos do gráfico da termogravimetria derivada (DTG).

Amostra	Perda de H₂O	T_i	T_{max}
In natura	60	220	316
PT 160 °C	45	248	348
DL	45	248	348

PT = Pré-tratamento de banho hidrotérmico. DL = Pré-tratamento de banho hidrotérmico a 160 °C e deslignificação com NaOH 1%. T_i = Temperatura inicial de degradação. T_{max} = Temperatura máxima de degradação.

Tabela 9. Percentual da perda de massa cumulativa das fibras lignocelulósicas analisadas.

Amostra	Temperatura (°C)					
	100	200	300	400	500	600
In natura	7,56	9,31	31,20	75,46	81,59	89
PT 160 °C	7,56	8,03	19,90	86,34	93,46	-
DL	6,72	8,62	20	74,19	84,15	92,4

PT = Pré-tratamento de banho hidrotérmico. DL = Pré-tratamento de banho hidrotérmico a 160 °C e deslignificação com NaOH 1%.

4.4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A análise de MEV das amostras de fibra de caroá in natura, pré-tratada e deslignificada foi utilizada para determinar os efeitos dos pré-tratamentos com imagens detalhadas (resolução de 300 µm) da superfície das fibras. Dessa forma, pôde-se notar que a amostra da fibra de caroá in natura apresentou uma morfologia compacta e íntegra (Figura 17). A região de superfície lisa observada é característica de material de fibra bruta (SPINACÉ et al., 2009; KAUSHIK et al., 2012).

Após o pré-tratamento hidrotérmico a 160 °C foi possível observar a desorganização da fibra. A amostra deslignificada com NaOH 1% apresentou uma superfície mais rugosa e um aumento da porosidade do material com uma maior exposição da superfície da celulose e, portanto, favorece a acessibilidade do substrato na hidrólise enzimática (CORRALES et al., 2012). Resultados semelhantes foram observados para o tratamento alcalino do bagaço de cana-de-açúcar com NaOH 1%, no qual verificou-se a abertura das fibras (MARTÍN et al., 2012). Por meio das micrografias, evidenciou-se também, a eficiência do método selecionado (pré-tratamento de banho hidrotérmico a 160 °C e deslignificação com NaOH 1%). Em síntese, o pré-tratamento contribuiu para a remoção do conteúdo amorfo expondo a molécula de celulose (GEORGE et al., 2015).

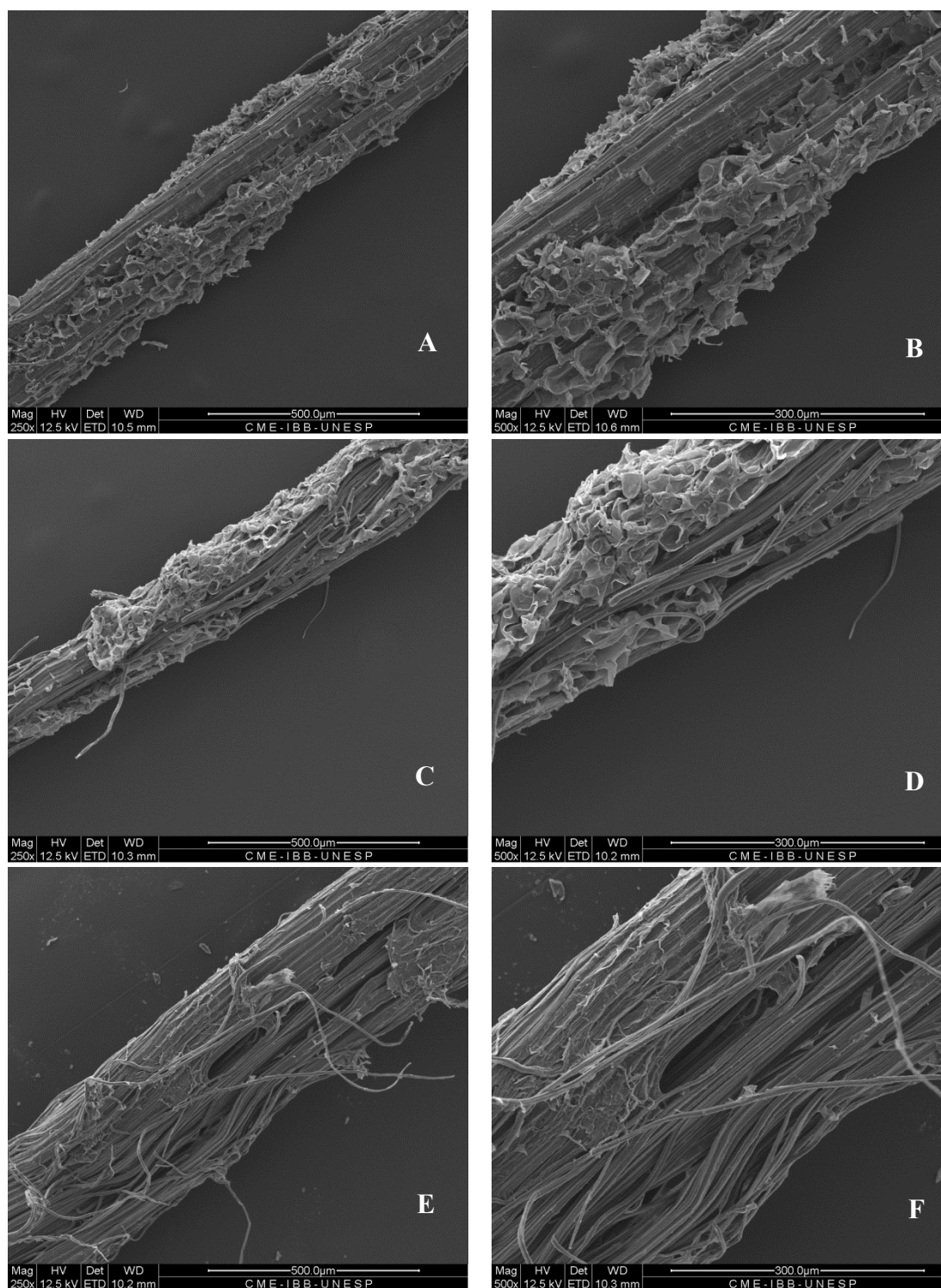


Figura 17. Microscopia eletrônica de varredura de amostras de caroá in natura (A e B); pré-tratadas em banho hidrotérmico à 160 °C - PT (C e D) e deslignificadas DL (E e F). As imagens à esquerda possuem aumento de 250 x e à direita 500 x.

4.5. Hidrólise enzimática com endoglucanase

Levando-se em consideração o cálculo da perda de massa do substrato da hidrólise, pôde-se observar que o rendimento de nanocelulose foi de aproximadamente 10%. Tang et al. (2015) alcançaram um rendimento de 17,3% após o produto da hidrólise ácida ser submetido a tratamento enzimático durante 1 h. Por outro lado, Filson et al. (2009) trabalhando com a hidrólise de polpa reciclada, utilizando endoglucanase, verificaram um elevado rendimento de nanocelulose cristalina (38%).

4.5.1 Efeitos da inativação enzimática

As reações de hidrólise foram interrompidas, tanto pela inativação das enzimas com etanol 20%, quanto com aquecimento a 100 °C. Após a centrifugação e filtragem dessas amostras, imagens de AFM mostraram a remoção das enzimas apenas para o tratamento com 20% de etanol. Após o aquecimento a 100°C, as enzimas perderam suas características solúveis e, portanto, precipitaram com a nanocelulose durante a centrifugação. No entanto, a presença de etanol não alterou a solubilidade das enzimas, o que facilitou a sua remoção.

4.6. Microscopia de força atômica (AFM)

Após a hidrólise enzimática da polpa celulósica com E-CELTTM, foram realizadas medidas de AFM para análise da morfologia da estrutura da nanocelulose. AFM é utilizada para análise de imagens topográficas e medições de força (LAST et al., 2010). Uma sonda presa a um cantilever varre a superfície da amostra. As forças de interação entre a sonda e a amostra defletem o cantilever e as deflexões são detectadas por laser para formar a imagem (MEYER; AMER, 1988; LEITE et al., 2007). Durante a varredura da amostra pela sonda, a altura e a amplitude da imagem fornecem detalhes da topografia e o contraste entre macio e rígido (MANDAL et al., 2011).

