

Isolamento e caracterização de nanofibras de celulose de engaços de dendê obtidas por hidrólise enzimática

Eliane da Silva Simplicio¹, Dasciana de Sousa Rodrigues², Fabrício Machado Silva³, Leonardo Fonseca Valadares⁴

Resumo

A obtenção de nanofibras de celulose por hidrólise enzimática, no contexto do aproveitamento de biomassa lignocelulósica, tem sido explorada como uma rota promissora nos últimos anos. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho consiste no isolamento e caracterização de nanofibras de celulose de engaços de dendê obtidas por hidrólise enzimática, avaliando diferentes tempos de reação. O isolamento da celulose foi realizado com solução de clorito de sódio (2%) acidificado com solução aquosa de ácido acético 1:1 e solução de hidróxido de potássio (6%). A hidrólise da celulose foi efetuada em três condições de tempo (24, 48 e 72 horas), utilizando complexo de celulases comercial a 50 °C. As enzimas foram inativadas após transcorrer o tempo de hidrólise pelo aquecimento a 98 °C por uma hora. A caracterização foi conduzida por colorimetria de reflectância, microscopia eletrônica de transmissão (MET), difratometria de raios-X (DRX) e termogravimetria (TG). A fração celulósica isolada apresentou rendimento igual a 36,97%, cristalinidade avaliada em 59,92% e elevado grau de branqueamento. Na hidrólise enzimática, com o aumento do tempo de reação, houve um decréscimo na cristalinidade e na espessura das fibras celulósicas, com morfologia fina, alongada e altamente entrelaçada. Observou-se um comportamento térmico semelhante para as amostras estudadas. No entanto, a melhor condição de obtenção de nanocelulose foi em 48 horas de reação, visto o índice de cristalinidade evidenciado (62,57%), comportamento térmico estável e a diferença não acentuada na espessura da fibra, comparado ao material obtido em 72 horas de reação, o que não justifica gasto adicional de tempo e energia com manutenção do processo.

¹ Química, mestranda em Tecnologias Química e Biológica, Universidade de Brasília, eliane.simplicio@colaborador.embrapa.br

² Química Industrial, doutora em Engenharia Química, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, dasciana.rodrigues@embrapa.br

³ Engenheiro Químico, doutor em Engenharia Química, Universidade de Brasília, fmachado@unb.br

⁴ Químico, doutor em Química, pesquisador da Embrapa Agroenergia, leonardo.valadares@embrapa.br

Introdução

A busca por novas fontes de matérias-primas, disponíveis em grande escala e competitivas econômica e ambientalmente tem sido foco de inúmeras discussões em caráter mundial. Aliado à dependência generalizada de insumos de origem petroquímica, torna-se primordial dispor de alternativas locais que contribuam para a manutenção das atividades na indústria. Com isso, a biomassa lignocelulósica vem sendo explorada em processos graças à grande quantidade de resíduos agroindustriais produzidos anualmente e ao fato de estes serem subutilizados dentro das cadeias de produção em que são gerados, o que é de interesse para o Brasil, visto a oportunidade de gerar novas tecnologias e produtos (CORTEZ, 2010).

Nessa perspectiva, a dendeicultura no País consiste de uma cadeia produtiva atrativa, fornecendo resíduos lignocelulósicos como os engaços de dendê, utilizados em diversas finalidades nesse setor, visando à geração de renda. A biomassa lignocelulósica é composta por três principais frações: celulose (40-50%), hemicelulose (15-25%) e lignina (15-25%), dentre outros constituintes. A partir de processos adequados de conversão, pode-se obter biocombustíveis, materiais renováveis e produtos químicos de interesse comercial. Para isso, podem ser empregados métodos químicos, físicos, biológicos ou combinados, selecionados de acordo com as características da matéria-prima, rendimento e viabilidade em escala industrial (CORTEZ, 2010; ROSILLO-CALLE et al., 2005).

A fração celulósica para a ciência de materiais pode contribuir significativamente como uma fonte precursora de matéria-prima na obtenção de inúmeros produtos de caráter renovável, inéditos e de elevado valor agregado. Nesse âmbito, com os conhecimentos no campo da nanotecnologia, a produção e aplicação de fibras celulósicas de escala nanométrica como alternativa de agente de reforço para matrizes variadas, possibilita a melhoria das propriedades físicas e químicas dessa matéria-prima, sobretudo para a síntese de biomateriais e nanocompósitos.

