

Produção de nanofibras de algodão: uso de hidrólise enzimática para a quebra da celulose

Caroline Cibir Ribeiro¹, Larissa Andreani², Felipe Brandão de Paiva Carvalho³, Simone Monteiro⁴, Leonardo Fonseca Valadares⁵

Resumo

A crescente conscientização em relação à sustentabilidade impulsiona a utilização do método bioquímico para a produção de nanoestruturas, o qual oferece a vantagem de operar em condições suaves. Este estudo tem como objetivo produzir nanofibras de celulose a partir de fibras de algodão via rota enzimática, sem processos químicos adicionais. Enzimas comerciais de *Trichoderma reesei* foram empregadas para obter microfibras e nanofibras de celulose em formato agulha. Após 96 horas de hidrólise, as nanofibras apresentaram dimensões médias de 289 nm de comprimento e 33 nm de espessura, com potencial Zeta de $-15,7 \pm 1,7$ mV e $-12,0 \pm 2,3$ mV em dispersões aquosas de 0,01 M KCl e 0,01 M KNO_3 , respectivamente. A reação resultou em um rendimento de 7,5% de nanofibras isoladas.

Termos para indexação: nanopartículas, processamento coloidal, celulose de algodão, hidrólise enzimática, microscopia eletrônica de transmissão.

Introdução

O desenvolvimento de materiais biodegradáveis de alto desempenho tem atraído o interesse da comunidade científica como uma possibilidade para reduzir o uso de plásticos e mitigar o impacto ambiental. Neste contexto, a conversão da celulose em nanopartículas assume relevância para o desenvolvimento de novos compósitos, em áreas como saúde e alimentos (Jacob, 2022). Contudo, enfrenta-se o desafio de obter nanomateriais com viabilidade econômica e sustentabilidade ambiental. Para superar essa questão, a hidrólise enzimática surge como uma alternativa promissora, oferecendo maior seletividade por meio da ação da celulase, ao mesmo tempo em que reduz os custos de produção e minimiza os resíduos químicos prejudiciais.

Dentre as fontes naturais, incluindo resíduos agroindustriais e madeira, o algodão emerge como uma opção promissora para a obtenção de nanocelulose, em razão da sua ampla disponibilidade e do seu alto teor de celulose. Além disso, o algodão não requer etapas adicionais de remoção de hemicelulose e lignina, o que pode reduzir custos de operação (Jacob, 2022).

No entanto, a hidrólise enzimática do algodão ainda é um desafio, por causa da recalcitrância de sua celulose, o que resulta em um número limitado de estudos nessa área. Satyamurthy et al. (2011) obtiveram nanofibras de algodão por meio da hidrólise da celulose microcristalina usando o fungo *T. reesei*, embora as fibras de algodão tenham sido pré-tratadas com ácido clorídrico antes do ataque enzimático. Meyabadi e Dadashian (2012) realizaram hidrólise enzimática de resíduos de fibras de algodão para a produção de nanoesferas de celulose. Hiden et al. (2016) combinaram tratamento enzimático com fibrilação mecânica e obtiveram uma rede de nanofibrilas de algodão. Notavelmente,

¹ Engenheira química, mestranda em Engenharia Química, Universidade Federal de Goiás, caroline.ribeiro@colaborador.embrapa.br

² Química, doutora em Química, analista da Embrapa Agroenergia, larissa.andreani@embrapa.br

³ Engenheiro de bioprocessos e biotecnologia, mestre em Tecnologias Químicas e Biológicas, analista da Embrapa Agroenergia, felipe.carvalho@embrapa.br

⁴ Engenheira de alimentos, doutora em Engenharia de Alimentos, professora da Universidade de Brasília, simonems@unb.br

⁵ Químico, doutor em Química, pesquisador da Embrapa Agroenergia, leonardo.valadares@embrapa.br

esses dois estudos não alcançaram a morfologia desejável de nanofibras em formato de agulha. Neste trabalho, apresentamos uma nova metodologia para a produção de nanofibras em formato de agulha a partir de algodão, utilizando a hidrólise enzimática, sem tratamentos químicos adicionais.

Materiais e métodos

O algodão empregado neste estudo é algodão hidrófilo, comercializado pela marca Farol. O acetato de sódio tribásico PA e o ácido cítrico anidro PA foram obtidos das marcas Êxodo científica e Dinâmica Química Contemporânea, respectivamente. O coquetel enzimático *Celluclast*[®] de *Trichoderma reesei* foi obtido da Sigma Aldrich.