Assim, observou-se que as nanopartículas obtidas após o tempo de reação de 2h (Figura 18) evidenciaram nanoestruturas de celulose. Essas estruturas com morfologia em formato agulha foram denominadas nanocristais de celulose ou *whiskers* (KLEMM et al., 2011; CAMPOS et al., 2013).

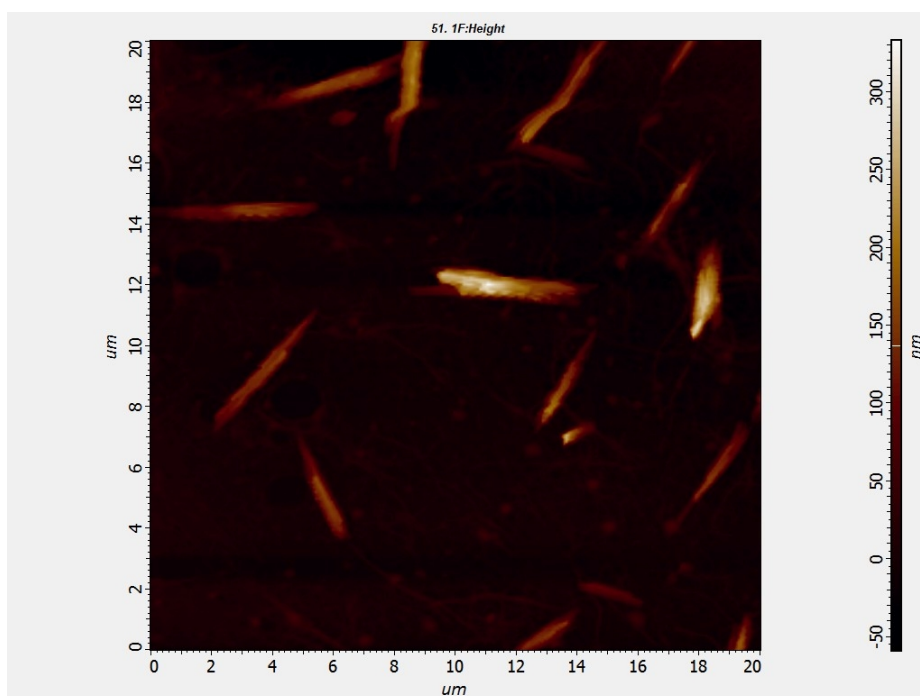


Figura 18. Microscopia de força atômica de nanocristais de celulose após a hidrólise com a enzima E-CELTM durante 2 h de reação.

A amostra proveniente da reação de hidrólise de 10 h apresentou nanopartículas de celulose no formato “ribbon-like” (fita), que contém mais de uma fibrila associada (DONALDSON, 2007; DING et al., 2014), além de partículas elipsoidais amorfas (Figura 19). Nota-se que as nanoceluloses estão agregadas, esta agregação física de nanocristais orientados pode ocorrer por meio das ligações de hidrogênio ou interações de empilhamento da glicose, sem alterar o tamanho real do cristal (FANG et al., 2014).

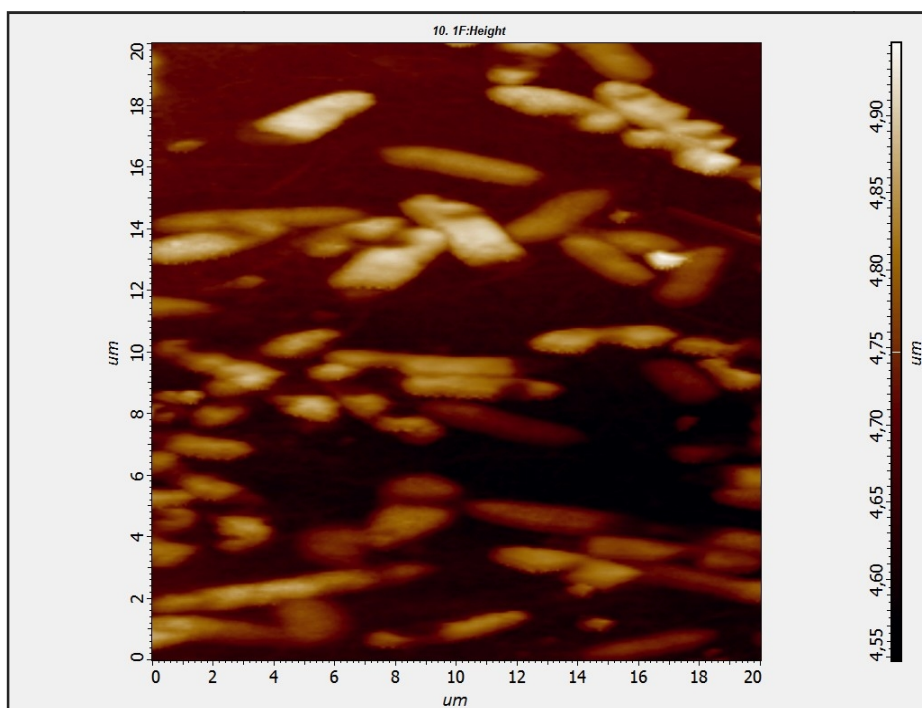


Figura 19. Microscopia de força atômica de nanopartículas de celulose após a hidrólise com a enzima E-CELTm durante 10 h de reação.

Para conhecer o potencial de reforço por meio da razão de aspecto (L/D), é possível medir comprimento e diâmetro a partir de imagens de AFM, conforme a Figura 20.

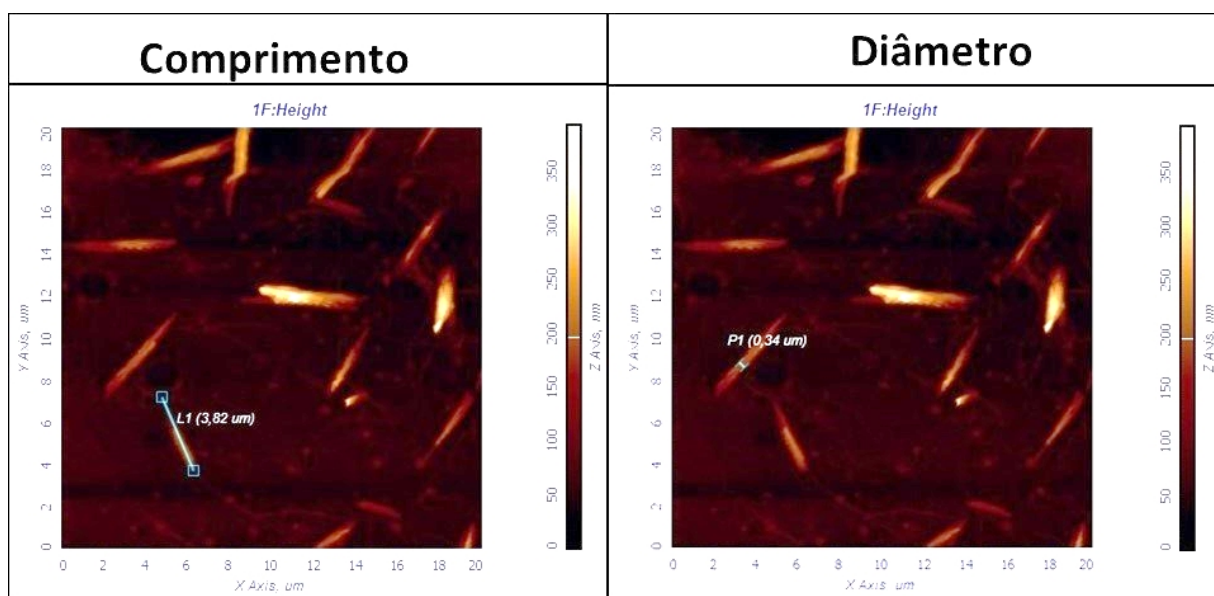


Figura 20. Microscopia de força atômica das nanoceluloses cristalinas de caroá, com destaque para as medidas de comprimento e diâmetro.

