

13° CONGRESSO BRASILEIRO DE POLÍMEROS



CARACTERIZAÇÃO DE NANOCRISTAIS DE CELULOSE OBTIDOS A PARTIR DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR COM TRATAMENTO HIDROTERMICO E SUBSEQUENTE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

Lais A. de Camargo^{1,2} (M), Sandra C. Pereira², Cristiane S. Farinas², José M. Marconcini², Luiz. H. C. Mattoso^{1,2}

¹Universidade Federal de São Carlos, - UFSCar,, São Carlos – SP, <u>laisangelice@gmail.com</u> ²Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Instrumentação, São Carlos, SP, Brasil.

Resumo: Os nanocristais de celulose (NCC) são um material com aplicação em diversos setores da indústria. Nos últimos anos, há uma crescente tendência para o reaproveitamento de resíduos agroindustriais, como na produção de etanol de segunda geração, que após a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar, resta um resíduo fibroso que pode ser reutilizado na produção de produtos de interesse tecnológico. O presente estudo avaliou estes resíduos para a produção de NCC. O bagaço apresentou 54,6% de celulose e foi hidrolisado com extrato enzimático comercial nas quantidades de 7, 12 e 22 mg de proteina/g de celulose. Os resíduos foram purificados com NaOH 5% (m/m) a 55 °C e H_2O_2 35% (v/v) seguido de uma hidrólise a 45 °C com H_2SO_4 60% (m/m) e extração por 30 min. Os NCC apresentaram alto índice de cristalinidade e morfologia adequada, com tamanhos variando entre 193 nm a 246 nm de comprimento e de 17 nm a 30 nm de diâmetro, então os NCC foram produzidos com sucesso neste estudo.

Palavras-chave: Bagaço de cana-de-açúcar, hidrólise enzimática, pré-tratamento hidrotérmico, nanocristais de celulose.

Cellulose nanocrystals characterization obtained from marc of cane sugar with hydrothermal treatment and subsequent hydrolysis enzymatic

Abstract: The cellulose nanocrystals (NCC) is material with application in various sectors of industry and obtained from a variety of natural resources. In recent years, there is a growing trend for the reuse of industrial residues as the second-generation ethanol production, which after enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse, a fibrous residue remains that can be reused in the production of products technological interest. This study evaluated these residues for the production of NCC. The residue showed 54.6% and the pulp was hydrolyzed with commercial quantities of the enzyme extract 7, 12 and 22 mg protein/g of cellulose. The residue was purified with 5% NaOH (w / w) at 55 ° C and 35% H₂O₂ (v/v) followed by hydrolysis at 45°C with H₂SO₄ 60% (m/m) and extracted for 30 min. The NCC showed high levels of crystallinity and proper morphology, with sizes ranging from 193 nm to 246 nm long and 17 nm to 30 nm diameter. Therefore, the NCC was produced successfully in this study, contributing to the economy of the enzymatic route industrially.

Keywords: Bagasse cane sugar, enzymatic hydrolysis pretreatment hydrothermal, cellulose nanocrystals.

1. Introdução

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar. Na safra 2014/2015, 671,69 milhões de toneladas de cana-de-açúcar serão processadas pelas usinas brasileiras (CONAB, 2014) Deste total, estima-se que 1/3 seja correspondente à geração de bagaço. O bagaço é um subproduto que contém teores elevados de carboidratos, sendo composto por 40-45% de celulose, 30-35% de hemicelulose e o restante é principalmente composto por lignina [1, 2 e 3].

A rota de produção de etanol celulósico é promissora e envolve basicamente três etapas, a saber: pré-tratamento da biomassa, hidrólise enzimática e fermentação alcoólica [4 e 5]. Após a

hidrólise enzimática do bagaço, resta um resíduo fibroso sólido que pode ser reaproveitado em outros processos, como a obtenção de celulose purificada e nanocristais (NCC) de celulose.

Nanocristais de celulose são materiais sólidos cristalinos amplamente ordenados e de pequenos diâmetros cilíndricos e alongados obtidos a partir de uma variedade de recursos naturais, geralmente por hidrólise ácida [6]. As propriedades dos nanocristais dependem muito das condições administradas na hidrólise ácida, como tempo e temperatura. Segundo Chen *et al.* (2009), se utilizado ácido sulfúrico de aproximadamente 60% (m/m) é possível produzir nanocristais de celulose com comprimento entre 200 a 400 nm e de 10 nm de largura [7].

Neste sentido, o emprego dos resíduos do processo de sacarificação enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de novos materiais, como os NCC de celulose, para a utilização em diversos setores industriais, entre eles, o de embalagens, torna-se de grande relevância para a economicidade do processo global de produção de etanol celulósico. Com esta motivação, o presente trabalho avaliou a viabilidade de reutilização dos resíduos da hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar hidrotérmico para a produção de NCC de celulose.

2. Materiais e Métodos

2.1. Materiais

Utilizaram-se o bagaço de cana-de-açúcar in natura (BIN) e o bagaço de cana-de-açúcar com pré-tratamento hidrotérmico (BH) (CTBE, Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol). O extrato enzimático comercial Cellic[®]CTec2(Novozymes) foi usado na etapa de hidrólise enzimática.