Hidrólise enzimática

Os extrativos das fibras de algodão hidrofílicas comerciais foram removidos com extração acelerada por solvente (Thermo Scientific, Dionex ASE-350) usando uma solução de éter de petróleo e etanol (2:1) a 105 °C. Os processos enzimáticos foram realizados com uma carga enzimática de 30 FPU/g utilizando o coquetel enzimático *Celluclast*[®], com atividade inicial de FPase de 40,7 FPU/mL. Uma carga de substrato de 0,5% (m/v) foi embebida em um tampão de citrato de sódio/ácido cítrico (50 mM, pH 4,8), e a reação foi realizada a 50 °C, sob agitação constante a 200 rpm em *shaker*. As amostras foram retiradas do agitador nos tempos especificados e aquecidas a 95 °C por 45 minutos para desativar as enzimas.

Separação de celulose

As enzimas, a solução tampão e o açúcar foram removidos da dispersão coloidal de celulose por meio de centrifugação (Beckman Coulter, Optima-XE100) a 35.000 g por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado, e o sedimento foi redisperso em água destilada. O processo foi repetido três vezes. As amostras foram sonicadas com um processador ultrassônico (Sonics & Materials, GEX500) por 30 minutos a 200 W.

As microfibras e nanofibras de celulose foram separadas por meio de uma série de etapas de centrifugação sequenciais. Inicialmente, a amostra foi submetida à centrifugação a 5.000 g por 15 minutos, onde o sobrenadante foi coletado. O sedimento foi redisperso em água destilada e submetido à centrifugação sob os mesmos parâmetros. Esse procedimento foi repetido três vezes. Posteriormente, todos os sobrenadantes coletados foram submetidos a uma etapa final de centrifugação a 16.000 g por 15 minutos. Isso resultou em três frações, denominadas F1 (material sedimentado a 5.000 g), F2 (material sedimentado a 16.000 g) e F3 (sobrenadante a 16.000 g). Por fim, todas as frações foram liofilizadas. Os rendimentos de microfibras e nanofibras foram determinados por gravimetria.

Caracterização das fibras

A morfologia das fibras de celulose do algodão foi analisada por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) (Zeiss, SIGMA-HV) a 30 kV. Para as análises, uma gotícula de amostra obtida após 96 horas de hidrólise foi depositada sobre grade de microscopia recoberta (400 *mesh*) e armazenada em dessecador. Aproximadamente 150 medições das dimensões de fibras foram realizadas em cada fração, com base nas imagens de MET, usando o software *ImageJ*. O comportamento coloidal foi avaliado por meio de medidas de potencial Zeta (Brookhaven, ZetaPALS). As amostras liofilizadas foram redispersas em água destilada a 4% (m/v) e sonicadas por 10 minutos usando o processador ultrassônico. As suspensões foram diluídas em 1:100 (v/v) em cloreto de potássio 0,01 M (KCl) e nitrato de potássio 0,01 M (KNO₃).

Determinação de glicose

Para avaliar o progresso da hidrólise enzimática, que transforma as cadeias de celulose em fibras menores e glicose, o conteúdo de glicose no sobrenadante foi quantificado a 45 °C usando cromatografia líquida de alta eficiência. A análise foi conduzida em sistema HPLC Agilent (1260 Infinity) equipado com uma coluna Bio-Rad (Aminex HPX-87H) e um detector de índice de refração.

Resultados e discussão

Caracterização das fibras

A Figura 1 apresenta as imagens de microscopia eletrônica de transmissão das frações centrifugadas após a hidrólise enzimática do algodão. A Fração F1 contém microfibras com dimensões maiores que 3 μm , bem como nanofibras (Figura 1a, b), apresentando médias de comprimento de 652 ± 641 nm e espessura de 124 ± 168 nm. A Fração F2 apresentou uma redução na presença de microfibras (Figura 1c, d) em comparação com a F1, resultando em dimensões médias de 508 ± 240 nm de comprimento e 37 ± 23 nm de espessura. Por outro lado, a Fração F3, que consiste em partículas que não sedimentaram a 16.000 g, exibiu morfologia em formato de agulha, com dimensões de 377 ± 127 nm de comprimento e 29 ± 12 nm de espessura (Figura 1e, f).