A caracterização por AFM permite uma maior aproximação das medidas reais, devido à alta resolução da técnica. Porém, para isso, é feito um cálculo a partir das medidas obtidas com as imagens para correção de artefato que ocorre devido à influência geométrica da amostra e da sonda de AFM, proposto por Zenhausern et al. (1992). Artefato este conhecido como convolução da ponta (sonda) (BRAGA; RICCI, 2004), corrigido pela equação 1, de um modelo proposto por Wang & Chen (2007):

$$W^2 = 16R_T R_S$$

na qual, W (*width*) se refere à largura da amostra na imagem; R_T (*tip radius*), ao raio da ponta (sonda), e R_S (*sample radius*), ao raio real da amostra.

As imagens de AFM das nanoceluloses obtidas após hidrólise enzimática de 2 h apresentaram diâmetro médio de 296 ± 89 nm (média $\pm$ desvio padrão) e comprimento médio de 3950 ± 202 nm (média $\pm$ desvio padrão) (Figura 21). Os valores obtidos não são homogêneos, o que pode estar associado à sonicação que é capaz de remover a parte amorfa da nanoestrutura, quebrando as interfaces relativamente fracas das microfibrilas elementares para dispersar as nanoceluloses (SONG et al., 2014; TANG et al., 2015). Em acordo com esta heterogeneidade, Campos et al. (2013) obtiveram nanocristais de celulose com 4100 ± 2583 nm de comprimento e 109 ± 73 nm de diâmetro, como resultado do estudo da hidrólise com celulases das fibras de curauá previamente tratadas com soda e branqueadas com ácido acético e clorito de sódio. As dimensões geométricas dos nanocristais de celulose dependem da origem do substrato lignocelulósico e das condições de hidrólise da celulose (HABIBI et al., 2010; DUFRESNE et al., 2013). Os resultados obtidos corroboram com KHALIL e colaboradores (2014), que definem a nanocelulose como um material celulósico com pelo menos uma de suas dimensões na escala nanométrica. No entanto, alguns pesquisadores consideram que a nanocelulose deve conter uma das dimensões com valor igual ou inferior a 100 nm (KLEMM et al., 2011; BRINCHI et al., 2013).

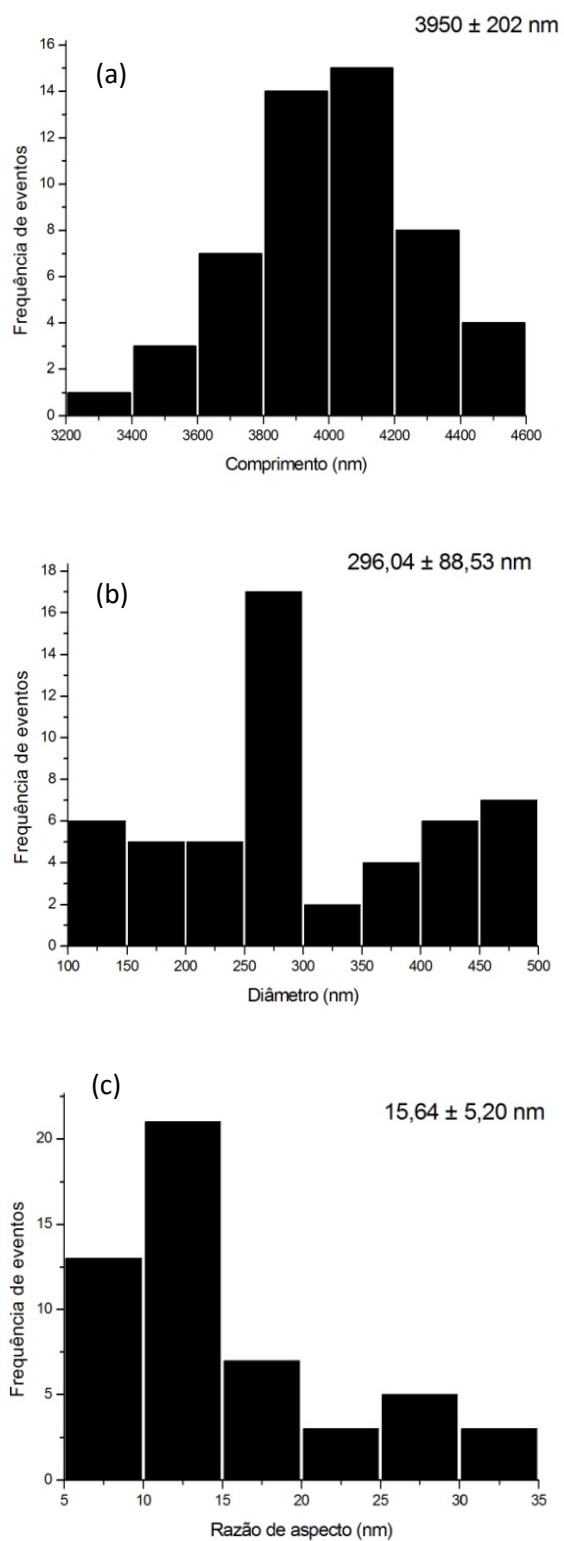


Figura 21. Histogramas dos valores de comprimento (a), diâmetro (b) e razão de aspecto (c) das nanoceluloses cristalinas obtidas após a hidrólise com E-CELTm por 2 h.

Um parâmetro importante para análise das propriedades de reforço da nanocelulose é a razão de aspecto (comprimento/diâmetro), que depende da disposição das fibras e pode ser afetada pelas condições de preparação da amostra e agregação (DUFRESNE, 2013). A razão de aspecto da amostra de nanocristais do caroá hidrolisado com endoglucanase por 2 h foi em torno de 16 ± 5 (média $\pm$ desvio padrão) (Figura 21). Nanocelulose cristalina com razão de aspecto menor do que 10 não confere nenhum benefício como agente reforçante de materiais compósitos, de valores entre 10 e 50 é possível verificar algum benefício, mas apenas uma razão de aspecto maior que 50 pode garantir um efeito de reforço eficiente (EICHHORN et al., 2010). Esses valores são próximos às dimensões encontradas para nanoceluloses cristalinas de curauá com razão de aspecto de 13 a 17 (CORRÊA et al., 2010), nanocelulose de linho com razão de aspecto 15 (CAO et al., 2007) e nanocristais de algodão com razão de aspecto 10 (YUE et al., 2012).

4.7. Hidrólise enzimática com complexo enzimático

O resíduo da hidrólise com a enzima E-CELTTM durante 2 h de reação (R-TM) foi hidrolisado com o complexo enzimático celulolítico (Accellerase 1.500). A porcentagem de celulose convertida em glicose corresponde a 88%. Esse dado era o esperado de acordo com informações do fabricante da enzima (Du Pont) que demonstrou um rendimento de quase 90% na conversão de açúcares após a hidrólise enzimática da madeira softwood pré-tratada, após 70 horas de reação.

4.7.1 Medida de açúcares redutores totais (ART)

A absorbância dos materiais hidrolisados por 24, 48 e 72 h foi medida a 540 nm em espectrofotômetro e a quantidade de glicose liberada foi calculada com base em uma curva de calibração de glicose padrão (Figura 21). A concentração de glicose obtida após a hidrólise enzimática da amostra R-TM por 72 h foi $19,60 \text{ g L}^{-1}$ (Figura 22). A massa de açúcares foi de 0,98 g para um volume de 50 mL de material hidrolisado.