Na literatura, a obtenção de nanoestruturas de celulose é reportada por meio de processos mecânicos e hidrólise seletiva da celulose. Esta última deve ser realizada na presença de catalisadores, tendo duas possibilidades: ácidos inorgânicos (H_2SO_4 , HCl e H_3PO_4) ou enzimas (celulases). Embora a hidrólise ácida seja o método consolidado atualmente, o uso de celulases vem sendo

avaliado como uma rota alternativa e promissora, apresentando como principais vantagens condições operacionais mais brandas de temperatura, pH e a eliminação de problemas com a corrosão de equipamentos e a alta especificidade por substrato celulósico elucidada (BONONI, 2010). Nesse sentido, o objetivo deste trabalho consiste na obtenção e caracterização de nanofibras de celulose de engaços de dendê isoladas por hidrólise enzimática, considerando diferentes tempos de reação.

Materiais e métodos

Purificação da celulose de engaços de dendê

A metodologia descrita a seguir é adaptada de Fahma et al. (2010). A remoção da fração de lignina foi realizada com solução de clorito de sódio 2% acidificado com solução aquosa de ácido acético 1:1 e a fração de hemicelulose foi removida com solução de hidróxido de potássio (6%). Esse procedimento foi realizado em dois ciclos. Para o experimento, foram adicionados 50 g de engaços de dendê secos, moídos e sem extrativos (5%) para um sistema aquoso (1.000 mL). Para cada ciclo foram realizadas quatro extrações, adicionando-se 25 g clorito de sódio Sigma Aldrich (80%) e acidificando o sistema com 6 mL de solução aquosa de ácido acético 1:1, e uma extração adicionando-se 70,59 g de hidróxido de potássio Tedia Brasil (85%). Cada extração teve a duração de 24 horas sob agitação à temperatura ambiente, seguido de lavagem até pH neutro. O teor de sólidos foi determinado em triplicata.

Hidrólise enzimática de celulose de engaços de dendê

Para a realização da hidrólise enzimática de celulose, utilizou-se complexo de celulasas comercial com atividade igual a 41,7 FPU/mL. Primeiramente, pesou-se em balança analítica aproximadamente 20 g de polpa de celulose em triplicata. Cada alíquota foi inserida em um Erlenmeyer de 125 mL, juntamente com 0,2 mL de solução de tampão citrato de sódio/ácido cítrico 0,1 M, pH 5 e o respectivo volume de celulasas comercial. Os sistemas foram incubados em *shaker* sob agitação a 250 rpm a 50 °C. As reações foram interrompidas após 24, 48 e 72 horas de tempo de hidrólise. A inativação enzimática foi realizada por meio de aquecimento a 98 °C por 1 hora, seguida de lavagem até pH neutro.

Caracterização química e morfológica

Para a análise por microscopia eletrônica de transmissão (MET), uma alíquota de cada amostra foi diluída, sonicada e adicionada em “grids” de cobre e armazenadas em dessecador. As micrografias foram registradas em microscópio eletrônico de transmissão JEOL - JEM/1011, a 80 kV. A análise das dimensões (comprimento e espessura) das nanofibras foi realizada com o programa ImageJ, pela medida de cerca de 200 nanoestruturas.

Para a difratometria de raios-X, as amostras foram secas por 48 horas a 78 °C e analisadas em difratômetro Bruker/D8 Focus, potência de 40 kV, 30 mA e radiação de $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda=1,54 \text{ \AA}$), a uma velocidade de 0,5°/minuto no intervalo de ângulos 2θ variando de 5° a 40°. O índice de cristalinidade (IC) foi determinado de acordo com a equação proposta por Segal et al. (1959), a partir da intensidade de difração dos picos: $2\theta = 18^\circ$ e $22,6^\circ$.

Para a colorimetria de reflectância [considerou-se os valores da escala CIEL*a*b*, em que L^* é a luminosidade, a^* é a coordenada que descreve o vermelho (+) e o verde (-) e o b^* é a coordenada para o amarelo (+) e o azul (-)] e termogravimetria, as amostras foram secas a 78 °C por 24 horas e analisadas em colorímetro Konica Minolta, modelo CR-400 com fundo branco e no equipamento Shimadzu DTG-60H. Foram pesadas entre 8 mg e 10 mg de cada amostra em cadinho de platina e analisadas a uma faixa de aquecimento de 25 °C até 900 °C com taxa de aquecimento de 10 °C/min, em atmosfera de nitrogênio (N_2) com fluxo de 50 mL/min^{-1} .