2.2. Métodos

2.2.1 Preparação da biomassa: O bagaço de cana-de-açúcar com pré-tratamento hidrotérmico (BH) em um reator a 90° C e 10 min (CTBE, Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol) foi lavado e deixado a temperatura ambiente até umidade inferior a 10%, depois foi peneirado com peneira de granulometria de 2 mm.

2.2.2 Caracterização química e morfológica: A composição química das amostras foi determinada de acordo com Gouveia et al. (2009). O índice de cristalinidade (IC%) foi calculado com base no método de Segal et al. (1995), empregando-se a Difração de Raio X (DR-X) em um Shimadzu 6000 com radiação CuK α ($\lambda = 1,54$ Å). As análises microscópicas foram realizadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) equipada com um canhão de emissão de campo (FEG). A morfologia dos NCC foi realizada por Microscopia Eletrônica de Transmissão de Varredura (STEM). As imagens de STEM foram obtidas em equipamento TecnaiTM G2 F20 com um detector de campo claro (BF).

2.2.3 Hidrólise enzimática: O bagaço de cana hidrotérmico (BH) foi submetido à hidrólise enzimática em tampão citrato 0,1 M, pH 5,0 com uma carga de sólidos de 10%. Utilizou-se 7, 12 e 22 mg de proteína por grama de celulose. A atividade enzimática foi previamente determinada de acordo com Ghose (1987). A concentração de proteínas em mg/mL foi determinada pelo método de Bradford [8]. Os ensaios foram realizados a 50 °C e 200 rpm por 24 h. A produção de glicose foi monitorada por um kit enzimático (Doles, Brasil).

2.2.4 Purificação do resíduo: A etapa de purificação seguiu a metodologia de Teixeira *et al.* (2011). Adicionou-se 100 mL de NaOH 5% (m/m) a 55 °C. Em seguida, adicionou-se 5 g do resíduo da hidrólise enzimática (RHE) e 43 mL de H_2O_2 35% (v/v) sob agitação magnética por 1,5 h. A solução foi filtrada a vácuo em funil de Buchner, lavando-se o resíduo até meio neutro (pH=7). Este material foi seco a 70 °C em estufa para as análises de caracterização [9].

2.2.5 *Hidrólise ácida:* A etapa de hidrólise ácida seguiu a metodologia de Teixeira *et al.* (2011), sendo que 5 g do resíduo da hidrólise enzimática após a purificação (RHEP) foi disperso em 100 mL de H_2SO_4 60% (m/m) a 45 °C sob agitação vigorosa por 30 min. Em seguida, adicionou-se 500

mL de água deionizada a baixa temperatura para interromper a reação de hidrólise. O H_2SO_4 foi parcialmente removido por centrifugação a 10.000 rpm por 10 min, seguida de diálise em água com uma membrana de celulose até pH 7. A suspensão foi sonicada durante 5 min, congelada e liofilizada para posterior análise.

3. Resultados e Discussão

Os teores de celulose, hemicelulose e lignina para bagaço *in natura* (BIN), bagaço prétratado hidrotérmico (BH) e para os resíduos da hidrólise enzimática a partir da hidrólise realizada com as cargas de enzimas de 7 (RHE-7), 12 (RHE-12) e 22 mg de proteína/g de celulose (RHE-22) estão apresentados na Tabela 1.

	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)
BIN	46,6	26,5	21,7
BH	54,6	6,5	33,4
RHE-7	53,6	4,8	30,6
RHE-12	49,1	4,4	34,4
RHE-22	42,9	4,0	34,5

Tabela 1. Composição do material lignocelulósico (%)

A purificação dos resíduos possibilitou a remoção da lignina residual, permitindo uma maior exposição de celulose, como pode ser observado pela variação entre o índice de cristalinidade do RHE para o resíduo da hidrólise enzimática purificado RHEP na Tabela 2. Este processo gerou um material composto por alto teor de celulose cristalina, demostrando que este resíduo sólido apresentou maior potencial para a etapa de hidrólise ácida. A Figura 1 apresenta o DR-X das amostras de BH, resíduos da hidrólise enzimática (7, 12 e 22), resíduo branqueado e os respectivos NCC.

Tabela 2. IC (%) das amostras de BH para RHE, RHEP e NCC

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



Figura 1. Difratograma de Raios-X para: (A) BH - 7, (B) BH - 12 e (C) BH - 22

Os difratogramas exibiram picos típicos de polimorfos de celulose I (a $2\theta \sim 15,7^{\circ}$ e $22,4^{\circ}$) e alguns NCC apresentaram uma mistura de polimorfos de celulose I e celulose II (a $\sim 11,6^{\circ}$ e $22,1^{\circ}$) [10 e 11].