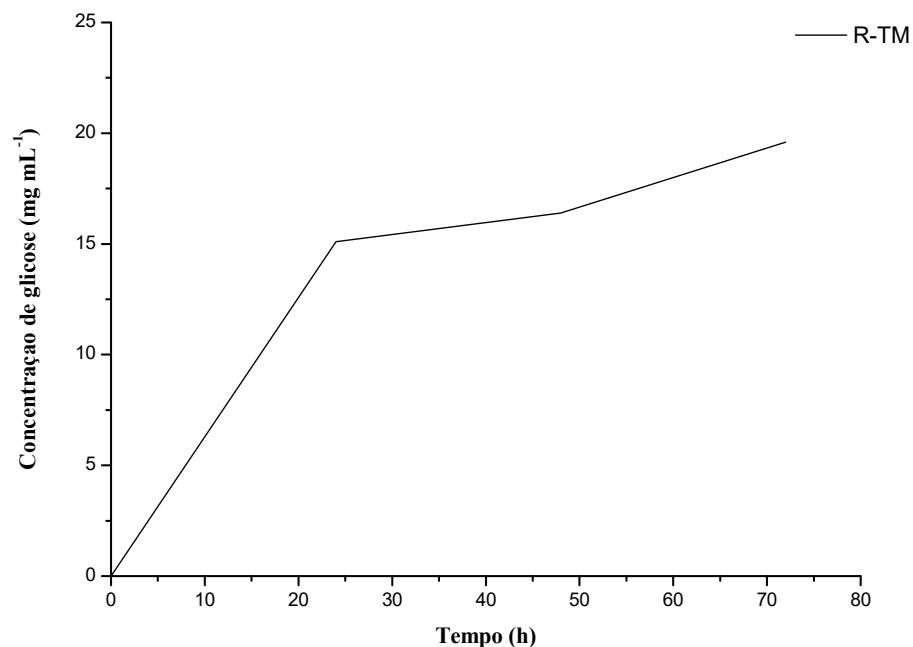


Figura 22. Curva de liberação de glicose na presença do complexo celulolítico Accellerase 1.500, do resíduo de fibras de caroá após a hidrólise com a endoglucanase E-CELTTM por 2 h (R-TM).

4.8. Obtenção de etanol

4.8.1. Cálculo do rendimento teórico de etanol

Com base na massa de açúcares (0,98 g) do material hidrolisado determinada na seção 4.7.1, utilizando a equação de Gay-Lussac (seção 3.9), o rendimento teórico de etanol do material fermentado (0,51 g de etanol/ g de glicose) foi de 0,50 g ou 10 g L⁻¹. O método de acordo com a equação de Gay-Lussac é frequentemente utilizado para calcular o rendimento de etanol após o processo fermentativo (LAVASACK, 2003).

4.8.2. Cálculo do rendimento real de etanol

O material hidrolisado com o complexo enzimático foi filtrado, fermentado pelas leveduras *s. cerevisiae* e destilado. Após a destilação, a densidade da amostra medida em densímetro digital foi de $0,9989 \text{ g dm}^{-3}$, sendo o teor alcoólico determinado com base na tabela de densidade/teor alcoólico, igual a 0,75 °GL. Sendo o volume de etanol igual ao volume da solução multiplicado pelo teor alcoólico percentual e a densidade medida aproximadamente igual a 1 g dm^{-3} , a massa de etanol foi de 0,375 g e a concentração de $7,5 \text{ g L}^{-1}$. O rendimento de etanol corresponde a 75% do rendimento teórico. Há vários produtos das reações secundárias da fermentação, como glicerol, ácido succínico, ácido acético (MURTAGH, 1999). Sendo assim, um valor entre 88 e 94% do rendimento teórico é considerado ideal na prática (WEBB, 1978; LAVASACK, 2003). No entanto, o material hidrolisado contém açúcares não fermentescíveis pela *s. cerevisiae* e produtos que inibem o crescimento das mesmas, por exemplo, o ácido acético como produto da decomposição da hemicelulose, o furfural e o 5-hidroximetilfurfural (HMF), gerados por meio da desidratação dos monômeros de pentoses e hexoses, respectivamente (GÁMEZ et al., 2006; CARDONA et al., 2010).

5. CONCLUSÕES

- O pré-tratamento hidrotérmico a 160 °C seguido de deslignificação com NaOH 1% é indicado na remoção efetiva de lignina visando a obtenção da polpa de celulose de caroá, além de ser um métodos que proporciona menor efeito negativo ao ambiente.
- A hidrólise enzimática da polpa celulósica de caroá com a endoglucanase E-CELTTM por 2 horas produz nanoceluloses no formato agulha com rendimento de aproximadamente 10%.
- As nanoceluloses cristalinas com razão de aspecto de 16 ± 5 nm podem ser utilizadas como potencial agente reforçante de materiais compósitos.
- A inativação da enzima E-CELTTM com a adição de 20% de etanol mantém a sua solubilidade, além de facilitar a sua remoção.
- O resíduo da hidrólise na presença do coquetel celulolítico (Accellerase 1.500) libera açúcares fermentescíveis que podem ser utilizados para produção de etanol 2G.
- A fibra de caroá pode ser considerada uma potencial fonte de energia renovável em um sistema acoplado para a produção tanto de nanocelulose como de etanol 2G.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALDANA et al. Barrier properties of polylactic acid in cellulose based packages using montmorillonite as filler. **Polymers**, v. 6, p. 2386–2403, 2014.
- ALVIRA, P. et al. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4851–4861, 2010.
- ARAÚJO, J. R.; WALDMAN, W. R.; DE PAOLI, M. A. Thermal properties of high density polyethylene composites with natural fibers: coupling agent effect. **Polymer Degradation and Stability**, v. 93, p. 1770–1775, 2008.
- BALLESTEROS, I. et al. Ethanol production from steam-explosion pretreated wheat straw. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 129–132, p. 496–508, 2006.
- BHAT, M. K.; BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. **Biotechnology Advances**, v. 15, n. 3-4, p. 583–620, 1997.
- BELBEKHOUCHE, S. et al. Water sorption behavior and gas barrier properties of cellulose whiskers and microfibrils films. **Carbohydrate Polymer**, v. 83, n. 4, p. 1740–1748, 2011.
- BERLIN, A. et al. Weak lignin-binding enzymes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 121-124, p. 163–170, 2005.
- BRAGA, P. C.; RICCI, D. **Atomic force microscopy**: biomedical methods and applications. 1. ed. New Jersey: Humana Press, 2004.
- BRANDT, A. et al. Deconstruction of lignocellulosic biomass with ionic liquids. **Green Chemistry**, v. 15, n. 3, p. 550–583, 2013.
- BRINCHI, L. et al. Production of nanocrystalline cellulose from lignocellulosic biomass: Technology and applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 94, n. 1, p. 154–169, 2013.
- CAMPOS, A. et al. Obtaining nanofibers from curaua and sugarcane bagasse fibers using enzymatic hydrolysis followed by sonication. **Cellulose**, v. 20, n. 3, p. 1491–1500, 2013.
- CANTAREL B. L. et al. The Carbohydrate-Active Enzymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics. **Nucleic Acids Research**, v. 37, p. 233–238, 2009.
- CARDONA, C. A.; QUINTERO, J. A.; PAZ I. C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4754–4766, 2010.

CARVALHO, W. et al. Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira. **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 2191–2195, 2009.

CHANDRA, R. P.; ARANTES, V.; SADDLER, J. Steam pretreatment of agricultural residues facilitates hemicellulose recovery while enhancing enzyme accessibility to cellulose. **Bioresource Technology**, v. 185, p. 302–307, 2015.

CHAUVE, M. et al. Comparative kinetic analysis of two fungal beta-glucosidases. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, p. 1–8, 2010.

CHEN, H. **Biotechnology of lignocellulose: theory and practice**. 1. ed. Netherlands: Springer, 2014, 510 p.

CLOETE, T. E.; MALHERBE, S. Lignocellulose biodegradation: fundamentals and applications. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 1, n. 2, p. 105–114, 2002.

CORRALES, R. C. N. R. et al. Structural evaluation of sugar cane bagasse steam pretreated in the presence of CO₂ and SO₂. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, n. 36, p. 1–8, 2012.

CORRÊA, A. N. et al. Cellulose nanofibers from curaua fibers. **Cellulose**, v. 17, p. 1183–1192, 2010.