Resultados e discussão

O processo de polpação da celulose apresentou rendimento igual a 36,97% (com base no teor de sólidos), elevado grau de branqueamento e cristalinidade avaliada em 59,92% (Tabela 1). Para os hidrolisados gerados, as micrografias confirmam a obtenção de fibras em escala nanométrica, evidenciada pela diminuição da espessura destas com o aumento do tempo de hidrólise, apresentando morfologia fina, alongada e altamente entrelaçada (Figura 1).

Essa informação comprova a atividade efetiva e sinérgica das celulasas sobre a estrutura da fibra celulósica, embora não seja observada a redução no comprimento das mesmas (característica acentuada da fibra de engajo de

dendê), o que não restringe e nem compromete a ação enzimática, propriedades e aplicações avaliadas para esse material (Tabela 1).

Tabela 1. Valores de cristalinidade, comprimento, espessura e coloração de biomassa, fibra celulósica e nanofibras de celulose (NFC) em diferentes tempos de hidrólise.

Material	Cristalinidade (%)	Espessura (nm)	Comprimento (nm)	Coloração (L*; a*; b*)
Engaço de dendê	27,38	-	-	43,38; 4,57; 17,49
Fibra de celulose	59,92	$11,0 \times 10^3 \pm 3,9 \times 10^3$	$190 \times 10^3 \pm 106 \times 10^3$	95,15; -0,46; 5,07
NFC – 24 horas	69,57	$17,4 \pm 7,3$	$782,1 \pm 341,2$	95,78; -0,69; 6,96
NFC – 48 horas	62,57	$12,9 \pm 6,2$	$414,2 \pm 207,0$	96,60; -0,52; 6,40
NFC – 72 horas	49,68	$11,8 \pm 5,9$	$640,4 \pm 384,2$	96,01; -0,77; 6,07

Com isso, a melhor condição de tempo de hidrólise apresentada foi em 48 horas de reação, visto que, com 24 horas de reação, observam-se fibras não hidrolisadas e, com 72 horas de reação, não há uma diminuição significativa, principalmente na espessura das nanofibras, em comparação ao material obtido em 48 horas de reação. O termograma gerado (Figura 2A) mostra que, com o aumento do tempo de hidrólise, as nanofibras apresentaram uma temperatura maior de degradação em relação à fibra de engaço de dendê e de celulose. Entretanto, essa diferença não é acentuada, sugerindo que as amostras de nanofibras apresentam comportamentos térmicos semelhantes.

A partir do índice de cristalinidade calculado por meio do difratograma de raios-X construído (Figura 2B), verifica-se que, com 24 horas de hidrólise enzimática, ocorreu o aumento da cristalinidade da nanofibra, comparado à fibra celulósica de engaço de dendê (59,92%).