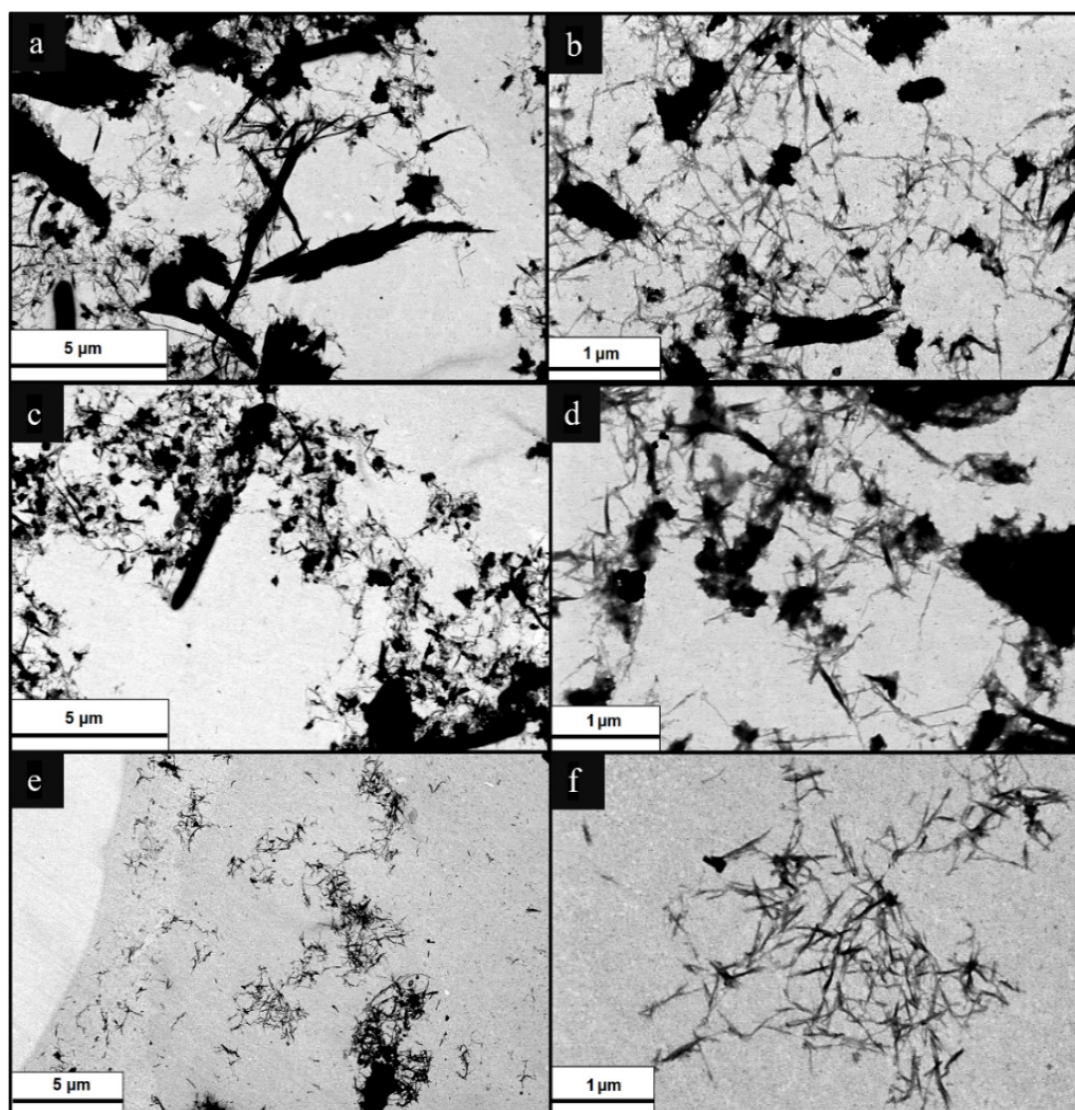


Figura 1. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET) das frações de celulose: (a, b) F1; (c, d) F2; (e, f) F3.

A fração F3 representa as nanofibras de celulose isoladas obtidas por hidrólise enzimática, caracterizadas por um comprimento médio de 377 nm e uma espessura de 29 nm. Essas dimensões são consistentes com resultados da literatura para nanofibras de celulose obtidas por um processo combinado de hidrólise enzimática e homogeneização de alta pressão, com comprimentos médios entre 100 nm e 250 nm e espessuras entre 5 nm e 10 nm (Zhai et al., 2021). Além disso, estudos anteriores relataram dimensões semelhantes para nanofibras obtidas por hidrólise com ácido clorídrico e posterior hidrólise com *T. reesei*, com dimensões médias de 120,3 nm de comprimento e 29,7 nm de espessura (Satyamurthy et al., 2011).

A presença de fibras nanométricas em todas as frações pode ser atribuída ao fenômeno conhecido como “arraste de partículas” durante a centrifugação, em que partículas maiores carregam partículas menores, incorporando as nanofibras no sedimento, mesmo com forças centrífugas relativamente baixas (Rickwood; Graham, 2015).