COSGROVE, D. J.; JARVIS, M. C. Comparative structure and biomechanics of plant primary and secondary cell walls. **Frontiers in Plant Science**, v. 22, n. 3, p. 204, 2012.

DAS, S. et al. Effect of steam pre-treatment of jute fiber on dimensional stability of jute composite. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 76, p. 1652–1661, 2000.

D'ALMEIDA, A. L. F. S. et al. Thermal analysis of less common lignocellulose fibers. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 91, n. 2, p. 405–408, 2008.

DEMAIN, A. L. et al. Cellulase, clostridia, and ethanol. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 69, p. 124–154, 2005.

DEMIRBAS, M. F. Biorefineries for biofuel upgrading: A critical review. **Applied Energy**, v. 86, p. S151–S161, 2009.

DINAND, E.; CHANZY, H.; VIGNON, M. R. Parenchymal cell cellulose from sugar beet pulp: preparation and properties. **Cellulose**, v. 3, n. 1, p. 183–188, 1996.

DING, S. Y.; ZHAO, S.; ZENG, Y. Size, shape, and arrangement of native cellulose fibrils in maize cell walls. **Cellulose**, v. 21, n. 2, p. 1–9, 2014.

DONALDSON, L. Cellulose microfibril aggregates and their size variation with cell wall type. **Wood Science and Technology**, v. 41, n. 5, p. 443–460, 2007.

DONOHUE, B. S. et al. Visualizing lignin coalescence and migration through maize cell walls following thermochemical pretreatment. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 101, n. 5, p. 913–925, 2008.

DUFRESNE, A. Nanocellulose: a new ageless bionanomaterial. **Materials Today**, v. 16, n. 6, p. 220–227, 2013.

DUTTA, S.; WU, K. C. W. Enzymatic breakdown of biomass: enzyme active sites, immobilization, and biofuel production. **Green Chemistry**, v. 16, n. 11, p. 4615–4626, 2014.

ESCOBAR, J. C. et al. Biofuels: environment, technology and food security. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 13, n. 6-7, p. 1275–1287, 2009.

EICHHORN, S. J. et al. Review: current international research into cellulose nanofibres and nanocomposites. **Journal of Materials Science**, v. 45, p. 1-33, 2010.

FANG, L.; CATCHMARK, J. M. Characterization of water-soluble exopolysaccharides from *Gluconacetobacter xylinus* and their impacts on bacterial cellulose crystallization and ribbon assembly. **Cellulose**, v. 21, p. 3965–3978, 2014.

FELTUS, F. A.; VANDENBRINK, J. P. Bioenergy grass feedstock: current options and prospects for trait improvement using emerging genetic, genomic, and systems biology toolkits. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, p. 80, 2012.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood: chemistry, ultrastructure, reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, 1989. 613 p.

FENNER, M. The phenology of growth and reproduction in plants. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, v. 1, n. 1, p. 78–91, 1998.

FILSON, P. B.; DAWSON-ANDOH, B. E.; SCHWEGLER-BERRY, D. Enzymatic-mediated production of cellulose nanocrystals from recycled pulp. **Green Chemistry**, v. 11, p. 1808–1814, 2009.

FLEMMING, K.; GRAY, D. G.; MATTHEWS, S. Cellulose crystallites. **Chemistry**, v. 4, n. 7-9, p. 1831–1835, 2001.

FLOROS, M. et al. Enhancement of thermal stability, strength and extensibility of lipid-based polyurethanes with cellulose-based nanofibers. **Polymer Degradation and Stability**, v. 97, p. 1970–1978, 2012.

FUKUZUMI, H. et al. Transparent and high gas barrier films of cellulose nanofibers prepared by TEMPO-mediated oxidation. **Biomacromolecules**, v. 10, p. 162–165, 2009.

GALBE, M.; ZACCHI, G. Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 108, p. 41–65, 2007.

GÁMEZ, S. et al. Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid. **Journal and Food Engineering**, v. 74, p. 78–88, 2006.

GEORGE, M.; MUSSONE, P. G.; BRESSLER, D. C. Modification of the cellulosic component of hemp fibers using sulfonic acid derivatives: surface and thermal characterization. **Carbohydrate Polymers**, v. 134, p. 230–239, 2015.

GHAREHKHANI, S. et al. Basic effects of pulp refining on fiber properties - A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 115, p. 785–803, 2015.

GIBSON, L. J. The hierarchical structure and mechanics of plant materials. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 9, p. 2749–2766, 2012.

GILBERT, H. J. The biochemistry and structural biology of plant cell wall deconstruction. **Plant Physiology**, v. 153, n. 2, p. 444–455, 2010.

GOUVEIA, E. R. et al. Validation of methodology for the chemical characterization of sugar cane bagasse. **Química Nova**, v. 32, p. 1500–1503, 2009.

GÜMÜSKAYA, E.; USTA, M.; BALABAN, M. Carbohydrate components and crystalline structure of organosolv hemp (*Cannabis sativa L.*) bast fibers pulp. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 491–497, 2007.

GUPTA, K. M. Hemp fibre - Reinforced Composites. In: **Engineering Materials: Research, Applications and Advances**. New York: CRC Press, 2015, p. 482.

GUSAKOV, A.V. et al. Design of highly efficient cellulase mixtures for enzymatic hydrolysis of cellulose. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 97, p. 1028–1038, 2007.

HABIBI, Y.; CHANZY, H.; VIGNON, M. R. Tempo-mediated surface oxidation of cellulose whiskers. **Cellulose**, v. 13, p. 679–687, 2006.

HABIBI, Y.; LUCIA, A. L.; ROJAS, O. J. Cellulose nanocrystals: chemistry, self-assembly, and applications, **Chemical Reviews**, v. 110, t. 6, p. 3479–3500, 2010.

HANLEY, S. J. Atomic force microscopy of cellulose microfibrils: comparison with transmission electron microscopy. **Polymer**, v. 33, n. 21, p. 4639–4642, 1992.

HENDRIKS, A. T. W. M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 10–18, 2009.

HENRISSAT, B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochemical Journal**, v. 280, p. 309–316, 1991.

HENRISSAT, B.; BAIROCH, A. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochemical Journal**, v. 293, p. 781–788, 1993.

HENRISSAT, B.; BAIROCH, A. Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. **Biochemical Journal**, v. 316, p. 695–696, 1996.

HERRICK, F. W. et al. Microfibrillated cellulose: morphology and accessibility. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 37, p. 797–813, 1983.

HONORATO, C. et al. Transparent nanocellulose-pigment composite films. **Journal of Material Science**, v. 50, p. 7343–7352, 2015.

HU, J. et al. The addition of accessory enzymes enhances the hydrolytic performance of cellulase enzymes at high solid loadings. **Bioresource Technology**, v. 186, p. 149–153, 2015.

IDREES, M. et al production of fermentable sugars by combined chemo-enzymatic hydrolysis of cellulosic material for bioethanol production. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 31, n. 2, p. 355–363, 2014.

ILMÉN, M. et al. High level secretion of cellobiohydrolases by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, n. 30, p. 1–15, 2011.

INOUE, H. Combining hot-compressed water and ball milling pretreatments to improve the efficiency of the enzymatic hydrolysis of eucalyptus. **Biotechnology for Biofuels**, v. 1, n. 2, p. 1–9, 2008.

ISOGAI, A.; SAITO, T; FUKUZUMI, H. Review. TEMPO-oxidized cellulose nanofibers. **Nanoscale**, v. 3, p. 71–85, 2011.

JIANG, T. D. **Lignin**. Beijing: Chemical Industry Press, 2001.

JONES, L.; ENNOS, A. R.; TURNER, S.R. Cloning and characterization of irregular xylem4 (irx4): a severely lignin-deficient mutant of Arabidopsis. **The Plant Journal**, v. 26, p. 205–216, 2001.

JONOOBI, M. et al. Chemical composition, crystallinity, and thermal degradation of bleached and unbleached kenaf bast (*Hibiscus cannabinus*) pulp and nanofibers. **BioResources**, v. 4, n. 2, p. 626–639, 2009.