Comparando-se os difratogramas observamos para as amostras de NCC, uma diminuição da porção amorfa, onde os NCC apresentaram em média um índice de cristalinidade de IC% = 79,2% e uma mudança no perfil do difratograma com o aparecimento em alguns casos de picos de celulose tipo II. Efeitos semelhantes foram observados por Teixeira *et al.* (2011) com NCC de bagaço de

cana-de-açúcar e Chen *et al.*(2009) para NCC de fibras de casca de ervilha [7 e 9].Portanto, os NCC produzidos apresentaram alto IC% e com valores muito próximos, independente do material de partida, mostrando que o método de obtenção se adequa a ambas as matrizes estudadas. A figura 2 exibem curvas TG e DTG para as amostras de BH. As propriedades térmicas do BEX e BH estão apresentadas na tabela 3 seguir.



Figura 2. Curvas TG/DTG para as amostras de BH: (A) DTG (B) TG

A T_{max} dos resíduos apresentam temperaturas mais elevadas do que comparado com os NCC, revelando que estes apresentam uma maior estabilidade térmica. A T_{onset} para o RHE-BH variou aproximadamente de 290°C a 300°C e para o NCC -BH de 238°C a 261°C. Estes dados mostram os NCC apresentam menor estabilidade térmica do que suas fibras de partida, o que de acordo com Teixeira, *et. al.* (2010) é atribuída à etapa de hidrólise com ácido sulfúrico que diminui a termoestabilidade dos cristais de celulose. Isto ocorre, pois as cadeias de celulose que contêm grupos sulfato sofrem degradação em temperaturas mais amenas e, além disso, a substituição de grupos OH por grupos sulfato reduz a ativação de energia para degradação da cadeia de celulose [12 e 11].

	% Voláteis	% Resíduo	T onset (°C)	T max. (°C)
BH	3,52	1,48	298,09	315,11
RHE 7	2,80	1,35	290,16	318,49
RHE 12	2,03	0,70	300,58	319,81
RHE 22	3,50	2,44	295,01	317,46
NCC 7	7,16	6,12	261,99	279,45
NCC 12	4,87	4,97	238,52	271,28
NCC 22	3,36	3,41	246,73	272,26

Tabela 3. Propriedades térmicas do BH

A morfologia dos NCC foi estuda a partir de micrografias de MET como apresentado na Figura 3.



Figura 3. Micrografia de MET para o NCC do BH: (A) NCC 7, (B) NCC 12 e (C) NCC 22

A partir da micrografia de MET é possível observar que os NCC foram sintetizados com sucesso. Os comprimentos (L) e diâmetros (D) dos NCC bem como seus respectivos erros estão apresentados na Tabela 3 e foram calculados com o software ImageJ com cerca de 50 NCC.

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

Tabela 4. Comprimento e diâmetro médio para os NCC de BH

Os diâmetros medidos foram semelhantes às estruturas nanométricas derivados de outras fontes de agroresíduos, como diretamente do bagaço de cana-de-açúcar ((D) = 255 ± 55 nm e (L) = 8 ± 3 nm) [9], do bagaço de mandioca (2-11 nm) [13], de resíduos de algodão ((D) = 135 ± 50 nm e (L) = 14 ± 4 nm) [12]. As diferenças observadas nos NCC produzidos já eram esperadas devido aos consecutivos processos físico-químicos as quais o material é submetido até chegar à etapa de hidrólise ácida.

4. Conclusão

Os NCC obtidos a partir dos resíduos da rota enzimática de produção de etanol celulósico são um material de alto valor agregado com aplicação em diversos setores e foram produzidos com sucesso neste trabalho. Assim, a utilização dos resíduos para a produção de novos materiais como nanocristais de celulose para a utilização em diversas áreas da indústria, entre elas a de embalagens, contribui para o desenvolvimento da rota tecnológica de produção de etanol celulósico.

5. Referências

1. SUN, J. X. et al. Polym. Degrad. Stabil., v. 84, n. 2, p. 331-339, 2004.

2. PEREIRA, P. H. F. et al.. Bioresources, v. 6, n. 3, p. 2471-2482, 2011.

3. LIMA, M. A. et al. Biotechn. for Biof., v. 7, 18 2014.

4. AITA, G. A.; SALVI, D. A.; WALKER, M. S. Biores. Technol., v. 102, n. 6, p. 4444-4448, 2011.

5. HAAFIZ, M. K. M. et al. Carbohyd. Polym., v. 103, p. 119-125, 2014.

- 6. CHEN, Y. et al. Carbohyd. Polym., v. 76, n. 4, p. 607-615, 2009.
- 7. BRADFORD, M. M., v. 72, n. 1–2, p. 254, 1976.
- 8. TEIXEIRA, E. D. et al. Ind. Crop. Prod., v. 33, n. 1, p. 63-66, 2011.
- 9. GOUVEIA, E. R. et al. Quim. Nova, v. 32, n. 6, p. 1500-1503, 2009.
- 10. KLEMM, D. et al. Angew. Chem. Int. Edit., v. 44, n. 22, p. 3358-3393, 2005.
- 11. TEIXEIRA, E. D. et al. Cellulose, v. 17, n. 3, p. 595-606, 2010.
- 12. ROMAN, M.; WINTER, W. T. Biomacrom., v. 5, n. 5, p. 1671-1677, 2004.
- 13. TEIXEIRA, E. D. M. et al. Carbohyd. Polym., v. 78, n. 3, p. 422-431, 2009.