Rendimento

A Figura 2 avalia o progresso das reações de hidrólise, por meio do rendimento de microfibras e nanofibras e da produção de glicose.

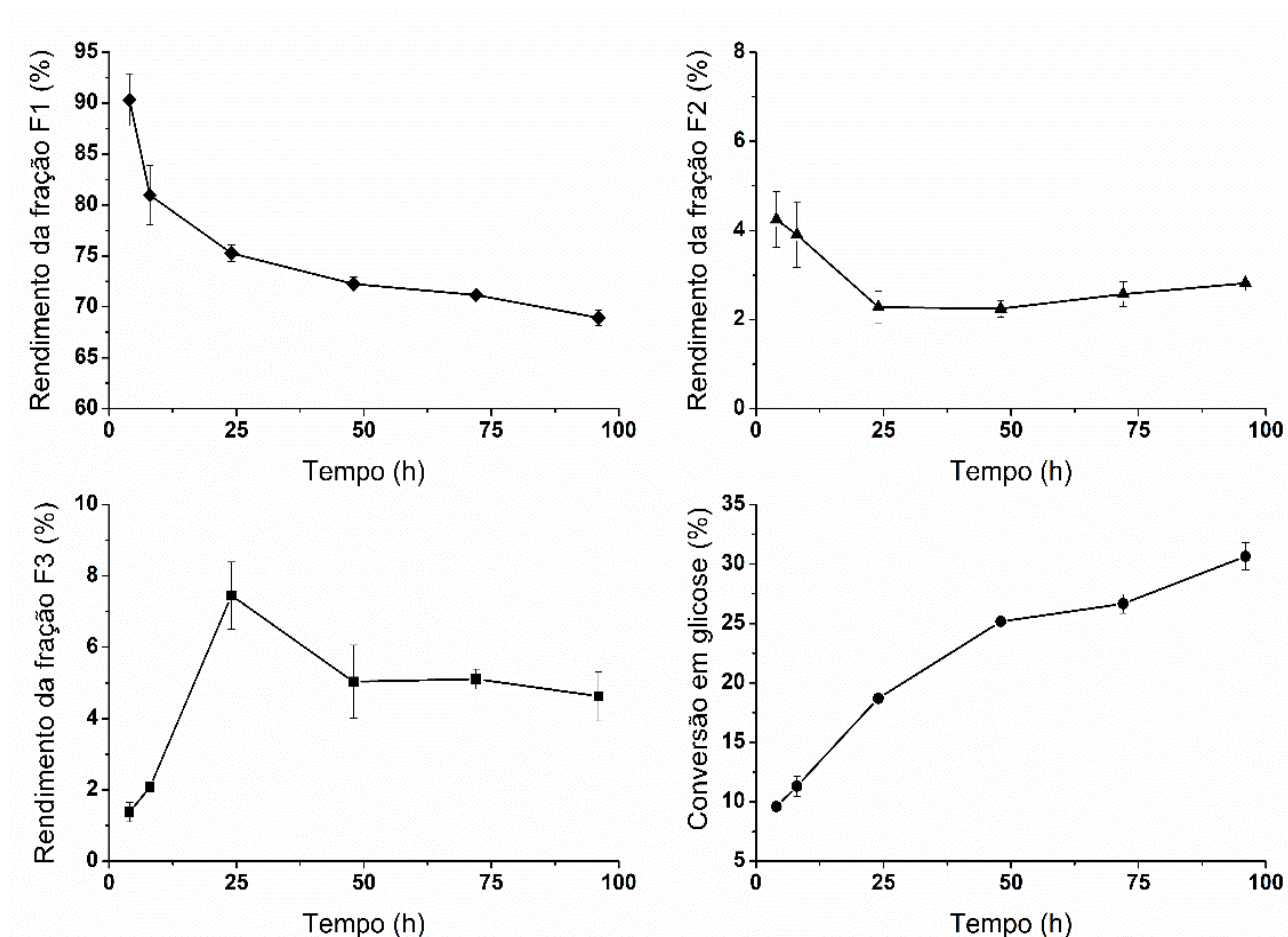


Figura 2. Rendimento das fibras das frações F1, F2, F3 e produção de glicose ao longo do tempo.