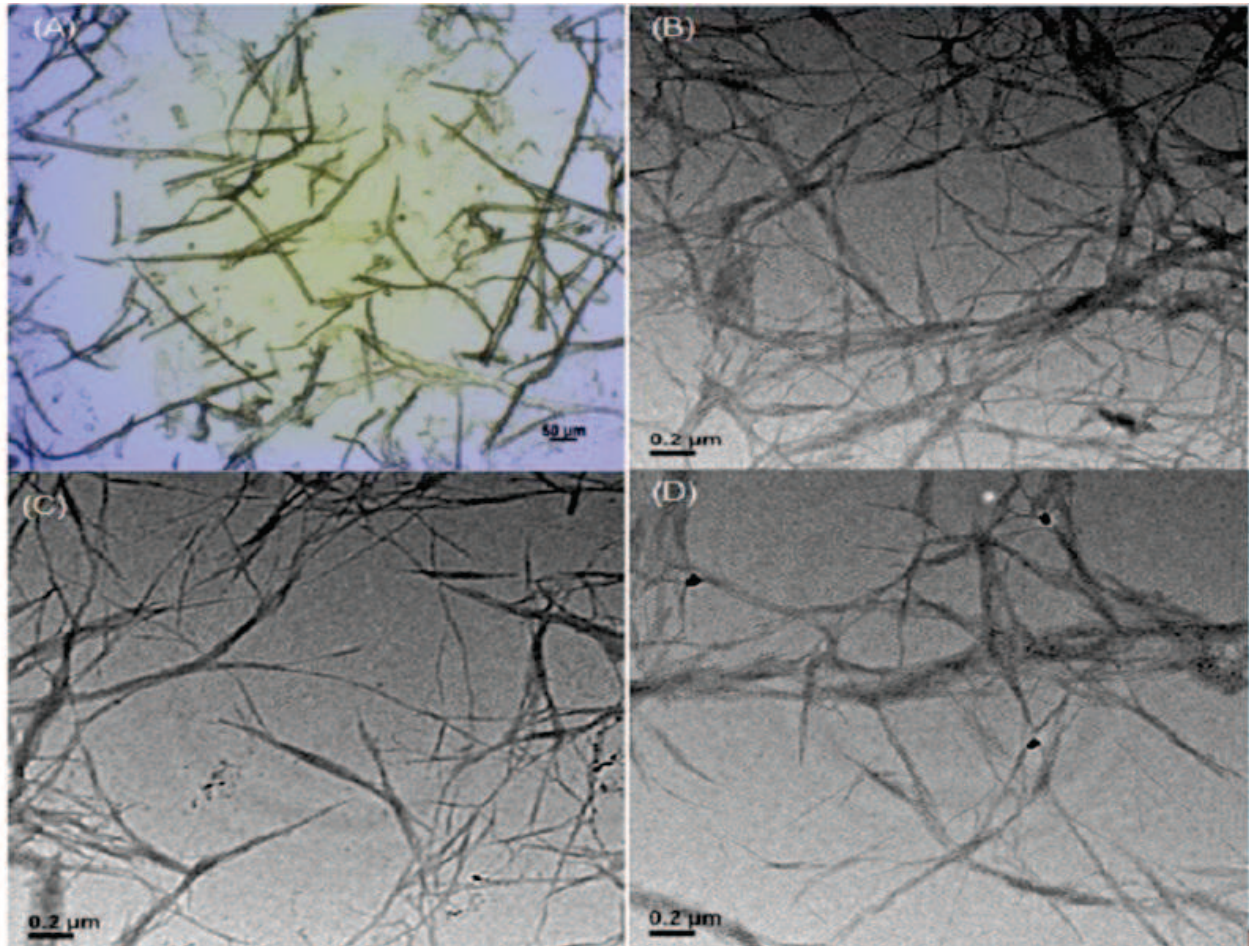


Figura 1. Micrografias registradas por microscopia de luz (A) e por microscopia eletrônica de transmissão (MET) (B, C e D): (A) fibra de celulose de engaços de dentê, (B) nanofibra de celulose em 24 horas, (C) nanofibras de celulose em 48 horas e (D) nanofibras de celulose em 72 horas.

Entretanto, com o aumento do tempo de reação, ocorreu a diminuição da cristalinidade do material (Tabela 1). Tal resultado sugere que, com o aumento do tempo de reação, as enzimas, após hidrolisar a parte amorfa do material, começam a agir sobre a celulose cristalina, diminuindo a fração de cadeias cristalinas da mesma.