KADLA, J. F.; GILBERT, R. D. Cellulose structure: a review. **Cellulose Chemical Technology**, v. 34, p. 197, 2000.

KALIA, S.; BOUFI, S.; CELLI, A. KANGO, S. Nanofibrillated cellulose: surface modification and potential applications. **Colloid and Polymer Science**, v. 292, n. 1, p. 5–31, 2014.

KAMM, B.; GRUBER, P.R.; KAMM, M. **Biorefineries, Industrial Processes and Products**. Ed. Wiley-VCH, Germany, 2006.

KARLSSON, H. et al. Ethanol production in biorefineries using lignocellulosic feedstock e GHG performance, energy balance and implications of life cycle calculation methodology. **Journal of Cleaner Production**, v. 83, p. 420–427, 2014.

KAUSHIK, V. K.; KUMAR, A.; KALIA, S. Effect of mercerization and benzoyl peroxide treatment on morphology, thermal stability and crystallinity of sisal fibers. **International Journal of Textile Science** v. 1, n. 6, p. 101-105, 2012.

KEEGSTRA, K. Plant cell walls in future perspectives in plant biology. **Plant Physiology**, v. 154, p. 483–486, 2010.

KETUDAT CAIRNS, J. R.; ESEN, A. β -Glucosidases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, n. 20, p. 3389–3405, 2010.

KHALIL, H. P. S. A. et al. Production and modification of nanofibrillated cellulose using various mechanical processes: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 99, p. 649– 665, 2014.

KLEMM, D.; HEUBLEIN, B.; FINK, H-P.; BOHN, A. Review: Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. **Angewandte Chemie International Edition**. v. 44, p. 3358–3393, 2005.

KLEMM, D. et al. Nanocelluloses: a new family of nature-based materials. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 50, n. 24. p. 5438–5466, 2011.

KO, J. K. Effect of liquid hot water pretreatment severity on properties of hardwood lignin and enzymatic hydrolysis of cellulose. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 112, p. 252–262, 2015.

KOSARIC, N. et al. Ethanol fermentation. In: CHEMIE, V. **Biotechnology**: a comprehensive treatise, Reed, G. ed., 1983, v. 3, p. 257–386.

KULKARNI, A. R. et al. Comparison of arabinoxylan structure in bioenergy and model grasses. **Industrial Biotechnology**, v. 8, p. 222–229, 2012.

KUMAR, R.; SINGH, S.; SINGH, O. V. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 5, p. 377–91, 2008.

KUMAR, P. et al. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 48, p. 3713–3729, 2009.

LAHIJI, R. R. et al. Atomic force microscopy characterization of cellulose nanocrystals. **Langmuir**, v. 26, n. 6, p. 4480–4488, 2010.

LANGAN, P. et al. Synchrotron X-ray structures of cellulose I_β and regenerated cellulose II at ambient temperature and 100K. **Cellulose**, v. 12, n. 6, p. 551–562, 2005.

LAST, J. A. The applications of atomic force microscopy to vision science. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 51, n. 12, p. 6083–6094, 2010.

LAVASACK, B. P. Estimates of ethanol production from sugar cane feedstocks. **Proceedings of the Australian Society of Sugar Cane Technology**, v. 25, p. 1–9, 2003.

LEAL, F. C.; LOPES, A. V.; MACHADO, I. C. Polinização por beija-flores em uma área de caatinga no Município de Floresta, Pernambuco, Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 29, n. 3, p. 379–389, 2006.

LEÃO, A. L. et al. Biopolymers applications on automotive industry. In: BERTOLINI, A. C. **Biopolymers Technology**. São Paulo: Cultura Acadêmica, 2007, p. 165–196.

LEE, H. V.; HAMID, S. B. A.; ZAIN, S. K. Review. Conversion of lignocellulosic biomass to nanocellulose: structure and chemical process. **Scientific World Journal**, v. 2014, 20 p., 2014.

LEITE, F. L. et al. The atomic force spectroscopy as a tool to investigate surface forces: basic principles and applications. In: MENDEZ-VILAS, A., DIAZ, J. **Modern research and educational topics in microscopy**, Formatex microscopy, 2007, 748 p.

LI, J.; HENRIKSSON, G.; GELLERSTEDT, G. Lignin depolymerization/ repolymerization and its critical role for delignification of aspen wood by steam explosion. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 3061–3068, 2007.

LIN, N.; DUFRESNE, A. Nanocellulose in biomedicine: current status and future prospect. **European Polymer Journal**, v. 59, p.302–325, 2014.

LIU, H. et al. Visualization of enzymatic hydrolysis of cellulose using AFM phase imaging. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 45, p. 274–281, 2009.

LOMBARD, V. et al. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. **Nucleic Acids Research**, v. 42, p. 490–495, 2014.

LYND, L. R. et al. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 3, p. 506–77, 2002.

MABEE, W. E. et al. Renewable-based fuels for transport. In: LARSEN, H., PETERSEN, L. S. **Renewable energy for power and transport**. Riso National Laboratory, 2006, p. 47–50.

MANDAL, A.; CHAKRABARTY, D. Isolation of nanocellulose from waste sugarcane bagasse (SCB) and its characterization. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, p. 1291–1299, 2011.

MANSFIELD, S. D.; MOONEY, C.; SADDLER, J. N. Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis. **Biotechnology Progress**, v. 15, p. 804–816, 1999.

MARQUES, G.; GUTIÉRREZ, A.; DEL RÍO, J. C. Chemical characterization of lignin and lipophilic fractions from leaf fibers of curaua (*Ananas erectifolius*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 1327–1336, 2007.

MARTÍN, C. et al. Enzyme loading dependence of cellulose hydrolysis of sugarcane bagasse. **Química Nova**, v. 35, n. 10, p. 1927–1930, 2012.

METREVELI, G. et al. A size-exclusion nanocellulose filter paper for virus removal. **Advanced Healthcare Materials**, v. 3, p. 1546–1550, 2014.

MEYER, G.; AMER, N. M. Novel optical approach to atomic force microscopy. **Applied Physics Letters**, v. 53, 1988.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426–428, 1959.

MOISER, N. et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass, **Bioresource Technology**, v. 96, p. 673–686, 2005.

MONTEIRO, S. N. et al. Thermogravimetric stability behavior of less common lignocellulosic fibers – a review. **Journal of Materials Research and Technology**, v. 1, n. 3, p. 189–199, 2012.

MOON, R. J. Cellulose nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites. **Chemical Society Reviews**, v. 40, n. 7, p. 3941–94, 2011.

MORRISON, I. M.; STEWART, D. Determination of lignin in the presence of ester-bound substituted cinnamic acids by a modified acetyl bromide procedure. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 69, p. 151–157, 1995.

MORTIMER, J. C. et al. Absence of branches from xylan in *Arabidopsis gus* mutants reveals potential for simplification of lignocellulosic biomass. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, p. 17409–17414, 2010.

MURTAGH, J. E. The alcohol textbook: a reference for the beverage, fuel and industrial alcohol industry. In: Jacques, K., Lyons, T. P. and Kelsall, D. R. **Molasses as feedstock for ethanol production**. 3. ed. Nottingham: Nottingham University Press, 1999, p. 89–96.

NAKANO, Y. et al. NAC-MYB-based transcriptional regulation of secondary cell wall biosynthesis in land plants. **Frontiers in Plant Science**. v. 6, p. 1–18, 2015.

NIKLAS, K. J. **Plant biomechanics**. An engineering approach to plant form and function. Chicago, IL: University of Chicago Press. 1992. 622 p.

NOGI, M.; LWAMOTO, S.; NAKAGAITO, A. N.; YANO, H. Optically transparent nanofiber paper. **Advanced Materials**, v. 21, p. 1595–1598. 2009.

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise enzimática de biomassa. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1549–1558, 2010.

ORLOWSKI, A. et al. How endoglucanase enzymes act on cellulose nanofibrils: role of amorphous regions revealed by atomistic simulations. **Cellulose**, v. 22, p. 2911–2925, 2015.