À medida que o tempo de hidrólise aumenta, observa-se uma diminuição na porcentagem das frações de microfibras (F1 e F2), indicando uma eficiente quebra enzimática das microfibras em componentes menores, incluindo nanofibras (F3) e glicose. O rendimento médio de nanofibras observado foi de aproximadamente 7,5% após 24 horas de hidrólise. Rendimentos mais altos durante esse período podem ser atribuídos à ação contínua e sinérgica das enzimas, seguida por subsequente redução do rendimento por causa da conversão das fibras em açúcares. É amplamente aceito que

períodos mais longos de hidrólise enzimática resultam em uma maior degradação das fibras em açúcares (Hideno et al., 2016).

Esses resultados oferecem informações valiosas sobre a hidrólise enzimática do algodão e seu potencial para a produção de nanofibras de celulose. No entanto, destacam a importância da otimização da reação para aumentar os rendimentos. Mais investigações são necessárias para ajustar os parâmetros da reação e alcançar rendimento de nanofibras de celulose.

Potencial Zeta

O comportamento coloidal foi avaliado pelo potencial Zeta (PZ), um parâmetro crítico para avaliar as tendências de agregação em diferentes meios e pHs (Kumar, 2021). As nanofibras de celulose apresentaram valores de $-15,7 \pm 1,7$ mV e $-12,0 \pm 2,3$ mV em dispersões aquosas de 0,01 M KCl e 0,01 M KNO_3 , respectivamente. Esses valores são consistentes com as cargas relatadas para materiais de celulose, que geralmente variam de -10 mV a -15 mV. Estudos anteriores relataram valores de PZ para hidrolisados de algodão tratados enzimaticamente de -14,63 mV em meio aquoso (Satyamurthy et al., 2011) e -15,87 mV em 0,001 M KCl (Buschle-Diller et al., 2005). Em comparação com as nanofibras hidrolisadas com ácido, geralmente caracterizadas por um PZ variando de -30 mV a -50 mV, por causa da sulfonação da celulose, as produzidas por hidrólise enzimática exibem menor estabilidade coloidal. No entanto, os resultados mostram coloides relativamente estáveis sem a adição de grupos funcionais na superfície das nanofibras, como observado durante a hidrólise ácida com H_2SO_4 (Kumar, 2021). Essa ausência de grupos funcionais adicionados apresenta potenciais vantagens para futuras aplicações.

Conclusão

Este estudo contribui para o avanço de materiais biodegradáveis, produzindo com sucesso microfibras e nanofibras em formato de agulha a partir de algodão por meio de hidrólise enzimática. O maior rendimento de nanofibras foi obtido após 24 horas de reação. As nanofibras produzidas são estáveis, com potencial Zeta negativo. Esses resultados sugerem que a hidrólise enzimática do algodão tem o potencial de produzir nanofibras de celulose em condições brandas sem uso de produtos químicos. Estudos adicionais são necessários para otimizar as condições de reação e explorar aplicações específicas.

Referências bibliográficas

- BUSCHLE-DILLER, G.; INGLESBY, M. K.; WU, Y. Physicochemical properties of chemically and enzymatically modified cellulosic surfaces. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 260, n. 1-3, p. 63-70, 2005.
- HIDENO, A.; ABE, K.; UCHIMURA, H.; YANO, H. Preparation by combined enzymatic and mechanical treatment and characterization of nanofibrillated cotton fibers. **Cellulose**, v. 23, n. 6, p. 3639-3651, 2016.
- JACOB, P. J. S. Cotton based cellulose nanocomposites: synthesis and application. In: JACOB, P. J. S. **Cotton**. [S.l.]: IntechOpen, 2022.
- KUMAR, D. **Nanocellulose and its composites for water treatment applications**. Boca Raton: CRC Press, 2021.
- MEYABADI, T. F.; DADASHIAN, F. Optimization of enzymatic hydrolysis of waste cotton fibers for nanoparticles production using response surface methodology. **Fibers and Polymers**, v. 13, n. 3, p. 313-321, 2012.
- RICKWOOD, D.; GRAHAM, J. Centrifugation techniques. In: **ENCYCLOPEDIA of Life Sciences**. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2015. p. 1-7.
- SATYAMURTHY, P.; JAIN, P.; BALASUBRAMANYA, R. H.; VIGNESHWARAN, N. Preparation and characterization of cellulose nanowhiskers from cotton fibers by controlled microbial hydrolysis. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 1, p. 122-129, 2011.
- ZHAI, X.; XIANG, Y.; TIAN, Y.; WANG, A.; LI, Z.; WANG, W.; HOU, H. Extraction and characterization of cellulose nanocrystals from cotton fiber by enzymatic hydrolysis-assisted high-pressure homogenization. **Journal of Vinyl and Additive Technology**, v. 27, n. 4, p. 781-794, 2021.