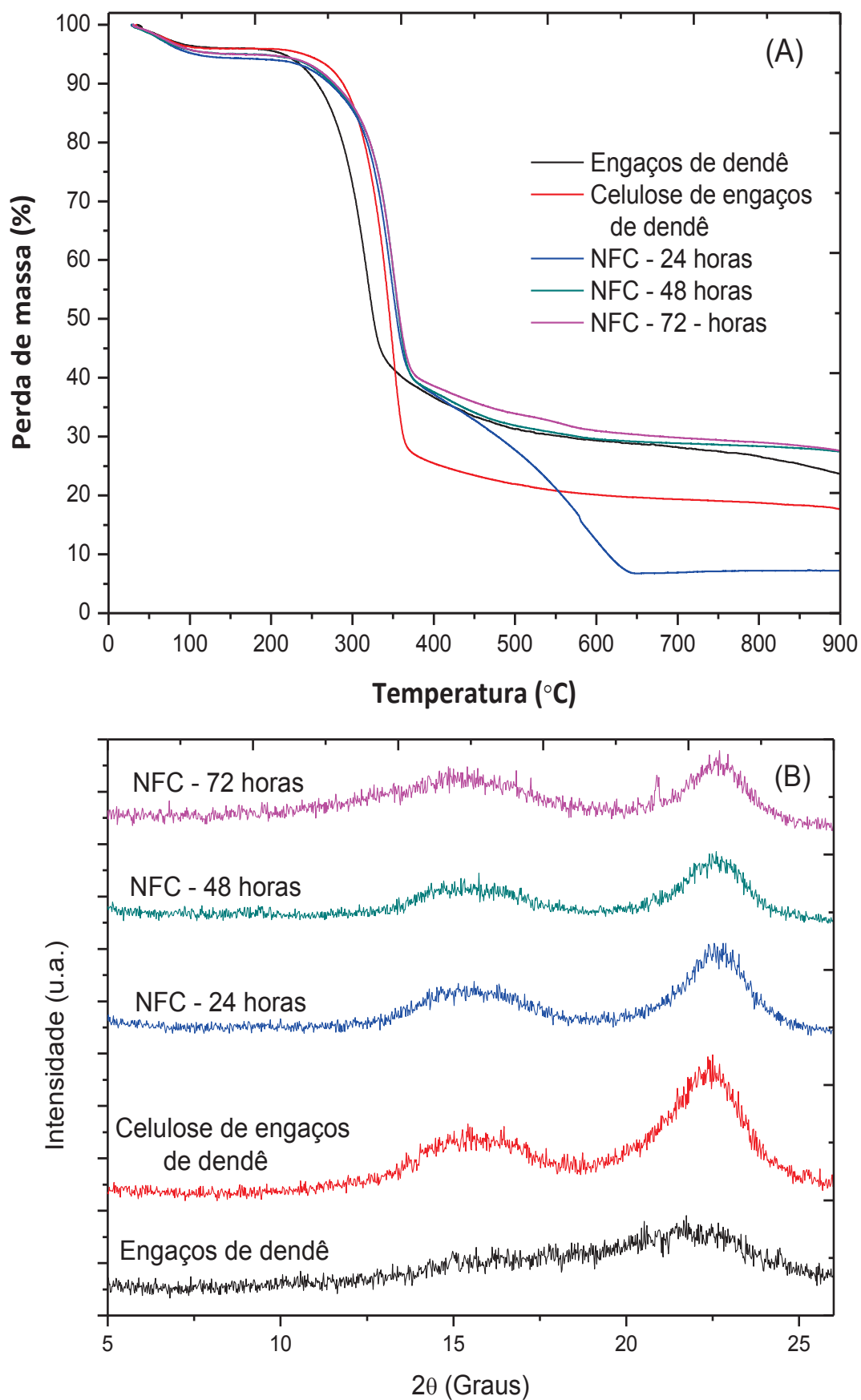


Figura 2. Caracterização de amostras de fibra de engaços de dendê, fibra celulósica e nanofibras (24, 48 e 72 horas): (A) Termograma e (B) Difratoograma de raios-X.

Conclusões

Constatou-se que a melhor condição de isolamento de nanofibras por hidrólise enzimática da celulose de engaços de dendê foi alcançada durante 48 horas de reação, apresentando cristalinidade elevada (62,57%) e morfologia fina (12,9 nm), alongada, altamente entrelaçada. O valor encontrado para a espessura das nanofibras nesse tempo se mostrou semelhante ao verificado em 72 horas de reação, o que não justifica custos adicionais com energia e tempo para a manutenção do processo, visto também a diminuição da cristalinidade da fibra celulósica (49,68 %) nessa condição. Os resultados obtidos contribuem quanto ao uso de tecnologias químicas e biológicas direcionadas à ciência de materiais, visando à produção de fibras celulósicas de escala nanométrica.

Apoio financeiro

Os autores agradecem à Capes e ao CNPq. Particularmente, E. Simplicio agradece à Capes (Capes/Embrapa, Projeto n° 086404/2014), pela concessão de bolsas.

Referências

- BONONI, A. Workshop hidrólise de material lignocelulósico. In: CORTEZ, L. A. B. (Coord.). **Bioetanol de cana-de-açúcar: p&d para produtividade e sustentabilidade**. São Paulo: Blucher, 2010.p. 679-695.
- CORTEZ, L. A. B. (Coord.). **Bioetanol de cana-de-açúcar: p&d para produtividade e sustentabilidade**. São Paulo: Blucher, 2010. 992 p.
- FAHMA, F.; IWAMOTO, S.; HORI, N.; IWATA, T.; TAKEMURA, A. Isolation, preparation, and characterization of nanofibers from oil palm empty-fruit-bunch (OPEFB). **Cellulose**, Dordrecht,, v. 17, n. 5, p. 977-985, 2010.
- ROSILLO-CALLE, F.; BAJAY, S. V.; ROTHMAN, H. (Org.). **Uso da biomassa para produção de energia na indústria brasileira**. Campinas: UNICAMP, 2005. 447 p.
- SEGAL, L.; CREELY, J. J.; MARTIN, A. E.; CONRAD, C. M. An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer. **Textile Research Journal**, Princeton, v. 29, n. 10, p. 786-794, 1959.