OOSHIMA, H. et al. Enzyme activity of cellulase adsorbed on cellulose and its change during hydrolysis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 31, p. 253–266, 1991.

O’SULLIVAN, A. C. Cellulose: the structure slowly unravels. **Cellulose**, v. 4, p. 173–207, 1997.

PÄÄKKÖ, M. et al. Enzymatic hydrolysis combined with mechanical shearing and high pressure homogenization for nanoscale cellulose fibrils and strong gels. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 6, p. 1934–1941, 2007.

PARK, S et al. Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, n.10, p. 2–10, 2010.

PAIVA, A. T.; SEQUEIRA, S. M.; EVTUGUIN, D. V. Nanoscale structure of cellulosic materials: challenges and opportunities for AFM. In: MENDEZ-VILAS, A., DIAZ, J. **Modern research and educational topics in microscopy**, Formatex microscopy, 2007, p. 726.

PERDESEN, M; MEYER, A. S. Lignocellulose pretreatment severity - relating pH to biomatrix opening. **New Biotechnology**, v. 27, n. 6, p. 739–750, 2010.

PENTTILÄ, P. A. et al. Effects of pressurized hot water extraction on the nanoscale structure of birch sawdust. **Cellulose**, v. 20, n. 5, p. 2335–2347, 2013.

PEREIRA, F. R. L., QUIRINO, G. Z. M. Fenologia e biologia floral de *Neoglaziovia variegata* (Bromeliaceae) na caatinga paraibana. **Rodriguésia**, v. 59, n. 4, p. 835–844, 2008.

PEREIRA, J. H. et al. Crystal structure of endoglucanase Cel9A from the thermoacidophilic *Alicyclobacillus acidocaldarius*. **Acta Crystallography**, v. D65, p. 744–750, 2009.

PEREIRA, J. H. et al. Biochemical characterization and crystal structure of endoglucanase Cel5A from the hyperthermophilic *Thermotoga maritima*. **Journal of Structural Biology**, v. 172, p. 372–379, 2010.

RAHIMI, A. et al. Formic-acid-induced depolymerization of oxidized lignin to aromatics. **Nature**, v. 515, p. 249–252, 2014.

RIBEIRO, M. B. Fibrocultura: o Semi-Árido é o paraíso das fibras vegetais. In: RIBEIRO, M.B. (ed.). A potencialidade do semi-árido brasileiro. Brasília: Revan. **Acta Crystallography**, v. 136, p.121, 2007.

ROCHA, G. J. M. et al. Mass balance of pilot-scale pretreatment of sugarcane bagasse by steam explosion followed by alkaline delignification. **Bioresource Technology**, v. 111, p. 447–452, 2012.

RUBIN, E.M. Genomics of cellulosic biofuels. **Nature**, v. 454, p. 841–845, 2008.

RUEL, K. et al. J.P. Impact of CCR1 silencing on the assembly of lignified secondary walls in *Arabidopsis thaliana*. **New Phytologist**, v. 184, p. 99–113, 2009.

SACUI, J. A. et al. Comparison of the properties of cellulose nanocrystals and cellulose nanofibrils isolated from bacteria, tunicate, and wood processed using acid, enzymatic, mechanical, and oxidative methods. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 6, p. 6127–6138, 2014.

SALAS, C. et al. Nanocellulose properties and applications in colloids and interfaces. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 19, p. 383–396, 2014.

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 185–194, 2009.

SANTOS, P. A. et al. Polyamide-6/ vegetal fiber composites prepared by extrusion and injection molding. **Composites Part A: Applied Science and Manufacturing**, v. 38, p. 2404–2411, 2007.

SCHELLER, H.; ULVSKOV, P. Hemicelluloses. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 61, p. 263–89, 2010.

SCHRÖDER, C.; BLANK, S.; ANTRANIKIAN, G. First glycoside hydrolase family 2 enzymes from *Thermus antranikianii* and *Thermus brockianus* with β -glucosidase activity. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 3, p. 1–10, 2015.

SCHUBOT, F. D. et al. 2004. Structural basis for the exocellulase activity of the cellobiohydrolase CBH A from *Clostridium thermocellum*. **Biochemistry**, v. 43, p. 1163–1170, 2004.

SEGAL, L. An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the x-ray diffractometer. **Textile Research Journal**, v. 29, p. 786–794, 1962.

SERPA, V. I.; POLIKARPOV, I. Enzymes in bioenergy In: BUCKERIDGE, M. S. S.; GOLDMAN, G. H. H. (Org.). **Routes to Cellulosic Ethanol**. New York: Springer, 2011, cap. 7, p. 97–113.

SILVA, R. et al. Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos. *Química Nova*, v. 32, n. p. 661–671, 2009.

SILVA, V. F. N. et al. Fermentation of cellulosic hydrolysates obtained by enzymatic saccharification of sugarcane bagasse pretreated by hydrothermal processing. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 38, p. 809–817, 2011.

SILVEIRA, D. G. et al. Micropropagation and *in vitro* conservation of *Neoglaziovia variegata* (Arr. Cam.) Mez, a fiber producing bromeliad from Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 4, p.923–932, 2009.

SILVEIRA, D. G. et al. Germinative response of *Neoglaziovia variegata* (Arruda) Mez seeds. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 5, p. 948–955, 2011.

SILVEIRA, R. L. et al. Plant biomass recalcitrance: effect of hemicellulose composition on nanoscale forces that control cell wall strength. **Journal of the American Chemical Society**, v. 135, p. 19048–19051, 2013.

SIMS, R. E. H. et al. An overview of second generation biofuel technologies. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 1570–1580, 2010.

SIQUEIRA, G. et al. Morphological investigation of nanoparticles obtained from combined mechanical shearing, and enzymatic and acid hydrolysis of sisal fibers. **Cellulose**, v. 1, p. 1147–1158, 2010.

SMITH, L. B.; DOWNS, R. J. Bromelioideae (Bromeliaceae). **Flora Neotropica Monograph**, v. 14, p. 1493–2141, 1979.

SONG, Q. Nanofibrillated Cellulose (NFC): A high-value co-product that improves the economics of cellulosic ethanol production. **Energies**, v. 7, p. 607–618, 2014.

SOUZA et al. Nanocellulose from Curava Fibers and their Nanocomposites. **Molecular Crystals and Liquid Crystals**, v. 522, p. 342–352, 2010.

SPINACÉ, M. A. S. et al. Characterization of lignocellulosic curaua fibres. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, p. 47–53, 2009.

SPOLJARIC, S. et al. Stable, self-healing hydrogels from nanofibrillated cellulose, poly (vinyl alcohol) and borax via reversible crosslinking. **European Polymer Journal**, v. 56, p. 105–117, 2014.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, v. 83, p. 1–11, 2002.

TAGLIAFERRO, G. V.; SILVA, M. L. C. P.; SILVA, G. L. P. Influência do agente precipitante na preparação do óxido de nióbio (V) hidratado pelo método da precipitação em solução homogênea. **Química Nova**, v. 28, p. 250, 2005.

TANG, Y. et al. Extraction of cellulose nano-crystals from old corrugated container fiber using phosphoric acid and enzymatic hydrolysis followed by sonication. **Carbohydrate Polymers**, v. 125, p. 360–366, 2015.

TANGNU, S. K.; BLANCH, H. W.; WILKE, C. R. Enhanced production of cellulase, hemicellulase, and β -glucosidase by *Trichoderma reesei* (Rut C-30). **Biotechnology and Bioengineering**, v. 23, p. 1837–1849, 1981.

TAHERDANAK, M.; ZILOUEI, H. Improving biogas production from wheat plant using alkaline pretreatment. **Fuel**, v. 115, p. 714–719, 2014.

TALEBNIA, F.; KARAKASHEV, D.; ANGELIDAKI, I. Production of bioethanol from wheat straw: an overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4744–4475, 2010.

THAMSIRIROJ, T.; MURPHY, J.D. Is it better to import palm oil from Thailand to produce biodiesel in Ireland than to produce biodiesel from indigenous Irish rape seed? **Applied Energy**, v. 86, p. 595–604, 2009.

THRING, R. W.; CHORNET, E.; QVEREND, R. Recovery of a solvolytic lignin: effects of spent liquor/acid volume ratio, acid concentration and temperature. **Biomass**, v. 23, p. 289–305, 1990.

THUNDAT, T. et al. Role of relative humidity in atomic force microscopy imaging. **Surface Science Letters**, v. 294, n. 1-2, p. 939–943, 1993.

TILMAN, D., SOCOLOW, R., FOLEY, J.A., HILL, J., LARSON, E., LYND, L., PACALA, S., REILLY, J., SEARCHINGER, T., SOMERVILLE, C. Beneficial biofuels - the food, energy, and environment trilemma. **Science**, v. 325, p. 270–271, 2009.

TINGAUT, P.; ZIMMERMANN, T.; SÈBE, G. Cellulose nanocrystals and microfibrillated cellulose as building blocks for the design of hierarchical functional materials. **Journal of Materials Chemistry**, v. 22, p. 20105–20111, 2012.

TIWARI, P.; MISRA, B. N.; SANGWAN, N. S. β -Glucosidases from the fungus *Trichoderma*: An efficient cellulase machinery in biotechnological applications. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1–10, 2013.

TOMCZAK, F.; SATYANARAYANA, K. G.; SYDENSTRICKER, T. H. D. Studies on lignocellulosic fibers of Brazil: Part III – Morphology and properties of Brazilian curaua fibers. **Composites Part A: Applied Science and Manufacturing**, v. 38, p. 2227–2236, 2007.

TURBAK, A. F.; SNYDER, F. W.; SANDBERG, K. R. J. Microfibrillated cellulose, a new cellulose product: properties, uses, and commercial potential. **Journal of Applied Polymer Science. Applied Polymer Symposium**, v. 37, p. 815 – 827, 1983.

UTO, T.; MAWATARI, S.; TOSHIFUMI, Y. Theoretical study of the structural stability of molecular chain sheet models of cellulose crystal allomorphs. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 118, p. 9313–9321, 2014.

VAN DEN BRINK, J. et al. Synergistic effect of *Aspergillus niger* and *Trichoderma reesei* enzyme sets on the saccharification of wheat straw and sugarcane bagasse. **Biotechnology Journal**, v. 9, n. 10, p. 1329-1338, 2014.

VASCONCELOS, R. F.; ARAÚJO, G. T.; ROCHA, A. P. T.; ROCHA, M. T. Cinética de deslignificação do caroá (*Neoglaziovia variegata* (Arr. Cam.) Mez.) por processo organossolve. **Revista Educação Agrícola Superior**, v. 24, n. 2, p.54–61, 2009.

VIANA, L. C. **Desenvolvimento de filmes celulósicos nanoestruturados a partir da madeira de Pinus sp.** 2013. 124 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

VIDAL, A. C. F.; HORA, A. B. Celulose de fibra longa: uma oportunidade para a indústria brasileira? BNDES Setorial, Rio de Janeiro, n. 39, p. 281–342, 2014.

VLASENKO, E. et al. Substrate specificity of family 5, 6, 7, 9, 12, and 45 endoglucanases. **Bioresource Technology**, v.101, p. 2405–2411, 2010.

WANDERLEY, M. C. A. et al. Increase in ethanol production from sugarcane bagasse based on combined pretreatments and fed-batch enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 128, p. 448-453, 2013.

WANG, Y.; CHEN, X., “Carbon nanotubes: a promising standard for quantitative evaluation of AFM tip apex geometry”, **Ultramicroscopy**, v. 107, p. 293–298, 2007.

WEBB, A. D. Vinegar: Starch hydrolysis and alcoholic fermentation. In: Grayson, M., Eckroth, D. Kirk Othmer Encyclopedia of Chemical Technology. 3. ed. New York: John Wiley and son, , 1978, v. 23, 755 p.

WEI, J. H.; SONG, Y. R. Recent advances in study of lignin biosynthesis and manipulation. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 43, n. 8, p. 771–779, 2001.

WEIBEL, M. K.; MYERS, C. D. (SBP Inc.). Use of parenchymal cell cellulose to improve comestibles, US Patent, v. 4, p. 923–981, 1990.

WRIGHT, P. J.; WALLIS, A. F. A. Rapid determination of cellulose in plantation eucalypt woods to predict kraft pulp yields. **Tappi Journal**, v. 81, p.126–130, 1998.

WU, T. H. et al. Diverse substrate recognition mechanism revealed by *Thermotoga maritima* Cel5A structures in complex with cellotetraose, cellobiose and mannotriose. **Biochimica et Biophysica Acta**, n. 1814, p. 1832–1840, 2011.

WUESTENBERG, T. **Cellulose and cellulose derivatives in the food industry: fundamentals and applications**. 2014, 440 p.

WYK, J. P. H. Biotechnology and the utilization of biowaste as a resource for bioproduct development. **Trends Biotechnology**, n. 5, v. 19, p. 172-177, 2001.

XAVIER, L. P. O. **Caroá**. EMPARN Empresa de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Norte. 2 ed., 1982, p. 20.

XIAO, L. P. et al. Impacto of hot compressed water pretreatment on the structural changes of woody biomass for bioethanol production. **BioResources**, v. 6, n. 2, p. 1576–1598, 2011.

YAMANO, H.; HORII, F.; ODANI, H. Structural changes of native cellulose crystals induced by annealing in aqueous alkaline and acidic solutions at high temperatures. **Macromolecules**, v. 22, p. 4130–4132, 1989.

YANG, H. et al. Characteristics of hemicelluloses, cellulose and lignin pyrolysis. **Energy Fuel**, v. 86, p. 1781–1788, 2007.

YINGHUAL, Z.; YUANTING, K. T.; HOSMANE, N. S. **Applications of Ionic Liquids. In Lignin Chemistry in Ionic Liquids - New Aspects for the Future**. Jun-ichi Kadokawa ed., 2013.

YUE, Y. et al. Comparative properties of cellulose nano-crystals from native and mercerized cotton fibers. **Cellulose**, v. 19, p. 1173–1187, 2012.

ZENHAUSERN, F. et al. DNA and RNA polymerase/DNA complex imaged by scanning force microscopy: influence of molecular-scale friction. **Scanning**, v. 14, n. 4, p. 212–217, 1992.

ZHAO, X.; WANG, L.; LIU, D. Technical note peracetic acid pretreatment of sugarcane bagasse for enzymatic hydrolysis: a continued work. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 83, p. 950–956, 2008.

ZHAO, X.; CHENG, K.; LIU, D. Mini-review. Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82, p. 815–827, 2009.

ZHENG, Y.; ZHANG, S.; MIAO, S.; , SU, Z.; PING WANG, P. Temperature sensitivity of cellulase adsorption on lignin and its impact on enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. **Journal of Biotechnology**, v. 166, p. 135–143, 2013.

ZHENG, Y.; MONTY, J.; LINHARDT, R. J. Mini-review. Polysaccharide-based nanocomposites and their applications. **Carbohydrate Research**, v. 405, p. 23–32, 2015.

ZHONG, R.; YE, Z-H. Secondary cell walls: biosynthesis, patterned deposition and transcriptional regulation. **Plant and Cell Physiology**, v. 56, p. 195–214, 2015.

ZHONG, R. et al. Dual methylation pathways in lignin biosynthesis. **Plant Cell**, p. 10, v. 2033–2046, 1998.

ZHU, J. Y.; SABO, R.; LUO, X. L. Integrated production of nano-fibrillated cellulose and cellulosic biofuel (ethanol) by enzymatic fractionation of wood fibers. **Green Chemistry**, v. 13, p. 1339–1344, 2011.

ZHENG, Y.; MONTY, J.; LINHARDT, R. J. Mini-review. Polysaccharide-based nanocomposites and their applications. **Carbohydrate Research**, v. 405, p. 23–32, 2015.